



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT'DE
MİTOKONDRIYAL DNA KONTROL BÖLGESİ
NÜKLEOTİT VARYASYONLARI VE OLASI
HAPLOTİPLERİN HASTALIĞIN
PATOGENEZİYLE İLİŞKİSİ**

BURCU HASTÜRK
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Fatih Eren

İSTANBUL
2017

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Yüksek Lisans
Anabilim Dalı : Tıbbi Biyoloji Ve Genetik
Tez Sahibi : Burcu Hastürk
Tez Başlığı : Non-Alkolik Steatohepatit'de Mitokondriyal DNA Kontrol Bölgesi Nükleotit Varyasyonları Ve Olası Haplotiplerin Hastalığın Patogeneziyle İlişkisi
Sınav Yeri : Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Anabilim Dalı
Sınav Tarihi : 23/05/2017

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman	Kurumu
Doç. Dr. Fatih Eren	M.Ü. Tıbbi Biyoloji Ve Genetik AD
Sınav Jüri Üyeleri	
Prof. Dr. S. Ayşe Özer	M.Ü. Tıbbi Biyoloji Ve Genetik AD
Doç. Dr. Rıfat Bircan	NKÜ. Biyoloji Bölümü AD

İmza



Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 1 2017 tarih ve 44 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Burcu Hastürk

B. Hastürk

I. ÖN SÖZ

Bu tez, iki güzel insanın sayesinde vücut buldu. Onlar benim ilk öğretmenim; fedakâr anne ve babam.

Karşılık beklemeden, esirgmeden bilgi ve tecrübelerini benimle paylaştılar. Birçok şeyi onlardan öğrendim. Benim de savunduğum, ideal bir yaşam tasavvur ettiniz. İtiraf etmeliyim ki, inanmak üzereydim.

Ne yazık ki evren, sizin bahsetmekten kaçındığınız bir mekanizmaya bağlı olarak işliyor. Bildiğiniz gibi, buldukları ortama en iyi şekilde uyum sağlayan canlılar hayatta kalırken, diğerleri eleniyor.

Binbir güçlükte elde ettiğimiz desteği yabancı sermayeli şirketlere vermekten hoşnut değilim. Çalışıyoruz ama pastanın en büyük dilimini onlar kapıyor, kaybediyoruz, üzülüyorum.

Eğitim ve öğretimdeki fırsat eşitsizliğinin yarattığı sorunların üstesinden gelebiliriz. İnternet çağındaki şu günlerde bilgiye kolayca ulaşmak mümkün. Yeter ki isteyelim ve bahanelerden kurtulalım. Böylece üreten ya da dejenere bir toplum olma yönündeki çok önemli bir karara sirayet etmiş oluruz.

Kuşkusuz okullar ve üniversiteler yardımıyla dünya tarihine yön verecek insanlar bu topraklarda yetişecektir. O günleri sabırsızlıkla ve özlemle bekliyorum.

"Ya öğreten, ya öğrenen, ya dinleyen ya da ilmi seven ol. Fakat sakın beşincisi olma; (bunların dışında kalırsan) helâk olursun" (Hz. Muhammed).

"Bir milleti özgür, bağımsız, görkemli, yüce bir toplum halinde yaşatan terbiyedir ve onu tutsak yapan sefalet iten de bunun yokluğudur. Tehdit esasına dayanan ahlak, bir fazilet olmadıktan başka itimada da şayan değildir" (Mustafa Kemal Atatürk).

Bu satırlar, her şeyden çok sevdiğim ailem ve güzel ülkem için kaleme alındı.

Tez çalışmam ile birlikte sağlam akademik temeller atmama vesile olan, bu süreçte bana yol gösteren ve emek veren, değerli tez danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Fatih Eren'e,

Bilgi ve tecrübesinden yararlandığım saygıdeğer hocam, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. S. Ayşe Özer'e,

Yüksek lisans eğitimim boyunca aldığım derslerle beni bilimsel çalışmalara hazırlayan değerli hocalarım, Sayın Doç. Dr. Mustafa Akkiprik'e, Sayın Doç. Dr. Ahmet İlter Güney'e ve lisansüstü eğitimi sevdiren, örnek aldığım değerli hocam, Sayın Yrd. Doç. Dr. Can Erzik'e,

Marmara Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda iyiliğini, tavsiyelerini ve yardımlarını esirgemeyen, Arş. Gör. Sayın Ebubekir Dirican'a, Arş. Gör. Sayın Duygu Bircan Kadioğlu'na, bölümde oryantasyonu sağlayarak hayatımı kolaylaştıran, Arş. Gör. Sayın Gökçe Güllü Amura'ya, doktora öğrencisi Sayın İrem Peker Eyüboğlu'na ve değerli büyüğüm yüksek biyolog Sayın Serap Sevil Şahin'e,

Deney aşamalarımda laboratuvar olanaklarından faydalandığım sürece gösterdiği ilgi ve sabrı için, Marmara Üniversitesi GEMHAM Araştırma Asistanı Sayın Ayşe Mine Yılmaz'a,

Lisans derslerimi aldığım saygıdeğer hocalarıma,

Manevi desteklerini her zaman hatırlayacağım, değerli büyüğüm Havva Balcılar'a ve değerli büyüğüm Kader Kılıç Kahraman'a,

Kıymetli dostlarım, Çiğdem, Leyla ve Songül'e, ablama teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-YLP-131016-0439 numaralı proje ile desteklenmiştir.

17/04/2017

Saygılarımla,

Burcu Hastürk

II. İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
I. ÖN SÖZ	i, ii
II. İÇİNDEKİLER	iii
III. KISALTMA ve SİMGELER	v
IV. ŞEKİL, RESİM ve TABLOLAR	x
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	4
4.1. Non-Alkolik Steatohepatit	4
4.1.1. Epidemiyoloji	5
4.1.2. Etyopatogenez	6
4.1.3. Tanı	10
4.1.4. Genetik faktörler	12
4.2. Mitokondrinin Yapısı	14
4.2.1. Mitokondriyal genom	15
4.2.2. Mitokondriyal DNA replikasyon ve transkripsiyon mekanizması	17
4.2.3. Mitokondrinin organizmadaki rolü	22
4.2.4. Mitokondriyal metabolizma ve insülin direnci	23
4.2.5. Mitokondriyal DNA kontrol bölgesi nükleotit varyasyonları ve NASH	25
5. GEREÇ ve YÖNTEM	26
5.1. Çalışma Grupları	26
5.2. Periferel Kandan Genomik DNA İzolasyonu	26

5.3. PZR-RFLP Analizi	27
5.3.1. Kullanılan primerler ve restriksiyon enzimi	27
5.3.2. mtDNA kontrol bölgesi 16189 T/C in-silico <i>MnI</i> PZR-RFLP tayini	27
5.3.3. PZR amplifikasyonu	29
5.3.4. PZR amplifikasyonu sonrası DNA miktarının belirlenmesi	30
5.3.5. PZR ürünlerinin <i>MnI</i> enzimi ile kesimi	30
5.4. Kapiller Elektroforez DNA Sekanslama	31
5.4.1. PZR ürünlerinin temizlenmesi	31
5.4.2. Sekans reaksiyonunun hazırlanması	31
5.4.3. Ekstensiyon ürünlerinin saflaştırılması	32
5.4.4. Elüsyon ve denatürasyon aşaması	33
5.5. İstatistiksel Analiz	33
6. BULGULAR	34
6.1. Klinik Bulgular	34
6.2. mt16189 T/C <i>MnI</i> PZR-RFLP Bulguları	35
6.3. mtDNA Dizi Analizi Bulguları	37
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	46
8. KAYNAKLAR	54
9. EKLER	63
9.1. EK 1 Çalışmaya Alınma ve Dışlanma Kriterleri	63
9.2. Ek 2 Kullanılan Aletler	64
9.3. Ek 3 Kullanılan Bilgisayar Programları	65
9.4. EK 4 Kullanılan Sarf Malzemeler	66
9.5. Ek 5 Kullanılan Çözeltiler	67
10. ÖZ GEÇMİŞ	68

III. KISALTMA ve SİMGELER

A2M: α 2-makroglobülin

ALT: Alanin aminotransferaz

AP: Atipik patern

Apo: Apolipoprotein

ARMS: Amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi

AS-PZR: Allele-spesifik polimeraz zincir reaksiyonu

Asetil CoA: Asetil koenzim A

ASH: Alkolik steatohepatit

AST: Aspartat aminotransferaz

AS160: 160 kDa Akt substrat

ATP: Adenozin trifosfat

bç: Baz çifti

CO₂: Karbondioksit

CPT: Karnitin palmitoil transferaz

CRS: Cambridge referans dizisi

CSB: Korunmuş dizi bloğu

CT: Bilgisayarlı tomografi

DAG: Diaçilgliserol

ddNTP: Dideoksinükleotit trifosfat

dH₂O: Distile su

D-Loop: Displacement loop

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Deoksinükleotit trifosfat

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EtBr: Etidyum bromür

ERK: Hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar

ETS: Elektron taşıma sistemi

FADH: Flavin adenin dinükleotit

FoxO1: Forkhead kutu proteini 1

FFA: Serbest yağ asidi

FT: Fibro test

GGT/gama GT: Gama glutamil transferaz

GRB2: Büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2

GSK-3: Glikojen sentaz kinaz 3

GWAS: Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları

H₂O: Su

HCC: Hepatoselüler karsinom

HSP: H-zincir promotörü

HVR: Hiper değişken bölge

IR: İnsülin direnci

IRS: İnsülin reseptör substrat

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

LIG: Ligaz

LSP: L-zincir promotörü

MA: Moleküler ağırlık

MetS: Metabolik sendrom

MgCl₂: Magnezyum klorür

MRI: Manyetik rezonans görüntüleme

mRNA: Haberci RNA

mtDNA: Mitokondriyal DNA

MTORC: Rapamisin kompleksinin memeli hedefi

mtSSB: Mitokondriyal tek zincir bağlanma proteini

MT-TF: Mitokondriyal tRNA fenilalanin kodlayan gen

NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit

NaOAc: Sodyum asetat

NASH: Non-alkolik steatohepatit

NAYK: Non-alkolik yağlı karaciğer

NAYKH: Non-alkolik yağlı karaciğer hastalığı

NCAN: Neurocan proteini

nDNA: Nükleer DNA

np: Nükleotit pozisyonu

O_H, O_L: Ağır ve hafif zincir replikasyon orijinleri

OR: Göreceli olasılıklar oranı

oxLDL: Okside düşük dansiteli lipoprotein

OXPHOS: Oksidatif fosforilasyon

PDH: Pirüvat dehidrogenaz

PDK1: Fosfoinositid bağımlı protein kinaz 1

PEO1: Twinkle proteini

pH: Hidrojenin Gücü

PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz

PNPLA3: Patatin benzeri fosfolipaz domain içeren protein-3

POLG: DNA polimeraz γ

POLRMT: Mitokondriyal RNA polimeraz

POP-7: Polimer-7

PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu

RefSeq: Referans dizi

RFLP: Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi

RNA: Ribonükleik asit

ROT: Reaktif oksijen türleri

rRNA: Ribozomal RNA

SHC: Src homoloji 2 alanı

SREBP1c: Sterol düzenleyici eleman bağlama proteini 1c

ST: Steato test

T2D: Tip 2 diyabet

TAG: Triaçilgliserol

TAS: Sonlanma ile ilişkili diziler

TBE: Tris-borik asit-EDTA

TCA: Trikarboksilik asit döngüsü

mTERF: Transkripsiyonu sonlandırma faktörü

TFAM: Mitokondriyal transkripsiyon faktör A

TG: Trigliserit

TLR: Toll benzeri reseptör

TM6SF2: Transmembran-6 süper aile üyesi-2

TNP: Tek nükleotit polimorfizmi

TOP: Topoizomeraz

tRNA: Taşıyıcı RNA

UCP: Uncoupling protein

UV: Morötesi ya da ultraviyole ışık

VKİ: Vücut kitle indeksi

VLDL: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein



IV. ŞEKİL, RESİM ve TABLOLAR

Şekil 1. NASH patogenezinde çoklu paralel vuruş hipotezi

Şekil 2. ASH ve NASH’de g¼nl¼k alkol t¼ketime

Şekil 3. İnsan mitokondriyal DNA’sı

Şekil 4. Mitokondriyal genomun maternal kalıtımı

Şekil 5. İnsan mitokondriyal genomu, transkripsiyon promot¼rleri ve replikasyon orjinlerinin pozisyonları

Şekil 5a. mtDNA replikasyon mekanizması

Şekil 5b. Kesintisiz ve kesintili zincir sentezi

Şekil 6. Oksidatif metabolizma boyunca glikoliz, TCA ve β -oksidasyonuyla, NADH veya $FADH_2$ ’i indirgeyerek glikoz ve yağ asitlerinin ¼retilmesi

Şekil 7. İns¼lin sinyal yolu.

Resim 1. Normal karaciğer dokusu (A) ile basit stetoza dokusu (B) arasında hepatositlerde yağ birikimi karşılaştırması

Resim 2. NASH patogenezinde çift vuruş hipotezi

Resim 3. NAYKH’nin histolojik alt tipleri ve hastalığın ilerleyişindeki etkileri

Resim 4. Karaciğer biyopsisi

Resim 5. Mitokondrinin bileşenleri

Resim 6. Mitokondri sirk¼ler genomun taramalı elektron mikroskop g¼r¼nt¼s¼

Resim 7. PZR ve PZR-RFLP jel g¼r¼nt¼leri

Resim 8. Dizi analizi kromatogram g¼r¼nt¼leri

Tablo 1. NAYKH’nin tipleri

Tablo 2. mtDNA sentezine katılan, n¼kleer fakt¼rlerin kodladığı genler

Tablo 3. Mitokondriyal genomun transkripsiyon ¼r¼nleri

Tablo 4. Polimorfizm tayini i¼in kullanılan primer dizileri ve restriksiyon enzimi

Tablo 5. mtDNA T16189T; rs28358586 in-silico *MnII* PZR-RFLP

Tablo 5a. mtDNA T16189C; rs28358586 in-silico *MnII* PZR-RFLP

Tablo 6. Hedef bölgenin PZR protokolü

Tablo 6a. Termal döngü cihazı programı

Tablo 7. PZR amplifikasyonu sonrası *MnII* enzim kesim bileşenleri

Tablo 8. Sekans reaksiyonu

Tablo 8a. Döngüsel dizileme tepkimesinin programı

Tablo 9. NASH'li hastaların klinik bulgularına göre demografik ve biyokimyasal karakterleri

Tablo 10. mtDNA 16189 T/C *MnII* PZR-RFLP Sonuçları

Tablo 11. Restriksiyon enzimi *MnII* atipik paternler motifi ile parçaların uzunluğu (bç)

Tablo 12. mtDNA dizi analizi sonuçları: Yaygın ve nadir nükleotit varyasyonları

Tablo 12a. mtDNA dizi analizi sonuçları: Di-nükleotit ve tri-nükleotit varyasyonları

Tablo 12b. mtDNA dizi analizi sonuçları: NASH grubu ile mtDNA varyantları arasındaki ilişki

Tablo 12c. mtDNA dizi analizi sonuçları: Haplogruplar ve lokal özel mutasyonlar

NON-ALKOLİK STEATOHEPATİT'DE MİTOKONDRIYAL DNA KONTROL BÖLGESİ NÜKLEOTİT VARYASYONLARI VE OLASI HAPLOTİPLERİN HASTALIĞIN PATOGENEZİYLE İLİŞKİSİ

Öğrenci: Burcu Hastürk

Danışman: Doç. Dr. Fatih Eren

Anabilim Dalı: Tıbbi Biyoloji ve Genetik

1. ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, mitokondriyal DNA (mtDNA) kontrol bölgesinde yer alan T16189C gibi yaygın varyantlar ile non-alkolik steatohepatit (NASH) arasındaki ilişki araştırıldı. **Gereç ve Yöntem:** 150 NASH ve 150 sağlıklı kontrol bireyin yaş ve cinsiyeti eşleştirildi. "Endonükleaz *MnII* enzimi" kullanılarak restriksiyon parça uzunluk polimorfizm (RFLP) analizi ile mtDNA 16189 np genotipleri incelendi ve doğrudan dizi analizi ile mtDNA kontrol bölgesi (15911-16540 np) varyasyonları saptandı. **Bulgular:** T16189C polimorfizmi açısından gruplar arasında anlamlı bir fark yoktu, ancak atipik RFLP bant paternlerine sahip bireyler tespit edildi ve dizi analizi ile sınıflandırıldı. Yeni bir mutasyon (C16053G) ve iki yeni heteroplazmik varyasyon (16234 C-CT; 16256 C-CT) tanımlandı. Ayrıca üç tri-nükleotit polimorfizmi (C16294-C16295-C19296, TTT; C16187-C16188-T16189, TAC; C16187-C16188-T16189, TGC) bulundu. Katılımcıların tümü R makro-haplogrubu, H2a2a1 haplotipi idi. Bu varyasyonlar arasında, NASH grubu içinde, mtDNA kontrol bölgesi nükleotit varyasyonlarından bazıları istatistiksel olarak anlamlı bulundu. **Sonuçlar:** mtDNA kontrol bölgesi nükleotit varyasyonlarının NASH patogenezi üzerindeki etkisinin daha geniş çalışma gruplarında araştırılmasının önemi anlaşıldı. Atipik paternlere neden olan nükleotit kombinasyonlarının varlığı nedeniyle, kullanılan *MnII* PZR-RFLP analizinin, T16189C polimorfizmini tespit etmekte hassas bir yöntem olmadığı ortaya çıkarıldı. mtDNA T16189C varyantını *MnII* PZR-RFLP ile araştıranların, doğru sonuçları bildirmek adına yayınlarını revize etmesi gerektiği anlaşıldı.

Anahtar Sözcükler: Polimorfizm, mutasyon, haplotipler, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi, dizi analizi.

THE ASSOCIATION OF MITOCHONDRIAL DNA CONTROL REGION NUCLEOTIDE VARIATIONS AND THEIR POTENTIAL HAPLOTYPES WITH THE PATHOGENESIS OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS

Student: Burcu Hastürk

Advisor: Assoc. Prof. Fatih Eren

Department: Medical Biology and Genetics

2. SUMMARY

Aim: In this study, the relationship between non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and common variants such as T16189C in the mitochondrial DNA (mtDNA) control region was investigated. **Materials and Methods:** We matched 150 NASH and 150 healthy controls for age and sex. We detected mtDNA np 16189 genotypes by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis with *MnII* enzyme and identified mtDNA control region (np 15911-16540) variations by direct sequencing analysis. **Findings:** There was no significant difference between groups for T16189C polymorphism, but we individuals with atypical RFLP banding patterns were identified and classified. A novel mutation (C16053G), two new heteroplasmic variations (16234 C-CT; 16256 C-CT) were determined. Also, three trinucleotide polymorphisms (C16294-C16295-C19296, TTT; C16187-C16188-T16189, TAC; C16187-C16188-T16189, TGC) were found. All of the participants were H2a2a1 haplotype. Among these variations, there were statistically significant some of the nucleotide variations in the mtDNA control region in the NASH group. **Results:** It was understood that the effect of nucleotide variations on the pathogenesis of NASH in the mtDNA control region should be investigated in larger study groups. Due to the presence of nucleotide combinations causing atypical patterns, the *MnII* PCR-RFLP assay used was found to be non-sensitive to detect T16189C polymorphism. It was understood that those who studied the T16189C variant with *MnII* PCR-RFLP should revise their publications to report the correct results.

Key words: Polymorphism, mutation, haplotypes, restriction fragment length polymorphism, sequence analysis.

3. GİRİŞ ve AMAÇ

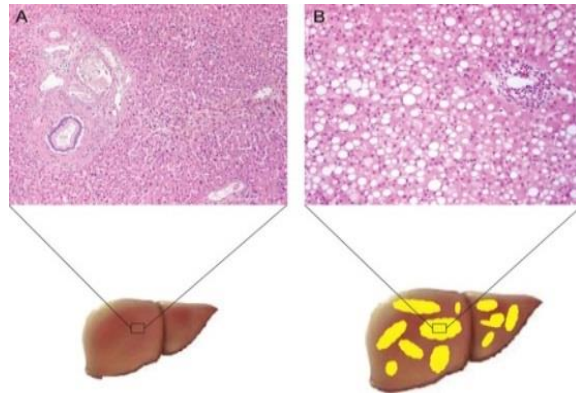
Dünya genelinde NAYKH ve NASH en yaygın görülen kronik karaciğer hastalığıdır. Obezite, tip 2 diyabet (T2D) ve metabolik sendrom (MetS) ile yakından ilişkilidir (Tuyama ve Chang, 2012). Diyabet ve obezite epidemileri, yağlı karaciğer hastalığı prevalansının artmasına yol açmaktadır (Cusi, 2012). NAYKH ve NASH, genellikle asemptomatik serum alanin aminotransferaz (ALT) ve gama glutamil transferaz (gama GT/GGT) değeri yüksekliği ile ilişkilidir. Karaciğerde yağ infiltrasyonu varlığında ultrason takibi önerilmekte, ancak NAYKH ve NASH arasındaki kesin ayırım için ciddi komplikasyon riski olan karaciğer iğne biyopsisi gerekmektedir. Bu ayırım önemlidir, çünkü NAYKH içerisinde NASH'in, fibroz ve siroza ilerleme riski daha yüksektir. Hepatoselüler karsinom (HCC) için NASH'li hastalar önemli risk grubudur. NASH'te karaciğer fonksiyon bozukluğu, HCC oluşumuna ve karaciğer transplantasyonuna neden olabilmektedir (Farrell ve ark., 2005). NASH'in genellikle asemptomatik seyri hastalığın erken teşhisini engellemektedir. Bu nedenle, karaciğerde sinsi olarak ilerleyen NASH hastalığını predikte edebilecek non-invaziv moleküler biyo-belirteçlerin bulunması önemli bir araştırma konusudur. mtDNA'nın kodlama yapmayan kontrol bölgesi polimorfizmlerinden 16189 baz çifti (bç) pozisyonunda T>C transisyonunun, NASH hastalarının büyük bir bölümünde görülen insülin direnci (IR), T2D ve obezite ile ilişkili olduğu öngörülmektedir (Liou ve ark., 2007). Bu veriler ışığında, mtDNA kontrol bölgesi nükleotit varyasyonlarının NASH hastalığıyla ilişkisinin incelenmesi önemli bir araştırma konusudur. Bir önceki çalışmamızda, NASH hastalarının mtDNA kontrol bölgesi 16189 T/C tek nükleotit polimorfizmi (TNP) incelenmiş ve atipik RFLP paternleri saptanmıştır (Güner, 2014). Bu paternlerin, hedef mtDNA kontrol bölgesindeki nükleotit varyasyonlarıyla kalıtsal birliktelik gösteren haplotiplerin varlığını işaret ettiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızda bilinmeyen bu varyasyonların tespit edilmesi ve NASH ile ilişkisinin ortaya çıkarılması için, toplam 300 bireyden (150 biyopsi kanıtı NASH hastası, 150 sağlıklı kontrol birey) alınan periferik kanlarda, mt16189 T/C polimorfizmini, *MnII* PZR-RFLP yöntemiyle belirlemeyi ve mtDNA kontrol bölgesinin dizi analizini gerçekleştirmeyi amaçladık.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Non-Alkolik Steatohepatit

NAYKH ve komplike formu NASH, kronik karaciğer hastalığının yaygın nedenleri arasında bulunmaktadır (Matteoni ve ark., 1999). NAYKH, hepatik parankim içerisinde yağ birikmesi (>%5) olarak tanımlanmakta, bununla beraber inflamasyon ve hücresel hasar görülmemektedir. Diğer taraftan NASH, karaciğerde yağ varlığının yanısıra inflamasyon ve/veya Mallory cisimcikleri, hepatositlerde balonlaşma dejenerasyonu ile karakterizedir (Sanyal ve ark., 2011). NAYKH, karaciğerde yağ birikimine yol açan ikincil nedenlerden; ciddi alkol tüketimi, hepatit C virüsü enfeksiyonu, ilaç toksisitesi ve diğer medikal koşullar dışlanarak, karaciğerde yağ varlığı olarak tanımlanmaktadır (Puri ve Sanyal, 2012) (Resim 1). İkincil nedenler, karaciğerde yağ infiltrasyonuna neden olabilmesine rağmen, NAYKH ağırlıklı olarak obezite ve MetS ile ilişkilidir. Bu yüzden diğer kronik karaciğer hastalıkları hariç tutularak NAYKH tanısı konulmaktadır (Mcavoy ve ark., 2006). NAYKH, basit yağlanma ve NASH'e kadar değişken, geniş bir aralığı kapsamaktadır. NAYKH oransal olarak daha yaygın olmasına rağmen, NASH hastalarında siroza ilerleme daha fazla görülmektedir. Bu nedenle NASH, NAYKH içerisindeki en ciddi durum olarak kabul edilmektedir. Matteoni ve ark.'larının literatürde yer alan NAYKH sınıflandırması Tablo 1'de verilmiştir (Matteoni ve ark., 1999).



