BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROPSİKİYATRİK İLAÇ KULLANIMINDA YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE TANI PANELİ GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nigar Duygu TORLAK

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

HAZİRAN 2018

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

NÖROPSİKİYATRİK İLAÇ KULLANIMINDA YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE TANI PANELİ GELİŞTİRİLMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nigar Duygu TORLAK
(150305119)

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Biyoteknoloji Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fahri AKBAŞ

HAZİRAN 2018

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 150305119 numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi Nigar Duygu TORLAK, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "NÖROPSİKİYATRİK İLAÇ KULLANIMINDA YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE TANI PANELİ GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç.Dr. Fahri AKBAŞ** .....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç.Dr. Sema Sırma EKMEKÇİ** .....
İstanbul Üniversitesi

Doç.Dr. Gözde YEŞİL .....
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : 18 Mayıs 2018
Savunma Tarihi : 22 Haziran 2018

AİLEM'E,

ÖNSÖZ

Yüksek lisans programının boyunca çalışmamı yönlendiren; bilgi, tecrübe, emek ve yardımlarını esirgemeyerek katkıda bulunan sayın danışman hocam Doç. Dr. Fahri Akbaş'a,
Tez çalışmam boyunca yardımlarını esirgemeyen, desteklerini her zaman hissettiğim değerli arkadaşlarıma,
Hayatımın her döneminde koşulsuz sevgi ve şefkatle yanımda olan, bana inanıp güvenen, varlıkları ile güç bulduğum çok kıymetli aileme tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Haziran 2018

Nigar Duygu TORLAK
(Biyomühendis)

BEYAN

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

Nigar Duygu TORLAK

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **iv**
BEYAN ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vi**
KISALTMALAR ..... **viii**
TABLO LİSTESİ ..... **x**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xii**
SUMMARY ..... **xiii**
1. GİRİŞ ve AMAÇ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1 Nöropsikiyatrik Hastalıklar 4
2.1.1 Depresyon 4
2.1.1.1 Depresyon tedavisi 5
2.1.1.2 Depresyon tedavisinde kullanılan antidepresan ilaçlar 6
2.1.1.2.1 Monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI) 6
2.1.1.2.2 Trisiklik antidepresanlar (TSA) 7
2.1.1.2.3 Seçici serotonin gerialım inhibitörleri (SSRI) 7
2.2 Farmakogenetik 8
2.2.1 İlaç metabolizması biyotransormasyon 9
2.2.1.1 Faz I enzimleri ve reaksiyonları 10
2.2.1.2 Faz II enzimleri ve reaksiyonları 11
2.2.2 Sitokrom P450 11
2.2.2.1 Sitokrom P450 enzim çalışma mekanizması 12
2.2.2.2 CYP450 enzim isimlendirmesi 13
2.2.2.3 Sitokrom P450 polimorfizmlerinin klinik önemi 13
2.2.2.4 CYP2D6 geni 15
2.2.2.5 CYP2C9 geni 16
2.2.2.6 CYP2C19 geni 17
2.2.2.7 CYP1A2 geni 18
2.2.2.8 CYP3A4 geni 19
2.3 Yeni Nesil Dizileme 20
3. GEREÇ ve YÖNTEM **20**
3.1 Gereç 21
3.1.1 Cihazlar 21
3.1.2 Kimyasallar ve Ticari Kitler 22

3.1.3 Primerler 23
3.2 Yöntem 25
3.2.1 Örneklerin toplanması 26
3.2.2 DNA izolasyonu 26
3.2.3 DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi 26
3.2.4 Primer tasarımı ve primer sulandırma 27
3.2.5 PCR optimizasyonu 27
3.2.6 Amplifikasyon Sonrası Çoğaltılan Ürünleri Kontrolü 29
3.2.6.1 Agaroz Jel Hazırlanması 29
3.2.6.2 PCR Ürünlerinin Değerlendirilmesi 30
3.2.7 Yeni nesil dizileme 30
3.2.7.1 Kütüphane hazırlama 31
3.2.7.2 Manyetik boncuk purifikasyonu 31
3.2.7.3 Miseq sekanslama 32
3.2.7.4 Analiz 33
4. BULGULAR 34
4.1 Genomik DNA İzolasyonu Bulguları 34
4.2 Primerlerin optimizasyonu 35
4.3 Miseq kütüphane hazırlığı ve normalizasyonu 36
4.4 Yeni nesil dizileme run özet verileri 37
4.5 Amplikon Okuma Sayıları 38
4.6 Moleküler analiz 42
5. TARTIŞMA 47
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 60
KAYNAKLAR 62
EKLER 70
ÖZGEÇMİŞ 73

KISALTMALAR

YND	**:** Yeni Nesil Dizileme
PCR	**:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu
CYP	**:** Sitokrom
DNA	**:** Deoksiribo Nükleik Asit
SSRI	**:** Seçici Serotonin Gerialım İnhibitörleri
MAOİ	**:** Monoamin Oksidaz İnhibitörleri
TSA	**:** Trisiklik Antidepresanlar
NaSSA	**:** Alfa 2 Adrenoreseptör Antagonistleri
NRI	**:** Seçici Noradrenerjik Gerialım İnhibitörleri
NDGI	**:** Noradrenalin ve Dopamin Gerialım İnhibitörleri
SNRI	**:** Serotonerjik ve Noradrenalin Gerialım İnhibitörleri
SAGI	**:** Serotonin 2A Antogonistleri / Serotonin Gerialım İnhibitörleri
$R\text{-}CH_2NH_2$	**:** Amin
O_2	**:** Oksijen
MAO	**:** Monoamin Oksidaz
R-CHO	**:** Aldehit
NH3	**:** Amonyak
H2O2	**:** Hidrojen peroksit
G6PD	**:** Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz
FMO	**:** Flavin içeren monooksijenazlar
SULT	**:** Sülfat eklenmesi
UGT	**:** Glukuronosiltransferazlar
GST	**:** Glutatyon -s – transferazlar
NAT	**:** N-asetil transferazlar
CO	**:** Karbon monoksit
nm	**:** Nanometre
NADP	**:** Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
ADR	**:** Ters İlaç Reaksiyonu
del	**:** Delesyon
ins	**:** İnsersiyon
OD	**:** Optik yoğunluk
rpm	**:** Dakikadaki devir sayısı
sn	**:** Saniye
ng	**:** Nanogram
µl	**:** Mikrolitre
°C	**:** Celsius
dk	**:** Dakika
SNP	**:** Tek Nokta Polimorfizmi
TDM	**:** Tedavisel İlaç Kan Düzeyi Monitorizasyonu
CO_2	**:** Karbondioksit
P	**:** Pigment
Fe	**:** Demir

EDTA	**:** Etilendiamin Tetraasetik Asit
NaOH	**:** Sodyum Hidroksit
TBE	**:** Tris-borate-EDTA
mm	**:** Milimetre
bp	**:** Baz çifti
mV	**:** Milivolt
UV	**:** Ultraviyole
EtOH	**:** Etanol
pM	**:** Pikomolar
K/mm2	**:** Milimetrekaredeki küme sayısı
Mb	**:** Mega baz
RFLP	**:** Restriction Fragment Length Polymorphisms
ASO	**:** Alel Spesifik Oligonükleo dler
MAF	**:** Minor Alel Frekansı

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Türkiye'de bulunan antidepresanlar.. 6
Tablo 2.2 : Ksenobiyotik metabolize eden faz I enzimleri. 11
Tablo 2.3 : Ksenobiyotik metabolize eden faz II enzimleri……...11
Tablo 2.4 : Test panelleri ve analiz edilen varyantlar.. 14
Tablo 2.5 : CYP2D6 polimorfizm ve enzim aktivitesine etkisi. 16
Tablo 2.6 : CYP2C9 polimorfizm ve enzim aktivitesine etkisi. 17
Tablo 2.7 : CYP2C19 polimorfizm ve enzim aktivitesine etkisi. 18
Tablo 2.8 : CYP1A2 polimorfizm ve enzim aktivitesine etkisi.. 19
Tablo 3.1 : Çalışmada kullanılan cihaz listesi..... 21
Tablo 3.2 : Kullanılan ticari kitlerin ve kimyasalların listesi ……22
Tablo 3.3 : CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 ve CYP2D6 genlerinin içerdiği SNP'ler için tasarlanan primerler……23
Tablo 3.4 : CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 için PCR protokolü…...…28
Tablo 3.5 : CYP2D6 için PCR protokolü……..28
Tablo 3.6 : CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 için PCR döngüsü…….28
Tablo 3.7 : CYP2D6 için PCR döngüsü……29
Tablo 4.1 : DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri……34
Tablo 4.2 : Amplikonların giriş ve saflaştırma sonrası konsantrasyonları …...……36
Tablo 4.3 : Yeni nesil dizileme run özeti... 37
Tablo 4.4 : 1-10 no'lu DNA'lara ait okuma sayıları.. 39
Tablo 4.5 : 11-20 no'lu DNA'lara ait okuma sayıları. 40
Tablo 4.6 : 1-10 no'lu DNA'lara ait genotipleme.. 44
Tablo 4.7 : 11-20 no'lu DNA'lara ait genotipleme.. 45

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : İlaç metabolizması..... 9
Şekil 2.2 : Sitokrom P450 enzim sisteminin çalışma mekanizması.. 12
Şekil 2.3 : CYP450 adlandırma sistemi.. 13
Şekil 2.4 : CYP2D6 geni yerleşiği..... 15
Şekil 2.5 : CYP2C9 geni yerleşiği.. 17
Şekil 2.6 : CYP2C19 geni yerleşiği.. 18
Şekil 2.7 : CYP1A2 geni yerleşiği..... 19
Şekil 2.8 : CYP3A4 geni yerleşiği..... 20
Şekil 3.1 : Dizileme basamakları. 30
Şekil 4.1 : CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 genleri jel görüntüsü. …... 35
Şekil 4.2 : CYP2D6 geni jel görüntüsü 35
Şekil 4.3 : Amplikonların giriş ve saflaştırma sonrası konsantrasyonları 37
Şekil 4.4 : Miseq cihazı Q30 skor çıktısı.. 38
Şekil 4.5 : Küme yoğunluğu 15
Şekil 4.6 : 1 no'lu hastaya ait varyant raporu.. 42
Şekil 4.7 : 1 no'lu hastaya ait kaplam grafiği. 43
Şekil 4.8 : 1 no'lu hastaya ait referans ve alternatif alellerin dağılımının IGV'de görünümü ……..43
Şekil 4.9 : SNP noktaları ve ortalama okuma derinlikleri 46

NÖROPSİKİYATRİK İLAÇ KULLANIMINDA YENİ NESİL DİZİLEME YÖNTEMİ İLE TANI PANELİ GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yüksek sermayeli teknolojik gelişmelerin kullanılması sonucu olarak sağlık harcamaları artmıştır, aynı zamanda gelişen teknoloji ile harcamalarda bazı tasarruflara imkânda sağlamıştır. Bu tasarrufun en etkili yardımcısı farmakogenetik testler olacaktır. Türkiye'de sağlık harcamalarında ilaçların payı %46, İngiltere ve Amerika'da ise bu oran sadece %12'dir. Farmakogenetik, kişilerin genetik yapılarındaki varyasyonlar nedeni ile ilaçlara verdikleri yanıtlardaki değişiklikleri inceleyen bir bilim dalıdır. 2003 yılında İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasından sonra önem kazanarak dünyada hızla yaygınlaşmaktadır. Bireyin genetik yapısı ile hastalığının tedavisinde kullanılabilecek ilaçların karşılaştırılmasıyla, en etkili ilacın yan etkisi en az olabilecek dozda verilebilmesi sağlanmaktadır. Günümüzde epilepsi, diyabet, kalp hastalıkları, mide hastalıkları, kanser ve depresyon gibi birçok hastalığın tedavisinden önce bireylere farmakogenetik testler yapılabilmektedir.

Farmakogenetiğin geleceğiyle ilgili olarak özellikle üç alan öne çıkacak gibi görünmektedir. Bu alanlar psikiyatri, kardiyoloji ve onkolojidir.

2000 yılında depresyon, ''Yeti Yitimine Ayarlanmış Yaşam Yılı'' olarak değerlendirilen global hastalık yükünün sebepleri arasında dördüncü sırada yer almaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) raporlarına göre, 2020 yılına gelindiğinde, depresyon, tüm yaş ve cinsiyet grupları için ''Yeti Yitimine Ayarlanmış Yaşam Yılı'' değerlendirmelerinde ikinci sırayı alacaktır.

Çalışmamızın konusu olan psikiyatrik hastaların kullandıkları ilaçlar %35-45'i tedaviye yanıt verirken, %30-50'si tedaviye cevap verememekte veya günlük hayatının akışını bozacak şiddetli yan etkiler oluşturmaktadır. Nöropsikiyatri alanında kullanılan neredeyse tüm ilaçlar karaciğerde üretilen ve polimorfizmi yüksek olan CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 ve CYP3A4 enzimleri tarafından metabolize edilir. Yaygın olarak kullanılmamakla birlikte bu genlerdeki polimorfizmler DNA analiz yöntemleriyle tespit edilebilmekte ve tedaviye başlamadan önce uygun ilaç ve dozu belirlenebilmektedir. Söz konusu analizler farklı yöntemler kullanılarak yapılmaktadır ve henüz bir standardizasyon sağlanamamıştır. PCR-RFLP, Sanger DNA dizi analizi, Real-time PCR, mikroarray gibi yöntemlerle maliyeti yüksek test hizmetleri sunulmaktadır.

Projenin amacı, literatürdeki bilgilere göre polimorfimleri ve etki mekanizmaları bilinen, rutinde uygulamaları yapılmakta olan bu genlerin tümünü tek bir panel olarak analizini sağlayan moleküler tanı kiti oluşturmaktır.

Metod olarak hedefteki enzimleri kodlayan genlerde bulunan ve nöropsikiyatriye yönelik farmakogenetik analizlerde en sık kullanılan 52 polimorfik nokta 22 primer ile çoğaltılması planlanmıştır. Noktaların analizine imkân sağlayacak şekilde uygun primerler tasarlanmış ve optimizasyonu yapılmıştır. Optimize edilen primerler kullanılarak PCR yöntemi ile genlerin amplifikasyonu sağlanmıştır. Daha sonra yeni nesil dizileme teknolojisi ile (Illumina platformu) dizi analizleri yapılmıştır. Dizileme işlemi sonrasında verilerin kalite analizi yapıldıktan sonra taşıdıkları polimorfizmler tespit edilmiştir.

Yapılan çalışma bir polimorfizm üzerinden toplum taraması olmayıp, çok sayıda genin tek seferde analizini gerçekleştiren bir polimorfizm analiz paneli/kiti oluşturulmuştur. Metod geliştirmeye yönelik olduğundan rastgele seçilmiş 20 farklı bireye ait genomik DNA kullanılmıştır. Klinik kullanıma yönelik standart, daha ekonomik ve yeni nesil teknolojiye dayanan bir kit geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: SNP, P450, Yeni Nesil Dizileme, CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, farmakogenetik, Illumina, antidepresan

THE DEVELOPMENT OF PHARMACOGENETICS DIAGNOSTIC PANELS WITH NEXT GENERATION SEQUENCING METHODS IN NEUROPSYCHATRIC DRUG USE

SUMMARY

As in the whole world, health expenditures have increased as a result of the use of high-tech technological developments in our country, and at the same time, we have been able to make some savings in spending with developing technology. Pharmacogenetic tests will be the most effective assistant to this saving. The share of medicines in health expenditures in Turkey 46%, while in Britain and America, this ratio is only 12%. Pharmacogenetics is a scientific discipline that examines changes in the responses people give to drugs and the reasons for variations in genetic constitution. After the completion of the Human Genome Project in 2003 and is spreading rapidly in the world. By comparing the genetic structure of the individual with the drugs that can be used in the treatment of the disease, it is ensured that the side effect of the most effective drug can be given in the least possible dose. Nowadays pharmacogenetic tests can be performed on individuals before treatment of many diseases such as epilepsy, diabetes, heart diseases, stomach diseases, cancer and depression.

In the future of pharmacogenetics, three areas appear to be particularly prominent. These areas are psychiatry, cardiology and oncology.

In 2000, depression was ranked fourth among the causes of the global illness burden, which was assessed as " Disability-adjusted life year (DALY) ". According to the World Health Organization (WHO) reports, by the year 2020, depression will take the second place in the " Disability-adjusted life year" evaluations for all age groups and gender groups.

While 35-45% of the drugs used by our psychiatric patients respond to treatment, 30-50% of them produce severe side effects that either do not respond to treatment or interfere with the flow of daily life. Nearly all drugs used in the field of neuropsychiatry are metabolized by the enzymes CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 and CYP3A4, which are produced in the liver and have high polymorphism Although not widely used, polymorphisms in these genes can be detected by DNA analysis methods and appropriate drugs and doses can be determined before treatment begins. These analyzes are made using different methods and no standardization has been achieved yet. PCR-RFLP, Sanger DNA sequence analysis, Real-time PCR, microarray, etc. The purpose of the project is to create a molecular diagnostic kit that provides analysis of all of these genes, which are known to be routinely applied, based on polymorphisms and mechanisms of action according to the literature.

