

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

HepG2 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE OUABAINİN
MİTOKONDRIYAL GENOM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
Dr. Rukiye NAR

SAMSUN/2011

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

HepG2 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE OUABAİNİN
MİTOKONDRIYAL GENOM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ

Dr. Rukiye NAR

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Abdulkerim BEDİR

SAMSUN/2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin hazırlanması aşamalarında yardım ve destek aldığım değerli hocam Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdulkerim Bedir'e, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Doç. Dr. Ramazan Amanvermez, Doç Dr. Nermin Kılıç, Yrd. Doç. Dr. Birşen Bilgici, Yrd. Doç. Dr. Bahattin Avcı, Yrd. Doç. Dr. Hasan Alaçam ve Yrd. Doç. Dr. Özgür Korhan Tuncel'e ve Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Cafer Eroğlu'na teşekkür ederim.

Tecrübelerinden faydalandığım sevgili arkadaşlarım Uzm. Dr. Cansel Özmen, Uzm. Dr. Aynur Düzgün ve Uzm. Dr. Tülay Özdemir'e, birlikte çalıştığım arkadaşlarım Uzm. Dr. Seher Aydoğan, Dr. Murat Günay, Dr. Ayşegül Bahadır, Dr. Şimal Gürler, Dr. Veli Kılınç, Dr. Osman Saliş, Dr. Uğur Düz, Dr. Mesut Kılıçoğlu, Dr. Sedat Gülten, Hande Koldaş'a ve tüm Biyokimya Anabilim Dalı çalışanlarına teşekkür ederim.

Her zaman bana destek olan değerli eşim Gökay Nar'a, hayatıma anlam ve neşe katan canım kızlarım Gizem ve Gamze'ye, eğitim hayatımın en zor günlerinde maddi ve manevi destekleri ile yanımda olan annem Semiha Nar ve babam Avni Nar'a, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim aileme sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|--------------|
| ÖNSÖZ | I |
| İÇİNDEKİLER | II |
| TABLolar | VII |
| ŞEKİLLER | IX |
| KISALTMALAR | XI |
| ÖZET | XVI |
| SUMMARY | XVIII |
| KISALTMALAR..... | XI |
| 1. GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER..... | 4 |
| 2.1 Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz POMPASI..... | 4 |
| 2.1.1 Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz Yapısı..... | 4 |
| 2.1.2 Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz Fonksiyonu..... | 6 |
| 2.2 KARDİYOTONİK STEROİTLER..... | 7 |
| 2.3 OUABAİN..... | 8 |
| 2.4 2-DEOKSİGLUKOZ..... | 12 |
| 2.5 MİTOKONDİRİ..... | 15 |
| 2.5.1 Mitokondrinin Yapısı..... | 15 |
| 2.5.1.1 Dış Membran..... | 15 |
| 2.5.1.2 İç Membran..... | 15 |
| 2.5.1.3 Matriks..... | 15 |
| 2.5.2 Mitokondrinin Fonksiyonları..... | 16 |
| 2.5.2.1 Oksidatif Fosforilasyon (Oxidative Phosphorylation, OXPHOS)..... | 16 |

| | |
|---|----|
| 2.5.3 Mitokondriyal DNA | 19 |
| 2.5.3.1 Mitokondriyal Kalıtım | 20 |
| 2.5.3.2 mtDNA'nın Replikasyonu | 21 |
| 2.5.3.3 mtDNA'nın Transkripsiyonu | 22 |
| 2.5.3.4 Mitokondriyal Protein Sentezi | 23 |
| 2.5.3.5 mtDNA Mutasyonları | 24 |
| 2.6 REAKTİF OKSİJEN ÜRÜNLERİ | 27 |
| 2.6.1 ROÜ kaynakları | 28 |
| 2.6.2 ROÜ'nün etkileri | 28 |
| 2.6.3 Antioksidan Savunma Mekanizmaları | 30 |
| 2.7 mtDNA ve OKSİDATİF STRES | 30 |
| 2.8 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU | 31 |
| 2.8.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) | 31 |
| 2.8.2 PCR Çeşitleri | 32 |
| 2.8.2.1 Nested PCR | 32 |
| 2.8.2.2 Touchdown PCR | 33 |
| 2.8.2.3 Long PCR (XL-PCR) | 33 |
| 2.8.2.4 Kantitatif Real-Time PCR (QPCR) | 34 |
| 2.8.2.4.1 QPCR Cihazları | 36 |
| 2.8.2.4.2 QPCR'da Kullanılan Metotlar | 36 |
| 2.8.2.4.2.1 Spesifik olmayan metodlar | 36 |
| 2.8.2.4.2.2 Spesifik metodlar | 36 |
| 2.8.2.4.3 Primer-Prob Dizaynı | 38 |
| 2.8.2.4.4 Sonuçların Yorumlanması | 39 |
| 2.8.2.4.4.1 Absolü Kantitasyon | 39 |
| 2.8.2.4.4.2 Relatif Kantitasyon | 39 |

| | |
|--|-----------|
| 2.8.2.4.4.2.1 Relatif Standart Eğri Metodu..... | 40 |
| 2.8.2.4.4.2.2 Komparatif CP Metodu..... | 40 |
| 2.8.2.4.5 QPCR'ın Avantajları..... | 41 |
| 3. GEREÇ – YÖNTEM..... | 42 |
| 3.1 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER: | 42 |
| 3.2 KULLANILAN KİMYASALLAR..... | 43 |
| 3.3 HepG2 HÜCRE KÜLTÜRÜ..... | 45 |
| 3.3.1 Hücre Kültür solüsyonları | 45 |
| 3.3.2 Hücre Kültür Protokolleri..... | 48 |
| 3.3.2.1 -80 °C'de dondurularak saklanan hücrelerin çözülmesi | 48 |
| 3.3.2.2 HepG2 hücrelerinin pasajlanması..... | 48 |
| 3.3.2.3 HepG2 hücrelerinin dondurulması..... | 48 |
| 3.3.3 Hücre Kültür Gruplarının Medyum Hazırlığı (İlaçlı grupların medyumları). | 49 |
| 3.3.4 Çalışma Gruplarının İçerikleri..... | 50 |
| 3.3.5 HepG2 hücrelerinde optimal hücre sayısının belirlenmesi | 50 |
| 3.3.6 HepG2 hücrelerine çalışma medyumlarının uygulanması | 51 |
| 3.3.6.1 Hücrelerin 96 kuyucuklu pleyte ekilmesi | 51 |
| 3.3.6.2 HepG2 hücre DNA izolatları için hücre ekimi | 51 |
| 3.4 DNA İZOLASYONU | 52 |
| 3.4.1 İzolasyon Kiti İçeriği ve Solüsyonlarının Hazırlanması | 52 |
| 3.4.2 Numune materyali | 52 |
| 3.4.3 DNA izolasyon protokolü..... | 53 |
| 3.5 DNA KANTİTASYONU | 54 |
| 3.5.1 Picogreen ile DNA kantitasyon protokolü | 54 |
| 3.6 DNA DİLÜSYONU..... | 55 |
| 3.7 KANTİTATİF REAL-TİME PCR METODUNUN UYGULANMASI | 56 |

| | |
|--|----|
| 3.7.1 Biyoinformatik Analiz..... | 56 |
| 3.7.1.1 Beta Globin Primerleri ve Probenun Belirlenmesi..... | 56 |
| 3.7.1.2 ND1 Standart Primerlerinin Belirlenmesi..... | 56 |
| 3.7.1.3 ND1 Primerlerinin Belirlenmesi..... | 57 |
| 3.7.1.4 ND1 Probenun Belirlenmesi..... | 57 |
| 3.7.1.5 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart Primerlerinin Belirlenmesi..... | 57 |
| 3.7.1.6 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Primerlerinin Belirlenmesi..... | 58 |
| 3.7.1.7 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Probenun Belirlenmesi..... | 58 |
| 3.7.1.8 mtDNA Uzun Fragment Primerlerinin Belirlenmesi..... | 58 |
| 3.7.1.9 mtDNA Uzun Fragment Kantitasyon Primerlerinin Belirlenmesi..... | 59 |
| 3.7.1.10 mtDNA Uzun Fragment Kantitasyon Probenun Belirlenmesi..... | 59 |
| 3.7.2 Numunelerde Beta-globin PCR Çalışılması..... | 59 |
| 3.7.3 mtDNA Standardının Elde Edilmesi..... | 61 |
| 3.7.3.1 ND1 Standart Sekansının PCR ile Çoğaltılması..... | 61 |
| 3.7.3.2 ND1 Standardının Agaroz Jelde Görüntülenmesi..... | 62 |
| 3.7.3.3 ND1 Standart PCR Ürününün Saflaştırılması..... | 63 |
| 3.7.3.4 ND1 Standardının Kopya Sayısının Hesaplanması..... | 64 |
| 3.7.4 Numunelerde ND1 PCR Çalışılması..... | 64 |
| 3.7.5 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardının Elde Edilmesi..... | 66 |
| 3.7.5.1 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart Sekansının PCR ile Çoğaltılması..... | 66 |
| 3.7.5.3 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması..... | 68 |
| 3.7.5.4 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardının Touchdown PCR ile Çoğaltılması .. | 69 |
| 3.7.5.5 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart Touchdown PCR Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesi..... | 70 |
| 3.7.5.6 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart Touchdown PCR Ürününün Saflaştırılması | 71 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7.5.7 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardının Kopya Sayısının Hesaplanması..... | 72 |
| 3.7.6 Numunelerde mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon PCR çalışılması | 72 |
| 3.7.6.1 Numunelerin mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon standart primerleri ile çalışılması | 73 |
| 3.7.6.2 QPCR ile mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon çalışılması | 74 |
| 3.7.7 Numunelerde mtDNA Uzun Fragmentin XL-PCR ile Çoğaltılması..... | 75 |
| 3.7.8 mtDNA Uzun Fragment Standardının Elde Edilmesi | 77 |
| 3.7.8.1 mtDNA Uzun Fragment Standardının PCR ile Çoğaltılması | 77 |
| 3.7.8.2 mtDNA Uzun Fragment Standardının Agaroz Jelde Görüntülenmesi | 78 |
| 3.7.8.3 mtDNA Uzun Fragment Standart Ürününün Saflaştırılması..... | 79 |
| 3.7.8.4 mtDNA Uzun Fragment Standardının Kopya Sayısının Hesaplanması .. | 80 |
| 3.7.9 XL-PCR ürünlerinin QPCR ile kantitasyonu | 80 |
| 3.8 Numunelerde Hücre Başına Düşen mtDNA Kopya Sayılarının Hesaplanması.... | 82 |
| 3.9 Numunelerde mtDNA ⁴⁹⁹⁷ Delesyon Frekansının Hesaplanması | 82 |
| 3.10 Numunelerde mtDNA Lezyon Frekansının Hesaplanması..... | 82 |
| 3.11 Verilerin Değerlendirilmesi | 83 |
| 4. BULGULAR..... | 84 |
| 4.1 QPCR Çalışmalarının Standart Eğrileri | 84 |
| 4.2 Numunelerin QPCR ile kantitasyon sonuçları | 85 |
| 5. TARTIŞMA..... | 92 |
| 6. SONUÇLAR..... | 98 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 99 |

TABLULAR

Sayfa

| | | |
|--------------------|--|----|
| Tablo I | α ve β altünite varyantlarının dokulardaki ekspresyon dağılımları..... | 5 |
| Tablo II | mtDNA ve nDNA tarafından kodlanan oksidatif fosforilasyon sistemine ait polipeptidler..... | 19 |
| Tablo III | mtDNA ve nDNA arasındaki kodon farklılıkları..... | 24 |
| Tablo IV | Mitokondriyal DNA mutasyonları ve ilişkili hastalıklar..... | 26 |
| Tablo V | Önemli reaktif oksijen ürünleri..... | 27 |
| Tablo VI | PBS solüsyon hazırlığı, 1 L..... | 46 |
| Tablo VII | Komplet DMEM Medyum Hazırlığı, 100 ml..... | 47 |
| Tablo VIII | Freeze medyum, 10 ml..... | 47 |
| Tablo IX | HepG2 hücre DNA izolatları için pleyt dizaynı..... | 51 |
| Tablo X | DNA izolasyon protokolü..... | 53 |
| Tablo XI | Numune dilüsyonu için gerekli DNA ve 1XTE miktarları..... | 55 |
| Tablo XII | 8169 bç'lik ND1 standart primerleri..... | 57 |
| Tablo XIII | ND1 primerleri..... | 57 |
| Tablo XIV | 427 bç mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon standart primerleri..... | 57 |
| Tablo XV | 126 bç mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon primerleri..... | 58 |
| Tablo XVI | mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon probu..... | 58 |
| Tablo XVII | mtDNA Uzun Fragment Primerleri..... | 58 |
| Tablo XVIII | mtDNA uzun fragment kantitasyon primerleri..... | 59 |
| Tablo XIX | Beta-globin kantitasyonu için QPCR protokolü..... | 60 |

| | | |
|---------------------|---|----|
| Tablo XX | ND1 standart PCR master miks hazırlanması..... | 61 |
| Tablo XXI | ND1 standartı için PCR protokolü | 62 |
| Tablo XXII | ND1 için QPCR protokolü..... | 65 |
| Tablo XXIII | mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardı için PCR master miks hazırlanması ... | 66 |
| Tablo XXIV | mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart PCR protokolü | 66 |
| Tablo XXV | mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardının çoğaltılması için PCR master miks hazırlanması | 69 |
| Tablo XXVI | mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardı için Touchdown PCR protokolü | 70 |
| Tablo XXVII | Numunelerde mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon PCR'ı için master miks hazırlanması | 73 |
| Tablo XXVIII | Numunelerde mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyonu için PCR protokolü..... | 74 |
| Tablo XXIX | QPCR ile mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon için PCR protokolü | 74 |
| Tablo XXX | Numunelerde mtDNA uzun fragment için PCR protokolü..... | 76 |
| Tablo XXXI | mtDNA uzun fragment standardı için PCR master miks hazırlanması | 77 |
| Tablo XXXII | mtDNA uzun fragment standardı için PCR protokolü..... | 78 |
| Tablo XXXIII | QPCR ile mtDNA uzun fragment kantitasyonu için PCR protokolü ... | 81 |
| Tablo XXXIV | Numunelerde mtDNA/hücre, mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon frekansı ve 8843 baz uzunluğundaki mtDNA zincirinde lezyon frekansı değerleri | 85 |

ŞEKİLLER

| | Sayfa |
|---|--------------|
| Şekil 1 Na ⁺ /K ⁺ -ATPaz pompası altüniteleri | 5 |
| Şekil 2 Endojen kardiyotonik steroidlerin yapısı | 8 |
| Şekil 3 Kardiyak miyositlerde ouabain sinyal iletim yolları | 11 |
| Şekil 4 2-DG yapısı | 13 |
| Şekil 5 Mitokondrinin yapısı | 16 |
| Şekil 6 Oksidatif fosforilasyon sistemi..... | 17 |
| Şekil 7 mtDNA'nın yapısı | 20 |
| Şekil 8 mtDNA replikasyon başlama ve transkripsiyon başlama ve sonlanmasının şematik görünümü..... | 22 |
| Şekil 9 mtDNA'da sık görülen mutasyonlar | 25 |
| Şekil 10 Sinyal molekülü olarak ROÜ'nin sinyal iletim kaskadı ile ilişkisi..... | 29 |
| Şekil 11 PCR aşamaları | 31 |
| Şekil 12 Nested PCR prensibi | 33 |
| Şekil 13 PCR amplifikasyonunda başlangıç, erken eksponansiyel, logaritmik ve plato fazları | 35 |
| Şekil 14 QPCR'da kullanılan metot prensipleri | 37 |
| Şekil 15 Beta globin primer-prob dizaynı | 56 |
| Şekil 16 ND1 standardına ait bantların elektroforetik görüntüsü..... | 63 |
| Şekil 17 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardına ait bantların elektroforetik görüntüsü..... | 68 |

| | |
|---|----|
| Şekil 18 427 bç'lik mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon standardına ait bandların elektroforetik görüntüsü | 71 |
| Şekil 19 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon saptama prensibi..... | 73 |
| Şekil 20 mtDNA uzun fragment standardına ait bandlarının elektroforetik görüntüsü . | 79 |
| Şekil 21 QPCR ile ND1 kantitasyonunun standart eğrisi..... | 84 |
| Şekil 22 QPCR ile XL-PCR ürünleri kantitasyonunun standart eğrisi..... | 84 |
| Şekil 23 QPCR ile Beta-Globin kantitasyonunun standart eğrisi..... | 84 |
| Şekil 24 QPCR ile mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon kantitasyonunun standart eğrisi | 85 |
| Şekil 25 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon analizinde absolü ve relatif kantitasyon metotlarının karşılaştırılma grafiği..... | 86 |
| Şekil 26 mtDNA kopya sayısının analizinde absolü ve relatif kantitasyon metodlarının karşılaştırılma grafiği..... | 87 |
| Şekil 27 mtDNA lezyon analizinde absolü ve relatif kantitasyon metodlarının karşılaştırılma grafiği | 87 |
| Şekil 28 mtDNA kopya sayısı analiz grafiği | 88 |
| Şekil 29 mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon analiz grafiği | 89 |
| Şekil 30 mtDNA lezyonu relatif amplifikasyon grafiği | 90 |
| Şekil 31 mtDNA lezyon frekansı analiz grafiği | 91 |

KISALTMALAR

| | |
|---------------------------------|--|
| (¹ O ₂) | Singlet oksit |
| (LOO [•]) | Lipid hidroperoksil radikali |
| (NO [•]) | Nitrik oksit radikali |
| (O ₂ ^{•-}) | Süperoksit radikali |
| (OH ^{•-}) | Hidroksil radikali |
| 2-DG | 2-deoksiglukoz |
| 8-OHdG | 8-hidroksi-deoksiguanozin |
| A7r5 | Rat düz kas hücreleri |
| ACTH | Adrenokortikotropik Hormon |
| ADP | Adenosin difosfat |
| ANF | Atrial Natriuretic Factor |
| AP-1 | Activator protein 1 |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| BER | Baz Eksizyon Tamir |
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| BLAT | BLAST-Like Alignment Tool |
| CAT | Katalaz |
| CP | Crossing Point |
| CPEO | Kronik Progresiv External Oftalmopleji |
| CSB | Conserved Sequence Block |
| Ct | Cycle Treshold |

| | |
|-------------------------------|--|
| D-loop | Displacement Loop |
| DMSO | Dimetilsülfooksit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| EGFR | Epidermal büyüme faktör reseptörü |
| Erk 1/2 | Extracellular-signal-regulated kinases |
| ETZ | Elektron Transport Zinciri |
| FAD | Flavin adenin dinükleotid |
| FBS | Fetal Bovine Serum |
| FMN | Flavin mononükleotid |
| FRET | Fluorescence Resonance Energy Transfer |
| GAPDH | Gliseraldehid 3-fosfat dehidrogenaz |
| GLUT1 | Glucose transporter 1 |
| GPx | Glutasyon peroksidaz |
| H zincir | Ağır zincir |
| H ₂ O ₂ | Hidrojen peroksit |
| HeLa | İnsan serviks epitelyal karsinom hücre hattı |
| HepG2 | Hepatoselüler Karsinom hücre hattı |
| HK | Heksokinaz |
| HK-2 | İnsan böbrek proksimal tübül hücreleri |
| HMG | High Mobility Group |
| HO-1 | Hem Oksijenaz-1 |
| HPLC | Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi |

| | |
|-----------------------|--|
| HSP | H zincir transkripsiyon promoter bölgesi |
| IP3 | Inositol trisphosphate |
| IT _{H1} | Ağır zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi |
| IT _L | Hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi |
| KSS | Kearns Sayre Sendromu |
| KTS | Kardiyotonik Steroidler |
| L zincir | Hafif zincir |
| LDH | Laktat Dehidrogenaz |
| LHON | Leber'in Herediter Optik Nöropatisi |
| LLC-PK1 | Pig renal epitelyal hücreleri |
| LNCaP | Human prostate cancer cells |
| LSP | L zincir transkripsiyon promoter bölgesi |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| MDR-1 | Multidrug Resistant Gene-1 |
| MEF | Murin embriyonik fibroblast |
| MEK | Mitogen-activated protein kinases |
| mRNA | Messenger Ribonucleic acid |
| MRP | Multidrug resistance-associated protein |
| MRP-1 | Multidrug Resistant Associated Protein-1 |
| mtDNA | Mitokondrial DNA |
| mtDNA ⁴⁹⁷⁷ | 4977 bç mtDNA delesyonu |
| mTERF | Transkripsiyonun sonlanmasına aracılık eden faktör |

| | |
|--|--|
| mtTFA | Mitokondriyal transkripsiyon faktörü A |
| Na ⁺ K ⁺ -ATP'az | Sodyum potasyum adenozin trifosfataz |
| NAC | N-Asetil sistein |
| NAD | Nikotinamid adenin dinükleotid |
| NADPH | Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat reduced form |
| NCX | Na ⁺ /Ca ²⁺ değiştirici |
| nDNA | nükleer DNA |
| NER | Nükleotid Eksizyon Tamir |
| NF-kB | Nükleer faktör(NF)-kappa Beta |
| NHK | Normal insan böbrek hücreleri |
| O _H | H zincirin replikasyon orjini |
| O _L | L zincirin replikasyon orjini |
| Ou | Ouabain |
| PBS | Phosphate Buffered Saline |
| PC-12 | Prostat karsinom hücre hattı -12 |
| PC-3 | Prostat kanser hücre hattı-3 |
| PCR | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| PLC | Fosfolipaz C |
| PolG | DNA polimeraz gama |
| QH [•] | Semikinon radikali |
| QH ₂ | Ubikinol |
| QPCR | Kantitatif real time PCR |

| | |
|---------|------------------------------------|
| Raf | Rat sarcoma |
| Ras | Rapidly Accelerated Fibrosarcoma |
| RNaz-P | Ribonükleaz P |
| ROÜ | Reaktif oksijen ürünleri |
| rRNA | Ribozomal RNA |
| RTCA | Real Time Cell Analysis |
| RT-PCR | Revers Transkriptaz PCR |
| SH-SY5Y | İnsan nöroblastoma hücreleri |
| skACT | Skeletal α -actin |
| SOD | Süperoksit dismutaz |
| SR/ER | Sarkoplazmik/endoplazmik retikulum |
| T47D | Meme kanser hücreleri |
| TAS | Termination Associated Sequence |
| TCA | Trikarboksilik asit |
| TD-PCR | Touchdown-PCR |
| Tm | Erime derecesi |
| TMD | Transmembran domain |
| tRNA | Transfer RNA |
| UPL | Universal Probe Library |
| XL-PCR | Long PCR |

ÖZET

HepG2 HÜCRE KÜLTÜRLERİNDE OUABAINİN MİTOKONDRIYAL GENOM ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Ouabain, konjestif kalp yetmezliği tedavisinde kullanılan, kardiyotonik steroidler sınıfına ait spesifik Na^+/K^+ -ATPaz inhibitörüdür. Ouabainin insan karaciğer kanser hücrelerinde apoptoz gelişiminde ve reaktif oksijen ürünleri (ROÜ) oluşumunda rol aldığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Ancak, ouabainin mitokondriyal DNA (mtDNA) üzerine etkileri tam olarak bilinmemektedir.

Glukoz yoksunluğu, solid tümörlerin merkezi bölgesinde oluşan ve kemoterapiye rezistansı indükleyen bir durumdur. Glukoz yoksunluğu oluşturan 2-Deoksiglukoz (2-DG) glikolizi inhibe eden sentetik bir glukoz analogudur.

ROÜ, DNA üzerinde tek ve çift zincir kırıkları, modifiye pürin ve pirimidin bazları oluşumu gibi değişik lezyonlara yol açarak hasar oluşturabilmektedir. mtDNA'da görülen yaygın delesyon 4977 baz uzunluğundadır ve mtDNA'nın replikasyonu sırasında oluşabileceği gibi serbest radikallerin üretilmesi ile de ilişkili olabilir. mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu ve mtDNA lezyon frekansı genellikle oksidatif hasarın belirteci olarak kullanılmaktadır.

Bu çalışmadaki amacımız, HepG2 hücrelerinde mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunu ve mtDNA lezyon frekansını inceleyerek ouabainin mitokondriyal DNA üzerine olan etkilerini araştırmaktır. Bu amaçla HepG2 hücreleri 96-kuyucuklu pleytte (5×10^3 hücre/kuyucuk) bir gece kültüre edildi ve ardından 10 mM 2-DG varlığında ve yokluğunda 0.75 nM, 7.5 nM, 75 nM ve 750 nM ouabain ile 24 saat muamele edildi. Ayrıca 10 mM 2-DG verilen grup ve herhangi bir ilacın uygulanmadığı kontrol grubu oluşturuldu. HepG2 hücrelerinden nükleer ve mitokondriyal DNA izolasyonu yapıldı. Long PCR ve kantitatif PCR yöntemleri ile numunelerin mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon frekansı, lezyon frekansı ve hücre başına düşen mitokondriyal DNA kopya sayıları bulundu.

Çalışmamızda, tek başına 2-DG uygulanan grupta, mtDNA kopya sayısı 1.49 kat ve mtDNA lezyon frekansı 1.9 kat artarken mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon frekansı değişmedi.

Tek başına 75 nM ouabain mtDNA kopya sayısını 0.75 kat azaltırken, 7,5 nM ve 0,75 nM ouabain dozları ise sırasıyla 1.67 ve 1.95 kat arttırdı. 2-DG ile kombine tüm ouabain dozlarında mtDNA kopya sayısı yaklaşık 1.4 kat arttı. Tek başına 750 nM, 75 nM ve 7,5 nM ouabain dozları mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunu sırasıyla 1.39, 1.92 ve 1.44 kat arttırdı. 2-DG ile kombine 750 nM ve 75 nM ouabain dozları mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunu sırasıyla 4.94 ve 1.57 kat arttırırken kombine 7,5 nM ouabain dozunda anlamlı bir değişiklik olmadı. Tek başına 750 nM ve 75 nM ouabain dozları mtDNA lezyon frekansını 2.5 ve 1.5 kat arttırdı. 2-DG ile kombine 750 nM ouabain dozu mtDNA lezyon frekansını 2.28 kat arttırırken kombine 75 nM ouabain dozunda anlamlı bir değişiklik olmadı. Tek başına ve 2-DG ile kombine 7,5 nM ouabain dozu mtDNA lezyon frekansını sırasıyla 0.67 ve 0.45 kat azalttı.

Sonuç olarak, ouabain hem tek başına hem de 2-DG ile kombine iken mtDNA lezyon frekansını ve mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunu arttırmaktadır ve bu artış ouabainin oksidatif stres oluşturarak DNA hasarı ve apoptozisi indüklediği savını desteklemektedir.

Anahtar Kelimeler: Ouabain, Delesyon, 2-Deoksiglukoz, Reaktif Oksijen Ürünleri, Polimeraz Zincir Reaksiyonu

SUMMARY

STUDYING THE EFFECTS OF OUABAIN ON MITOCHONDRIAL GENOME IN HepG2 CELL CULTURES BY MOLECULAR METHODS

Ouabain, which is used for congestive heart failure treatment, is a specific Na^+/K^+ -ATPase inhibitor and it belongs to class of cardiotonic steroids. It has been indicated in the studies that ouabain plays a role on developing apoptosis in human liver cancer cells and in the formation of reactive oxygen species (ROS). But, the effects of ouabain on mitochondrial DNA (mtDNA) are not completely known yet.

Absence of glucose is a condition that occurs in the centre of solid tumour and induces resistance to chemotherapy. 2-deoxyglucose (2-DG) developing absence of glucose is a synthetic glucose analogous inhibiting glycolysis.

ROS leading different lesions such as modified purine and pyrimidine bases, can cause damage single and double chain breaks on DNA. Common deletion which has been seen in mtDNA is 4977 base length and it might be occurred during replication of mtDNA as well as it might be related to generation of free radicals. mtDNA⁴⁹⁷⁷ deletion and mtDNA lesion frequency are generally used as reagents of oxidative damage.

Our purpose in this study is to research the effects of ouabain on mitochondrial DNA by analysing mtDNA⁴⁹⁷⁷ deletion and mtDNA lesion frequency in HepG2 cells. For this purpose, HepG2 cells were cultured in 96 well culture plates (5×10^3 cell/well) overnight and then they were treated with ouabain of 0.75 nM, 7.5 nM, 75 nM and 750 nM in the presence and absence of 10 mM 2-DG. Also a group that was given 10 mM 2-DG and a control group that was not received any medication were created. Nuclear and mitochondrial DNA isolation from HepG2 cells were implemented. mtDNA⁴⁹⁷⁷ deletion frequency, lesion frequency and mitochondrial DNA copy numbers for per cell of the samples were determined by long PCR and quantitative PCR methods.

In our study, in the group that applied 2-DG alone, while the copy number of mtDNA has increased 1.49 times and lesion frequency of mtDNA has increased 1.9 times, deletion frequency of mtDNA⁴⁹⁷⁷ has not been changed. 75 nM ouabain alone has decreased the copy number of mtDNA 0.75 times, alone 7.5 nM and 0.75 nM ouabain doses have increased respectively 1.67 and 1.95 times. In turns in all ouabain doses with

2-DG, copy number of mtDNA has increased approximately 1.4 times. 750 nM, 75 nM and 7,5 nM ouabain doses alone have increased mtDNA⁴⁹⁷⁷ deletion respectively 1.39, 1.92 and 1.44 times. While 750 nM and 75 nM ouabain doses combined with 2-DG have increased mtDNA⁴⁹⁷⁷ deletion respectively 4.94 and 1.57 times, there was no significant change in combined 7,5 nM ouabain. 750 nM and 75 nM ouabain doses have alone increased the lesion frequency of mtDNA 2.5 and 1.5 times. While 750 nM ouabain dose combined with 2-DG has increased the lesion frequency of mtDNA 2.28 times, there was not occurred significant change in combined 75 nM ouabain dose. 7,5 nM ouabain dose combined with 2-DG has alone decreased the lesion frequency of mtDNA respectively 0.67 and 0.45 times.

As a result, ouabain both alone and when combined with 2-DG increases mtDNA lesion frequency and mtDNA⁴⁹⁷⁷ deletion and this increase supports the thesis that ouabain generate oxidative stress and induces DNA damage and apoptosis.

Key Words: Ouabain, Deletion, 2-Deoxyglucose, Reactive Oxygen Species, Polymerase Chain Reaction

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mitokondri, hücre genomundan farklı olan ve mitokondriyal DNA (mtDNA) olarak adlandırılan kendisine ait genetik sistem içermektedir (23). mtDNA, çift zincirli, kapalı sirküler yapıya sahip bir DNA molekülü olup 16569 baz çifti (bç) uzunluğundadır. Her bir mitokondri, 2-10 kopya mtDNA bulundurur. mtDNA, mitokondriyal elektron transport zincirine (ETZ) ait 13 protein, 22 tRNA (transfer RNA) ve 2 rRNA (ribozomal RNA) olmak üzere toplam 37 gen kodlamaktadır (32, 107, 124, 130).

Aerobik hücrelerde serbest radikal üretiminin en önemli kısmını mitokondriyal ETZ ve endoplazmik retikulum (ER) oluşturur (81). Hücredeki oksijenin %90'dan fazlası mitokondride tüketilir ve tüketilen oksijenin yaklaşık %2'si süperoksit radikali oluşumu ile sonuçlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni ETZ'de bulunan kompleks I ve kompleks III'ten elektron kaçağı olmasıdır (76). Yüksek konsantrasyondaki Reaktif Oksijen Ürünleri (ROÜ) hücre bileşenlerinden DNA, RNA, proteinler, aminoasitler, karbonhidratlar ve lipitlerde hasara yol açabilmektedir (25, 76). ROÜ, DNA üzerinde tek ve çift zincir kırıkları ile modifiye pürin ve pirimidinleri içeren birçok lezyona yol açarak hasar oluşturabilmektedir (81).

Çeşitli hücre tiplerinde oksidatif stresin mtDNA'da nDNA'dan 3-10 kat daha fazla hasara neden olduğu gösterilmiştir (103, 104, 142). mtDNA'nın oksidanların oluştuğu mitokondri iç zarına yakın yerleşimli olması, histon proteinlerini içermemesi ve DNA tamir sisteminin zayıf olması oksidan hasarlara karşı daha duyarlı olmasına yol açmaktadır (70, 123, 143).

Serbest radikaller nokta mutasyonu, delesyon gibi çeşitli DNA sekans değişikliklerine yol açabilmektedir (81). Birkaç bazdan birkaç kilobaza kadar farklı uzunluklarda olabilen mtDNA delesyonlarının, mtDNA'nın replikasyonu sırasında veya oksidatif hasarın tetiklediği tek veya çift zincir DNA kırıkları sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (62, 70). 4977 bç uzunluğundaki delesyon, yüksek insidansı nedeniyle yaygın delesyon (mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu, common deletion) olarak adlandırılmaktadır. Bu delesyon, mtDNA'da 8470-8482 ve 13447-13459 nükleotidler arasında 13 bç uzunluğundaki tekrar dizilerinde bir kırılma ile ortaya çıkmaktadır (50, 59, 143).

Ouabain, kardiyotonik steroidler (KTS) sınıfına ait pozitif inotropik etkileri olan bir ilaçtır ve membran Na^+/K^+ -ATPaz pompasını doğrudan inhibe ederek hücre içi Na^+ konsantrasyonunu yükseltip plazma membranında yerleşik olan $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değiştirici pompayı aktive ederek hücre içi Ca^{2+} artışına neden olmaktadır. Ouabain Na^+/K^+ gradientini etkilemeden, çok sayıda sinyal yolağını da aktiflemektedir (43). Ouabain'in etkisi sonucu aktiflenen sinyal yolları; Src kinaz aktivasyonu, Src tarafından EGFR transaktivasyonu; Ras/Raf/MEK/ERK1/2 yolunun aktivasyonu ve mitokondriyal ROÜ oluşumunu kapsar (60). Ortaya çıkan etkiler hücre tipine ve doza bağlı olarak değişmektedir (139). Ouabainin farklı hücre tiplerinde ROÜ oluşumunu indüklediği ve kanser hücrelerinde doza bağlı olarak hem proliferasyonu hem de apoptozu uyardığı gösterilmiştir (22, 49, 54, 64, 73, 141). Ouabainin hepatoselüler karsinom (HepG2) hücrelerinde apoptotik olduğu ve ROÜ artışına yol açtığı daha önce gösterilmiştir ancak etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir (89, 141). Ouabainin hücre içi Ca^{2+} ve ROÜ artışına yol açarak çift iplikçik DNA kırıklarına ve buna bağlı hücre apoptozuna neden olduğu iddia edilmektedir (141). Literatürde ouabainin mtDNA üzerine olan etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Yaptığımız çalışmada uyguladığımız ouabain protokolünü ve dozlarını literatürdeki diğer kanser hücre kültürü çalışmalarını esas alarak belirledik (71, 87, 121, 141).

2-Deoksiglukoz (2-DG), glukoz analogu ve glikolizin yarışmalı inhibitörüdür (92). 2-DG heksokinazı inhibe ederek özellikle mitokondriyal solunum defekti olan kanser hücrelerinde veya hipoksik hücrelerde glukoz yoksunluğu oluşturmaktadır (7, 21, 77). Solid tümörlerin kötü vaskülarize kanser hücrelerinde, sürekli ya da aralıklı olarak hipoksinin yanı sıra glukoz yoksunluğu da mevcuttur (90). Hipoglisemi ve hipoksinin kemoterapiye rezistansı indüklemesi, solid tümörlerin tedavisinde en önemli problemi oluşturmaktadır (90). Çalışmamızda 2-DG kullanma amacımız, HepG2 hücrelerinde normoksik ortamda hipoglisemi şartları oluşturmaktır. 2-DG dozunu literatürdeki hücre kültür çalışmalarını göz önüne alarak belirledik (40, 102).

Bölümümüzde daha önce yapılan çalışmada ouabainin HepG2 hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği ve hücrel stres varlığını gösteren Hem Oksijenaz-1 (HO-1) gen ekspresyonunda artış yaptığı saptanmıştır (89). Bu bilgilerin ışığında QPCR (kantitatif real-time polimeraz zincir reaksiyon) ve Long PCR (XL-PCR) yöntemleri ile

farklı dozlardaki ouabainin HepG2 hücrelerinde tek başına ve 2-DG ile kombine iken mtDNA üzerine olan etkilerini; mtDNA kopya sayısı, mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu ve mtDNA lezyon frekansı üzerinden araştırmayı amaçladık. Ayrıca bu çalışmayı yaparken XL-PCR ürünlerini QPCR ile kantite ederek DNA lezyon analizinde daha sonraki çalışmalara temel olacak bir protokol oluşturmayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Na⁺/K⁺-ATPaz POMPASI

Na⁺/K⁺-ATPaz (EC 3.6.3.9) P-tip ATPaz ailesine ait sodyum pompasıdır. İlk kez 1957 yılında J. Skou tarafından sinir hücrelerinde tanımlanmıştır (136). Bütün ökaryotik hücrelerde bulunan ve hücre membranında lokalize bir proteindir.

Na⁺/K⁺-ATPaz pompası adenosin trifosfat (ATP) molekülünün hidrolizi ile hücreden 3 Na⁺ çıkışı ve hücreye 2 K⁺ girişini sağlar. Sodyum ve potasyum değişimi esnasında oluşan elektrokimyasal gradiyent, fosfat, aminoasitler ve şekerlerin taşınması için itici güç oluşturur. Na⁺/K⁺-ATPaz ayrıca membran proteinleri ile de etkileşir ve sinyal proteinlerinin sitozolik kaskadlara katılmasını sağlayan bir sinyal reseptörü olarak da görev yapar (87, 141).