Resim 1. Normal karaciğer dokusu (A) ile basit stetozluklu doku (B) arasında hepatositlerde yağ birikimi karşılaştırması (Bhatia ve ark., 2012'den değiştirilerek alındı.)

Tablo 1. NAYKH'nin tipleri (Matteoni ve ark., 1999'dan değiştirilerek alındı.)

Tip I	Basit steatoz (inflamasyon veya fibroz yok)
Tip II	Steatoz ile lobüler inflamasyon
Tip III	Steatoz, inflamasyon ve değişken derecede fibroz (NASH)
Tip IV	Steatoz, inflamasyon, balonlu hücreler, Mallory cisimciği veya fibroz (NASH)

4.1.1. Epidemiyoloji

NASH dünya çapında giderek yaygınlaşan kronik karaciğer hastalığıdır ve obezite, IR, T2D, arteriyal hipertansiyon ve hipertrigliseridemi ile yakından ilişkilidir (Abbas ve ark., 2012; Lonardo ve ark., 2005).

Günümüzde NAYKH sanayi ülkelerinde genel nüfusun %20-40'ında görülmektedir ve kronik karaciğer hastalığının en yaygın görülen grubudur (Farrell ve ark., 2005). Obez ve diyabetlilerde prevalansı fazladır (Clark ve ark., 2002). Dünya nüfusunda diyabet ve obezite epidemisi görülmektedir. 2008'de yayınlanan verilere göre dünyada en az 1 milyar 46 milyon yetişkin birey, 170 milyon çocuk aşırı şişman veya obezdir (Abbas ve ark., 2012). ABD'de yaklaşık 6 milyon bireyin NASH hastası olduğu ve 600 bin bireyde de NASH ile ilişkili olarak siroz gelişeceği tahmin edilmektedir (Ong ve Younossi, 2007). NAYKH'nin %10-20'sinde, NASH'e ilerleme görülmektedir. NASH'in batı ülkelerinde prevalansı yaklaşık %2-6'dır. ABD'de NASH genel nüfusun yaklaşık %5-6'sını etkilemektedir (Farrell ve ark., 2005). ABD'de NAYKH prevalansı erkeklerde kadınlara göre 3-5 kat daha fazladır, erkeklerde yüksek vücut kitle indeksi (VKİ) bildirilmiştir (Bahcecioglu ve ark., 2006).

ABD'de NAYKH prevalansı özellikle Hispanik (%28) ve Asya (%20-30) kökenli olanlardan daha yüksektir (Weston ve ark., 2005). Amerika ve diğer sanayi ülkelerinde obezite dramatik olarak artmakta ve buna bağlı olarak NAYKH ve NASH prevalansı yükselmektedir (Tuyama ve Chang, 2012). Obezitenin prevalansında kültürel ve coğrafi farklılıklar önemlidir. Zengin ya da fakir ülkelerin her ikisinde de yaygın karaciğer hastalıkları içinde yükselmeye devam eden NASH belirtileri, halk sağlığını ve sağlık masraflarını etkileyerek, küresel bir yük haline geleceğini işaret etmektedir (Abbas ve ark., 2012).

4.1.2. Etyopatogenez

NASH, NAYKH'nin en ağır histolojik formunu temsil etmektedir. NASH, karaciğerde %5'i aşan yağ birikimi, lobüler inflamasyon, hepatositlerde balonlaşma ve değişken derecelerde fibrozun eşlik ettiği durumlar olarak tanımlanmaktadır.

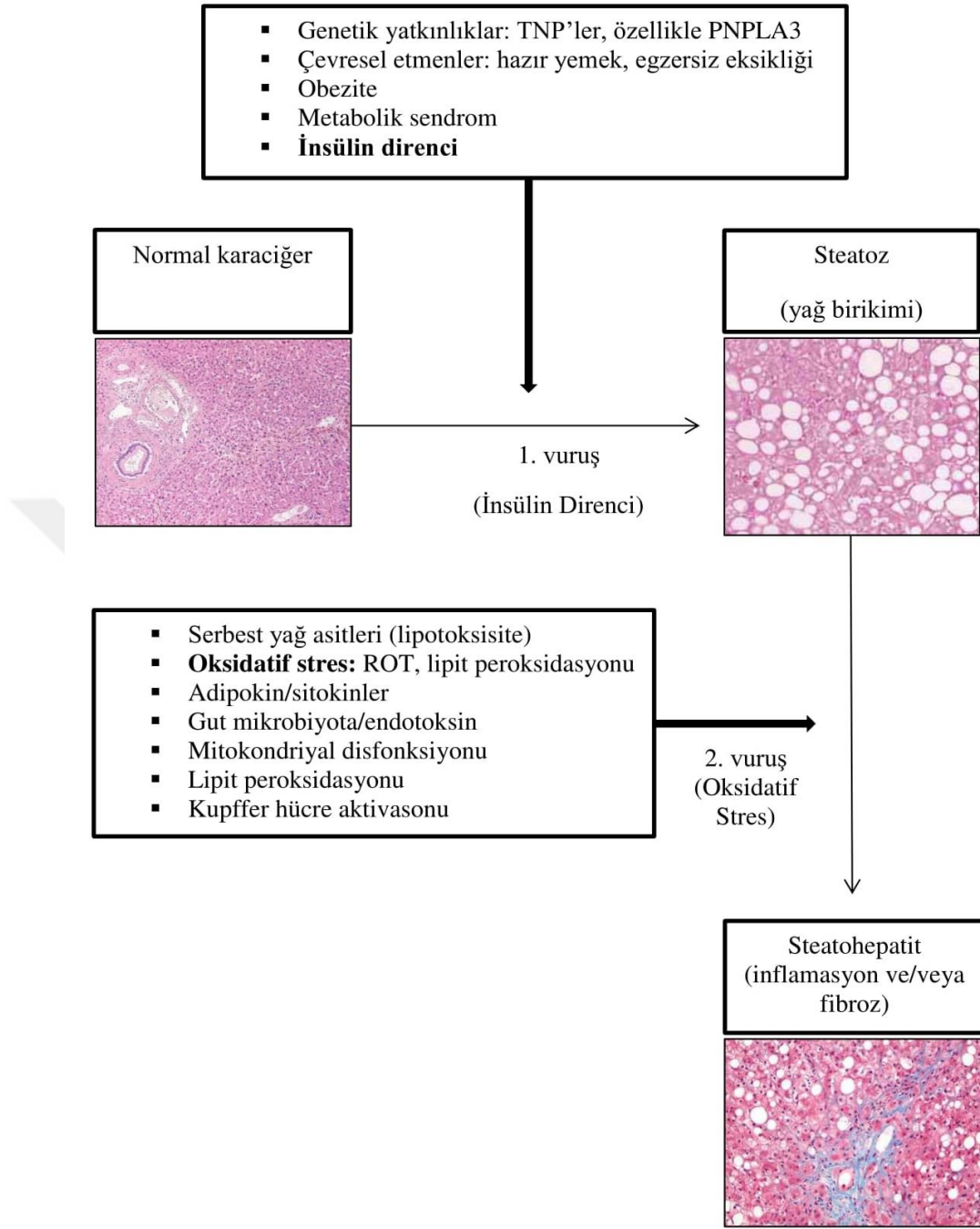
Obeziteyle ilişkili NAYKH patogenezinin merkezinde IR yer almaktadır. Ayrıca, genetik yatkınlığı olan bireylerde steatoz ve ilerleyen karaciğer hasarlarında, oksidatif stres ve sitokinler, birlikte etki gösteren faktörlerdir.

NASH'in histolojik bileşenleri, steatoz, hepatositlerde balonlaşma ve lobüler inflamasyondur; fibroz NASH'in histolojik tanımının bir parçası değildir, ancak, karaciğer biyopsisinde fibrozun derecesi prognozu predikte ederken, inflamasyon ve nekroz derecesini predikte etmemektedir. Hastalık yıllarca semptom göstermeden kalabilmekte, siroz ve HCC'ye kadar ilerleyebilmektedir (Abbas ve ark., 2012).

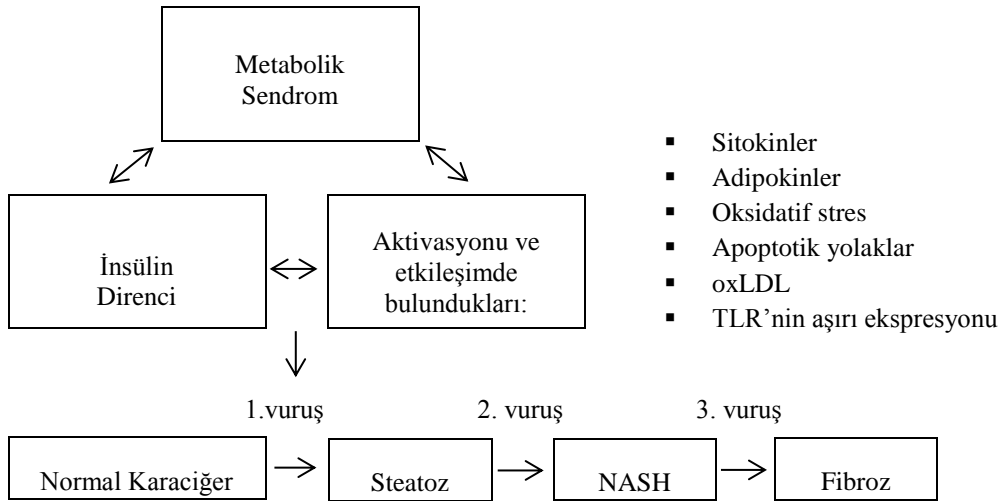
Day ve ark. tarafından 1998'de NAYKH için günümüzde de geçerliliğini koruyan "çift vuruş" hipotezi önerilmiştir (Resim 2). Birinci vuruşta, hepatositlerde trigliserit ve serbest yağ asitlerinin birikimi meydana gelmekte, günlük diyetin ve hepatik lipogenezin artmasıyla, IR oluşmaktadır. İkinci vuruş, lipit peroksidasyonu, mitokondriyal disfonksiyon ve inflamasyonu kapsamaktadır, hepatositlerde hasar ve karaciğerde fibrozun gelişmesine neden olmaktadır (Day ve James, 1998).

2010 yılında Tilg ve Moschen tarafından NASH'in patogenezini açıklamak için yeni bir görüş olarak "çoklu paralel vuruş" hipotezi bildirilmiştir (Tilg ve Moschen, 2010). Bu hipotez, endoplazmik retikulum stresi ve sitokin aracılı stres ile steatozun yanı sıra nekroinflamasyonu indükleyerek çoklu vuruşlarla birlikte NASH'in gelişiminde rol oynadığını öne sürmektedir (Şekil 1).

NASH'in patogenezi için evrensel olarak kabul gören "çoklu vuruş" hipotezinde, farklı proteinler ve immün bileşenler; IR ve proinflamatuvar sürece aracılık etmektedirler. MetS, NASH patogenezinde merkezi role sahiptir. Günümüzde her bir farklı hasta için çoklu vuruşların kimliği büyük ölçüde belli değildir (Abbas ve ark., 2012).



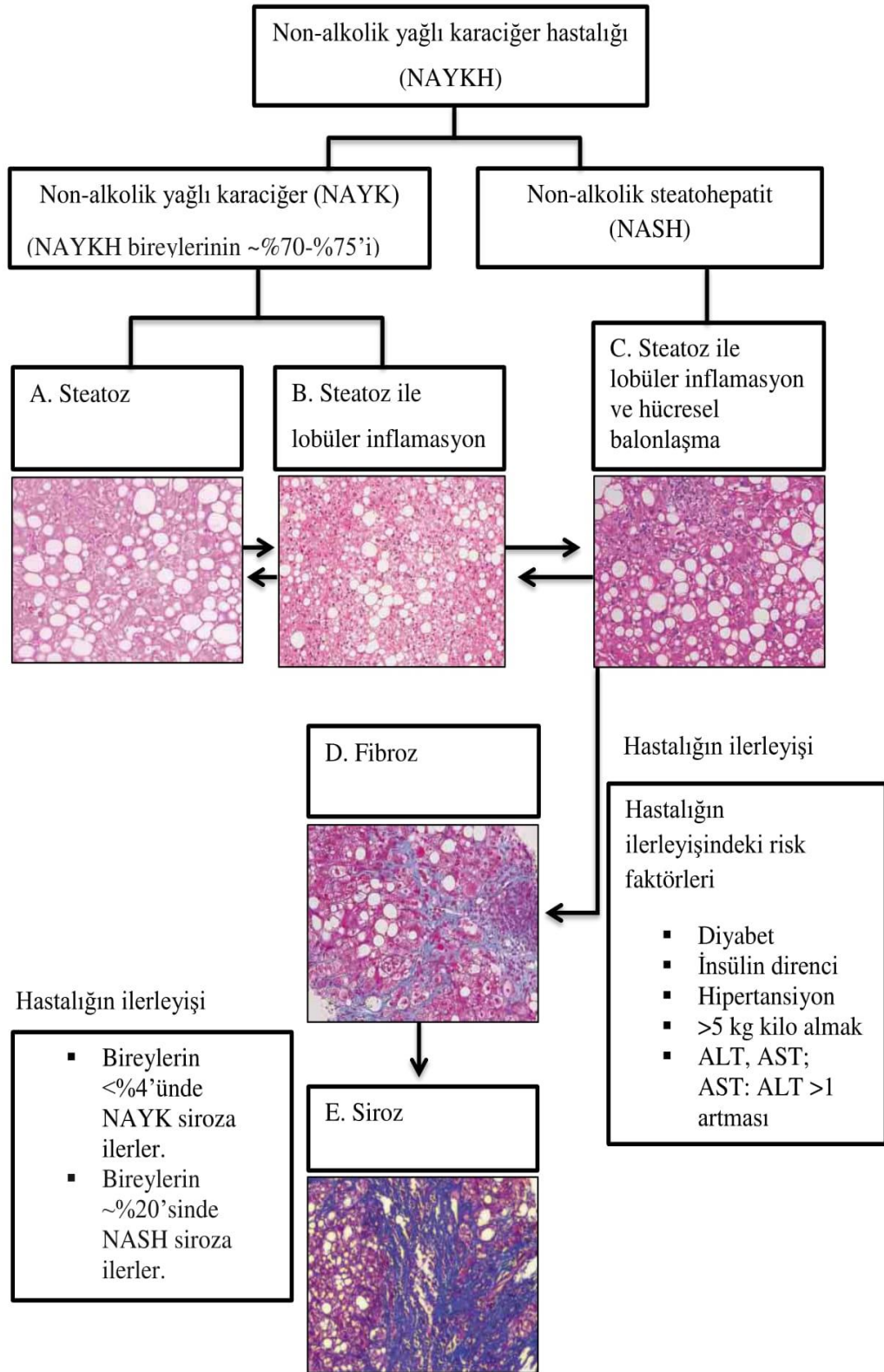
Resim 2. NASH patogenezinde çift vuruş hipotezi (Yang ve ark., 2014'ten değiştirilerek alındı.)



Şekil 1. NASH patogenezinde çoklu paralel vuruş hipotezi (Kısaltmalar, oxLDL: Okside düşük dansiteli lipoprotein, TLR: Toll benzeri reseptör) (Abbas ve ark., 2012'den değiştirilerek alındı.)

"Çift vuruş" ve "çoklu vuruş" hipotezlerinin her ikisinde de genel olarak, NAYKH spektrumu altındaki teorik yapı, hastalığın doğrusal ilerleyişi nedeniyle az şiddetli olandan daha şiddetli formlara doğru zaman içinde yavaşça biriken hepatik hasarları ele almaktadır (Tilg ve Moschen, 2010).

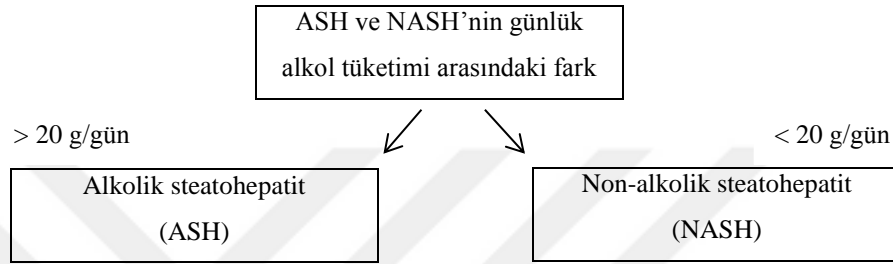
Bununla birlikte, doğrusal ilerleme modeline alternatif olarak, NAYKH'nin her bir sınıfı için (steatoz, fibroz, NASH) farklı patogenetik yollar boyunca tek bir hastalığın geliştiği bilinmektedir (Resim 3). Bu patofizyolojik mekanizmaların belirlenmesi, NAYKH'nin biyolojik yapısının iyi anlaşılmasına ve böylelikle klinisyenlerin metabolik karaciğer hastalığının her bir özel formu için kişiye yönelik uygun tedaviyi uygulamasına imkân tanıyacaktır. NAYKH'nin patofizyolojik kavramlarına ilişkin olarak "çoklu vuruş" hipotezinin, "farklı vuruş" modeline revize edilmesi gerekmektedir (Yılmaz, 2012).



Resim 3. NAYKH'nin histolojik alt tipleri ve hastalığın ilerleyişindeki etkileri (Rinella, 2015'ten değiştirilerek alındı.)

4.1.3. Tanı

NAYKH ve NASH tanısı için alkol tüketimi hakkında geçerli bir raporlama gerekmektedir. Günlük alkol tüketiminde kabul edilen eşik değer 20 g'dir. Belirlenen bu kritik, tanısal olarak alkolik steatohepatit (ASH) ve NASH arasında ayırım sağlamak için kullanılmaktadır (Abbas ve ark., 2012; Lonardo ve ark., 2005) (Şekil 2).



Şekil 2. ASH ve NASH'de günlük alkol tüketimi (Stefan ve ark., 2016'dan değiştirilerek alındı.)

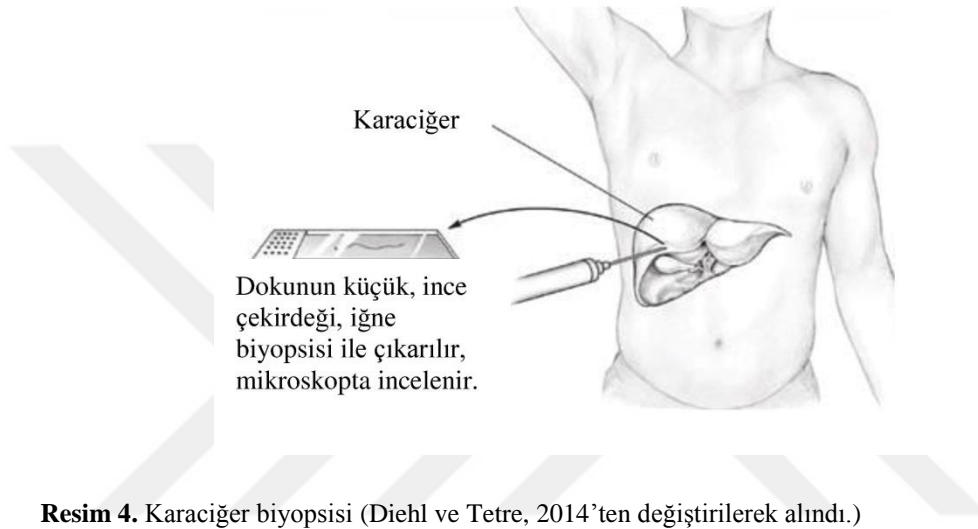
NAYKH'da steatohepatit ve fibrozun değerlendirilmesi açısından yaygın olarak kullanılmakta olan serum aminotransferaz düzeyleri (ALT/AST) ve bilgisayarlı tomografi (CT) taraması, manyetik rezonans görüntüleme (MRI) taraması gibi testler güvenilir bulunmamaktadır. Bu nedenle NAYK hastalarında steatohepatitin belirlenebilmesi için non-invaziv biyo-belirteçlerin geliştirilmesi son derece önemlidir (Musso ve ark, 2011).

Non-invaziv diagnostik testler olarak karaciğer fibrozunu öngören "FibroTest" (FT) (Halfon ve ark., 2008) steatozu öngören "SteatoTest" (ST) gibi testler geliştirilmiştir (Ratziu ve ark., 2006) ancak bu testlerin kullanımı henüz yaygınlaşmamıştır (Vuppalachchi ve Chalasani, 2009). FT, total bilirübin, GGT, α 2-makroglobülin (A2M), apolipoprotein A-I (ApoA1) ve haptoglobin (Ratziu ve ark., 2006), ST; ALT, A2M, ApoA1, haptoglobin, total bilirübin, GGT, kolesterol, trigliserit, glikoz düzeyi ve VKİ'yi (Poynard ve ark., 2005), bireylerde yaş ve cinsiyet göz önüne alınarak değerlendirilmesi için tasarlanmış testlerdir.

NASH hastalarında hepatosit hasarının potansiyel mekanizması, serum veya plazmada apoptoz belirteci olan, kaspazla kesilmiş sitokeratin 18 (M30-Apoptoz ELISA) düzeyine bakılarak değerlendirilmektedir (Sowa ve ark., 2013), ancak

NASH'te onkotik nekrozun hasarda ne derece rol oynadığı henüz bilinmemektedir (Feldstein ve ark., 2009).

Diğer karaciğer hastalığı formlarından, inflamasyon ve fibroz şiddetini belirleyerek NASH'in kesin ayrımını sağladığı ortak olarak kabul edilen tek güvenilir uygulama karaciğer iğne biyopsisidir (doku incelemesi) (Adams ve Angulo, 2006) (Resim 4).



NAYKH'da fibrozlu hastaları tespit etmek için non-invaziv yöntemler kullanılmaktadır (Musso ve ark., 2011). Bunlar, NAYKH fibroz skorlama sistemi, geliştirilmiş karaciğer fibroz paneli ve hepatik elastografidir (fibroscan). NAYKH fibroz skorlama sistemi, altı histolojik özelliği içeren (yaş, VKİ, hiperglisemi, platelet sayımı, albümin, AST/ALT oranı) bir formül kullanılarak hesaplanmaktadır (<http://nafldscore.com>, Erişim tarihi: 15 Şubat 2016).

3064 hastayı içeren 13 çalışmanın meta analizine göre, NAYKH fibroz skorlama sistemi ilerlemiş fibroz, ya da sirozu predikte eden kullanışlı bir yöntemdir (Musso ve ark., 2011). Son zamanlarda yapılan meta analizlere göre NAYKH'da fibrozu belirlemek için kullanılan fibroscan, yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olmasına rağmen, yüksek VKİ'li bireylerde başarı oranı düşüktür (Chalasanı ve ark., 2012). Bu problemler obez hastalar için geliştirilen yeni bir prob' la büyük ölçüde giderilmiştir.