As a method, it was planned to replicate 52 polymorphic spots with 22 primers which are most frequently used in pharmacogenetic analysis for neuropsychiatric genes in genes encoding the target enzymes. Suitable primers were designed and optimized to allow analysis of points. Amplification of the genes was achieved by PCR using the optimized primers. Later, sequence analyzes were performed with the next generation of scaling technology (Illumina platform). After the quality analysis of the data, the polymorphisms they carried out were determined after the scaling process. The study was not a community survey through a polymorphism, but a polymorphism analysis panel / kit was developed to perform analysis of many SNP at once. Genomic DNA of 20 different individuals randomly selected was used for the method development. The kit designed, more economical and next generation technology for clinical use has been developed.

Key Words: SNP, P450, Next Generation Sequencing, CYP2D6, CYP3A4, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, pharmacogenetics, Illumina, antidepressant

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Farmakogenetik ilaç tedavisine alınan yanıtın önceden tahmin edilebilmesi için genetik bilgiyi kullanan bir alandır. Psikiyatrik bozuklukların patogenezinde rol oynayan ve ilaç tedavisine alınan yanıtı etkileyen genler ve bunların varyantları tanımlanmıştır. Gelişmekte olan moleküler genetik teknikler bu alandaki ilerlemeye katkıda bulunmaktadır. Günümüzde, psikiyatrik tedaviler deneme-yanılma esasına dayalı olarak ampirik şekilde uygulanmaktadır. Psikiyatrik tedavilerle farmakogenetik bilgisi sayesinde, bireyin genetik yapısına göre en yararlı ilacı ve dozu belirlemek mümkün olabilmektedir.

Bugün, 100'den fazla psikoaktif ilaç halen birçok psikiyatrik hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Günümüzde psikofarmakolojideki hızlı gelişime rağmen hastalıkların tedavi düzeyi ve remisyon oranları beklenilen seviyede değildir [1]. Azımsanmayacak sayıda hasta, sürekli üretilen ve geliştirilen ilaç seçeneklerine rağmen gerektiği gibi tedavi olamamakta ya da tedaviye direnç göstermektedir. Tedavi sürecindeki bu başarısızlık sektörü sürekli olarak yeni ilaç arayışına itmektedir. Ayrıca rutinde kullanımda olan bazı ilaçlarında kullanım ve etkinliğinin yeniden düzenlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. İhtiyaç duyulan bu optimize işleminin sağlanabilmesi için geleneksel deneme-yanılma yöntemine başvurulur ya da Tedavisel İlaç Kan Düzeyi Monitorizasyonu (TDM) gibi modern ve hastaya en az zarar verecek yöntem uygulanır. Farmakogenetik biliminin gelişmesi için yeni bir alternatif olarakta kişinin genetik profiline göre ilaç ve ilaç dozajının optimizasyonu sağlanabilir.

Kişiler arasındaki DNA dizilim farklılıklarını saptayarak elde ettiği kişisel profil ile bireyin ilaca vereceği yanıtı belirleyip, bu yanıta göre en etkili ve en az zararlı dozajı belirlemek farmakogenetik biliminin temel amaçlarındandır. İlaç yanıtındaki bireysel farklılıklar klinisyenler için büyük sorun teşkil etmektedir. Bu farlılıklardan kaynaklanan temel sorunların başında ilaca yanıt alamamak veya kişinin ilaca ters tepki vermesi yer almaktadır. Farmakogenetik bilimi günümüzde en çok kardiyoloji, onkoloji ve psikiyatri bilimine yardımcı olmaktadır. Ksenobiyotik olarak adlandırılan

ve canlı vücuduna dışarıdan alınan maddelerin metabolizmasında ve vücuttan atılımında görev yapan enzimlerin büyük kısmını Sitokrom P450 (CYP) enzim ailesi oluşturmaktadır [2]. Psikiyatri alanında kullanılan ilaçların büyük çoğunluğunun metabolize olma sürecinden P450 enzim grubu sorumludur. Enzim etkinliği bireyler arası farklılık gösterdiği için kişiler arası ilaç dozajlarındada farkılılıklar olması beklenmektedir. Bazı genetik profile sahip insanlara normal gelen dozaj, bazılarına yetersiz, bazılarına da toksik etki yapacak kadar fazla gelebilir [3]. "Kişiye özel tedavi" kavramının oturtulması advers ilaç reaksiyonlarının önlenebilmesi için alınması gereken önemli bir tedbirdir. Kişinin genetik profilinin incelenip bu profile göre ilaç kullanımına yönlendirmek, risk almadan, maddi ve manevi kayıp olmadan izlenebilecek tedavi yolunun başlangıcıdır. CYP enzimlerinin çalışma hızına göre hastalar 4 sınıf halinde gruplandırılır [4,5]. Poor Metabolizer [PM, (Enzim çalışmaz)], Intermediate Metabolizer [IM, (Enzim yavaş çalışır)], Efficient Metabolizer [EM, (Enzim normal hızda çalışır)], Ultrarapid Metabolizer [UM, (Enzim çok hızlı çalışır)]. UM olarak sınıflandırılan hastalarda ilaç yıkım süresi çok kısa olduğundan dolayı ilacın hücrede kalma süreci çok azalır ve kan dolaşımına geçen miktar azalır. Hastanın tedavisinde başarısızlık gözlenmesi bu profilde beklenen bir durumdur. Hızlı metabolizmaya sahip hasta standart dozda bir ilacı hemen yıkıma uğrattığı için hasta hiç tedavi almamış gibi hastalığı aynı etki ile yaşayacaktır. Yavaş metabolizör bireylerde ise tam tersi durum yaşanmaktadır. Enzim aktivitesinin olamadığı yada çok az olduğu bireylerdir. Kan dolaşımına geçen ilaç miktarı çok yüksek oranda olacağından, ksenobiyotik madde toksik doza ulaşır ve yan etkiler meydana gelir. Yan etkiler ciddi boyutlara ulaşıp ölümle sonuçlanabilmektedir. [6].

İlaç kullanımında antidepresanlar ilk sırayı almaktadır. Yalnız Türkiye'de değil, bütün dünyada da 'yapay mutluluk sağlayan ilaçlar' olarak tanımlanan antidepresanlar depresyona giren, panik atak yaşayan ya da stresle başa çıkmaya çalışanların ilk tercihidir. Sağlık Bakanlığı Türkiye'de antidepresan kullanım oranının son beş yılda yüzde 56 oranında arttığını açıklamıştır [7]. Buna göre bir yılda yaklaşık 37 milyon ilaç kullanmaktadır.

Çalışmamızda antiepresan ilaç metabolizmasında etkin olduğu bilinen CYP enzim ailesi kodlayan genlerin sahip olduğu bazı polimorfik bölgelerin analizi için panel hedeflenmiştir. Kullanacağımız yeni nesil dizileme yönteminin diğer DNA analiz

sistemlerine göre daha uygun maliyet, uygulama kolaylığı ve hızlı dizileme gibi üstünlükleri vardır. Yeni nesil dizileme platformları yüksek hacimde paralel dizileme yaparak milyonlarca DNA fragmentini eş zamanlı bir şekilde diziler. Bu sayede çok sayıda gen bölgesinin aynı anda ve kısa sürede dizilenmesi mümkündür. Amacımız geliştireceğimiz panel ile gerek ilaç maliyetinin, gerekse ilaca bağlı görülebilecek yan etkilerin ve özelliklede klinisyenlerin uyguladığı deneme-yanılma yönteminin önemli ölçüde azalmasına katkıda bulunmaktır. Nöropsikiyatri alanında kullanılan neredeyse tüm ilaçlar "serotonin seçici gerialım inhibitörleri (SSRIs)" adı verilen antidepresanlar" karaciğerde bulunan CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 ve CYP3A4 enzimleri tarafından metabolize edilir. Çalışmamızda sunmaya çalıştığımız panel ve yöntemle ilaç metabolizmasında etkili olan bu enzimlerdeki polimorfik noktalar tespit edilip sahip olunan varyasyonları yorumlayabilmesi için klinisyene rapor halinde sunulabilecek ve klinisyenin hastaya uygulanması gereken dozaj hakkında yorum yapabilmesi sağlanacaktır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Nöropsikiyatrik Hastalıklar

Beyinde meydana gelen bozuklukları ve bu bozuklukların davranışsal etkilerini inceleyen bilim dalı nöropskiyatri olarak isimlendirilir. Bu bilim dalı farklı organik bozukluklar ve bu bozukluklara ek olarak işlev bozukluklarını da değerlendirme içerisinde tutup, tanı koymada büyük önem taşımaktadır. Nöropsikolojik değerlendirmede rutinde kullanılan görüntüleme sistemlerine ek olarak nöropsikolojik testlerde kullanılmıştır [8].

Nöropsikiyatik hastalıklara ikincil olarak depresyon görülmesi çok sık karşılaşılan bir durumdur. İnme, epilepsi ve demans gibi nöropsikiyatrik hastalıklarda bu durumla daha sık karşılaşılmaktadır [9].

2.1.1 Depresyon

Toplumda görülen ruhsal sorunlarda başı çeken depresyon teriminin ilk kez tanımlanması Hipokrat dönemine kadar uzanır [10]. Ancak Hipokrat'ın depresyon terimi bugünkü tanımla pek uyuşmamaktadır. Bugünkü anlamına en yakın tanım ise Kraepelin tarafından 1886 yılında yapılmıştır [11]. Kişinin belli bir süre, genel olarak içinde bulunduğu sabit olarak yorumlanan duygulanım durumuna "mood" adı verilir. Depresyon bireylerde ortaya çıkan çevresel, hormonal veya genetik bozukluklar sonucunda oluşan çökkünlük durumudur. Çeşitli sebepler sonucuna bireylerin duygu durumunda iniş-çıkışlar gözlemlenebilir. Ancak bu dalgalanmalar aşırı boyutlara ulaşıp uzun süreler devam eder ve kişide duygu alanım bozukluğuna sebebiyet verebilmektedir. Duygulanım bozukluklarında ilk sırada yer alan depresyon çevresel değişikliklerle uyum içinde olamayan tepkiler sergileme ve iç yaşamda sürekli çelişkiler halinde bulunma durumudur [12,13,14].

Duygu durum bozukluğunu sıradan bir hayal kırıklığı veya "kötü bir gün" geçirmenin sebep olduğu mutsuzluktan ayırmak için standart tanı ölçütleri kullanılmıştır. Bu ölçümlendirme sistemi Dünya Sağlık Örgütü tarafından geliştirilen ICD-10

sınıflandırma sistemidir. ICD-10 sistemine göre depresyon belirti kümelerinden oluşan bir sendromdur. Duygu durum bozukluğu ise bu belirtilerden sadece bir tanesidir. Yaklaşık olarak 15 günlük bir süreçte depresif duygu durum ya da ilgi kaybı diğer belirtilerle birlikte devam eder. Kişilerde enerji ve ilgi kaybı, suçluluk duygusu, yoğunlaşma güçlüğü, iştah azalması, ölüm ya da intihar düşünceleri ile birlikte konuşma, uyku, iştah, cinsellik gibi etkinlik düzeyinde azalma gözlemlenir. Son olarak kişilerarası, sosyal ve mesleki işlevsellikte bozulma ile sonuçlanır [15, 16, 17, 18].

Kısaca bir psikomotor inhibisyon hali olan duygu durum bozukluğu DSM-IV 'ye göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır.

• Majör depressif epizod
• Distimik bozukluk
• Baflka türlü adlandırılamayan depressif bozukluk
• Bipolar I bozukluğu
• Bipolar II bozukluğu
• Siklotimik bozukluk
• Genel tıbbi duruma bağlı duygudurum bozukluğu
• Madde kullanımının yol açtığı duygu durum bozukluğu [17].

2.1.1.1 Depresyon tedavisi

İntihar ya da çevrelerine zarar verme ihtimali olan hastaların, gıda alımı ileri derecede azalmış olanların, sosyal destekleri yeterli olmayanların, hikayelerinde hızlı ilerleyici depresif epizodlar bildirenlerin hastaneye yatırılmaları gerekir [19,20]. Depresyonun iyileşme ve yinelemlerle seyreden yaşam boyu süren bir hastalık olduğu ve tedavi edilmeyen olguların %15 oranında süregenleştiği düşünüldüğünde konunun önemi daha iyi anlaşılır. Tedaviye yanıt vermeyen veya yetersiz yanıt veren olguların oranı ise %15-35 gibi önemli bir orandır [21]. Depresif bozuklukların tedavisi öncelikle doğru tanı konulması ve tedavi amaçlarının belirlenmesini içerir. Tedavi de akut sürdürüm dönem tedavisi olarak iki faz vardır. Akut dönem ortalama ilk 4-12 haftayı kapsar. Bu dönemde belirtilerin remisyonu ve önceki işlevselliğe dönüş amaçlanır.Bu dönemde hastayla işbirliğinin sağlanması,eğitim verilmesi,tedavi seçimi ve yanıtının değerlendirilmesi önemlidir. Sürdürüm fazı ise remisyonun ardından gelen 6 ay veya daha uzun süreyi kapsar,mevcut atağın alevlenmesi ya da tekrarlamanın önlenmesi

amaçlanır. Bu dönemde hastaya uzun süreli ilaç kullanımı konusunda eğitimin verilmesi,yan etkilerin kontrolü ve işlevselliğin sağlanması gereklidir.

Tedavi süresi: Hemen bütün antidepresif ilaçların önemli bir özelliği etkinliğin 1-3 hafta içinde başlamasıdır. Bu süre içinde,uykuda, iştahta, duygudurum ve toplumsal etkinliklerde düzelme başlar. Antidepresan tedavide doz ve yeterli süre çok önemlidir. Etkin olup olmadığına karar verirken 4-6 haftalık süre zorunludur [18, 20, 22].

2.1.1.2 Depresyon tedavisinde kullanılan antidepresan ilaçlar

Antidepresan ilaçlar enzim ya da reseptör inhibitörleri ve geri alım engelleyicileri olarak etkilerini gösteririler. Tablo 2.1'de Türkiye'de bulunan antidepresan ilaçlar yer almaktadır [18,23].

Tablo 2.1: Türkiye'de bulunan antidepresanlar.

1-Monoamin Oksidaz İnhibitörleri(MAOİ) Moklobemid
2-Trisiklik Antidepresanlar(TSA) Opipramol, Imipramin, Klomipramin, Amitriptilin
3-Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri(SSRI) Sertralin, Fluoksetin, Paroksetin, Fluvoksamin, Sitalopram, Essitalopram
4- Alfa 2 adrenoreseptör antagonistleri(NaSSA) Mianserin, Mirtazapin
5- Seçici Noradrenerjik Gerialım İnhibitörleri(NRI) Reboksetin, Maprotilin
6- Noradrenalin ve Dopamin Gerialım İnhibitörleri(NDGI) Bupropion
7- Serotonerjik ve Noradrenalin Gerialım İnhibitörleri (SNRI) Venlafaksin, Milnasipran, Duloksetin
8- Serotonerjik ilaçlar (SAGI) Nefazodon, Tianeptin, Trazodon

2.1.1.2.1 Monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI)

İlk olarak geliştirilen antidepresanlardır, monoamin oksidaz enzimleri geri dönüşümsüz olarak inhibe ederler. Monoamin oksidaz, serotoninin parçalanmasından sorumlu enzimdir. Serotonini parçalayan enzim miktarını azaltmak, nöronları canlandırmak için serotoninin ihtiyacı olan zamanı çoğaltır. MAO (Monoamin Oksidaz), fizyolojik olarak aminlerin aldehit, amonyak ve hidrojen perokside oksidatif deaminasyonundan sorumlu bir mitokondriyal enzimdir.

$$R\text{-}CH_2NH_2 + O_2 + H_2O \ (\rightarrow MAO\ )\ R\text{-}CHO + NH_3 + H_2O_2$$

Dopamin, epinefrin, norepinefrin ve serotonin gibi nörotransmitter aminler yanı sıra tiramin gibi yiyeceklerde bulunan toksik aminleri, benzilamin ve benzeri amin yapısındaki pek çok bileşiği deamine etmektedir. MAO enzimi inhibe edildiğinde, Santral Sinir Sisteminde; dopamin, epinefrin, norepinefrin, serotonin, triptamin, tiramin gibi merkezi uyarıcı etkisi bulunan aminlerin konsantrasyonu artar. Diyetle alınan aminlerin kan basıncında tehlikeli yükselmelere neden olabilmesi sebebiyle kullanımı sınırlı olmuştur. Ülkemizde bulunmamaktadır.

MAOİ'lerin sebebiyet verdiği yan etkiyi önlemek için geri dönüşümlü MAOİ (RIMA) geliştirilmiştir. Bu grupta ülkemizde moklobemid bulunmaktadır. Klasik MAOİ grubu ilaçlardan yan etkisi azaltılmış ve etkinliği korunmuş yeni bir sınıf olarak geliştirilmiştir. MAO enziminin substratlarının varlığında ilacın kolayca bu enzimden ayrılabilmesinden dolayı "geri dönüşümlü" ifadesi kullanılmıştır [18,24].