2.1.1 Na⁺/K⁺-ATPaz Yapısı

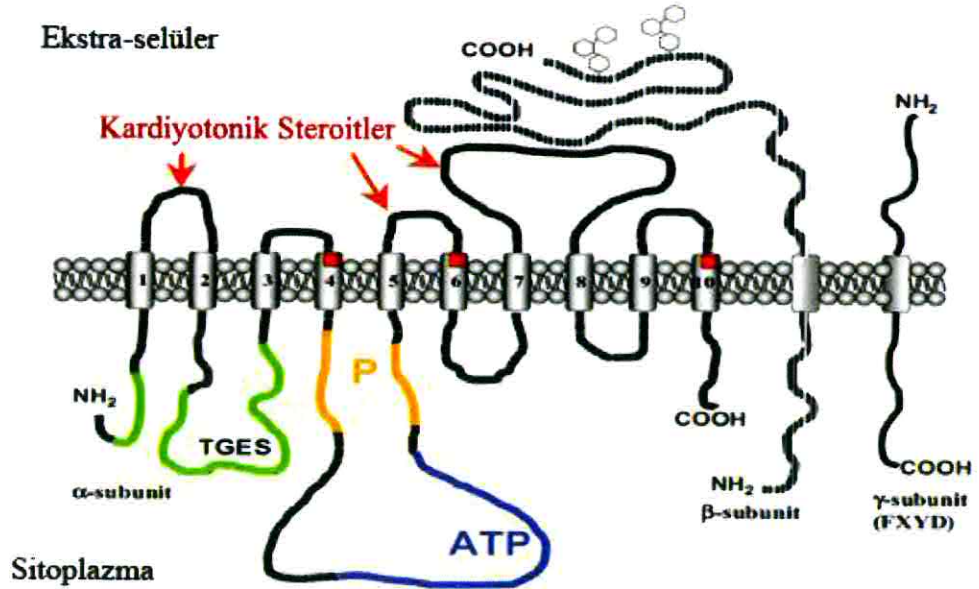
Na⁺/K⁺-ATPaz iki majör polipeptidin nonkovalent etkileşiminden oluşan oligomerik bir proteindir. Memelilerde bu majör polipeptidler dört yapısal varyantı olan alfa polipeptit (α_1 , α_2 , α_3 , α_4) ve üç yapısal varyantı olan beta polipeptit (β_1 , β_2 , β_3) olarak tanımlanmaktadır. Farklı alfa ve beta polipeptid varyantlarının beraberliği özgün fonksiyonel özellikler ve doku spesifik ekspresyon paterni gösteren çeşitli Na⁺/K⁺-ATPaz izozimlerinin oluşması sağlar (87). Şekil 1'de Na⁺/K⁺-ATPaz pompası altüniteleri gösterilmiştir.

α altünite, 110 kDa ağırlığındadır ve enzimin katalitik ünitesidir. α altünite 10 transmembran (TM) segmente sahiptir, sodyum ve kardiyotonik steroidler (KTS) için ekstraselüler segmentte, potasyum ve ATP için ise intraselüler luptlarda bağlanma bölgesi içerir. β altünite, 31,5 kDa ağırlığında glikozile bir proteindir ve pompa aktivitesini kontrol eden ünitedir. Düzenleyici β altünitesi tek bir TM segmente sahiptir (8, 138). α ve β altünite varyantlarının dokulardaki ekspresyon dağılımları Tablo I'de gösterilmiştir.

Tablo I: α ve β altünite varyantlarının dokulardaki ekspresyon dağılımları

| α altünite | | β altünite | |
|-------------------|---|------------------|--|
| $\alpha 1$ | tüm dokular | $\beta 1$ | tüm dokular |
| $\alpha 2$ | kalp, damar düz kası, iskelet kası, beyin, adiposit, kartilaj doku ve kemik | $\beta 2$ | kalp, beyin, kartilaj doku ve eritrosit |
| $\alpha 3$ | santral ve periferel sinir sistemi ile kalp iletim sistemi | $\beta 3$ | akciğer, beyin, kartilaj doku ve eritrosit |
| $\alpha 4$ | testis | | |

$\alpha\beta$ kompleksine kolokelize bulunan ve FXYD olarak adlandırılan 7 transmembran protein tanımlanmıştır. Bu proteinlerden biri olan FXYD2, Na^+/K^+ -ATPaz'ın gama (γ) altünitesi olarak bilinmektedir. 7,3 kDa ağırlığındaki bu protein $\alpha\beta$ kompleksinin spesifik domainleri ile etkileşerek Na^+/K^+ -ATPaz'ın katalitik özelliklerini düzenlemektedir (8).



Şekil 1: Na^+/K^+ -ATPaz pompası altüniteleri (8)

2.1.2 Na⁺/K⁺-ATPaz Fonksiyonu

Çeşitli hücrel faaliyetler ve normal istirahat membran potansiyeli için sitoplazmada yüksek K⁺ ve düşük Na⁺ gereklidir. Bunun oluşturulması ve korunması Na⁺/K⁺-ATPaz tarafından sağlanır. İyonik homeostazın sağlanması hücre büyümesi, farklılaşması, hücre sağkalımı, hücre migrasyonunun modülasyonu ve hücre-hücre etkileşimleri için önemlidir (141). Na⁺/K⁺-ATPaz'ın pompa, enzim ve KTS için reseptör olmak üzere 3 klasik özelliği bulunmaktadır (8).

KTS, Na⁺/K⁺-ATPaz'ın α altbirimine bağlanıp pompayı inhibe ederek intraselüler Na⁺ artışına ve bunun sonucunda Na⁺-Ca⁺ değiştirici aracılığıyla da intraselüler Ca⁺ artışına yol açar. Düşük konsantrasyonda KTS, intraselüler Na⁺ ve K⁺ değişiminden bağımsız olarak birçok sinyal iletim yolunu aktifler. Bu sinyal yolları Src kinaz aktivasyonu, Src tarafından epidermal büyüme faktörü reseptör (EGFR) transaktivasyonu ve Rat sarcoma/Rapidly Accelerated Fibrosarcoma/Mitogen-activated protein kinases/extracellular-signal-regulated kinases (Ras/Raf/MEK/ERK1/2) yolunun aktivasyonu ve mitokondriyal reaktif oksijen ürünlerinin (ROÜ) oluşumunu kapsar. Çeşitli sinyal yollarının aktivasyonu farklı genlerin ekspresyonunu düzenler ve hücre büyümesini uyarır (138, 139, 141, 147).

KTS veya dijital benzeri Na⁺/K⁺-ATPaz inhibitörleri, Na⁺/K⁺-ATPaz'ın $\alpha 1$ ekstraselüler segmentindeki spesifik bağlanma bölgesi (TM1-TM2, TM5-TM6 ve TM7-TM8) ile etkileşir. Ekstraselüler TM1-TM2'deki 111-122 sekanslardaki amino asitler KTS bağlanmasında en önemli kısmı oluşturur. İzofomlardaki amino asit sekans farklılığı ile α ve β izoformlarının doku spesifik dağılımı pompanın KTS'lere sensivitesinde farklılığa yol açar (8).

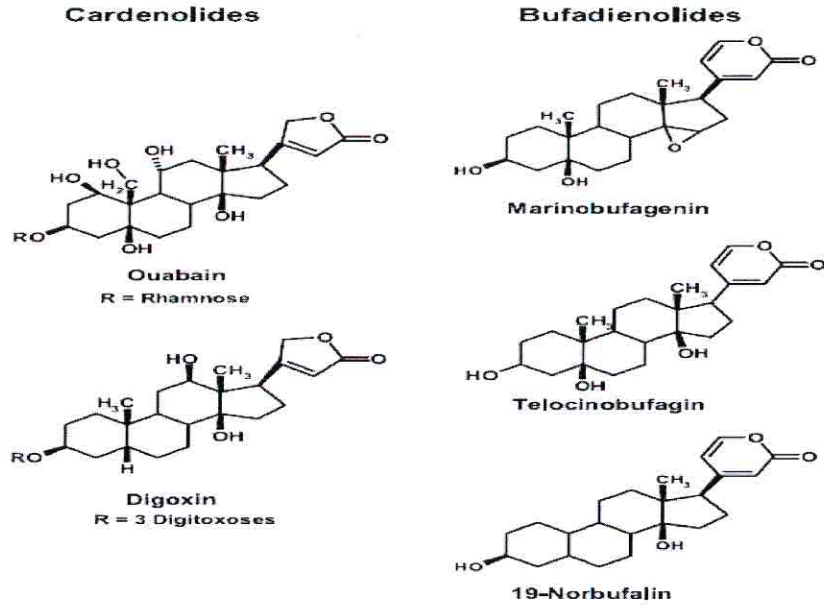
Na⁺/K⁺-ATPaz kanser hücrelerinde normal hücrelere göre daha fazla eksprese olur ve böylece KTS için daha fazla bağlanma bölgesi sağlanır. Yapılan çalışmalarda Na⁺/K⁺-ATPaz $\alpha 1$ altbiriminin insan prostat kanseri hücreleri (PC-3, DU 145), insan küçük hücreli olmayan akciğer kanseri hücreleri (A549), glioblastoma hücreleri (Hs683, U87-MG, U373-MG, T98G) ve meme kanseri hücreleri (MCF-7) gibi malign hücrelerde yüksek miktarda eksprese olduğu gösterilmiştir. Enerji metabolizması, iyon dengesi ve sinyal iletiminde önemli rolü olan $\alpha 1$ altbiriminin potansiyel bir antikanser hedef olabileceği düşünülmektedir (141).

2.2 KARDİYOTONİK STEROİTLER

KTS, konjestif kalp yetmezliği ve atriyal fibrilasyon tedavisinde kullanılan ve kalp kası kasılmasını uyarıcı (pozitif inotropik) etkileri olan ilaçlardır. Yapılan çalışmalar sonucu memeli dokularında endojen KTS bulunmuştur. Adrenal bezden salgılanan bu bileşikler hormon benzeri etki gösterir ve reseptörleri olan Na^+/K^+ -ATPaz ile etkileşerek birçok hücrel fonksiyonu etkiler (86).

KTS 200 yıl önce William Withering tarafından konjestif kalp yetmezliği tedavisi için kullanılan ilaç olarak tanımlanmıştır. Ringer 1885 yılında kardiyak kontraksiyon stimülasyonu yapan dijital glikozitlere benzer endojen bir bileşik olduğunu öne sürmüştür. Sdney Smith 1930 yılında Digitalis lanata bitkisinden digoksini izole etmiştir (86). 1953'de, Albert Szent-Gyorgyi memelilerde endojen bir dijital varlığını ortaya atmıştır ve aynı yıl Schatzmann KTS'in sodyum pompasının spesifik inhibitörü olduğunu ve plazma membranında Na^+/K^+ -ATPaz'ın dijital reseptörü olduğunu keşfetmiştir. 1960'larda memeli kalp kasında $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX) pompa keşfedilmiş ve KTS'in indüklediği pozitif inotropik etkiye aracılık ettiği gösterilmiştir (112, 115).

Kardiyak glikozitler kardenolidler ve bufadienolidler olarak iki grupta sınıflandırılır. KTS'in yapısı genel olarak 5 veya 6 üyeli lakton halkasının bağlı olduğu bir steroid çekirdekten oluşur ve bazı KTS'de şeker bileşeni bulunmaktadır. Kardenolidler bitkilerde, bufadienolidler ise karakurbağası zehirinde tanımlanmıştır. Kardenolid benzeri bileşiklerden ouabain ve digoksin insan plazmasında endojen olarak bulunmaktadır. 19-Norbufalin, bufenolid, proscillaridin A, marinobufagenin ve telosicobufagin insan dokularında bulunmuş endojen bufadienolidlerdir (24, 86). Şekil 2'de endojen KTS'in yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2: Endojen kardiyotonik steroidlerin yapısı (114)

KTS, Na^+/K^+ -ATPaz pompasına yüksek afinite ile bağlanır ve enzimin pompalama fonksiyonunu inhibe eder. KTS'nin Na^+/K^+ -ATPaz pompasına bağlanması Na^+/K^+ -ATPaz/Src kompleksinin inaktif konformasyondan aktif konformasyona dönüşmesini sağlayarak tirozin fosforilasyonuna ve bunu takip eden sinyal komplekslerinin oluşumuna yol açar. Endojen KTS normal fizyolojik durumlarda nanomolar düzeyin altındaki konsantrasyonlarda bulunur ve bu düşük konsantrasyonda hücre yüzeyindeki Na^+/K^+ -ATPaz'ın %1'ine bağlanır. Birçok memeli hücresinin hücre başına yaklaşık 1 milyon pompa içerdiği göz önüne alındığında az miktarda pompa inhibisyonu intraselüler Na^+ ve K^+ konsantrasyonunda değişikliğe yol açmamaktadır. KTS ile %1 oranında Na^+/K^+ -ATPaz pompasının inhibisyonu, Na^+/K^+ -ATPaz/Src kompleksinin oluşturduğu sinyalizasyon ile hücre başına binlerce aktif molekülün oluşumu için yeterlidir (138)

2.3 OUABAIN

Ouabain kardenolid grubu kardiyak glikozittir. İlk olarak 1991 yılında Hamlyn ve ark. tarafından insan plazmasında nanomolar düzeyde endojen ouabain olduğu bulunmuştur (41). 1998 yılında Schneider ve ark. ouabainin sığır adrenal bezinden salgılandığını göstermiştir (113). Pregnenolon ve progesteron endojen ouabainin prekürsörleridir ve biyosentezi adrenal zona fasikülata hücrelerinde olur. Ekzojen

ouabain bir Afrika ok zehiri olan Ouabaio ağacından ve Strophanthus gratus bitkisinden elde edilir (115).

Ouabain majör olarak adrenal bezde sentezlenip depolanır ve salınımı hormonal stimülasyon ile olmaktadır. Sığır adrenokortikal hücre kültüründe anjiyotensin II ve adrenokortikotropik hormona (ACTH) cevap olarak ouabainin salındığı gösterilmiştir (86, 115). Sodyum dengesinde bozulma, kronik böbrek yetmezliği, hiperaldosteronizm, konjestif kalp yetmezliği ve preeklampsi durumlarında endojen ouabain konsantrasyonu yüksek bulunmuştur. Ouabainin düşük dozlarda insanda vazokonstriksiyona neden olduğu gösterilmiştir. Sıçanların uzun süreli düşük dozlarda (nanomolar) ouabain veya diğer kardenolidlere maruz kalması hipertansiyona neden olmuştur (38, 79, 115).

Mikromolar düzeylerdeki ouabain toksiktir ve intraselüler Na^+ artışına yol açarak 2 mekanizma ile hücre hasarı oluşturur. İlk olarak, hücre içi Na^+ birikimi plazma membran potansiyelinin elektrokimyasal kaybına neden olarak inorganik iyon birikimine ve bunun sonucunda hücre şişmesi ve nekrotik ölüme yol açar. İkinci olarak, hücre içi Na^+ artışı, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değişimini etkinleştirerek intraselüler Ca^{2+} da sürekli bir yükselmeye ve bunun sonucunda hücre hasarı/ölümüne aracılık eden sinyal iletim yollarının başlamasına yol açar. Ayrıca, pompa fonksiyonunu önemli ölçüde inhibe eden ouabain konsantrasyonları non-iyonik olaylar ile ROÜ oluşumuna ve çok sayıda protein kinaz kaskadının aktifleşmesine neden olarak hasar oluşturabilir (43). Ouabainin mikromolar düzeydeki konsantrasyonları PC-3, LNCaP ve DU145 prostat kanser hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonu, mitokondriden erken sitokrom c salınımı, mitokondriyal membran potansiyel kaybı ve ROÜ oluşumuna yol açarak apoptozisi indüklemiştir (49, 133). Hepatoselüler karsinom hücrelerinde (HepG2) yapılan çalışmada 0,1 μM ouabain, CyclinA/CDK2/PCNA kompleksini azaltıp, P21^{CIP1} miktarlarını arttırarak hücreleri S fazında durdurmuş ve Ca^{2+} ile ROÜ artışına yol açarak apoptozisi indüklemiştir (141).

Ouabain nanomolar konsantrasyonlarda Na^+/K^+ gradientini etkilemekten ziyade hücre içi sinyal yollarını etkileyerek fizyolojik ve patofizyolojik olaylarda fonksiyon gösterir. Hücre proliferasyonu (6, 106), kalsiyum mobilizasyonu (106), hücre sitotoksitesisi (49), proteaz aktivasyonu ve MAPK fosforilasyonu (106) nanomolar düzeydeki ouabain ile indüklenir (43).

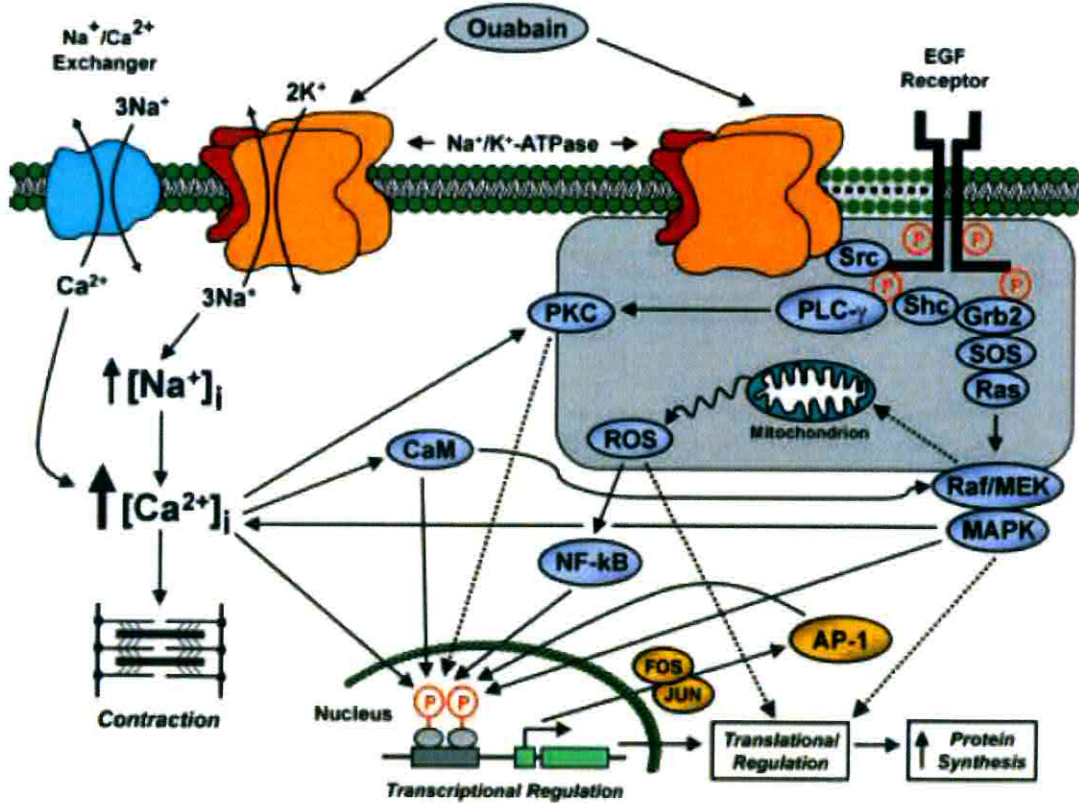
Ouabainin Na^+/K^+ -ATPaz ile etkileşimi sonucu aktiflenen sinyal yolları; başlıca Src kinaz aktivasyonu, Src tarafından EGFR transaktivasyonu, Ras/Raf/MEK/ERK1/2 yolunun aktivasyonu ve mitokondriyal ROÜ oluşumunu kapsar (60). Kardiyak miyositlerde bu sinyal yollarının aktivasyonu sonucunda bazı erken yanıt protoonkogenlerin indüksiyonu, transkripsiyon faktörlerinden nükleer faktör kappa-B (NF- κ B) ve aktivatör protein-1 (AP-1) aktivasyonu, büyüme ile ilişkili kardiyak gen ekspresyonunun düzenlenmesi, protein sentezinin stimülasyonu ve miyosit hipertrofisi uyarılır. Bu olaylarda ROÜ ve Ca^{2+} ikincil mesajcı olarak fonksiyon göstermektedir (137, 139). Ouabain ile aktive olan sinyal yolları kardiyak miyositler dışındaki hücrelerde de benzerdir ancak ortaya çıkan etkiler farklılık gösterebilmektedir (139). Şekil 3'te kardiyak miyositlerde ouabain sinyal iletim yolları gösterilmektedir.

Kardiyak miyositler dışında insan serviks epitelyal karsinom hücreleri (HeLa), sıçan düz kas hücreleri (A7r5), sıçan pankreas adacık hücreleri, insan nöroblastoma hücreleri (SH-SY5Y), PC-3 ve HepG2 hücreleri ile yapılan çalışmalarda ouabain ile indüklenen ROÜ oluşumu gösterilmiştir (49, 54, 64, 73, 141). Ouabain tümör hücrelerinde glikolizi azaltarak ROÜ eliminasyonunda gerekli olan indirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) üretimini düşürerek ROÜ'yü artırır ve mitokondriyal ATP üretimini azaltır (54, 141). Ouabainin neden olduğu hücre içi Ca^{2+} ve ROÜ artışının çift iplikçik DNA kırıklarına ve buna bağlı hücre apoptozuna neden olduğu iddia edilmektedir (141).

Ouabainin miyokart, düz kas, astrosit ve renal proksimal tübül hücrelerini içeren çeşitli hücre tiplerinde proliferasyonu indüklediği gösterilmiştir. Mitojenik etki mekanizması tam olarak bilinmemektedir. Miyokart hücrelerinde ouabain Na^+/K^+ -ATPaz ile bağlandığında Src kinaz aktivasyonu sonucu EGF reseptörü fosforillenerek transaktive edilir ve sonrasında bunu takip eden MEK/ERK yolunun aktivasyonu sonucu hücre büyümesinde gerekli olan genlerin ekspresyonu artar (87). Nontoksik konsantrasyonlardaki ouabain kardiyak miyositlerde parsiyel Na^+/K^+ -ATPaz inhibisyonu ile intraselüler Ca^{2+} artışına yol açar ve bu artış gen transkripsiyonunun regülasyonu ile kardiyak hipertrofiyi stimüle eder (137). Ouabainin aktive ettiği Ras ve P42/44 MAPK sinyal yolları ile c-fos, atriyal natriüretik faktör (ANF), iskelet α -actin (skACT) ve Na^+/K^+ -ATPaz α_3 subunit genleri birbirleriyle ilişkili bulunmuştur (60). Büyüme ile ilişkili bu genlerden ANF, skACT ve Na^+/K^+ -ATPaz α_3 subunit ouabaine

yanıt olarak artan ROÜ ile ilişkili bulunmuştur. Antioksidan olan N-asetil-sistein (NAC) ouabainin bu genler üzerine olan etkilerini bloke etmiştir (137).

Ouabain Na^+/K^+ -ATPaz ile etkileştiğinde 2 mekanizmayla intraselüler kalsiyum artışına yol açar. Birinci mekanizma; pompanın inhibe olması sonucu artan intraselüler Na^+ miktarındaki artış ile, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ değişimini etkinleştirerek intraselüler Ca^{2+} artışına yol açmasıdır. İkinci mekanizma; ouabain ile etkileşen sodyum pompası konformasyonel değişikliğe uğrar ve pompanın α altbiriminin amino terminali sarkoplazmik/endoplazmik retikulum'un (SR/ER) inozitol trifosfat (IP3) reseptörü ile etkileşir. Pompa reseptör etkileşimi Src bağımlı fosforilasyon ve fosfolipaz C $\alpha 1$ (PLC $\alpha 1$) aktivasyonu ile IP3 oluşumu sağlar ve IP3 ER'den Ca^{2+} salınımını artırır (111, 112, 114, 145). Nanomolar düzeydeki ouabainin indüklediği intraselüler Ca^{2+} artışının direkt veya indirekt sonucu olarak mitokondriyal membran potansiyel kaybı, ROÜ üretimi, proteaz aktivasyonu, apoptozis, NF κ B aktivasyonu, endotelin salınımı ve MAPK aktivasyonu meydana gelebilmektedir (43).



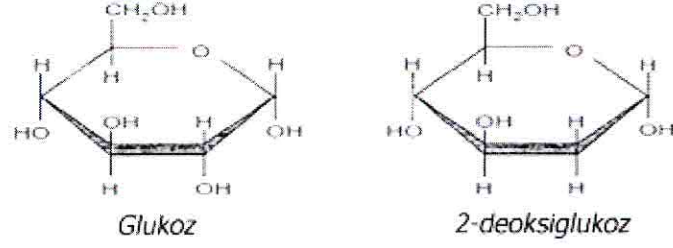
Şekil 3: Kardiyak miyositlerde ouabain sinyal iletim yolları (139)

Yapılan çeşitli çalışmalar nanomolar konsantrasyonlardaki ouabainin sitotoksik olabileceğini, kaspaz-3 ve kalpain gibi ölüm efektörlerini etkinleştirebileceğini göstermektedir. Kalpain aktivasyonu, endojen kalsinörin inhibitörü olan cain/cabin1 bölünmesi yolu ile apoptozis, nekroz ve kalsiyumla indüklenen hücre ölümüne yol açabilmektedir. İnsan prostat düz kas hücrelerinde, 10 nmol/L ouabain laktat dehidrogenaz (LDH) salınmasına ve sistein proteaz kaspaz-3 aktivite artışına yol açmıştır (22). İnsan kaynaklı miyoplastik hücreler (Girardi), domuz renal epitelyal hücreleri (LLC-PK1), insan böbrek proksimal tübül hücreleri (HK-2) ve sıçan primer vasküler düz kas hücrelerinde (VSMC) yapılan çalışmalarda nanomolar konsantrasyonlarda ouabainin 3 saat içinde kalpaini aktive ettiği bulunmuştur (43).

Ouabaine bağlı hücre ölümünün (düşük veya yüksek konsantrasyonlarda) hem nekrotik hem de apoptotik yolların kombinasyonu ile olduğu düşünülmektedir. Ouabainin hücre ölümü üzerine etkisi hücre tipi, ouabain konsantrasyonu ve uygulama süresi gibi faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir (43).

2.4 2-DEOKSİGLUKOZ

2-Deoksiglukoz (2-DG), glukoz analogu ve glikolizin yarışmalı inhibitörüdür. Şekil 4'te 2-DG'nin yapısı gösterilmiştir. Hücre içinde hekzokinaz (HK) tarafından fosforile edilerek 2-DG-fosfata (2-DG-P) çevrilir. 2-DG-P, glukoz-6-fosfat'tan farklı olarak fosfoheksoz izomeraz tarafından metabolize edilemez ve hücre içinde birikir. 2-DG-P ürün inhibisyonu ile glikolizin ilk hız kısıtlayıcı basamağı olan fosforilasyon aşamasında glikolizi inhibe eder (92). 2-DG, in vitro koşullarda glukoz yoksunluğuna yol açarak hücre ATP azalmasına, hücre siklus progresyonunda blokaja ve hücre ölümüne yol açmaktadır (7, 77). 2-DG, glikoliz inhibisyonunun yanı sıra protein glikozilasyonunu da etkilemektedir. ER'de yanlış katlanmış proteinlerin birikimine yol açarak ER stres cevabını aktifler. 2-DG antiviral ve antikanser tedavide denenmiş bir ajandır (56).



Şekil 4: 2-DG yapısı (1)

Aerobik koşullar altında, normal hücreler ATP'lerinin çoğunu enerji kaynağı olarak glukoz, yağ asitleri ve diğer metabolik ara ürünleri kullanarak mitokondriyal oksidatif fosforilasyondan elde ederken, bazı tümör hücreleri ATP'lerinin % 60 kadarını glikoliz yoluyla üretmektedir (21). Kanser hücrelerinde aerobik koşullarda glikoliz artışı Warburg etkisi olarak adlandırılmaktadır (132). Malign transformasyona uğratılan kültür hücrelerinde glukoz taşıyıcı 1 (GLUT1) gen transkripsiyon aktivasyonu sonucu GLUT1 mRNA'sında ve proteininde artış ve buna bağlı olarak hücre içine glukoz transportunda artış olduğu saptanmıştır (1). Tümör hücrelerinin ATP üretmek için daha az enerji verimliliği olan glikolizi arttırmasının nedeni henüz tam olarak anlaşılacakla beraber mitokondrial DNA (mtDNA) mutasyonları ve delesyonlar, nükleer DNA (nDNA) mutasyonları veya anormal gen ekspresyonu, onkojenik transformasyon ve tümör mikroçevresinin etkisi öne sürülen muhtemel mekanizmalardır (21).

Kanser hücrelerindeki artmış glikolitik aktivite ve normal hücrelerde glikoliz dışında enerji üretimi için alternatif mitokondriyal fosforilasyon bulunması, glikolizi antikanser ajanlar için hedef haline getirmiştir. Glikoliz inhibisyonu yapan antikanser ajanlar HK, fosfofruktokinaz, gliseraldehit-3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH) ve LDH enzimlerini inhibe ederek etki göstermektedir (21, 92). 2-DG, mitokondriyal solunum defekti olan kanser hücrelerinde veya hipoksik hücrelerde HK inhibisyonu ile glukoz yoksunluğu yaratarak ATP depleksiyonuna, nükleotit ve makromoleküllerin sentezinin azalmasına, hücre siklusunun durmasına ve hücre ölümüne yol açmaktadır (7, 21, 77). 2-DG veya glukoz yoksunluğu kanser hücrelerinde ROÜ'yü arttırmaktadır (131). Glukoz yoksunluğunda NADPH üretimi azalır ve redoks durumu değişip tiyol metabolizması bozulur, artan ROÜ ve oksidatif stres apoptoza duyarlılığı artırır (57, 83).

Çoğu kemoterapötik ajan hızlı bölünen hücelere toksik iken solid tümörlerin merkezinde bulunan yavaş bölünen hücelere etkisizdir (77). Solid tümörlerin merkezindeki hüceler glikolitik inhibitörlere duyarlıdır (80). Standart kanser tedavi rejimine glikoliz inhibitörlerinin eklenmesi kemoterapötik ajanların yavaş bölünen hücelere üzerine olan sitotoksik etkisini arttırmaktadır (27, 77). 2-DG seçici olarak kanser hücelerinde birikmektedir ve bunun başlıca nedenleri; artmış GLUT1 ile uptake artışı, artmış hücre içi HK düzeyi ve düşük hücre içi fosfataz düzeyidir (1). 2-DG, in vitro memeli tümör hücelerinde sitotoksiktir ve in vivo tümör büyümesini inhibe eder. Sıçanlarda fibrosarkoma büyümesini inhibe ettiği gösterilmiştir (2). 2-DG'nin insan glioma ve skuamoz kanser hatlarında kamptotesin ve etoposid sitotoksitesini, ayrıca prostat ve pankreas hücre hattında paklitaksel, adriamisin, cisplatin sitotoksitesini artırdığı gösterilmiştir (27). Meme kanser hücelerinde (T47D) 2-DG/doksorubisin kombinasyonunun oksidatif stres ve tiyol metabolizmasını bozma yolu ile sitotoksite yaptığı ve bunun NAC ile geri çevrilebildiği gösterilmiştir (2).

İnsan kanser hücelerinde kemosensitizasyonun yanısıra radyosensitizasyon da 2-DG tarafından artırılır (2, 27). 2-DG beyin tümörlerinde radyasyonun uyardığı sitogenetik hasarı artırmıştır (27). 2-DG'nin ATP üretimi ve enerji metabolizmasını azaltıcı etkisi radyasyon uygulanması sonrası gerçekleşen DNA tamirinde inhibisyona yol açar (72). Yapılan bir çalışmada beyin tümörü olan hastalarda radyasyon tedavisi ile birlikte 250 mg/kg dozuna kadar 2-DG kullanımının güvenli olduğu bildirilmiştir (122). İnsan kanser hücelerinde 2-DG'nin tiyol metabolizmasını bozması, total hücre içi glutatyon ile NADPH miktarını azaltması ve oksidatif stresi uyarması hüceleri iyonize radyasyonun sitotoksik etkilerine duyarlı hale geldiği ve NAC eklenerek oksidatif stresin azaltılması durumunda bu duyarlılığın azaldığı iddia edilmiştir (72).

2.5 MİTOKONDİRİ

2.5.1 Mitokondrinin Yapısı

Mitokondri, oksijenli solunum yapan tüm ökaryotik hücrelerde bulunan ve enerji üretiminden sorumlu olan organeldir. Ovalden çubuğa kadar değişen şekillerde bulunur ve yaklaşık 0,5-1 µm çaptadır. Sayıları hücrenin fonksiyonuna ve ihtiyacına bağlı olarak birkaç yüz ile birkaç bin arasında değişmektedir. Mitokondriler, iç ve dış membran olarak adlandırılan bir çift zar sistemiyle çevrilidir. Dış ve iç membranların arasındaki bölge intermembran aralık, iç membranın çevrelediği bölge ise matriks olarak adlandırılmıştır (3, 10). Şekil 5'te mitokondrinin yapısı gösterilmiştir.

2.5.1.1 Dış Membran

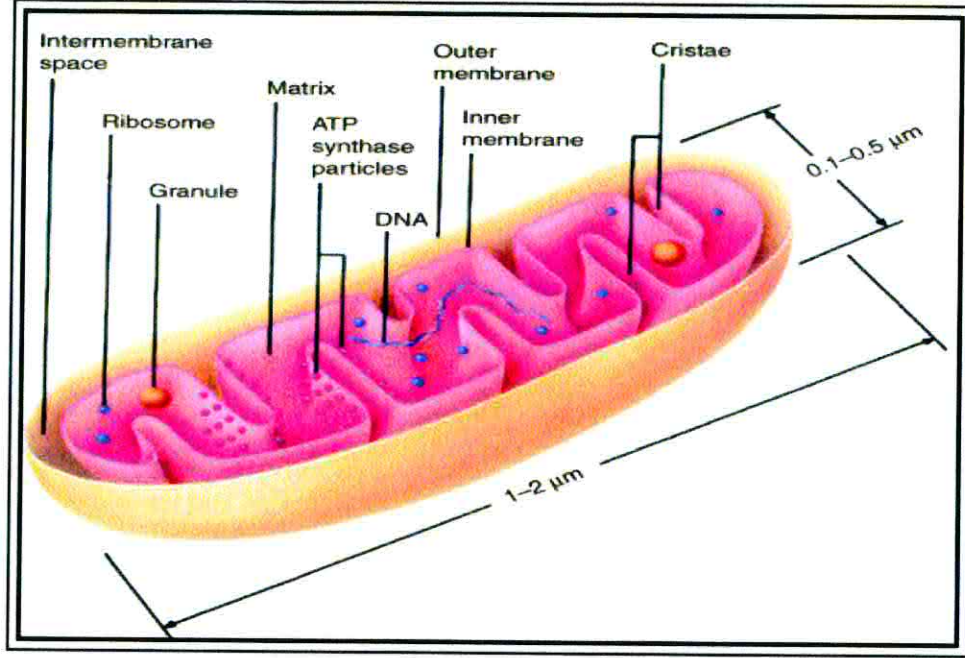
Dış membran 10000 daltondan küçük moleküllerin geçişine olanak veren ve porin olarak adlandırılan geniş kanallar içerir. Bu moleküller intermembran aralığa girerek intermembran aralığın bileşimini iyonlar ve küçük moleküller yönünden sitozole benzer hale getirir. Lipit bileşenlerini matrikste metabolize olabilecek forma dönüştüren enzimler de dış membranda bulunur (3, 23).

2.5.1.2 İç Membran

İç membran matrikse doğru krista denilen yapıları oluşturarak yüzey alanını artırır. Doku tiplerine göre krista sayısı ve alanı değişiklik göstermektedir. Matrikste metabolize olacak küçük moleküllerin veya iyonların membrandan geçebilmesi için membranda protein yapıda transport molekülleri bulunur. Ayrıca enerji üretiminde rol alan elektron zincir (ETZ) proteinleri ve ATP sentaz kompleksi de iç membranda yerleşmiştir (3).

2.5.1.3 Matriks

Matriks, pirüvat ve yağ asidi oksidasyonu ile trikarboksilik asit (TCA) siklusu için gerekli enzimlerin de içinde olduğu yüzlerce farklı enzim içerir. Enzimlerin yanı sıra özel mitokondriyal ribozomlar, tRNA, mtDNA ve nikotinamid adenin dinükleotid (NAD), flavin adenin dinükleotid (FAD), Adenosin difosfat (ADP) ve Pi (inorganik fosfat) moleküllerini de içerir (3, 23, 75).



Şekil 5: Mitokondrinin yapısı (75)

2.5.2 Mitokondrinin Fonksiyonları

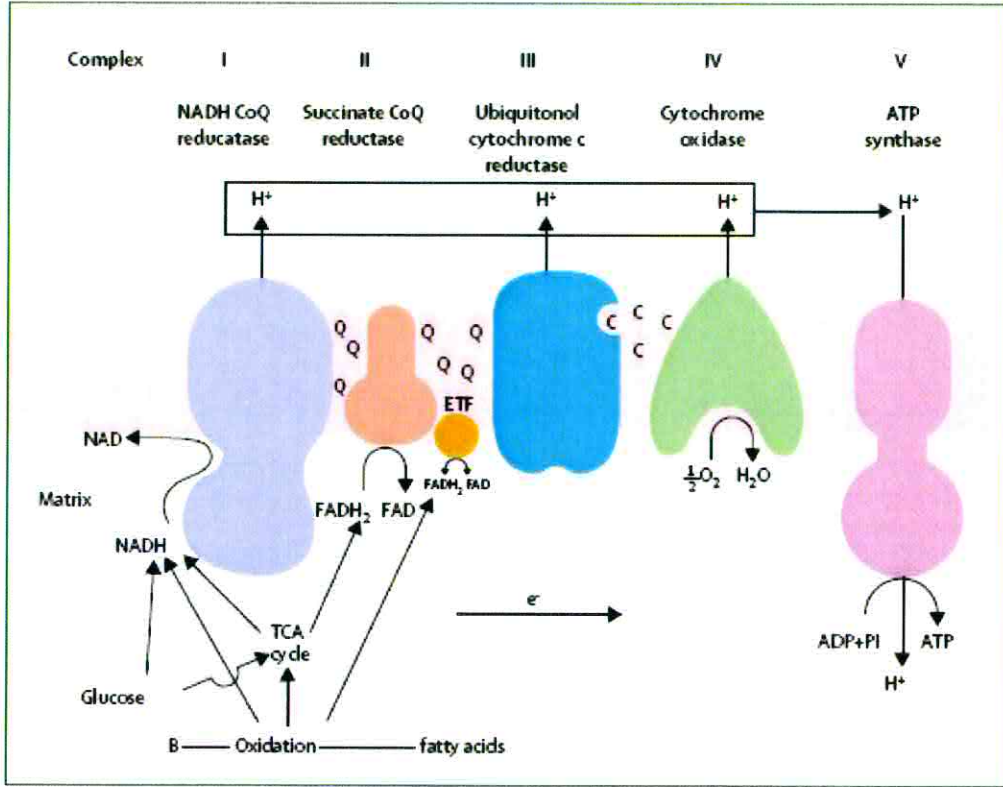
Mitokondri, lipid ve karbonhidratların yıkımından elde edilen ve oksidatif fosforilasyon işlemiyle ATP'ye dönüştürülen kullanılabilir enerjinin büyük bölümünün üretiminden sorumludur (23). Bunun yanı sıra intraselüler kalsiyum düzenlenmesi, ısı oluşumu, apoptozis kontrolü, hem sentezi, yağ asitlerinin β -oksidasyonu, üre siklusu ve hücrel ROÜ üretiminde de fonksiyonları vardır (61, 69)

2.5.2.1 Oksidatif Fosforilasyon (Oxidative Phosphorylation, OXPHOS)

Hücrel enerjinin en büyük bölümünün kaynağını oluşturan elektron taşınımı ve oksidatif fosforilasyon mitokondri iç membranında gerçekleşmektedir. Oksidatif fosforilasyon sırasında NADH ve $FADH_2$ 'den çıkan elektronlar O_2 ile birleşir ve bu yükseltgenme/indirgenme reaksiyonları sırasında açığa çıkan enerji ADP'den ATP sentezlemek için kullanılır. NADH ve $FADH_2$, glikoliz, yağ asidi oksidasyonu ve sitrik asit siklusunda oluşan yüksek enerjili moleküllerdir ve yüksek transfer potansiyeline sahip bir çift elektron içerirler. NADH veya $FADH_2$ 'deki elektronlar moleküler oksijene aktarılırken oksidatif fosforilasyonla ATP sentezi gerçekleştirilir (23).