4.1.4. Genetik faktörler

Kromozom 22 lokusu: PNPLA3

NAYKH'da genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) tarafından belirlenen ilk varyant 22. kromozom üzerinde bulunan PNPLA3 geni (patatin benzeri fosfolipaz domain içeren protein-3: rs738409 c.444 C>G, p.I148M), yanlış anlamlı TNP'dir (Stefan ve ark., 2016). PNPLA3 rs738409 varyantını taşıyan bireyler, kodon 148'de sitozin yerine guanin nükleotidi gelmesi sonucu, izolösin yerine metiyonin (I148M) amino asidi sentezlemektedir (Romeo ve ark., 2008). PNPLA3 geni adiponütrin proteinini kodlamaktadır, bu protein özellikle hepatosit yağ içeriği artışıyla ilişkilidir (Attar ve ark., 2013). İnsanlarda PNPLA3 geninin başlıca ekspresyonu hepatositlerde intraselüler membranda gerçekleşmektedir, yemekten sonra ve IR boyunca karaciğerde sentezi indüklenmektedir (Dongiovanni ve ark., 2013). PNPLA3 geni rs738409 polimorfizminde normal genotip CC allelleridir. NAYKH'da en yaygın bulunan, CG ve GG allelleridir. Minör (G) allelini homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan NAYKH'da, en kötü şekilde fibroz veya siroza ilerleme görülmektedir (Kotronen ve ark., 2009). Bu polimorfizmde minör allel frekansı Hispaniklerde yüksektir. Bu durumda, agresif NAYKH prevalansı görülmekte ve ALT, AST düzeyleri artmaktadır. PNPLA3 rs738409 varyantı ile NASH ve karaciğer fibroz riski ilişkisi ile, yaş, VKİ veya T2D gibi potansiyel olarak etkili faktörlerden bağımsız artış göstermektedir.

Yapılan meta analizi çalışmalarında I148M polimorfizmi ve NAYKH, neredeyse tüm etnik gruplarda; yetişkinlerde, adölesanlarda, çocuklarda hepatik stetoz ile ilişkili bulunmuştur (Romeo ve ark., 2010a; Romeo ve ark., 2010b). Sonraki çalışmalarda da, 148M varyantının hepatik steatoz için önemli bir risk faktörü olduğu, serbest yağ asidi salınımı, IR, obezite, lipogenezin artması ve lipit metabolizmasının değişimi üzerine etkisi gösterilmiştir (Dongiovanni ve ark., 2013). I148M polimorfizmi steatoz, steatohepatit, fibroz/siroz (Shen ve ark., 2015) ve hepatosellüler karsinom için prediktifdir (Trépo ve ark., 2014).

Kromozom 19 lokusu: TM6SF2

Son zamanlarda GWAS meta-analizleri, NAYKH'la ilişkili olarak kromozom 19 (19p13.11) üzerindeki genleri belirlemiştir. Bunlar: NCAN (neurocan proteini) ve TM6SF2 (transmembran-6 süper aile üyesi-2) genleridir. Bu bölgelerdeki varyasyonlar plazma kolesterolü, trigliserit ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) düzeyleri ile ilişkilidir.

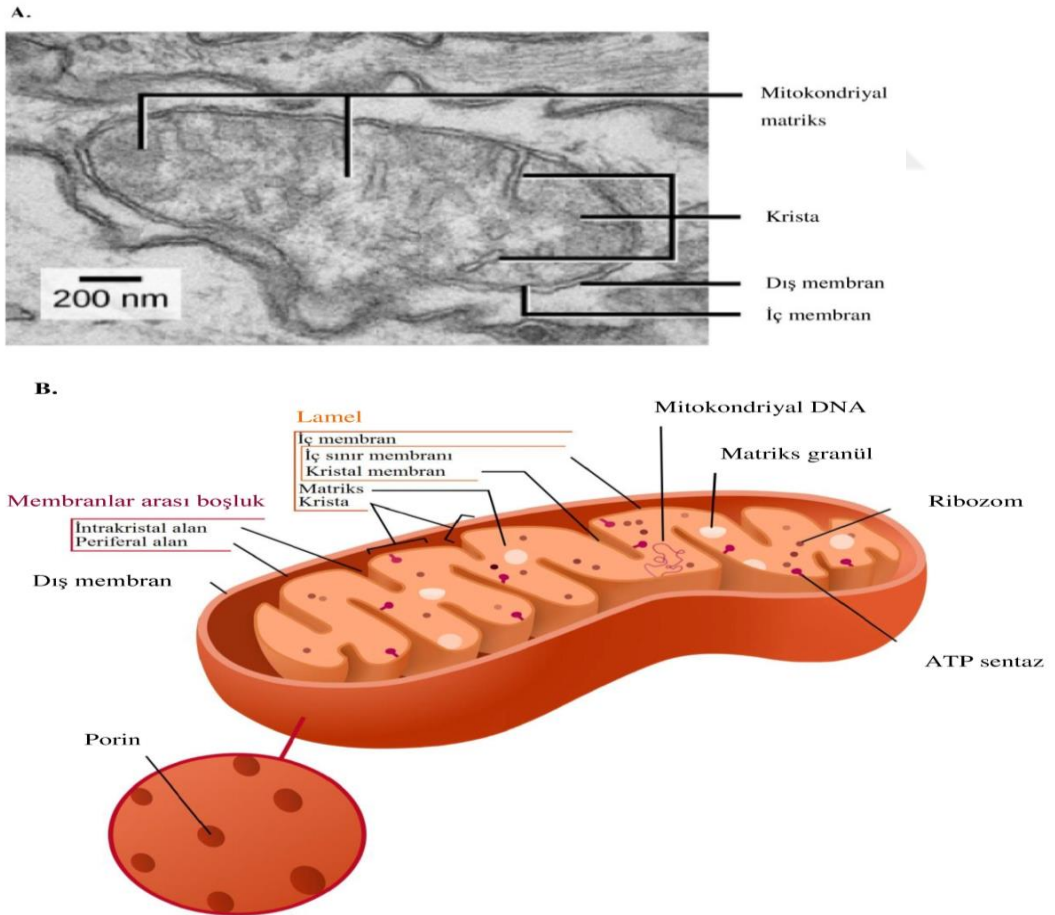
NCAN geni, karaciğer yağ içeriği ve NAYKH ilerleyişi ile ilişkili olarak bildirilmiştir. Özellikle NCAN rs2228603 minör (T) allelin, hepatik trigliserit birikimine yol açtığı düşünülmektedir (Speliotes ve ark., 2011). TM6SF2 (rs58542926, c.449 C>T, p.Glu167Lys, E167K) minor (T) alleli taşıyan bireylerde, hepatik trigliserit içeriği artışına aracılık etmektedir, steatohepatit ve NAYKH ile ilişkili fibrozda yatkınlık kazandırmaktadır. Ters olarak, yaygın (C) alleli taşıyan hepatik çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) salınımı, karaciğeri korumaktadır, ancak ateroskleroz ve kardiyovasküler hastalıkların riskini arttırmaktadır. MetS ve NAYKH genellikle kardiyovasküler hastalıkla ilişkilidir. TM6SF2 rs58542926 minor alleli taşıyan karaciğer hastası bireyler, kardiyovasküler morbidite ve mortalite yaşamaya daha eğilimli olabilirler.

Kromozom 11 lokusu: APOC3

NASH hastalığının gelişiminden sorumlu, hastalıkla ilişkili iki nükleotit varyasyonu olan allel tanımlanmıştır. Yağlı karaciğer hastalığında, IR ve hipertrigliseridemi ile ilişkili APOC3 (apolipoprotein C3; 11q23.3) geni, rs2854116 (c.455 T>C) ve rs2854117 (c.482 C>T) TNP belirlenmiştir. Bu polimorfizmler; APOC3 geninin 455. np'de baskın allel olan timinin, sitozine transisyonu olan APOC3 T455C polimorfizmi ve yine aynı genin 482. np baskın allel olan sitozinin minör allel timin nükleotidine transisyonu olan C482T polimorfizmleridir (Petersen ve ark., 2010). 455C ve 482T varyant allellerinin birisini ya da her ikisini birden heterozigot olarak taşıyan bireylerde, plazma apolipoprotein C3'ün %30, plazma trigliserit ve kolesterolün %60 arttığı tespit edilmiştir (Allocca ve Selmi, 2010).

4.2. Mitokondrinin Yapısı

Mitokondri, farklı fonksiyonlara sahip çift membranla (dış ve iç) çevrilmiş, küresel bir organeldir (Resim 5). Mitokondriyal dış membran 5 kDa'dan daha küçük moleküllerin geçişine izin veren porinler içermektedir. Ayrıca, büyük proteinlerdeki mitokondriyal sinyal dizilerini tanıyan ve geçişine izin veren geniş multiprotein translokaz kompleksini kapsamaktadır. Mitokondriyal iç membran, elektron taşıma sistemi (ETS) ve ATP sentaz kompleksinin tüm bileşenlerini içermektedir. Ayrıca, toplam yüzey alanını arttırmak için mitokondri matriksine doğru girintiler yapan krista denilen yapıları kapsamaktadır. Çift membran iki mitokondriyal bölümden oluşmaktadır. Bunlar, dış ve iç membran arasında yer alan membranlar arası boşluk ve iç membranın içerisinde yer alan matriksdir. Mitokondriyal DNA, mitokondriyal matriks içerisinde yer almaktadır (Chial ve Craig, 2008).



Resim 5. Mitokondrinin bileşenleri (A, B) (<https://lol.khanacademy.org/science/biology/structure-of-a-cell/tour-of-organelles/a/chloroplasts-and-mitochondria>, Erişim tarihi: 15 Şubat 2016)

4.2.1. Mitokondriyal genom

İnsan mitokondriyal genomu; çift-zincirli, kapalı dairesel yapıda, 16 569 bç büyüklüğünde mtDNA içermektedir (Şekil 3, Resim 6). mtDNA çift zincir sarmal yapısı, guanin ve sitozin baz dağılımlarına göre yoğunluk gradient santrifüj yöntemi kullanılarak, guanin içeriği fazla olan "ağır zincir" (H-zincir), sitozin içeriği fazla olan "hafif zincir" (L-zincir) olarak belirlenmiştir (Kasamatsu ve Vinograd, 1974).

H-zincir; 2 ribozomal RNA (rRNA), 14 taşıyıcı RNA (tRNA) ve 12 polipeptit genlerini, L-zincir; 8 tRNA ve bir polipeptit genlerini kodlamaktadır (Anderson ve ark., 1981). mtDNA, 2 rRNA geni: 12S ve 16S; 22 tRNA geni (20 amino asit için): L-zincir, proline (P), glutamik asit (E), serin (S-UCN), tirozin (Y), sistein (C), asparjin (N), alanin (A), glutamin (Q); H-zincir, fenilalanin (F), valin (V), lösin (L-UUR), izolösin (I), metiyonin (M), triptofan (W), aspartik asit (D), lizin (K), glisin (G), arjinin (R), histidin (H), serin (S-AGY), lösin (L-CUN), treonin (T) (Şekil X) ve oksidatif fosforilasyon (OXPHOS) için gerekli 13 protein kodlayan gen: Kompleks I (NADH CoQ redüktaz), veya nikotinamid adenin dinükleotit (NADH) dehidrogenaz: 7 alt-ünite (ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6); kompleks III (CoQ sitokrom c redüktaz): 1 alt-ünite (sitokrom b); kompleks IV (sitokrom c oksidaz) üç alt-üniteyi: I, II ve III (COI, COII, COIII); kompleks V, veya H ± translokasyon ATP sentaz iki alt-ünite: 6 ve 8 (ATP6, ATP8) olmak üzere toplam 37 genen oluşmaktadır (Clayton, 2000).

OXPHOS için gerekli 83 polipeptitten 70'i nükleer genler, 13'ü mtDNA tarafından kodlanmaktadır. 70 OXPHOS bileşenleri, mitokondriyal metabolizma ve bakım için gerekli diğer tüm proteinler, nükleer genler tarafından kodlanmaktadır, mitokondrideki özel sistemler aracılığıyla içeri aktarılmaktadır (Mokranjac ve Neupert, 2005).

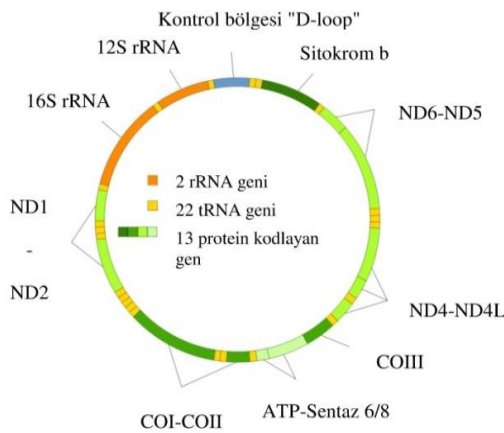
Memeli mtDNA'sı ekonomik bir organizasyon sergilemektedir. Genler arasında intronlar bulunmamaktadır, sadece bir düzenleyici bölgeye sahiptir. Ayrıca rRNA ve tRNA molekülleri oldukça küçüktür (Wolstenholme, 1992). Mitokondriyal DNA bir "displacement loop" (D-loop) içermektedir, kodlama yapmayan bu bölge, yaklaşık 1,1 kb uzunluğundadır [576-16 024 np =1124 bç] mtDNA replikasyonu, D-

loop içerisinde gerçekleşmektedir (Arnberg ve ark., 1971). D-loop, dizi varyasyonları oldukça fazladır.

D-loop, öncelikle Greenberg ve ark.'ları tarafından iki bölgeye ayrılarak tanımlanmıştır. Hiper değişken bölge 1 (HVR-1), 16024-16365 nükleotit pozisyonları arasında, hiper değişken bölge 2 (HVR-2), 70-340 nükleotit pozisyonları arasındadır (Greenberg ve ark., 1983). Ayrıca Lutz ve ark., 438-574 nükleotit pozisyonları arasında hiper değişken bölge 3'ü (HVR-3) tanımlamıştır (Lutz ve ark., 1997).

mtDNA oksijenli solunum boyunca yüksek düzeyde reaktif oksijen türlerine (ROT) maruz kalmaktadır. mtDNA histonların koruyuculuğundan yoksundur ve mtDNA hasarlarının giderilmesi için tamir mekanizması yeterli kapasiteye sahip değildir. İnsan mtDNA'sı oksidatif hasara duyarlıdır ve sonuçta nükleer DNA'dan (nDNA) daha fazla mutasyona uğramaktadır (Yakes ve Houten, 1997).

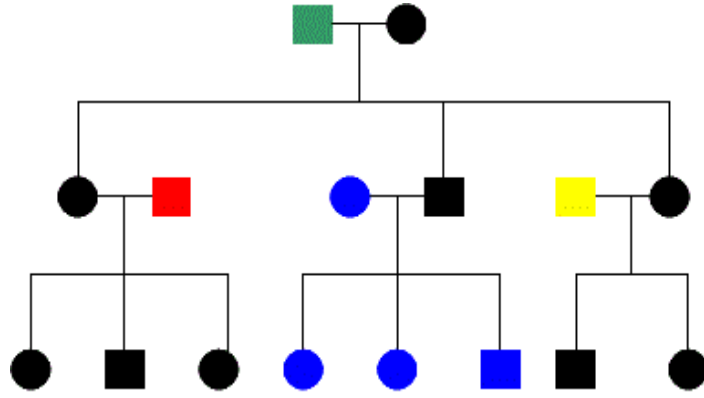
Mitokondriyal genom her nesilde anneden devralınmaktadır (Giles ve ark., 1980) (Şekil 4). mtDNA D-loop dizi değişiklikleri nüfusun evrimi ve antropoloji çalışmalarında araştırılmaktadır (Wallace ve ark., 1999; Coskun ve ark., 2003). mtDNA'da kromozomu koruyan histon proteinlerin olmaması, ROT'lara fazla maruz kalması ve DNA tamir mekanizmalarının yetersiz oluşu, mtDNA'yı mutasyonlara açık hale getirmektedir (Yakes ve Houten, 1997). Ortaya çıkan mutasyonlar, mtDNA'nın kodladığı proteinlerin değişmesine yol açmakta ve bu durum organizmanın metabolizmasını etkilemektedir.



Şekil 3. İnsan mitokondriyal DNA'sı (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mitochondrial_DNA_de.svg, Erişim tarihi: 15 Şubat 2016)



Resim 6. Mitokondri sirküler genomun taramalı elektron mikroskop görüntüsü (Hudson ve Vinograd, 1967'den değiştirilerek alındı.)



Şekil 4. Mitokondriyal genomun maternal kalıtımı (Hudson ve Vinograd, 1967'den değiştirilerek alındı.)

4.2.2. Mitokondriyal DNA replikasyon ve transkripsiyon mekanizması

mtDNA'da meydana gelen mutasyonların ve biyokimyasal sonuçlarının anlaşılması açısından, replikasyon ve transkripsiyon mekanizmasının bilinmesi önemlidir (Taylor ve Turnbull, 2005). mtDNA replikasyonu, nükleer genler tarafından kodlanan genlere bağlı, yarı otonom bir mekanizmaya sahiptir (Tablo 2). Mitokondriyal tek zincir bağlanma proteini (mtSSB), mitokondriyal polimeraz γ (POLG), 5'-3' DNA helikaz aktivitesi gösteren twinkle proteini, (Spelbrink ve ark., 2001) ve mitokondriyal transkripsiyon faktör A (TFAM), mtDNA'nın replikasyon, bakım, onarım ve rekombinasyonunda yer alan önemli proteinlerden bazılarıdır (Holt ve ark., 2007). Pol γ , mtSSB ve twinkle proteinleri replikasyon çatalını oluşturmaktadır (Wanrooij ve Falkenberg, 2010).

Replikasyonda; mtDNA Pol γ tarafından 5'-3' yönünde zincir uzatılmaktadır. Memeli DNA polimeraz γ holoenzimi; $\gamma\beta_2$ heterotrimerik yapıda, POLG ve POLG2 genlerini içermektedir. POLG geni, 140 kDa ağırlığında, 5'-3' katalitik ve ekzonükleaz aktivitesine sahip alt-üniteyi (POLGA); POLG2 geni, 54-kDa ağırlığında temel işlevi gören yardımcı alt üniteyi (POLGB) kodlamaktadır (Berdanier, 2005). H-zincir replikasyon orjininden başlayarak, korunmuş diğer bir dizi olan sonlanma ile ilişkili dizilerde (TAS) son bulan 700 bç'lik bölge, D-loop kontrol bölgesidir (Wallace ve ark., 1999). D-loop kontrol bölgesi ağır zincir ve hafif zincir replikasyon orjinlerini (sırasıyla; O_H ve O_L) içeren spesifik bir alana sahiptir.

mtDNA replikasyonu, mikroskopik ve biyokimyasal analizler temel alınarak "D-loop modeli" ile açıklanmaktadır (Clayton, 1982).

Bu modele göre;

1. O_H 'nin yukarısında, L-zincir promotörünün (LSP) akış aşağı yönünde yer alan, korunmuş dizi bloğu II'nin (CSB) içinde veya yakınında yeni sentezlenen DNA sekansından, mtDNA replikasyonunun başlaması için RNA primerleri sentezlenmektedir (Wanrooij ve Falkenberg, 2010).
2. Replikasyon ilk olarak kesintisiz H-zincirde başlamaktadır. O_H 'den itibaren, mtDNA Pol γ ile 5'-3' saat yönünde H-zincir sentezi ilerlemekte ve zincir açılmaktadır.
3. H-zincir replikasyonu, L-zincirin replikasyon orjinine ulaşıncaya, ters yönde, O_L 'den itibaren kesintili L-zincir sentezi başlar (Şekil 5a, 5b) (Taylor ve Turnbull, 2005).
4. Okazaki ribonükleotit parçaları DNA'ya dönüştürülerek, kesintili L-zincir sentezlenmektedir (Yasukawa ve ark., 2006).

RNA primerlerinin çıkarılması, boşlukların doldurulması, süper sarmal dönüşler ve çemberin kapatılmasıyla yeni çift zincirli mtDNA molekülü oluşmaktadır (Wanrooij ve Falkenberg, 2010).

Tablo 2. mtDNA sentezine katılan, nükleer faktörlerin kodladığı genler (Berdanier, 2005'ten değiştirilerek alındı.)

Gen sembolü	Gen ismi	kDa
LIG3	DNA ligaz III	96 veya 103
POLG	DNA polimerazın katalitik alt ünitesi (POLGA)	140
POLG2	DNA polimerazın yardımcı alt ünitesi (POLGB, POLG β)	55
PEO1	Twinkle proteini	77
SSBP1	Tek zincir bağlanma proteini (mtSSB)	15
TOP1MT	Mitokondriyal DNA topoizomeraz I	66
TOP2B	DNA topoizomeraz II β	150
TOP3A	DNA topoizomeraz III γ	106

Transkripsiyon; mitokondriyal transkripsiyon kontrol bölgesinde yer alan, H-zincir üzerindeki iki promotörden birinden (HSP1 ve HSP2) ve LSP'den başlamaktadır. (Şekil 5) D-loop içerisinde yerleşen MT-RNR1 geninin 5' ucuna yakın bulunan HSP2 ve LSP promotörlerinden gelen transkripsiyon ürünleri uzun polisistronik öncü RNA zincirleridir, bu zincirler daha sonra işlenerek özgün tRNA ve haberci RNA (mRNA) moleküllerini oluşturmaktadır (Clayton, 1991). Mitokondri DNA'sının transkripsiyonu D-loop bölgesindeki iki promotörden itibaren birbirine ters yönde başlar. İki zincir aynı anda ve tamamen transkripsiyona uğrar. Sentezlenen öncül RNA daha sonra RNAaz P ile kesilerek, tRNA'lar, mRNA'lar ve rRNA'lar serbest kalır (Wallace ve ark., 1999). HSP1; mitokondriyal tRNA fenilalanin kodlayan (MT-TF) genin, yukarı akış yönünde yer almaktadır ve MT-TF geni; 2 rRNA (12S, 16S), 2 tRNA (mt-tRNA Phe, mt-tRNA Val) üretmektedir (Tuppen ve ark., 2010). Transkripsiyonun başlaması için, nükleer genler tarafından kodlanan mitokondriyal RNA polimeraz (POLRMT), mitokondriyal transkripsiyon faktörleri (TFAM ve TFB1M ya da TFB2M'den birisi) ve transkripsiyonu sonlandırma faktörü (mTERF) gerekmektedir (Falkenberg ve ark., 2002). H-zincir transkripsiyonu, HSP'den başlayarak, diyagram üzerinde saat yönünün tersine doğru ilerlemektedir. İki rRNA (12S, 16S), 14 tRNA ve OXPHOS proteinleri için 12 mRNA kodlamaktadır. L-zincir transkripsiyonu, LSP'den başlayarak, diyagram üzerinde saat yönünde ilerlemektedir. D-loop dışında, mtDNA replikasyonu için RNA primerleri, 8 tRNA ve 1 mRNA kodlamaktadır (Clayton, 2000) (Tablo 3, Şekil 5).