2.1.1.2.2 Trisiklik antidepresanlar (TSA)

Trisiklik antidepresanlar genellikle serotonin ve noroadrenalin gerialım pompalarını, çok az da dopamin geri alım pompalarını inhibe ederek etki gösterirler. Yan etkileri (bulanık görme, ağız kuruluğu, baş dönmesi, kan basıncı düşüklüğü) sebebiyle kullanımı azalmıştır. Bu grup ilaçların yüksek dozları güvenli değildir. Yeni kuşak antidepresanların güvenilirliğinin yüksek oluşu bu ilaçların kullanımının azalamsında büyük etken olmuştur [18].

2.1.1.2.3 Seçici serotonin gerialım inhibitörleri (SSRI)

Bu grupta sertralin, fluoksetin, paroksetin, fluvoksamin, sitaloprami, essitalopram yer almaktadır. Adından da anlaşılacağı üzere seçici Serotonin gerialım inhibitörü türü antidepresanlar bu taşıyıcı proteinlerin çalışmasını durdurarak serotoninin sinaptik boşlukta kalmasını sağlar. Kronik uygulamalarda serotoninin sürekli artışı serotonin nöronunun duyarsızlaşmasına neden olmaktadır [25, 26, 27]. Huzursuzluk, terleme, hazımsızlık, baş ağrısı, dudaklarda kuruma, uykulu olma gibi yan etkileri vardır. Özellikle ek medikal hastalığı olan bireylerde çoklu ilaç kullanımında ciddi ilaç etkileşimleri olabilir [18].

Seçici Noradrenerjik Gerialım inhibitörleri (NRI),
Noradrenalin ve Dopamin Gerialım İnhibitörleri (NDGI),

Serotonin ve Noradrenalin Gerialım İnhibitörleri (SNRI),
Noradrenerjik (α2 antagonizması yoluyla) ve Serotonerjik Antidepreanlar (NaSSA),
Serotonin 2A Antogonistleri / Serotonin Gerialım İnhibitörleri (SAGI)
Grubu antidepresanlar ise ülkemizde bulunan diğer antidepreanlardır[18,28,29].

2.2 Farmakogenetik

İlaç yanıtının bireyler arası değişlik göstermesinden sorumlu birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörleri; yaş, vücut ağırlığı, eliminasyon organları, ilacın veriliş yolu, çevresel faktörler,beslenme alışkanlıkları ve bireyin genel sağlık durumu olarak sıralanabiliriz. Ancak ilaç yanıtının bireyler arası değişkenliğine yol açan en önemli etkenin genetik faktörler olduğu biraz geç anlaşılmıştır. İlaç yanıt mekanizmasında genetik faktörlerin rolü olduğu kabul gördükten sonra farmakogenetik terimi ortaya çıkmıştır.

Farmakogenetik; ilaca verilen yanıtın ve ilaç etkinliğinin genetik yapıya bağlı olarak bireyler arasında farklılık göstermesini inceleyen bilim dalıdır. Farmakogenetiğin temelini oluşturan "biyokimyasal bireysellik" ifadesini ilk defa yüzyıl öncesinde Sir Archibald Garrod kullanmıştır [30]. 1950'li yıllarda kalıtsal Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği olan bireylerde antimalaryal ilaçların kullanımı sonucu hemoliz görülmesi farmokogenetiğin temelini oluşturan verilerden olmuştur [31]. Farmakogenetik terimi 1959'da Friedrich Vogel of Heidelberg tarafından kullanıldı [32]. 1962'de Warner Kalow'un "Pharmacogenetics – Heredity and the Response to Drugs" isimli makalesi yayınlanmıştır [33]. 1968 yılında ikiz kardeşlerle yapılan çalışmada, tek yumurta ikizi kardeşlerin ilaç cevap metabolizmalarının çift yumurta ikizlerine oranla dikkate değer bir şekilde benzerlik gösterdiği kanıtlanmıştır [34]. Yapılan bu çalışmalar ilaç reaksiyonlarında genetik dizilimin etkisini açıkca ortaya koymuştur. Advers ilaç reaksiyonları birden fazla gen tarafından kontrol edildiğinden farmakogenetik alanı yıllar boyunca yavaş bir gelişim göstermiştir. DNA teknolojisi ve in-vitro moleküler testlerdeki gelişmeler bu alanın gelişim hızına ivme katmıştır. 1990'lı yıllarda İnsan Genom Projesi ve gelişen mikrodizileme teknolojisi ile birlikte gelişmeler hız kazandı [15]. 2003 yılında tamamlanan İnsan Genom Projesi ve 2005 yılında FDA tarafından onay alan CYP2D6 ve CYP2C1 genlerinin analizini sağlayan test ile farmakogenetik bilimi gelişim göstermeye devam etmiştir. İnsan genom diziliminin aydınlatılması, farmakogenomik ve translasyonel tıp araştırmalarında

önemli ilerlemelere yol açmıştır [35]. Genetik farlılıklar ilaç yanıtında, bireyler arasındaki değişkenliğin %30 'luk bir kısmına sebep olmaktadır [36]. Hastaların genetik profilindeki bu farklılıklar; ilnaznazaç etkisinde, potansiyel ilaç toksisitesi veya tedavi başarısızlığı gibi risklere sebep olabilmektedir. Farmakogenetik bilimi bireyler arası genetik değişkenliğinin ilaç yanıtına ve etkililiğine yönelik çalışmalarını temel alır. Şu anki klinik araştırmalar, hasta genotip testi ve bu genetik bilginin kullanılması üzerine odaklanmaktadır [37,38]. Farmakogenetik değişkenlik gösteren en büyük grup olan Sitokrom p450 (CYP450) enzim ailesi ilaç metabolizmasından sorumludur. Bu enzimler ilaç metabolizmasında yer alan Faz 1 reaksiyonları içerisindeki oksidasyon reaksiyonunda bulunurlar [39].

2.2.1 İlaç metabolizması biyotransormasyon

İlaçların insan vücudunda izlediği yol genel olarak Şekil 2.1'de gösterildiği gibidir. İlaç yıkımları genel olarak karaciğerde olmakla birlikte farklı ilaçlara göre yıkım yerleri değişkenlik gösterebilmektedir. İlaçların bazıları tamamen okside formda CO2'e dönüşüp solunum yolu ile vücuttan uzaklaştırılırken, bazıları ise böbrek ve karaciğerde form değiştirerek vücuttan atılır. İlaçların atılabilmesi için suda eriyebilirliğini arttıracak modifikasyonlarla hızlı şekilde atılımı sağlanır [40]. Organizmaya giren ilaç ve benzeri toksik maddelerin sebep olduğu etkinin azaltılabilmesi veya ortadan kaldırılmasında rol oynayan dönüştürücü sisteme biyotransformasyon denilmektedir. Genel olarak organizmanın devamı için gerekli olan bütün kimyasal reaksiyonlardır [41].

Şekil 2.1: İlaç metabolizması.

Biyotransformasyon, kimyasal bileşiklerin bakteriler, mantarlar ve enzimler gibi organizmalar tarafından form değiştirilmesidir. Vücut canlı sistemlere yabancı ilâç, böcek öldürücü, petrol ürünleri gibi ksenobiyotik maddelere karşı savunmak için bir dizi biyotransformasyon reaksiyon veya metabolik reaksiyonlar gerçekleştirir. İlaçların çoğu insanda yoğun şekilde metabolize olur. İnsanlar için en sık karşılaşılan ksenobiyotik madde olan ilaç biyotransformasyon sonucu daha hidrofilik hale getirilir ve böylece vücuttan kolaylıkla atılabilir. Genel olarak, ilaçlar lipofilik kimyasallardır, biyotransformasyon olmadığını varsaydığımızda etkili bir şekilde ortadan kaldırılamadıkları için vücutta birikir ve toksisite meydana gelir. Az sayılabilecek istisnalar dışında tüm ksenobiyotikler, faz 1 ve faz 2 enzimatik reaksiyonlarına maruz kalırlar. Temel mantık olarak bu metabolizma, hidrofobik kimyasalları, idrar veya safra yoluyla kolaylıkla giderilebilen türevlerine dönüştürmeye yarar. Ksenobiyotik madde olan ilaçlar etki alanlarına ulaşabilmek için bazı fiziksel özelliklere sahip olmalılar. Bu nedenle, çoğu ilaç hidrofobiktir, hidrofobik olması ise ilaçların lipit bilayer'larda yer alan hedef reseptörleri veya proteinleri ile etkileşime girerek hücrelere girmesini sağlar. Hücrelerin içine giriş, plazma zarındaki çok sayıda taşıyıcı tarafından kolaylaştırılır. Bu hidrofobik özellik, ilaç eliminasyonunu zorlaştırır, çünkü metabolizma yokluğunda, ilaçlar hücrelerdeki yağ ve hücresel fosfolipid bilayerlerinde birikebilirler. Biytotransformayon sayesinde hidrofilik hale gelen ilaçların eliminasyonu kolaylaşır [42-46].

Genel olarak, biyotransformasyon reaksiyonları 'faz I' ve 'faz II' reaksiyonu olarak bilinen iki geniş kategoriye ayrılmıştır.

2.2.1.1 Faz I enzimleri ve reaksiyonları

Faz 1 enzimleri genel olarak dört gruba ayrılmışlardır. Bunlar sitokrom p450(CYP), monoamin oksidaz(MAO), esterazlar ve amidazlardır. Bu enzimler fonksiyonel grupları (-OH, -COOH, -SH, -O-, –NH2) ile bağlanarak, ksenobiyotikleri hidrofilik forma dönüştürüp suda çözünürlüğünü arttırırlar. Bu enzimler oksidasyon, redüksiyon ve hidroksilasyon işlemlerinden sorumludurlar ve temel olarak faz II reaksiyonuna hazırlık aşamasında rol almaktadırlar. CYP enzimleri, pek çok ilacın farmakolojik olarak aktifleştirilmesinden sorumlu en önemli enzim grubudur. Tablo 2.2’de ksenobiyotik metabolize eden enzimler ve reaksiyonları gösterilmiştir. Faz I

reaksiyonları mikrozomal ve mikrozomal olmayan oksidasyon, hidroliz ve reduksiyon reaksiyonlarıdır [47].

Tablo 2.2: Ksenobiyotik metabolize eden faz I enzimleri.

Enzimler	Reaksiyonlar
Sitokrom P450'ler (P450/CYP)	C ve O oksidasyon, dealkilasyon, diğerleri
Flavin içeren monooksijenazlar (FMO)	N, S ve P oksidasyon
Epoksid hidrolazlar (mEH, sEH)	Epoksitlerin hidrolizi

2.2.1.2 Faz II enzimleri ve reaksiyonları

Faz II reaksiyonlarında, ilaç veya metabolitlerin küçük endojen polar moleküllere kovalent bağla bağlanmasıyla oluşur. Endojen moleküllerin doğrudan konjügasyonu, bileşik zaten uygun fonksiyonel gruplar içeriyorsa oluşabilir. Bu konjugasyon reaksiyonlarına glukoronosiltransferaz, sülfotransferaz, N-asetiltransferaz gibi enzimler aracılık etmektedir [48]. Konjugasyon reaksiyonları sonucunda ilaçların sudaki çözünürlüğü artar. En çok karşılaşılan konjugasyon reaksiyonu ise glukronik asid reaksiyonudur. Bu reaksiyon dışında asetilasyon, metilasyon, sülfotidizasyon diğer konjugasyon reaksiyonlarıdır. Faz II reaksiyonları sonucunda ilaçların lipid çözünürlüğü azalır ve ilaçlar böbreklerden dışarı atılır. Tablo 2.3'de ksenobiyotik metabolize eden enzimler ve reaksiyonları gösterilmiştir [47].

Tablo 2.3: Ksenobiyotik metabolize eden faz II enzimleri.

Enzimler	Reaksiyonlar
Sülfotransferazlar (SULT)	Sülfat eklenmesi
UDP- glukuronosiltransferazlar (UGT)	Glukronik asit eklenmesi
Glutatyon -s – transferazlar (GST)	Glutatyon eklenmesi
N-asetil transferazlar (NAT)	Asetil gurubunun eklenmesi
Metiltransferazlar	Metil grubunun eklenmesi

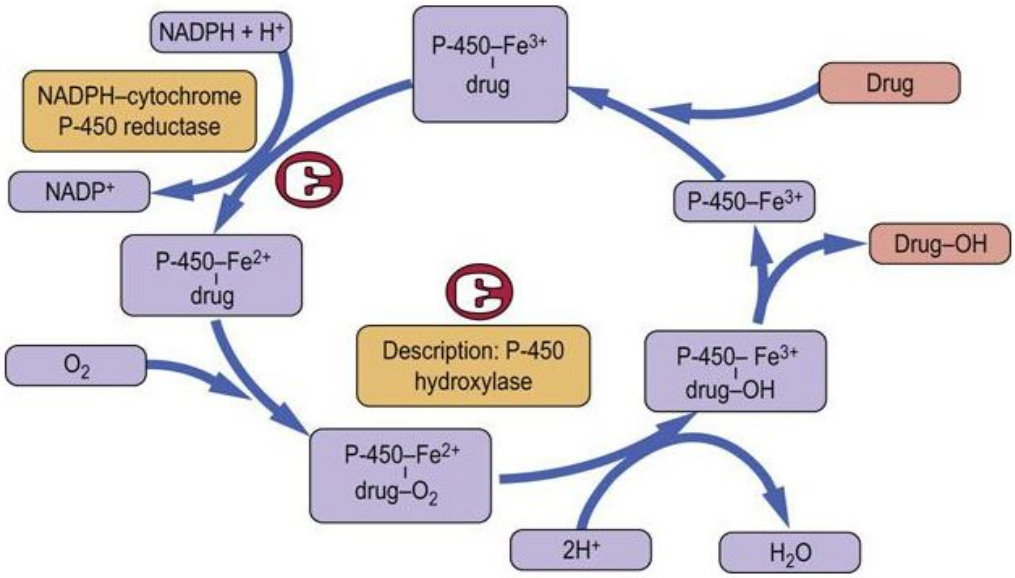
2.2.2 Sitokrom P450

İlk olarak 1958 yılında Martin Klinberg sıçan karaciğer mikrozomları üzerinde spektrofotometrik çalışmalarda bulunurken karbon monoksit (CO) bağlayan bir pigment olarak Sitokrom P450'yi tanımlanmıştır. Pigment tasvir eder nitelikte P simgesine yer verilmiştir. Daha sonra ise absorpsiyon spektrumunda 450 nm'de tepe değeri verdiği için P-450 olarak literatürde yerini almıştır [49]. Başlangıçta fonksiyonel, yapısal veya biyolojik özellikleri bilinmeyen bu proteinin sadecec spektral özellikleri bilinmekteydi. Çalışmalar ilerledikçe yapısal ve fonksiyonel olarak aydınlatıcı bilgiler literatürde yerini almaya başladı [50].

Sato ve Omura isimli iki araştırmacı tarafından 1962 yılında "P450" terimi ilk defa kullanılmıştır. Bu iki araştımacı üzerinde çalışılan bu proteinin CO bağlamasının yanı sıra demir içeren hemoprotein olduğunu tespit etmişlerdir [51,52]. İnsan genomunda toplamda 18 aileye ayrılmış olarak 57 aktif CYP geni bulunmaktadır. (CYP1-3) olarak adlandırılan ilk üç aile, eksojen maddelerin metabolizmasında yer alırken geri kalan enzim aileleri ise endojen maddelerin metabolizmasında yer almaktadır [53].

2.2.2.1 Sitokrom P450 enzim çalışma mekanizması

Sitokrom P450 enzim sistemine ait çalışma mekanizması ilk olarak 1971 yılında Estabrook tarafından modellenmiştir. Şekil 2.2'de bu modelleme gösterilmiştir.

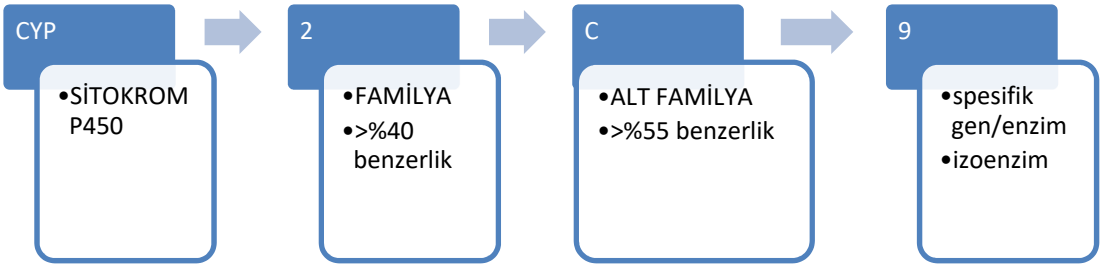


Şekil 2.2: Sitokrom P450 enzim sisteminin çalışma mekanizması.

Döngüye giren serbest ilaç ferik demir (Fe+3) ile kompleks oluşturur. Sitokrom P redüktaz tarafından NADPH'ın NADP'ye dönüştürülmesiyle üretilen elektron transferi sonrasında Fe+3, Fe+2 'ye indirgenmiştir. İndirgenmiş olan substrat-sitokrom P450 kompleksi O_2 ile birleşerek daha da indirgenir. Diğer O_2 atomu ise su oluşumuna katılır. Sonuç olarak enzimsubstrat-O_2 kompleksi meydana gelir. Substratın kompleksten ayrıldıktan sonra enzim tekrar serbest hale geçer ve sürecin devamındaki reaksiyona hazır hale gelir [54].