Mitokondriyal solunum zinciri, birbiri ardısıra etki gösteren elektron taşıyıcıları serisidir (85). Bu taşıyıcılar mitokondri iç zarında dört büyük moleküler kompleks

halinde düzenlenmiştir. Beşinci bir protein kompleksi olarak da adlandırılan ATP sentaz enzimi, enerji sağlayan elektron taşıma reaksiyonunun ATP senteziyle birleşmesini sağlar (23).



Şekil 6: Oksidatif fosforilasyon sistemi (109)

Kompleks I (NADH: Ubikinon Oksidoredüktaz), 850 kD ağırlığında, bir adet flavin mononükleotid (FMN) içeren flavoprotein ve en az altı Fe-S merkezi bulunan 42 polipeptitten oluşan büyük bir enzimdir. NADH ile gelen bir çift elektron ilk olarak FMN'ye daha sonra demir-kükürt kompleksi üzerinden koenzim Q'ya aktarılır. Kompleks I eşzamanlı olarak dört protonun intermembran aralığına transferini katalizler (23, 85).

Koenzim Q (ubikinon), uzun izoprenoid yan zincire sahip lipitte çözünen bir moleküldür. Ubikinon bir elektron alarak semikinon radikali (QH^{*}) veya iki elektron alarak ubikinol (QH₂) haline gelebilir. Ubikinon yapısal olarak küçük ve hidrofobik olması nedeniyle mitokondri iç membranının lipit çift tabakasından kolayca geçebilen, elektron ve protonların hareketli taşıyıcısı olarak iş yapar ve elektronları kompleks III'e aktarır (85).

Kompleks II (Süksinat: Ubikinon), TCA siklusundaki zara bağılı tek enzim olan süksinat dehidrogenazdır. 140 kD ağırlığındadır ve iki tip prostetik grup ile en az 4 farklı protein içerir. Bir proteinde, Fe-S merkezleri ve kovalent bağılı bir molekül FAD vardır. TCA siklusunda süksinatın fumarata okside edilmesini ve süksinattan gelen elektronların FAD'ye sonra Fe-S merkezleri üzerinden koenzim Q'ya aktarılmasını sağlar (85). Kompleks I'de elektronların NADH'tan koenzim Q'ya aktarılmasının aksine, elektronların FADH₂'den koenzim Q'ya aktarımı serbest enerjide önemli bir düşüşe yol açmaz ve bu nedenle ATP sentezi oluşmaz. FADH₂'den çıkan elektronların elektron taşıma zincirinden geçişi sırasında sadece kompleks III ve IV'te serbest enerji elde edilir (23).

Kompleks III (Ubikinon: sitokrom C oksidoredüktaz), 250 kD ağırlığındadır ve her birinde 11 ayrı altbirim bulunan iki farklı monomerden oluşur. Monomerik yapı sitokrom b, sitokrom c ve Fe-S merkezi içerir. Dimerik yapı kompleks III'ün işlevi için esastır. Ubikinolden (QH₂) sitokrom c'ye elektronları aktarırken, matriksten intermembran aralığına proton transferini de sağlar (85). İç membranın dış yüzüne bağılı, hareketli bir periferik zar proteini olan sitokrom c, elektronları son olarak O₂'e aktaracak olan kompleks IV'e (sitokrom oksidaz) taşır (23).

Kompleks IV (Sitokrom oksidaz), 160 kD ağırlığında 13 altbirimden oluşan büyük bir enzimdir. Elektronları sitokrom c'den moleküler oksijene transfer eder ve oksijeni suya indirger. Bu kompleks üzerinden her dört elektron geçişi için, enzim matriksten dört H⁺ alarak O₂'yi iki molekül suya çevirir. Aynı zamanda bu reaksiyon sırasında mitokondri matriksinden intermembran aralığına dört proton geçişi olur (85).

Kompleks V (ATP sentaz), ADP+Pi'den ATP oluşumu sağlar. ATP sentaz birbirine bağılı olarak bulunan periferik membran proteini F₁ ve integral protein (Fo)'dan oluşur. Fo kompleksinin a,b,c olarak belirtilen üç alt birimi vardır ve bileşimi ab₂c₁₀₋₁₂ şeklindedir. Fo intermembran aralığındaki protonların matrikse geri dönmesine olanak sağlayan proton kanalını oluşturur. F₁ kompleksi beş farklı tipte toplam dokuz altbirim içerir ve bileşimi $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ şeklindedir. β alt birimi ATP sentezi için katalitik bölgedir. Protonların matrikse hareketinin oluşturduğu güç F₁ proteini tarafından katalizlenen ATP sentezi için gerekli olan enerjiyi sağlar. Geçen her dört protona karşılık bir ATP sentezlenir (23, 85, 116).

2.5.3 Mitokondriyal DNA

Mitokondri, hücre genomundan ayrı ve farklı olan kendisine ait bir genetik sistem içerir (23). Her bir mitokondri 2-10 kopya mtDNA bulundurur (93, 107).

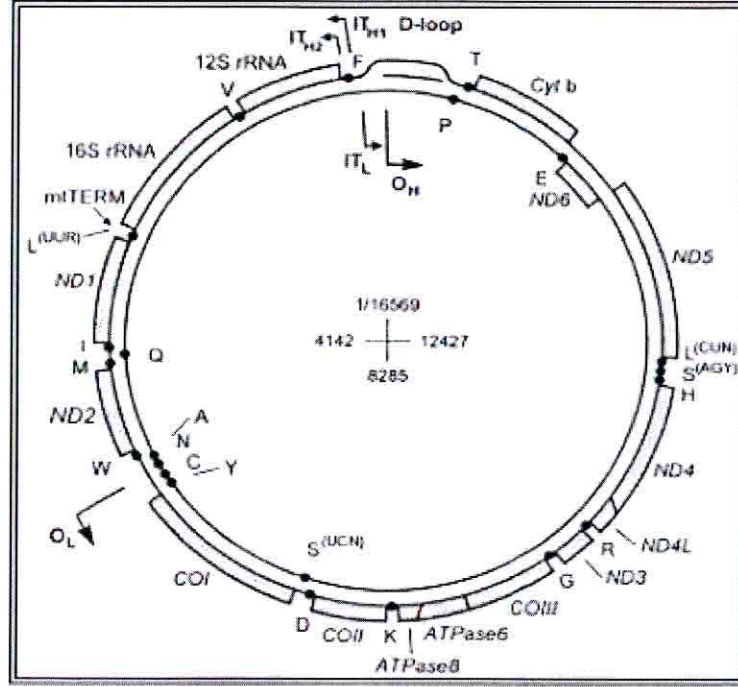
İnsan mtDNA'sının tüm dizisi ilk olarak Anderson ve arkadaşları tarafından 1981 yılında tanımlanmıştır (4). Mitokondri matriksi içinde yer alan mtDNA, çift zincirli, kapalı sirküler yapıya sahip bir DNA molekülü olup 16569 baz çifti (bç) uzunluğundadır. mtDNA, mitokondriyal ETZ'ye ait 13 protein, 22 tRNA ve 2 rRNA olmak üzere toplam 37 gen kodlamaktadır (32, 107, 124, 130). mtDNA'da kodlanan 13 proteinin yedisi kompleks I, biri kompleks III, üçü kompleks IV ve ikisi kompleks V'e ait subunitlerdir (32, 130). Oksidatif fosforilasyon sistemini oluşturan diğer polipeptitler nDNA tarafından kodlanmaktadır (93). Tablo II'de mtDNA ve nDNA tarafından kodlanan oksidatif fosforilasyon sistemine ait polipeptitler gösterilmektedir (93).

Tablo II : mtDNA ve nDNA tarafından kodlanan oksidatif fosforilasyon sistemine ait polipeptitler

| Protein kompleksi | mtDNA'da kodlanan polipeptitler ve sayısı | nDNA'da kodlanan polipeptit sayısı | nDNA ve mtDNA'da kodlanan polipeptit sayısı |
|-------------------|---|------------------------------------|---|
| Kompleks I | ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6 (7) | 36 | 43 |
| Kompleks II | --- | 4 | 4 |
| Kompleks III | Sitokrom b (1) | 10 | 11 |
| Kompleks IV | COX I, COX II, COX III (3) | 10 | 13 |
| Kompleks V | ATPaz 6, ATPaz 8 (2) | 14 | 16 |
| Toplam | 13 | 74 | 87 |

mtDNA'nın iki komplementer zinciri baz içeriklerine göre adlandırılmaktadır. H zincir (ağır zincir) daha çok pürin bazlarını, L zinciri (hafif zincir) ise daha çok pirimidin bazlarını içerir. 2 rRNA, 14 tRNA ve 12 polipeptid H zincirde, kalan 9 gen ise L zincirde kodlanmaktadır (32, 124) Şekil 7'de mtDNA'nın yapısı gösterilmektedir (124)

mtDNA'da gen kodlanmayan, düzenleyici fonksiyonları olan iki bölge vardır. Birincisi, tRNA^{Phe} ve tRNA^{Pro} genleri arasında bulunan kontrol bölgesi olarak da adlandırılan yaklaşık 1 kilo baz (kb) uzunluğundaki D-loop (Displacement Loop) bölgesidir. D-loop, H-L zincirlerine ait transkripsiyon promotör bölgeleri ve H zincirine ait replikasyon orjini içerir (O_H). İkinci kodlanmayan bölge ise, yaklaşık 30 nükleotid uzunluğundadır ve L zincirin replikasyon orjinini içerir (O_L) (32, 110, 124).



Şekil 7: mtDNA'nın yapısı (124)

2.5.3.1 Mitokondriyal Kalıtım

Mitokondriyal DNA'nın kalıtımı ilk olarak 1980 yılında Giles ve arkadaşları tarafından tanımlandığı şekilde maternal olarak gerçekleşmektedir (34). Memeli sperm hücrelerinde mtDNA kopya sayısı oldukça düşük iken oositlerde çok yüksektir ($>10^5$). Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak yapılan çalışmalarda paternal kalıtımın da mümkün olabileceği bildirilmiştir. Gyllensten ve arkadaşları *Mus musculus* ve *Mus spretus* ile yaptığı tür çaprazlamalarında az miktarda paternal mtDNA'nın da yavrulara geçtiğini göstermişlerdir (117, 124).

2.5.3.2 mtDNA'nın Replikasyonu

Mitokondriyal DNA replikasyonu, mitokondriyal matriks içerisinde, hücre döngüsünden ve nDNA replikasyonundan bağımsız olarak gerçekleşmektedir (32).

Mitokondriyal DNA replikasyonu zincir spesifik olarak iki replikasyon orijininden başlamaktadır. Ağır zincir orijini (O_H) D-loop bölgesinde hafif zincir promotorunun (LSP) aşağısında yer alırken, hafif zincir orijini (O_L) O_H 'den mtDNA'nın 2/3'si kadar bir uzaklıkta yer almaktadır (124). Mitokondriyal replikasyonun başlaması mitokondriyal transkripsiyon sistemi ile bağlantılıdır ve O_H 'de bir noktadan, hafif zincirin promotorundan transkribe olan RNA primeriyle başlar (32, 110). Şekil 8'de replikasyon başlaması şematik olarak gösterilmiştir. CSB (conserved sequence block) ve TAS (termination associated sequence) olarak adlandırılan iki D-loop sekansı replikasyon sürecine katkıda bulunur. CSB, D-loop bölgesinde bulunan korunmuş dizidir ve başlangıç RNA primeri oluşumuna katılır. Ağır zincir replikasyon başlangıç noktası her zaman CSB-I yakınında lokalizedir. TAS, 15 bp'lik bir dizidir ve sentezi durmuş D-loop DNA zincirinin 3' ucu ile ilişkilidir. Mitokondriyal RNA polimerazın RNA primeri sentezinden sonra O_H 'nin yukarısında kalan CSB üzerinde stabil bir RNA-DNA hibridi oluşmaktadır. Oluşan R-loop yapısı üzerinden olgun primer oluşur ve mitokondriyal DNA polimeraz (DNA polimeraz γ) ağır zincir sentezini başlatır (13, 32,124).

Ağır zincir sentezi başladıktan sonra, sentez çoğu durumda sonlanma ile ilişkili diziler (TAS) üzerinde durmakta ve 3 zincirli D-loop yapısı ortaya çıkmaktadır. Bazı durumlarda ise tüm genom boyunca devam etmekte ve yeni bir mtDNA kopyası oluşturulmaktadır. Hafif zincir sentezi ise ağır zincir sentezi başladığında O_L bölgesinde çift zincirin açılması ile aktiflenir. Zincirin açılmasının ardından bir primaz ile primer dizisi oluşturulur ve O_L bölgesinde timinden zengin bölgeye bağlanır. Hafif zincir replikasyonu ağır zincirle ters yönde olmak üzere başlar (32,124).

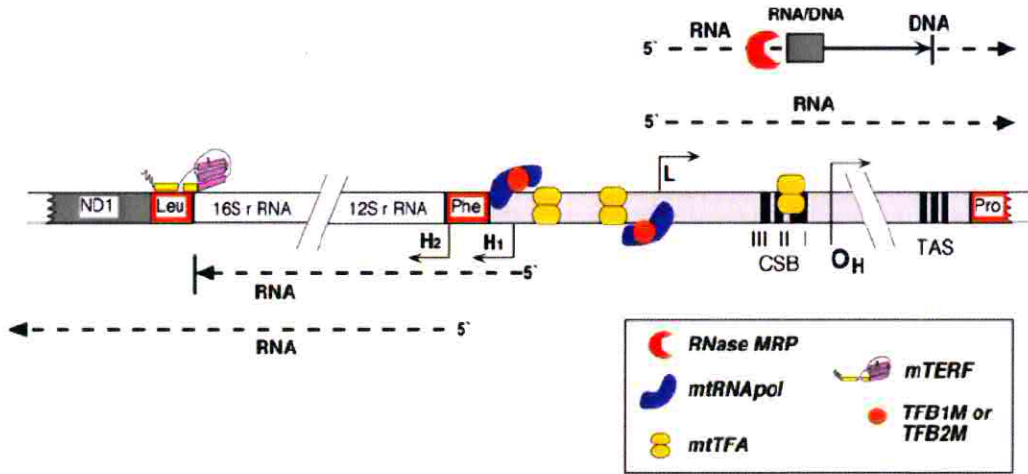
RNA primerlerinin uzaklaştırılması ve sentezlenmesi tamamlanmış DNA zincirlerinin ligaz ile birleştirilmesinden sonra replikasyon işlemi tamamlanır. mtDNA replikasyonu mitokondri spesifik DNA polimeraz γ (Pol γ) tarafından gerçekleştirilir.

Pol γ , büyük katalitik α -subünit (125-140 kD) ve primer tanınmasında rol alan küçük β -

subünitten (30-54 kD) oluşur. α -subünit 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir ve replikasyonun doğrulukla yapılmasını sağlar (29, 32, 124).

2.5.3.3 mtDNA'nın Transkripsiyonu

D-loop bölgesi üzerinde yerleşim gösteren ağır zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi (IT_{H1}) ve hafif zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi (IT_L) olarak adlandırılan iki majör transkripsiyon başlama alanı vardır. Birbirlerine 150 bp uzaklıkta yer alan, IT_{H1} ve IT_{L1} bölgeleri ağır ve hafif zincir promotor bölgeleri (HSP ve LSP) içerisinde yer almaktadır (18). Her iki promotor dizinin upstream bölgesinde mitokondriyal transkripsiyon faktörünün (mtTFA) bağlanması için gerekli "enhancer dizileri" bulunmaktadır. tRNA_{phe} geninin içerisinde 12S rRNA geninin yanında yer alan ikinci bir ağır zincir transkripsiyon başlangıç bölgesi (IT_{H2}) bulunmaktadır (32, 124). Şekil 8'de transkripsiyon başlaması şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 8: mtDNA replikasyon başlama ve transkripsiyon başlama ve sonlanmasının şematik görünümü (32)

Mitokondriyal transkripsiyon, mitokondriyal RNA polimeraz, mtTFA, TFB1M ve TFB2M transkripsiyon faktörlerine ve mTERF transkripsiyon sonlanma faktörüne ihtiyaç duyar (32). Mitokondriyal RNA polimeraz (mtRNApol) 120 kD ağırlığında bir proteindir ve transkripsiyonu başlatabilmek için mitokondriyal transkripsiyon faktörlerine ihtiyaç duymaktadır (33). RNA metiltransferazlarla homoloji gösteren

TFB1M ve TFB2M transkripsiyon faktörleri, mtRNApol ile heterodimer oluşturarak transkripsiyonun başlamasında rol oynarlar ancak uzama için gerekli değildir (31). mtTFA, 25 kD ağırlığında HMG (high mobility group) proteinler grubuna ait bir üyedir. mtTFA HMG-box domaini aracılığıyla DNA ile kompleks oluşturur ve mtDNA promoter bölgesinin konformasyonel değişikliğini indükleyerek RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmasına olanak sağlar (119).

Transkripsiyonun sonlanmasına aracılık eden faktör (mTERF), mtDNA'ya bağlanır ve DNA heliksinde bükülmeye yol açar. mTERF RNA polimeraz ile spesifik bir etkileşime girmekten çok fiziksel bir bariyer oluşturarak ve DNA konformasyon değişikliğine yol açarak transkripsiyonu sonlandırır (120). Şekil 8'de transkripsiyon sonlanması şematik olarak gösterilmiştir. Sentezlenen transkriptlerin mitokondriyal ribonükleaz P (RNaz-P) ile endonükleotik kesimi sonucu 13 mRNA, 22 tRNA ve 2 rRNA oluşur (110, 124).

2.5.3.4 Mitokondriyal Protein Sentezi

Mitokondriyal protein sentezi sitoplazmik protein sentezinden bağımsız olarak mitokondriyal matrikste yer alan ve mitoribozom adı verilen mitokondriyal ribozomlar tarafından gerçekleşmektedir. Mitoribozomlar küçük ve büyük alt birimleri mtDNA tarafından kodlanan 16S ve 12S rRNA'yı içermektedir (124).

Memeli mitokondriyal mRNA'sı, ribozoma bağlanmayı kolaylaştıracak öncü sekanslara sahip değildir ve 7-metilguanilat cap yapısı bulunmamaktadır. Böylelikle ribozomu başlama kodonuna yönlendiren tanıma mekanizmasından yoksun bırakılmıştır ve bu durum translasyon verimini düşürmektedir. Düşük translasyon verimi, mitokondrideki mRNA yoğunluğunun atırılması ile yeterli hale getirilmeye çalışılmıştır (110, 124).

mRNA'nın mitoribozomun küçük alt birimine bağlanmasının ardından ribozomal alt birim henüz tam olarak belirlenememiş yardımcı faktörler aracılığı ile mRNA 5' ucuna doğru ilerlemektedir. Memelilerde tanımlanmış tek başlangıç faktörü mtIF-2'dir. mtIF-2 GTPaz ailesine ait monomerik bir proteindir ve fMet-tRNA'nın küçük ribozomal alt birime bağlanmasını sağlar. GTP hidrolizi mtIF-2'nin yapıdan ayrılmasına ve büyük ribozomal alt birimin yapıya katılarak 55S başlangıç kompleksinin oluşumuna yol açar. mtEF-Tu, mtEF-Ts ve mtEF-G memelilerde

tanımlanmış uzama faktörleridir. Mitokondriyal protein sentezinin sonlanma süreci tam olarak aydınlatılamamakla birlikte mtRF1 ve mtRF1a salınım faktörleri tanımlanmıştır (123, 124).

Mitokondriyal protein sentezinde rol alan tRNA'lar mtDNA tarafından kodlanırlar ve sitoplazmik tRNA'lara kıyasla çok daha küçüktürler. Buna ek olarak mitokondriyal translasyon, evrensel kodlamadan farklılık göstermektedir (88, 123, 125). mtDNA ve nDNA arasındaki kodon farklılıkları Tablo III'de gösterilmiştir (123).

Tablo III: mtDNA ve nDNA arasındaki kodon farklılıkları

| Kodon | nDNA | mtDNA |
|--------------|-------------|--------------|
| UGA | DUR | Trp |
| AGA | Arg | DUR |
| AGG | Arg | DUR |
| AUA | Ile | Met |

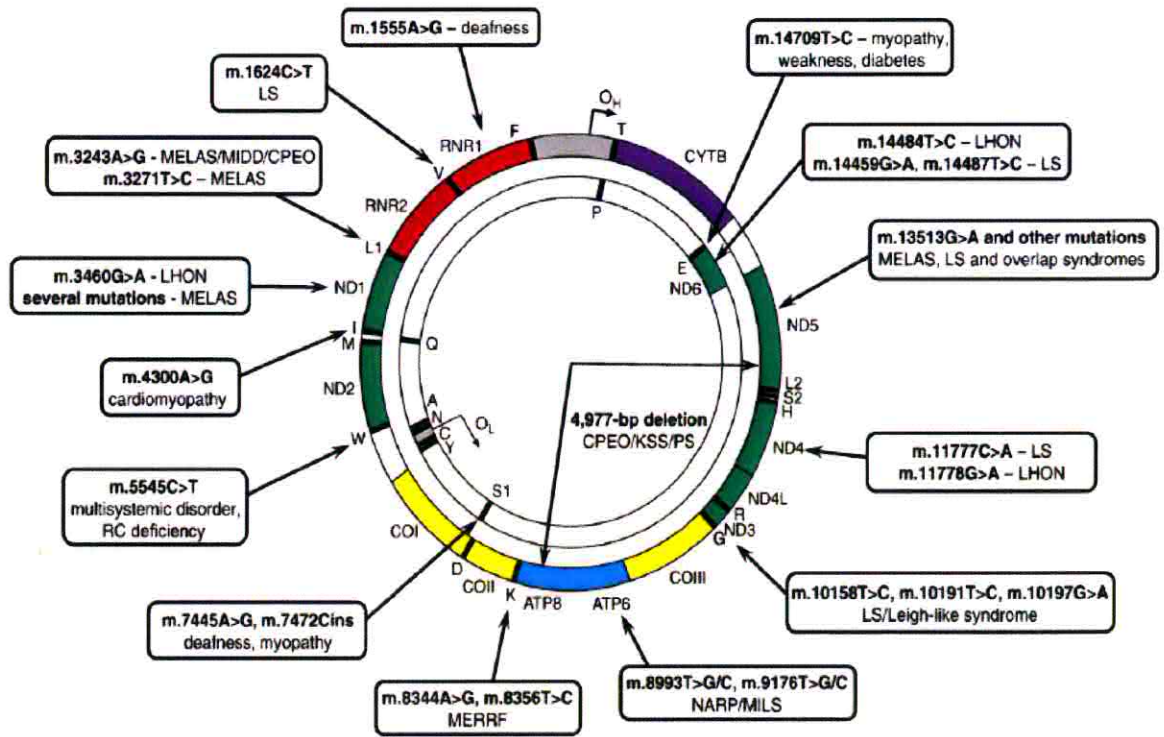
2.5.3. 5 mtDNA Mutasyonları

Ames ve arkadaşları mtDNA'nın oksidatif hasara nDNA'dan daha yatkın olduğunu öne sürmüşlerdir (98). Takip eden çalışmalarda insan, sıçan, fare ve mantar gibi çeşitli hücre tiplerinde oksidatif stresin mtDNA'da nDNA'dan 3-10 kat daha fazla hasara neden olduğu gösterilmiştir (103, 104, 142). mtDNA'nın nDNA'dan daha fazla hasar görmesinin nedenleri;

1. mtDNA, nDNA gibi histon veya non-histon proteinlerle korunmaz ve bu nedenle mutajenler mtDNA'yı daha çok etkiler (16, 123, 143, 146).
2. Mitokondrilerde DNA onarım sistemi yetersizdir. mtDNA'nın nükleotid eksizyon tamir (NER) için gerekli enzimlerden yoksun olduğu, bununla beraber baz eksizyon tamir (BER) sisteminin oksidatif DNA hasarının uzaklaştırılması için temel yol olduğu belirlenmiştir (11, 70, 107, 123).
3. mtDNA intron içermediği için, rastgele bir mutasyon genellikle kodlayıcı DNA zincirini etkiler (16, 143).

4. mtDNA oksidanların olduğu mitokondri iç zarına yakın yerleşimlidir. mtDNA mitokondride gerçekleşen oksidatif fosforilasyon sırasında ortaya çıkan fazla miktarda ROÜ'ye maruz kalır (11, 123, 146).

mtDNA mutasyonları, mtDNA yeniden düzenlenmeleri ve baz değişimi mutasyonları olarak iki başlık altında ele alınabilir (12). Şekil 9'da sık görülen mutasyonlar gösterilmiştir. Baz değişimi mutasyonları, aminoasit değişikliğine neden olan missense mutasyonları ve protein sentezi ile ilişkili nokta mutasyonlarını içermektedir. Sıklıkla görülen mutasyonlar, A-G ve G-A transizyon mutasyonlarıdır. Bu mutasyonlar, ROÜ gibi endojen faktörler tarafından oluşturulan DNA adduktlarının replikatif bypass'ı ya da DNA replikasyon hatalarından ortaya çıkmaktadır (55). mtDNA yeniden düzenlenme mutasyonlarının önemli bölümünü 1.3-8 kb büyüklüklerindeki geniş delesyonlar oluşturur (126).



Şekil 9: mtDNA'da sık görülen mutasyonlar (126)

mtDNA'daki birçok somatik mutasyonun yaşlanma ile birlikte farklı dokularda progresif olarak birikim gösterdiği bulunmuştur (70). mtDNA delesyonları yaşlanmayla birlikte özellikle iskelet kası, miyokart ve beyin gibi postmitotik dokularda farklı oranlarda birikmektedir (62). mtDNA mutasyonlarının sadece yaşlanmanın belirtisi

olmadığı aynı zamanda yaşlanmanın nedeni de olabileceği bildirilmiştir (82). Patojenik mtDNA mutasyonları mitokondriyal solunumda genel bir defekte ve bunun sonucunda hücre ATP üretiminde azalmaya ve çeşitli hastalıklara yol açmaktadır (126). mtDNA mutasyonları sonucu ortaya çıkan hastalıklardan bir kısmı Tablo IV’de verilmektedir.

Tablo IV: Mitokondriyal DNA mutasyonları ve ilişkili hastalıklar (84, 109, 125)

| Hastalık | Klinik fenotip | mtDNA mutasyonu |
|--|---|--|
| CPEO (Kronik Progresiv External Oftalmopleji) | Oftalmopleji | 3243 tRNA ^{Leu} Delesyon 8470:13447 |
| KSS (Kearns-Sayre Sendromu) | Progresif miyopati, oftalmopleji, kardiyomiyopati | Delesyon 8470:13447, 3243 tRNA ^{Leu} , 8344 tRNA ^{Lys} |
| MELAS | Miyopati, ensofalopati, laktik asidoz | 3243 tRNA ^{Leu} , 11084 ND4, 3271 tRNA ^{Leu} |
| MERRF (Miyoklonik epilepsi, ragged red fibriller) | Miyoklonik epilepsi, miyopati | 8344 tRNA ^{Lys} , 8356 tRNA ^{Lys} |
| NARP (Nöropati, ataksia, retinitis pigmentosa) | Nöropati, ataksi, retinitis pigmentosa | 8993 ATP ^{az6} |
| Pearson sendromu | Pansitopeni, laktik asidoz | Delesyon 8470:13447 |
| LHON (Leberin herediter optik nöropatisi) | Optik nöropati | 11778 ND4, 3460 ND1, 14484 ND6 |
| Leigh sendromu | Progresif beyin hastalığı | 8344 tRNA ^{Lys} 8993 ATP ^{az6} |
| DDM (Sağırılık, Diabetes mellitus) | Diabetes Mellitus ve sağırılık | 3243 tRNA ^{Leu} |

Çeşitli hastalıklarla ilişkilendirilen 100’den fazla mtDNA delesyonu bilinmektedir (50). Birkaç bazdan birkaç kilobaza kadar farklı uzunluklarda olabilen mtDNA delesyonlarının büyük bölümü benzer özellikler göstermektedir. Genellikle O_H ve O_L replikasyon orjinleri arasında ve kısa tekrar dizileri arasında yer alırlar (109,126). Delesyonların, mtDNA’nın replikasyonu sırasında ve oksidatif hasar sonucu tek veya çift zincir DNA kırıkları sonucunda oluştuğu düşünülmektedir (62,70).

4977 bç uzunluğundaki delesyon, yüksek insidansı nedeniyle *yaygın delesyon* (mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu, common deletion) olarak adlandırılmaktadır. Bu delesyon, mtDNA'da 8470-8482 ve 13447-13459 nükleotidler arasında 13 bç uzunluğundaki tekrar dizilerinde bir kırılma ile ortaya çıkar (50, 59, 143). Delesyona uğrayan mtDNA bölgesi, 5 tRNA geni ile sitokrom c oksidaz, kompleks I ve ATPaz altünitelerini kodlayan 7 geni içermektedir (143).

4977 bç uzunluğundaki delesyon, Pearson Sendromu, Oküler miyopatiler, Kronik Progresiv Eksternal Oftalmopleji (CPEO) ve Kearns Sayre Sendromu (KSS) gibi çeşitli patolojik fenotiplerle ilişkilendirilmiş ve yaşlanma ile birikim gösterdiği bulunmuştur (20, 50, 109). mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunun, kolorektal, mide, karaciğer, böbrek, akciğer ve prostat kanserindeki solunum defektine katkıda bulunduğu ve tümör progresyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (130, 143).

2.6 REAKTİF OKSİJEN ÜRÜNLERİ

Oksijen yaşam için vazgeçilmez bir elementtir fakat bazı durumlarda insan vücuduna ciddi zararlı etkilerde bulunabilir (53). Oksijen potansiyel zararlı etkilerini diğer maddelere oksijen verme yatkınlığı olan ROÜ oluşturarak gösterir. ROÜ'nün birçoğu serbest radikaldir (65). Tablo V'te önemli reaktif oksijen ürünleri gösterilmektedir.

Dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren reaktivitesi yüksek molekül gruplarına **radikal** adı verilmektedir. Molekülün kimyasal simgesinin sağ üst köşesine konan nokta veya çizgiyle (R[•], R⁻) gösterilir. Serbest radikaller kovalent bağların homolitik kırılması, nötral bir molekülün elektron kaybetmesi veya nötral bir moleküle elektron transferi reaksiyonlarından oluşan başlıca üç mekanizma ile oluşur (58).

Tablo V: Önemli reaktif oksijen ürünleri (65).

| Serbest radikal olanlar | Radikal olmayanlar |
|--|--|
| Hidroksil (OH [•]) | Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂) |
| Süperoksit (O ₂ ^{•-}) | Singlet oksit (¹ O ₂) |
| Nitrik oksit (NO [•]) | Hipoklorid (HOCl) |
| Lipid hidroperoksil (LOO [•]) | Ozon (O ₃) |

2.6.1 ROÜ kaynakları

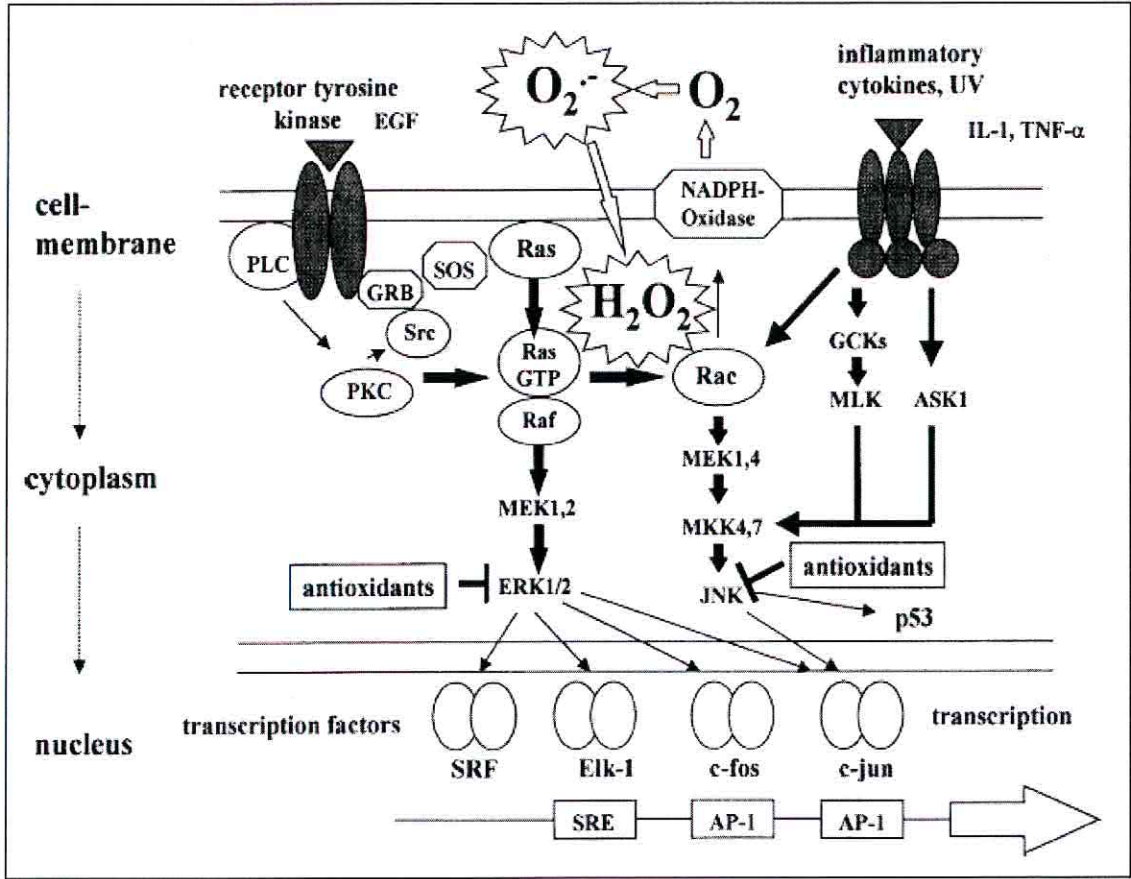
Serbest radikaller ve diğer ROÜ normal metabolik olaylar sırasında endojen olarak veya X-ışınları, ozon, sigara içimi, kemoterapotikler, ultraviöle ışınlar ve endüstriyel kimyasallara maruziyet sonucu ekzojen olarak üretilir (65, 105).

Aerobik hücrelerde serbest radikal üretiminin en önemli kısmını mitokondriyal ETZ ve ER oluşturur (81). Hücredeki oksijenin %90'dan fazlası mitokondride tüketilir ve tüketilen oksijenin yaklaşık %2'si süperoksit oluşumu ile sonuçlanır. Buradaki radikal yapımının nedeni ETZ'de bulunan kompleks I ve kompleks III'ten elektron kaçağı olmasıdır (76). Hiperbarik oksijen tedavisi, iskemi-reperfüzyon sendromu, yaşlanma gibi patolojik durumlar ve oksidatif fosforilasyonu bozan uncoupler ajanlar ROÜ üretimini artırır. ER'deki NADPH-sitokrom P450 redüktaz enzimi süperoksit oluşumuna yol açar (81).

Araşidonik asit kaskadının aktivasyonu, aktive nötrofil ve makrofaj gibi fagositik hücreler, hipoksantin/ksantin oksidaz, lipooksijenaz ve siklooksijenaz, gama-glutamil transpeptidaz, endojen bileşiklerin otooksidasyon olayları, ksantin oksidaz ve NADPH oksidaz gibi oksidan enzim reaksiyonları da serbest radikaller ve ROÜ üretimine yol açar (25, 65, 81, 105).

2.6.2 ROÜ'nün etkileri

Düşük konsantrasyonlardaki ROÜ hücre proliferasyonunda, embriyonik gelişimde, patojenler için savunma mekanizması olarak ve diğer hücresel fonksiyonların düzenlenmesinde sinyal molekülü olarak görev yapmaktadır (51, 76, 130). ROÜ spesifik reseptörler ile direkt etkileşerek veya protein kinaz, protein fosfataz ve transkripsiyon faktörlerini içeren sinyal yollarını etkileyerek sinyal iletiminde rol alır. Bunun yanı sıra, sinyal yollarında Ca⁺² ile birlikte hareket ederek hücre siklus durması ile hücre ölümü ve hücre proliferasyonu arasındaki dengenin düzenlenmesinde rol oynar. Oksitleyici ve indirgeyici eşdeğerlikliler ROÜ'nün hücre proliferasyon ve diferansiyasyon kontrolünde ikinci mesajcı olarak fonksiyon göstermesine olanak sağlar (105). Şekil 10'da sinyal molekülü olarak ROÜ'nün sinyal iletim kaskadı ile ilişkisi gösterilmektedir.



Şekil 10: Sinyal molekülü olarak ROÜ'nin sinyal iletim kaskadı ile ilişkisi (105).

Yüksek konsantrasyondaki ROÜ hücre bileşenlerinden DNA, RNA, proteinler, aminoasitler, karbonhidratlar ve lipitlerde hasara yol açar (25, 76). ROÜ, DNA üzerinde tek ve çift zincir kırıkları ile modifiye pürin ve pirimidinleri içeren birçok lezyona yol açarak hasar oluşturur. Serbest radikaller, nokta mutasyonu ve delesyon gibi çeşitli DNA sekans değişikliklerine yol açarak bazı protoonkogenler ve tümör süpresör genleri aktive edebilmektedir (81). Protein oksidasyonu, proteinlerin ROÜ veya oksidatif stres ürünleri ile kovalent modifikasyonu sonucu oluşur. Protein oksidasyonu sonucunda protein fonksiyonlarında ve proteaz inhibitör aktivitelerinde kayıp ve enzim aktivitesinde azalma oluşabilmektedir (118). Membrandaki fosfolipitlerin yapısında bulunan yağ asidlerinin doymamış bağları, serbest radikallerle kolayca reaksiyona girerek peroksidasyon ürünleri oluştururlar (25) Uzun süreli düşük seviyelerde ROÜ'ye maruziyet de hücre bileşenlerine hasar vererek yaşlanma ve apoptozis süreçlerini başlatabilmektedir (105).