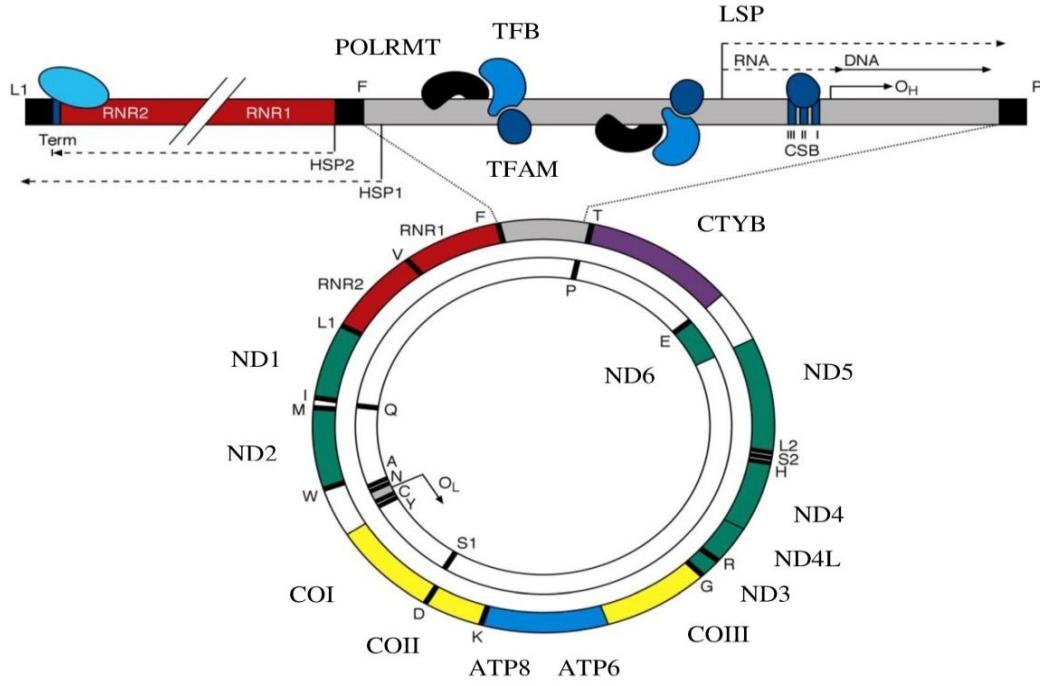
Tablo 3. Mitokondriyal genomun transkripsiyon ürünleri

L-zincir transkriptleri (saat yönü)	H-zincir transkriptleri (saat yönünün tersi)
RNA primerleri	2 rRNA (12S, 16S)
8 tRNA (P, E, S, Y, C, N, A, Q)	14 tRNA (F, V, L, I, M, W, D, K, G, R, H, S, L, T)
1 mRNA (ND6)	12 mRNA

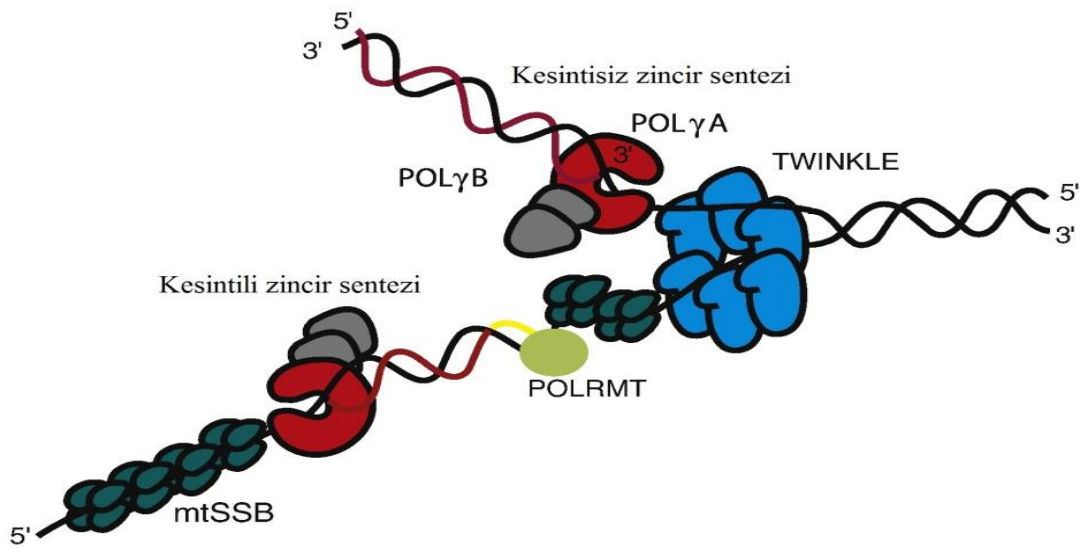
(Wanrooij ve Falkenberg, 2010'dan değiştirilerek alındı.)

mtDNA'nın kodladığı 13 OXPHOS proteinin sentezlenmesi için, mitokondriyal ribozomlar üzerinde mRNA'ya çeviri gerçekleşmektedir. Mitokondriyal tRNA ya da rRNA genlerindeki mutasyonlar mitokondriyal translasyonu bozarak patolojiyi etkilemektedir (Jacobs, 2003). Patogenik mtDNA

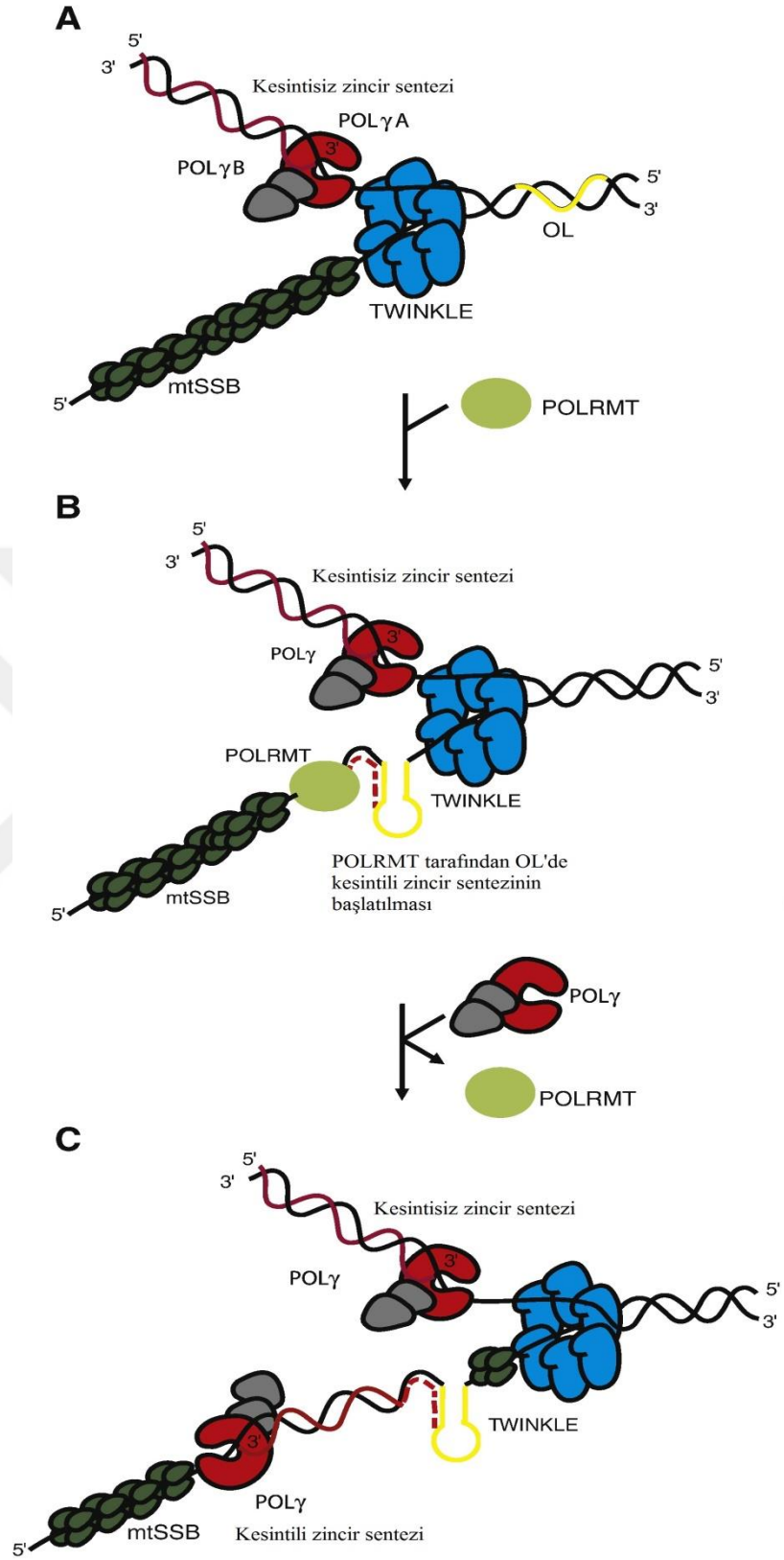
mutasyonları nedeniyle mitokondriyal transkripsiyonun yol açtığı hücrel disfonksiyonun, doku spesifik ya da mutasyon spesifik etkileri önemli bilgiler verebilmesi açısından araştırmalara dahil edilmektedir (Taylor ve Turnbull, 2005).



Şekil 5. İnsan mitokondriyal genomu, transkripsiyon promotörleri ve replikasyon orjinlerinin pozisyonları (Tuppen ve ark., 2010'dan değiştirilerek alındı.)



Şekil 5a. mtDNA replikasyon mekanizması (Wanrooij ve Falkenberg, 2010'dan değiştirilerek alındı.)



Şekil 5b. Kesintisiz ve kesintili zincir sentezi (A, B, C) (Wanrooij ve Falkenberg, 2010'dan değiştirilerek alındı.)

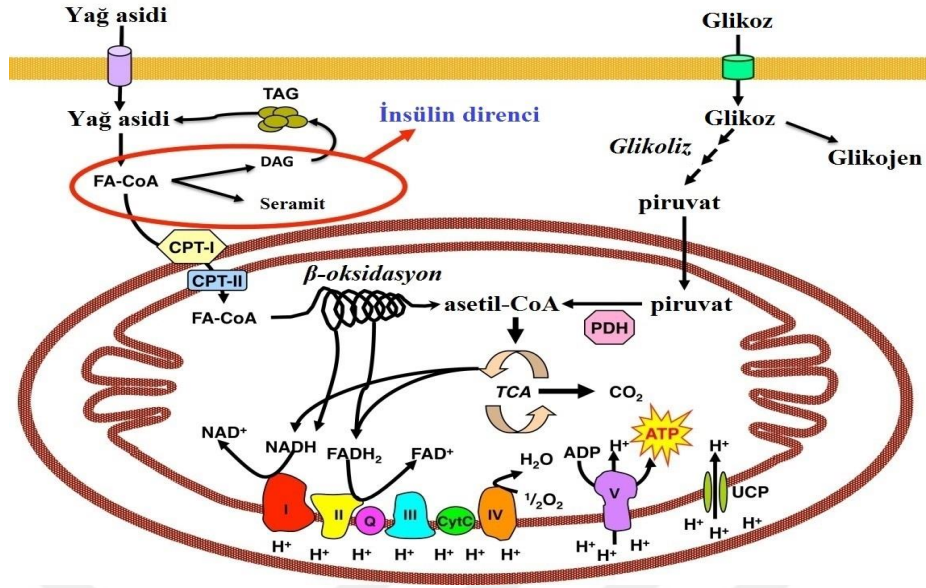
4.2.3. Mitokondrinin organizmadaki rolü

Ökaryotik hücrelerde metabolik enerjinin üretilmesinde kritik bir rol oynayan mitokondri, substrat yakıtlarının oksidasyonu için gerekli alan sağlamaktadır. Mitokondri oksidatif fosforilasyon süreciyle, karbonhidrat ve yağ asitlerini parçalayarak, kullanılabilir enerji olan ATP'nin elde edilmesinden sorumludur. Çoğu mitokondriyal proteinin translasyonu, serbest sitozolik ribozomlar tarafından sağlanmaktadır ve özgün hedef sinyallerle organel içerisine alınmaktadır. Sitozolda gerçekleşen glikoliz evresinde, glikoz pirüvata dönüştürülmektedir (Şekil 6).

Pirüvatin mitokondri içerisine taşınıp, asetil koenzim A'ya (asetil CoA) dönüştürülmesiyle birlikte oksidasyon işlemi başlamaktadır, glikoz metabolizması sonucunda, trikarboksilik asit döngüsüyle (TCA) CO₂ ve ATP elde edilmektedir. (Şekil 6). Aynı zamanda yağ asitlerinin oksidasyonu da asetil CoA üretilmektedir, daha sonra mitokondride TCA tarafından benzer şekilde metabolize edilmektedir. TCA enzimleri oksidasyonla karbonhidrat ve yağ asitlerinin yıkılmasında merkezi role sahiptir.

Asetil CoA'dan CO₂ oksidasyonunda, NADH ve flavin adenin dinükleotit (FADH₂) sırasıyla NAD⁺ ve FAD⁺ya indirgendiği zaman elektronlar mitokondriyal elektron transfer zinciri boyunca, protonların pompalanmasıyla birlikte, kompleks I, III ve IV ile membranlar arası boşluğa geçmektedir. NADH ve FADH₂'den yüksek enerjili elektronlar membranda moleküler oksijen taşıyıcı bir diziyle transfer edilmektedir. Bu elektron transfer reaksiyonlarından elde edilen enerji, bir proton gradient zarında potansiyel enerjiye dönüştürülerek depolanmaktadır, daha sonra ATP sentezini harekete geçirmek için kullanılmaktadır (Cooper ve Hausman, 2007).

Elektronlar kompleks IV'te oksijene transfer edilerek H₂O üretilmektedir. Pompalanan protonlar mitokondriyal iç membran genelinde bir elektrokimyasal gradient oluşturmaktadır, bu durum ATP üretimini sağlayan ATP sentaz (kompleks V) için itici bir güç olarak kullanılmaktadır. Ayrıca elektrokimyasal gradient, termogenez olarak adlandırılan bir işlemde ısı üreterek, UCP (Uncoupling Protein) aracılığıyla ısıyı dağıtmaktadır (Turner, 2013). Mitokondriyal iç membran ATP üreten asıl alanı temsil etmektedir ve bu kritik rolü yapısına yansıtmaktadır.

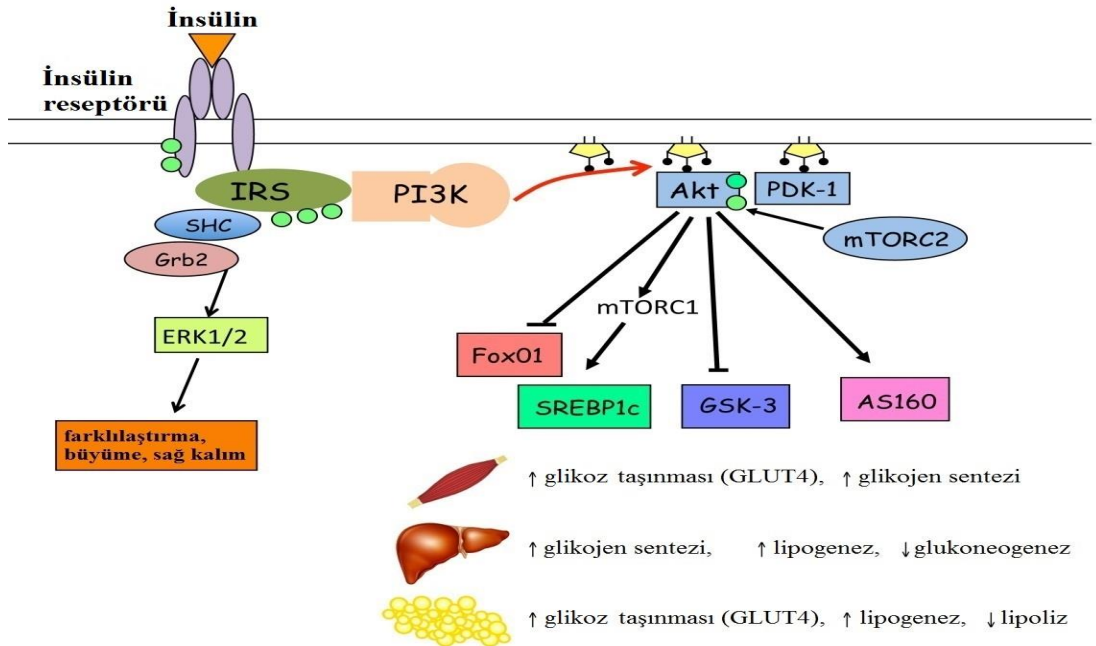


Şekil 6. Oksidatif metabolizma boyunca glikoliz, TCA ve β -oksidasyonu, NADH veya $FADH_2$ 'i indirgeyerek glikoz ve yağ asitlerinin üretilmesi (Kısaltmalar: NADH: Nikotinamid adenin dinükleotit; $FADH_2$: Flavin adenin dinükleotit'i ; TAG, Triaçilgliserol; DAG, Diaçilgliserol; PDH, pirüvat dehidrogenaz; CPT, Karnitin palmitoil transferaz; UCP, Uncoupling Protein) (Turner, 2013'ten değiştirilerek alındı.)

4.2.4. Mitokondriyal metabolizma ve insülin direnci

İnsülin günlük diyetle alınan karbonhidrat, yağ ve protein yakıt metabolizmasını düzenler. Glikoz sentezini düzenleyen insüline duyarlı dokular iskelet kası, karaciğer ve yağ dokusudur. Normal fizyolojik koşullar altında insülin, vücuda yemek alımına yanıt olarak pankreasdaki Langerhans adacıklarındaki beta hücrelerden dolaşıma salınır. İnsülin, reseptörüne bağlandıktan sonra bir dizi sinyal molekülünün fosforilasyonu, bağlanması ve yer değiştirmesini içeren ve sonunda glikoz ve lipid metabolizmasının spesifik son noktalarında değişikliklere neden olan iyi tanımlanmış bir sinyal kaskadını uyarır (Şekil 7). İnsülin direnci ile, insülinin yukarıdaki yollar üzerindeki etkisi tehlikeye girerse, dokulara glikoz alımını yetersiz hale getirir ve hepatik glikoz çıkışı bozulur ve baskılanmasına yol açar. İnsülin etkinliğinin azaldığı durumların üstesinden gelmek için pankreatik beta hücreleri daha fazla insülin salgırlar. Devam eden insülin direnci popülasyonun çoğunda telafi edebilir ancak genetik olarak duyarlı bireylerde, beta hücreler, iş yükünün artması karşısında başarısız olur ve bu durum kan şekeri düzeylerinin yükselmesine ve T2D'ye yol açar. Bu nedenle insülin direnci, T2D patogenezinde önemli bir rol oynar. Moleküler düzeyde, insülin direncinden sorumlu olan mekanizmalar tam

olarak aydınlatılamamıştır. Çalışmalar insüline dirençli insanların, oksidatif stres ve karaciğer iltihap yollarının aşırı aktifleştğini bildirmiştir. Oksidatif stres, insülin direncinin gelişiminde rol oynar. Obez ve insüline dirençli bireylerde yağ dokusu ve karaciğerde iltihaplanma (ve bir dereceye kadar kasdaki) söz konusudur. İnsülin direnci ve T2D ile ilişkili kusurlardan birisi de, yağ dokusunda lipid birikimidir. Aşırı besin tüketimi ile, yağ asitleri ve metabolitleri, iskelet kası, karaciğer ve kalp gibi dokulara uygunsuz şekilde yayılır ve insülin hareketinde kusurlar oluşur. Daha spesifik olarak, yükselen trigliseritler sıklıkla insüline karşı dirençli insanların dokularında bildirilmiştir. Metabolik olarak aktif uzun zincirli açıl-CoA ve diaçilgliserol (DAG) gibi diğer sitozolik lipid metabolitlerinin birikimi, doğrudan insülin direnci ile bağlantılıdır Bu lipid metabolitleri, reaktif oksijen türleri ve sitokinler, insülin sinyal iletimini ve glikoz metabolizma yollarını doğrudan doğruya antagonize eder.



Şekil 7. İnsülin sinyal yolu. (Turner, 2013'ten değiştirilerek alındı.) (Kısaltmalar: IRS, insülin reseptör substrat; SHC, Src Homoloji 2 alanı; GRB2, büyüme faktörü reseptörüne bağlı protein 2; ERK, hücre dışı sinyalle düzenlenmiş kinazlar veya klasik MAP kinazlar; PI3K, fosfoinositid 3-kinaz; PDK1, fosfoinositid bağımlı protein kinaz 1; MTORC, rapamisin kompleksinin memeli hedefi; FoxO1, forkhead kutu proteini O1; SREBP1c, sterol düzenleyici eleman bağlama proteini 1c; GSK-3, glikojen sentaz kinaz 3; AS160, 160 kDa Akt substrat.)

4.2.5. Mitokondriyal DNA kontrol bölgesi nükleotit varyasyonları ve NASH

İnsan mtDNA'sının filogenetik ağacı çizilerek belirli polimorfizmler belirlenmiş ve popülasyon spesifik haplotipler tanımlanmıştır. (Finnilä ve ark., 2001). Belirli mtDNA haplotiplerinin çeşitli hastalıklara yatkınlık ya da koruyuculuk sağladığı düşünülmektedir (Niemi ve ark., 2003).

İnsan mtDNA kontrol bölgesinin birinci ve ikinci hiper değişken bölgesi, iki homopolimerik sitozin alanı (sırasıyla, HVRI: 16184-16193 np ve HVRII: 303-315 np) içermektedir. Cambridge referans dizisine (CRS) göre bu homopolimerik alan sırasıyla 16189 ve 310 pozisyonunda timin (T) tarafından kesintiye uğratılmaktadır (Lutz-Bonengel ve ark., 2004).

Mevcut kanıtlara göre, mtDNA T16189C varyantı belirli etnik gruplarda, MetS, yüksek açlık insülin konsantrasyonu ve IR ile ilişkili bulunmaktadır (Wang ve ark., 2009). Popülasyon çalışmaları, NAYKH ile IR, T2D, hipertansiyon, obezite ve dislipidemi arasında güçlü bir ilişki olduğunu ileri sürmektedir (Marchesini ve ark., 1999).

Güner'in, "Mitokondriyal DNA Nikotinamid Adenin Dinükleotid Dehidrogenaz 5 12361 Adenin / Guanin ve Displacement-loop 16189 Timin / Citozin Polimorfizmlerinin Nonalkolik Steatohepatit Hastalarında Görülme Sıklığı ve Klinik Önemi" isimli yüksek lisans tez çalışmasında; Türk popülasyonunda mtDNA D-loop 16189 T/C polimorfizmi, toplam 349 bireyde (160 NASH hasta, 189 sağlıklı kontrol birey). Allele-spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (AS-PZR) ve PZR-RFLP tekniği ile araştırılmış, mt16189 CC genotipe sahip bireyler, hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bulunmazken, 16189 np'de atipik paternlerin varlığı dikkat çekmiştir (Güner, 2014).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Çalışma Grupları

Bu çalışma, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Polikliniği'nde takip edilmekte olan erişkin 150 NASH'li hasta ve 150 sağlıklı kontrol bireyi içeren vaka-kontrol çalışmasıdır. Çalışmanın etik kurul onay yazısı ve çalışmaya katılan bireylerle ilgili bilgiler (çalışmaya alınma ve dışlanma kriterleri) ekler bölümünde sırasıyla Ek 1 ve Ek 2'de bulunmaktadır.

5.2. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu

Çalışmaya katılan 300 bireyin periferik kanları "PureLink Genomic DNA Mini Kit, Life Technologies" protokolüne göre aşağıdaki işlemler uygulanarak genomik DNA'lar izole edildi.

Kan Liziz:

1. 1.5 mL'lik steril mikrotüpe 200 µl tam kan aktarıldı. Üzerine, 20 µl proteinaz K ve 20 µl RNaz eklenerek karıştırıldı, 1 dk. oda sıcaklığında inkübe edildi. Üzerine 200 µl bağlanma tamponu eklenerek karıştırıldı, 55°C'de 10 dk. kuru ısıtıcıda inkübe edildi.

DNA'nın Bağlanması:

2. Tüpe 200 µl saf alkol eklenip iyice karıştırıldı. Karışım, toplama tüpüne yerleştirilen filtreye aktarılarak, 10000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.