2.2.2.2 CYP450 enzim isimlendirmesi

CYP enzimleri ilaç metabolizmasının büyük bir kısmıdan sorumludur. Faz I'e bağlı ilaç metabolizmanın %75-80'lik kısmından, genel olarak klinikte kullanılan ilaçların ise %65-70'inin metabolizmasından sorumlu olan enzim grubudur [55]. Polimorfik CYP genlerinin ve karakterizasyonlarının tanımlanması süreci sona erdiğinden bir ortak isimlendirme sistemine ihtiyaç duyuldu. Böylece, 1999'da mevcutta tespit edilmiş olan ve gelecekte tanımlanma ihtimali olan alel terminolojisine yönelik bir ortak platform yaratmak amacıyla bir isimlendirme komitesi kuruldu. Tespit edilen alellerin isimlendirmelerini ve fenotiplerini bir arada sunabilmek amacıyla "Human Cytochrome P450 Allele Nomenclature (CYP-allele) (http://www.cypalleles.ki.se/)" websitesi kuruldu [56].



Şekil 2.3: CYP450 adlandırma sistemi.

2.2.2.3 Sitokrom P450 polimorfizmlerinin klinik önemi

Canlıların sahip olduğu genetik polimorfizmlerin saptanmış olması, uygulanması gereken birçok tedevi için yol gösterici olabilir. Kişilerin ilaçlara verdiği yanıtların genetik yapıya bağlı olarak farklı olduğunu farmakogenetik biliminin gelişmesiyle anlamış bulunmaktayız. Farmakogenetik biliminin önemi terapötik indeksi dar olan

ilaçların kullanımında yaşana sorunlarla iyice artmış durumdadır. Bireylerin sahip olduğu genetik polimorfizmlerin uygulanacak tedavi öncesinde bilinmesi, verilecek ilacın dozunun ayarlanması hastanelerde rutin uygulamalar arasına girmek üzeredir [57].

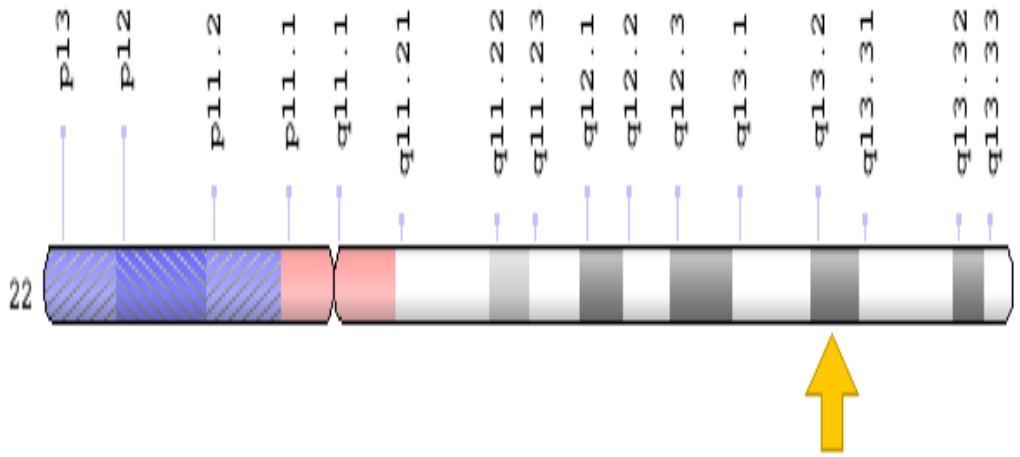
Ters ilaç reaksiyonları klinikte oluşan ve çoğunluğu ölümle sonuçlanan en önemli problemlerden biridir. Ters ilaç reaksiyonunun(ADR) en önemli nedenlerinden birisi sitokrom P450 enzim polimorfizmidir. Amerika Birleşik Devletleri'nde hastaneye yatırılan vakaların %6,7'si ters ilaç reaksiyonu nedeniyle yatırılmıştır. Yılda 100.000'in üzerinde ters ilaç reaksiyonu nedeniyle ölüm vakası bildirilmiştir. Faz I polimorfik enzimlerin metabolize ettikleri ilaçların %56'sında ters ilaç reaksiyonu gözlendiği bildirilmiştir. Bu reaksiyonların %86'sından CYP450 enzimlerinin sorumlu olduğu rapor edilmiştir [57, 58]. Tablo 2.4'de klinik önemi bulunan varyantların tespitine yönelik piyasada kullanılan test panelleri verilmiştir [91].

Tablo 2.4: Test panelleri ve analiz edilen varyantlar.

Farmakogenetik test paneli	Analiz edilen CYP2D6 varyantları	Analiz edilen CYP2C19 varyantları	Analiz edilen diğer genler
AssureRX	*1, *2, *2A, *3, *4, *5, *6, *7, *8,*9, *10, *11, *12, *14, *15, *17, *41	*1, *2, *3, *4, *5*6, *7, *8	SLC6A4, HTR2A
Genelex (You Script)	*1, *2, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *12, *14, *15, *17, *41	*1, *2, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *17	CYP2C9, VKORC1
Genomas (HILOmet PhyzioTypeSystem)	*1, *3, *4, *5, *6, *9, *10, *17, Duplication	*1, *2, *3	CYP2C9
Matrix Genomics	Zayıf metabolizör, Normal metabolizör, Hızlı metabolizör	*2, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *17	VKORC1, CYP2C9, CYP4F2,GGCX, APOE
LUMINEX xTAG CYP2D6	*1, *2, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *15, *17, *29, *35, *41, Duplication		
Mayo Clinic	*1, *2, *2A, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *12, *14A, *14B, *15, *17, *41,	*1, *2, *3, *4, *6, *7, *8, *17	CYP3A4, UGT1A1, TPMT, HTR2A, HTR2C CYP2C9, CYP1A2, VKORC1,
Laboratory Corporation of America	*1, *2, *3, *4. *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *12, *14, *15, *17, *41, *1XN,*2XN, *4XN,	*2, *3, *4, *5, *6, *8, *17	CYP2C9, HLA-B*1502, VKORC1, TPMT, APOE, IL28B, UGT1A1, MTHFR
PGxl	*1, *2, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *11, *12, *14, *15, *17, *41	-	CYP2C9, CYP1A2, NAT2, HLA-B*5701, 5-HTTLPR, MTHFR
ARUP Laboratories	*1, *2, *2A, *3, *4, *5, *6, *7, *8, *9, *10, *12, *14, *17, *29	*2, *3, *4, *6, *7, *8, *9, *10, *17	CYP2C9, MTHFR, TPMT
The AmpliChip CYP450 Test	*1, *2, *2ABD, *3, *4ABDJK, *5, *6ABC, *7, *8, *9, *10AB, *11, *15, *17, *19, *20, *29, *35, *36, *40	*1, *2, *3	

2.2.2.4 CYP2D6 geni

CYP2D6 genine ait lokalizasyon bilgisi Şekil 2.4‘de gösterilmiştir. Genin yerleşiği 22q13.2’dir.



Şekil 2.4: CYP2D6 geni yerleşiği

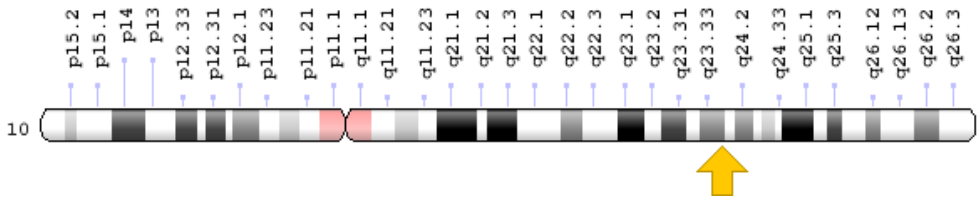
CYP2D6, antidepresanlar, antipsikotikler, analjezikler ve beta blokerleri dahil olmak üzere yaygın olarak piyasada bulunan ve reçetelenen birçok ilacın metabolizmasından sorumludur [52]. CYP2D6’nın metabolize ettiği onlarca ilaç arasında Prozac, Zoloft, Paxil, Effexor, Hydrocodone, Amitriptyline, Claritin, Cyclobenzaprine, Haldol, Metoprolol, Rythmol, Tagamet, Tamoxifen ve Tusstat yer almaktadır. CYP2D6’nın başlıca substratı olan kodein ön ilaçlarını ve diğer opioidleri aktif biçimlerine dönüştürerek etkin hale gelmelerini sağlar [60]. Toplumda %10 yavaş metabolizer (PM), %7 hızlı metabolizer (UM) ve %35 normal metabolizer (IM) prevelansına sahiptir. CYP2D6 için yavaş metabolizör kişiler, normal bireylerden farklı farmakokinetiğe sahiptirler ve bu farklılık sebebiyle standart doz dışında doz ayarlanmasına ihtiyaç duymaktadırlar [60]. CYP2D6 geni, 100'den fazla (*) aleli ile tanımlanan polimorfik bir gendir [59]. Genotipleme çalışmalarıyla, CYP2D6 geni varyantlarından en azından 15 tanesinin fonksiyonel olmayan gen ürünlerini kodladığı saptanmıştır. Tanımlanmış olan bu aleller, nokta mutasyonları, delesyon, insersiyon, duplikasyon ve gen duplikasyonlarını taşıyabilmektedirler [62]. CYP2D6 genine ait polimorfizmler ve bu polimorfizmlerin enzim aktivitesine etkiler Tablo 2.5’de gösterilmiştir [63]

Tablo 2.5: CYP2D6 polimorfizm ve enzim aktivitesine etkisi

Aleller	Polimorfizm	Enzim aktivitesi
*XN	gen duplikasyonu	artmış aktivite
*2	-1584C>G, 1661G>Ca, 2850C>Ta, 4180G>Ca	Normal
*3	2549A>del	İnaktif
*4	1846G>A; 100C>Tb	İnaktif
*5	gen delesyonu	İnaktif
*6	1707T>del	İnaktif
*7	2935A>C	İnaktif
*8	1758G>T	İnaktif
*9	2613-2615 delAGA	Azalmış
*10	100C>Ta	Azalmış
*11	883G>C	İnaktif
*12	124G>A	İnaktif
*14	1758G>A	İnaktif
*15	138insT	İnaktif
*17	1023C>T ve 2850C>Ta	Azalmış
*20	1973insG	İnaktif
*21	2573insG	İnaktif
*29	3183G>A (3271G)	Azalmış
*38	2587-2590delGACT	İnaktif
*39	1661G>C, 4180G>C	Normal
*41	2988G>A	Azalmış
*44	2950G>C	İnaktif

2.2.2.5 CYP2C9 geni

CYP2C9 genine ait lokalizasyon bilgisi Şekil 2.5'de gösterilmiştir. Genin yerleşiği 10q23.33'dir.



Şekil 2.5: CYP2C9 geni yerleşiği

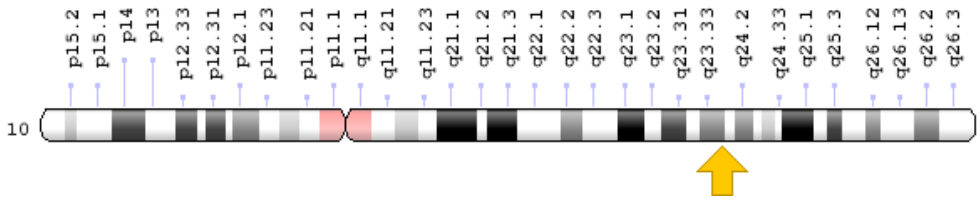
CYP2C9 enzimi piyasada reçete edilen ilaçların %16'sına etki etmektedir. Kafkas ırkının yaklaşık olarak %35'i yavaş metabolize eden alellere sahiptir. CYP2C9 doz ayarlaması güç olan ve birikiminde toksititeye sebep olan varfarin gibi ilaçların biyotransformasyonunda önemli role sahiptir. Üç farklı fenotipi tanımlanmıştır. Zayıf metabolizörler, aktif CYP2C9 alelli olmayanlardır. Orta metabolizörler ise bir aktif ve bir inaktif CYP2C9 alel içerenlerdir. Normal metabolizör iki aktif CYP2C9 alel içerirler. Toplumda sıklıkla karşılaşılan alel CYP2C9*2, CYP2C9*3'tür. Her iki alellede CYP2C9 enzim aktivitesini azaltır ve bu bireyler zayıf metabolizör olarak isimlendirilir [64]. CYP2C9 genine ait polimorfizmler ve bu polimorfizmlerin enzim aktivitesine etkiler Tablo 2.6'de gösterilmiştir [63].

Tablo 2.6: CYP2C9 polimorfizm ve enzim aktivitesine etkisi

Aleller	Polimorfizm	Enzim aktivitesi
*1	- (wild tip)	normal
*2	430C>T	azalmış
*3	1075A>C	azalmış
*4	1076T>C	azalmış
*5	1080C>G	azalmış
*6	818delA	inaktif
*8	449G>A	artmış
*11	1003C>T	azalmış
*12	1465C>T	azalmış
*16	485C>A	azalmış
*18	1075A>C	azalmış

2.2.2.6 CYP2C19 geni

CYP2C19 genine ait lokalizasyon bilgisi Şekil 2.6‘da gösterilmiştir. Genin yerleşiği 10q23.33’dir.



Şekil 2.6: CYP2C19 geni yerleşiği

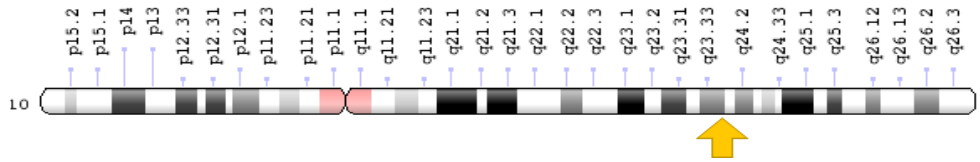
CYP2C19 enzimi reçete edilen ilaçların %5-10 üzerine etki eder. Farklı toplumlar arasında yapılan çalışmalar sonucunda toplumlar arasında metabolizör frekansları büyük farklılıklar göstermiştir. Avrupa kökenlilerde zayıf metabolizör oranı %2-6 iken Japon toplumunda bu oran %15-20'lere ulaşmıştır [65]. Enzim aktivitesi çok farklı seviyelerde saptanmıştır. Bu enzim aktivitelerindeki farklılıklara dayanarak üç farklı tipte feanotip tanımlanmıştır. Zayıf metabolizör, *1 aleli bulundurmayan bütün fenotipler zayıf olarak adlandırılır. Orta metabolizör, bir aktif ve bir inaktif CYP2C19 alel içermektedirler. Standart dozdan daha düşük ilaç verilmelidir. Normal metabolizör ise iki aktif alel içerir ve ilaç tüketimi standart dozda olmalıdır [66]. CYP2C19 genine ait polimorfizmler ve bu polimorfizmlerin enzim aktivitesine etkiler Tablo 2.7’da gösterilmiştir [63].

Tablo 2.7: CYP2C19 polimorfizm ve enzim aktivitesine etkisi

Aleller	Polimorfizm	Enzim aktivitesi
*1	- (wild tip)	normal
*2	681G>A	inaktif
*3	636G>A	inaktif
*4	1A>G	inaktif
*5	1297C>T	inaktif
*6	395G>A	inaktif
*7	IVS5+2T>A	inaktif
*8	358T>C	inaktif
*9	431G>A	azalmış
*10	680C>T	azalmış
*17	991A>G	artmış

2.2.2.7 CYP1A2 geni

CYP1A2 genine ait lokalizasyon bilgisi Şekil 2.7‘de gösterilmiştir. Genin yerleşiği 15q24.1’dir.



Şekil 2.7: CYP1A2 geni yerleşiği.

CYP1A2 enzimi rutinde reçete edilen ilaçların %5-10’luk bir kısmını metabolize etmektedir. Metabolizmasında rol aldığı bazı ilaçlar clozapine, imipramine, caffeine, fluvoxamine, paracetamol, phenacetin, theophylline ve tacrine gibi sık kullanımda olan ilaçlardır [67].