2.6.3 Antioksidan Savunma Mekanizmaları

Serbest radikalleri metabolize eden, serbest radikal oluşumunu önleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran maddelere **antioksidan maddeler** denilmektedir (108). Serbest radikallere ve diğer ROÜ'ye karşı enzimatik ve nonenzimatik birçok savunma mekanizması mevcuttur. Savunma sistemleri, farklı oksidan ajanlar üzerinde veya farklı hücrel kompartmanlarda etki göstermeleri ile çeşitlilik gösterir (65).

Süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimlerini içeren primer savunma mekanizması, ROÜ'yü etkisiz hale getirerek oksidan hasarın oluşmasını önler. SOD, yüksek reaktivite gösteren süperoksit radikalini H_2O_2 'ye çevirir, CAT ve GPx ise H_2O_2 'yi uzaklaştırarak etki gösterir (65, 81).

Askorbik asit (vitamin C), α -tokoferol (vitamin E), glutatyon (GSH), β -karoten, vitamin A, ürat ve NADPH'ı içeren sekonder savunma mekanizmaları ise serbest radikallerin oksidan hasar yapıcı etkisini azaltıcı yönde etki gösterir (65, 81).

2.7 mtDNA ve OKSİDATİF STRES

Solunum zinciri komplekslerinden kompleks I ve kompleks III, ROÜ'nün büyük kısmının üretildiği bölgelerdir (107). ROÜ, mitokondride protein, lipid, RNA ve DNA'yı içeren makromoleküllerde oksidatif hasar oluşturmaktadır (55, 76).

Oksidatif DNA hasarı pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlara, abazik alanlara, tek ve çift zincir kırıklarına neden olmaktadır (70, 78). Farklı ROÜ, DNA'yı değişik şekillerde etkilerler. Bilinen en reaktif molekül olan ($^{\bullet}OH$) radikali (37) bütün bazlarla reaksiyona girebilirken, (1O_2) radikali seçici olarak guanine saldırır (134).

mtDNA'da oksidatif modifiye baz düzeyi, nükleer DNA'dan daha yüksek bulunmuştur (146). Modifiye bazlar arasında en sık görülen timin glikol'ün replikasyonu ve transkripsiyonu bloke edici etkisi bulunmaktadır. En sık görülen pürin lezyonu ise 8-oxodeoksiganin (8-oxodG)'dir. Oksidatif stres altında okside deoksiganin nükleotidi (8-OHdG), nDNA'dan daha hızlı oranda artarak birikir. 8-OHdG, DNA'da adenin ile, replikasyon sırasında sitozin ile birleşir ve transversiyon mutasyonlarına yol açar. (11, 55, 134). ROÜ'nün mitokondriyal iç membranda yüksek

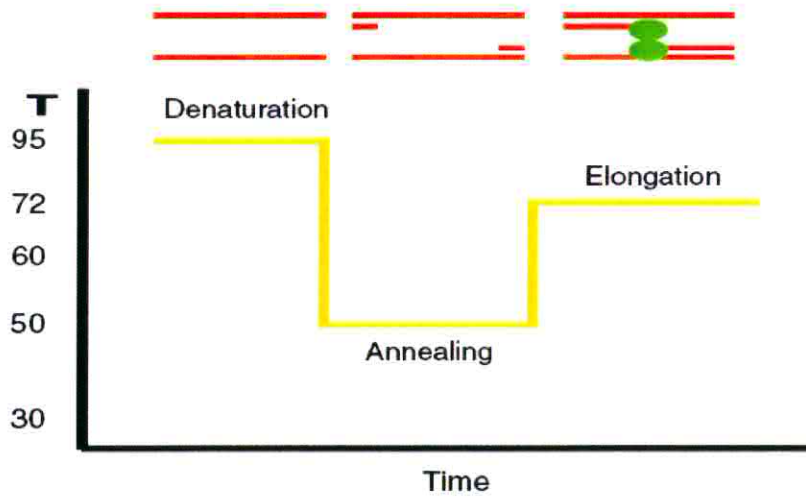
miktarda oluşması ve mtDNA'nın iç membrana yakın yerleşimli olması mtDNA mutasyonlarının yüksek oranda görülmesindeki en önemli faktörlerden biridir (146).

Kanser, diyabet, ateroskleroz, kronik inflamatuvar olaylar, karaciğer hastalıkları, iskemik hasarlar ve nörodejeneratif hastalıkları içeren çeşitli patolojiler, ROÜ oluşumundaki artış sonucu olarak gelişen mitokondriyal fonksiyon bozukluğu ile ilişkilidir. mtDNA oksidatif hasar için kritik bir hedeftir ve mtDNA hasarı elektron transportu, mitokondriyal membran potansiyeli ve ATP oluşumunda bozulma yoluyla hücre zedelenmesine yol açar (129).

2.8 POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU

2.8.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

PCR, DNA içerisinde yer alan, baz dizisi bilinen iki segment arasındaki özgün bir gen bölgesini in vitro koşullarda enzimatik olarak amplifiye etmek için uygulanan tepkimelere verilen ortak bir isimdir. Bu uygulama için ilgili gen bölgesine ait baz dizisinin bilinmesi gereklidir. Metod basitçe tüp içerisinde nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanır. PCR reaksiyonu; 94°C–98°C aralığında gerçekleştirilen **denatürasyon**, 37°C–65°C aralığında gerçekleştirilen **annealing** ve 72°C'de gerçekleştirilen **elongasyon** aşamalarından oluşur ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanması esasına dayanır. Dr. Kary B. Mullis 1980'li yıllarda yaptığı PCR çalışmaları ile 1993 yılında Kimya alanında Nobel ödülü almıştır (95). Şekil 11'de PCR aşamaları gösterilmektedir.



Şekil 11: PCR aşamaları (63)

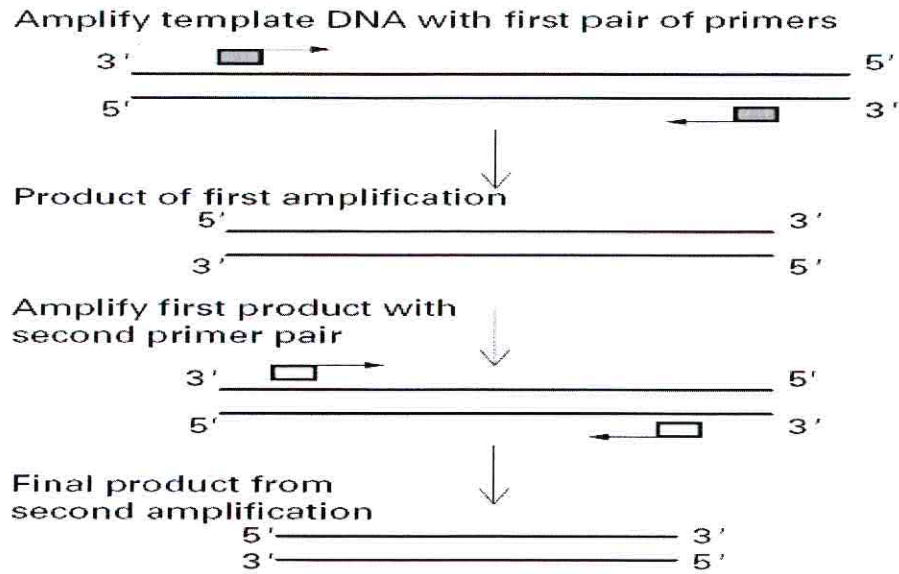
2.8.2 PCR Çeşitleri

Moleküler çalışmalarda kullanılan amaca yönelik birden fazla PCR çeşidi bulunmaktadır. Çalışılan DNA kaynağına ve hedef DNA bölgesine göre farklı yöntemler tercih edilebilir. Başlıca PCR çeşitleri;

- Kantitatif real time PCR (QPCR)
- Multipleks PCR
- Nested PCR
- Touchdown PCR
- Reverse Transkriptaz PCR (RT-PCR)
- Hot Start PCR
- Long PCR
- Inverse PCR (9, 26, 52)

2.8.2.1 Nested PCR

İki çift primerin kullanıldığı iki aşamalı amplifikasyon yöntemidir. İlk aşamada iki adet dış primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzunca bir bölgenin amplifikasyonu yapılır (15-30 siklus). İkinci aşamada ise ilk amplifikasyonda elde edilen ürün, iç primerler için kalıp görevi görür ve daha kısa ikinci bir ürün elde edilir. Şekil 12’de Nested PCR prensibi gösterilmiştir. PCR’ın sensitivitesi ve spesifitesi Nested PCR yöntemi ile artırılabilir. Nested PCR yönteminde iki farklı primer çifti kullanılması reaksiyonun spesifikliğini arttırmaktadır. Örnekte tek kopya DNA olduğu durumlarda bile iki aşamalı olarak yapılan amplifikasyonlarla çok sayıda DNA elde edilebilmektedir. Böylece amplifikasyon sonucu oluşan fazla miktardaki hedef molekül yalancı negatiflik olmadan kolayca ölçülebilmektedir. Bu yöntemle pozitif sonuç alma olasılığı arttığı için testin sensitivitesi de artmaktadır (9, 26).



Şekil 12: Nested PCR prensibi (9)

2.8.2.2 Touchdown PCR

Touchdown-PCR (TD-PCR) optimal primer bağlanma derecesini saptamak amacıyla geliştirilmiş bir yöntemdir (26). TD-PCR'da optimizasyon, kullanılan tamponlar ve siklik şartlardan ziyade, annealing ısısı üzerine odaklanarak gerçekleştirilmektedir (91). Amplifikasyonun ilk siklusunda annealing ısısı olarak hesaplanan erime derecesinin (T_m) yaklaşık 15°C üzerinden başlanmakta ve takip eden sikluslar arasında $1-2^{\circ}\text{C}$ düşürülerek T_m derecesinin yaklaşık 5°C üzerine kadar gelmektedir. İlk sikluslarda düşük miktarda fakat oldukça spesifik amplifikasyon gerçekleşirken, düşük annealing ısısındaki sikluslarda oluşan ürün miktarı artmaktadır. Böylece hedef bölgeye spesifik ampikonlar elde edilir (26, 44).

TD-PCR, birbirlerinden farklı T_m derecelerine sahip primer sekanslarının bulunduğu durumlarda spesifik ürün eldesi için kullanılabilir. TD-PCR, düşük annealing ısılarında oluşabilen yalancı yapışmaların ve yüksek annealing ısılarında gözlenebilen ürün yokluğunun üstesinden gelebilecek ve spesifik ürünlerin elde edilebileceği etkili bir tekniktir (91).

2.8.2.3 Long PCR (XL-PCR)

Long PCR, genellikle 2 farklı DNA polimerazın kullanıldığı, konvansiyonel PCR yöntemlerine göre çok daha uzun hedef bölgelerinin (örneğin 5 kb'dan büyük) çoğaltıldığı PCR temelli amplifikasyon yöntemidir. DNA polimerazlardan biri yüksek

processivity'e (5'-3' polimeraz aktivitesi), diğeri ise proofreading (3'-5' ekzonükleaz aktivitesi) yeteneğine sahiptir (140)

Bazı DNA lezyon tipleri PCR amplifikasyonu sırasında DNA polimerazı bloke ederek ilerlemesini engeller. DNA lezyonu olan örneklerde, PCR amplifikasyon veriminin düşmesi sonucu lezyonsuz DNA'ya oranla ürün miktarında azalma görülmektedir. DNA zincir kırıkları, abazik bölgeler, büyük eklentiler (bulky adduct) ve bazı baz modifikasyonları DNA polimerazı bloke eden lezyonlar olarak sayılabilir (66, 94, 101). Gen spesifik olması ve uzun fragmentleri (~25 kb) tarayabilme imkanından dolayı XL-PCR ile DNA lezyon analizi yapılmaktadır. XL-PCR DNA hasar ölçümünde kullanılan Southern Blotlama, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) gibi diğer metodlara oranla oldukça sensitif bir metoddur ve çok düşük düzeylerdeki (1 lezyon/ 10^5 b) lezyonlar XL-PCR ile tespit edilebilmektedir (104).

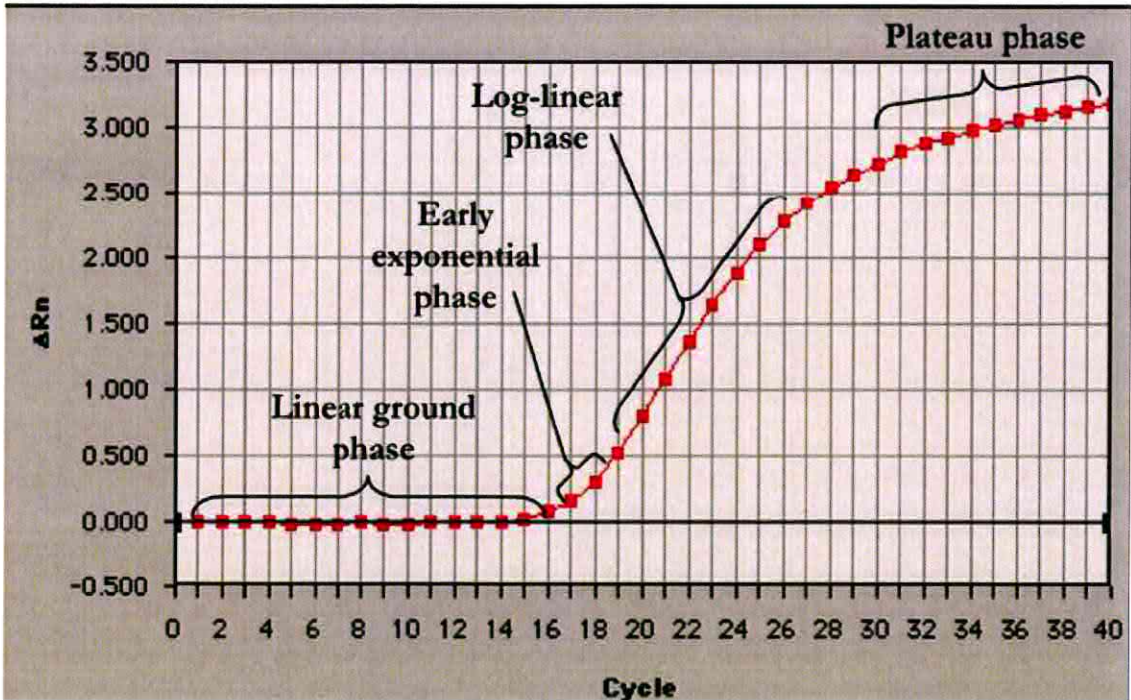
2.8.2.4 Kantitatif Real-Time PCR (QPCR)

QPCR, PCR amplifikasyonunu görülür hale getirme ve monitörize etme olanağı veren, floresan işaretli probalar veya şelat edici boyaların kullanıldığı, floresansın çoğaltılan DNA (amplikon) ile doğru orantılı olduğu, online izlenebilen bir çoğaltma yöntemidir. Bu teknoloji kinetik PCR veya homojen PCR gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (39). Ürünün çoğalması floresan sinyalinde artışa neden olduğundan, her siklusta artan DNA miktarı reaksiyon süresince hassas olarak ölçülür. Real-time PCR'da konvansiyonel PCR'dan farklı olarak, ürünlerin analizi sikluslar sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi ve DNA bantlarının ultraviyole ışık altında görüntülenmesi gibi ek işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time kantitatif PCR, oluşan amplikonların erime derecelerini (T_m) de belirleme olanağı veren bir yöntemdir. Tüm reaksiyonun eş zamanlı kontrolü, T_m 'in değerlendirilebilmesi, standart eğrinin hesaplanabilmesi ve internal kalite kontrolün kullanılabilmesi önemli avantajlarıdır. Bu da tekrarlanabilirliğe ve kantitatif sonuçların elde edilmesine olanak vermektedir (127).

Kantitatif real-time PCR sırasında amplifikasyon farklı evreler meydana getirir. Bunlar; başlangıç fazı, erken eksponansiyel faz, logaritmik faz ve plato fazıdır. Başlangıç fazında ürün oluşmakta, ancak floresans background seviyesinin altında kalmaktadır. Baseline floresans değeri bu aşamada hesaplanır. Erken eksponansiyel

fazda floresans miktarı bir eşik değere ulaşarak background seviyesinin üzerine çıkar. Baseline değerini aşan ilk siklus 'crossing point (CP)' veya 'cycle threshold (Ct)' olarak adlandırılır. CP değerleri başlangıç DNA miktarını temsil etmektedir ve sonuçların hesaplanmasında kullanılır. Logaritmik fazda PCR optimal amplifikasyon periyoduna girmektedir ve ideal reaksiyon koşullarında ürün miktarı her PCR siklusunda ikiye katlanmaktadır. Plato fazı ise reaksiyon bileşenlerinin (primer, taq polimeraz vs.) tükendiği ve ortamdaki inhibitör maddelerin varlığından dolayı DNA veya floresan miktarında anlamlı artışın olmadığı evredir (35, 135). (Şekil 13)

PCR reaksiyonu sırasında hedef bölgenin amplifikasyonunu yansıtan floresan emisyonundaki artış dedektör sistemi ile eş zamanlı okunur. Bilgisayarın software programı $\Delta R_n = R_n^+ - R_n^-$ eşitliğini kullanarak ΔR_n değerini hesaplamaktadır. R_n^+ , ürünün floresan emisyonunu, R_n^- ise baseline bölgesindeki floresan emisyonunu ifade etmektedir. Software programı PCR amplifikasyonu sırasında hesaplanan floresans emisyon verilerini toplayarak ΔR_n değerleri siklus numarasına karşı gelecek şekilde amplifikasyon eğrisi çizer. PCR amplifikasyonunun erken sikluslarında ΔR_n değeri baseline değerini aşamaz (36, 45).



Şekil 13: PCR amplifikasyonunda başlangıç, erken eksponansiyel, logaritmik ve plato fazları (135).

QPCR sıklıkla biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme amacıyla kullanılmaktadır (63).

2.8.2.4.1 QPCR Cihazları

Birçok araştırma ve tanı laboratuvarında QPCR ölçümü için kullanılan çeşitli cihazlar mevcuttur. Bu cihazlar birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıklar ve hızları ile ayrılırlar. Bugün için yaygın olarak kullanımda olan sistemler: Applied Biosystems 7300 ve 7500 cihazları, Bioneer Exicycler cihazı, Roche LightCycler 480 cihazı, Stratagene Mx3000p, Mx3005p, Mx4000 cihazları, Eppendorf RealPlex cihazı, Cepheid SmartCycler cihazı ve BioRad Chromo4 ve i-cycler cihazlarıdır (63, 127).

2.8.2.4.2 QPCR'da Kullanılan Metotlar

Real-time PCR'da kullanılan floresan ölçüm metotları spesifik ve spesifik olmayan metotlar olarak iki başlık altında incelenebilir (14). Şekil 14'te QPCR'da kullanılan metotlardan bazılarının prensibi gösterilmektedir (128).

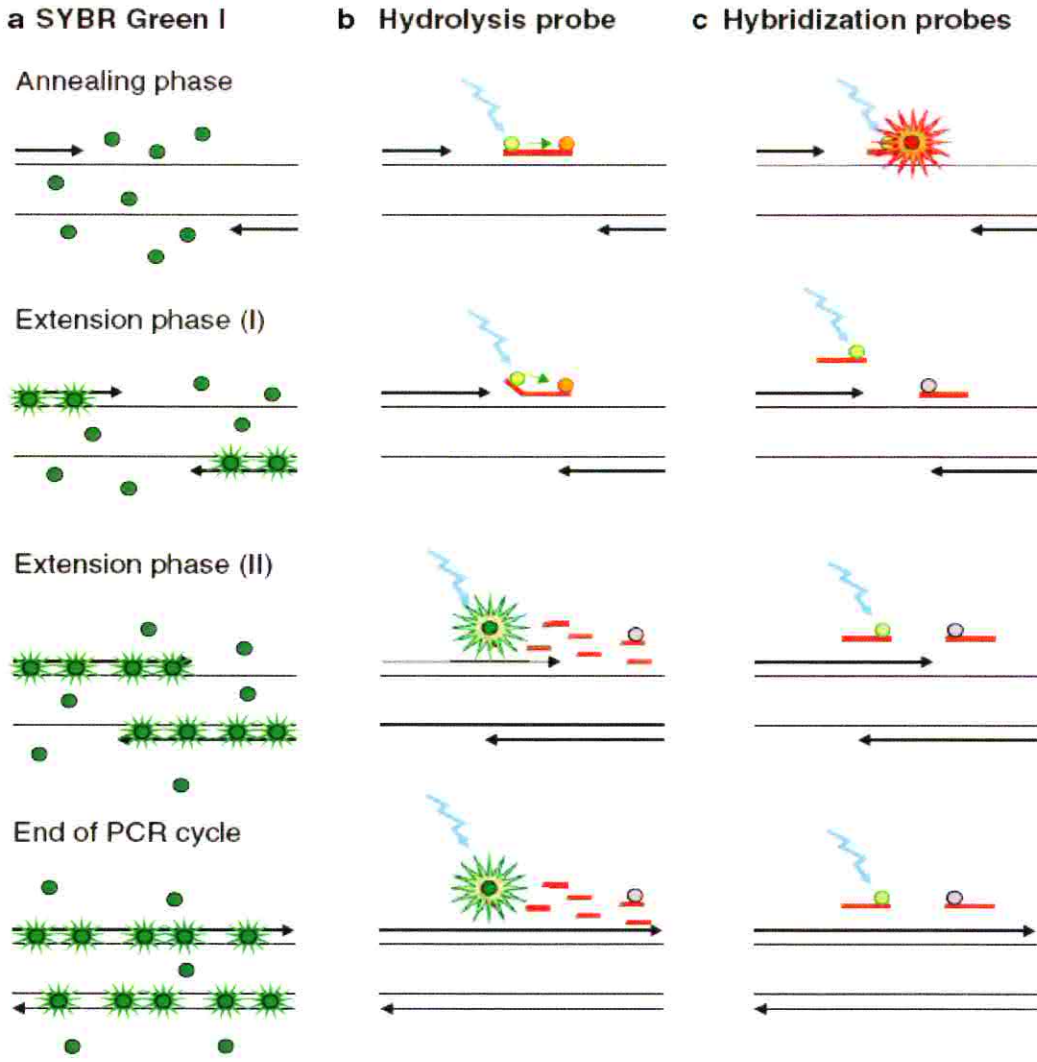
2.5.2.4.2.1 Spesifik olmayan metotlar

Spesifik olmayan metotlar her PCR ölçümü için sentez ve dizayn gerektirmeyen ve çift zincirli DNA'ya bağlanarak floresans veren boyaların kullanıldığı metotlardır. Günümüzde en sık SYBR Green boyası kullanılmaktadır. Bu yöntem optimize edilmiş PCR şartlarında ve dizaynı iyi yapılmış primerler ile çok fazla sayıda hedef genin çoğaltılmasına olanak verir. Floresan işaretli problara ihtiyaç göstermediği için maliyeti ucuzdur. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları da vardır. İstenmeyen PCR ürünlerinin çoğalması sonucu açığa çıkan floresan yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Ortamda hedef DNA dizisi olmadığında primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda "primer dimer"leri olarak adlandırılan çift zincirli DNA bölgelerinin oluşumu ile floresan ışımaya gözlenebilir. Çoğaltılan DNA'nın istenilen hedef bölge olup olmadığını anlayabilmek için DNA'ların erime eğrisi analizleri (melting curve) yapılması gerekmektedir (14, 128).

2.8.2.4.2.2 Spesifik metotlar

Spesifik metotlar her PCR ölçümü için bir veya daha fazla floresans probun sentez ve dizaynını gerektirir ve FRET teknolojisinin kullanıldığı tekniklerdir. Spesifik

metodlarda, TaqMan veya hidroliz probları, moleküler beacon problar, Scorpions probları ve hibridizasyon probları gibi prob sistemleri kullanılır (14, 30).



Şekil 14: QPCR’da kullanılan metot prensipleri (128)

“TaqMan® probe” yöntemi çoğaltılmak istenilen DNA bölgesine komplementer olan ve floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob içerir. Floresan işaretli probun 5' ucunda “fluorophore” (6-karboksifloresin=6-FAM) ve 3' ucunda “quencher” (6-karboksitetrametil-rodamin= TAMRA) bulunur. 3' uçtaki baskılayıcı TAMRA boyası 5' uçtaki FAM boyasının sinyal oluşturmasını engellemektedir. Sinyal oluşabilmesi için öncelikle DNA üzerinde primerlerin bağlanma bölgeleri arasında probun bağlanması ve sonrasında Taq DNA polimeraz enziminin 5'→3 ekzonükleaz aktivitesi ile FAM'ı probdan ayırması gerekmektedir. Serbest hale geçen FAM sinyal oluşturur. Her bir döngüde ürün çoğaldıkça floresan da ona bağlı olarak artmaya devam eder (30, 128).

Hibridizasyon prob sisteminde floresan işaretli iki farklı prob bulunmaktadır. Donör prob 3' ucunda floresans isaretli boya, akseptör (alıcı) prob ise 5' ucunda akseptör boya içermektedir. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine bağlanıp birbirine yaklaştığında donör boyadan akseptör boyaya enerji yayılımı olur. Enerjinin birinci floresan boyadan ikinci floresan boyaya transferi FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) olarak adlandırılır. Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresan sinyal miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak artar (17, 30).

2.8.2.4.3 Primer-Prob Dizaynı

İyi düzenlenmiş primerler ve problemler doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon sağlanabilir ve genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilirler. Primer ve problemlerin düzenlenmesi için hazırlanmış çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır. Primer ve prob dizaynında dikkat edilecek başlıca noktalar şunlardır.

1. Tm dereceleri, primer için 58-60°C, prob için 68-70°C olmalı.
2. G-C içerikleri % 30-80 aralığında olmalı.
3. Primerler 15-30 baz uzunluğunda olmalı.
4. Primerin 3' ucundaki son 5 nükleotitdeki total G-C içeriği 2'yi aşmamalı.
5. Maksimum ampikon büyüklüğü 400 bp'i aşmamalı (ideali 50-150 bp).
6. Problemler ardışık benzer nükleotit içermemeli (özellikle 4 veya daha fazla G).
7. Problemlerdeki % 30-80 aralığındaki G-C içeriğinde C, G'den fazla olmalı.
8. Problemlerin 5' ucunda G olmamalı (9, 28, 47)

2.8.2.4.4 Sonuçların Yorumlanması

PCR amplifikasyonunda oluşan ürün başlangıçtaki DNA miktarına bağlıdır. rn PCR siklusları ile plato fazına ulaşıncaya kadar eksponansiyel olarak artış gösterir. PCR rnleri her bir siklusta tam olarak iki katına ulaşamazlar. Her siklus sonucunda meydana gelen ürün miktarı:

$$P = T(1+E)^n \text{ formülü ile hesaplanır}$$

P : rn (Product),

n : Siklus sayısı,

T : Başlangıçtaki DNA sayısı (Template),

E : PCR verimliliği (Efficiency) (99)

Başlangıçtaki DNA miktarını kantite etmek için farklı yaklaşımlar mevcuttur. Bu yaklaşımlar absolü ve relatif kantitasyon olarak iki ana başlık altında incelenir.

2.8.2.4.4.1 Absolü Kantitasyon

Absolü kantitasyonda standart eğri kullanılarak başlangıç kopya sayısı tespit edilir. Bu metotda, konsantrasyonları bilinen standardın seri dilüsyonları hazırlanır. Standart eğri, standart dilüsyonlarının amplifikasyonu sonrası, her bir dilüsyonun oluşturduğu CP değerlerine karşı başlangıç kopya sayısının logaritması ile oluşturulur. Bu standart eğride, bilinmeyen numunenin CP değeri karşılaştırılarak başlangıç kopya sayısı tespit edilir. Standart eğri en az dört nokta içermelidir (15, 97). Standart olarak ilgili genin klonlandığı plazmid, genomik DNA, cDNA, in vitro transkriptler ya da total RNA gibi çeşitli kaynaklar kullanılmaktadır (15, 97).

2.8.2.4.4.2 Relatif Kantitasyon

Gen ekspresyonununun relatif kantitasyonu, farklı dokulardaki spesifik genlerin ekspresyon düzeyleri arasındaki farklılıkları belirlemeye izin verir. Bu farklılık, absolü kantitasyonda olduğu gibi bir değer olarak değil, kalibratör olarak da adlandırılan bir referans numunenin n-katı şeklinde ifade edilir.

Real-time PCR kantifikasyonunda hedef numunenin başlangıç miktarındaki kk farklılıklar, amplifikasyon ürününe katlanarak yansır. Bu durum özellikle farklı bireylerden alınan örneklerle başlanan reaksiyonlarda izlenir. Bir internal kontrol kullanılarak bu başlangıç farklılıklarını standardize etmek ve elde edilen sonucun

normalizasyonu bu yüzden çok faydalıdır. İdeal bir internal kontrol deneysel koşullardan etkilenmeden eksprese olabilmelidir. Bu amaçla kullanılan 'housekeeping gen'ler ökaryotlarda çok çeşitli olmakla birlikte en sık kullanılanları Gliseraldehit 3-fosfat dehidrogenaz (GAPDH), β -actin, siklofilin ve 28S rRNA'dır. Bu genler referans gen olarak da isimlendirilmektedir (148).

Relatif kantitasyonda relatif standart eğri ve komparatif CP olarak iki farklı metot kullanılır.

2.8.2.4.4.2.1 Relatif Standart Eğri Metodu

Bu metotta, hedef bölgeyi içeren stok cDNA, RNA veya DNA'nın dilüsyonu ile elde edilen standart eğri ve kalibratör kullanılır. Kalibratör, sonuçların karşılaştırılması amacıyla kullanılan bir numunedir. Örneğin, bir ilacın gen ekspresyonu üzerine olan etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, ilaç uygulanmamış kontrol grubu uygun bir kalibratör olarak seçilebilir. Numunelerin kantite edilen değerleri, kalibratör değerine bölünerek relatif ekspresyon değerine ulaşılır ve kalibratörün n-katı şeklinde ifade edilir (5, 135). Hem ekzojen standard hazırlığı hem de kompleks matematiksel işlem gerektirmemesi nedeniyle kolay bir metottur ve genellikle hedef gen amplikasyon verimliliği ile referans gen amplikasyon verimliliğinin eşit olmadığı durumlarda kullanılır (135).

2.8.2.4.4.2.2 Komparatif CP Metodu

$\Delta\Delta CP$ metodu olarak da isimlendirilen bu metod da, standart eğri metoduna benzer ama konsantrasyonların yerine CP değerleri kullanılır. Hedef genin CP değeri bir referans genin CP değerine oranlanarak normalize edilir. Daha sonra normalize CP değerleri seçilen bir kalibratöre oranlanarak sonuçlar kalibratörün n-katı şeklinde verilir.

Komparatif CP metodu, $2^{-\Delta\Delta CP}$ formülü ile ifade edilir. Burada:

$$\Delta\Delta CP = \Delta CP_{(hedef)} - \Delta CP_{(kalibratör)}$$

$$\Delta CP_{(hedef)} = CP_{(hedef)} - CP_{(referans)}$$

$$\Delta CP_{(kalibratör)} = CP_{(kalibratör)} - CP_{(referans)}$$

Karşılaştırmalı CP metodunun uygulanabilirliği validasyon (relatif verimlilik) çalışması ile değerlendirilir. Hedef ve referans genlerin seri dilüsyonları ile elde edilen farklı başlangıç konsantrasyonlarının ΔCP değerinin değişmemesi yani logaritmik konsantrasyona karşı ΔCP grafiğinde slope değerinin sıfıra yakın ($< 0,1$) olması gerekir.

Hatalı sonuçları önlemek için hedef genin amplikasyon verimliliği ile referans genin amplikasyon verimliliğinin yaklaşık eşit olması gereklidir (128,135).

2.8.2.4.5 QPCR'ın Avantajları

1. Konvansiyonel PCR “plato fazında” yani end-point ölçüm yaparken, real time PCR “ekponansiyel büyüme fazında” ölçüm yapmaktadır.
2. Floresan sinyalin gücü doğrudan çoğaltılan ürün miktarı ile orantılıdır.
3. Konvansiyonel ölçümlerden 1000 kat daha az nükleik asit ile çalışılabilmektedir.
4. PCR sonrası elektroforez gerektirmez.
5. Hızlıdır (< 1 saat).
6. Kontaminasyon riski düşüktür.
7. Sensitivitesi yüksektir.
8. Tekrarlanabilirliği iyidir
9. Sonuçlar kantite edilebilir.
10. Melting Curve analizi ile spesifik amplifikasyon doğrulanabilir (47).

3. GEREÇ – YÖNTEM

3.1 KULLANILAN ARAÇ VE GEREÇLER:

1. Santrifüj MSE, MISTRAL 3000I, seri no: 5691/02/075, U.K.
2. Santrifüj Jouan, C4i, seri no: 30411037, France
3. Mikropipetler (Sealpette Jencons 0.5-10, Treff Lab 20- 200, 100-1000, Genex Beta 10-100, 50, 2-20, Dialab 200-1000, Rainin Pipet-plus R 20, Socorex 50-200, Eppendorff 20, 100, 200, 1000, Germany).
4. Mikrosantrifüj SIGMA 3K30, seri no: 76262, USA
5. Mikrosantrifüj Jouan A-14, seri no: 39903105, France
6. 1,5 ml nükleaz içermeyen eppendorff (Cat No.616201 Grenier Bio-one, USA)
7. 0,2 ml PCR tüp (Cat No.683201 Grenier Bio-one, USA)
8. Derin dondurucu -70°C, NUAIRE, Seri no: 9394248, USA
9. Derin dondurucu -80°C, NUAIRE, Seri no: Z17N-205195-ZN, USA
10. Benmari ASTEL, TIP J18 BAIN UNIVERSAL, N seri: 3940517, Jouan, France
11. Benmari Termal Lab. Aletleri, seri no: 821911, Türkiye
12. Vorteks VM3, Windaus, 3392, Germany
13. LightCycler 480 II, seri no: 28218, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
14. Laminar-flow (Bilser, Seri no: 6087, Ankara, Türkiye)
15. Laminar-flow (Nuair, Model no: Nu-425-400E, seri no: 116026070307, USA)
16. LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, 04729692001 white, lot: 09016400, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
17. Ultrasonic Cleaner, seri no: 030607, Germany
18. Spektrofotometre, IMPLN NanoPhotometer, Seri no: 1271,U.K.
19. pH metre, Microprocessor pH meter EDT Instruments RE 357, 702 U.K.
20. Elektronik terazi (Chyo Balanced Corporation, JL-180, seri no: 300258, Japan)
21. Cellstar Tissue Culture Flask (25 cm²) kırmızı kapaklı Cat No.690175 Grenier bio-one, Austria
22. Cellstar 96 well Cell Culture Plate, Cat no.655 180 Grenier bio-one, Austria
23. 10 µl (cat. no. 765288), 20 µl (cat. no.774288) 100 µl (cat. no.772288), 200 µl, 1000 µl (cat. no.740288) pipet uçları, steril, Grenier bio-one, Austria
24. 10 µl pipet ucu, steril, Neptune BT10XL, lot: 56522 Mexico
25. CO₂ inkübatör, Sanyo MCO-17AIC, seri no: 00605796, Japan

26. Invert mikroskop, Nikon eclipse TS100, seri no: 0101743, Japan
27. Real Time Cell Analiz sistemi-RTCA-SP (xCELLigence System monitors) Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany
28. GenAmp 9700 Thermal Cycler cihazı, cat. no.235034083, Applied Biosystems, California USA
29. Thermo PX2 Thermal Cycle seri no: HBPX2220 U.S.A.
30. Arçelik MD 554 mikrodalga fırın, seri no: 0300472807, Çin
31. Consort E702 elektroforez güç kaynağı, S/N 42568, Belgium
32. Minicell EC370M elektroforez tankı
33. Herolab UVT-20M Transluminatör cat: 296500, seri no: 970406500, Germany
34. Avegene life science LIAS ChemX AG-LA200/400F imaj analiz sistemi
35. Synergy Microplate Reader Biotek Instruments SN 233513 U.S.A.