DNA'nın Yıkılması:

3. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve filtre üzerine 500 µl yıkama tamponu (wash 1) eklendi, 10000 x g'de 1 dk. santrifüj edildi.
4. Filtre yeni bir toplama tüpüne aktarıldı ve filtre üzerine 500 µl yıkama tamponu (wash 2) eklendi, max. g'de 3 dk. santrifüj edildi.

DNA Eldesi:

5. Filtre 1.5 mL'lik steril mikrotüpe aktarıldı ve üzerine 200 µl elüsyon tamponu eklendi, max. g'de 1,5 dk. santrifüj edildi.
6. Genomik DNA elde edildi.

DNA'nın Saklanması:

7. Genomik DNA, mikrotüplere bölüştürülerek -20 °C'ye kaldırıldı.

5.3. PZR-RFLP Analizi

5.3.1. Kullanılan primerler ve restriksiyon enzimi

mtDNA kontrol bölgesi 16189 T/C polimorfizm tayini için kullanılan primer dizileri Aral ve ark.'ların makalelerinden referans alınarak kullanıldı (Aral ve ark., 2011). Polimorfizm tayini için kullanılan primer dizileri ve restriksiyon enzimi Tablo 4'de gösterildi.

Tablo 4. Polimorfizm tayini için kullanılan primer dizileri ve restriksiyon enzimi

TNP	Primer İsimleri	Primer Dizileri (5'- 3')	Enzim	Canlı	Tanımaya yeri
rs28358586			<i>MnII</i>	<i>Moraxella nonliquefaciens</i>	CCTC
	rs28-F	5'ACCAGTCTTGTAACCGGAG3'			
	rs28-R	5'GTGGGCTATTTAGGCTTTAT3'			

5.3.2. mtDNA kontrol bölgesi 16189 T/C in-silico *MnII* PZR-RFLP tayini

PZR-RFLP mt16189 T/C genotiplendirme çalışmamızda "restriction mapper" adlı (<http://www.restrictionmapper.org>, Erişim tarihi: 15 Şubat 2016) biyoinformatik programı kullanılarak, deney öncesi in silico restriksiyon analiz gerçekleştirildi. *Moraxella nonliquefaciens* tarafından kodlanan *mnlIR* geni *E. coli*'ye klonlanarak *MnII* enzimi elde edilmiştir. *MnII* restriksiyon enzimi CCTC(7/6)^ diziyi tanıyarak spesifik olarak kesmektedir.

MnII enzimatik aktivitesi, T alleli varlığında kesim yaparak, 286, 118, 84, 39 (2), 35, 28 bç uzunluğunda kesim ürünlerini, C alleli varlığında kesim yaparak, 321, 118, 84, 39 (2) 28 bç uzunluğunda kesim ürünlerini oluşturmaktadır. mtDNA kontrol bölgesi 16189 T/C; rs28358586 in-silico *MnII* PZR-RFLP analizi Tablo 5 ve Tablo 5a'da gösterildi.

Tablo 5. mtDNA T16189T, rs28358586 in-silico *MnII* PZR-RFLP

15901	AAACTAATAC <u>ACCAGTCTTGTAACCGGA</u> GATGAAAACCTTTTTCCAAGGACAAATCAGA
15961	GAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAACTATTCT
16021	CTGTTCTTTCATGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACA
16081	ACCGCTATGTATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAT
16141	ACTTGACCACCTGTAGTACATAAAAAACCAATCCACATCAAAACCC <u>CCT</u> CCCATG/CTTA
16201	CAAGCAAGTACAGCAATCAAC <u>CCTC</u> AACTAT/CACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACC
16261	<u>CCTC</u> ACCCAC/TAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAGC
16321	CATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCATGGATGACCCC <u>CC</u>
16381	<u>TC</u> AGATAG/GGGTCCCTTGACCACCAT <u>CCTC</u> CGTGAA/ATCAATATCCCGCACAAGAGTGCT
16441	ACTCT <u>CCTC</u> GCTCCG/GGCCATAACACTTGGGGGTAGCTAAAGTGAAGTGTATCCGACAT
16501	CTGGTTCCTACTTCAGGGTC <u>ATAAAGCCTAAATAGCCCAC</u>

Tablo 5a. mtDNA T16189C, rs28358586 in-silico *MnII* PZR-RFLP

15901	AAACTAATAC <u>ACCAGTCTTGTAACCGGA</u> GATGAAAACCTTTTTCCAAGGACAAATCAGA
15961	GAAAAAGTCTTTAACTCCACCATTAGCACCCAAAGCTAAGATTCTAATTTAACTATTCT
16021	CTGTTCTTTCATGGGGAAGCAGATTTGGGTACCACCCAAGTATTGACTCACCCATCAACA
16081	ACCGCTATGTATTTTCGTACATTACTGCCAGCCACCATGAATATTGTACGGTACCATAAAT
16141	ACTTGACCACCTGTAGTACATAAAAAACCAATCCACATCAAAACCCCC <u>C</u> CCCATGCTTA
16201	CAAGCAAGTACAGCAATCAAC <u>CCTC</u> AACTAT/CACACATCAACTGCAACTCCAAAGCCACC
16261	<u>CCTC</u> ACCCAC/TAGGATACCAACAAACCTACCCACCCTTAACAGTACATAGTACATAAAGC
16321	CATTTACCGTACATAGCACATTACAGTCAAATCCCTTCTCGTCCCATGGATGACCCC <u>CC</u>
16381	<u>TC</u> AGATAG/GGGTCCCTTGACCACCAT <u>CCTC</u> CGTGAA/ATCAATATCCCGCACAAGAGTGCT
16441	ACTCT <u>CCTC</u> GCTCCG/GGCCATAACACTTGGGGGTAGCTAAAGTGAAGTGTATCCGACAT
16501	CTGGTTCCTACTTCAGGGTC <u>ATAAAGCCTAAATAGCCCAC</u>

5.3.3. PZR amplifikasyonu

"I-Star DNA Polimeraz Seti, Intron Biotechnology" kiti protokolüne göre aşağıdaki işlemler uygulandı. Hedef bölgenin PZR protokolü Tablo 6'da, termal döngü cihazı programı Tablo 6a'da gösterildi.

1. 1,5 mL tüpün içerisine ortak reaksiyon bileşenleri (MgCl₂, dNTP, DNA polimeraz, tampon solüsyonu, primerler) eklendi, nazikçe karıştırıldı ve reaksiyon karışımı hazırlandı. Karışım örnek sayısına göre hesaplandı.
2. Reaksiyon karışımı 0,2 mL PZR tüplere eşit miktarda dağıtıldı.
3. Reaksiyonda 100-250 ng genomik DNA olacak şekilde dilüsyonları yapılan DNA örnekleri PZR tüplerine pipetlendi, karıştırıldı.
4. PZR tüpleri uygun profil ayarları yapılan termal döngü cihazına alındı. PZR işlemi, buzun üzerinde gerçekleştirildi.

Tablo 6. Hedef bölgenin PZR protokolü

Reaksiyon Bileşenleri	1X	Final Konsantrasyon	Stok Konsantrasyon
Steril H ₂ O	33,7 µl		
PZR Tamponu	5 µl	1X	10 X
dNTP Karışımı	1 µl	400 µM	10 mM
MgCl ₂ Solüsyonu	3 µl	1,5 mM	25 mM
İleri Primer	1 µl	0,2 µM	10 µM
Geri Primer	1 µl	0,2 µM	10 µM
Taq DNA Polimeraz	0,3 µl	1,5 U	5 U/µl
DNA Örneği	5 µl	150 ng	
Toplam Reaksiyon Hacmi	50 µl		

Tablo 6a. Termal döngü cihazı programı*

Döngü Sayısı	Hedef Bölgenin PZR Basamakları		
	Denatürasyon	Eşleşme	Polimerizasyon
İlk Döngü	95°C'de 3'		
30 ^d	95°C'de 45"	55°C'de 1'	72°C'de 45"
Son Döngü			72°C'de 10'
Soğutma	4°C'de ∞		

*Biometra TProfessional ısı döngü cihazı.

5.3.4. PZR amplifikasyonu sonrası DNA miktarının belirlenmesi

DNA miktarını belirlemek için 5 µl PZR ürününden alınarak yükleme boyası ile karıştırıldı, %1'lik agaroz jele yüklendi. Kuyucuklardan birine 50 bç'lik DNA belirteci yüklenerek, ultraviyole (UV) transluminatör cihazında (Vilber Lourmat, Fransa) görüntüleme yapıldı.

5.3.5. PZR ürünlerinin *MnII* enzimi ile kesimi

"Anza 48 *MnII* (5 U/µL), Life Technologies" kiti protokolüne göre aşağıdaki işlemler uygulandı. PZR amplifikasyonu sonrası *MnII* kesim bileşenleri Tablo 7'de gösterildi.

1. 1,5 mL'lik tüpte Tablo 7'de belirtilen bileşenlerle karışım hazırlandı.
2. Nazikçe karıştırıldı ve birkaç saniye kısa devir santrifüj edildi.
3. Karışım 0,2 mL'lik tüplere dağıtıldı.
4. 0,2 mL'lik tüplere 10 µl PZR ürünü eklendi, karıştırıldı.
5. *MnII* enzim aktivasyonu için 37 °C'de 10 dk. inkübe edildi.

Tablo 7. PZR amplifikasyonu sonrası *MnII* enzim kesim bileşenleri

Kesim Bileşenleri	1X
Steril H ₂ O	7 µl
10X Red Tampon	2 µl
48 <i>MnII</i> Enzim	1 µl
PZR Ürünü (~0,1-0,5 µg DNA)	10 µl
Toplam	20 µl

*37°C'de 15 dk. inkübe edildi.

Kesim paternlerini belirlemek için, 10 µl PZR-RFLP ürününden alındı, %3'lük agaroz jele (%1 nüssive, %2 agaroz) yüklendi. Kuyucuklardan birine 50 bç'lik DNA belirteci yüklenerek, UV transluminatör cihazında görüntüleme yapıldı. Elektroforez yöntemiyle restriksiyon parça uzunlukları görüntülendi.

5.4. Kapiller Elektroforez DNA Sekanslama

Boya sonlandırma dizileme yöntemi kullanılarak çift zincirli mtDNA kontrol bölgesi (D-loop) HVR1'i (16024-16383 np) kapsayan ~630 bç'lik hedef bölge (15911-16540 np), otomatik DNA dizileme cihazı (Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer) ile analiz edildi. Bu yöntemde farklı floresan boya ile işaretlenmiş dört dideoksinükleotit trifosfat (ddNTP) dizi sonlandırıcılar kullanıldı. Kapiller içerisinde ilerleyen DNA parçaları, lazer okuyucu tarafından yaydığı floresan dalga boyuna göre tespit edildi ve dizi kromatogramı olarak elde edilen dizi, NCBI veri tabanından sağlanan referans dizisiyle (rCRS, NC_012920) karşılaştırılarak DNA dizi analizi gerçekleştirildi.

5.4.1. PZR ürünlerinin temizlenmesi

PZR ürünlerinin temizlenmesi için "ExoSAP-IT PCR Clean-Up, Affymetrix" protokolüne göre aşağıdaki işlemler uygulandı.

1. 0,2'lik PZR tüplerine 5 µl PZR ürünleri pipetlendi.
2. PZR reaksiyondan kalan artıkların temizlenmesi için üzerlerine 2 µl ExoSAP-IT enzimi eklendi. Toplam hacim 7 µL'dir.
3. 37°C'de 15 dk. inkübe edilerek, PZR'dan kalan primerler ve nükleotidler degrade edildi.
4. ExoSAP-IT inaktivasyonu için 80°C'de 15 dk. inkübe edildi.
5. Pürifiye olmuş ürünler analiz edilene kadar -20°C'de saklandı.

5.4.2. Sekans reaksiyonunun hazırlanması

Saflaştırılmış PZR ürünleri floresan işaretli dideoksinükleotidlerin kullanıldığı döngüsel dizileme tepkimesine tabi tutuldu. Bu tepkime "BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo Fisher Scientific" kullanılarak gerçekleştirildi. Döngüsel dizileme tepkimesi için kullanılacak kimyasalların konsantrasyonları ve hacimleri Tablo 8'te verildi. Her örnek için ileri ve geri primerler kullanılarak ayrı

iki döngüsel dizileme tepkimesi yapıldı.

Tablo 8. Sekans reaksiyonu

Reaksiyon Bileşenleri	Final Konsantrasyon	1X
BigDye Terminator	2X	2µl
BigDye Dizileme Tamponu	5X	2 µl
Primer (ileri ya da geri)	2 pmol	2µl
Steril H ₂ O (toplam hacim 10 µL olacak şekilde ayarlandı.)		
Kalıp DNA	3-10 ng	1-4 µl
Toplam Reaksiyon Hacmi	10 µl	10 µl

Tepkime için hazırlanan mikrosantrifüj tüplerine malzemeler konulduktan sonra tüpler tepkimenin gerçekleşmesi için ısı döngü cihazına konuldu. Isı döngü cihazındaki program Tablo 8a'da gösterilmektedir.

Tablo 8a. Döngüsel dizileme tepkimesinin programı*

Döngü Sayısı	Hedef Bölgenin PZR Basamakları		
	Denatürasyon	Eşleşme	Polimerizasyon
İlk Döngü	96°C'de 1'		
25 ^d	96°C'de 10"	50°C'de 5"	60°C'de 4'
Soğutma	4°C'de ∞		

*Biometra TProfessional ısı döngü cihazı.

5.4.3. Ekstensiyon ürünlerinin saflaştırılması

Sekans reaksiyonunun ardından etilendiamin tetraasetik asit/sodyum asetat/ethanol (EDTA/NaOAc/Etanol) çöktürmesi ile ekstensiyon ürünleri saflaştırıldı. Bu işlemler için aşağıdaki sıra takip edildi. DNA sekans ürünleri pürifiye edildi.

1. 1,5 µl'lik mikrosantrifüj tüpü içerisine 1 µl 125 mM EDTA (pH:8.0), 1 µl 3M NaOAc (pH 4.8), 1 µl glikojen eklenerek karışım hazırlandı.
2. 0,2'lik PZR tüplerindeki sekans örneklerinin üzerine karışımdan 3'er µl eklendi, toplam 13 µl'lik karışım pipetleme yapılarak 96'luk plate'e (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode) aktarıldı.
3. Üzerine 25 µl soğuk %100 alkol eklendi, plate seal'ı ile üzeri kapatıldı. Birkaç saniye hafifçe vorteks ile karıştırıldıktan sonra, 15 dk. oda

sıcaklığında inkübe edildi.

4. Plate santrifüjü ile 1850 g'de 45 dk. çevrildi.
5. Plate seal'ı çıkarılıp, plate üzeri, kağıt peçete ile kapatılarak, plate ters çevrildi ve 165 g'de 1 dk. çevrildi.
6. Plate kuyularına 35 µl %70 etanol pipetlendi. Plate üzeri seal ile kapatılarak, 1650 g'de 15 dk. santrifüj edildi.
7. Plate seal'ı çıkarılıp, plate üzerine kağıt peçete örtülüp, plate ters çevrildi ve 185 g'de 2 dk. çevrildi.

5.4.4. Elüsyon ve denatürasyon aşaması

Plate, PZR ısı döngü cihazında 56 °C'de 3 dk. kapak açık tutularak, ethanol kurutma işlemi ardından, plate kuyularına 10'ar µl formamid eklenerek üzeri septa ile kapatıldı ve PZR ısı döngü cihazında 95°C'de 3 dk. denatüre edildi. Ardından plate kırık buz içerisine alınıp renatüre edildi. Örnekler ışıktan korunarak, ABI 3500 genetik analiz cihazında dizileme işlemi gerçekleştirildi.

5.5. İstatistiksel Analiz

Elde edilen veriler çalışma formlarına kaydedildi, nicel ve nitel değerler olarak ikiye ayrıldı ve SPSS 22.0 istatistik paket programı ile GraphPad InStat 3.05 programı kullanılarak istatistiksel analizleri yapıldı. İstatistiksel hesaplamalar için ikiden fazla grubun kategorik değişkenlerine ait verilerin karşılaştırmasında "Pearson'un ki-kare testi"; iki satır iki sütunlu, küçük örneklem hacmine sahip olanlarda "Fisher'in kesin ki-kare testi" kullanıldı. Tüm bu istatistiksel çalışmalar için p değerinin " <0.05 " olması anlamlı olarak kabul edildi. İkiden fazla grubun sürekli değişkenlerine ait verilerin karşılaştırılmasında parametrik dağılım gösterenler "One Way ANOVA testi"; ikiden az olanların "Independent Sample T testi" kullanıldı. Non-parametrik ikiden fazla grubun sürekli değişkenlerine ait verilerin karşılaştırılmasında "Kruskal Wallis H testi"; ikiden az olanlarında "Mann Whitney U testi" kullanıldı. Tüm bu istatistiksel çalışmalar için p değerinin " <0.05 " olması durumunda sonuçlar anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Klinik Bulgular

Çalışmaya biyopsi kanıtlı 150 NASH hasta birey ve 150 sağlıklı kontrol birey alındı, yaş ve cinsiyetleri eşleştirildi. Yaş ortalaması ve standart sapma değeri sırasıyla, hasta bireylerin, 45.08 ± 9.41 yıl; kontrol bireylerin, 44.76 ± 9.14 yıl, 18 ile 60 yaş arasıydı. Çalışmaya katılan hastaların klinik bulguları Tablo 9’da verildi.

Tablo 9. NASH’li hastaların klinik bulgularına göre demografik ve biyokimyasal karakterleri

Değişkenler	Nicelikler
Yaş (yıl)*	45.08 ± 9.41 (n=150)
Cinsiyet (kadın/erkek)	75/75 (n=150)
VKİ (kg/m ²)*	31.7 ± 5.69 (n=150)
Histolojik steatoz**	2 (1-3)
Lobüler inflamasyon**	2 (1-2)
Balonlaşma**	2 (1-2)
Fibroz**	1 (0-2)
NASH skoru**	5 (4-6)
Diyabet (var/yok)	44/103 (n=147)
Metabolik sendrom (var/yok)	94/56 (n=150)
Hipotiroid (var/yok)	23/127 (n=150)
Hipertansiyon (var/yok)	44/104 (n=148)
Hiperlipidemi (var/yok)	79/67 (n=146)
Safra taşı hastalığı (var/yok)	20/127 (n=147)
HOMA-IR**	5.02 (5.02-32.95) (n=137)
Sistolik kan basıncı (mmHg)*	129.22 ± 18.08 (n=148)
Diastolik kan basıncı (mmHg)*	82.72 ± 11.14 (n=148)
AST (U/L)*	51.53 ± 37.1 (n=150)
ALT (U/L)*	79.05 ± 44.92 (n=150)
Total kolesterol (mg/dL)*	211.92 ± 43.94 (n=149)
HDL kolesterol (mg/dL)*	44.62 ± 10.32 (n=149)
LDL kolesterol (mg/dL)*	134.33 ± 40.13 (n=147)
Trigliserit (mg/dL)*	192.44 ± 108.52 (n=149)
CRP (mg/dL)*	2.39 ± 3.14 (n=141)

*Ort.-Ss. değerleri Student’in t testi ile hesaplandı. **Medyan değerleri çeyrekler açıklığı olarak ifade edildi ve Mann-Whitney U testi ile karşılaştırıldı. (Kısaltmalar: Ort.-Ss., ortalama-standart sapma; VKİ, vücut kitle indeksi; HOMA-IR, insülin direnci; AST, aspartat aminotransferaz; ALT, alanin aminotransferaz; HDL, yüksek yoğunluklu lipoprotein; LDL, düşük yoğunluklu lipoprotein; CRP, C-reaktif protein)

6.2. mt16189 T/C *MnI* PZR-RFLP Bulguları

Polimorfizm çalışmalarında Hardy-Weinberg eşitliğinin sağlanması için kontrol grubu bireylerinin heteroplazmi göstermesi gerekir. mtDNA 16189T/C (rs28358586) PZR-RFLP çalışmamızda homoplazmi saptandığı için (bir kişi hariç), Hardy-Weinberg eşitliği kontrol grubunda dengeli ($p < 0,001$) dağılım göstermedi.

mt16189 T/C polimorfizmini değerlendirmek için kullandığımız *MnI* PZR-RFLP analizine göre, majör (C) ve minör (T) allele ait genotipler belirlendi. Ayrıca, atipik bant paternlerine sahip örnekler gözlemlendi (Tablo 10).

mt16189 T/C genotip tayini için ileri ve geri primer çiftleri ile gerçekleştirdiğimiz PZR ve *MnI* PZR-RFLP ürünlerinin (~630 bp) agaroz jel elektroforez bant görüntüleri Resim 7’de verildi.

Tablo 10. mtDNA16189 T/C *MnI* PZR-RFLP Sonuçları

Genotip, Allel ve Atipik Patern Dağılımı	NASH grubu n=150	Kontrol grubu n=150
Genotip sıklığı		
Majör allele ait genotip (TT)	119 (%85.61)	117 (%83.57)
Minör allele ait genotip (CC)	20 (%14.38)	23 (%16.42)
Toplam	139	140
Allel sıklığı		
T alleli	238	234
C alleli	40	46
Toplam	278	280
Atipik patern sıklığı		
	11 (%7.33)	10 (%6.66)
Toplam	150	150

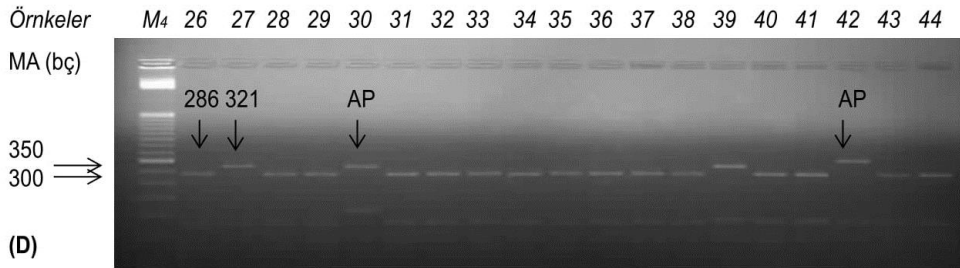
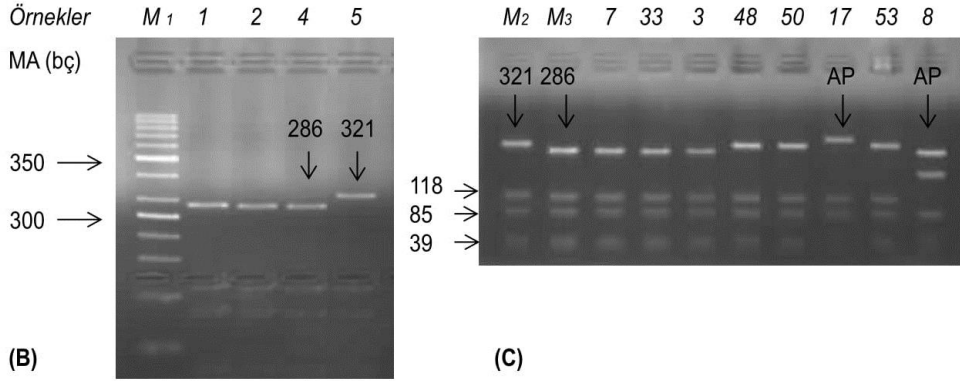
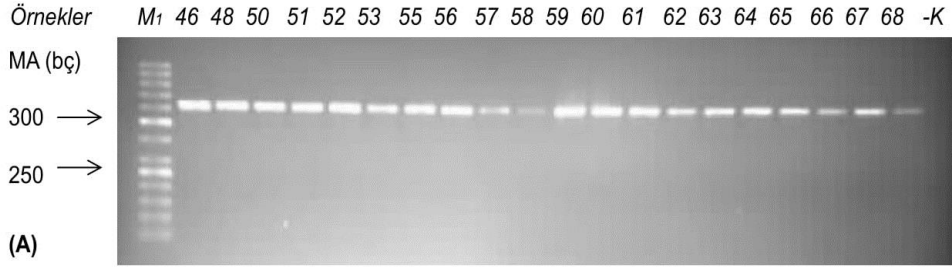
mtDNA 16001 - 16540 np (630 bç)

İleri primer →

← Geri primer

MnII (CCTC) RFLP

16189	16224	16263	16381	16409	16448		16224	16263	16381	16409	16448	
286	35	39	118	28	39	85	321	39	118	28	39	85
bç	bç	bç	bç	bç	bç	bç	bç	bç	bç	bç	bç	bç



Resim 7. PZR ve PZR-RFLP jel görüntüleri (A) İleri ve geri primer çiftleri kullanılarak, mtDNA kontrol bölgesi, ~630 bç büyüklüğündeki PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi. 5 µl PZR ürünleri %1,5'luk agaroz jelin kuyularına yüklendi. Szantai ark. 2006'dan uyarlandı. (B, C, D) mt16189 T/C polimorfizmini (rs28358586) belirlemek için *MnII* PZR-RFLP uygulandı. Şeklin üzerinde yazılanlar: T alleli varlığında bantların parça uzunlukları, 286, 118, 85, 39 bç; C alleli varlığında ise 321, 118, 85, 39 bç'dir. (Kısaltmalar, MA: Moleküler ağırlık; M_1 (50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific), M_2 , M_3 (321, 286 bç); M_4 (50 bp DNA ladder, Invitrogen, USA): Belirteç; AP: Atipik patern; -K: negatif kontrol. (Örnekler satırında yazan sayılar, kuyulara yüklenen hasta ve kontrol bireylere ait ürünlerdir.)