Hem indüklenebilen hem de inhibe olan CYP1A2 enzimi indükleyici varlığında Normal indüksiyon, azalmış indüksiyon ve hiperindüksiyon olmak üzere üç fenotipte tanımlanmıştır. Enzimin induksiyonunu indükleyiciler ve gende bulunan polimorfizmler etkilemektedir. Normal induksiyon, iki tane CYP1A2*1A aleli taşıyan ve normal metabolik aktiviteyi temsil eden fenotiptir. Azalmış indüksiyon, induksıyonun normalden daha düşük seviyede olduğunu temsil eder. Genotip olarak en az bir tane CYP1A2*1C aleli taşıması gerekmektedir. Hiperindüksiyon, standart dozdan daha yüksek dozda substrata ihtiyaç duyan bu fenotip en az bir tane CYP1A2* 1F aleli içerir. Normal induksiyona sahip bireylere oranla %40 daha yüksek induksiyona sahip olabilirler. Bu sebeple standart dozun üzerinde ilaç verilmelidir [68, 69]. CYP1A2 genine ait polimorfizmler ve bu polimorfizmlerin enzim aktivitesine etkiler Tablo 2.8’de gösterilmiştir [63]

Tablo 2.8: CYP1A2 polimorfizm ve enzim aktivitesine etkisi

Aleller	Polimorfizm	Enzim aktivitesi
*1A	- (wild tip)	normal
*1C	-3860G>A	azalmış
*1F	-163C>A	artmış indüksyon
*1K	-740T>G, -730C>T, - 164C>A	azalmış

2.2.2.8 CYP3A4 geni

CYP3A4 genine ait lokalizasyon bilgisi Şekil 2.8‘de gösterilmiştir. Genin yerleşiği 7q22.1’dir.

Şekil 2.8: CYP3A4 geni yerleşiği.

Reçete edilen birçok ilacın metabolizmasında rol aldığı gibi CYP2D6 ile metabolize edilen ilacın konsantrasyonu arttığında da ilacın metabolizmasında yer alıp yetersiz CYP2D6 aktivitesinin düzenlenme aşamasında yardımcı görev üstlenmektedir [70].

2.3 Yeni Nesil Dizileme

James Watson ve Francıs Crick tarafından 1953 yılında DNA’nın çift zincirli yapısının keşfinin sonrasında DNA dizilerinin okunmasına ihtiyaç ve ilgi duyuldu. Bu okumaların yapılabilmesi için farklı yöntemler geliştirilmeye çalışıldı [71]. Geliştirilen bu yöntemler arasından sıyrılarak standart yöntem olarak kendini gösteren sanger dizileme yöntemi Frederick Sanger tarafından geliştirilmiştir [72]. Bu yöntem dideoksinükleotidler ile zincir sonlandırma esasına dayanmaktadır [73].

Genom projesinin tamamlanmasının ardından yeni nesil dizileme olarak adlandırılan masif paralel dizileme yöntemleri geliştirilmeye ve zamanla bilim dünyasında yerini almaya başladı. Yöntemin öncülerinden olan Life Sciences 2005 yılında 454 platformunu piyasaya sürmüştür. 2006 yılında ise Solexa Genome Analyzer’ı Applied Biosystems ise Agencourt’u piyasaya sürmüştür. 2011 yılına gelindiğinde Ion Torrent PGM, Pacific Biosciences Pac Bio RS ve Illumina MiSeq platformları da piyasadaki yerini aldı [74, 75]

Yeni nesil dizileme yönteminde temel prosedür bir örnekten elde edilen DNA’nın milyonlarca fragmanının eş zamanlı olarak dizilenmesidir. Genel olarak kullanılan yeni nesil dizileme platformlarının temel basamakları; taslak (*template*) hazırlama, dizileme, görüntüleme ve elde edilen verilerin analiz edilmesidir [75].

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Cihazlar

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 3.1'de yer almaktadır.

Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan cihaz listesi.

Cihaz Adı	Marka	Kullanım Amacı
Otomatik pipetler	Gilson	Tüm laboratuvar çalışmalarında kullanılmıştır.
Derin dondurucu (-20˚C)	Beko	Örnekler, belirli kit çözeltileri ve tampon çözeltilerin saklanmasında kullanılmıştır.
Buzdolabı (+4 ˚C)	Beko	Örnekler, belirli kit çözeltileri ve tampon çözeltilerin saklanmasında kullanılmıştır.
Hassas terazi	Desis	Kimyasal madde miktarlarını ölçmede kullanılmıştır.
Vorteks	Stuart	Küçük hacimdeki solüsyon ve mixleri homojen hale getirmede kullanılmıştır.
Soğutmalı santrifüj	Hettich	İzolasyon protokolünde kullanılmıştır.
Nanodrop	ACTG gene UVS - 99	Genomik DNA konsantrasyonu ölçümlerinde kullanılmıştır.
Isıl döngüleyici (PCR cihazı)	Bio-Rad	Belirlenen PCR döngüsünde, dizilenecek gen bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılmıştır.
Mikrodalga fırın	Arçelik	Agaroz jel hazırlamada kullanılmıştır.
Çeker ocak	Vortice	Agaroz jel hazırlamada kullanılmıştır.
Yatay elektroforez sistemi	Bio-Rad	Agaroz jele yüklenen PCR ürünlerinin yürütülmesinde kullanılmıştır.
Jel görüntüleme sistemi	Dnr, Mınıbıs	Agaroz jelde yürütülen örneklerin görüntülemesi işleminde kullanılmıştır.
Florometre	Qubit	Pcr ürünleri ölçümlerinde kullanıldı.
Yeni nesil dizileme cihazı	İllumina, MiSEQ	Dizileme işleminde kullanılmıştır.
Bilgisayar	Casper, Samsung	Jel görünteleme sistemine bağlı şekilde , agaroz jel görüntülerinin kaydedilip arşivlenmesi sağlanmıştır.(Casper) Primer dizaynı ve dizileme analizi için

3.1.2 Kimyasallar ve Ticari Kitler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 3.2'de yer almaktadır.

Tablo 3.2: Kullanılan ticari kitlerin ve kimyasalların listesi.

Kit, Kimyasal Adı	Marka	Kullanım Amacı
DNeasy Blood & Tissue Kits	Qiagen	EDTA'lı kandan DNA izolasyonu için kullanılmıştır.
QUIBIT dsDNA HS Assay Kit	İnvitrogen	DNA ve PCR ürünleri konsantrasyonunu ölçmek amacıyla kullanılmıştır.
Nextera XT DNA Sample Preparation Index Kit	İllumina	Yeni nesil dizileme protokolünde yer alan indeksleme işleminde kullanılmıştır.
Nextera XT DNA Sample Preparation Kit	İllumina	Yeni nesil dizileme protokolünde yer alan kütüphane hazırlık amacıyla kullanılmıştır.
MiSeq Reagent Kit v3	İllumina	Normalize edilmiş PCR ürününün dizileme cihazına yüklemesi amacıyla kullanılmıştır.
PhiX Sequencing Control V3	İllumina	Verilerin kalite kontrolü için kullanılmıştır.
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter	Manyetik boncuk yöntemiyle saflaştıma amacıyla kullanılmıştır.
Distile su	Polifarma	Tüm laboratuvar çalışmalarında kullanılmıştır.
Etanol (99%)	Sigma-Aldrich	Dna izolasyonunda ticari kitin üzerine prosedürlerinde belirtilen miktarlarda eklenerek kullanılmıştır. Yeni nesil dizileme PCR'ı sonrasında manyetik beadlerle birlikte saflaştıma amacıyla kullanılmıştır.
NaOH	Sigma-Aldrich	DNA kütüphanesinin denatürasyonu için kullanılmıştır.
Agaroz	Invitrogen	Amplikonların yükleneceği jelin hazırlanmasında kullanılmıştır.
TBE (10X)	Sigma-Aldrich	Agaroz jel hazırlanmasında kullanılmıştır.
Etidyum bromür	EMD Millipore	Amplikonların floresan olarak işaretlenmesinde kullanılmıştır.

Tablo 3.2 (devam): Kullanılan ticari kitlerin ve kimyasalların listesi.

Kit, Kimyasal Adı	Marka	Kullanım Amacı
DNA jel yükleme boyası	New England Biolabs	Amplikonların agaroz jeldeki kuyucukların tabanına inmesinde ve boyanmasında kullanılmıştır.
Taq DNA Polymerase &buffer ,recombinant (5 U/µL)	Thermo Scientific	DNA örneklerini çoğaltmak için yapılan PCR reaksiyonunda kullanılmıştır. Enzim ve buffer birlikte ticari kit olarak temin edilmiştir.
d-NTP set (100 mM), each 4x0.25 ml	Thermo Scientific	PCR reaksiyonunda kullanılmıştır.
GeneRuler and O'GeneRuler DNA Ladders	Thermo Scientific	PCR ürününün boyunu tespit etmede DNA markörü olarak kullanılmıştır.
Dimetil sulfoksid (DMSO)	Thermo Scientific	PCR reaksiyonunda kullanılmıştır.

3.1.3 Primerler

Primerler, hedef gen bölgelerinin PCR ile çoğaltılmasında kullanılmıştır. Primer3 programıyla tasarlanan primerler USCS In silico-PCR, Primer Design and Search Tool ve PCR Primer Stats biyoinformatik uzantılarıyla kontrolleri yapıldıktan sonra Macrogen firması tarafından sentezlenmiştir. Analiz edilecek olan polimorfik bölgeler için tasarlanan primerlere ait diziler Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

Tablo 3.3: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 ve CYP2D6 genleri için tasarlanan primerler.

Gen Adı	Primer	Primer Dizisi (5'-3')	Band Boyutu (bç)
CYP1A2	CYP1A2_1CF	AGGAACACAACGGGACTTCT	588
CYP1A2	CYP1A2_1CR	TACGCTCCTTCTCCTTGAGG	
CYP1A2	CYP1A2_1KF_F	ACCTTTCTTGGGACCAATTT	964
CYP1A2	CYP1A2_1KF_R	ACCTTTCTTGGGACCAATTT	
CYP2C9	CYP2C9_3F	ATTTTGGCCTGAAACCCATA	599
CYP2C9	CYP2C9_3R	TTGGCTCTCAGCTTCAAACC	
CYP2C9	CYP2C9_4F	TCTCCAACTATTCTTGCCCTTT	837
CYP2C9	CYP2C9_4R	GCTATGAGCACGCTTTAGGG	
CYP2C9	CYP2C9_5F	TCAATCAGGTTGTCCAAATTCTT	976
CYP2C9	CYP2C9_5R	CTACCGCCTCAACTTCAGAAC	
CYP2C9	CYP2C9_7F	TTGTGCATCTGTAACCATCCTC	508
CYP2C9	CYP2C9_7R	CCCCAAACTGGAAACAAGAG	
CYP2C9	CYP2C9_9F	GAGTAACTGCTCTCTGTGTTTGC	397

Tablo 3.3 (devam): CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4 ve CYP2D6 genleri için tasarlanan primerler.

Gen Adı	Primer Adı	Primer Dizisi (5'-3')	Band Boyutu (bç)
CYP2C19	CYP2C19_1F	TGGAACCACTTGGGTTAACAT	481
CYP2C19	CYP2C19_1R	TGAAGGAGCATACTTACATTGGTT	
CYP2C19	CYP2C19_3F	GCATCTGTCTTGGGGATGG	400
CYP2C19	CYP2C19_3R	TGAGGTAATTTGGTATCCAAGC	
CYP2C19	CYP2C19_4F	TCAAATACATGAATTCACCCCTA	640
CYP2C19	CYP2C19_4R	AAGACTCCAAAGTGCCTGGA	
CYP2C19	CYP2C19_5F	TTTGTAGTATCAATCAGGTTGTGC	850
CYP2C19	CYP2C19_5R	CTGGAAGCTGCAGAACAGAG	
CYP2C19	CYP2C19_9F	TCATCCCTCCTATGATTCACC	400
CYP2C19	CYP2C19_9R	GGGTCAGAAGAAGCATCACA	
CYP2C19	CYP2C19_7F	TGTGGGCTTCTCTTCCTTCT	600
CYP2C19	CYP2C19_7R	CCAATTAAACTGCCATACATAGGA	
CYP3A4	CYP3A4_3F	TCAGTATCCACAACACTTGGAGA	470
CYP3A4	CYP3A4_3R	AGGCATGCAGATTCCCATT	
CYP3A4	CYP3A4_9F	ATGCTTTCCCCAGATCATAA	650
CYP3A4	CYP3A4_9R	GTGGCTCCTGATTGGATGTT	
CYP2D6	CYP2D6_(-1584)F	AGCACTGGCTCCAAGCAT	587
CYP2D6	CYP2D6_(-1584)R	CGGAGATTTCCTCTTGTTGC	
CYP2D6	CYP2D6_ 1F	ACTGGCAGCACAGTCAACAC	441
CYP2D6	CYP2D6_ 1R	GTTTCACCCACCATCCATGT	
CYP2D6	CYP2D6_ 2F	TCTGGGAATGGGATGCTAAC	668
CYP2D6	CYP2D6_ 2R	CTCACCCATTGGGCTCCT	
CYP2D6	CYP2D6_ 3F	GTGGGCAGAGACGAGGTG	694
CYP2D6	CYP2D6_ 4R	CCATCTATGCAAATCCTGCTC	
CYP2D6	CYP2D6_ 5F	AGGTTTCTCCTCTGGGCAAG	680
CYP2D6	CYP2D6_ 6R	GGCCCTGACACTCCTTCTT	
CYP2D6	CYP2D6_ 7F	GAGCCCATCTGGGAAACAGT	670
CYP2D6	CYP2D6_ 8R	CTGCTGAGAAAGGCAGGAAG	
CYP2D6	CYP2D6_ 9F	GGGTCCCAGCATCCTAGAGTC	673
CYP2D6	CYP2D6_ 9R	CTGCTCAGCCTCAACGTACCCCT	

3.2 Yöntem

Bezmiâlem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Komitesi'nden alınan etik kurul onayı ile deneysel çalışmalara başlanmıştır.

Çalışmamızın konusu olan antidepresan ilaçların neredeyse tamamı karaciğerde bulunan CYP enzimleri tarafından metabolize edilmektedir. Yapılan literatür taraması sonrası ilaç metabolizmasında rol oynayan CYP enzimlerini kodlayan polimorfik noktalar belirlendi.

Oluşturulacak tanı paneli kapsamında, nokta mutasyonu, insersiyon ve delesyon içeren 5 gen ve 35 bölge ele alındı. Bu polimorfik noktaların analizi için tasarlanan primerlerin optimizasyonunda genomik DNA kullanıldı.

Oluşturulacak tanı kitinde taranacak bölgeler için gerekli primer tasarımı sürecinde Primer3 programı kullanıldı. Primer dimer, sekonder yapı ve Tm kontrolleri için PCR Primer Stats programı kullanıldı. Tasarlanan primerlerin hepsi tek tek optimize edildi. Optimizasyonu işlemi tamamlandıktan sonra çalışmamıza aldığımız genomik DNA'lar için amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Aynı DNA örneğine sahip bütün amplikonlar tek tüpte birleştirildi. Tek tüpte birleştirilen örnekler Bıoline PCR saflaştırma kiti ile kolon prurifikasyonu yapıldı. Saflaştırma işleminden sonra Nextera XT DNA Library Prep ve Nextera XT Index kitleri kullanılarak fragmantasyon, barkodlama ve tagmentasyon aşamaları kit protokolüne uygun şekilde yapıldı. Elde edilen barkodlanmış PCR ürünleri Ampure Bead kullanılarak purifiye edildikten sonra Qubit ile PCR ürün miktarları tespit edildi. Amplikonlar her havuzdan eşit konsantrasyonda olacak şekilde tek tüpte birleştirildi. Birleştirilen amplikonlar NaOH ile denatüre edildikten sonra, HT1 tamponu ile karıştırıldı. Seyreltilen DNA kütüphanesi hazırlanan Phix kontrol kütüphanesi ile birleştirildi. Birleştirilen DNA ve kontrol kütüphanesi Reagent Kit ile yüklemeye hazır hale getirildi.

Elde edilen diziler ve okuma sayıları IGV ve SEQ programları kullanılarak analiz edildi. Hazılarlanan havuzlardaki okuma sayılarının dengeli dağılım göstermesi ve yeterli okuma derinliğine sahip olması kontrol edildi.

3.2.1 Örneklerin Toplanması

Bu tez çalışmasına gönüllü olarak çalışmaya katılmak isteyen rastgele seçilen 20 sağlıklı birey dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen hastalardan "ASGARI BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU" doldurulması istendikten sonra, EDTA'lı tüpe 2 ml kan örneği alınmıştır.

3.2.2 DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüpte + 4 ºC de muhafaza edilen kandan 200 µl alınıp 1,5 ml eppendorf tüpüne konulduktan sonra üzerine 20 µl Proteinaz K ve 200 µl Buffer AL eklenildi sonra vortekslenerek homojenize olması sağlandı. 56°C'de 10 dakika inkübasyona bırakıldıktan sonra tüpün üzerine 200 µl etanol eklendi ve vorteks yapıldı. 1.5ml eppendorf tüp içerisindeki sıvının tamamı, toplama tüpü üzerinde bulunan filtreli hazneye aktarıldı. 8000rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Tüpün alt kısmı atıldı ve filtre haznesi yeni bir toplama tüpüne aktarıldıktan sonra filtrenin üzerine 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon olarak kullanılan kit içeriğinde bulunan Buffer AW1 eklendi. 8000rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Santrifüj sonrasında filtre haznesi tekrar yeni bir toplama tüpüne alınarak üzerine 500 µl AW2 yıkama tamponu ekledikten sonra, 14000 rpm'de 5 dakika süresince santrifüj yapıldı. Toplama tüpüne toplanan süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra, 14000rpm'de 1 dakika santrifüj yapıldı. Filtre haznesi yeni 1,5ml'lik eppendorfa yerleştirildi ve 200 µl elüsyon tamponu olarak kullanılan Buffer AE ilave edildi. 8000rpm'de 2 dakika santrifüj yapıldı. Son olarak filtre haznesi atıldı. Eppendorfta kalan genomik DNA konsantrasyon belirlenmesi için bir sonraki aşamaya geçildi.