3.2 KULLANILAN KİMYASALLAR

1. 2-Deoxy-D-glucose, 1 G, % 99 crystalline, MA:164.16 g/mol, Sigma, D6134, USA
2. Medium: DMEM, Biological Industries, Lot: 01-050-1A, with 1 g/L D-glucose, with Na Piruvat, without L-Glutamin, Israel
3. Ouabain octahydrate 1 G, Sigma, Cat. No. O3125, MA: 728.8, %95 powder, USA
4. L-Glutamin, 200 mM, Biological Industries, Cat: 0.3-0.20-1C, Lot: 567256, Israel
5. Fetal Bovine Serum, Heat inactivated, Sterile filtered, insect cell culture tested 500 ml, Cat No: F7678 Sigma Aldrich, USA
6. Tripsin-EDTA (%0.25 Tripsin, %0.02 EDTA) Cat No; 03052-1B Lot 733055 Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
7. 10.000 Penisilin/10 mg Streptomisin 100X Cat No; P0781, 100 ml, Sigma-Aldrich, USA
8. Dimethylsulfoxid (DMSO) (MERCK-Schuchardt, Cat. No: 802912, Germany)
9. PBS (Phosphat Buffer Salin), 10 mM, pH 7.4
 - NaCl, 136 mM (Merck, Cat. No: 6400) MW: 58,44 Germany
 - KCl, 2.7 mM (Merck, Cat. No: 4935) MW: 74,56 Germany
 - Na₂HPO₄, 10 mM (Merck, Cat. No: 6586) MW: 141,96 Germany
 - KH₂PO₄, 10 mM (Merck, Cat. No: 4871) MW: 136,09 Germany
10. Isopropanol (Merck, Cat. No: 995) Germany

11. pH 4, pH 7, pH 10 kalibratörler (Orion Application Solution 910104, 910107, 910110 CAS Reg. No 7732-18-5, GmBh)
12. Normal melting temperature (NMP) Agaroz Sigma, A-0169, USA
13. Ethidium bromide E8751 ~95% (HPLC) MA: 394.31 Sigma-Aldrich, USA
14. pUC Mix Marker 8 SM0303 50 µg 0.1 µg/µl Fermentas
15. Lambda DNA/EcoRI+HindIII SM0191 250(5x50)µg 0.5µg/µl Fermentas
16. 1 ml 6X DNA Loading Dye Fermentas
17. High-pure PCR Template Preparation Kit (Cat. No. 11 796 828 001, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
18. High-pure PCR Product Purification kit (Cat. No. 1 732 676, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
19. Expand Long Range, dNTPack (Cat. No. 04 829 042 001, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
20. LightCycler 480 Probe Master (Cat. No. 04 707 494 001 Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
21. Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits 10 × 100 µL P11495 Invitrogen
22. LightCycler® Control Kit DNA (Cat. No. 12158833001, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany)
23. TBE 5x TBE, pH 8,2
 - 450 mM Tris Baz (MA 121,4 g) 54,513 g Sigma T-1503, lot: 80H5634 USA
 - 450 mM Borik Asid (MA 61,83 g) 27,823 g Merck 160 Germany
 - 10 mM EDTA 20 ml 0,5 M EDTA(pH 8) (MA 292.24 g) 2.92 g Pancreac 131026, Barcelona, Espana
24. Human Beta Globin forward-reverse (19/20 b) primer çifti (Sentez No: 370999/371000, Alpha DNA, Montreal, Canada 10 µM)
25. Human Beta Globin LNA Taqman probe seti (UPL17, Cat.No.04686900001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
26. Human ND1 Standart forward (19 b) primer (Sentez No:370994 Alpha DNA, Montreal, Canada 10 µM)
27. Human ND1 Standart reverse (23 b) primer (Product No.1191952 TIB MOLBIOL Berlin, Germany 10 µM)

28. Human ND1 forward (19 b) primer (Product No.1191950 TIB MOLBIOL Berlin, Germany 10 µM)
29. Human ND1 reverse (19 b) primer (Sentez No:370996 Alpha DNA, Montreal, Canada 10 µM)
30. Human ND1 Taqman Probu (UPL51, Cat.No.04688481001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
31. Human mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart forward-reverse (21/23 b) primer çifti (Sentez No: 370978/370979 Alpha DNA, Montreal, Canada 10 µM)
32. Human mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon forward-reverse (24/20 b) primer çifti (Product No.1154159/1154160 TIB MOLBIOL Berlin, Germany 10 µM)
33. Human mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Taqman Probu (Product No.1154158 TIB MOLBIOL Berlin, Germany)
34. Human mtDNA Uzun Fragment forward-reverse (24/26 b) primer çifti (Sentez No: 370982/370983 Alpha DNA, Montreal, Canada 10 µM)
35. Human mtDNA Uzun Fragment Kantitasyon forward-reverse (21/23 b) primer çifti (Product No.1191951/1191952 TIB MOLBIOL Berlin, Germany 10 µM)
36. Human mtDNA Uzun Fragment Kantitasyon Taqman Probu (UPL5, Cat.No.04685024001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)

3.3 HepG2 HÜCRE KÜLTÜRÜ

HepG2 hücreleri, insan hepatoselüler karsinom hücreleridir. Çoğalması adheren özellik taşır. Epitelyal morfoloji gösterir. Doubling time 48 saattir. Pasaj17 HepG2 hücreleri Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü'nden Prof. Dr. Mithat Bozdayı'dan temin edildi. Hücreler aşağıda verilen protokole göre pasajlandı.

3.3.1 Hücre Kültür solüsyonları

1) DMEM Medyum pH; 7.4

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Lot: 01-050-1A
- 1 g/L D-glucose ve Na Piruvat içerir, L-Glutamin içermez
- Likit, kullanıma hazır, 2-8 °C'de son kullanım tarihine kadar saklanabilir.

2) Fetal Bovin Serum (FBS)

- Sigma Aldrich, 500 ml, USA
- Katalog No: F7678

- Isı ile inaktive edilmiş, steril filtre edilmiştir. Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml aliqoutlanarak -70 °C'de saklanır.

3) L-Glutamin 200 mM, 20 ml

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Katalog No: 03-022-1C, Lot: 567256
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 2'şer ml aliqoutlanarak -70 °C'de saklanır.

4) Tripsin-EDTA (% 0,25 tripsin, % 0,02 EDTA) 100 ml

- Biological Industries Kibbutz Beit Haemek 25115 ISRAEL
- Katalog No: 03052-1B
- Stok solüsyon 15 ml'lik falkon tüplere 10'ar ml aliqoutlanarak -70 °C'de saklanır.

5) 10.000 ü PENİSİLİN/10 mg STREPTOMİSİN, 100X stok

- Sigma-Aldrich, 100 ml, USA
- Katalog No: P0781
- 15 ml'lik falkon tüplere 5'er ml olacak şekilde aliqoutlanarak -70 °C'ye kaldırılır

6) Fosfat Buffer Salin (PBS) 10 mM pH;7.4 1 L

Tablo VI: PBS solüsyon hazırlığı, 1 L

| Madde | Miktar | Firma |
|--|--------|------------------------------------|
| NaCl 136 mM | 8 g | Merck, cat. no.6400, S-12, Germany |
| KCl, 2.7 mM | 0.2 g | Merck, cat. no 4935, P-11, Germany |
| Na ₂ HPO ₄ , 10 mM | 1.44 g | Merck, cat. no 6586, S-7a, Germany |
| KH ₂ PO ₄ , 10 mM | 1.36 g | Merck, A997671 851, P-3, Germany |
| dH ₂ O | 800 ml | |

- 8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.44 g Na₂HPO₄, 1.36 g KH₂PO₄ tartılarak 800 ml dH₂O ile çözünmesi sağlanır.
- pH 7.4'e ayarlanarak dH₂O ile 1 litreye tamamlanır.
- 0.22 µm'lik filtre ile filtre edilir. Sterilizasyon için otoklava gönderilir. 2-8°C'de saklanır.

7) Hücre Kültür Komplek Medyum Hazırlığı

- FBS, -70 °C'den 37 °C'ye alınarak çözülmesi sağlanır.
- Penisilin/streptomisin 100X stok solüsyonu, -70 °C'den oda ısısına alınarak çözülmesi sağlanır.
- L-Glutamin 200 mM, -70 °C'den oda ısısına alınarak çözülmesi sağlanır.
- 100 ml komplek DMEM medyum hazırlanması için tablo VII'deki miktarlardaki solüsyonlar laminer flow kabininde steril şartlarda karıştırılır.
- 0,22 µm'lik filtre ile steril cam şişeye filtre edilip 3 tane 50 mL'lik falkon tüpe konular ve ışıktan koruyarak 2-8 °C'de saklanır.

Tablo VII: Komplek DMEM Medyum Hazırlığı, 100 ml

| | Volüm | Final konsantrasyon |
|-----------------------------|-------|---------------------|
| FBS | 10 ml | % 10 |
| Penisilin/streptomisin 100x | 1 ml | 1x |
| L-Glutamin 200 mM | 2 ml | % 2 (4 mM) |
| DMEM | 87 ml | |

8) DMEM Freeze-Medyum Hazırlığı, 10 ml

- DMEM komplek medyum benmaride 37 °C'ye getirilir.
- Kültür şartlarında, hücreler dondurulmadan önce % 10 DMSO olacak şekilde DMSO eklenir.
- Freeze-medyum sadece dondurulacak hücreler için kullanılır.
- Taze hazırlanmalıdır.

Tablo VIII: Freeze medyum, 10 ml

| | Volüm | Final konsantrasyonu |
|---------------------|-------|----------------------|
| DMEM Komplek Medyum | 9 ml | % 90 |
| DMSO | 1 ml | % 10 |

3.3.2 Hücre Kültür Protokolleri

3.3.2.1 -80 °C'de dondurularak saklanan hücrelerin çözülmesi

- -80 °C'den çıkarılan hücreler hızla çözülmesi için 37 °C'ye getirilmiş benmariye koyulur.
- Çözöldükten sonra 600 xg'de, 37 °C'de 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılıp üzerine ~2-3 ml DMEM komplet medyum eklenir ve karıştırılır.
- Hücreler pasteur pipeti ile flaska pipetlenir ve üzerine DMEM komplet medyum eklenerek 5 ml'ye tamamlanır.
- CO₂ inkübatöre kaldırılır.

3.3.2.2 HepG2 hücrelerinin pasajlanması

- Flasktaki hücreler % 70-80 konflüent olduğunda pasajlama yapılır.
- Flasktaki komplet medyum uzaklaştırılır.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml steril PBS alınarak flaska aktarılır ve hücreler yıkanır.
- PBS uzaklaştırılır.
- Pasteur pipeti ile yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin-EDTA flaska ilave edilir ve 3 dk süreyle CO₂ inkübatörde bekletilir.
- Mikroskopta hücrelerin ayrılması izlendikten sonra pasteur pipeti ile Tripsin-EDTA'nın üzerine ~ 3-4 ml komplet medyum ilave edilir ve karıştırılır.
- Komplet medyum ve hücreler 15 ml'lik falkon tüpte toplanır.
- 600 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılarak 5 ml komplet medyum ile resüspanse edilir.
- 4 flaska ~1'er ml dağıtılır ve komplet DMEM ile 5 ml'ye tamamlanır.
- CO₂ inkübatöre alınır.
- Medium değiştirme haftada 2 ya da 3 kez yapılır.

3.3.2.3 HepG2 hücrelerinin dondurulması

- Flaskın mediumu uzaklaştırılır.
- Pasteur pipeti ile ~ 2-3 ml PBS eklenerek yıkanır.
- Pasteur pipeti ile yüzeyi kaplayacak kadar Tripsin-EDTA eklenerek 3 dk CO₂ inkübatörde bekletilir.

- Mikroskopta hücre ayrılması izlendikten sonra ~2-3 ml komplet DMEM medyum eklenerek hücreler 15 ml'lik falkon tüpte toplanır.
- 600 xg'de, oda ısısında 5 dk santrifüj edilir.
- Süpernatant atılıp üzerine 5 ml freeze-medium eklenir.
- 1'er ml aliqoutlanarak -80 °C'de saklanır.

3.3.3 Hücre Kültür Gruplarının Medyum Hazırlığı (İlaçlı grupların medyumları)

- **10 mM 2-DG İçeren Komplet DMEM Medyum Hazırlama: 10 ml**
(2-DG MA: 164.16 g/mol)
16.416 mg 2-DG tartılır ve 10 ml komplet DMEM medyum içerisinde çözülür ve filtre edilir.
16 ml hazırlamak için 26,27 mg tartılır.
- **2x 10 mM 2-DG solüsyonu hazırlama:**
52.55 mg 2-DG tartılıp 16 ml komplet DMEM medyum içinde çözülür.
- **750 nM Oubain İçeren Komplet DMEM Medyum Hazırlama: 2 ml**
(Ouabain MA: 728.77 g/mol, suda çözünürlük 10 mg/ml)
10 mg ouabain tartılır 1 ml dH₂O ile çözülür.
0.1093 µl volümü almak zor olduğu için 100 kat dilüsyon yapılır.
Komplet DMEM ile 100 kat dilüe edilir (10 µl ouabain+990 µl DMEM).
Buradan 10.93 µl alınıp 2 ml komplet DMEM içine konursa 750 nM oubain içeren komplet DMEM hazırlanmış olur.
- **2x750 nM Oubain İçeren Komplet DMEM Medyum Hazırlama: 2 ml**
21.86 µl alınıp 2 ml komplet DMEM içine konur.
- **75, 7.5 ve 0.75 nM Oubain İçeren Komplet DMEM Medyum Hazırlama: 2 ml**
Hazırlanmış olan 750 nM oubain içeren komplet DMEM'den 10'ar kat dilüsyonla hazırlanır.

3.3.4 Çalışma Gruplarının İçerikleri

- 1) Komplet medyum
- 2) 10 mM 2-deoksiglukoz içeren komplet medyum
- 3) 750 nM ouabain içeren komplet medyum
- 4) 75 nM ouabain içeren komplet medyum
- 5) 7.5 nM ouabain içeren komplet medyum
- 6) 0.75 nM ouabain içeren komplet medyum
- 7) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 750 nM ouabain
- 8) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 75 nM ouabain
- 9) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 7.5 nM ouabain
- 10) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 0.75 nM ouabain

3.3.5 HepG2 hücrelerinde optimal hücre sayısının belirlenmesi

- Real Time Cell Analysis-Single Plate (RTCA-SP) cihazının 96 kuyucuklu E-pleyptindeki kuyucuklara 100 µl komplet medyum pipetlenip 15 dakika CO₂ inkübatörde bekletilerek background okuma yapılır.
- Hücreler flasktan kaldırılır ve hücre sayımı yapılır.
- Hücreler 80000 hücre/100 µl olacak şekilde komplet medyumla resüspanse edilir.
- E-pleyptteki ilk kuyucuğa 80000 hücre/100 µl hücre içeren süspansiyondan 100 µl eklenir.
- 80000 hücre/200 µl hücre içeren ilk kuyucuktan 100 µl ikinci kuyucuğa aktarıldığında ilk kuyucukta 40000 hücre kalır ve devam eden seri dilüsyonlarla sırasıyla 20000, 10000, 5000, 2500 hücre/kuyucuk ekim yapılmış olur. Son kuyucuktan da 100 µl atılarak 1250 hücre/kuyucuk elde edilir.
- Total hacmin 200 µl olması için tüm kuyucuklara tekrar 100 µl komplet medyum ilave edilir.
- Üç tekrarlı çalışılır.
- 24 saat monitör izlemesi yapılır.
- İlaç uygulamadan önce hücreleri logaritmik artış fazında yakalamak için gereken en uygun hücre sayısı 5000-10000 hücre/kuyucuk olarak belirlendi.

3.3.6 HepG2 hücrelerine çalışma medyumlarının uygulanması

3.3.6.1 Hücrelerin 96 kuyucuklu pleyte ekilmesi

- % 70-80 konfluent olan HepG2 kültür hücrelerine ait flasttaki medyum boşaltılır.
- Pasteur pipeti ile ~2-3 ml steril PBS alınarak flaska aktarılır ve hücreler yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırılır.
- Flaska yüzeyi kaplayacak kadar tripsin-EDTA (% 0.25-% 0.02) konulur.
- 3 dakika CO₂ inkübatörde bekletilir.
- Hücrelerin ayrıştığı mikroskop altında görülür.
- Üzerine yaklaşık 5 ml komplet DMEM medyum konulur.
- Pasteur pipeti ile birkaç kez al/ver yapılarak karıştırılır. Sonrasında kan sayım cihazında hücre sayımı yapılır.
- 96'lık pleyte her bir kuyucuğa 5000 hücre/200 µl olacak şekilde DMEM-hücre karışımı otomatik pipetle dağıtılır.
- %70 konflüent olana kadar (~24 saat) 37°C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edilir.

3.3.6.2 HepG2 hücre DNA izolatları için hücre ekimi

Yukarıda anlatılan hücre ekimi sonucu % 70 konflüent olan hücrelerin medyumundan 100 µL multikanal pipetle uzaklaştırılıp her bir kuyucuğa pleyt dizaynında gösterildiği gibi (Tablo IX), 2x ilaç içeren komplet DMEM medyumlar 100 µL/kuyucuk pipetlendi. Kontrol grubu içeren kuyulara ise normal komplet medyum 100 µL/kuyucuk pipetlendi ve 24 saat boyunca 37 °C'de CO₂ inkübatöründe inkübe edildi. Çalışmada aynı gruptan 4'er kuyu birleştirilerek çift numune elde edildi. Hücrelerden DNA izolasyonu yapıldı. DNA izolatları için pleyt dizaynı aşağıda gösterilmiştir.

Tablo IX: HepG2 hücre DNA izolatları için pleyt dizaynı

| | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|--|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | | |

- 1) Komplet medyum
- 2) 10 mM 2-deoksiglukoz
- 3) 750 nM ouabain içeren komplet medyum
- 4) 75 nM ouabain içeren komplet medyum
- 5) 7.5 nM ouabain içeren komplet medyum
- 6) 0.75 nM ouabain içeren komplet medyum
- 7) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 750 nM ouabain
- 8) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 75 nM ouabain
- 9) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 7.5 nM ouabain
- 10) 10 mM 2-deoksiglukoz ve 0.75 nM ouabain

3.4 DNA İZOLASYONU

DNA izolasyonu için High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) kullanıldı.

3.4.1 İzolasyon Kiti İçeriği ve Solüsyonlarının Hazırlanması

1. Tissue Lysis Buffer: Kullanıma hazır. 20 ml şişe, 4 M ürea, 200 mM Tris, 20 mM NaCl, 200 mM EDTA içermektedir. [pH: 7.4 (25°C)].
2. Binding Buffer: Kullanıma hazır. 6 M guanidin-HCl, 10 mM üre, 10 mM tris-HCl, % 20 Triton X-100 (v/v) içermektedir [pH: 4.4 (25°C)].
3. Proteinaz K: 90 mg liyofilizat içeren şişe içine 4,5 mL distile su ilave edildi ve tam olarak çözünene kadar beklendi. Daha sonra proteinaz K solüsyonu 300 µL'lik aliquotlara ayrıldı. -70 °C'de saklandı.
4. Inhibitor Removal Buffer: 33 mL'lik şişe içerisine 20 mL absolü etanol eklenerek hazırlandı. 5 mM guanidine-HCl, 20 mM Tris-HCl içermektedir [pH:6.6 (25°C)].
5. Wash Buffer (yıkama solüsyonu): 20 mL'lik şişe içerisine 80 mL etanol eklenerek hazırlandı. 20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl içermektedir. [pH: 7.5 (25°C)].
6. Elution Buffer: Kullanıma hazır. 40 ml'lik şişe, 10 mM Tris içermektedir. [pH: 8.5 (25°C)].

3.4.2 Numune materyali

- 10⁶ kültüre pasaj 17 HepG2 hücreleri kullanıldı

3.4.3 DNA izolasyon protokolü

- Medyumları uzaklaştırılan pleyte 150 µl/kuyu 37 C⁰'de bekletilen PBS elektronik dispensır ile eklenip tüm kuyucuklar bir kez yıkanır.
- Multikanal pipet ile PBS uzaklaştırılıp 50 µl/kuyu Tripsin ile hücreler kaldırılır.
- 100 µl komplet medyum/kuyu ile reaksiyon durdurulup 4 kuyu birleştirilerek bir ependorfa toplanır.
- 1000 g'de 5 dakika santrifüj edilip süpernatant atılır ve aşağıdaki protokol uygulanır.

Tablo X: DNA izolasyon protokolü

| | High Pure DNA izolasyon protokolü |
|-----|--|
| 1. | Hücrelerin üzerine 200 µL Tissue Lysis Buffer ve 40 µL Proteinaz K ilave edilerek karıştırılır. |
| 2. | 55°C'ye getirilmiş benmaride 1 saat inkübe edilir |
| 3. | 200 µL binding buffer ilave edilir ve karıştırılır. |
| 4. | 72°C'ye getirilmiş benmaride 10 dakika inkübe edilir. |
| 5. | 100 µL izopropanol eklenerek karıştırılır. |
| 6. | Numuneyi High Pure filtreli tüpe transfer etmek için: High filtreli tüp, toplayıcı tüpe yerleştirilir. Numunenin tamamı filtreli tüpe pipetlenir (maksimum 700 µl) |
| 7. | Numuneler oda sıcaklığında, 1 dakika 8000 g'de santrifüj edilir. |
| 8. | Santrifüj sonrası toplayıcı tüp atılır ve filtreli tüp yeni kolektör tüpe yerleştirilir. |
| 9. | Filtreli tüpe 500 µl inhibitor removal buffer pipetlenir ve oda sıcaklığında, 1 dakika, 8000 g'de santrifüj edilir. |
| 10. | Santrifüj sonrası toplayıcı tüp atılır ve filtreli tüp yeni kolektör tüpe yerleştirilir. |
| 11. | Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer pipetlenir ve oda sıcaklığında, 1 dakika 8000 g'de santrifüj edilir. |
| 12. | Santrifüj sonrası toplayıcı tüp atılır ve filtreli tüp yeni kolektör tüpe yerleştirilir. |
| 13. | Filtreli tüpe 500 µl Wash Buffer pipetlenir ve oda sıcaklığında, 1 dakika 8000 g'de santrifüj edilir. |
| 14. | Numuneler oda sıcaklığında, 10 saniye 14000g'de santrifüj edilir. |

| | |
|-----|---|
| 15. | Toplayıcı tüp atılarak filtrelü tüp temiz, steril 1,5 ml'lik mikro-santrifüj tüpüne yerleştirilir. |
| 16. | DNA' yı elüe etmek için: Filtrelü tüpe daha önceden 70 °C'ye ısıtılmış 200 µL elüsyon buffer pipetlenir. Oda sıcaklığında 1 dakika, 8000 g'de santrifüj edilir. |
| 17. | Mikrosantrifüj tüpte biriken elüe DNA'dır. Elüe edilen DNA'lar -80° C'ye kaldırılır. |

3.5 DNA KANTİTASYONU

DNA izolasyonu sonrası numunelerin DNA miktarı Picogreen boyası ile Synergy Micro-plate Reader cihazında floresans ölçüm yapılarak bulundu.

3.5.1 Picogreen ile DNA kantitasyon protokolü

- 20X TE buffer: 200 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, pH 7.5, 1X olarak dilüe edilir ve oda ısısında saklanır.
- 100 µg/mL Lambda (λ) DNA 1X TE buffer ile istenilen konsantrasyonlarda dilüe edilir ve standartlar oluşturulur.
- PicoGreen reagent içeren solüsyon hazırlığı: 1/200 dilüsyon yapılır. Işıktan korunur. Plastik bir kap içerisinde taze olarak hazırlanmalıdır.
 - ❖ Cam kapta hazırlanmamalıdır, cam yüzeyler reagent'ı absorblayabilir.
- 95 µL 1X TE Buffer siyah multiwell pleyte dağıtılır.
- 5 µL standart /numune multiwell pleyte pipetlenir.
- 100 µL Picogreen reagent (1/200 dilüsyonlu) multiwell pleyte pipetlenerek karıştırılır.
- 10 dakika oda ısısında, ışıktan korunarak inkübe edilir.
- 20 saniye shaking yapıldıktan sonra 485 nm eksitasyon 530 nm emisyon dalga boyunda ölçüm yapılır.
- Reagent blank tüm kuyulardan çıkarıldıktan sonra standart eğri kullanılarak konsantrasyon hesaplanır.

3.6 DNA DİLÜSYONU

Çalışılan numunelerin DNA içeriğini eşitlemek için gerekli dilüsyon oranları Microsoft Office Excel programı kullanılarak hesaplandı. Numuneler ilk olarak 1,5 ng/μl daha sonra 0,15 ng/μl olacak şekilde 1XTE buffer ile 2 aşamada dilüe edildi. Tablo XI’de numune dilüsyonu için gerekli DNA ve 1XTE miktarları verilmektedir.

Tablo XI: Numune dilüsyonu için gerekli DNA ve 1XTE miktarları

| Numune | Kons (ng/μl) | 1,5 ng/μl için gerekli DNA (μl) | 1,5 ng/μl’e getirmek için gerekli 1XTE(μl) | 0,15 ng/μl için gerekli 1,5 ng/μl DNA(μl) | 0,15 ng/μl’e getirmek için gerekli 1XTE(μl) |
|---------|--------------|---------------------------------|--|---|---|
| 24.1.1 | 3,104 | 19,3 | 20,7 | 5,00 | 45,00 |
| 24.1.2 | 5,527 | 10,9 | 29,1 | 5,00 | 45,00 |
| 24.2.1 | 2,336 | 25,7 | 14,3 | 5,00 | 45,00 |
| 24.2.2 | 0,855 | ---- | ---- | 8,77 | 41,23 |
| 24.3.1 | 2,419 | 24,8 | 15,2 | 5,00 | 45,00 |
| 24.3.2 | 2,128 | 28,2 | 11,8 | 5,00 | 45,00 |
| 24.4.1 | 4,129 | 14,5 | 25,5 | 5,00 | 45,00 |
| 24.4.2 | 1,09 | ---- | ---- | 6,88 | 43,12 |
| 24.5.1 | 4,17 | 14,4 | 25,6 | 5,00 | 45,00 |
| 24.5.2 | 5,153 | 11,6 | 28,4 | 5,00 | 45,00 |
| 24.6.1 | 4,288 | 14,0 | 26,0 | 5,00 | 45,00 |
| 24.6.2 | 6,025 | 10,0 | 30,0 | 5,00 | 45,00 |
| 24.7.1 | 1,367 | ---- | ---- | 5,49 | 44,51 |
| 24.7.2 | 0,931 | ---- | ---- | 8,06 | 41,94 |
| 24.8.1 | 3,547 | 16,9 | 23,1 | 5,00 | 45,00 |
| 24.8.2 | 3,381 | 17,7 | 22,3 | 5,00 | 45,00 |
| 24.9.1 | 3,741 | 16,0 | 24,0 | 5,00 | 45,00 |
| 24.9.2 | 3,7 | 16,2 | 23,8 | 5,00 | 45,00 |
| 24.10.1 | 2,737 | 21,9 | 18,1 | 5,00 | 45,00 |
| 24.10.2 | 2,723 | 22,0 | 18,0 | 5,00 | 45,00 |

3.7 KANTİTATİF REAL-TİME PCR METODUNUN UYGULANMASI

3.7.1 Biyoinformatik Analiz

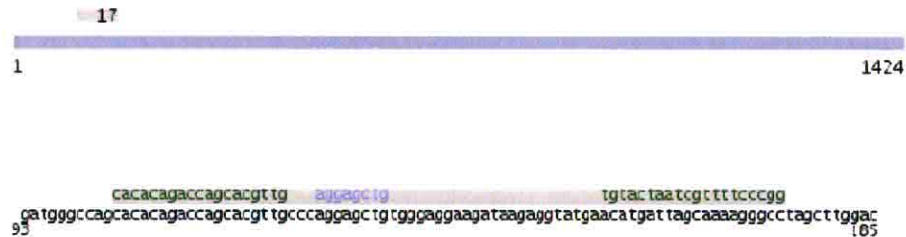
3.7.1.1 Beta Globin Primerleri ve Probenin Belirlenmesi

Numunelerdeki nükleer genom sayısının belirlenmesi için 11. kromozomda bulunan Beta-globin geni kullanıldı. Beta-globin geninin primer-prob dizaynı Roche Universal Probe Library (UPL) programı (48) kullanılarak yapıldı. BLAT (BLAST-Like Alignment Tool) (UCSC Genome Bioinformatics; <http://genome.ucsc.edu/FAQ/FAQblat.html>) ve BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (NCBI; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Şekil 15'te Beta globin primer-prob dizaynı görülmektedir.

Use probe #17 (cat. no. 04686900001)

| Primer | Length | Position | Tm | %GC | Sequence |
|--|--------|-----------|----|-----|-----------------------|
| Left | 19 | 103 - 121 | 59 | 58 | cacacagaccagcagcttg |
| Right | 20 | 156 - 175 | 59 | 45 | ggcccttttgctaatacatgt |
| Amplicon (73 nt) | | | | | |
| cacacagaccagcagcttgccaggagctgtgggaggaagataagaggtatgaacatgattagcaaaagggcc | | | | | |

This assay has: **All criteria met.**



Şekil 15: Beta globin primer-prob dizaynı

Beta globin UPL prob 17 (aggagctg)

3.7.1.2 ND1 Standart Primerlerinin Belirlenmesi

Numunelerdeki mtDNA kopya sayılarının belirlenmesi için nadiren delesyona uğrayan ND1 bölgesi seçildi (42). LightCycler Probe Design Software 2.0 programı kullanılarak 8169 bç uzunluğunda amplicon oluşturan ND1 standart primerleri belirlendi. BLAT ve BLAST analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Tablo XII'de 8169 bç'lik ND1 standart primerleri görülmektedir.

Tablo XII: 8169 bç'lik ND1 standart primerleri

| Forward Primer | 5' Pozisyon | 3' Pozisyon | Uzunluk |
|-------------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| CTACCATCACCTCTACAT | 3504 | 3522 | 19 |
| Reverse Primer | 5' Pozisyon | 3' Pozisyon | Uzunluk |
| TTGGATGAGAATGGCTGTTACTA | 11672 | 11650 | 23 |

3.7.1.3 ND1 Primerlerinin Belirlenmesi

Bu çalışmada, LightCycler Probe Design Software 2.0 programı kullanılarak 8169 bç'lik ND1 standart ampikonu içinde 255 bç'lik ampikon oluşturan primerler dizayn edildi. BLAT ve BLAST analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Tablo XIII'de ND1 primerleri görülmektedir.

Tablo XIII: ND1 primerleri

| Forward Primer | 5' Pozisyon | 3' Pozisyon | Uzunluk |
|-----------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| AGCCGTTTACTCAATCCTC | 3639 | 3657 | 19 |
| Reverse Primer | 5' Pozisyon | 3' Pozisyon | Uzunluk |
| GTTCGGTTGGTCTCTGCTA | 3893 | 3875 | 19 |

3.7.1.4 ND1 Probunun Belirlenmesi

255 bç'lik ND1 ampikonunun kantitasyonunu sağlayacak UPL probe 51 (ctctctgcc) Roche Universal Probe Library (UPL) programı kullanılarak dizayn edildi.

3.7.1.5 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart Primerlerinin Belirlenmesi

LightCycler Probe Design Software 2.0 programı kullanılarak 427 bç uzunluğunda ampikon oluşturan mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standart primerleri belirlendi. BLAT ve BLAST analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Tablo XIV'de 427 bç mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standart primerleri görülmektedir.

Tablo XIV: 427 bç mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standart primerleri

| Forward Primer | 5' Pozisyon | 3' Pozisyon | Uzunluk |
|-------------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| GAACCAACACCTCTTTACAGT | 8344 | 8363 | 21 |
| Reverse Primer | 5' Pozisyon | 3' Pozisyon | Uzunluk |
| TGTTAGTAATGAGAAATCCTGCG | 13748 | 13726 | 23 |

3.7.1.6 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Primerlerinin Belirlenmesi

Chuanzhong Ye ve arkadaşları tarafından dizayn edilen 126 bç uzunluğunda amplikon oluşturan primerler mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon primerleri olarak seçildi (143). BLAT ve BLAST analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Tablo XV’de 126 bç mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon primerleri görülmektedir.

Tablo XV: 126 bç mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon primerleri

| Forward Primer | 5’ Pozisyon | 3’ Pozisyon | Uzunluk |
|--------------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| CTAAATACTACCGTATGGCCCACC | 8376 | 8399 | 24 |
| Reverse Primer | 5’ Pozisyon | 3’ Pozisyon | Uzunluk |
| CTGCTAATGCTAGGCTGCCA | 13479 | 13458 | 20 |

3.7.1.7 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Probuunun Belirlenmesi

Heike Koch ve arkadaşları tarafından dizayn edilen Taqman prob mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon probu olarak seçildi (59). BLAT ve BLAST analizleri ile doğruluğu teyit edildi. Tablo XVI’de mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon probu görülmektedir.

Tablo XVI: mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon probu

| Taqman Prob | 5’Pozisyon | 3’Pozisyon | Uzunluk |
|---|-------------------|-------------------|----------------|
| 5’-fam- ACACAAACTACCACCTACCTCCCTCACCA -tamra-3’ | 8455 | 8483 | 29 |

3.7.1.8 mtDNA Uzun Fragment Primerlerinin Belirlenmesi

8843 bç uzunluğunda amplikon oluşturan mtDNA Uzun Fragment Primerleri Janine H. Santos ve arkadaşlarına ait makaleden seçildi (104). BLAT ve BLAST analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Tablo XVII’de mtDNA uzun fragment primerleri görülmektedir

Tablo XVII: mtDNA Uzun Fragment Primerleri

| Forward Primer | 5’ Pozisyon | 3’ Pozisyon | Uzunluk |
|----------------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| TCTAAGCCTCCTTATTCGAGCCGA | 6000 | 6023 | 24 |
| Reverse Primer | 5’ Pozisyon | 3’ Pozisyon | Uzunluk |
| TTTCATCATGCGGAGATGTTGGATGG | 14826 | 14851 | 26 |

3.7.1.9 mtDNA Uzun Fragment Kantitasyon Primerlerinin Belirlenmesi

mtDNA uzun fragment kantitasyonunu sağlayacak olan primerler, 8843 bç'lik mtDNA ampliconu içinde 85 bç'lik amplicon oluşturacak şekilde LightCycler Probe Design Software 2.0 programı kullanılarak dizayn edildi. BLAT ve BLAST analizleri ile doğrulukları teyit edildi. Tablo XVIII'de mtDNA uzun fragment kantitasyon primerleri görülmektedir.

Tablo XVIII: mtDNA uzun fragment kantitasyon primerleri

| Forward Primer | 5' Pozisyon | 3' Pozisyon | Uzunluk |
|-------------------------|--------------------|--------------------|----------------|
| CCTACGACAAACAGACCTAAA | 11588 | 11608 | 21 |
| Reverse Primer | 5' Pozisyon | 3' Pozisyon | Uzunluk |
| TTGGATGAGAATGGCTGTTACTA | 11672 | 11650 | 23 |

3.7.1.10 mtDNA Uzun Fragment Kantitasyon Probenin Belirlenmesi

85 bç'lik mtDNA ampliconunun kantitasyonunu sağlayacak UPL probe 5 (cagccaca) Roche Universal Probe Library (UPL) programı kullanılarak dizayn edildi.

3.7.2 Numunelerde Beta-globin PCR Çalışılması

- LightCycler® Control Kit DNA kitinde bulunan 15000 pg/μl (5000 kopya/μl) insan genomik DNA'sından, 10 kat seri dilüsyon ile 4 adet standart hazırlandı.
Standart 1: 5000 kopya/μL
Standart 2: 500 kopya /μL
Standart 3: 50 kopya /μL
Standart 4: 5 kopya /μL

PCR'da kullanılan master miks hazırlanması ve PCR programı Tablo XIX'da gösterilmiştir.

Tablo XIX: Beta-globin kantitasyonu için QPCR protokolü

| Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|----------------------------------|--------|-----------------|-------------|
| PCR-grade distile su | 5,8 µL | | |
| Beta-globin Prim _{forw} | 1 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| Beta-globin Prim _{rev} | 1 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| UPL Prob 17 | 0,2 µL | 10 µM | 0,1 µM |
| LC 480 Prob Master | 10 µL | 2X | 1X |
| Standart/DNA template | 2 µL | | |
| Toplam hacim | 20 µL | | |

Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatılarak 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg’de uygun adaptör kullanılarak santrifüj edilmelidir.

Beta-globin için programlar:

| Program adı | Siklus | Analiz modu |
|----------------|--------|---------------|
| Pre-inkübasyon | 1 | None |
| Amplifikasyon | 50 | Kantifikasyon |
| Soğutma | 1 | None |

Sıcaklık Hedefleri:**Pre-inkübasyon**

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| 95 | None | 00:10:00 | 4.4 |

Amplifikasyon

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| 95 | None | 00:00:10 | 4.4 |
| 55 | None | 00:00:15 | 2.2 |
| 72 | Single | 00:00:01 | 4.4 |

Soğutma:

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| 40 | None | 00:00:10 | 1.5 |

3.7.3 mtDNA Standardının Elde Edilmesi

3.7.3.1 ND1 Standart Sekansının PCR ile oğaltılması

PCR Cihazı (Px2 Thermo) ile standart olarak kullanılacak olan 8169 b ND1 ampliconu, ND1 standart primerleri kullanılarak XL-PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Numune olarak 27,5 ng/μL DNA kullanıldı. PCR’da kullanılan master miks ve PCR programı sırasıyla Tablo XX ve Tablo XXI ’de gösterilmiştir.

Tablo XX: ND1 standart PCR master miks hazırlanması

| Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|--|---------|-----------------|-------------|
| Expand Long PCR Buffer (MgCl ₂ içermeyen) | 10 μl | 5 X buffer | 1 X |
| MgCl ₂ | 3,5 μl | 25 mM | 1,75 mM |
| PCR-grade distile su | 24,5 μl | | |
| ND1 std.-Prim _{forw} | 1,5 μl | 10 μM | 0,3 μM |
| ND1 std.-Prim _{rev} | 1,5 μl | 10 μM | 0,3 μM |
| dNTP-Mix (Roche) | 1,75 μl | 10 mM | 350 μM |
| BSA (Bovin Serum Albumine) | 0,25 μl | 20 μg/ μl | 100 ng/ μl |
| Total Volüm | 43 μl | | |

Nazikce karıştırıldıktan sonra 43 μl master miks solüsyonu 0,2 ml’lik PCR tüplerine aktarılır ve üzerine aşağıdaki malzemeler uygulama ısalarına dikkat edilerek sırayla pipetlenir.

| | Uygulama ısısı | Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|----|----------------|------------------|--|-----------------|-------------|
| 1. | 2-8 °C | DNA Template | 2 μl | 27,5 ng/μl | 55 ng/50μl |
| 2. | 2-8 °C | Expand PCR Mix | 43 μl | 10 X | 1X |
| 3. | 75 °C | Expand Enzim mix | 5 μl (0,5 μl enzim+4,5 μl dH ₂ O) | 5 U/μl | 2,5 U/50μl |
| | | Total Volüm | 50 μl | | |

Tablo XXI: ND1 standardı için PCR protokolü

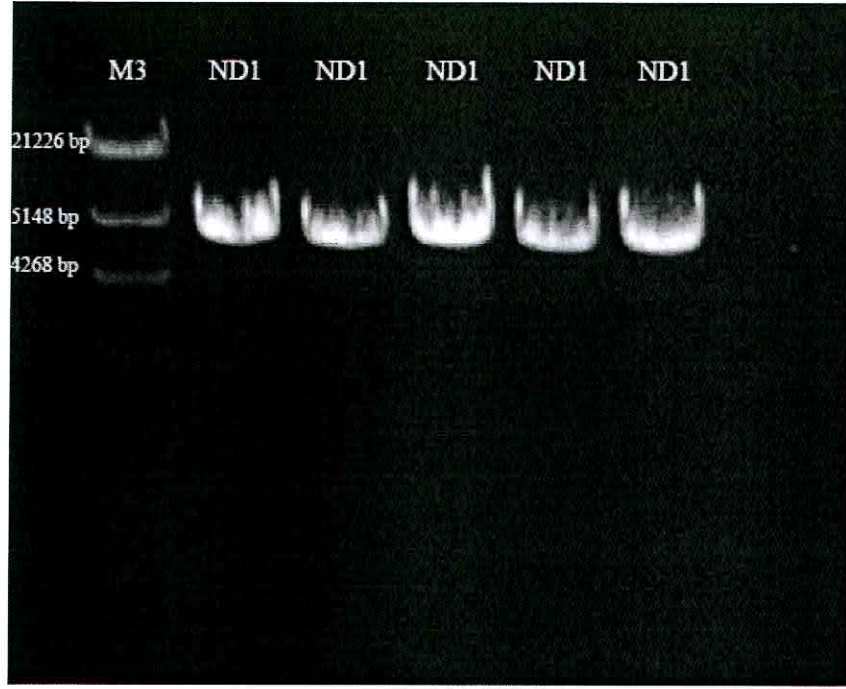
| Evre | Isı | Süre | Siklus |
|-------------------------|------------|-------------|---------------|
| Hot Start | 75 °C | 2 dakika | 1 |
| Başlangıç denatürasyonu | 94 °C | 1 dakika | 1 |
| Denatürasyon | 94 °C | 15 saniye | 25 |
| Annealing | 53 °C | 30 saniye | 25 |
| Elongasyon | 68 °C | 12 dakika | 25 |
| Final Ekstansiyon | 68 °C | 10 dakika | 1 |
| Soğutma | 25 °C | 1 dakika | 1 |

3.7.3.2 ND1 Standardının Agaroz Jelde Görüntülenmesi

8169 bç'lik ND1 standardının elde edilip edilmediğini görmek amacıyla PCR ürünleri 0,7'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

1. Erlenmayerde, 0,28 gr agaroz (Sigma, A-0169), 40 ml TBE buffer (0,5X) içinde çözüldü.
2. Mikrodalga fırında 400 watt'ta bir taşım kaynatıldı.
3. Çözünen agaroz üzerine 3 µL Ethidium Bromide eklendi.
4. 12'li tarak elektroforez tankına yerleştirildi. Agaroz, ılık hale gelince tanka döküldü.
5. 30-40 dk kadar agarozun donması beklendi.
6. İlk kuyucuğa 10 µL Marker 3 (M3) yüklendi.
7. 10 µL PCR ürünleri, 3 µL 6X Loading Buffer ile karıştırıldıktan sonra diğer kuyucuklara yüklendi. Yürütücü tampon olarak 0,5 X TBE Buffer kullanıldı.
8. PCR ürünlerine, 80V'ta 60 dakika elektroforez uygulandı.
9. Bandlar elektroforez sonrası, UV ışıkta, jel görüntüleme cihazında değerlendirildi

ND1 standardına ait 8169 bç'lik elektroforez bandları Şekil 16'da gösterilmektedir.