6.3. mtDNA Dizi Analizi Bulguları

ABI 3500 otomatik dizi analizi cihazı kullanılarak, 150 NASH, 150 sağlıklı kontrol birey olmak üzere toplam 300 PZR ürünü (mtDNA 16911-16540 np) dizilendi.

mt16189 T/C polimorfizmi için yapılan PZR-RFLP sonuçları ile dizi analizinden elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı. Buna göre, RFLP sonucu normal bant paterni olarak değerlendirilen ancak, dizi analizi sonucu ile eşleşmeyen bir örnek tespit edildi. mtDNA C16187T, T16189C dizisine sahip hasta erkek bireyde belirtilen nükleotit varyasyonlarından kaynaklanan yeni bir *MnII* enzim tanıma dizisi oluştu ve kesim yaptı. Böylelikle aslında mt16189 np için CC genotipe sahip birey, RFLP sonucuna göre TT genotipli olarak belirlendi ve yanlış RFLP sonucu verdiği anlaşıldı.

mtDNA 16189 np için gerçekleştirilen *MnII* PZR-RFLP analizine göre atipik RFLP bant paterni gösteren bireylerin nükleotit değişimleri incelendi. Elde edilen dizi analizi sonuçlarına göre 29 atipik patern 6 grup altında toplandı (Tablo 11).

AP_{1a}'da T16189C, C16223T; AP_{1b}'de T16189C, T16224C; AP_{1c}'de T16189C, C16222T, T16224C; AP_{1e}'de C16187T, C16188A/G, T16189C, C16223T; AP_{1f}'de C16188A, C16223T nükleotit değişimleri nedeniyle *MnII* enzimi ilk iki kesim bölgesini atlayarak sırasıyla 360, 118, 28, 39 bç kesim paternleri oluşturdu.

AP_{1d}'de T16189C, C16222T, C16261T; diğerlerinden farklı olarak C16261T varyantı *MnII* enzimi 3. kesim bölgesini değiştirip yeni bir kesim bölgesi oluşturmasına rağmen, 358, 118, 28, 39 bç kesim paternlerini verip, benzer bir RFLP paterni gösterdiği için AP₁ grubunda değerlendirildi.

AP₂, T16189C, C16356C nükleotit değişimleri ile karakterizedir, T16356C varyantı *MnII* için yeni bir enzim tanıma bölgesi oluşturarak sırasıyla 321, 39, 94, 24, 28, 39 bç kesim paternlerini verdi.

AP₃, T16189C, C16264G nükleotit değişimleri nedeniyle *MnII* enzimi birinci ve üçüncü kesim bölgesini atlayarak sırasıyla 321, 157, 28, 39 bç kesim paternlerini oluşturdu.

AP₄, T16356C varyantına sahiptir ve bu varyant *MnII* enzimi için yeni bir enzim tanıma bölgesi oluşturarak sırasıyla 286, 35, 39, 94, 24, 28, 39 bç kesim paternlerini

verdi.

AP_{5a}, C16223T, C16264T; AP_{5b}, C16223T, C16262T nükleotit değişimleri nedeniyle *MnII* enzimi ikinci ve üçüncü kesim bölgelerinde kesim yapmayarak, 286, 192, 28, 39 bç kesim paternleri oluşturdu.

AP₆, C16187T, C16222T, C16261T nükleotit değişimlerinden; C16187T varyantı, T16189T np kesim bölgesini kaldırdı ve C16261T varyantı ile yeni *MnII* enzim kesim bölgeleri oluşturarak diğer nükleotit değişimleri ile birlikte 284, 74, 138, 28, 39 bç kesim paternlerini verdi.

Ayrıca, her iki çalışma grubu için, 11/300 bireyde T16189T-C16261T, 3/300 bireyde T16189C-C16261T nükleotit kombinasyonları ekstra *MnII* enzim tanıma bölgesi oluşturdu. Kesim parçalarının uzunlukları farklı olsa da, RFLP bantları normal olarak yansıdığı için atipik patern sınıflandırmasına dahil edilmedi, ancak nükleotit kombinasyonları gösteren haplotipik örnekler olarak belirtildi.

Tablo 11. Restriksiyon enzimi *MnII* atipik paternler motifi ile parçaların uzunluğu (bç)

mtDNA bölgesi	HVI															Atipik patern sonuçları	
rCRS pozisyonu	16187	16188	16189	16222	16223	16224	16261	16262	16263	16264	16356	16357	16381	16409	16448		
rCRS baz bç	C	C	I	C	C	I	C	C	I	C	T	T	I	I	I		
	<u>286</u>			<u>35</u>			<u>39</u>			<u>118</u>			<u>28</u>	<u>39</u>		H/K	
AP1a			C			T T			T				T	T	T		H: 3
bç									<u>360</u>				<u>118</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 7
AP1b			C			C			T				T	T	T		H: 1
bç									<u>360</u>				<u>118</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 1
AP1c			C		T	C			T				T	T	T		H: 0
bç									<u>360</u>				<u>118</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 1
AP1d			C		T	T			T				T	T	T		H: 0
bç									<u>358</u>				<u>118</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 1
AP1e	T	A/G	C			T T			T				T	T	T		H: 1
bç									<u>360</u>				<u>118</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 1
AP1f		A				T T			T				T	T	T		H: 0
bç									<u>360</u>				<u>118</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 1
AP2			C			T			T			C T	T	T	T		H: 1
bç									<u>321</u>			<u>94</u>	<u>24</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 0
AP3			C			T			T	G			T	T	T		H: 1
bç									<u>321</u>				<u>157</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 0
AP4			T			T			T			C T	T	T	T		H: 3
bç			<u>286</u>			<u>35</u>			<u>39</u>			<u>94</u>	<u>24</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 2
AP5a			T			T T			T T				T	T	T		H: 1
bç			<u>286</u>										<u>192</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 1
AP5b			T			T T			T T				T	T	T		H: 1
bç			<u>286</u>										<u>192</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 0
AP6	T					T T			T				T	T	T		H: 2
bç	<u>284</u>								<u>74</u>				<u>138</u>	<u>28</u>	<u>39</u>		K: 0
Atipik Paternler	Toplam															29	

(Pereira ve ark. 2006'dan uyarlandı,) (Kısaltmalar, HVI: Hiper değişken bölge I; rCRS: Cambridge referans dizisi; bç: Baz çifti; AP: Atipik patern; H: Hasta birey, K: Kontrol birey)

150 NASH hasta birey, 150 sağlıklı kontrol birey ile yapılan mtDNA kontrol bölgesi dizi analizi sonucu, toplam 139 nükleotit varyasyonu tespit edildi (Tablo 12). Bunlar arasında 19 nükleotit varyasyonunun prevalansı %5'den fazlaydı. Bu nükleotit varyasyonları arasında 1 yeni mutasyon (C16053G) ve 2 yeni heteroplazmi (16234 C-CT; 16256 C-CT) literatüre kazandırıldı (referans dizi: RefSeq. NC_012920).

Bu çalışmada, mtDNA kontrol bölgesi için T16126C, C16294T varyantlarının NASH grubunda %24, kontrol grubunda %12 olarak birlikte kalıtılan nükleotit kombinasyonları olduğu belirlendi.

Çalışmamızda 3 ayrı kadın bireyde, 3 tri-nükleotit varyasyonu, C16187-C16188-T16189, TAC (hasta); C16187-C16188-T16189, TGC (kontrol); C16294-C16295-C16296, TTT (kontrol); 8 ayrı bireyde 4 di-nükleotit varyasyonu, A16182C-A16183C (4 kontrol birey, 1 hasta birey), A16194C-T16195C (1 kontrol birey), C16294T-C16295T (1 kontrol birey), A16318T-G16319A (1 hasta birey) belirlendi (Tablo 12a). Ayrıca, 4 ayrı bireyde, 16189 T-TC; 16234 C-CT; 16256 C-CT; 16399 A-AG, heteroplazmileri saptandı (Resim 8).

NASH hasta grubunda, mt16129 G>A, AA genotipi fibroz (p=0.0468, OR= 5.436, 95% CI= 1.081-27.347), mt16163 A>G, GG genotipi MetS (p= 0.046, OR= 9.686, 95% CI= 0.5421-173.05), mt16249 T>C, CC genotipi lobüler inflamasyon (p= 0.0211, OR= 13.199, 95% CI= 0.7469-233.24) ve histolojik steatoz (p= 0.0281, OR= 13, 95% CI= 0.7082-238.63), mt16256 C>T, TT/TC genotipi ile diyabet (p= 0.0213, OR= 5.263, 95% CI= 1.252-22.119), mt16294 C>T, TT genotipi ile MetS (p= 0.0286, OR= 3.117, 95% CI= 1.107-8.778), mt16296 C>T, TT genotipi ile hipertiroit (p= 0.0303, OR= 4.132, 95% CI= 1.217-14.033) ilişkisi saptandı (Tablo 12b).

mtDNA mt16318 A>C polimorfizminin CC genotip frekansı NASH grubunda anlamlılığa yakın olarak kontrol grubuna göre yüksek bulundu (hasta grubu, 5/150; kontrol grubu, 0/150; p=0.0604).

Türk popülasyonu ile gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada saptanan polimorfizmler HaploGrep 2 programı (<http://haplogrep.uibk.ac.at/>, Erişim tarihi: 15 Şubat 2017) ile haplotip analizi yapılarak doğrulandı. Buna göre; R makro-haplogrubuna ait, haplogrup H2a2a1 içerisinde, H2a2a1d-T16172C (4 birey); H2a2a1g-T16189C (15 birey); H2a2a1h-C16320T (6 birey) alt haplogrupları belirlendi (Tablo 12c).

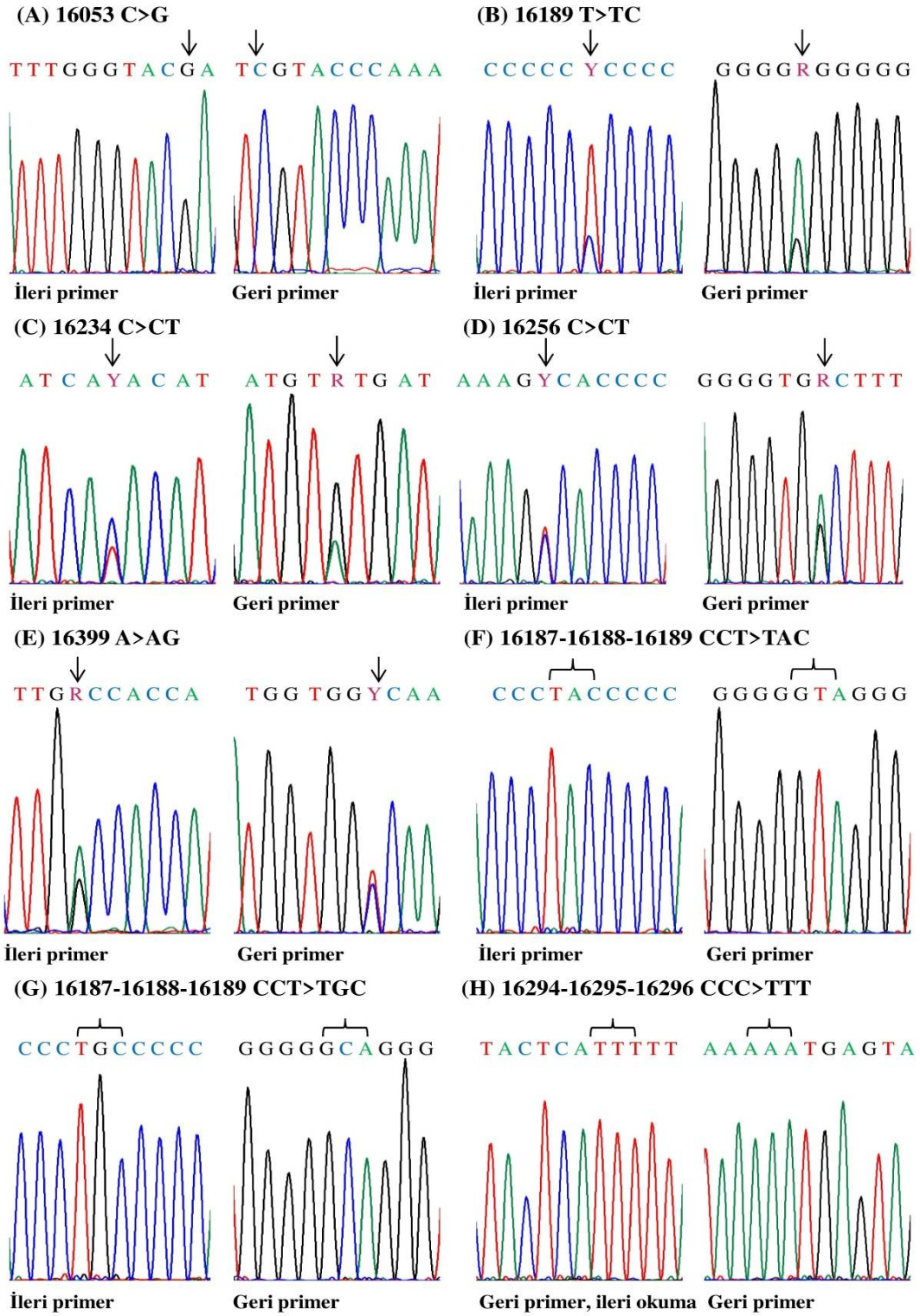
Tablo 12. mtDNA dizi analizi sonuçları: Yaygın ve nadir nükleotit varyasyonları

19 yaygın polimorfizm (>%5) (n=300)			120 nadir nükleotit varyasyonu (<%5) (n=300)				
mtTNP	Hasta	Kontrol	Hasta ve kontrol grubu				
C16069T	15 (%10)	12 (%8)	A16051G	T16172C	A16215G	A16258C	A16316G
T16093C	4 (%0.6)	8 (%5.33)	C16053G	C16173T	T16217C	C16260T	A16318T
T16126C	42 (%28)	32 (%21.33)	A16058C	C16174T	C16218T	C16261T	A16318C
G16129A	14 (%9.33)	16 (%10.66)	A16066G	C16176G	A16219G	C16262T	G16319A
G16145A	10 (%6.66)	7 (%4.66)	C16067T	C16176T	A16220C	C16264G	C16320T
A16183C	14 (%9.33)	19 (%12.66)	A16070G	T16178C	C16221T	C16264T	T16324C
T16189C	34 (%22.66)	38 (%25.33)	C16071T	C16179T	C16222T	A16265G	T16325C
C16223T	23 (%15.33)	29 (%19.33)	T16075C	A16182C	A16227G	C16266T	C16327T
T16224C	15 (%10)	14 (%9.33)	A16078G	C16184T	A16230G	C16270T	C16328A
T16249C	8 (%5.33)	6 (%4)	T16086C	C16186T	T16231C	T16271C	C16344T
T16256C	8 (%5.33)	9 (%6)	T16092C	C16187T	C16232A	A16272G	T16352C
C16278T	5 (%3.33)	10 (%6.66)	T16102C	C16188G	C16234T	G16274A	C16353A
C16292T	8 (%5.33)	8 (%5.33)	C16111T	C16188A	C16234G	C16287T	C16355T
C16294T	27 (%18)	20 (%13.33)	C16114A	T16189TC	C16234CT	T16288C	T16356C
C16296T	13 (%8.66)	9 (%6)	T16124C	C16192T	A16235G	A16289G	T16357C
T16304C	9 (%6)	11 (%7.33)	T16136C	C16193T	C16239T	C16290T	T16359C
T16311C	30 (%20)	29 (%19.33)	C16147A	A16194C	A16240G	C16291T	T16368C
A16343G	10 (%6.66)	13 (%8.66)	C16148T	T16195C	C16242T	A16293G	G16390A
T16362C	9 (%6)	14 (%9.33)	C16150T	C16201T	T16243C	C16295T	G16391A
			G16153A	A16203G	G16244A	T16298C	A16399G
			A16162G	A16206C	C16248T	A16299G	A16399AG
			A16163G	T16209C	C16250T	A16300G	T16443C
			C16168T	G16213A	C16256CT	C16301T	C16465T
			C16169T	C16214T	C16257A	A16309G	A16482G

Tablo 12a. mtDNA dizi analizi sonuçları: Di-nükleotit ve tri-nükleotit varyasyonları

Di-nükleotit varyasyonu	Allel	Hücre veya Doku Türü	Hastalık
A16182C-A16183C	A16182C A16183C	Prostat tümörü Akciğer tümörü, Prostat tümörü	Melanom hastaları
A16194C-T16195C	A16194C T16195C		
C16294T-C16295T	C16294T C16295T		
A16318T-G16319A	A16318T G16319A		
Tri-nükleotit varyasyonu	Allel	Hücre veya Doku Türü	Hastalık
C16187T-C16188G-T16189C C16187T-C16188A-T16189C	C16187T T16188G/A T16189C	Akciğer tümörü Prostat tümörü, Normal bukkal bez	Diyabet, Kardiyomiyopati, Endometrial kanser riski, Metabolik sendrom , Melanom hastaları
C16294T-C16295T-C16296T	C16294T C16295T C16296T		

(Varyasyonlar ile hücre veya doku türü ve hastalık ilişkisi, Mitomap web sitesinden referans alındı, <http://www.mitomap.org/foswiki/bin/view/Main/SearchAllele>, Erişim tarihi: 20/05/2017)



Resim 8. Dizi analizi kromotogram görüntüleri (A) mt16053 C>G yeni mutasyon (B) mt16189 T>TC heteroplazmi (C) mt16234 C>CT yeni heteroplazmi (D) mt16256 C>CT yeni heteroplazmi (E) mt16399 A>AG heteroplazmi (F) mt16187-mt16188-mt16189 CCT>TAC tri-nükleotit varyasyonu (G) mt16187-mt16188-mt16189 CCT>TGC tri-nükleotit varyasyonu (H) mt16294-mt16295-mt16296 CCC>TTT tri-nükleotit varyasyonu, T16189C varyantına sahip olduğu için, geri primer kromotogramı paylaşıldı. (A, B, C, D, E, F, G) ileri ve geri primerler kullanılarak dizi analizi yapıldı.

Tablo 12b. mtDNA dizi analizi sonuçları: NASH grubu ile mtDNA varyantları arasındaki ilişki

Değişkenler	Genotipler		Değerler		
	GG	AA	P değeri	OR	%95 CI
mt16129 G>A					
Fibroz 0	53	3	0.0468	5.436	1.081-27.347
Fibroz 3-4	13	4			
mt16163 A>G	AA	GG	P değeri	OR	%95 CI
Metabolik sendrom yok	56	0	0.046	9.686	0.5421-173.05
Metabolik sendrom var	87	7			
mt16249 T>C	TT	CC	P değeri	OR	%95 CI
Lobüler inflamasyon 1	62	0	0.0211	13.199	0.7469-233.24
Lobüler inflamasyon 2-3	80	8			
Histolojik steatoz 1	40	0	0.0281	13	0.7082 - 238.63
Histolojik steatoz 3	40	6			
mt16256 C>T	CC	TT/CT	P değeri	OR	%95 CI
Diyabet yok	100	3	0.0213	5.263	1.252-22.119
Diyabet var	38	6			
mt16294 C>T	CC	TT	P değeri	OR	%95 CI
Metabolik sendrom yok	51	5	0.0286	3.117	1.107-8.778
Metabolik sendrom var	72	22			
mt16296 C>T	CC	TT	P değeri	OR	%95 CI
Hipotiroit yok	119	8	0.0303	4.132	1.217-14.033
Hipotiroit var	18	5			

P değeri, OR ve %95 CI değerleri Graphpad programı ile hesaplandı. (Kısaltmalar: OR, göreceli olasılıklar oranı; %95 CI, güven aralığı)

Tablo 12c. mtDNA dizi analizi sonuçları: Haplogruplar ve lokal özel mutasyonlar

Makro-haplogrup R n=300		Haplogrup: H2a2a1			n (%)			
		H2a2a1d			4 (1,33)			
		H2a2a1g			15 (5)			
		H2a2a1h			6 (2)			
Haplogrup	Kimlik	Lokal özel mutasyonlar						
H2a2a1d- T16172C	10h-K	16126C	16294T	16304C				
	42h-K	16188A	16189C	16223T	16230G	16234T	16311C	
	21h-E	16086C	16187T	16189C				
	32k-E	16069T	16126C	16145A	16261T	16309G		
H2a2a1g- T16189C	14h-K	16168T	16192T	16343G				
	34h-K	16126C	16163G	16186T	16291T	16294T		
	56h-E	16095	16113C	16136A	16149C	16318C		
	34h-E	16126C	16294T	16296T				
	39h-E	16293G	16343G	16390A				
	26h-E	16126C	16163G	16186T	16294T			
	4h-E	16126C	16163G	16186T	16294T			
	41h-E	16145A	16189Y	16368C				
	1k-K	16256T	16318T	16368C				
	12k-K	16126C	16163G	16186T	16294T			
	47k-K	16126C	16163G	16186T	16294T			
	50k-K	16223T						
	12k-E	16126C	16163G	16186T	16248T	16266T	16271C	16294T
	46k-E	16126C	16163G	16186T	16294T			
63k-E	16223T	16278T	16293C					
H2a2a1h- C16320T	29h-K	16086C	16147A	16172C	16209C	16223T	16248T	16355T
	56h-K	16071T	16172C					
	13k-K	16069T	16126C	16145A	16192T	16222T	16261T	
	35k-K	16069T	16126C	16193T				
	41k-K	16086C	16172C	16187T	16188G	16189C	16223T	16230G
	54k-K	16320T						

(Kısaltmalar, h-K: Kadın hasta; h-E: Hasta erkek; k-K: Kadın kontrol; k-E: Erkek kontrol)

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

IR, obezite, hiperlipidemi, hipertansiyon, MetS, primer NASH komponentleridir. Nitekim birçok ülkede, NAYKH'nin %30-40'ında obezite, yaklaşık %50'sinde IR, %20-30'unda T2D, %80'inde hiperlipidemi, %30-60'ında arteriyal hipertansiyon görülür (Bedogni ve ark., 2005; Marchesini ve ark., 1999). Yağlı karaciğerde mitokondriyal disfonksiyon hepatosit hücre hasarına yol açar. Birinci vuruşta, IR ve hepatositlerde TG birikimi, serbest yağ asidi (FFA) artışına sebep olur, ikinci vuruşta, mitokondriyal hasar ile birlikte oksidatif stres artar, ATP miktarında azalma meydana gelir. Oksidatif fosforilasyondan sorumlu olan mitokondrinin kodlamış olduğu genlerde meydana gelen nükleotit varyasyonları, mitokondri disfonksiyonunu etkileyebilir.