3.2.3 DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

İzolasyon sonucu elde edilen genomik DNA konsantrasyonu, spektrofotometre (Nanodrop ND-1000) cihazı ile ölçüldü. DNA'nın O.D(260/280) dalga boylarında spektrofotometrik ölçümlerinin oranının 1,8-2.0 aralığında olması ideal olarak kabul edildi. İdeal DNA konsantrasyonu ise (30-100 ng/µl) olarak değerlendirildi. Bu limitasyonlar eşliğinde elde edilen genomik DNA'lar ile çalışmaya başlandı.

3.2.4 Primer tasarımı ve primer sulandırma

Yapılan literatür taraması sonucunda belirlenen polimorfik bölgelerini kapsayan primerlerin tasarımı için referans diziler ENSEMBLE ‘dan alındı.

Primer tasarımı yaparken;

- Primer uzunluğu olarak 18 ila 25 baz arasında olmasına, %40 ila %60 arasında bir GC içeriğine sahip ve bağlamayı desteklemek için 3’ C veya G ile bitmesine,
- Primerin 3 'ucu kalıp DNA'sı ile tam olarak eşleşebilmesine,
- Primerin 3 ′ ucundaki son 5 bazda, en az 2 G veya C tabanının (GC kelepçesi) olduğundan emin olunmasına,
- Dört veya daha fazla baz tekrarından kaçınılmasına,
- Primerlerin kalıp DNA’ya bağlanma sıcaklığı optimum 60ºC olmak üzere 55-65 ºC arasında olacak şekilde ve her primer çiftinin kalıp DNA’ya bağlanma sıcaklıkları arasında maksimum 3ºC olmasına,
- Saç tokası (hairpin) denilen yapıyı oluşturmaması için primer kendi içinde eşlenik baz dizileri içermemesine,
- Primer çiftleri primer-dimer oluşumuna sebep olmamasına dikkat edilerek Primer3 pragramı aracılığıyla tasarlandı.

Primer tasarımları yapıldıktan sonra in-silico olarak primerlerin kontrolleri USCS-In-Silico PCR ve BiSearch.enzyme sayfaları kullanılarak yapıldı. HPLC saflaştırma metoduyla sentezlenen primerler liyofilize halde teslim alıındı, son konsantrasyonları 100 pmol/µl olacak şekilde distile su ile sulandırıldı. 100 pmol/µl stok primerin 1/10 sulandırılması suretiyle 10 pmol/µl olacak şekilde PCR primerleri hazırlandı.

3.2.5 PCR optimizasyonu

Çalışmaya hasta DNA’ları ile başlamadan önce, DNA kalitesinden emin olduğumuz çalıştığını bildiğimiz kontrol DNA’sı ile optimizasyon çalışması yapıldı. Çeşitli denemeler sonucu sentetik olarak hazırlanmış primerler için optimum sıcaklık, optimum reaktif miktarları ve konsantrasyonları tespit edildi. Optimizasyon aşamasından sonra çalışmaya dahil edilen 20 DNA örneği için PCR reaksiyonları gerçekleştirildi ve ısıl döngü cihazına yerleştirilen örneklerin amplifikasyonu sağlandı. PCR reaksiyonunda kullanılan primer dizileri Tablo 3.4, uygulanan PCR protokolleri Tablo 3.5 ve PCR döngüsü Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.4: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 için PCR protokolü.

Bileşenler	Reaksiyona konulan hacim
10XPCR Buffer	2,5 µl
MgCl2	2 µl
dNTP karışımı	0,5 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,2 µl
Kalıp DNA	2,5 µl
Steril H2O	17,5 µl

Tablo 3.5 : CYP2D6 için PCR protokolü.

BİLEŞEN	REAKSİYONA KONULAN HACİM
10XPCR BUFFER	2,5 µl
MgCl2	2 µl
dNTP karışımı	0,5 µl
Forward Primer	1 µl
Reverse Primer	1 µl
Taq DNA Polimeraz	0,2 µl
Kalıp DNA	2,5 µl
Dimetil sulfoksid (DMSO)	2 µl
Steril H2O	15,5 µl

Tablo 3.6: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 için PCR döngüsü.

Aşama	Sıcaklık(ºC)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95	30 saniye	38 döngü
Primer Bağlanması	60	30 saniye	
Yeni Zincir Sentezi	72	30 saniye	
Son Uzama	72	5 dakika	1 döngü

Tablo 3.7: CYP2D6 için PCR döngüsü.

Aşama	Sıcaklık(ºC)	Süre	Döngü Sayısı
İlk Denatürasyon	95	5 dakika	1 döngü
Denatürasyon	95	30 saniye	38 döngü
Primer Bağlanması	60	30 saniye	
Yeni Zincir Sentezi	72	30 saniye	
Son Uzama	72	5 dakika	1 döngü

3.2.6. Amplifikasyon Sonrası Çoğaltılan Ürünleri Kontrolü

3.2.6.1 Agaroz Jel Hazırlanması

PCR ürünlerinin oluşup oluşmadığını kontrol etmek için, PCR sonrası ürünler agaroz jel elekroforezi ile kontrol edildi. 2 gr Agaroz tartılarak 100 mL 1X TBE tamponuna eklendi ve karıştırılarak homojenize edildi. Hazırlanan karışımın ağzı alüminyum folyo ile kapatıldıktan sonra üzerine delikler açılarak mikrodalga fırında kaynatıldı. Çözeltinin biraz soğuması beklendikten sonra içerisine 8 µL Etidyum bromür eklenip tamamen karışması sağlandı. Bu karışım içerisine taraklar yerleştirilmiş jel tabaklarına döküldü. Jeli dökerken hava kabarcığı kalmamasına dikkat edildi, oluşan kabarcıklarda jel katılaşmadan pipet ucu yardımıyla giderildi ve pürüzsüz jel elde edildi. Hazırlanan jelin tabak içerisinde 20 dakika donması beklendi. Jelin donduğundan emin olduktan sonra tarakları çıkartarak jelde oluşturduğumuz kuyuların kontrolu yapıldı. Jel elektroforez tankına katot elektrot yönüne dikkat edilerek yerleştirildi. Tank jelin üzerini en az 5-6 mm geçecek şekilde 1X TBE tamponu ile dolduruldu. Parafilm'den kesilerek üzerine 1 µL 6X Jel Loading Buffer ve 5 µL PCR ürünü konularak iyice pipetaj yapılıp homojenize olması sağlandıktan sonra karışımın tamamı jel kuyucuklarına zarar vermeden kuyucuklara yüklendi. Ayrıca her sıraya 100 bç Ladder yüklendi. Örneklerin yüklenme sırası ve düzeni kontrol edildikten sonra tankın kapağı kapatılarak yürütme işlemi başlatıldı. Güç kaynağı 100 mV ayarlanarak,

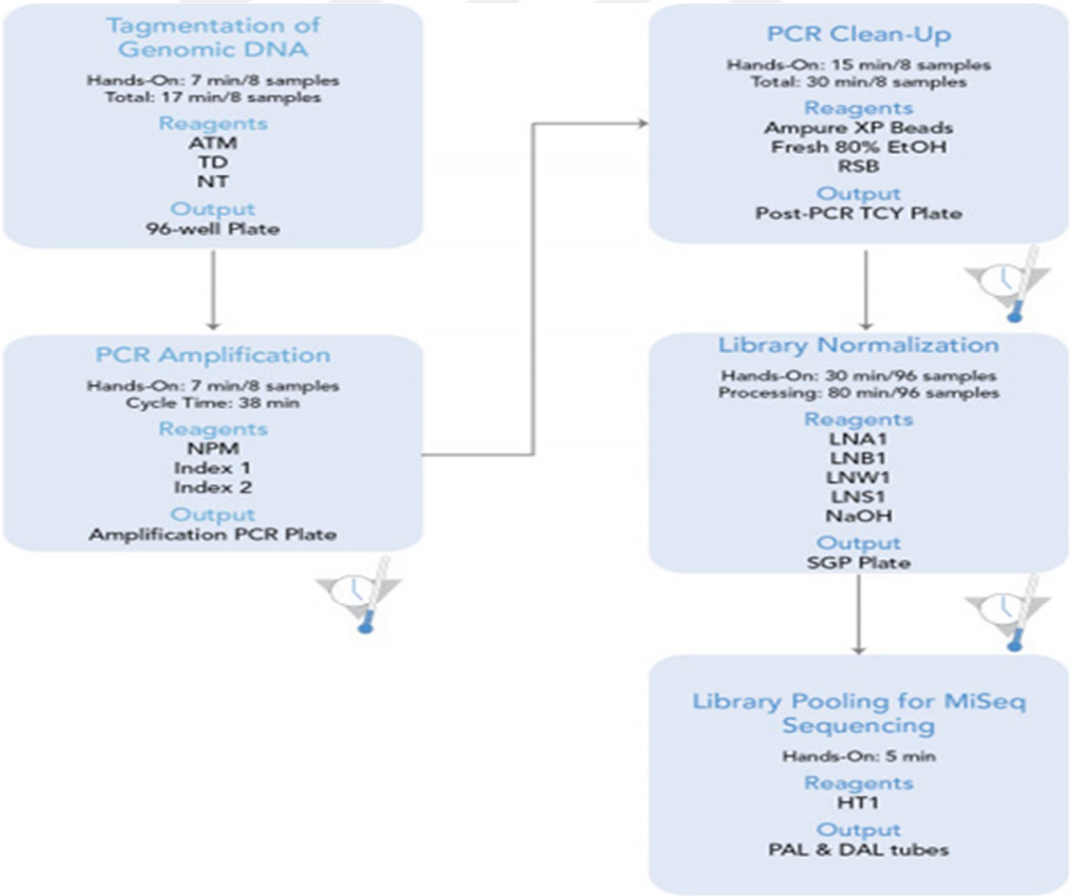
örnekler 30 dakika jel üzerinde yürütüldü. UV altında fotoğrafları çekildi ve kaydedildi.

3.2.6.2 PCR Ürünlerinin Değerlendirilmesi

PCR işlemi sonrası, PCR ürünlerinin istenilen bölgede olup olmadığını ve PCR ürününün dizileme işlemi için yeterli kalitede olduğunu kontrol etmek amacıyla PCR ürünleri DNA molekül ağırlığı belirteçleri ile birlikte jelde görüntülenmiştir. Yeterli ürün oluşmadığı düsünülen ürünler için PCR işlemi tekrar edilerek yeterli ürün sağlandıktan sonra protokole devam edilmiştir.

3.2.7 Yeni nesil dizileme

Protokol dahilinde "Nextera XT DNA Library Kit ve 'NexteraXT Indeks Kit' içeriklerinden yararlanıldı. Böylece DNA fragmentasyonu ve adaptör dizi eklemeleri ve saflaştıma yapılarak kalıp DNA dizileme cihazına uygun hale getirildi. Şekil 3.1 uygulanan protokolün özeti niteliğindedir.



Şekil 3.1 : Dizileme basamakları.

3.2.7.1 Kütüphane hazırlama

Nextera XT protokolünde yeni nesil dizilemede sıklıkla kullanılan ve aşina olunan panel sisteminden farklı olarak havuz sistemi kullanıldı. Ayrı ayrı primerleriyle amplifiye edilen CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 ve CYP1A2 genlerinin ilgili amplikonlarından her havuzda sadece tek genomik DNA'ya ait örnekler olacak şekilde birleştirildi.

Hazırlanan şablona göre 1 no'lu hastaya ait toplamda 5 genin polimorfik noktalarının analizlenmesine imkân sağlayacak olan 22 amplikon tek bir tüpte toplandı. Bu birleştime işlemi her bir hasta içi ayrı ayrı yapıldı. Sonuçta toplamda çalışmamıza dahil edilen 20 hasta sayısı kadar yani 20 havuzluk çalışma şablonu oluşturuldu. Amplikonlar birleştirildikten sonra Qubit ile DNA ölçümleri yapıldı. Ölçümden sonra ayrı ayrı her örneğin konsantrasyonu 0,2 ng/µl olacak şekilde seyreltildi. Başlangıç örnek konsantrasyonları eşitlendikten sonra PCR işlemine başlandı. Örneklerden 5'er µl hacimlerde alınarak enzimatik fragmentasyon ve adaptör solüsyonları ile tagmentasyon işlemi gerçeklestirildi. Tagmente edilen DNA, indeks primerleri ve PCR Mastermix ile PCR reaksiyonuna tabi tutuldu. 12 döngülük PCR ile tagmente DNA'nın uçlarına indeks diziler eklenerek her örneğin ayrı indeks ile barkodlanması sağlandı. Böylece son asamada örnekler karıstırıldığı zaman hangi örneğin hangi indekse ait olduğu anlasılabildi. PCR asamasından sonra manyetik beadler ve etanol yardımıyla saflaştırma yapıldı.

3.2.7.2 Manyetik boncuk purifikasyonu

Her bir DNA örneğine sahip çoklu amplikonlar barkodlandıktan ve PCR işlemi tabi tutulduktan sonra kısa süreli vortekslenir ve 10 sn. süreyle 10.000x g'de santrifuj edilir. Mantetik boncukların içinde bulunduğu AMPure XP şişesi çalkalanarak çökelti oluştuma ihtimali bulunan mantetik boncukların solusyon içerisinde asılı duruma geçmesi sağlandı. PCR ürünlerinin üzerine 90 µl AMPure bead eklendi ve manyetik boncuklarla amplikonların iyice karışması sağlandı. Oda ısısında 5 dakika bekletildikten sonra karışım manyetik stant üzerine alındı ve 2 dakika stant üzerinde bekletildi. Tüplerin içerisindeki manyetik boncuklar tüpün çeperlerine çekilerek sıvıyı berrak hale getirdi. Berraklaşan sıvının sıvı kısmı pipetle çekilerek atıldı. Taze olarak hazırlanan %70 EtOH ile tüpte kalan pelet yıkandı. Manyetik boncukların tekrar çepere çekilmesinin ardından sıvı kısım tekrar atılarak 2.kez etanol ile yıkama işlemi

gerçekleştirildi. Yıkama işlemi tamamlandıktan sonra beadlerin üzerindeki nemi buharlaştımak adına tüplerin kapakları açık şekilde manyetik stant üzerinde 15 dakika kurumaya bırakıldı. Beadlerin nemi buharlaştıktan sonra 52.5 µl RSB solusyonu eklendi ve örnekler mantetik stanttan alındı. 2 dakika oda ısısında bekletilen örnekler tekrar manyetik stantta alındı ve bu kez sıvı kısmı alındı. Alınan sıvı kısım etiketlenmiş ve purifiye edilmiş DNA yani saflaştırılmış amplikon kütüphanesidir.

3.2.7.3 Miseq sekanslama

Elde edilen amplikon kütüphaneleri tek tek Qubit ile ölçüldü ve ürün konsantrasyonu belirlendi. Yapılan ölçümlerden sonra her havuzdan 50 ng olacak şekilde örneklerden hesaplanan hacimlerde birleştirildi. Birleştirilen DNA örneği son olarak 4 nm'e dilue edildi. 1.5 ml'lik ependorf tüpte 5 µl (4 nm) DNA örneği ve 5 µl taze hazılanmış 0.2N NaOH (200 µl 1N NaOH + 800 µl d-H2O) birleştirildi. İyice karışrıldıktan sonra oda ısısında 5 dakika denaturasyon amaçlı inkübasyona bırakıldı. İyice denatüre olan örnek üzerine 990 µl HT1 tampon eklendi. 20 pM denatüre DNA kütüphanesi elde edildi. 20 pM kütüphaneden 240 µl alıp üzerine 360 µl HT1 buffer eklendi ve kütüphane 8 pM düşürüldü. Aynı şekilde 12.5 pM Phix solüsyonu hazırlandı.

Son olarak 570 µl DNA kütüphanesi ile 30 µl Phix karışıtılarak %5 Phix içeren kütüphane solusyonu hazırlandı. Hazırlanan örneğin tamamı Miseq Reagent Kit kartuşunda bulunan örnek yükleme bölmesine pipet yardımıyla yüklendi. Kartuşa örnek yüklenmeden önce kartuşun içindeki solusyonların çözündüğünden ve iyice karıştığından emin olmak için konroller yapıldı ve kartuş iyice çalkalandı. Flow cell kutusundan dikkatlice çıkarıldı ve cam bölme önce distile su sonra %70 'lik alkolle iyice temzilendi. Parmak izi, toz, çizik ve peçete artığı kalmayacak şekilde temizlenen flow cell cihazın flow cell bölmesine yerleştirildi. İncorporation buffer ve atık kutusu yerleştirilen cihaz dizileme için hazır duruma getirildi.

Hazırlanan örnekler cihaza yüklemeden önce çalışmamızı cihaza tanıtma görevini yerine getiren sample sheet dosyası oluşturuldu. Oluşturulan sample sheet dosyasıyla kullanılan kit, kullanılan indexler ve analiz için kullanılacak referanslar cihaza tanıtıldı. Son kontroller yapıldıktan sonra çalışma başlatıldı. Yaklaşık olarak 24 saat süren çalışma sürecinden sonra çalışma sonuçları Miseq cihazından alındı ve analiz edildi.