Şekil 16: ND1 standardına ait bandların elektroforetik görüntüsü (M3: Marker 3)

3.7.3.3 ND1 Standart PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR ürünleri, High Pure PCR Product Purification Kit kullanılarak aşağıda yazılan prosedüre göre saflaştırıldı.

1. 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere 100 µL PCR ürünü aktarılır.
2. Üzerine 500 µL binding buffer ilave edilir ve karıştırılır.
3. High pure filtre tüpleri kolektör tüplere yerleştirilir. Karışım filtre tüplerine aktarılır.
4. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
5. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere yerleştirilir.
6. 500 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklenir.
7. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
8. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere yerleştirilir.
9. 200 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklenir.
10. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
11. Kolektör tüpler atılır ve filtre tüpleri 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere yerleştirilir.
12. 100 µL Elüsyon Buffer ilave edilir.

13. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
14. Eppendorf tüplerde oluşan glass fiber kalıntılarını uzaklaştırmak için 16 000 g'de 2 dakika 15-25°C'de tekrar santrifüj edilir.
15. Supernatant başka bir 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüpe alınır.

3.7.3.4 ND1 Standardının Kopya Sayısının Hesaplanması

Saflaştırılan ND1 standart numunesinin miktarı nanospektrofotometre ile ölçüldü ve konsantrasyonu 15 µg/ml olarak bulundu.

- ND1 standart amplikonun uzunluğu: 8169 bç
- 1 bç ağırlığı: 660 Dalton (Da)
- 1 amplikonun ağırlığı: $8169 \times 660 = 5391540$ Da olarak hesaplandı.
- 1 Dalton: $1 / 6,02 \times 10^{23}$ gr
- 1 amplikonun ağırlığı: $5391540 \times 1 / 6,02 \times 10^{23}$ gr = $8,9 \times 10^{-12}$ µg olarak hesaplandı.
- Nanospektrofotometre ile mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon standart konsantrasyonu 15 µg/ml olarak bulunduğundan;
- ND1 standart amplikon kopya sayısı: $15 \text{ µg/ml} / 8,9 \times 10^{-12} \text{ µg}$
: $1,68 \times 10^{12}$ kopya/ml
: $1,68 \times 10^9$ kopya/µl olarak bulundu.

3.7.4 Numunelerde ND1 PCR Çalışması

- $1,68 \times 10^9$ kopya/µl ND1 standardından 10 kat seri dilüsyonla 5 adet ND1 standardı hazırlandı.

Standart 1: $1,68 \times 10^5$ kopya / µl

Standart 2: $1,68 \times 10^4$ kopya / µl

Standart 3: $1,68 \times 10^3$ kopya / µl

Standart 4: $1,68 \times 10^2$ kopya / µl

Standart 5: $1,68 \times 10^1$ kopya / µl

Yukarıdaki standartlar ve 0,15 ng/µl numuneler ND1 primerleri kullanılarak LightCycler 480 PCR cihazı ile çalışıldı. ND1 için hazırlanan PCR master miksi ve PCR programı Tablo XXII'de gösterilmiştir.

Tablo XXII: ND1 için QPCR protokolü

| Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|--------------------------|--------------|------------------------|--------------------|
| PCR-grade distile su | 5,8 µL | | |
| ND1-Prim _{forw} | 1 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| ND1- Prim _{rev} | 1 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| UPL Probe 51 | 0,2 µL | 10 µM | 0,1 µM |
| LC 480 Prob Master | 10 µL | 2X | 1X |
| Standart/DNA template | 2 µL | | |
| Toplam hacim | 20 µL | | |

Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatılarak 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg’de uygun adaptör kullanılarak santrifüj edilmelidir.

ND1 için programlar:

| Program adı | Siklus | Analiz modu |
|--------------------|---------------|--------------------|
| Pre-inkübasyon | 1 | None |
| Amplifikasyon | 45 | Kantifikasyon |
| Soğutma | 1 | None |

Sıcaklık Hedefleri:**Pre-inkübasyon**

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|-------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 95 | None | 00:10:00 | 4.4 |

Amplifikasyon

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|-------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 95 | None | 00:00:10 | 4.4 |
| 55 | None | 00:00:30 | 2.2 |
| 72 | Single | 00:00:01 | 4.4 |

Soğutma:

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|-------------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------|
| 40 | None | 00:00:10 | 1.5 |

3.7.5 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardının Elde Edilmesi

3.7.5.1 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart Sekansının PCR ile oğaltılması

PCR Cihazı (GenAmp 9700) ile standart olarak kullanılacak mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon ampikonu, mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standart primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Numune olarak 77,5 ng/μL DNA kullanıldı. PCR’da kullanılan master miks ve PCR programı sırasıyla tablo XXIII ve tablo XXIV’de gösterilmiştir.

Tablo XXIII: mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardı için PCR master miks hazırlanması

| Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|--|---------|-----------------|-------------|
| PCR-grade distile su | 9 μL | | |
| MtDNA ⁴⁹⁷⁷ deletion Std –Prim _{forw} | 1,25 μL | 10 μM | 0,5 μM |
| MtDNA ⁴⁹⁷⁷ deletion Std –Prim _{rev} | 1,25 μL | 10 μM | 0,5 μM |
| LC 480 Probe Master | 12,5 μL | 2X | 1X |
| DNA Template | 1 μL | | |
| Toplam hacim | 25 μL | | |

Tablo XXIV: mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart PCR protokolü

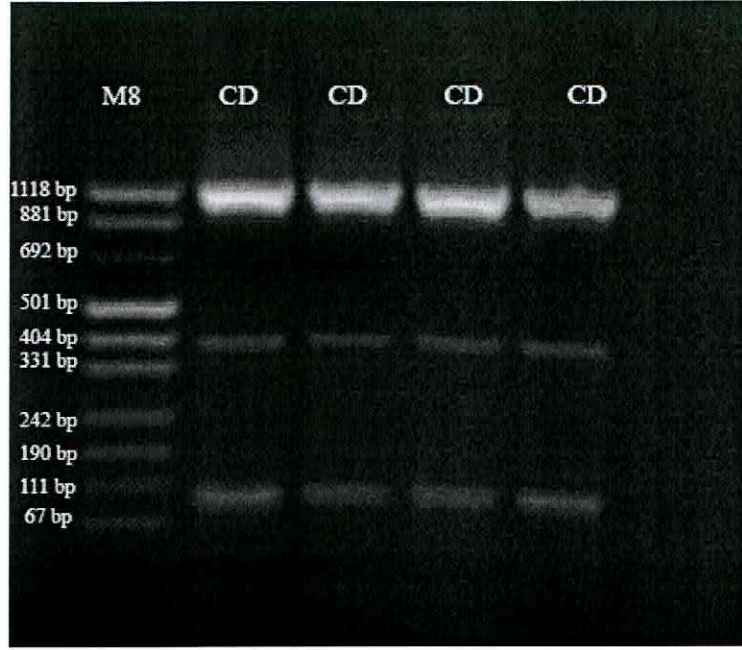
| Evre | Isı | Süre | Siklus |
|-------------------------|-------|-----------|--------|
| Başlangıç Denatürasyonu | 94 °C | 10 dakika | 1 |
| Denatürasyon | 94 °C | 1 dakika | 40 |
| Annealing | 50 °C | 10 saniye | 40 |
| Elongasyon | 72 °C | 10 saniye | 40 |
| Soğutma | 4 °C | 4 saat | 1 |

3.7.5.2 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart PCR Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesi

427 bç'lik mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon standardının elde edilip edilmediğini görmek amacıyla elde edilen PCR ürünü %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

1. Erlenmayerde, 0,6 gr agaroz (Sigma, A-0169), 30 ml TBE buffer (0,5X) içinde çözüldü.
2. Mikrodalga fırında 400 watt'ta bir taşım kaynatıldı.
3. Çözünen agaroz üzerine 3 µL Ethidium Bromide eklendi.
4. 12'li tarak elektroforez tankına yerleştirildi. Agaroz, ılık hale gelince tanka döküldü.
5. 30-40 dk kadar agarozun donması beklendi.
6. İlk kuyucuğa 10 µL Marker 8 (M8) yüklendi.
7. 10 µL PCR ürünleri, 3 µL 6X Loading Buffer ile karıştırıldıktan sonra diğer kuyucuklara yüklendi. Yürütücü tampon olarak 0,5 X TBE Buffer kullanıldı.
8. PCR ürünlerine, 100V'ta 80 dakika elektroforez uygulandı.
9. Bandlar elektroforez sonrası, UV ışıkta, jel görüntüleme cihazında değerlendirildi

mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon standartlarına ait 427 bç'lik elektroforez bandları şekil 17'de gösterilmektedir.



Şekil 17: mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardına ait bantların elektroforetik görüntüsü (M8: Marker 8, CD: Common Deletion, mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon)

Jelde mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standartlarına ait bantlar dışında nonspesifik bantların da çıkması nedeniyle 427 bç'lik bantlar jelden kesilerek High Pure PCR Product Purification Kit kullanılarak saflaştırıldı. Spesifikliğı arttırmak amacıyla ilk siklularda annealing derecesi yüksek olan ve daha sonraki siklularda giderek azalan PCR çeşidi olan Touchdown PCR ile jelden saflaştırılan PCR ürünü tekrar amplifiye edildi.

3.7.5.3 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart PCR Ürününün Agaroz Jelden Saflaştırılması

PCR ürünleri, High Pure PCR Product Purification Kit kullanılarak aşağıda yazılan prosedüre göre saflaştırıldı.

1. Agaroz jelden kesilen bantlar tartıldıktan sonra 1,5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere yerleştirilir.
2. Her 100 mg jel için 300 µL binding buffer ilave edilir ve 15-30 saniye vorteksenerek jelin çözülmesi sağlanır.
3. Karışım daha önceden 56 °C'ye ayarlanmış benmaride 2-3 dakikada bir vorteksenerek 10 dakika boyunca inkübe edilir.
4. Jel tamamen çözüldükten sonra her 100 mg jel için 150 µL isopropanol ilave edilir ve vorteksenir

5. High pure filtre tüpleri kolektör tüplere yerleştirilir ve karışım filtre tüplere aktarılır.
6. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
7. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere yerleştirilir.
8. 500 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklenir.
9. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
10. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere yerleştirilir.
11. 200 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklenir.
12. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
13. Kolektör tüpler atılır ve filtre tüpleri 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere yerleştirilir.
14. 100 µL Elüsyon Buffer ilave edilir ve 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
15. Eppendorf tüplerde oluşan glass fiber kalıntılarını uzaklaştırmak için 16 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de tekrar santrifüj edilir.
16. Supernatant başka bir 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüpe alınır.

3.7.5.4 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardının Touchdown PCR ile Çoğaltılması

PCR Cihazı (GenAmp 9700) ile standart olarak kullanılacak 427 bç'lik mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon ampikonu, mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standart primerleri kullanılarak Touchdown PCR yöntemi ile çoğaltıldı. Numune olarak agaroz jelden saflaştırılan 7,5 ng/µL 427 bç'lik PCR ürünü kullanıldı. PCR'da kullanılan master miks ve PCR programı sırasıyla tablo XXV ve tablo XXVI'da gösterilmiştir.

Tablo XXV: mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardının çoğaltılması için PCR master miks hazırlanması

| Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|--|---------|-----------------|-------------|
| PCR-grade distile su | 8 µL | | |
| mtDNA ⁴⁹⁷⁷ deletion –Prim _{forw} | 1,25 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| mtDNA ⁴⁹⁷⁷ deletion –Prim _{rev} | 1,25 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| LC 480 Probe Master | 12,5 µL | 2X | 1X |
| DNA Template | 2 µL | | |
| Toplam hacim | 25 µL | | |

Tablo XXVI: mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standardı için Touchdown PCR protokolü

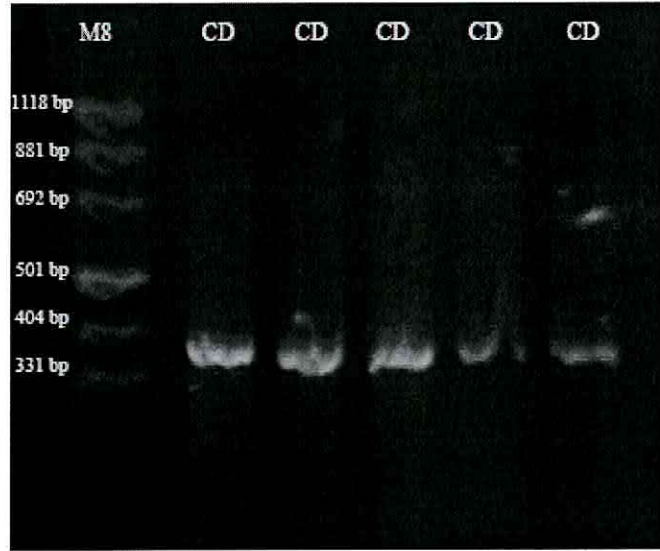
| Evre | | Isı | Süre | Siklus |
|-------------------------|--------------|-------|------------|--------|
| Başlangıç Denatürasyonu | | 94 °C | 10 dakika | 1 |
| Step 1 | Denatürasyon | 94 °C | 1 dakika | 5 |
| | Annealing | 60 °C | 10 saniye. | |
| | Elongasyon | 72 °C | 5 saniye | |
| Step 2 | Denatürasyon | 94 °C | 1 dakika | 5 |
| | Annealing | 58 °C | 10 saniye. | |
| | Elongasyon | 72 °C | 5 saniye | |
| Step 3 | Denatürasyon | 94 °C | 1 dakika | 10 |
| | Annealing | 56 °C | 10 saniye. | |
| | Elongasyon | 72 °C | 5 saniye | |
| Step 4 | Denatürasyon | 94 °C | 1 dakika | 10 |
| | Annealing | 55 °C | 10 saniye. | |
| | Elongasyon | 72 °C | 5 saniye | |
| Step 5 | Denatürasyon | 94 °C | 1 dakika | 15 |
| | Annealing | 54 °C | 10 saniye. | |
| | Elongasyon | 72 °C | 5 saniye | |
| Cooling | | 4 °C | 4 saat | 1 |

3.7.5.5 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart Touchdown PCR Ürününün Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Touchdown PCR sonrası 427 bp'lik mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon standardının spesifik tek bant olarak elde edilip edilmediğini görmek amacıyla PCR ürünü %2'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu. (Şekil 18)

1. Erlenmayerde, 0,6 gr agaroz, 30 ml TBE buffer (0,5X) içinde çözüldü.
2. Mikrodalga fırında 400 watt'ta bir taşım kaynatıldı.
3. Çözünen agaroz üzerine 3 µL Ethidium Bromide eklendi.
4. 12'li tarak elektroforez tankına yerleştirildi. Agaroz, ılık hale gelince tanka döküldü.
5. 30-40 dk kadar agarozun donması beklendi.

6. İlk kuyucuğa 10 µL Marker 8 (M8) yüklendi.
7. 10 µL PCR ürünleri, 3 µL 6X Loading Buffer ile karıştırıldıktan sonra diğer kuyucuklara yüklendi. Yürütücü tampon olarak 0,5 X TBE Buffer kullanıldı.
8. PCR ürünlerine, 100V'ta 80 dakika elektroforez uygulandı.
9. Bantlar elektroforez sonrası, UV ışıkta, jel görüntüleme cihazında değerlendirildi



Şekil 18: 427 bp'lik mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standardına ait bandların elektroforetik görüntüsü (M8: Marker 8, CD: Common Deletion, mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon)

3.7.5.6 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standart Touchdown PCR Ürününün Saflaştırılması

PCR ürünleri, High Pure PCR Product Purification Kit kullanılarak aşağıdaki prosedüre göre saflaştırıldı.

1. 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere 100 µL PCR ürünü aktarılır.
2. Üzerine 500 µL binding buffer ilave edilir ve karıştırılır.
3. High pure filtre tüpleri kolektör tüplere yerleştirilir. Karışım filtre tüplerine aktarılır.
4. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
5. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere yerleştirilir.
6. 500 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklenir.
7. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
8. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere yerleştirilir.

9. 200 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklenir.
10. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
11. Kolektör tüpler atılır ve filtre tüpleri 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere yerleştirilir.
12. 100 µL Elüsyon Buffer ilave edilir.
13. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
14. Eppendorf tüplerde oluşan glass fiber kalıntılarını uzaklaştırmak için 16 000 g'de 2 dakika 15-25°C'de tekrar santrifüj edilir.
15. Supernatant başka bir 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüpe alınır.

3.7.5.7 mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Standartının Kopya Sayısının Hesaplanması

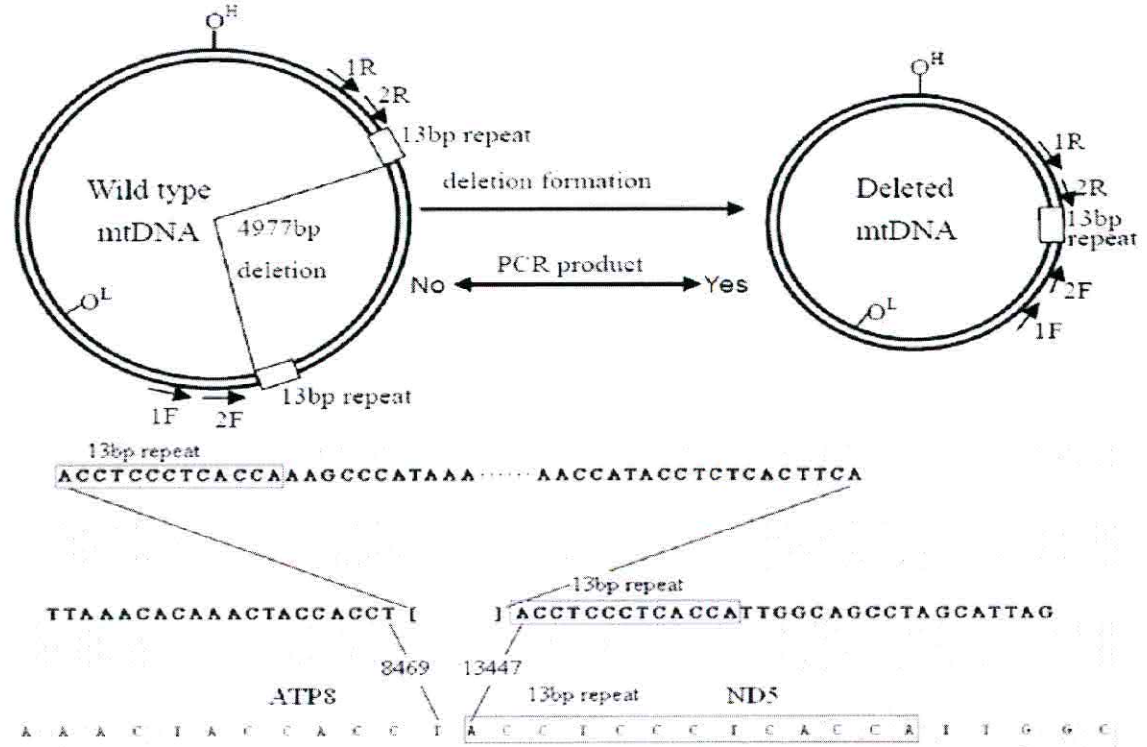
Saflaştırılan mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standart numunesinin miktarı nanospektrofotometre ile ölçüldü ve konsantrasyonu 46,18 µg/ml olarak bulundu.

- mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon standart ampikonun uzunluğu: 427 bç
- 1 bç ağırlığı: 660 Dalton (Da)
- 1 ampikonun ağırlığı: 427 x 660 = 281820 Da olarak hesaplandı.
- 1 Dalton: 1/ 6,02x10²³ gr
- 1 ampikonun ağırlığı: 281820x1/6,02x10²³ gr= 4,68x10⁻¹³ µg olarak hesaplandı.
- Nanospektrofotometre ile mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon standart konsantrasyonu 46,18 µg/ml olarak bulunduğundan;
- mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standart kopya sayısı: 46,18 µg/ml / 4,68 x 10⁻¹³ µg
: 9,86 x 10¹³ kopya / ml
: 9,86 x 10¹⁰ kopya / µl olarak bulundu.

3.7.6 Numunelerde mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon PCR çalışılması

Düşük seviyelerde bulunan mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon'unu saptamak amacıyla Nested PCR yöntemi kullanıldı. Şekil 19'da mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon saptama prensibi gösterilmiştir. Nested PCR için gerekli olan iki çift primerden, dış primerler olarak mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standart primerleri (1F-1R), iç primerler olarak da mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon primerleri (2F-2R) kullanıldı. İlk aşama PCR cihazında (Px2 Thermo) klasik PCR metodu ile çalışılarak 427 bç ürün elde edildi. İkinci aşama ise mtDNA⁴⁹⁷⁷ deletion Taqman probu da kullanılarak LightCycler 480 PCR cihazında QPCR metodu ile çalışıldı ve 126 bç ürün elde edildi. Uygulanan PCR koşullarında mtDNA⁴⁹⁷⁷

delesyon'u bulunan örneklerde ürün oluşurken, delesyonsuz numunelerde ürün oluşmasına imkan tanınmamıştır.



Şekil 19: mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon saptama prensibi (20)

3.7.6.1 Numunelerin mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standart primerleri ile çalışılması

0,15 ng/µl DNA içeren numuneler ilk olarak mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standart primerleri kullanılarak PCR cihazı (Px2 Thermo) ile çalışıldı. Hazırlanan PCR master miksi ve PCR programı sırasıyla tablo XXVII ve tablo XXVIII'de gösterilmiştir.

Tablo XXVII: Numunelerde mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon PCR'ı için master miks hazırlanması

| Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|--|--------------|-----------------|-------------|
| PCR-grade distile su | 5 µL | | |
| MtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon Std –Prim _{forw} | 1,25 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| MtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon Std –Prim _{rev} | 1,25 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| LC 480 Probe Master | 12,5 µL | 2X | 1X |
| DNA Template | 5 µL | | |
| Toplam hacim | 25 µL | | |

Tablo XXVIII: Numunelerde mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu için PCR protokolü

| Evre | Isı | Süre | Siklus |
|-------------------------|------------|-------------|---------------|
| Başlangıç Denatürasyonu | 94 °C | 10 dakika | 1 |
| Denatürasyon | 94 °C | 1 dakika | 30 |
| Annealing | 50 °C | 10 saniye | 30 |
| Elongasyon | 72 °C | 5 saniye | 30 |
| Soğutma | 4 °C | 4 saat | 1 |

3.7.6.2 QPCR ile mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon çalışması

- 9,86 x 10¹⁰ kopya / µl mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standardından 10 kat seri dilüsyonla 6 adet mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon standardı hazırlandı.

Standart 1: 9,86 x 10⁵ kopya / µl

Standart 2: 9,86 x 10⁴ kopya / µl

Standart 3: 9,86 x 10³ kopya / µl

Standart 4: 9,86 x 10² kopya / µl

Standart 5: 9,86 x 10¹ kopya / µl

Standart 6: 9,86 kopya / µl

Yukarıdaki standartlar ve PCR uygulanmış olan numuneler mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon primerleri kullanılarak LightCycler 480 PCR cihazı kullanılarak QPCR ile çalışıldı. QPCR ile mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon için hazırlanan PCR master miksi ve PCR programı tablo XXIX’da gösterilmiştir.

Tablo XXIX: QPCR ile mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon için PCR protokolü

| Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|---|--------------|------------------------|--------------------|
| PCR-grade distile su | 2,8 µL | | |
| MtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon-Prim _{forw} | 1 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| MtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon- Prim _{rev} | 1 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| MtDNA ⁴⁹⁷⁷ deletion Probe | 0,2 µL | 10 µM | 0,1 µM |
| LC 480 Prob Master | 10 µL | 2X | 1X |
| Standart/DNA template | 5 µL | | |
| Toplam hacim | 20 µL | | |

Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatılarak 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg’de uygun adaptör kullanılarak santrifüj edildi.

mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu için programlar:

| Program adı | Siklus | Analiz modu |
|----------------|--------|---------------|
| Pre-inkübasyon | 1 | None |
| Amplifikasyon | 50 | Kantifikasyon |
| Soğutma | 1 | None |

Sıcaklık Hedefleri:

Pre-inkübasyon

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| 95 | None | 00:10:00 | 4.4 |

Amplifikasyon

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| 95 | None | 00:00:10 | 4.4 |
| 60 | None | 00:00:15 | 2.2 |
| 72 | Single | 00:00:01 | 4.4 |

Soğutma:

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| 40 | None | 00:00:10 | 1.5 |

3.7.7 Numunelerde mtDNA Uzun Fragmentin XL-PCR ile Çoğaltılması

PCR Cihazı (PX2 Thermel Cycler) ile 0,15 ng/µl ‘ye getirilmiş numuneler mtDNA uzun fragment standart primerleri kullanılarak XL-PCR yöntemi ile çoğaltıldı. XL-PCR protokolü Janine H. Santos ve arkadaşlarına ait literatürden yararlanılarak oluşturuldu. PCR’da kullanılan master miks ve PCR programı sırasıyla tablo XXIX ve tablo XXX’da gösterilmiştir.

Tablo XXIX: mtDNA uzun fragment PCR için master miks hazırlanması

| Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|--|----------|-----------------|-------------|
| Expand Long PCR Buffer (MgCl ₂ içermeyen) | 5 µL | 5 X buffer | 1 X |
| MgCl ₂ | 1,75 µL | 25 mM | 1,75 mM |
| PCR-grade distile su | 8,75 µL | | |
| mtDNA uzun fragment std.-Prim _{forw} | 0,75 µL | 10 µM | 0,3 µM |
| mtDNA uzun fragment std.-Prim _{rev} | 0,75 µL | 10 µM | 0,3 µM |
| dNTP-Mix (Roche) | 0,875 µL | 10 mM | 350 µM |
| BSA (Bovin Serum Albumine) | 0,125 µL | 20 µg/ µl | 100 ng/ µl |
| Total Volüm | 18 µL | | |

Nazikçe karıştırıldıktan sonra 18 µl master miks solüsyonu 0,2 ml'lik PCR tüplerine aktarılır ve üzerine aşağıdaki tabloda bulunan malzemeler uygulama ısalarına dikkat edilerek sırayla pipetlenir.

| | Uygulama ısı | Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|----|--------------|--------------------|--|-----------------|-------------|
| 1. | 2-8 °C | DNA Template | 2 µl | 0,15 ng/µl | 0,3 ng/50µl |
| 2. | 2-8 °C | Expand PCR Mix | 18 µl | 10 X | 1X |
| 3. | 75 °C | Expand Enzim mix | 5 µl (0,5 µl enzim+4,5 µl dH ₂ O) | 5 U/µl | 2,5 U/50µl |
| | | Total Volüm | 25 µl | | |

Tablo XXX: Numunelerde mtDNA uzun fragment için PCR protokolü

| Evre | Isı | Süre | Siklus |
|-------------------------|-------|-----------|--------|
| Hot Start | 75 °C | 2 dakika | 1 |
| Başlangıç denatürasyonu | 94 °C | 1 dakika | 1 |
| Denatürasyon | 94 °C | 15 saniye | 19 |
| Annealing | 64 °C | 12 dakika | 19 |
| Final Ekstansiyon | 72 °C | 10 dakika | 1 |
| Soğutma | 25 °C | 1 dakika | 1 |

3.7.8 mtDNA Uzun Fragment Standardının Elde Edilmesi

3.7.8.1 mtDNA Uzun Fragment Standardının PCR ile oğaltılması

PCR Cihazı (GenAmp 9700) ile standart olarak kullanılacak 8843 bę'lik mtDNA uzun fragment ampliconu, mtDNA uzun fragment primerleri kullanılarak çoğaltıldı. Numune olarak 2,5 ng/uL DNA kullanıldı. PCR'da kullanılan master miks ve PCR programı sırasıyla tablo XXXI ve tablo XXXII'de gösterilmiştir.

Tablo XXXI: mtDNA uzun fragment standardı için PCR master miks hazırlanması

| Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|--|---------|-----------------|-------------|
| Expand Long PCR Buffer (MgCl ₂ içermeyen) | 10 l | 5 X buffer | 1 X |
| MgCl ₂ | 3,5 l | 25 mM | 1,75 mM |
| PCR-grade distile su | 21,5 l | | |
| mtDNA uzun fragment std.-Prim _{forw} | 1,5 l | 10 M | 0,3 M |
| mtDNA uzun fragment std.-Prim _{rev} | 1,5 l | 10 M | 0,3 M |
| dNTP-Mix (Roche) | 1,75 l | 10 mM | 350 M |
| BSA (Bovin Serum Albumine) | 0,25 l | 20 g/ l | 100 ng/ l |
| Total Volüm | 40 l | | |

Nazikce karıştırıldıktan sonra 40 l master miks solyosunu 0,2 ml'lik PCR tüplerine aktarılır ve üzerine aşağıdaki tabloda bulunan malzemeler uygulama ısısına dikkat edilerek sırayla pipetlenir.

| | Uygulama ısısı | Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|----|----------------|--------------------|--|-----------------|--------------|
| 1. | 2-8 C | DNA Template | 5 l | 2,5 ng/l | 12,5 ng/50l |
| 2. | 2-8 C | Expand PCR Mix | 40 l | 10 X | 1X |
| 3. | 75 C | Expand Enzim mix | 5 l (0,5 l enzim + 4,5 l dH ₂ O) | 5 U/l | 2,5 U/50l |
| | | Total Volüm | 50 l | | |

Tablo XXXII: mtDNA uzun fragment standardı için PCR protokolü

| Evre | Isı | Süre | Siklus |
|-------------------------|------------|-------------|---------------|
| Hot Start | 75 °C | 2 dakika | 1 |
| Başlangıç denatürasyonu | 94 °C | 1 dakika | 1 |
| Denatürasyon | 94 °C | 15 saniye | 30 |
| Annealing | 64 °C | 12 dakika | 30 |
| Final Ekstansiyon | 72 °C | 10 dakika | 1 |
| Soğutma | 25 °C | 1 dakika | 1 |

3.7.8.2 mtDNA Uzun Fragment Standardının Agaroz Jelde Görüntülenmesi

8843 bp'lik mtDNA uzun fragment standardının elde edilip edilmediğini görmek amacıyla PCR sonrası %0,7'lik agaroz jel elektroforezine tabi tutuldu.

1. Erlenmayerde, 0,28 gr agaroz, 40 ml TBE buffer (0,5X) içinde çözüldü.
2. Mikrodalga fırında 400 watt'ta bir taşım kaynatıldı.
3. Çözünen agaroz üzerine 3 µl Ethidium Bromide eklendi.
4. 12'li tarak elektroforez tankına yerleştirildi. Agaroz, ılık hale gelince tanka döküldü.
5. 30-40 dk kadar agarozun donması beklendi.
6. İlk kuyucuğa 10 µL Marker 3 (M3) yüklendi.
7. 10 µL PCR ürünleri, 3 µL 6X Loading Buffer ile karıştırıldıktan sonra diğer kuyucuklara yüklendi. Yürütücü tampon olarak 0,5 X TBE Buffer kullanıldı.
8. PCR ürünlerine, 80V'ta 60 dakika elektroforez uygulandı.
9. Bandlar elektroforez sonrası, UV ışıkta, jel görüntüleme cihazında değerlendirildi

mtDNA uzun fragment standardına ait 8843 bp'lik elektroforez bandları şekil 20'de gösterilmektedir.



Şekil 20: mtDNA uzun fragment standardına ait bandlarının elektroforetik görüntüsü (M3: Marker 3, UF: uzun fragment)

3.7.8.3 mtDNA Uzun Fragment Standart Ürününün Saflaştırılması

PCR ürünleri, High Pure PCR Product Purification Kit kullanılarak aşağıda yazılan prosedüre göre saflaştırıldı.

1. 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere 100 µL PCR ürünü aktarılır.
2. Üzerine 500 µL binding buffer ilave edilir ve karıştırılır.
3. High pure filtre tüpleri kolektör tüplere yerleştirilir. Karışım filtre tüplerine aktarılır.
4. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
5. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere yerleştirilir.
6. 500 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklenir.
7. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
8. Kolektör tüpler atılıp filtre tüpleri yeni kolektör tüplere yerleştirilir.
9. 200 µL Wash Buffer filtre tüplerine eklenir.
10. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
11. Kolektör tüpler atılır ve filtre tüpleri 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüplere yerleştirilir.
12. 100 µL Elüsyon Buffer ilave edilir.

13. 13 000 g'de 1 dakika 15-25°C'de santrifüj edilir.
14. Eppendorf tüplerde oluşan glass fiber kalıntılarını uzaklaştırmak için 16 000 g'de 2 dakika 15-25°C'de tekrar santrifüj edilir.
15. Supernatant başka bir 1.5 mL'lik nükleaz free eppendorf tüpe alınır.

3.7.8.4 mtDNA Uzun Fragment Standartının Kopya Sayısının Hesaplanması

Saflaştırılan mtDNA uzun fragment standart numunesinin miktarı nanospektrofotometre ile ölçüldü ve konsantrasyonu 16 µg/ml olarak bulundu.

- mtDNA uzun fragment standart amplikonun uzunluğu: 8843 bç
- 1 bç ağırlığı: 660 Dalton (Da)
- 1 amplikonun ağırlığı: $8843 \times 660 = 5836380$ Da olarak hesaplandı.
- 1 Dalton: $1 / 6,02 \times 10^{23}$ gr
- 1 amplikonun ağırlığı: $5836380 \times 1 / 6,02 \times 10^{23}$ gr = $9,69 \times 10^{-12}$ µg olarak hesaplandı.
- Nanospektrofotometre ile mtDNA uzun fragment standart konsantrasyonu 16 µg/ml olarak bulunduğundan;
- mtDNA uzun fragment standart kopya sayısı: $16 \text{ µg/ml} / 9,69 \times 10^{-12} \text{ µg}$
: $1,65 \times 10^{12}$ kopya / ml
: $1,65 \times 10^9$ kopya / µl olarak bulundu.

3.7.9 XL-PCR ürünlerinin QPCR ile kantitasyonu

- $1,65 \times 10^9$ kopya/µl mtDNA uzun fragment standardından 10 kat seri dilüsyonla 6 adet mtDNA uzun fragment standardı hazırlandı.
Standart 1: $1,65 \times 10^6$ kopya / µl
Standart 2: $1,65 \times 10^5$ kopya / µl
Standart 3: $1,65 \times 10^4$ kopya / µl
Standart 4: $1,65 \times 10^3$ kopya / µl
Standart 5: $1,65 \times 10^2$ kopya / µl
Standart 6: $1,65 \times 10^1$ kopya / µl

Yukarıdaki standartlar ve XL-PCR uygulanmış olan numuneler mtDNA uzun fragment primerleri kullanılarak LightCycler 480 PCR cihazı ile çalışıldı. QPCR ile

mtDNA uzun fragment için hazırlanan PCR master miksi ve PCR programı tablo XXXIII'de gösterilmiştir.

Tablo XXXIII: QPCR ile mtDNA uzun fragment kantitasyonu için PCR protokolü

| Malzeme | Hacim | Başlangıç kons. | Final kons. |
|---|--------|-----------------|-------------|
| PCR-grade distile su | 5,8 µL | | |
| mtDNA uzun fragment -Prim _{forw} | 1 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| mtDNA uzun fragment - Prim _{rev} | 1 µL | 10 µM | 0,5 µM |
| UPL Probe 5 | 0,2 µL | 10 µM | 0,1 µM |
| LC 480 Prob Master | 10 µL | 2X | 1X |
| Standart/DNA template | 2 µL | | |
| Toplam hacim | 20 µL | | |

Pipetlemeler bittikten sonra pleyt sealing foil ile kapatılarak 2 dakika oda sıcaklığında 1500xg'de uygun adaptör kullanılarak santrifüj edilmelidir.

mtDNA uzun fragment için programlar:

| Program adı | Siklus | Analiz modu |
|----------------|--------|---------------|
| Pre-inkübasyon | 1 | None |
| Amplifikasyon | 45 | Kantifikasyon |
| Soğutma | 1 | None |

Sıcaklık Hedefleri:

Pre-inkübasyon

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| 95 | None | 00:10:00 | 4.4 |

Amplifikasyon

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| 95 | None | 00:00:10 | 4.4 |
| 56 | None | 00:00:15 | 2.2 |
| 72 | Single | 00:00:01 | 4.4 |

Soğutma:

| Hedef (°C) | Acquisition Modu | Tutulan süre (hh:mm:ss) | Artış oranı (°C/s) |
|------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| 40 | None | 00:00:10 | 1.5 |

3.8 Numunelerde Hücre Başına Düşen mtDNA Kopya Sayılarının Hesaplanması

QPCR ile absöü kantitasyon yapılarak bütöün numunelerin nükleer ve mitokondriyal kopya sayıları bulundu. Numunelerin ND1 kopya sayıları, Beta-globin kopya sayılarına bölöndükten sonra her hücrede 2 kopya Beta-globin olması nedeniyle iki ile çarpılarak hücre başına düşen mitokondriyal DNA kopya sayıları hesaplandı. (mtDNA kopya sayısı/hücre = (ND1 kopya/ Beta-globin kopya)x2). Hesaplanan kopya sayıları kontrole oranlanarak gruplar arasındaki fark belirlendi.