Günümüzde, mtDNA kodlama yapmayan kontrol bölgesi (D-loop), mtDNA ağır zincir replikasyon orijini ve her iki zincirin (hafif ve ağır) transkripsiyon promotör bölgesini içerdiği için, meydana gelen nükleotit varyasyonları ve hastalık ilişkisi araştırılmaktadır. Bu bölgede yer alan mtDNA T16189C varyantı ile IR ve T2D'yi ilişkili bulan çalışmaların sonuçları tartışmalıdır. Biz bu çalışmada, mt16189 T>C polimorfizmini kapsayasan, mtDNA kontrol bölgesi nükleotit varyasyonlarının NASH ile ilişkisini araştırdık.

Liou ve ark. çalışmalarında, mtDNA T16189C varyantının prevalansı, 462 T2D'li bireyde %39.2, 592 non-T2D'li bireyde %30.7 idi ($p=0.004$), (Liou ve ark., 2007). Park ve ark.'ın, Kore, Japon, Tayvan, Hong Kong ve Çin'i kapsayan 2469 T2D'li hasta birey ve 1205 non-T2D'li bireyde mtDNA 16189C varyantını araştırdı. Yapılan analiz sonucu, 5 Asya ülkesinden katılımcıları içeren bu çalışmada, T16189C varyantı ile T2D ilişkili bulundu [OR=1.256, %95 CI=1.08-1.46, $p=0.003$]. Tüm örnekler *MnlI* PZR-RFLP ile çalışıldı, sadece 290 PZR ürünü için dizi analizi gerçekleştirildi. Buna göre, 290 PZR ürünü için %99 (287/290) PZR-RFLP ve dizi analizi uyumu gözlemlendi (Park ve ark., 2008).

mtDNA dizi analizi sonuçlarımıza göre bu çalışmada, NASH grubunda 36/150, %24 (36 bireyden birisi TC genotipli, heteroplazmi); sağlıklı kontrol grubunda 38/150, %25.33, T16189C polimorfizim prevalansı belirlendi. Hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmazken, *MnlI* PZR-RFLP analizi sonucu atipik

RFLP bant paternlerine sahip bireyler tespit edildi. mtDNA T16189C polimorfizim araştırmamızda, PZR-RFLP analiz sonuçları tabloda yer alırken, dizi analizi sonuçlarının ifade edilmesine karar verildi. mtDNA T16189C varyantını araştırmak için kullandığımız *MnII* PZR-RFLP analizi yönteminde saptanan atipik paternlere sahip örnekler, bu pozisyon için gerçek genotip prevalansını belirlemeyi engelledi. Atipik paternlere sahip bireyler dışında, PZR-RFLP ve dizi analizi sonuçları %100 uyumlu bulundu.

Aral ve ark., mtDNA T16189C varyantının prevalansını değerlendirmek için yaptıkları *MnII* PZR-RFLP çalışmalarında, T16189C polimorfizmine sahip, 7/39 T2D'li; 11/31 non-TD2'li birey olduğunu belirtti ve iki grup arasında anlamlı bir fark bulunmadı ($p=0.082$) (Aral ve ark., 2011).

Bir önceki çalışmamızda, mtDNA 16189 T/C polimorfizmi, AS-PZR ve *MnII* PZR-RFLP tekniği kullanılarak araştırıldı. NASH hasta bireylerinde 126/152 (%82.89); sağlıklı kontrol bireylerinde 128/154 (%83.11), T16189C polimorfizmi tespit edildi. Bu çalışmada atipik bant paternlerine sahip örnekler gözlemlendi (Güner, 2014).

Gill-Randall ve ark., 150 T2D'li ve 149 kontrol bireyde T16189C varyantını PZR-RFLP ve dizi analizi ile araştırdı. Dizi analizi sonucuna göre, T2D'de 22/140, ve kontrol bireyde 10/100, T16189C varyantı tespit edildi. Geri kalan 10 T2D'li ve 49 kontrol bireyde, T16189C polimorfizmi PZR-RFLP ile incelendi. Dizi analizinin yüksek maliyeti nedeniyle RFLP analizi yapılırsa da, gerçek polimorfizm prevalansı için dizi analizi yapılması gerektiğini vurguladı. Ayrıca, T16189C varyantı ile T2D, ilişkili bulunmadı (Gill-Randall ve ark. 2001).

Bu çalışmada, mtDNA T16189C varyantı araştırıldı, *MnII* enzim tanıma bölgelerinin kaybı ya da kazancı nedeniyle, PZR-RFLP bant paternlerini etkileyerek analiz sonuçlarını değiştirdiği tespit edildi. Atipik paternlere sahip bireylerde meydana gelen nükleotit varyasyonları incelendi ve sınıflandırıldı. Bunun yanı sıra, atipik PZR-RFLP bant paterni göstermeyen ancak belirli nükleotit kombinasyonları oluşturan haplotipik örnekler değerlendirildi. Haplotipik örnekler referans diziden farklı nükleotit birlikteliği gösterebilirler de, *MnII* RFLP analizi ile farklı bant paternleri oluşturmadıkları için, atipik bant paterni sınıflandırmasına dahil edilmedi. Buna göre, RFLP analizi ile gözlemlendiğimiz atipik bant paternleri kantitatif olarak dizi analizi

ile 29 birey olarak saptandı. Atipik patern sınıflandırmasında en yüksek prevalans AP1a idi [AP1a (10/29, %34,48); AP1b (2/29, %6,89); AP1c, AP1d, AP1f, AP2, AP3, AP5b (1/29, %3,44); AP1e, AP5a, AP6 (2/29, %6,89); AP4 (5/29, %17,24)].

mtDNA T16189C polimorfizmi araştırmamızda, *MnI* PZR-RFLP analizinin hassasiyetini sorgulamamıza neden olan ikinci durum ise, atipik RFLP bant paterni göstermeyen bir erkek hasta bireyde, mt16189 np için RFLP ve dizi analizi arasında farklı genotip sonucu ortaya çıkması oldu. Bu durum bize, atipik ya da normal bant paternine sahip bireylerde, mt16189 T/C polimorfizminin gerçek prevalansı için dizi analizi yönteminin önemini gösterdi. Yanlış RFLP sonucunun nedeni, dizi analizi ile anlaşıldı. mtDNA C16187T-T16189T nükleotit kombinasyonuna sahip bir erkek hasta bireyde C16187T polimorfizminin varlığı ile yeni bir enzim tanıma bölgesi oluştuğu için, RFLP analizinde mt16189 np'de CC genotipli olarak yanlış değerlendirilmesine neden oldu. Aslında bu bireyin 16189 np için genotipi TT iken, RFLP analizinin yanlış sonuç verdiği tespit edildi.

Ayrıca, her iki çalışma grubu için, 11/300 bireyde T16189T-C16261T, 3/300 bireyde T16189C-C16261T nükleotit kombinasyonları tespit edildi ve bu durumda ekstra enzim tanıma bölgesi oluşturdukları anlaşıldı. Ancak, RFLP analizinde anlayabileceğimiz farklılıkta bant paterni gözlenmediği için atipik RFLP bant paterni sınıflandırmasına dahil edilmedi, haplotipik nükleotitlere sahip bireyler olarak ifade edildi. Bu örneklerin mt16189 np için genotipleri değerlendirilirken, RFLP analizi ve dizi analizi sonuçları uyum gösterdi.

Çalışma grubumuzun, mt16189 np için genotip RFLP sonuçları, atipik ve haplotipik bireylerin varlığından dolayı, kantitatif olarak ifade edilmekten kaçınıldı, RFLP analiz sonuçlarına sadece tabloda yer verilirken, jel görüntüleri ile atipik bant paternlerinin bu pozisyon için genotip analizini mümkün kılmayan bant görüntüleri paylaşıldı.

mtDNA kontrol bölgesi dizi analizi çalışmamızda referans diziden farklılık gösteren atipik RFLP paternlerinin ve haplotipik örneklerin varlığı, Türk popülasyonu için ilk bulgular olarak literatüre katkı sağladı. Buna göre, 29 atipik RFLP bant paterni gösteren ve 14 haplotipik nükleotit birlikteliğine sahip, toplam 43 bireyin, mtDNA kontrol bölgesi dizileri, referans diziden farklı örnekler olarak belirlendi. Çalışma grubumuzda toplam 300 örnekten 43'ü (%14.33) Türk

popülasyonuna ait özgül diziler olarak tespit edildi.

Bu çalışma ile yeterli örnek sayısı ve kullanılan iki yöntem göz önüne alındığı zaman, geçmiş yıllarda Türk popülasyonu için az sayıda olan çalışmalara ve bundan sonraki araştırmalara önemli veriler ve bilgiler sundu.

mt16189 np genotiplendirme araştırmaları için literatür incelendi ve *MnII* PZR-RFLP analizi ile gerçekleştirilen çalışmalarda bizi destekleyen bilgilere ulaşıldı. Gibson ve ark., T16189C varyantı için mtDNA HV bölgesinde *MnII* alanlarının kazancı ya da kaybı dolayısıyla örneklerin yaklaşık %10'unun farklı bant paternlerine sahip olduğunu belirtti (Gibson ve ark., 2004). Tang ve ark., T16189C varyantını araştırmak için *MnII* PZR-RFLP analizi gerçekleştirdi ve RFLP sonuçlarında "anormal ürünler" olarak tanımladıkları örnekleri, dizi analizi ile araştırdı (Tang ve ark., 2006). Park ve ark., *MnII* restriksiyon enziminin T16189T varyantı için spesifik olmayıp, 16184-16193 np poli-C alanı içinde, diğer T alanlarını da tanıyabileceğini ve yanlış sınıflandırmalara sebep olabileceğinden söz etti (Park ve ark. 2008).

İlk defa, Ye ve ark. çalışmalarında, mtDNA D-loop bölgesi 16106-16437 np *MnII* restriksiyon alanlarını, RFLP yöntemiyle araştırdı. Buna göre 5 yaygın RFLP paterni gözlemledi, ancak meme kanseri hastaları ile kontrol grupta gerçekleştirdiği bu çalışmada "somatik *MnII* alanı mutasyonlarına" sahip örnekleri karşılaştırdığı zaman, anlamlı bir farklılık olmadığı anlaşıldı (Ye ve ark., 2010).

mtDNA T16189C polimorfizminin T2D ile ilişkisinden bahsederek popüler hale getiren çalışmalardan birisi, Poulton ve ark.'nın yaptığı araştırmadır. Bu çalışmanın diğer bir önemli tarafı da; sonradan bir çok araştırmacı tarafından kullanılacak olan ve T16189C polimorfizm tayini ile özdeşleşmiş *MnII* PZR-RFLP yönteminin literatüre sunulmuş olmasıdır. Bu araştırmaya, 463 T2D hastası ve 469 kontrol birey dahil edildi. mtDNA T16189C varyantı hasta grupta (46/463) kontrollere (30/469) göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde yüksek olarak saptandı (n=932, OR=1.61, %95 CI=1.0-2.7, p=0.048). Ancak *p* değerinden de anlaşılacağı gibi sınırdan anlamlılık gözlemlendi. Biz bu verileri istatistiksel analiz programı kullanarak tekrar değerlendirdiğimiz zaman, gerçekte bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını tespit ettik. Ayrıca, anlamlı bir ilişki bildiren ilk çalışma olmalarına rağmen; sadece T16189C varyantını taşıyan örnekler dizileme ile

doğrulandı (Poulton ve ark., 2002). Biz bu çalışma ile, yöntemin hipotezi araştırırken ortaya çıkan eksik yanlarını vurguladık.

Bu çalışmada, NASH hastalarına ait demografik ve klinik bilgiler değerlendirildi. Buna göre, NASH hasta grubunda mt16129 G>A, AA genotipi ile ileri evre fibroz (F3-F4) arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0.0468$, $OR=5.436$, $95\% CI=1.081-27.347$). mt16129 G>A, AA genotipli bireylerde 5.4 kat, ileri evre fibroz (F3-F4) görülme riski fark edildi. Bir başka deyişle, NASH hastaları arasında bu genotipi taşıyanların ileri evre fibroz gelişme riski anlamlı olarak daha yüksek bulundu.

NASH grubunda, mt16163 A>G, GG genotipi, MetS'li ve MetS'li olmayan bireylerde karşılaştırıldı. mt16163 A>G, GG genotip frekansı MetS'li bireylerde anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu genotip, MetS için bir risk faktörü kabul edildi ($p=0.046$, $OR=9.686$, $95\% CI=0.5421-173.05$).

NASH hastalarında mt16249 T>C, CC genotipi ile ileri evre lobüler inflamasyon arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0.021$, $OR=13.199$, $95\% CI=0.74-233.24$). mt16249 T>C, CC genotipini taşıyanlarda 13 kat daha fazla ileri evre lobüler inflamasyon görülme riski bulundu. NASH hastaları arasında bu genotipi taşıyanlarda ileri evre lobüler inflamasyon gelişme riski anlamlı olarak daha yüksektir. Ayrıca, NASH hastalarında mt16249 T>C, CC genotipi ile ileri evre histolojik steatoz arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptandı ($p=0.0281$, $OR=13$, $95\% CI=0.7082-238.63$).

NASH hastalarında mt16256 C>T, TT/TC genotipi, diyabetli ve diyabetli olmayan bireyler arasında karşılaştırıldı ($p=0.0213$, $OR=5.263$, $95\% CI=1.252-22.119$). mt16256 C>T, TT/TC genotipi ile diyabet arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu.

NASH hastalarında mt16294 C>T, TT genotip frekansı, MetS'li ve MetS'li olmayan bireyler arasında karşılaştırıldı ve mt16294 C>T, TT genotipli bireylerin MetS için bir risk faktörü olduğu belirlendi ($p=0.0286$, $OR= 3.117$, $95\% CI=1.107-8.778$).

NASH hastalarında mt16296 C>T, TT genotipi ile hipertiroitli ve hipertiroitli olmayan bireyler arasında araştırıldı. mt16296 C>T, TT genotipli bireyler ile hipertiroit arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulundu ($p=0.0303$,

OR=4.132, 95% CI=1.217-14.033) ilişkisi saptandı.

Çalışma grubumuzda sadece NASH hasta grubunda saptanan mtDNA A16318C varyantı hastalığı predikte edebilecek aday varyant olarak anlamlığa yakın bulundu (hasta grubu, 5/150; kontrol grubu, 0/150; p=0.0604). Ancak bu varyantın prevalansı %5'ten küçük olduğu için, sonraki çalışmalar için daha geniş bir kitlede ve diğer etnik grupları kapsayacak şekilde araştırılması gerektiği sonucu çıkarıldı. Tüm varyasyonlar içinde, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlılığa yakın olan tek varyant mt16318 A>C idi.

ndNA'da yaklaşık 1000 nükleotitte bir TNP görülmektedir (Carlson ve ark., 2003) İkili ya da üçlü nükleotit değişimleri oldukça nadirdir. Bu durumun mtDNA'ya yansması olarak TNP sıklığı artsa da, di-nükleotit ve tri-nükleotit varyasyonları nadirdir. Çalışma grubumuzda, 8 ayrı bireyde 4 di-nükleotit varyasyonu, A16182C-A16183C (4 kontrol birey, 1 hasta birey), A16194C-T16195C (1 kontrol birey), C16294T-C16295T (1 kontrol birey), A16318T-G16319A (1 hasta birey) belirlendi. Bunlar arasında, mtDNA A16183C varyantı literatürde melanom hastalığı ile ilişkilendirilmiştir.

mtDNA kontrol bölgesinde korunmuş diziler dışında literatürde nadir olarak tri-nükleotit değişimleri görülmektedir. Çalışma grubumuzda 3 kadın bireyde bulunan 3 tri-nükleotit varyasyonu için, literatürde yer alan mtDNA popülasyon genetiği çalışmaları incelendi. mtDNA kontrol bölgesi poli-C alanında C16187-C16188-T16189, TAC (bir hasta birey); C16187-C16188-T16189, TGC (bir kontrol birey) belirlendi. Watkins ve ark. çalışmalarında, Afrikalı 2 bireyde C16187-C16188-T16189, TAC, 5 bireyde C16187-C16188-T16189, TGC (Watkins ve ark., 1999) ayrıca Monsal ve ve Hagelberg'in çalışmalarında, Afrikalı 1 bireyde C16187-C16188-C16189, TGC tri-nükleotit değişimi tespit edildi (Monsal ve Hagelberg, 1997). Çalışma grubumuzda saptadığımız diğer tri-nükleotit değişimi C16294-C16295-C19296, TTT (bir hasta birey) idi. Quintana-Murci ve ark.'ın çalışmalarında, 1 Yunan'lı bireyde C16294-C16295-C19296, TTT varyasyonu bulundu (Quintana-Murci ve ark., 2004).

Çalışma örneklerimizin dizi analizi sonuçları, mtDNA CRS (RefSeq. NC_012920) ile karşılaştırıldı ve tespit edilen tüm varyasyonlar Mitomap sitesinde (<http://www.mitomap.org/MITOMAP>, Erişim tarihi: 15 Şubat 2017) yer alan allel

arama aracı kullanılarak literatür tarandı. Böylece ilk defa bu çalışma ile bir bireyde yeni bir mutasyon mtDNA C16053G ve iki bireyde iki yeni heteroplazmik nükleotit değişimi 16234 C-CT, 16256 C-CT tanımlanarak, literatüre kazandırıldı, ayrıca daha önce bildirilen iki heteroplazmi, çalışmamızda tespit edildi (16189 T-TC ve 16399 A-AG heteroplazmi).

MnII enzim tanıma alanları dışında yer alan nükleotit kombinasyonları olarak, mtDNA T16126C ve C16294T birlikteliği çalışmamızda prevalans olarak yüksek bulundu (toplamda 41/300 %13.66, hasta grubunda 24/150 %16, kontrol grubunda 17/150 %11.33). Benzer şekilde Maliarchuk ve Derenko çalışmalarında, beyaz ırka spesifik mtDNA kontrol bölgesinde T16126C ve C16294T varyantlarını nükleotit kombinasyonları olarak belirtti (Maliarchuk ve Derenko, 1997).

mtDNA 16189 np, HV1 (16184-16193 np) bölgesi içerisinde yer alır. Mutasyonel sıcak nokta olan HV1'de, bir poli-C homopolimerik alan bulunur. CRS'ya göre, ~10 Sitozin (C) tekrarı içeren poli-C bölgesi, 16189 np için Timin (T) tarafından kesintiye uğrar. T16189C polimorfizm araştırmalarında, referans diziye spesifik *MnII* restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak PZR-RFLP yöntemi ile sıklıkla çalışılmaktadır.

Araştırma sonuçlarımıza göre, mtDNA kontrol bölgesinde ortaya çıkan çeşitli nükleotit değişimlerinin varlığı nedeniyle, *MnII* PZR-RFLP'nin hassas bir yöntem olmadığını kanıtladık. Açıkça söyleyebiliriz ki, mtDNA kontrol bölgesi TNP araştırmalarında, dizi analizi dışında kullanılan yöntemler zayıf (AS-PZR, PZR-RFLP, ARMS-PZR (amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi), Real Time PZR gibi), çalışma sonuçları da tartışmalıdır. Bu duruma neden olan mutasyonel mtDNA yapısının mekanizmasını şöyle sıralayabiliriz:

1. OXPHOS sırasında oluşan ROT'lara maruz kalması,
2. nDNA'ya göre tamir mekanizmasının yeterli olmaması,
3. Koruyucu histon proteinlerden yoksun oluşu,
4. mtDNA kontrol bölgesi hiper değişken alanlara sahip olması,

mtDNA TNP analizi için kullanılan metodları uygun kılmazken, altın standart olarak dizi analizi yönteminin çalışmaların güçlü yanı ve çalışma sonuçlarının hassasiyetini arttırdığı, geçmiş yıllarda yapılan *MnII* PZR-RFLP analizi T16189C polimorfizm çalışmalarının tekrar gözden geçirilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

İlk defa bu pilot çalışma ile, patogenezi tam olarak aydınlatılmayan NASH hastalığını predikte edebilecek 6 önemli mtDNA kontrol bölgesi nükleotit varyasyonları ve sadece NASH grubunda görülen anlamlılığa yakın bir nükleotit değişimi belirlendi. Böylece ileride, NASH hastalığı ve altında yatan metabolik hastalıkları çalışmak isteyen araştırmacılar için, yeni mtDNA nükleotit varyasyonlarının varlığı işaret edildi.

Çeşitli hastalıklar için, popüler varyantların yanısıra, belki de artık bu çalışmada anlamlı bulunan mtDNA kontrol bölgesi nükleotit varyasyonları incelenerek, biriken anlamlı çalışma sonuçları ile rutin çalışmalar için panel oluşturulacaktır. Bu potansiyelin varlığı ile mtDNA kontrol bölgesi nükleotit değişimlerinin önemi vurgulandı.

Sıklıkla çalışılan mtDNA kontrol bölgesine ait literatürde olmayan, yeni bulguların (1 mutasyon ve 2 heteroplazmi gibi) çalışmamızda yer alması, araştırmamızın güzel tarafı oldu. Ayrıca ileriki çalışmalar için, özellikle filogenetik analizlerde karşılaştırma yapmak üzere, Türk popülasyonuna ait mtDNA nükleotit değişimleri hakkında önemli bir kaynak döküman sunuldu.

8. KAYNAKLAR

Abbas Z, Anania F, Ferenci P, Ghafoor Khan A, Goh KL, Hamid SS, Isakov V, Lizarzabal M, Mojica P M, Rivera R JF, Sarin S, Štimac D, Thomson ABR, Umar M, Krabshuis J, LeMair A. Nonalcoholic fatty liver disease and nonalcoholic steatohepatitis. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines. 2012.

Adams LA and Angulo P. Treatment of non- alcoholic fatty liver disease. Postgraduate Medical Journal. 2006;82(967):315-22.

Allocca M and Selmi C. Emerging nutritional treatments for nonalcoholic fatty liver disease. CRC Press. 2010;131-146.

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, De Bruijn MHL, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden RI, Young G. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981;290:457-465.

Aral C, Akkiprik M, Caglayan S, Atabey Z, Ozisik Gokhan, Bekiroglu N, Ozer A. Investigation of relationship of the mitochondrial DNA 16189 T>C polymorphism with metabolic syndrome and its associated clinical parameters in Turkish patients. Hormones. 2011;10(4):298-303.

Arnberg A, Van Bruggen EF, Borst P. The presence of DNA molecules with a displacement loop in standard mitochondrial DNA preparations. Biochim Biophys Acta. 1971;246,2:(353-357).

Attar BM and Van Thiel DH. Current concepts and management approaches in nonalcoholic fatty liver disease. Scientific World Journal. 2013;481893.

Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, Tiribelli C, Marchesini G, Bellentani S. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the dionysos nutrition and liver study. Hepatology. 2005;42:44-52.

Bahcecioglu IH, Koruk M, Yilmaz O, Bolukbas C, Bolukbas F, Tuncer I, Ataseven H, Yalcin K, Ozercan IH. Demographic and clinicopathological characteristics of nonalcoholic fatty liver disease in the east-southeastern Anatolia regions in Turkey. Medical Principles and Practice. 2006;15(1):62-8.