3.2.7.4 Analiz

Örnekler Illumina MiSeq cihazına yüklendikten sonra dizileme işlemi tamamlandığında cihazdan fastq ve bam uzantılı analiz dosyaları alındı. Örnekler IGV ve SEQ yazılımları ile analiz edildi. Elde edilen veriler analiz edilirken ilk olarak panelde belirtilen polimorfik noktaların analizine imkân sağlayacak şekilde amplikon elde edilip edilmediği kontrol edildi. Daha sonrasında ise okuma derinliğine bakıldı. Literatürde belirtilen en az 50X okuma derinliği refarans olarak kabul edildi. Bu değerin altında kalan amplikonlar geçersiz sayıldı. Analiz programlarında dizilerin referans diziler ile karşılaştırılması ve polimorfik allel ve nükleotit değişimleri tespit edildi. Tespit edilen değişimler önceden hazırlanan analiz formlarına not edildi.

4. BULGULAR

4.1 Genomik DNA İzolasyonu Bulguları

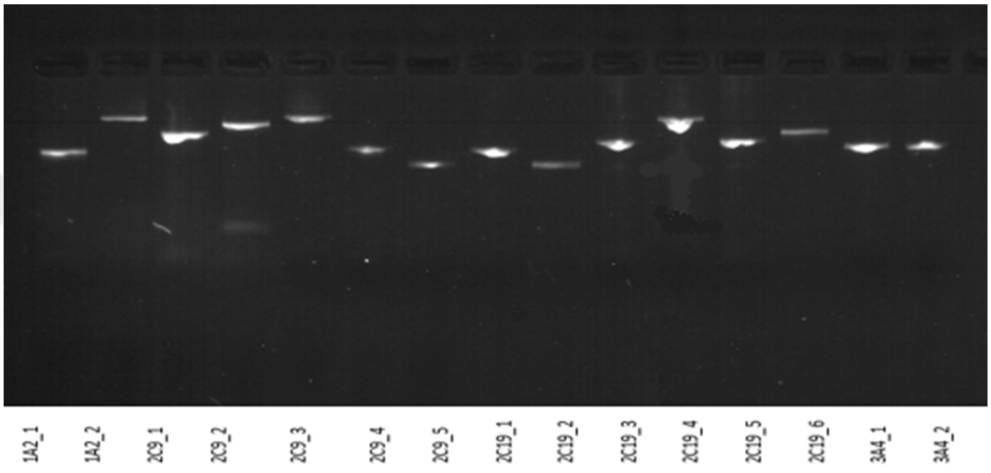
DNeasy Blood & Tissue Kits ile ile izole edilen genomik DNA'ların konsantrasyon miktarları 260 nm'deki absorbans değeri ile, saflıkları ise 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerlerinin oranı (A260/280) ile belirlenmiştir. Elde edilen konsantrasyon ve saflık değerleri Tablo 4.1'de verilmiştir. Saflık değeri ideal aralıkta kabul edilen örnekler çalışmaya alınmıştır. İzolasyon sonrası elde edilen genetik materyaller PCR ile çoğaltılacak hedef bölgeler için kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Kalıp DNA olarak kullanılacak miktar 2.5 µl olarak belirlenmiştir.

Tablo 4.1 : DNA konsantrasyonları ve saflık değerleri.

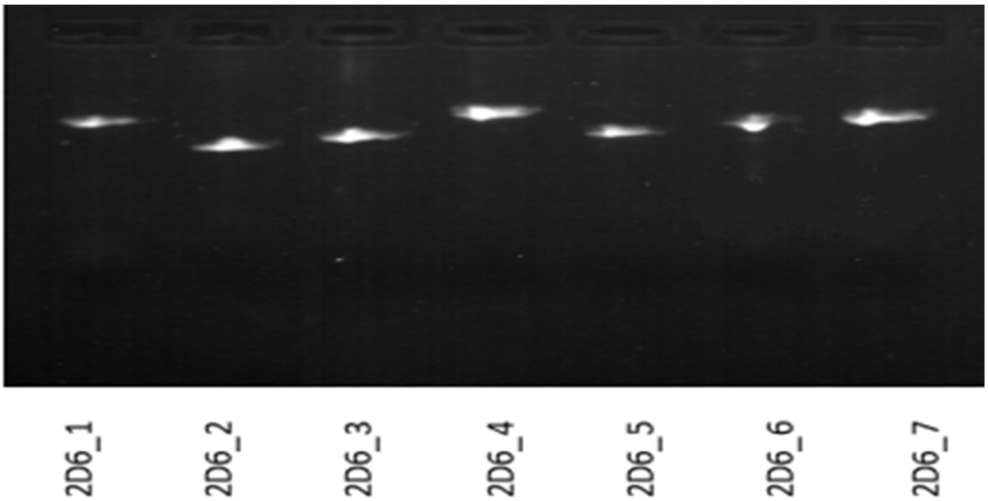
DNA No	ng/µl A(260)	A (260/280)
1	49,2	1,95
2	73,1	1,75
3	75,2	1,82
4	47,5	1,94
5	65,9	1,88
6	33,0	1,79
7	99,1	1,82
8	96,7	1,74
9	43,6	1,73
10	44,2	1,86
11	33,2	1,90
12	53,0	1,92
13	44,8	1,86
14	99,6	1,99
15	97,7	1,90
16	94,8	1,83
17	80,5	1,89
18	98,5	1,94
19	80,6	1,90
20	34,2	1,87

4.2 Primerlerin optimizasyonu

Polimorfik noktalar için tasarladığımız primerlerin istenilen bölgeyi çoğaltıp çoğaltmadığının kontrolü için her primer çifti için ayrı ayrı PCR yapıldıktan sonra PCR ürünleri DNA marker ile birlikte %2'lik agaroz jel elektroforezinden sonra UV ışık altında görüntülendi. Görüntelemeden sonra jel görüntüleri bilgisayara kaydedildi. Şekil 4.1'de CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 genleri için yapılan optimizasyon sonuçları gösterildi. Şekil 4.2'de ise CYP2D6 geni için yapılan optimizasyon sonuçları gösterildi.



Şekil 4.1: CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19 ve CYP3A4 genleri jel görüntüsü.



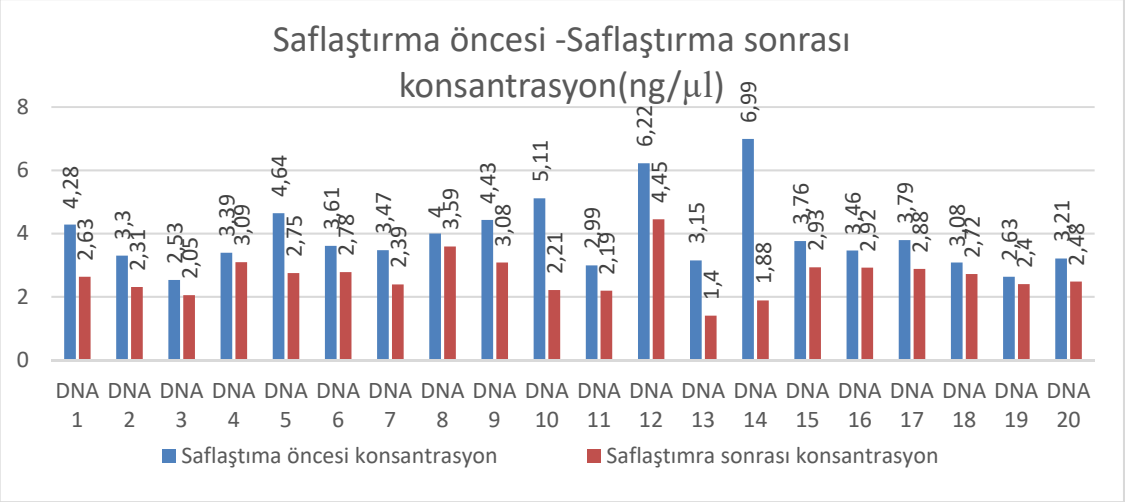
Şekil 4.2: CYP2D6 geni jel görüntüsü.

4.3 Miseq kütüphane hazırlığı ve normalizasyonu

İlk standart PCR sonucu elde edilen amplikonlar birleştirildikten sonra ikinci bir PCR ile barkodlama işlemine tabi tutuldu. Barkodlama işleminden sonra manyetik boncuklar aracılığıyla saflaştırma işlemi yapıldı. Saflaştırma işleminde önce ve sonra örneklerin konsantrasyonları belirlendi. Örnekler konsantrasyon tespitinden sonra her havuzdan eşit miktarda örnek girecek şekilde normalize edildi. Tablo 4.2'de amplikonların giriş konsantrasyonu ve saflaştırma sonrası konsantrasyonları verilmiştir. Ayrıca tabloda çalışmamıza dahil ettiğimiz amplikon sayılarıda dahil edilmiştir. Şekil 4.3'de amplikonların saflaştırma öncesi ve sonrası konsantrasyonları verilmiştir.

Tablo 4.2 : Amplikonların giriş ve saflaştırma sonrası konsantrasyonları.

Hasta/Havuz No	Amplikon sayısı	Amplikon konsantrasyonu (ng/µl)	Manyetik purifikasyon sonrası konsantrasyon (ng/µl)
1	410	2,53	2,05
2	430	2,63	2,39
3	425	2,99	2,19
4	428	3,08	2,72
5	419	3,15	1,4
6	410	3,21	2,48
7	425	3,3	2,31
8	426	3,39	3,09
9	430	3,46	2,92
10	422	3,47	2,39
11	426	3,61	2,78
12	427	3,76	2,92
13	425	3,79	2,88
14	431	4,0	3,59
15	428	4,28	2,63
16	430	4,43	3,08
17	425	4,64	2,75
18	427	5,11	2,21
19	429	6,22	4,45
20	425	6,99	1,88



Şekil 4.3 : Amplikonların giriş ve saflaştırma sonrası konsantrasyonları.

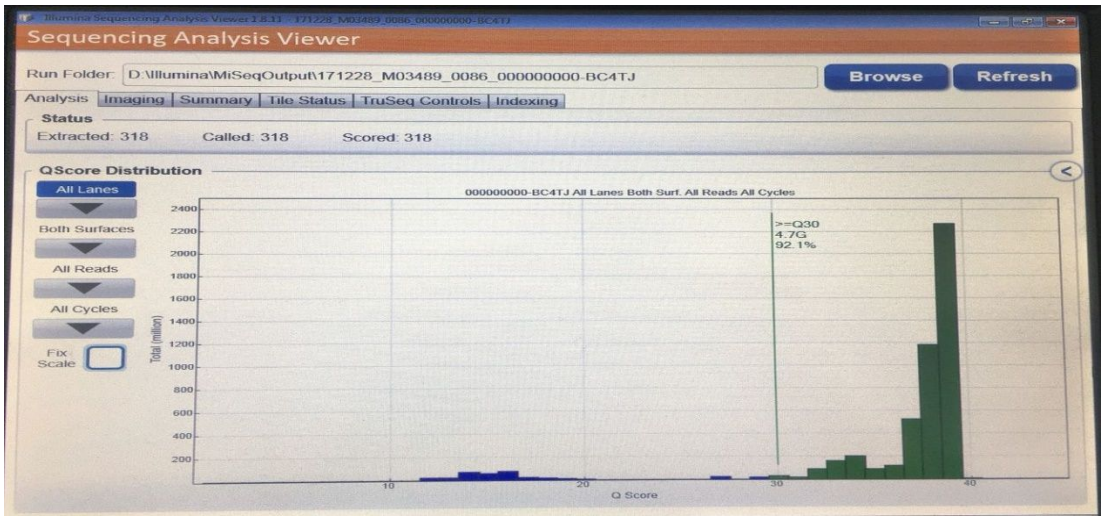
Kütüphane hazırlığına başlanmadan önce barkodlama için birleştirilmiş amplikonların yani havuzların ayrı ayrı Qubit ile konsantrasyonları ölçüldü ve YND amplifikasyon protokolü uygulandıktan sonra manyetik boncuklarla saflaştırma işlemi yapıldıktan sonra tekrar Qubit ile ölçüm yapıldı. Manyetik saflaştıma işleminde bazı örneklerden büyük miktarda kayıp olması sebebiyle saflaştırma sonrası konsantrasyonda düşüş gözlenmiştir.

4.4 Yeni nesil dizileme run özet verileri

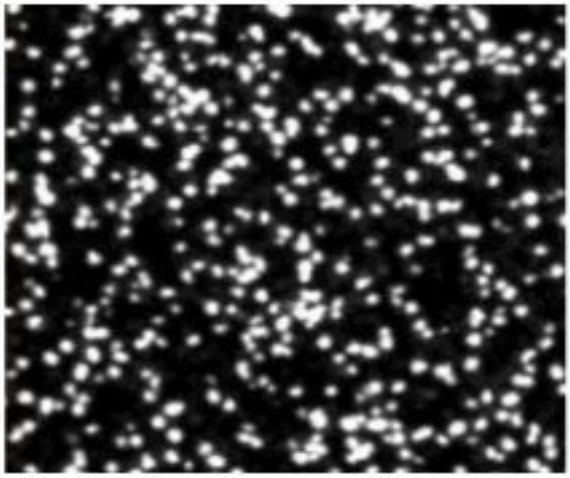
Illumina Nextera XT kitleri kullanılarak oluşturulan kütüphane Miseq v2 Reagent Kit (300 cycle) kartuş ve flowcell kullanılarak Illumina Miseq cihazına yüklenmiştir. Yeni nesil dizileme run özeti olarak çalışma kalitesini değerlendirebileceğimiz başlıca parametreler; okuma derinliği (read depth), küme yoğunluğu (cluster density), Q30 kalite skoru (Q30 score), CPU (Cluster passing filter) ve elde edilen veri (estimated yield)'dir. Tablo 4.3'de adı geçen parametreleri içeren run özeti verilmiştir. Şekil 4.4'de ise Miseq cihazının run sonunda verdiği Q30 skor çıktısı yer almaktadır. Şekil 4.5'de ise kümelenme yoğunluğunu gösteren cihaz çıktısı bulunmaktadır.

Tablo 4.3: Yeni nesil dizileme run özeti.

Parametre adı	Parametre değeri
Küme yoğunluğu (cluster density)	875 K/mm^2
Q30 kalite skoru (Q30 score)	%92,1
%PF (cluster passing filter)	%94,92
Elde edilen veri (estimated yield)	5100,0 MB



Şekil 4.4: Miseq cihazı Q30 skor çıktısı.



Şekil 4.5: Küme yoğunluğu.

4.5 Amplikon Okuma Sayıları

Illumina MiSeq ile dizileme çalışması yapılan örneklerin genotip analizinden önce okuma sayıları kontrol edildi. IGV ve SEQ programlarında analizi yapılan örneklerin okuma sayılarına ait grafikler ve tablolar oluşturuldu. Tablo 4.4 ve Tablo 4.5 amplikonlara ait okuma sayılarını vermektedir.

Tablo 4.4 : 1-10 no'lu DNA'lara ait okuma sayıları.