Absöü kantitasyona ek olarak Komparatif CP Metodu ile de hesaplama yapıldı. Çalışmamızda kalibratör olarak kontrol grubu kullanıldı ve gruplar arasındaki farklılık kalibratörün n-katı şeklinde hesaplandı.

3.9 Numunelerde mtDNA⁴⁹⁷⁷ Delesyon Frekansının Hesaplanması

QPCR ile absöü kantitasyon yapılarak bütöün numunelerin mitokondri kopya sayıları ve mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon kopya sayıları bulundu. Numunelerin mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon kopya sayıları ND1 kopya sayılarına bölöndü ve 100 ile çarpılarak delesyon frekansı (%) hesaplandı. (delesyon frekansı (%))= (mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon kopya/ND1 kopya) x100). Hesaplanan delesyon frekansı kontrole oranlanarak gruplar arasındaki fark belirlendi.

Absöü kantitasyona ek olarak Komparatif CP Metodu ile de hesaplama yapıldı. Çalışmamızda kalibratör olarak kontrol grubu kullanıldı ve gruplar arasındaki farklılık kalibratörün n-katı şeklinde hesaplandı.

3.10 Numunelerde mtDNA Lezyon Frekansının Hesaplanması

QPCR ile absöü kantitasyon yapılarak bütöün numunelere ait XL-PCR ürünlerinin kopya sayıları bulundu. XL-PCR ürünlerinin kopya sayıları ND1 kopya sayılarına bölünerek normalize edildi. Elde edilen değerler kontrole oranlanarak relatif amplifikasyon değerleri hesaplandı. Zincir başına düşen lezyon frekansı Poisson ekspresyonunun “zero class” eşitliği baz alınarak $\lambda = -\ln AD/AC$ formülü ile hesaplandı (104).

λ = lezyon frekansı

AD = Hasarlı DNA'nın amplifikasyonu

AC = Hasar olmayan DNA'nın amplifikasyonu

Lezyon frekansı hesabında negatif değerlerden kaçınmak amacıyla relatif amplifikasyon değeri en yüksek çıkan 0,75 nM Ouabain grubu AC olarak kullanılmıştır.

Absolü kantitasyona ek olarak Komparatif CP Metodu ile de relatif amplifikasyon değerleri hesaplandı. Çalışmamızda kalibratör olarak kontrol grubu kullanıldı ve gruplar arasındaki farklılık kalibratörün n-katı şeklinde hesaplandı.

3.11 Verilerin Değerlendirilmesi

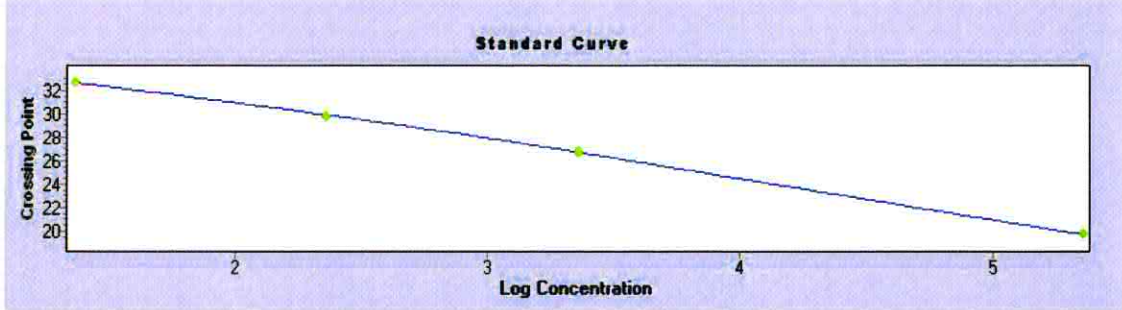
Veriler Microsoft Office Excel 2003 programı ile analiz edilerek değerlendirme yapıldı. İstatistiksel değerlendirmede kontrolün 1,2 katı artış ya da 0,8 kattan fazla azalma anlamlı kabul edildi.

Absolü ve relatif kantitasyon metodlarının karşılaştırılması MedCalc 11.4 istatistik software'i kullanılarak regresyon analizi ile yapıldı.

4. BULGULAR

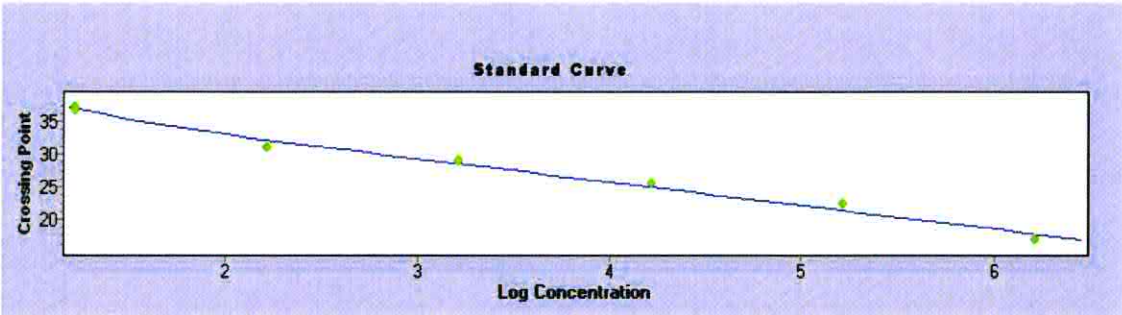
4.1 QPCR Çalışmalarının Standart Eğrileri

QPCR ile yaptığımız çalışmamızda absöü kantitasyon için kullandığımız standartlara ait eğriler ile Efficiency ve Slope değerleri Şekil 21, Şekil 22, Şekil 23 ve Şekil 24'te gösterilmiştir.



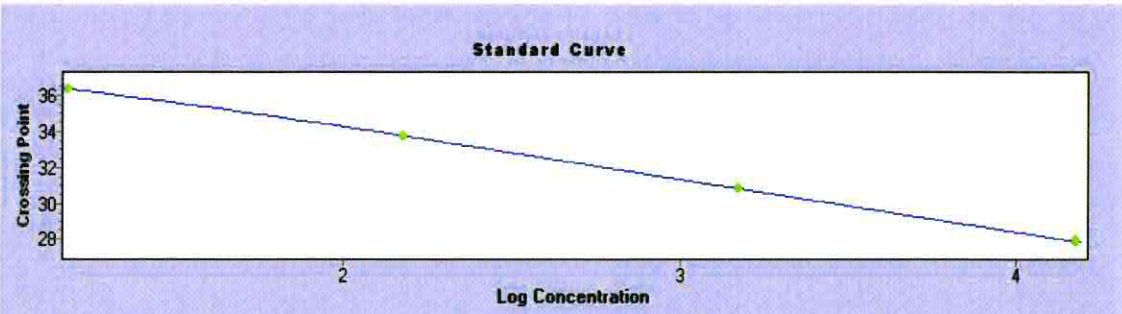
Efficiency: 1.977 Slope: -3.378

Şekil 21: QPCR ile NDI kantitasyonunun standart eğrisi



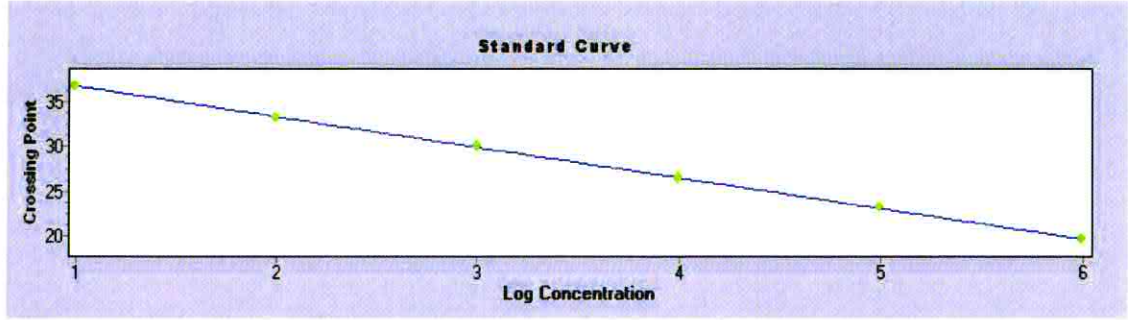
Efficiency: 1.907 Slope: -3.567

Şekil 22: QPCR ile XL-PCR ürünleri kantitasyonunun standart eğrisi



Efficiency: 2.195 Slope: -2.929

Şekil 23: QPCR ile Beta-Globin kantitasyonunun standart eğrisi



Efficiency: 1.980 Slope: -3.372

Şekil 24: QPCR ile mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon kantitasyonunun standart eğrisi

4.2 Numunelerin QPCR ile kantitasyon sonuçları

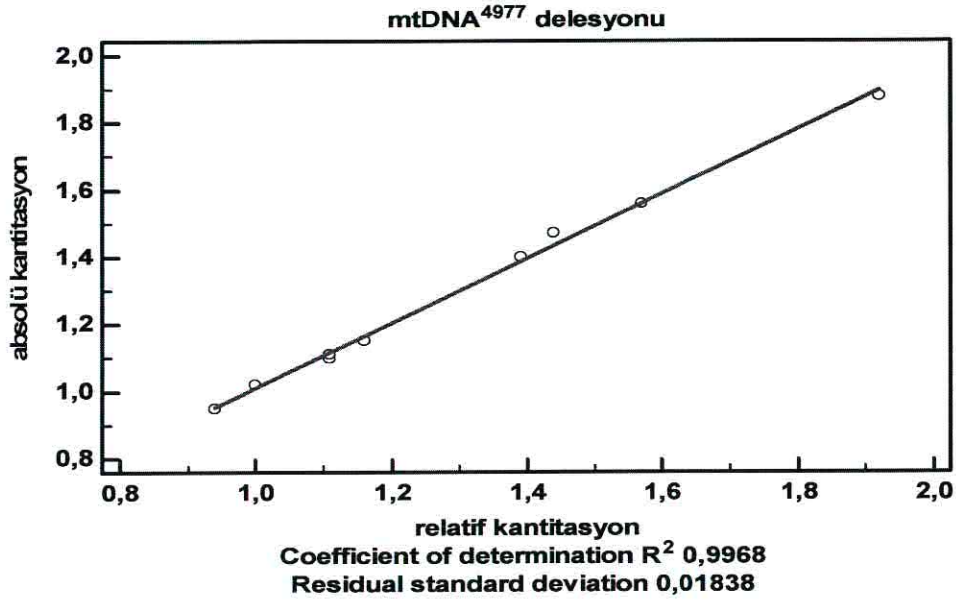
Çalışma sonrasında absölü kantitasyon ile elde edilen mtDNA kopya sayısı, mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon frekansı ve 8843 baz uzunluğundaki mtDNA zincirinde lezyon frekansı değerleri Tablo XXXIV’de gösterilmiştir.

Tablo XXXIV: Numunelerde mtDNA/hücre, mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon frekansı ve 8843 baz uzunluğundaki mtDNA zincirinde lezyon frekansı değerleri (Ou: Ouabain)

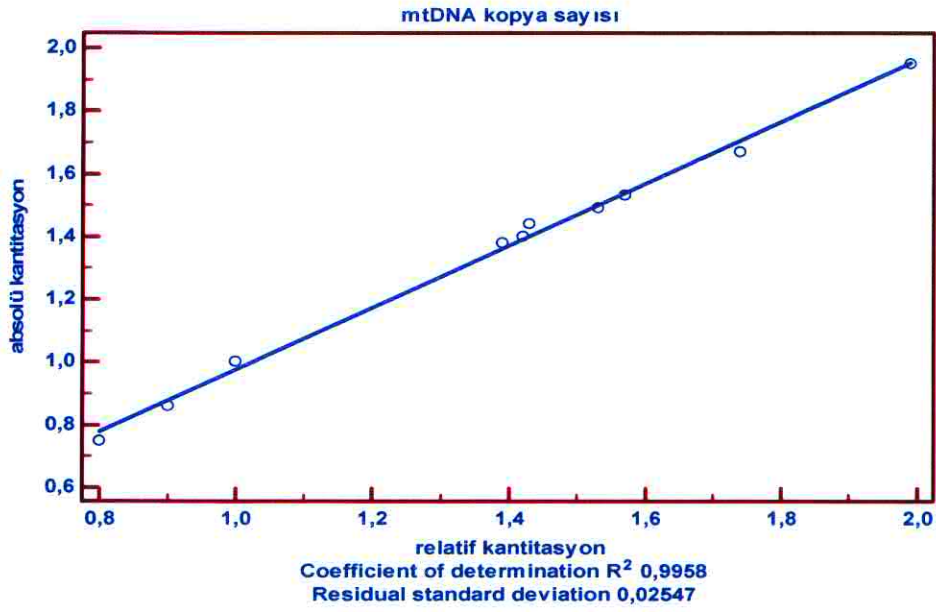
| Grup | mtDNA /hücre | mtDNA ⁴⁹⁷⁷ delesyon frekansı (%) | mtDNA lezyon frekansı (8843 b) |
|------------------------|--------------|---|--------------------------------|
| Kontrol | 3209,27 | 0,20 | 0,47 |
| 2-DG | 4796,14 | 0,19 | 0,89 |
| 750 nM Ou | 2767,27 | 0,28 | 1,17 |
| 75 nM Ou | 2406,13 | 0,38 | 0,72 |
| 7,5 nM Ou | 5373,67 | 0,29 | 0,32 |
| 0,75 nM Ou | 6263,98 | 0,22 | 0,00 |
| 2-DG+750 nM Ou | 4443,51 | 4,03 | 1,07 |
| 2-DG+75 nM Ou | 4633,38 | 0,31 | 0,50 |
| 2-DG+7,5 nM Ou | 4503,12 | 0,22 | 0,21 |
| 2-DG+0,75 nM Ou | 4923,18 | 0,23 | 0,41 |

Absolü kantitasyon sonucunda elde edilen değerler kontrole oranlanarak mtDNA kopya sayısı, mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon frekansı ve mtDNA lezyon frekansı hesaplanarak gruplar arası fark belirlendi. Kontrolün 1,2 katı artış ya da 0,8 kattan fazla azalma anlamlı kabul edildi.

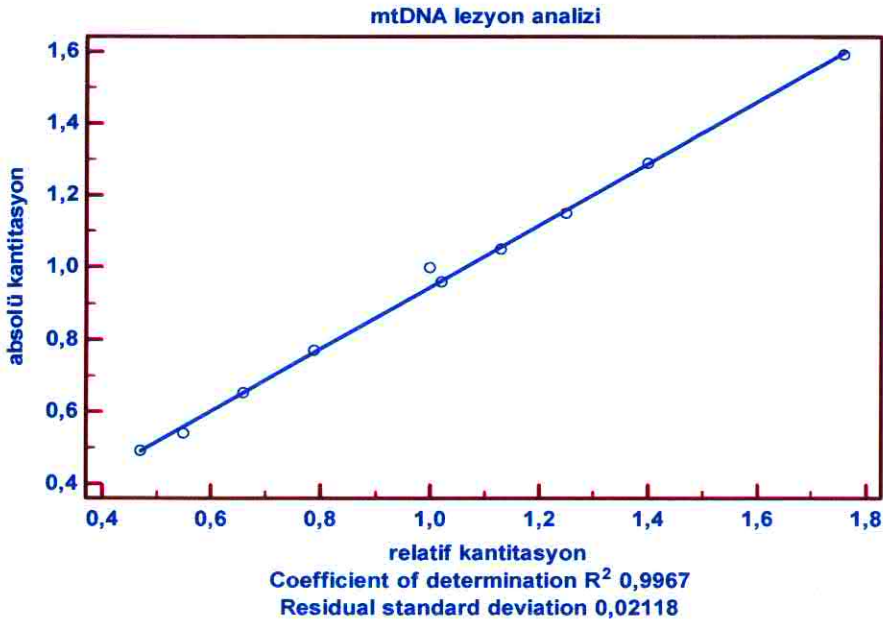
Absolü kantitasyona ek olarak Komparatif CP Metodu ile numunelerin konsantrasyonları yerine CP'leri kullanılarak hesaplama yapıldı ve gruplar arası fark belirlendi. Her iki metod ile bulunan değerler Regresyon analizi yapılarak değerlendirildi ve metodlar arasında fark olmadığı saptandı. Şekil 25'te mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon analizinde, Şekil 26'da mtDNA kopya sayısı analizinde ve Şekil 27'de mtDNA lezyon analizinde kullanılan absolü ve relatif kantitasyon metodlarının karşılaştırılma grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 25: mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon analizinde absolü ve relatif kantitasyon metodlarının karşılaştırılma grafiği



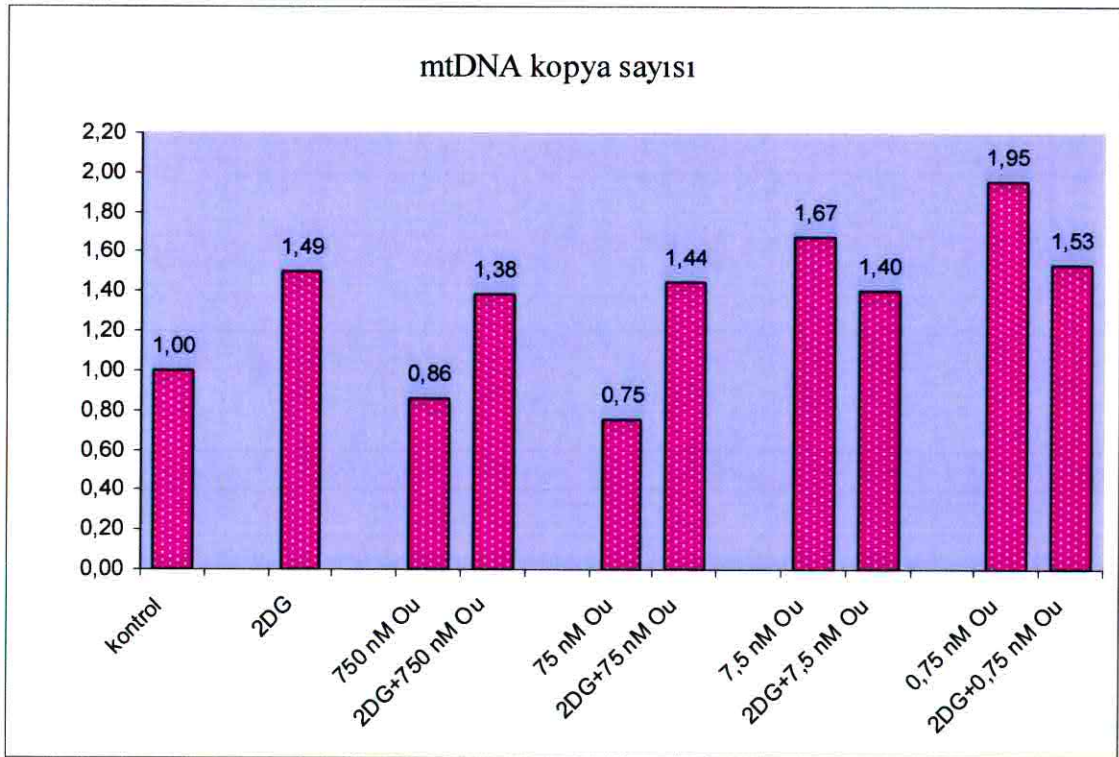
Şekil 26: mtDNA kopya sayısının analizinde absolü ve relatif kantitasyon metodlarının karşılaştırılma grafiği



Şekil 27: mtDNA lezyon analizinde absolü ve relatif kantitasyon metodlarının karşılaştırılma grafiği

Şekil 28’de 24 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan mtDNA kopya sayısının kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

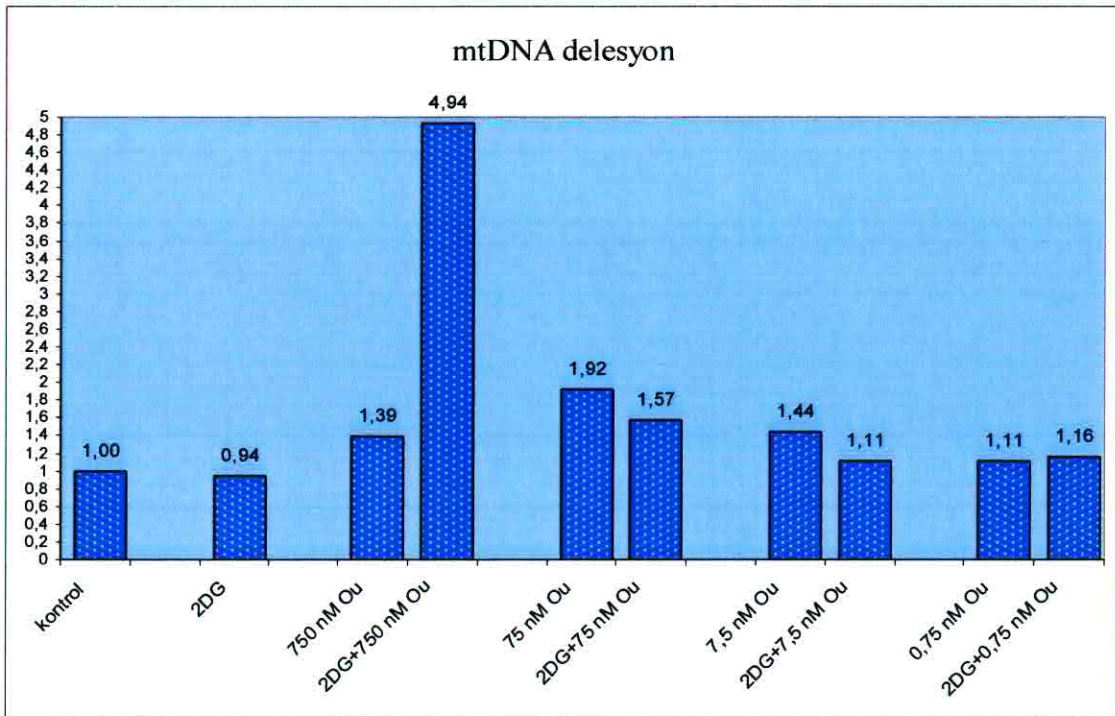
- 2-DG ve 2-DG ile kombine tüm gruplarda kontrol grubuna göre mtDNA kopya sayısı arttı.
- Tek başına 75 nM ouabain kontrol grubuna göre mtDNA kopya sayısını azalttı.
- 7,5 ve 0,75 nM ouabain dozlarında kontrol grubuna göre mtDNA kopya sayısı arttı.
- Bütün gruplar arasında kontrol grubuna göre mtDNA kopya sayısını en çok arttıran tek başına 0,75 nM ouabain dozu oldu.
- 2-DG ile kombine gruplardaki kopya sayısındaki artış oranı, 2-DG’nin tek başına yol açtığı artış oranı ile yakın bulundu.



Şekil 28: mtDNA kopya sayısı analiz grafiği

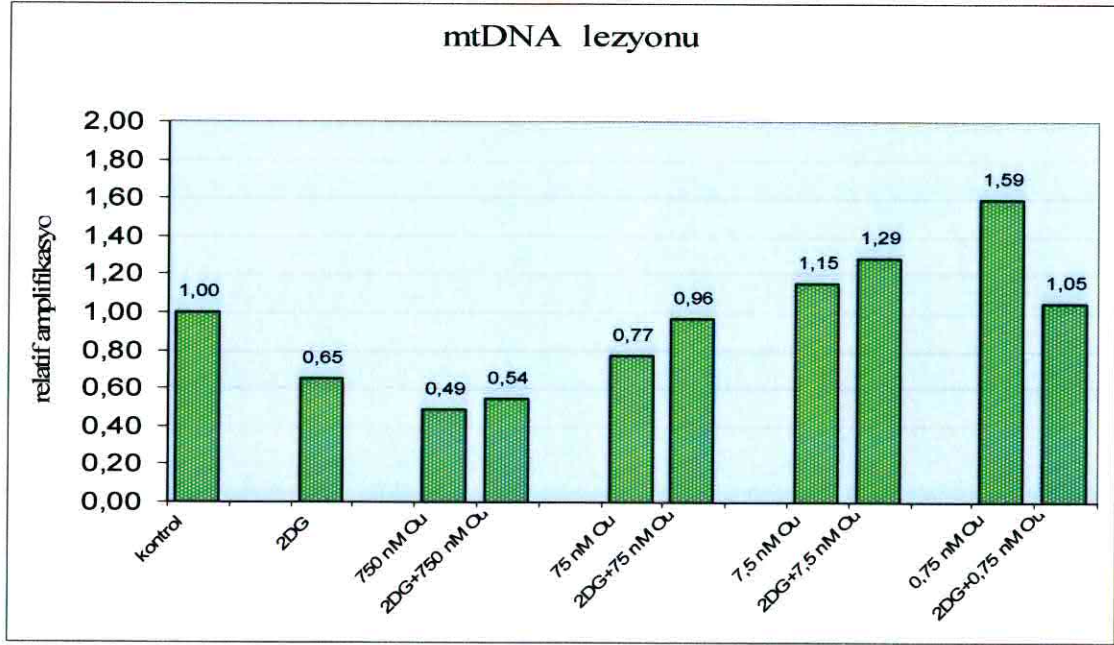
Şekil 29’da 24 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde çalışılan mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunun kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir.

- Tek başına ouabain dozları arasında delesyonda en yüksek artış 75 nM ouabain dozunda olmakla birlikte 750 nM ve 7,5 nM ouabain dozları da delesyonu arttırdı.
- 2-DG tek başına delesyon oranında değişiklik yapmazken 750 nM ouabain ile kombine grupta delesyon yaklaşık 5 kat arttı.
- Tek başına 75 nM ouabain grubunda daha belirgin olmakla birlikte, 2-DG ile kombine 75 nM ouabain gruplarında delesyon arttı
- Tek başına 7,5 nM ouabain grubunda delesyon arttı ancak 2-DG ile kombine 7,5 nM ouabain grubunda delesyonda anlamlı fark olmadı.
- Tek başına veya 2-DG ile kombine 0,75 nM ouabain dozunda kontrole göre delesyonda anlamlı bir fark olmadı.
- Bütün gruplar arasında kontrol grubuna göre delesyonda en yüksek artış 2-DG+750 nM ouabain dozunda oldu.



Şekil 29: mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon analiz grafiği

Şekil 30'da 24 saat boyunca ilaç uygulanan HepG2 hücrelerinde yapılan mtDNA lezyon analizinde numunelerin amplifikasyon değerlerinin kontrole göre değerlendirilmesi görülmektedir. DNA'da bulunan lezyonun DNA Polimeraz'ın ilerlemesini bloke etmesi, lezyon bulunan örneklerde amplifikasyon verimini düşürmektedir.



Şekil 30: mtDNA lezyonu relatif amplifikasyon grafiği

Zincir başına düşen lezyon frekansı $\lambda = -\ln AD/AC$ formülü ile hesaplandı.

λ = lezyon frekansı

AD = Hasarlı DNA'nın amplifikasyonu

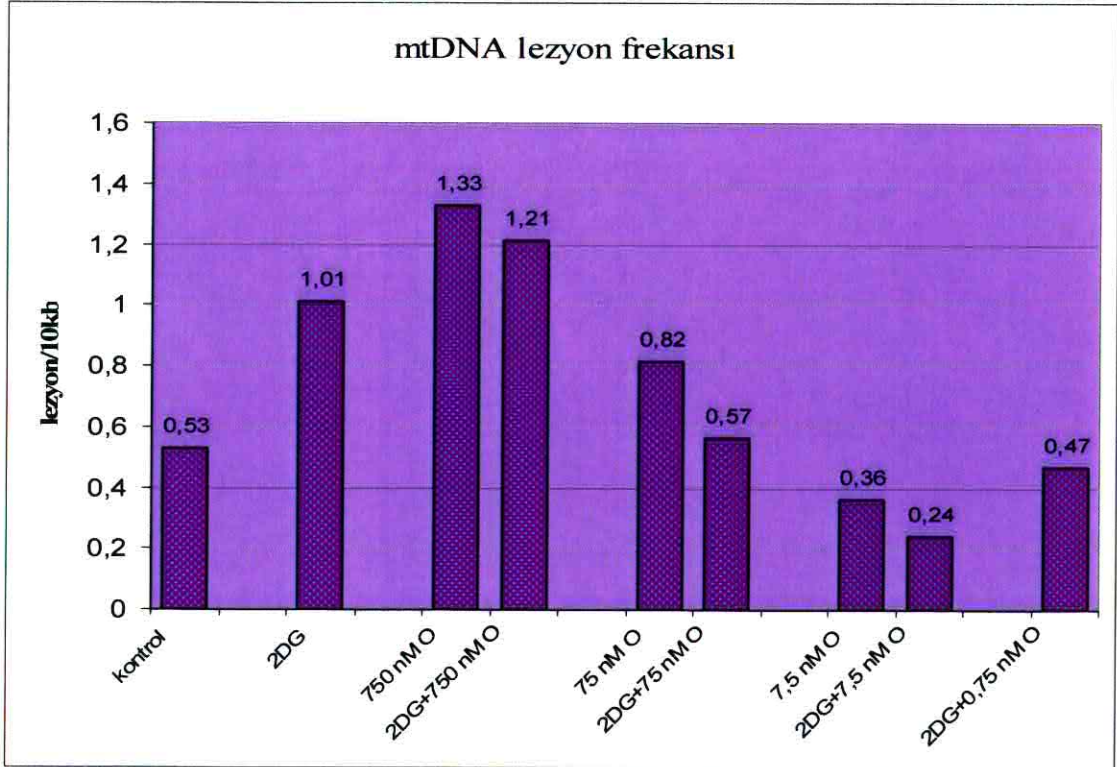
AC = Hasar olmayan DNA'nın amplifikasyonu

En yüksek amplifikasyon veriminin ve en az DNA lezyonunun 0,75 nM ouabain dozunda bulunması nedeniyle lezyon frekansı hesaplanırken formülde AC olarak kontrol grubunun yerine 0,75 nM ouabain dozu kullanıldı.

Şekil 31'de 10 kb'lık zincir başına düşen lezyon frekansı gösterilmiştir.

- 750 ve 75 nM ouabain dozları mtDNA lezyonunu arttırırken, 7,5 nM ve 0,75 nM ouabain lezyonu azalttı.
- Tek başına 2-DG mtDNA lezyonunu arttırdı.

- 2-DG ile kombine 750 nM ouabain lezyonu attırıcı etki gösterdi ancak tek başına 750 nM ouabain dozuna göre azalttı.
- 2-DG ile kombine 75 nM ouabain lezyonda istatistiksel olarak anlamlı bir etki göstermezken tek başına 75 nM ouabain dozu lezyonu arttırdı.
- Tek başına ve 2-DG ile kombine 7,5 nM ouabain lezyonu azaltıcı etki gösterdi
- 2-DG lezyonu arttırıcı etki gösterirken, kombine gruplarda 750 nM, 75 nM ve 7,5 nM ouabain dozlarının tek başına mtDNA lezyonu üzerine olan etkilerini azaltıcı etki gösterdi.
- Bütün gruplar arasında kontrol grubuna göre lezyonda en yüksek artış 750 nM ouabain dozunda oldu.
- Tek başına 0,75 nM ouabain ve 2-DG+7,5 nM ouabain lezyonu azalttı.



Şekil 31: mtDNA lezyon frekansı analiz grafiği

5. TARTIŞMA

Mitokondri, oksijenli solunum yapan tüm ökaryotik hücrelerde bulunan ve enerji üretiminden sorumlu olan organeldir. Hücredeki oksijenin %90'dan fazlası mitokondride tüketilir ve tüketilen oksijenin yaklaşık %2'si süperoksit ve H₂O₂ radikalleri oluşumu ile sonuçlanır (55,76). Solunum zinciri komplekslerinden kompleks I ve kompleks III, ROÜ'nün büyük kısmının üretildiği bölgelerdir (107). Mitokondride oluşan ROÜ, protein, lipit, RNA ve DNA'yı içeren makromoleküllerde oksidatif hasar oluşturmaktadır (55, 76).

Glukoz yoksunluğu, iskemi ve kanser gibi çeşitli hastalıklarla ilişkili bir hücre durumudur (90). Glukoz yoksunluğu sonucu oluşan hücresel stres Hem Oksijenaz-1 (HO-1) ve Grp78 genlerinin ekspresyon artışını da içeren ER stres cevabını uyarılmaktadır (46). Hipoksi, hem grubu, sodyum arsenit, hiperoksi, oksidatif stres, ağır metaller, UV radyasyon, inflamasyon gibi çeşitli uyaranlara cevap olarak HO-1 sentezi artar. HO-1, klasik antioksidan enzimlere ek olarak oksidatif strese karşı önemli bir hücresel savunma mekanizmasıdır (19, 100). Solid tümörlerde iç bölgedeki kötü vaskülarize kanser hücrelerinde, sürekli ya da aralıklı olarak hipoksinin yanı sıra glukoz yoksunluğu da mevcuttur (90). Hipoglisemi ve hipoksinin kemoterapiye rezistansı indüklemesi, solid tümörlerin tedavisinde en önemli problemi oluşturmaktadır (90). 2-DG ile glukoz yoksunluğu oluşturulan HepG2 hücrelerinde ilaç direnci ile ilişkili olan MRP-1 (Multidrug Resistant Associated Protein-1) ve MDR-1 (Multidrug Resistant Gene-1) gen ekspresyonlarında artış bulunmuştur (89). Çalışmamızda 2-DG solid tümörlerin merkezi bölgesindeki hipoglisemik şartları sağlayıcı ajan olarak kullanıldı ve dozu literatür esas alınarak belirlendi (40).

Kanser hücreleri, glukoz depleksiyonunda enerji değişimine adapte olmak amacıyla mitokondriyal biyogenezi ve mitokondriyal ETZ'yi düzenlemektedir. Yi-Chiung ve arkadaşlarının glukoz yoksunluğu olan HepG2 hücreleri üzerinde yaptıkları çalışmada mitokondri kütlesinde azalma ile birlikte 24. saatte mtTFA mRNA ekspresyonunda, 48. saatte ise mtDNA kopya sayısında artış bulmuşlardır (46). Çalışmamızda 2-DG, mtDNA kopya sayısını 1.49 kat ve mtDNA lezyon frekansını 1.9 kat arttırdı ancak mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon frekansını değiştirmedii. 2-DG ile mtDNA kopya sayısındaki artış, glikoliz inhibisyonu sonucu hücrenin alternatif enerji kaynağı

kullanmak amacıyla mitokondriyal biyogenezi arttırmasına bağlı olabilir. 2-DG milimolar konsantrasyonlarda, özellikle de mitokondriyal solunum defekti olan kanser hücrelerinde veya hipoksik çevredeki hücrelerde ATP tükenmesine ve hücre ölümüne neden olmaktadır (21). İnsan glioma hücreleri olan BMG-1 üzerinde yapılan çalışmada kısa süreli (2 saat) 5 mM 2-DG uygulaması önemli derecede ROÜ artışı ve hücre ölümüne yol açmıştır. Glukoz yoksunluğunun oksidatif stresi uyararak DNA hasarına yol açtığı iddia edilmektedir (57). 2-DG ile lezyon frekansında artışın yanında mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon frekansının değişmemesi artan mtDNA kopya sayısı sonucu delesyona uğramış mtDNA'nın dilüsyonuna bağlı olabilir.

2-DG veya glukoz yoksunluğu kanser hücrelerinde ROÜ'yü arttırmaktadır (131). Glukoz yoksunluğu oluşturulmuş PC12 sıçan feokromasitoma hücrelerinde yapılan çalışmada ATP seviyesinde ilk 3 saatte artış saptanmış, sonrasında ise progresif bir azalma izlenmiş ve 6 saat sonrasında ise mitokondriyal membran potansiyelinde düşüş saptanmıştır. Mitokondriyal membran potansiyelindeki düşüşün Ca⁺² salınımını indüklediği, ROÜ üretimini arttırdığı ve sitokrom c gibi pro-apoptotik faktörlerin mitokondriden salınımını hızlandırdığı rapor edilmiştir (74). Glukoz yoksunluğunda; NADPH üretimi azalır, redoks durumu değişip tiyol metabolizması bozulur ve artan oksidatif stres apoptoza duyarlılığı arttırır (57, 83).

Oksidatif DNA hasarı pürin ve pirimidin bazlarında modifikasyonlara, abazik alanlara, tek ve çift zincir kırıklarına neden olmaktadır (70, 78). Hasarlı nükleotidin DNA polimerazın ilerlemesini bloke ederek hedef sekansın amplifikasyonunda düşüşe neden olması PCR ile yapılan gen spesifik DNA hasarı çalışmalarının prensibini oluşturmaktadır (70). Ouabainin neden olduğu hücre içi Ca²⁺ ve ROÜ artışının çift iplikçik DNA kırıklarına ve buna bağlı hücre apoptozuna neden olduğu iddia edilmektedir (141).

mtDNA delesyonu, mtDNA'dan bir bazdan birkaç kilobaza kadar farklı uzunluklarda olabilen bir bölgenin eksilmesi sonucu ortaya çıkan mutasyondur (62, 109). 4977 bç uzunluğundaki delesyon, yüksek insidansı nedeniyle yaygın delesyon (mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu, common deletion) olarak adlandırılmaktadır. Bu delesyon, mtDNA'da 8470-8482 ve 13447-13459 nükleotidler arasında 13 bç uzunluğundaki tekrar dizilerinde bir kırılma ile ortaya çıkar (50, 59, 143). Delesyona uğrayan mtDNA

bölgesi, 5 tRNA geni ile sitokrom c oksidaz, kompleks I ve ATPaz altünitelerini kodlayan 7 geni içermektedir (143). 4977 bç uzunluğundaki delesyon, Pearson Sendromu, Oküler miyopatiler, Kronik Progresif Eksternal Oftalmopleji (CPEO), Kearns Sayre Sendromu (KSS) gibi çeşitli patolojik fenotiplerle ilişkilendirilmiş ve yaşlanma ile birikim gösterdiği bulunmuştur (20, 50, 109). mtDNA delesyonları özellikle iskelet kası, miyokart ve beyin gibi postmitotik dokularda biriktiği gösterilmiştir (62, 70). Delesyonların, mtDNA'nın replikasyonu sırasında ve oksidatif hasar sonucu meydana gelen tek veya çift zincir DNA kırıkları ile oluştuğu düşünülmektedir (62, 70). mtDNA delesyonunun görüldüğü dokularda mitokondriyal solunum fonksiyonlarının azalabileceği, ATP üretiminin azalması ile beraber ROÜ'nün artabileceği ve hatta hücrelerin ölümü ile sonuçlanabileceği rapor edilmiştir (78, 126).