Berdanier CD. Mitochondria in health and disease. CRC Press. 2005;640:41.

Stefan M, Thomas B, Jürgen R, Christoph S, Heiner W. *Hepatology A Clinical Textbook*. AbbVie. 2016; 978-3-941727-18-2.

Bhatia LS, Curzen NP, Calder PC, Byrne CD. Non-alcoholic fatty liver disease: a new and important cardiovascular risk factor?. *European Heart Journal*. 2012; 33(10):1190-200.

Carlson CS, Eberle MA, Rieder MJ, Smith JD, Kruglyak L, Nickerson DA. Additional SNPs and linkage-disequilibrium analyses are necessary for whole-genome association studies in humans. *Nature Genetic*. 2003;33:518-521.

Chalasani N, Younossi Z, Lavine JE, Diehl AM, Brunt EM, Cusi K, Charlton M, Sanyal AJ. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: practice guideline by the american association for the study of liver diseases. American College of Gastroenterology, and the American Gastroenterological Association. 2012;55(6):2005-23.

Chial H and Craig J. mtDNA and mitochondrial diseases. *Genes and Disease*. 2008;1(1):217.

Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology*. 2002;122(6):1649-57.

Clayton DA. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*. 1982;28(4):693-705.

Clayton DA. Replication and transcription of vertebrate mitochondrial DNA. *Annual Review of Cell Biology*. 1991;7:453-478.

Clayton DA. Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human Reproduction*. 2000;15,2:(11-17).

Cooper GM, Hausman RE. *The Cell: A Molecular Approach*. Fourth Edition. ASM Press. 2007;10-13.

Coskun PE, Ruiz-Pesini E, Wallace DC. Control region mtDNA variants: Longevity, climatic adaptation, and a forensic conundrum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(5):2174-2176.

Cusi K. Role of obesity and lipotoxicity in the development of nonalcoholic steatohepatitis: pathophysiology and clinical implications. *Gastroenterology* 2012;142:711-725.

Day CP, James OFW. Steatohepatitis: A tale of two "hits"?. *Gastroenterology*. 1998;114,4(842-845).

Diehl AM and Tetre B. Nonalcoholic Steatohepatitis. National Digestive Diseases Information Clearinghouse. 2014.

Dongiovanni P, Donati B, Fares R, Lombardi R, Mancina RM, Romeo S, Valenti L. PNPLA3 I148M polymorphism and progressive liver disease. *World Journal of Gastroenterology*. 2013;7,19(41):6969-6978.

Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature Genetics*. 2002;31(3):289-94.

Farrell GC, George J, Hall P, McCullough AJ. The epidemiology and risk factors of NASH. *Fatty liver disease: NASH and related disorders*. Wiley-Blackwell. 2005;23-37.

Feldstein AE, Wieckowska A, Lopez AR, Liu YC, Zein NN, McCullough AJ. Cytokeratin-18 fragment levels as noninvasive biomarker for nonalcoholic steatohepatitis: A multicenter validation study. *Hepatology*. 2009;50(4):1072-8.

Finnilä S, Lehtonen MS, Majamaa K. Phylogenetic network of European mtDNA. *The American Journal of Human Genetics*. 2001;68:1475-1484.

Gibson AM, Edwardson JA, Turnbull DM, McKeith IG, Morris CM, Chinnery PF. No evidence of an association between the T16189C mtDNA variant and late onset dementia. *Journal of Medical Genetics*. 2004;41:e7.

Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1980;77(11):6715-9.

Gill-Randall R, Sherratt EJ, Thomas AW, Gagg JW, Lee A, Alcolado JC. Analysis of a polycytosine tract and heteroplasmic length variation in the mitochondrial DNA D-loop of patients with diabetes, MELAS syndrome and race matched controls. *Diabetic Medicine*. 2001;18:413-416.

Greenberg BD, Newbold JE, Sugino A. Intraspecific nucleotide sequence variability surrounding the origin of replication in human mitochondrial DNA. *Gene*. 1983;21,1-2:(33-49).

Güner E. Mitokondriyal DNA nikotinamid adenin dinükleotid dehidrogenaz 5 12361 Adenin/Guanin ve displacement-loop 16189 Timin/Citozin polimorfizmlerinin nonalkolik steatohepatit hastalarında görülme sıklığı ve klinik önemi. *M. Ü. Sağlık*

Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, İstanbul (Danışman: Doç. Dr. Fatih Eren).

Halfon P, Munteanu M, Poynard T. FibroTest-ActiTest as a non-invasive marker of liver fibrosis. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*. 2008;32(6,1):22-39.

Holt IJ, He J, Mao CC, Boyd-Kirkup JD, Martinsson P, Sembongi H, Reyes A, Spelbrink JN. Mammalian mitochondrial nucleoids: organizing an independently minded genome. *Mitochondrion*. 2007;7(5):311-21.

Hudson B and Vinograd J. Circular DNA molecules in HeLa cell mitochondria. *Nature*. 1967;216,650.

Jacobs HT. Disorders of mitochondrial protein synthesis. *Human Molecular Genetics*. 2003;15,12,2:293-301.

Kasamatsu H and Vinograd J. Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annual Review of Biochemistry*. 1974;43:695-719.

Kotronen A, Johansson LE, Johansson LM, Roos C, Westerbacka J, Hamsten A, Bergholm R, Arkkila P, Arola J, Kiviluoto T, Fisher RM, Ehrenborg E, Orholm-Melander M, Ridderstråle M, Groop L, Yki-Järvinen H. A common variant in PNPLA3, which encodes adiponutrin, is associated with liver fat content in humans. *Diabetologia*. 2009;52(6):1056-60.

Liou CW, Lin TK, Weng HH, Lee CF, Chen TL, Wei YH, Chen SD, Chuang YC, Weng SW, Wang PW. A common mitochondrial DNA variant and increased body mass index as associated factors for development of type 2 diabetes: additive effects of genetic and environmental factors. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2007;92(1):235-239.

Lonardo A, Lombardini S, Ricchi M, Scaglioni F, Loria P. Review article: hepatic steatosis and insulin resistance. *Alimentary Pharmacology&Therapeutics*. 2005;22,2:64-70.

Lutz-Bonengel S, Sängler T, Pollak S, Szibor R. Different methods to determine length heteroplasmy within the mitochondrial control region. *International Journal of Legal Medicine*. 2004.

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

Maliarchuk BA, Derenko MV. Analysis of nucleotide combinations in types of the control region of human mitochondrial DNA. *Genetika*. 1997;33(3):387-92.

Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ, Forlani G, Melchionda N. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *American Journal of Medicine*. 1999;107:450-455.

Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116(6):1413-9.

Mcavoy NC, Ferguson JW, Campbell IW, Hayes PC. Review: non-alcoholic fatty liver disease: natural history, pathogenesis and treatment. *The British Journal Of Diabetes And Vascular Disease*. 2006;6:251-260.

Mokranjac D and Neupert W. Protein import into mitochondria. *Biochemical Society Transactions*. 2005;33(1019-23).

Monsal ve MV and Hagelberg E. Mitochondrial DNA polymorphisms in Carib people of Belize. *Proc. R. Soc. Lond. B*. 1997.

Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G. Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Annals of Medicine*. 2011;43(8):617-49.

Niemi AK, Hervonen A, Hurme M, Karhunen PJ, Jylhä M, Majamaa K. Mitochondrial DNA polymorphisms associated with longevity in a Finnish population. *Human Genetic*. 2003;112:29-33.

Ong JP and Younossi ZM. Epidemiology and natural history of NAFLD and NASH. *Clinical Liver Disease*. 2007;11(1):1-16.

Quintana-Murci L, Chaix R^l, Wells RS, Behar DM, Sayar H, Scozzari R, Rengo C, Al-Zahery N, Semino O. Where West Meets East: The complex mtdna landscape of the southwest and central Asian corridor. *The American Journal of Human Genetics*. 2004;74:827-845.

Park KS, Chan JC, Chuang LM, Suzuki S, Araki E, Nanjo K, Ji L, Ng M, Nishi M, Furuta H, Shirotani T, Ahn BY, Chung SS, Min HK, Lee SW, Kim JH, Cho YM, Lee HK. A mitochondrial DNA variant at position 16189 is associated with type 2 diabetes mellitus in Asians. *Diabetologia*. 2008;51:602-608.

Pereira Joana, Neves Rui, Forat Sophia, Huckenbeck Wolfgang, Olek K. MtDNA typing of single-sperm cells isolated by micromanipulation. *Forensic Science International: Genetics*. 2011;751:8.

Petersen KF, Dufour S, Hariri A, Nelson-Williams C, Foo JN, Zhang XM, Dziura J, Lifton RP, Shulman GI. Apolipoprotein C3 gene variants in nonalcoholic fatty liver disease. *The New England Journal of Medicine*. 2010;362:1082-1089.

Poulton J, Luan J, Macaulay V, Hennings S, Mitchell J, Wareham NJ. Type 2 diabetes is associated with a common mitochondrial variant: evidence from a population-based case-control study. *Human Molecular Genetics*. 2002;11:13.

Poynard T, Ratziu V, Naveau S, Thabut D, Charlotte F, Messous D, Capron D, Abella A, Massard J, Ngo Y, Munteanu M, Mercadier A, Manns M, Albrecht J. The diagnostic value of biomarkers (SteatoTest) for the prediction of liver steatosis. *Comparative Hepatology*. 2005;23;4:10.

Puri P and Sanyal AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: Definitions, risk factors, and workup. *Clinical Liver Disease*. 2012;1:4(99-103).

Ratziu V, Massard J, Charlotte F, Messous D, Imbert-Bismut F, Bonyhay L, Tahiri M, Munteanu M, Thabut D, Cadranel JF, Bail BL, de Ledinghen V, Poynard T. Diagnostic value of biochemical markers (FibroTest-FibroSURE) for the prediction of liver fibrosis in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *BioMed Central Gastroenterology*. 2006;14,6:6.

Rinella ME. Nonalcoholic fatty liver disease: a systematic review. *JAMA*. 2015; 9;313(22):2263-73.

Romeo S, Kozlitina J, Xing C, Pertsemlidis A, Cox D, Pennacchio LA, Boerwinkle E, Cohen JC, Hobbs HH. Genetic variation in PNPLA3 confers susceptibility to nonalcoholic fatty liver disease. *Nature Genetics*. 2008;40(12):1461-5.

Romeo S, Sentinelli F, Dash S, et al. Morbid obesity exposes the association between PNPLA3 I148M (rs738409) and indices of hepatic injury in individuals of European descent. *Int J Obes (Lond)*. 2010a;34:190-4.

Romeo S, Sentinelli F, Cambuli VM, et al. The 148M allele of the PNPLA3 gene is associated with indices of liver damage early in life. *J Hepatol*. 2010b;53:335-8.

Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, Ratziu V, McCullough A. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology*. 2011;54(1):344-53.

Shen JH, Li YL, Li D, Wang NN, Jing L, Huang YH. The rs738409 (I148M) variant of the PNPLA3 gene and cirrhosis: A meta-analysis. *The Journal of Lipid Research*. 2015;56:167-175.

Sowa JP, Heider D, Bechmann LP, Gerken G, Hoffmann D, Canbay A. Novel algorithm for non-invasive assessment of fibrosis in NAFLD. *Plos One*. 2013;8,4.

Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M, Larsson C. Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nature Genetic*. 2001;28:(223-31).

Speliotes EK, Yerges-Armstrong LM, Wu J, Hernaez R, Kim LJ, Palmer CD, Gudnason V, Eiriksdottir G, Garcia ME, Launer LJ, Nalls MA, Clark JM, Mitchell BD, Shuldiner AR, Butler JL, Tomas M, Hoffmann U, Hwang SJ, Massaro JM, O'Donnell CJ, Sahani DV, Salomaa V, Schadt EE, Schwartz SM, Siscovick DS, Voight BF, Carr JJ, Feitosa MF, Harris TB, Fox CS, Smith AV, Kao WHL, Hirschhorn JN, Borecki IB. Genome-wide association analysis identifies variants associated with nonalcoholic fatty liver disease that have distinct effects on metabolic traits. *PLoS Genetic*. 2011;7(3).

Szantai E, Ronai Z, Sasvari-Szekely M, Bonn G, Guttman A. Multicapillary Electrophoresis Analysis of Single-Nucleotide Sequence Variations in the Deoxycytidine Kinase Gene. *Clinical Chemistry*. 2006.

Tang DL, Zhou X, Li X, Zhao L, Liu F. Variation of mitochondrial gene and the association with type 2 diabetes mellitus in a Chinese population. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2006;77-82.

Taylor RW and Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nature Reviews Genetics*. 2005;6(5):389-402.

Tilg H and Moschen AR. Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology*. 2010;52(5):1836-46.

Trépo E, Nahon P, Bontempi G, Valenti L, Falletti E, Nischalke HD, Hamza S, Corradini SG, Burza MA, Guyot E, Donati B, Spengler U, Hillon P, Toniutto P, Henrion J, Franchimont D, Devière J, Mathurin P, Moreno C, Romeo S, Deltenre P. Association between the PNPLA3 (rs738409 C>G) variant and hepatocellular carcinoma: Evidence from a meta-analysis of individual participant data. *Hepatology*. 2014;59:2170-7.

Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics*. 2010;1797,2:(113-128).

Turner N. Mitochondrial Metabolism and Insulin Action. *InTech*. 2013;10.5772/56449.

Tuyama AC and Chang CY. Non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Diabetes*. 2012;4:266-80.

Vuppalanchi R and Chalasani N. Non-alcoholic fatty liver disease and non-alcoholic steatohepatitis: Selected practical issues in their evaluation and management. *Hepatology*. 2009;49(1):306-17.

Yakes FM ve Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;21,94(2):514-9.

Yang M, Gong S, Ye S, Lyman B, Geng L, Chen P, Li DY. Non-Alcoholic Fatty Liver Disease in Children: Focus on Nutritional Interventions. *Nutrients*. 2014;28,6(11):4691-705.

Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang MY, Bowmaker M, Jacobs HT, Holt JJ. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *The EMBO Journal*. 2006;22:(5358-5371).

Ye C, Shu XO, Pierce L, Wen W, Courtney R, Gao YT, Zheng W, Cai Q. Mutations in the mitochondrial DNA d-loop region and breast cancer risk. *Breast Cancer Research and Treatment*. 2010;119(2):431-436.

Yilmaz Y. Review article: is non-alcoholic fatty liver disease a spectrum, or are steatosis and non-alcoholic steatohepatitis distinct conditions?. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. 2012;36(9):815-23.

Wallace DC, Brown MD, Lott MT. Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene*. 1999;238:211-230.

Wang PW, Lin TK, Weng SW, Liou CW. Mitochondrial DNA variants in the pathogenesis of type 2 diabetes - relevance of asian population studies. *The Review Of Diabetic Studies*. 2009;6,4.

Wanrooij S and Falkenberg M. The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1797,8:(1378-1388).

Watkins WS, Bamshad M, Dixon ME, Rao BB, Naidu JM, Reddy PG, Prasad BVR, Das PK, Reddy PC, Gai PB, Bhanu A, Kusuma YS, Lum JK, Fischer P, Jorde LB. Multiple Origins of the mtDNA 9-bp Deletion in Populations of South India. *American Journal Of Physical Anthropology*. 1999;109:147-158.

Weston SR, Leyden W, Murphy R, Bass NM, Bell BP, Manos MM, Terrault NA. Racial and ethnic distribution of nonalcoholic fatty liver in persons with newly diagnosed chronic liver disease. *Hepatology*. 2005;41(2):372-9.

Wolstenholme DR. *International Review of Cytology*. 1992;141:173-216.

9. EKLER

Ek 1

9.1. Çalışmaya Alınma ve Dışlanma Kriterleri

Bu çalışmaya, Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı'nda ve Marmara Üniversitesi Gastroenteroloji Enstitüsü Kliniği'nde takip edilmekte olan 18-65 yaş aralığında 150 NASH'li hasta ve 150 sağlıklı kontrol birey alındı.

Günlük alkol alım miktarı; kadınlarda 20 g, erkeklerde 40 g'yi aşanlar çalışmaya alınmadı. Viral hepatit, hemokromatoz, Wilson hastalığı, otoimmün hepatit, primer biliyer siroz, sklerozan kolanjit, biliyer obstrüksiyon, kalp yetmezliği, serebrovasküler hastalık, renal yetmezlik ve malignite tanısı olan hastalar çalışmadan dışlandı. 18 yaş altı ve rızası olmayan hiçbir birey çalışmaya alınmadı.

Çalışmaya yeni alınan hastalar daha önce gastroenteroloji polikliniklerinde biyopsisi yapılarak NASH tanısı almış hastalar arasından seçildi. Çalışma nedeniyle hastalara biyopsi yapılmadı. Hastaların mevcut klinik, laboratuvar ve radyolojik bulgularından yararlanıldı, ek tetkik yapılmadı.

Kontrol grubu, polikliniklere başvuran kronik hastalığı olmayan, herhangi bir ilaç kullanmayan, karaciğer fonksiyon testleri normal bireyler arasından seçildi. Kontrol grubuna, çalışma nedeniyle ek tetkik yapılmadı. Sağlıklı gönüllülerin akraba olmaması bilinen herhangi bir hastalığının olmamasına dikkat edildi.

Çalışmaya alınan bütün bireylerin ayrıntılı fizik muayenesi yapıldı. Hastaların karaciğer biyopsi materyalleri aynı patolog tarafından Diyabet ve Sindirim ve Böbrek Hastalıkları Ulusal Enstitüsü (NIDDK) NASH Clinical Research Network skorlama sistemine göre değerlendirildi. Bu sınıflama sistemine göre hastalar kesin NASH, olası NASH ve basit yağlanma diye 3 gruba ayrıldı ve NASH tanısı konmuş hastalar çalışmaya alındı.

9.2. Kullanılan Aletler

Agaroz jel elektroforez güç kaynağı, Biometra (ABD)
Agaroz jel elektroforez tank düzeneği, Maxicell EC360M, (ABD)
Agaroz jel tepsi ve tarağı, Takara (ABD)
Buzdolabı, Arçelik (Türkiye)
Derin dondurucu -20 °C, Gorenje (Slovenya)
Etüv, Heraeus (Almanya)
Hassas terazi, Mettler AT261 (İsviçre)
Isı döngü cihazı, Biometra (ABD)
Kırık buz makinesi, Scotsman (ABD)
Kuru ısıtıcı, Wealtec (ABD)
Laminar flow, Özge A.T. (Türkiye)
Manyetik karıştırıcı, IKA (USA)
Mikrosantrifüj 120, Hettich (Almanya)
Otoklav, All American (ABD)
Otomatik mikropipetler, Gilson (Fransa)
Otomatik DNA dizi analizi cihazı, ABI 3500 Genetic Analyzer (ABD)
pH metre, WTW (Almanya)
UV kaynağı, Vilber Lourmat (Fransa)
Soğutmalı santrifüj, 320 R, Hettich (Almanya)
Soğutmalı santrifüj, ALLEGRA X-15R, Bechman Coulter (İngiltere)
Vorteks, IKA (ABD)

9.3. Kullanılan Bilgisayar Programları

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), sekans analizi motoru (ABD)

Chromas 261 Technelysium Pty Ltd, DNA dizi analizi yazılımı (Avustralya)

GraphPad InStat for Windows, istatistik paket programı (ABD)

Haplogrep2, PhyloTree 17 programını kullanan, otomatik haplogrup sınıflandırma programı (Avusturya)

IBM SPSS Statistics v22, istatistik paket programı (ABD)

Mitomap, allel arama motoru (ABD)

SeqA v6 ABI, DNA dizi analizi yazılımı (ABD)

Vilber lourmat, jel görüntüleme yazılımı (Fransa)

9.4. Kullanılan Sarf Malzemeler

Brom fenol mavisi, Sigma (ABD)

Borik asit, Sigma (Almanya)

EDTA, Sigma (Almanya)

Etanol, Emsure (Almanya)

Etidyum bromid, Sigma (ABD)

DNA dizileme kiti, BigDye terminator v3.1 cycle sequencing kit, Life Technologies (ABD)

DNA izolasyon kiti, PureLink genomic DNA mini kit, Life Technologies (ABD)

Glikojen, MBI Fermentas (Litvanya)

Formamide, Hi-Di formamide, Life Technologies (ABD)

Laboratuvar filmi, Parafilm M (ABD)

Micropor Gamma Agaroz, Prona (İspanya)

Primer çifti, MBI Fermentas (Litvanya)

Polimer, POP-7, Life Technologies (ABD)

PZR ürünü temizleme kiti, ExoSAP-IT, Life Technologies (ABD)

RFLP enzimi, Anza 48 MnlI, Life Technologies (ABD)

Septa, anot ve katot tampon kabı, ABI 3500 Series, Life Technologies (ABD)

Sodyum asetat (NaOAc), Merck (Almanya)

Taq DNA polimeraz set, I-StarTaq (TM) DNA polymerase, Intron Biotechnology (Kore)

Tris, Sigma (Almanya)

Ultra pür agaroz, Life Technologies (ABD)

50 bp DNA belirteç, Life Technologies (ABD)

0.2 mL, 1.5 mL, 50 mL PZR tüpleri, Axygen (ABD)

10 µL, 200 µL, 1000 µL steril pipet uçları, Axygen (ABD)

9.5. Kullanılan Çözeltiler

- TBE (Tris bazı-borik asit-EDTA) Çözeltisinin Hazırlanması:

5X TBE (500 mL) Çözeltisi
27 g Tris baz 13,75 g Borik asit 10 mL 0,5M EDTA (pH: 8.0) Tartılan kimyasallar bir miktar distile su (dH ₂ O) ile çözüldükten sonra çözelti otoklavlanmış dH ₂ O ile 500 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.
0,5X TBE (500 mL) Çözeltisi
5X TBE'den 50 mL alınarak dH ₂ O ile 450 mL'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

- Agaroz Jel Çözeltisinin Hazırlanması:

%3'lük Agaroz Jel Çözeltisi	%3'lük Agaroz Jel Çözeltisi (Nusieve+Agaroz)
3 g Standart agaroz 100 mL 0,5X TBE 50 µl Etidyum bromür (EtBr) (0,5 mg/ml)	1 g Nusieve agaroz, 2 g Standart agaroz 100 mL 0,5X TBE 50 µl EtBr (0,5 mg/mL)

10. ÖZ GEÇMİŞ

Adı	Burcu	Soyadı	Hastürk
Doğum Yeri	İskenderun	Doğum Tarihi	01/10/1990
Uyruğu	T.C.	Tel	05377061217
E-posta	burcuasturk@gmail.com		

Eğitim Düzeyi

Görevi	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans (Tezli)	Marmara Üniversitesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik	2017
Lisans, Yüksek Lisans (Tezsiz)	Marmara Üniversitesi, Biyoloji Öğretmenliği	2014
Lise	İskenderun Demir Çelik Anadolu Lisesi	2008

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama	Konuşma	Yazma

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma Becerisi

Uluslararası Kongrelerde Sunulan Sözlü Bildiriler

Hastürk B, Yılmaz Y, Eren F. (2017). Mitochondrial DNA control region nucleotide variations in nonalcoholic steatohepatitis, European Biotechnology Congress, P0232.



Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	09.2016.097	70737436-050.06.04-
	PROJE ADI	Non-Alkolik Steatohepatit'de Mitokondriyal DNA Kontrol Bölgesi Nükleotit Varyasyonları ve Olası Haplotiplerin Hastalığın Patogeneziyle İlişkisi	
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Doç. Dr. Fatih EREN	

KARAR BİLGİLERİ	Tarih : 29 / 01 / 2016
Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.	

ÜYELER					
Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Atilla KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> EVET <input type="checkbox"/> HAYIR	
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Doç.Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Doç.Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Doç.Dr. Tolga GÜVEN	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	
Av.Ümit ERDEM	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var Yok	<input checked="" type="checkbox"/> Evet <input type="checkbox"/> Hayır	