Ouabain ve diğer KTS'lerin mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu ve mtDNA lezyonu ile ilişkili olduğuna dair herhangi bir çalışma mevcut değildir. Biz de çeşitli dozlardaki ouabainin mtDNA hasarı üzerine etkisinin olup olmadığını araştırmak amacıyla mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunu ve mtDNA lezyon frekansını inceledik. Çalışmamızda tek başına 750 nM, 75 nM ve 7,5 nM ouabain dozları sırasıyla 1.39, 1.92 ve 1.44 kat mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunu arttırdı. 2-DG mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu üzerine etki göstermezken, 750 nM ve 75 nM ouabain ile kombine edildiğinde sırasıyla 4.94 ve 1.57 kat mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunu arttırdı.

Çalışmamızda 10 kb uzunluğundaki mtDNA'da lezyon frekansı 750 nM ve 75 nM ouabain dozlarında kontrole oranla sırasıyla 2.5 ve 1.5 kat artmış, 7,5 nM ve 0,75 nM ouabain dozlarında ise azalmış bulduk. 2-DG ile kombine 750 nM ouabain dozunda lezyon frekansı 2.28 kat artarken, 75 nM ouabain kombinasyonunda değişmedi. 2-DG ile 7,5 nM ouabain kombinasyonunda lezyon frekansı azaldı. HepG2 hücrelerinde yapılan çalışmada yüksek doz ouabain (75 nM ve 750 nM) tek başına ve 2-DG ile kombine edildiğinde HO-1 ekspresyonunu arttırmış ve sitotoksik etki göstermiştir. Bu durum ouabainin HepG2 hücrelerinde hücresele strese yol açtığını düşündürmektedir (89).

mtDNA kopya sayısı, hücre tipine, hücrenin enerji ihtiyacına ve hücrenin büyüme ve farklılaşma evrelerine göre değişiklik göstermektedir (68). Her bir mitokondri 2-10 kopya mtDNA bulundurur (107, 93). Yaşlı dokularda mtDNA içeriği

yüksek bulunmuştur ve bunun yaşlanma ile artan oksidatif stres ile ilişkili olduğu gözlenmiştir. mtDNA'daki bu artışın, defektif mitokondri sonucu zayıflamış solunum zincirini veya mutasyona uğramış DNA'yı kompanse etmek amacıyla geliştiği belirtilmiştir (68). QPCR kullanarak yaptığımız çalışmamızda hücre başına düşen mtDNA kopya sayılarını kontrol grubuna oranla 2-DG grubunda 1,49 kat ve 2-DG ile kombine 750 nM, 75 nM, 7,5 nM ve 0,75 nM ouabain gruplarında sırasıyla 1.38, 1.44, 1.4 ve 1.53 kat artmış olarak bulduk. Tek başına 750 nM ouabain dozu kopya sayısını değiştirmezken 75 nM ouabain dozu mtDNA kopya sayısını 0.75 kat azalttı, 7,5 nM ve 0,75 nM ouabain dozları ise sırasıyla 1.67 ve 1.95 kat arttırdı.

mtDNA içeriğinin mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte kanser tipine spesifik olarak değiştiği belirtilmektedir (20). Replikasyon ve transkripsiyonun kontrol bölgesi olan D-loop'daki yüksek somatik mutasyon frekansının birçok kanser tipindeki düşük mtDNA kopya sayısına yol açabileceği düşünülmektedir (67). Tümör dokularındaki mtDNA kopya sayısı ve mutasyonlarındaki değişimin tümör oluşumunu, fenotipini ve kemoterapötik ajanlara duyarlılığını etkileyebileceği belirtilmiştir (144). mtDNA kopya sayısı mide ve göğüs kanseri ile HCC'de düşük, renal onkositomada, over, baş-boyun, endometrium ve kolorektal kanserde ise yüksek bulunmuştur (20). Düşük mtDNA içeriğinin böbrek kanserinde tümör agresifliğinde artış, mide kanserinde düşük diferansiyasyon ve HCC'de tümör büyüklüğü ve siroza gidiş ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (67). HCC hastalarının tümör dokuları ile tümör olmayan karaciğer dokularının mtDNA kopya sayıları analiz edilmiş ve tümör hücrelerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda düşük bulunmuştur (144).

mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunun, kolorektal, mide, karaciğer, böbrek, akciğer ve prostat kanserindeki solunum defektine katkıda bulunduğu ve tümör progresyonu ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir (130, 143). Yin ve arkadaşları HCC hastalarının tümör dokularındaki mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunu, tümör olmayan karaciğer dokularına oranla düşük bulmuşlar ve bunun nedenini HCC hücrelerindeki yüksek mitotik aktivite sonucu delesyonlu mtDNA'nın dilüsyonuna bağlamışlardır (144).

Na⁺/K⁺-ATPaz pompası iyon transportunun yanısıra bir sinyal reseptörü olarak görev yapmaktadır (87, 141). Na⁺/K⁺-ATPaz ile KTS etkileştiğinde farklı hücre tiplerinde çeşitli sinyal kaskadlarını aktive etmektedir. Ouabainin Na⁺/K⁺-ATPaz ile

etkileşimi sonucu aktiflenen sinyal yolları; Src kinaz aktivasyonu, Src tarafından EGFR transaktivasyonu ve Ras/Raf/MEK/ERK1/2 yolunun aktivasyonu ve mitokondriyal ROÜ oluşumunu kapsar (60). Kardiyak miyositlerde bu sinyal yollarının aktivasyonu sonucunda büyüme ile ilişkili kardiyak gen ekspresyonunun düzenlenmesi, protein sentezinin stimülasyonu ve miyosit hipertrofisi görülmektedir ve bu olaylarda ROÜ ve Ca⁺² ikincil mesajcı olarak fonksiyon göstermektedir (137, 139). Kardiyak miyositlerin dışında yapılan hücre çalışmalarında da ouabain ile indüklenen ROÜ oluşumu gösterilmiştir (49, 54, 64, 73, 141).

Kanser hücrelerinin ouabainle muamele edilmesinin apoptotik hücre ölümüne aracılık ettiği gösterilmiştir. Ouabain, glioma gibi kanser türlerinde apoptozis indüksiyonu ve sitotoksik ilaçların proapoptotik etkilerini artırma gibi etkilere yol açmıştır (141). Ouabainin farklı hücre tiplerinde ROÜ oluşumunu indüklediği ve kanser hücrelerinde doza bağlı olarak hem proliferasyonu hem de apoptozu uyardığı gösterilmiştir (22, 49, 54, 64, 73, 141). HepG2 hücrelerinde yapılmış proliferasyon ve canlılık analizinde 0,75 nM ve 7,5 nM düşük doz ouabain proliferatif etki göstermiştir. 750 nM ouabain ise glukoz yoksunluğu koşullarında ve tek başına sitotoksik etki göstermiş, apoptozis ile ilişkili genlerden CHOP ve Par-4 ekspresyonlarında artışa yol açmıştır (89).

İnsan prostat adenokarsinom PC-3 hücrelerinde 3 nM ouabain mitokondriyal membran potansiyelinde azalmaya ve apoptozu neden olmuştur (43). PC-3 hücresinde 10 nM'dan az konsantrasyondaki ouabain 7 saatlik uygulamada mitokondriyal aktiviteyi azaltmıştır. Yüksek konsantrasyonlarda ouabain 2 saatlik uygulamada mitokondriyal fonksiyonu hızla bozmuş ve ROÜ artışı ile apoptozu uyarmıştır. 30 nM ouabain konsantrasyonunda orta düzeyde ROÜ artışı ve mitokondriyal membran potansiyelinde düşüş gözlenirken, 300 nM ouabain konsantrasyonunda ciddi düzeyde ve hızlı gelişen mitokondriyal membran potansiyelinde düşüş ve ROÜ'de 3.3 katlık bir artış saptanmıştır (49).

0,1 µM ouabain ile muamele edilen HepG2 hücrelerinde ROÜ ölçümü yapılmış ve kontrol hücrelerine göre istatistiksel olarak anlamlı oranda yüksek bulunmuştur (141). 1 µM ve 10 µM ouabain ile muamele edilen SH-SY5Y hücreleri 30 dakika içinde kontrol hücrelerinden yaklaşık % 50 daha fazla miktarda ROÜ üretmiştir ve sitozolik

Ca^{2+} da yaklaşık % 25 artmıştır (64). Ouabain hücre içi iyonik dengeyi değiştirmeden sinyal iletimi aracılığıyla ve glikolizi azaltarak tümör hücrelerinde Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat (NADPH) miktarını azaltarak ROÜ'yü arttırmakta ve mitokondriyal ATP üretimini azaltmaktadır (54, 141). Yüksek konsantrasyonda ouabain (μM) PC-3, LNCAP ve DU145 prostat kanser hücrelerinde kaspaz-3 aktivasyonu, mitokondriden erken sitokrom c salınımı, mitokondriyal membran potansiyel kaybı ve ROÜ oluşumuna yol açarak apoptozisi indüklemiştir (49, 133).

Malign meme kanser hücreleri, prostat karsinom hücreleri, insan lösemi hücreleri ve nöronal hücreleri KTS ile muamele edildiğinde hücre ölümü gerçekleşmiştir ve bu durum KTS'nin yalnızca konjestif kalp yetmezliğinde değil kanser tedavisinde de kullanılabileceğini düşündürmektedir (64). Kalp problemleri nedeniyle KTS kullanan ve kanserden ölen hastalarda retrospektif epidemiyolojik çalışmalar yapılmıştır. Stenkvist ve arkadaşları KTS'in (digoksin ve digitoksin) kanser üzerinde terapötik etkileri olduğunu rapor etmişlerdir. 32 tanesi tanı konulduğunda dijital tedavisi alan meme kanserli 175 hastayı 22 yıl izleyerek, ölüm oranlarını dijital alan grupta % 6 almayan grupta % 34 olarak gözlemişlerdir (114). Bufadienolid sınıfından bir KTS olan bufalin yüzyıllardır geleneksel Çin tıbbında malign hepatosellüler ve hematolojik kanser tedavisinde kullanılmaktadır (96)

75 nM'a kadar olan ouabain dozları tek başına HepG2 hücrelerinde apoptotik etki göstermezken 2-DG ile kombine edildiğinde apoptotik etki göstermiştir (89). Ouabainin HepG2 hücrelerinde proliferasyonu inhibe ettiği, hücre apoptozunu indüklediği, hücre döngüsü S fazı arresti oluşturduğu saptanmıştır. HepG2 hücresinde Na^+/K^+ -ATPaz $\alpha 1$ altbirim siRNA'sının hücre içi Ca^{2+} ve ROÜ artışı yaparak apoptozu indüklediği gösterilmiştir (141).

Çalışmamızda ouabain doza ve 2-DG ile kombinasyonuna bağlı olarak HepG2 hücrelerinin mtDNA kopya sayısı, mtDNA lezyon frekansı ve mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu üzerinde farklı etkiler gösterdi. Yüksek doz ouabain tek başına ve 2-DG ile kombine iken mtDNA lezyon frekansını ve mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunu arttırdı. Bu artış ouabainin kanser hücrelerinde oksidatif stres oluşturarak DNA hasarı ve apoptozis yaptığı savını desteklemektedir.

6. SONUÇLAR

1. mtDNA ve mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon kopya sayılarının belirlenmesinde kullanılan uygun primer ve probların dizaynı için yapılan biyoinformatik analizler tarafımızca gerçekleştirildi.
2. Tm hesaplama programlarının farklı sonuçlar vermesi nedeniyle primerlerin en uygun annealing derecesini belirlemek için Gradient PCR çalışılıp ürünlerin agaroz jelde görüntülenmesi gerektiği anlaşıldı.
3. QPCR ile yapılan çalışmamızda absöü ve relatif kantitasyon metodları ile yakın değerler bulunması, QPCR çalışmalarında absöü kantitasyon yerine standart hazırlığı gerektirmeyen relatif kantitasyonun yeterli olabileceğini gösterdi.
4. mtDNA lezyon analizi için XL-PCR ürünlerinin kantitasyonu QPCR yöntemiyle hızlı, hassas ve kolay bir şekilde başarıyla gerçekleştirildi.
5. 2-DG, mtDNA kopya sayısını ve mtDNA lezyon frekansını arttırdı ancak mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyon frekansını değiştirmedi.
6. 2-DG ile kombine tüm gruplarda mtDNA kopya sayısı arttı.
7. 75 nM ouabain mtDNA kopya sayısını azaltırken, 7.5 ve 0.75 nM ouabain dozları arttırdı.
8. 750, 75 ve 7.5 nM ouabain dozları mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonunu, 750 ve 75 nM ouabain dozları mtDNA lezyon frekansını arttırdı.
9. 750 ve 75 nM ouabain dozlarının tek başına uygulandığında mtDNA lezyon frekansını arttırıcı etkisi 2-DG ile kombine edildiğinde azaldı.
10. 2-DG, 750 nM ouabainin tek başınayken mtDNA⁴⁹⁷⁷ delesyonu üzerindeki arttırıcı etkisini daha da arttırırken daha düşük ouabain dozlarının etkisini azalttı.
11. Ouabain, doza bağlı olarak mtDNA üzerinde farklı etkiler göstermektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Aft RL, Zhang FW, Gius D. Evaluation of 2-deoxy-D-glucose as a chemotherapeutic agent: mechanism of cell death. *Br J Cancer*. 2002 Sep 23;87(7):805-12.
2. Ahmad IM, Mustafa EH, Mustafa NH, Tahtamouni LH, abdalla MY. 2DG enhances the susceptibility of breast cancer cells to doxorubicin *Central European Journal of Biology* 2010 5(6):739-748
3. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of The Cell*, Third Edition, Garland Publishing Inc, USA. 1994; 653-720.
4. Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*. 1981; 290:457-65.
5. Applied Biosystems, *Guide to Performing Relative Quantitation of Gene Expression Using Real-Time Quantitative PCR*
6. Aydemir-Koksoy A, Abramowitz J, Allen JC. Ouabain-induced signaling and vascular smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7;276(49):46605-11.
7. Aykin-Burns N, Ahmad IM, Zhu Y, Oberley LW, Spitz DR. Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. *Biochem J*. 2009 Feb 15;418(1):29-37.
8. Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV. Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev*. 2009 Mar;61(1):9-38.
9. Baumforth KR, Nelson PN, Digby JE, O'Neil JD, Murray PG. Demystified . the polymerase chain reaction. *Mol Pathol*. 1999 Feb;52(1):1-10.

10. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry*, Fifth Edition, New York: W H Freeman; 2002. Chapter 18
11. Bohr VA. Repair of oxidative DNA damage in nuclear and mitochondrial DNA, and some changes with aging in mammalian cells. *Free Radical Bio Med.* 2002 May 1;32(9):804-12.
12. Brandon MC, Lott MT, Nguyen KC, Spolim S, Navathe SB, Baldi P, et al. MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. *Nucleic Acids Res.* 2005 Jan 1;33(Database issue):D611-3.
13. Brown TA, Clayton DA. Release of replication termination controls mitochondrial DNA copy number after depletion with 2',3'-dideoxycytidine. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):2004-10.
14. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech.* 2004 Sep;15(3):155-66
15. Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 2002 Aug;29(1):23-39.
16. Cao J, Jia L, Zhou HM, Liu Y, Zhong LF. Mitochondrial and nuclear DNA damage induced by curcumin in human hepatoma G2 cells. *Toxicol Sci.* 2006 Jun;91(2):476-83.
17. Caplin BE, Rasmussen RP, Bernard PS, Wittwer CT. LightCyclerTM hybridization probes – the most direct way to monitor PCR amplification and mutation detection. *Biochemica* 1, 5–8 (1999).
18. Chang DD, Hixson JE, Clayton DA. Minor Transcription Initiation Events Indicate That Both Human Mitochondrial Promoters Function Bidirectionally. *Molecular and Cellular Biology.* 1986 Jan;6(1):294-301.
19. Chang SH, Garcia J, Melendez JA, Kilberg MS, Agarwal A. Haem oxygenase 1 gene induction by glucose deprivation is mediated by reactive oxygen species via the mitochondrial electron-transport chain. *Biochem J.* 2003 May 1;371(Pt 3):877-85.

20. Chen T, He J, Shen L, Fang H, Nie H, Jin T, et al. The mitochondrial DNA 4,977-bp deletion and its implication in copy number alteration in colorectal cancer. *BMC Med Genet.* 2011;12:8.
21. Chen Z, Lu W, Garcia-Prieto C, Huang P. The Warburg effect and its cancer therapeutic implications. *J Bioenerg Biomembr.* 2007 Jun;39(3):267-74.
22. Chueh SC, Guh JH, Chen J, Lai MK, Teng CM. Dual effects of ouabain on the regulation of proliferation and apoptosis in human prostatic smooth muscle cells. *J Urol.* 166: 47-53, 2001
23. Cooper GM, Hausman RE, *The Cell, a molecular approach.* Üçüncü baskı çevirisi. Çeviri Editörleri: Sakızlı M, Atabey N. *Hücre, Moleküler yaklaşım.* İzmir Tıp Kitabevi, 2006, 399-434.
24. Cornelius F, Mahmmoud YA. Interaction between Cardiotonic Steroids and Na,K-ATPase. Effects of pH and Ouabain-Induced Changes in Enzyme Conformation. *Biochemistry.* 2009 Oct 27;48(42):10056-65.
25. Delibaş N, Serbest Radikaller SDÜ tıp fakültesi dergisi 1995; 2 (3):11-17
26. Durmaz R. Polimeraz zincir reaksiyonu tipleri. Durmaz R (Ed.), *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji, 2. Baskı,* Kozan Ofset, Ankara, 2001: 35-43.
27. Dwarakanath BS. Cytotoxicity, radiosensitization, and chemosensitization of tumor cells by 2-deoxy-D-glucose in vitro. *J Cancer Res Ther.* 2009 Sep;5 Suppl 1:S27-31.
28. Eberhardt NL. A shell program for the design of PCR primers using genetics computer group (GCG) software (7.1) on VAX/VMS systems. *Biotechniques* 13: 914-7, 1992
29. Elpeleg O, Mandel H, Saada A. Depletion of the other genome-mitochondrial DNA depletion syndromes in humans. *J Mol Med.* 2002 Jul;80(7):389-96.
30. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Jan;19(1):165-256.

31. Falkenberg M, Gaspari M, Rantanen A, Trifunovic A, Larsson NG, Gustafsson CM. Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nat Genet.* 2002 Jul;31(3):289-94.
32. Fernandez-Silva P, Enriquez JA, Montoya J. Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol.* 2003 Jan;88(1):41-56.
33. Fisher RP, Clayton DA. A Transcription Factor Required for Promoter Recognition by Human Mitochondrial Rna-Polymerase - Accurate Initiation at the Heavy-Strand and Light-Strand Promoters Dissected and Reconstituted Invitro. *Journal of Biological Chemistry.* 1985;260(20):1330-8.
34. Giles RE, Blanc H, Cann HM, Wallace DC. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1980 Nov;77(11):6715-9.
35. Ginzinger DG. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol.* 2002 Jun;30(6):503-12.
36. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods.* 2001;25:386-401.
37. Goldstein S, Meyerstein D, Czapski G. The Fenton reagents. *Free Radic Biol Med.* 1993 Oct;15(4):435-45.
38. Gottlieb SS, Rogowski AC, Weinberg M, Krichten CM, Hamilton BP, Hamlyn JM. Elevated Concentrations of Endogenous Ouabain in Patients with Congestive-Heart-Failure. *Circulation.* 1992 Aug;86(2):420-5.
39. GÜNEL T. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR”. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2007, 27:763-767
40. Haga N, Saito S, Tsukumo Y, Sakurai J, Furuno A, Tsuruo T, et al. Mitochondria regulate the unfolded protein response leading to cancer cell survival under glucose deprivation conditions. *Cancer Sci.* 2010 May;101(5):1125-32.

41. Hamlyn JM, Blaustein MP, Bova S, Ducharme DW, Harris DW, Mandel F, et al. Identification and Characterization of a Ouabain-Like Compound from Human Plasma. *P Natl Acad Sci USA*. 1991 Jul;88(14):6259-63
42. Harbottle A, Krishnan KJ, Birch-Machin MA. Implications of using the ND1 gene as a control region for real-time PCR analysis of mitochondrial DNA deletions in human skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 2004 Jun;122(6):1518-21.
43. Harwood S, Yaqoob MM. Ouabain-induced cell signaling. *Front Biosci*. 2005;10:2011-7.
44. Hecker KH, Roux KH. High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *Biotechniques*. 1996 Mar;20(3):478-85.
45. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):986-94.
46. Hsu YC, Chi CW. Modulation of mitochondrial biogenesis by nitric oxide during glucose deprivation in human hepatoma cells. *Proc Amer Assoc Cancer Res*, Volume 47, 2006
47. <http://dorakmt.tripod.com/genetics/realtime.html>
48. <https://www.roche-applied-science.com/sis/rtPCR/upl/index.jsp?id=UP030000>
49. Huang YT, Chueh SC, Teng CM, Guh JH. Investigation of ouabain-induced anticancer effect in human androgen-independent prostate cancer PC-3 cells. *Biochem Pharmacol*. 2004 Feb 15;67(4):727-33.
50. Ieremiadou F, Rodakis GC. Correlation of the 4977 bp mitochondrial DNA deletion with human sperm dysfunction. *BMC Res Notes*. 2009;2:18.
51. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, et al. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem*. 2003 Dec;10(23):2495-505.

52. Jones NL. PCR. Principles, procedures, and parameters. *Methods Mol Biol.* 2002;187:37-46.
53. K. Bagchi and S. Puri, Free radicals and antioxidants in health and disease, *Eastern Mediterranean Health Journal*, Volume 4, Issue 2, 1998, Page 350-360
54. Kajikawa M, Fujimoto S, Tsuura Y, Mukai E, Takeda T, Hamamoto Y, et al. Ouabain suppresses glucose-induced mitochondrial ATP production and insulin release by generating reactive oxygen species in pancreatic islets. *Diabetes.* 2002 Aug;51(8):2522-9.
55. Kang D, Hamasaki N. Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin Chem Lab Med.* 2003 Oct;41(10):1281-8.
56. Kang HT, Hwang ES. 2-Deoxyglucose: an anticancer and antiviral therapeutic, but not any more a low glucose mimetic. *Life Sci.* 2006 Feb 16;78(12):1392-9.
57. Khaitan D, Chandna S, Dwarakanath SB. Short-term exposure of multicellular tumor spheroids of a human glioma cell line to the glycolytic inhibitor 2-deoxy-D-glucose is more toxic than continuous exposure. *J Cancer Res Ther.* 2009 Sep;5 Suppl 1:S67-73.
58. Kılınç K, Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2002;33:110-118.
59. Koch H, Wittern KP, Bergemann J. In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation. *J Invest Dermatol.* 2001 Oct;117(4):892-7.
60. Kometiani P, Li J, Gnudi L, Kahn BB, Askari A, Xie Z. Multiple signal transduction pathways link Na⁺/K⁺-ATPase to growth-related genes in cardiac myocytes. The roles of Ras and mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1998 Jun 12;273(24):15249-56.
61. Kowaltowski AJ. Alternative mitochondrial functions in cell physiopathology: beyond ATP production. *Braz J Med Biol Res.* 2000 Feb;33(2):241-50.

62. Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, Chinnery PF, Blackwood JK, Taylor RW, et al. What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat Genet.* 2008 Mar;40(3):275-9.
63. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, et al. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* 2006 Apr-Jun;27(2-3):95-125.
64. Kulikov A, Eva A, Kirch U, Boldyrev A, Scheiner-Bobis G. Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochim Biophys Acta.* 2007 Jul;1768(7):1691-702.
65. Langseth L. Oxidants, antioxidants and disease prevention. Belgium, International Life Science Institute, 1996.
66. Laws GM, Skopek TR, Reddy MV, Storer RD, Glaab WE. Detection of DNA adducts using a quantitative long PCR technique and the fluorogenic 5' nuclease assay (TaqMan). *Mutat Res.* 2001 Dec 12;484(1-2):3-18.
67. Lee HC, Hsu LS, Yin PH, Lee LM, Chi CW. Heteroplasmic mutation of mitochondrial DNA D-loop and 4977-bp deletion in human cancer cells during mitochondrial DNA depletion. *Mitochondrion.* 2007 Feb-Apr;7(1-2):157-63.
68. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005 Apr;37(4):822-34.
69. Lee HC, Wei YH. Mitochondrial role in life and death of the cell. *J Biomed Sci.* 2000 Jan-Feb;7(1):2-15.
70. Lee HC, Wei YH. Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and apoptosis in aging. *Exp Biol Med (Maywood).* 2007 May;232(5):592-606
71. Li J, Zelenin S, Aperia A, Aizman O. Low doses of ouabain protect from serum deprivation-triggered apoptosis and stimulate kidney cell proliferation via activation of NF-kappaB. *J Am Soc Nephrol.* 2006 Jul;17(7):1848-57.

72. Lin X, Zhang F, Bradbury CM, Kaushal A, Li L, Spitz DR, et al. 2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism. *Cancer Res.* 2003 Jun 15;63(12):3413-7.
73. Liu J, Tian J, Haas M, Shapiro JI, Askari A, Xie Z. Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. *J Biol Chem.* 2000 Sep 8;275(36):27838-44.
74. Liu Y, Song XD, Liu W, Zhang TY, Zuo J (2003) Glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in PC12 cell line. *J Cell Mol Med* 7: 49–56.
75. Logan DC. The mitochondrial compartment. *J Exp Bot.* 2006;57(6):1225-43.
76. Ma YS, Wu SB, Lee WY, Cheng JS, Wei YH. Response to the increase of oxidative stress and mutation of mitochondrial DNA in aging. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Oct;1790(10):1021-9.
77. Maher JC, Krishan A, Lampidis TJ. Greater cell cycle inhibition and cytotoxicity induced by 2-deoxy-D-glucose in tumor cells treated under hypoxic vs aerobic conditions. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2004 Feb;53(2):116-22.
78. Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res.* 2002 Nov 30;509(1-2):127-51.
79. Manunta P, Hamilton J, Rogowski AC, Hamilton BP, Hamlyn JM. Chronic hypertension induced by ouabain but not digoxin in the rat: Antihypertensive effect of digoxin and digitoxin. *Hypertens Res.* 2000 Sep;23:S77-S85.
80. Maschek G, Savaraj N, Priebe W, Braunschweiger P, Hamilton K, Tidmarsh GF, et al. 2-deoxy-D-glucose increases the efficacy of adriamycin and paclitaxel in human osteosarcoma and non-small cell lung cancers in vivo. *Cancer Res.* 2004 Jan 1;64(1):31-4.
81. Mates JM, Sanchez-Jimenez FM. Role of reactive oxygen species in apoptosis: implications for cancer therapy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000 Feb;32(2):157-70.

82. Meissner C. Mutations of mitochondrial DNA - cause or consequence of the ageing process? *Z Gerontol Geriatr.* 2007 Oct;40(5):325-33.
83. Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodovar C, Palacios C, Lopez-Rivas A. Inhibition of glucose metabolism sensitizes tumor cells to death receptor-triggered apoptosis through enhancement of death-inducing signaling complex formation and apical procaspase-8 processing. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11;278(15):12759-68.
84. Naviaux RK. Mitochondrial DNA disorders. *Eur J Pediatr.* 2000 Dec;159 Suppl 3:S219-26.
85. Nelson DL, Cox MM. *Lehninger Principle of Biochemistry.* Üçüncü baskı çevirisi. Çeviri Editörü: Kılıç N. *Lehninger Biyokimyanın ilkeleri.* Palme yayıncılık, 2005, 659-690.
86. Nesher M, Shpolansky U, Rosen H, Lichtstein D. The digitalis-like steroid hormones: New mechanisms of action and biological significance. *Life Sciences.* 2007 May 16;80(23):2093-107.
87. Nguyen AN, Wallace DP, Blanco G. Ouabain binds with high affinity to the Na,K-ATPase in human polycystic kidney cells and induces extracellular signal-regulated kinase activation and cell proliferation. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Jan;18(1):46-57.
88. Osawa S, Jukes TH, Watanabe K, Muto A. Recent evidence for evolution of the genetic code. *Microbiol Rev.* 1992 Mar;56(1):229-64.
89. Özdemir T, Bedir A. HepG2 hücre kültürlerinde ouabainin antikanser etkisi ve endoplazmik retikulum stres cevabı ile ilişkisi. OMÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi. Samsun 2011
90. Park HR, Tomida A, Sato S, Tsukumo Y, Yun J, Yamori T, Hayakawa Y, Tsuruo T, Shin-ya K. Effect on Tumor Cells of Blocking Survival Response to Glucose Deprivation. *J Natl Cancer Inst.* 96: 1300-10, 2004
91. Pekbay A, Çetin M, Bedir A, Saniç A, Günaydın M. HGVS RNA'nın Saptanmasında Touchdown-PCR'in Önemi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 2000; 32: 247-249

92. Pelicano H, Martin DS, Xu RH, Huang P. Glycolysis inhibition for anticancer treatment. *Oncogene*. 2006 Aug 7;25(34):4633-46.
93. Penta JS, Johnson FM, Wachsman JT, Copeland WC. Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res*. 2001 May;488(2):119-33.
94. Pessayre D, Schmitt P, Fromenty B. Chapter 2. Long PCR from Damaged DNA. *PCR Technology: Current Innovations, Second Edition*. Edited by Griffin H.G, Weissensteiner T, Griffin A. CRC Press 2003 P 11–21
95. Powledge TM. The polymerase chain reaction. *Adv Physiol Educ*. 2004 Dec;28(1-4):44-50.
96. Qi F, Inagaki Y, Gao B, Cui X, Xu H, Kokudo N, et al. Bufalin and cinobufagin induce apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells via Fas- and mitochondria-mediated pathways. *Cancer Sci*. 2011 May;102(5):951-8.
97. Radonic A, Thulke S, Mackay IM, Landt O, Siegert W, Nitsche A. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochem Bioph Res Co*. 2004 Jan 23;313(4):856-62.
98. Richter C, Park JW, Ames BN. Normal Oxidative Damage to Mitochondrial and Nuclear-DNA Is Extensive. *P Natl Acad Sci USA*. 1988 Sep;85(17):6465-7.
99. Rishi S, Manjeer S, Ajay S. Polymerase chain reaction: An emerging tool for research in pharmacology. *IJP July-August 2002*, 34(4):229-236
100. Ryter SW, Alam J, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev*. 2006 Apr;86(2):583-650.
101. S. Kumari, R. P. Rastogi, K. L. Singh, S. P. Singh, and R. P. Sinha, "DNA damage: detection strategies," *EXCLI Journal*, vol. 7, pp. 44–62, 2008.
102. Saito S, Furuno A, Sakurai J, Sakamoto A, Park HR, Shin-Ya K, et al. Chemical genomics identifies the unfolded protein response as a target for selective cancer cell killing during glucose deprivation. *Cancer Res*. 2009 May 15;69(10):4225-34.

103. Salazar JJ, Van Houten B. Preferential mitochondrial DNA injury caused by glucose oxidase as a steady generator of hydrogen peroxide in human fibroblasts. *Mutat Res.* 1997 Nov;385(2):139-49.
104. Santos JH, Mandavilli BS, Van Houten B. Measuring oxidative mtDNA damage and repair using quantitative PCR. *Methods Mol Biol.* 2002;197:159-76.
105. Sauer H, Wartenberg M, Hescheler J. Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation. *Cell Physiol Biochem* 2001;11:173-186
106. Saunders R, Scheiner-Bobis G. Ouabain stimulates endothelin release and expression in human endothelial cells without inhibiting the sodium pump. *Eur J Biochem.* 2004 Mar;271(5):1054-62.
107. Sawyer DE, Van Houten B. Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat Res-DNA Repair.* 1999 Jul 30;434(3):161-76.
108. Scandalios JG. The rise of ROS. *Trends Biochem Sci.* 2002 Sep;27(9):483-6.
109. Schapira AH. Mitochondrial disease. *Lancet.* 2006 Jul 1;368(9529):70-82.
110. Scheffler IE. A century of mitochondrial research: achievements and perspectives. *Mitochondrion.* 2001 Jun;1(1):3-31.
111. Scheiner-Bobis G, Schoner W. A fresh facet for ouabain action. *Nat Med.* 2001 Dec;7(12):1288-9.
112. Scheiner-Bobis G. The Na⁺, K⁺-ATPase: more than just a sodium pump. *Cardiovascular Research.* 2011 Jan;89(1):6-8.
113. Schneider R, Wray V, Nimitz M, Lehmann WD, Kirch U, Antolovic R, et al. Bovine adrenals contain, in addition to ouabain, a second inhibitor of the sodium pump. *Journal of Biological Chemistry.* 1998 Jan 9;273(2):784-92.
114. Schoner W, Scheiner-Bobis G. Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol-Cell Ph.* 2007 Aug;293(2):C509-C36.

115. Schonert W. Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *European Journal of Biochemistry*. 2002 May;269(10):2440-8.
116. Schultz BE, Chan SI. Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*. 2001;30:23-65.
117. Schwartz M, Vissing J. New patterns of inheritance in mitochondrial disease. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Oct 17;310(2):247-51.
118. Shacter E. Quantification and significance of protein oxidation in biological samples. *Drug Metab Rev*. 2000 Aug-Nov;32(3-4):307-26.
119. Shadel GS, Clayton DA. Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:409-35.
120. Shang J, Clayton DA. Human mitochondrial transcription termination exhibits RNA polymerase independence and biased bipolarity in vitro. *J Biol Chem*. 1994 Nov 18;269(46):29112-20.
121. Simpson CD, Mawji IA, Anyiwe K, Williams MA, Wang X, Venugopal AL, et al. Inhibition of the sodium potassium adenosine triphosphatase pump sensitizes cancer cells to anoikis and prevents distant tumor formation. *Cancer Res*. 2009 Apr 1;69(7):2739-47. Cancer Cells to Anoikis and Prevents Distant Tumor Formation
122. Singh D, Banerji AK, Dwarakanath BS, Tripathi RP, Gupta JP, Mathew TL, et al. Optimizing cancer radiotherapy with 2-deoxy-d-glucose dose escalation studies in patients with glioblastoma multiforme. *Strahlenther Onkol*. 2005 Aug;181(8):507-14.
123. Smits P, Smeitink J, van den Heuvel L. Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:737385.
124. Taanman JW. The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Feb 9;1410(2):103-23.

125. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005 May;6(5):389-402.
126. Tuppen HA, Blakely EL, Turnbull DM, Taylor RW. Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2010 Feb;1797(2):113-28.
127. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ.* 2005 Sep;29(3):151-9.
128. van der Velden VH, Hochhaus A, Cazzaniga G, Szczepanski T, Gabert J, van Dongen JJ. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia.* 2003 Jun;17(6):1013-34.
129. Van Houten B, Woshner V, Santos JH. Role of mitochondrial DNA in toxic responses to oxidative stress. *DNA Repair (Amst).* 2006 Feb 3;5(2):145-52.
130. Wang J, Lu YY. Mitochondrial DNA 4977-bp deletion correlated with reactive oxygen species production and manganese superoxidedismutase expression in gastric tumor cells. *Chin Med J (Engl).* 2009 Feb 20;122(4):431-6.
131. Wang Q, Liang B, Shirwany NA, Zou MH. 2-Deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase. *PLoS One.* 2011;6(2):e17234.
132. Warburg O. The Metabolism of Tumors *J. Chem. Educ.*, 1930, 7 (1), p 179
133. Winnicka K, Bielawski K, Bielawska A, Surazynski A. Antiproliferative activity of derivatives of ouabain, digoxin and proscillaridin A in human MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biol Pharm Bull.* 2008 Jun;31(6):1131-40.
134. Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J.* 1996 Jan 1;313 (Pt 1):17-29.
135. Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques.* 2005 Jul;39(1):75-85.

136. Xie Z, Cai T. Na⁺-K⁺--ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol Interv*. 2003 May;3(3):157-68.
137. Xie Z, Kometiani P, Liu J, Li J, Shapiro JJ, Askari A. Intracellular reactive oxygen species mediate the linkage of Na⁺/K⁺-ATPase to hypertrophy and its marker genes in cardiac myocytes. *J Biol Chem*. 1999 Jul 2;274(27):19323-8.
138. Xie Z, Xie J. The Na/K-ATPase-mediated signal transduction as a target for new drug development. *Front Biosci*. 2005;10:3100-9.
139. Xie ZJ, Askari A. Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *European Journal of Biochemistry*. 2002 May;269(10):2434-9.
140. XL PCR Amplification of Long Targets from Genomic DNA *Methods in Molecular Biology*, 2002, Volume 192, I, 37-51
141. Xu ZW, Wang FM, Gao MJ, Chen XY, Hu WL, Xu RC. Targeting the Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase alpha1 subunit of hepatoma HepG2 cell line to induce apoptosis and cell cycle arresting. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(5):743-51.
142. Yakes FM, Van Houten B. Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21;94(2):514-9.
143. Ye C, Shu XO, Wen W, Pierce L, Courtney R, Gao YT, et al. Quantitative analysis of mitochondrial DNA 4977-bp deletion in sporadic breast cancer and benign breast diseases. *Breast Cancer Res Treat*. 2008 Apr;108(3):427-34.
144. Yin PH, Lee HC, Chau GY, Wu YT, Li SH, Lui WY, et al. Alteration of the copy number and deletion of mitochondrial DNA in human hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer*. 2004 Jun 14;90(12):2390-6.
145. Yuan Z, Cai T, Tian J, Ivanov AV, Giovannucci DR, Xie Z. Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP3 receptor into a calcium-regulatory complex. *Mol Biol Cell*. 2005 Sep;16(9):4034-45.

146. Zastawny TH, Dabrowska M, Jaskolski T, Klimarczyk M, Kulinski L, Koszela A, et al. Comparison of oxidative base damage in mitochondrial and nuclear DNA. *Free Radic Biol Med.* 1998 Mar 15;24(5):722-5.
147. Zhang L, Zhang Z, Guo H, Wang Y. Na⁺/K⁺-ATPase-mediated signal transduction and Na⁺/K⁺-ATPase regulation. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008 Dec;22(6):615-21.
148. Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. *Biochem Bioph Res Co.* 1999 Jun 16;259(3):523-6.