GEN*ALEL	POLİMORFİZM	RS NUMBER	DNA 1	DNA 2	DNA 3	DNA 4	DNA 5	DNA 6	DNA 7	DNA 8	DNA 9	DNA 10
CYP2D6*2	-1584 C >G	1080985	1169	1200	579	332	880	665	470	594	590	162
CYP2D6*2	2850 C>T	16947	1069	391	724	396	197	480	694	432	398	402
CYP2D6*2	4180 G>C	1135840	171	136	83	338	114	145	236	65	213	125
CYP2D6*2	1661 G>C	1058164	571	160	137	428	135	136	337	250	102	176
CYP2D6*3	2549delA	35742686	507	193	180	347	140	147	329	222	154	251
CYP2D6*4	1846 G>A	3892097	74	85	73	108	71	56	86	93	97	70
CYP2D6*4	100 C>T	1065852	581	247	243	204	164	314	368	169	134	126
CYP2D6*6	1707delT	5030655	445	124	107	291	110	134	240	196	70	117
CYP2D6*7	2935 A>C	5030867	940	390	375	694	291	242	603	299	294	362
CYP2D6*8	1758 G>T	5030865	235	87	81	186	72	68	128	122	59	82
CYP2D6*9	2615_2617delAAG	5030656	395	142	133	286	111	77	233	168	104	157
CYP2D6*11	883 G>C	5030863	426	147	169	390	184	163	324	261	100	136
CYP2D6*12	124 G>A	5030862	571	265	246	232	171	311	359	134	74	78
CYP2D6*14	1758 G>A	5030865	235	87	81	186	72	68	128	122	59	80
CYP2D6*15	138insT	5030862	578	263	252	248	165	299	371	151	82	81
CYP2D6*17	1023 C>T	28371706	532	215	178	398	198	149	412	265	74	141
CYP2D6*17	2850 C>T	16947	1069	391	724	396	197	480	694	432	398	402
CYP2D6*20	1973insG	72549354	249	76	94	131	74	61	148	137	75	72
CYP2D6*21	2573insG	267608296	402	147	148	261	127	69	270	173	119	176
CYP2D6*29	3183 G>A	59421388	742	502	640	1085	380	322	375	402	440	495
CYP2D6*38	2587_2590delGACT	72549351	376	143	138	261	121	70	261	168	115	167
CYP2D6*39	4180 G>C	1135840	171	136	83	338	114	145	236	65	213	125
CYP2D6*41	2988 G>A	28371725	1137	356	405	705	249	238	643	314	255	375
CYP2D6*44	2950 G>C	72549349	967	337	313	630	238	208	545	258	245	319
CYP2C19*2	681G>A	4244285	83	54	72	127	99	105	147	53	111	60
CYP2C19*3	636 G>A	4986893	87	150	148	230	280	68	145	198	234	65
CYP2C19*4	1A>G	28399504	74	68	82	70	91	79	77	76	64	70
CYP2C19*5	1297 C>T	56337013	87	138	87	84	167	84	245	78	187	164
CYP2C19*6	395G>A	72552267	454	199	271	199	162	183	470	335	241	243
CYP2C19*7	IVS5+2T>A (19294T>A)	72558186	125	117	118	287	198	257	354	132	276	89
CYP2C19 *8	358T>C	41291556	108	180	183	222	339	289	355	194	400	155
CYP2C19 *9	431G>A	17884712	118	157	159	198	324	275	340	194	352	159
CYP2C19*10	680 C>T	6413438	85	121	122	144	105	147	103	111	110	64
CYP2C19*17	991A>G	3758581	126	57	123	75	137	105	190	156	163	103
CYP3A4*1B	-392G>A	2740574	95	277	317	332	77	91	73	64	65	57
CYP3A4*5	653 C>G	55901263	905	293	556	304	391	294	513	496	355	425
CYP3A4*6	830_831insA	4646438	130	81	206	118	227	140	241	225	94	319
CYP3A4*7	167 G>A	56324128	864	163	298	221	322	249	399	352	59	552
CYP2C9*2	430C>T	1799853	791	326	297	211	437	316	621	426	540	740
CYP2C9*3	1075A>C	1057910	171	140	241	276	92	65	88	132	200	106
CYP2C9*4	1076T>C	56165452	172	142	240	270	96	70	90	130	204	107
CYP2C9*5	1080C>G	28371686	172	149	242	286	95	69	92	132	214	108
CYP2C9*6	818delA	9332131	74	88	76	140	100	65	248	302	122	166
CYP2C9 *8	449G>A	7900194	843	326	298	230	438	322	616	444	552	883
CYP2C9*11	1003C>T	28371685	128	116	274	253	90	66	88	83	134	86
CYP2C9*12	1465C>T	9332239	1068	365	774	386	644	401	669	543	349	203
CYP2C9*16	485C>A	72558190	417	135	84	62	147	108	176	128	143	58

Tablo 4.4 (devam): 1-10 no'lu DNA'lara ait okuma sayıları.

CYP2C9*16	1190 A>C	72558193	88	63	84	77	98	72	62	96	71	54
CYP1A2*1C	-3860G>A	2069514	685	313	75	78	328	292	577	83	84	94
CYP1A2*1F	-163C>A	762551	598	240	166	123	336	210	418	195	424	63
CYP1A2*1K	-729 C>T	12720461	330	132	99	82	205	106	220	110	195	87
CYP1A2*1K	-739 T>G	2069526	321	130	93	83	195	105	212	98	193	85

Tablo 4.5 : 11-20 no'lu DNA'lara ait okuma sayıları.

GEN*ALEL	POLİMORFİZM	RS NUMBER	DNA 11	DNA 12	DNA 13	DNA 14	DNA 15	DNA 16	DNA 17	DNA 18	DNA 19	DNA 20
CYP2D6*2	-1584 C >G	1080985	995	219	1013	696	1018	1685	531	338	432	632
CYP2D6*2	2850 C>T	16947	143	642	456	540	729	663	113	1618	1106	95
CYP2D6*2	4180 G>C	1135840	71	291	147	197	212	329	73	477	440	82
CYP2D6*2	1661 G>C	1058164	72	339	151	231	363	542	52	958	366	55
CYP2D6*3	2549delA	35742686	90	350	223	326	491	391	85	946	467	68
CYP2D6*4	1846 G>A	3892097	84	97	96	83	104	120	74	402	205	70
CYP2D6*4	100 C>T	1065852	52	340	547	140	864	464	60	957	215	55
CYP2D6*6	1707delT	5030655	65	221	111	205	285	359	52	718	256	51
CYP2D6*7	2935 A>C	5030867	104	663	422	520	723	764	109	1459	1349	120
CYP2D6*8	1758 G>T	5030865	63	164	138	162	166	274	75	438	181	52
CYP2D6*9	2615_2617delAAG	5030656	76	235	149	254	280	314	85	705	353	58
CYP2D6*11	883 G>C	5030863	55	339	173	274	490	485	59	971	198	53
CYP2D6*12	124 G>A	5030862	54	345	475	244	797	547	62	1083	217	52
CYP2D6*14	1758 G>A	5030865	63	164	78	162	166	274	54	438	181	54
CYP2D6*15	138insT	5030862	52	367	466	238	815	601	67	1119	264	52
CYP2D6*17	1023 C>T	28371706	66	312	215	353	477	598	62	1145	300	57
CYP2D6*17	2850 C>T	16947	143	642	456	540	729	663	113	1618	1106	95
CYP2D6*20	1973insG	72549354	69	161	83	156	164	241	61	463	122	62
CYP2D6*21	2573insG	267608296	80	248	161	256	319	300	82	726	420	65
CYP2D6*29	3183 G>A	59421388	141	994	761	770	936	1155	58	1812	1757	155
CYP2D6*38	2587_2590delGACT	72549351	80	244	155	247	307	308	85	726	398	67
CYP2D6*39	4180 G>C	1135840	71	291	147	197	212	329	73	477	440	82
CYP2D6*41	2988 G>A	28371725	72	696	462	506	690	771	51	1243	1460	86
CYP2D6*44	2950 G>C	72549349	60	608	371	455	641	687	96	1259	1265	62
CYP2C19*2	681G>A	4244285	114	71	53	92	121	55	139	72	132	50
CYP2C19*3	636 G>A	4986893	84	148	145	214	245	68	145	198	234	65
CYP2C19*4	1A>G	28399504	72	103	56	96	80	52	96	141	81	55
CYP2C19*5	1297 C>T	56337013	124	104	67	94	88	86	92	143	84	64
CYP2C19*6	395G>A	72552267	55	135	134	148	123	193	63	192	84	54
CYP2C19*7	IVS5+2T>A (19294T>A)	72558186	228	174	50	191	232	110	364	216	301	63
CYP2C19 *8	358T>C	41291556	324	226	57	569	445	188	371	263	363	66
CYP2C19 *9	431G>A	17884712	309	224	52	505	439	182	359	264	358	73
CYP2C19*10	680 C>T	6413438	114	71	53	92	121	55	139	72	132	52
CYP2C19*17	991A>G	3758581	115	129	72	141	128	62	142	82	112	64
CYP3A4*1B	-392G>A	2740574	73	63	52	155	93	204	60	479	97	54
CYP3A4*5	653 C>G	55901263	50	220	375	292	366	405	54	657	129	54
CYP3A4*6	830_831insA	4646438	54	77	88	227	158	310	55	421	75	62

Tablo 4.5 (devam): 11-20 no'lu DNA'lara ait okuma sayıları.

CYP3A4*7	167 G>A	56324128	62	309	253	358	279	392	70	392	222	158
CYP2C9*2	430C>T	1799853	64	250	226	344	466	450	60	855	57	111
CYP2C9*3	1075A>C	1057910	196	280	75	306	254	157	526	257	592	126
CYP2C9*4	1076T>C	56165452	194	280	75	308	255	161	527	257	596	128
CYP2C9*5	1080C>G	28371686	204	283	75	298	259	168	536	252	608	130
CYP2C9*6	818delA	9332131	144	97	70	187	163	219	204	195	283	59
CYP2C9 *8	449G>A	7900194	58	246	235	342	474	450	54	885	55	109
CYP2C9*11	1003C>T	28371685	55	55	69	83	65	87	53	90	54	52
CYP2C9*12	1465C>T	9332239	69	527	453	694	720	599	54	858	363	478
CYP2C9*16	485C>A	72558190	55	102	66	91	132	128	134	130	115	52
CYP2C9*16	1190 A>C	72558193	84	97	54	132	130	54	62	112	105	58
CYP1A2*1C	-3860G>A	2069514	64	369	242	360	452	458	62	251	64	86
CYP1A2*1F	-163C>A	762551	55	106	73	305	363	314	65	721	64	76
CYP1A2*1K	-729 C>T	12720461	54	104	95	140	175	150	59	350	57	71
CYP1A2*1K	-739 T>G	2069526	50	109	99	145	184	144	54	360	50	65

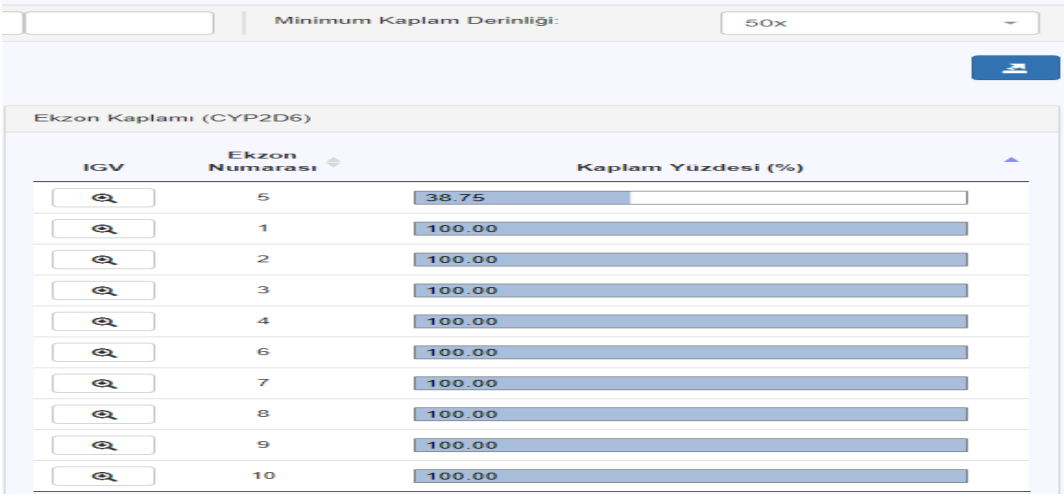
4.6 Moleküler analiz

Yeni nesil dizileme işlemi bittikten sonra miseq cihazından alınan .fastq dosyaları SEQ programına yüklenerek varyant sınıflandırma analizi yapıldı. Yeni nesil dizileme cihazından elde edilen yeni nesil dizileme okumalarındaki varyantlar tespit edildi. Varyantlar alternatif alel frekansları, ClinVar sonuçları ve in silico algoritma skorlarına göre filtrelendi. Çalışmamızda analiz edeceğimiz varyantlar daha önceden belirli olduğu için ekzon veya gen taramasına gitmeden, sadece rs numarası ile belirtilen polimorfik noktalar analiz edildi. Şekil 4.6'da SEQ programına ait varyant tablosu gösterildi. Şekil 4.7'de ise analiz edilen genlere ait ekzonların ne kadarının analiz edilebildiğini anlamamıza yarayan kaplam gösterilmiştir. %100 kaplama sahip olmak, ekzonun tamamını belirtilen eşik değerin üzerinde okuma sayısıyla okuyup analiz edilebilmiştir anlamına gelmektedir. İstenen en küçük okuma derinliği 50x olarak belirlendi.

Şekil 4.8'de IGV programında örneklere ait amplifikasyonların hizalama sonuçları verildi. Hizalamada referans ve alternatif alleller gösterilmiştir.

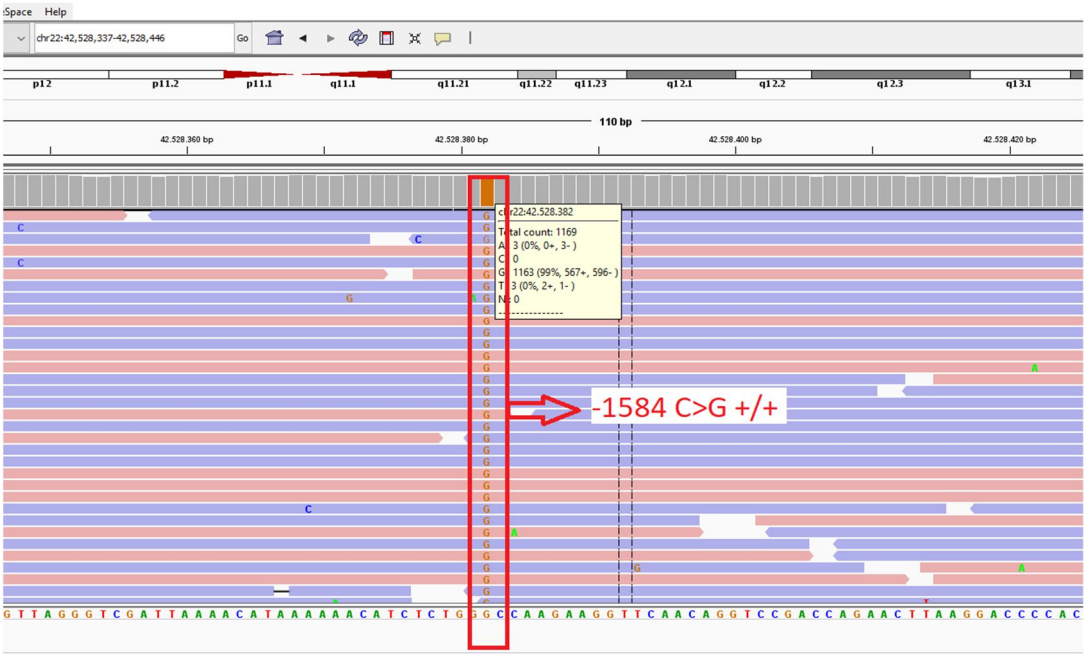
Gen	Pat	dbSNP No	Ekzon/intron	Mutasyon Tipi	Genotip	Nükleotid Degisimi	Kaplam (F/R)	Rapor
CYP2C19: ENSG00000165841 /ENST00000371321	B	rs3758581	Exon 7	Missense (V331I)	G/A	G -> A (c.991G>A)	51(64%) / 26(68%)	✓
CYP2C9: ENSG00000138109 /ENST00000260682	N	rs1057910	Exon 7	Missense (I359L)	A/C	A -> C (c.1075A>C)	31(46%) / 33(47%)	✓
CYP1A2: ENSG00000140505 /ENST00000343932	B	rs2069526	Intron 1	Intronic	T/G	T -> G (c.-10+103T>G)	46(50%) / 23(58%)	✓
CYP1A2: ENSG00000140505 /ENST00000343932	B	rs762551	Intron 1	Intronic	C/A	C -> A (c.-9-154C>A)	36(40%) / 74(48%)	✓
CYP2D6: ENSG00000100197 /ENST00000389970	B	rs28371725	Intron 7	Intronic	C/T	C -> T (c.985+39G>A)	70(44%) / 106(48%)	✓
CYP2D6: ENSG00000100197 /ENST00000389970	B	rs16947	Exon 7	Missense (C296R)	A/G	A -> G (c.886T>C)	109(44%) / 100(49%)	✓
CYP2D6: ENSG00000100197 /ENST00000389970	N	rs3892097	Intron 4	Splice Acceptor	C/T	C -> T (c.506-1G>A)	4(26%) / 3(27%)	✓
CYP2D6: ENSG00000100197 /ENST00000389970	B	rs1080995	Intron 1	Intronic	G/C	G -> C (c.180+34C>G)	30(42%) / 53(41%)	✓
CYP2D6: ENSG00000100197 /ENST00000389970	N	rs1065852	Exon 1	Missense (P34S)	G/A	G -> A (c.100C>T)	37(28%) / 52(39%)	✓
CYP2D6: ENSG00000100197 /NA	B	rs1080985	Promoter	Upstream Gene	G/G	C -> G ()	267(99%) / 253(100%)	✓

Şekil 4.6 : 1 no'lu hastaya ait varyant raporu.



Şekil 4.7: 1 no'lu hastaya ait kaplam grafiği.

Şekil 4.8'de IGV programında örneklere ait amplifikasyonların hizalama sonuçları verildi. Hizalamada referans ve alternatif alleller gösterilmiştir.



Şekil 4.8: 1 no'lu örneğe ait referans ve Alternatif alellerin dağılımının IGV'de görünümü.

1 No'lu örneğe ait çalışma sonucunda CYP2D6 geninde bulunan -1584C>G değişimini HOMOZİGOT olarak taşıdığı tespit edilmiştir. Ayrıca CYP2D6 geninde bulunan 1846 G>A, 100 C>T, 2988 G>A, CYP2C19 geninde bulunan 991A>G, CYP1A2 geninde bulunan -740T>G, CYP2C9 geninde bulunan 1075A>C değişimlerini HETEROZİGOT olarak taşıdığı tespit edilmiştir.

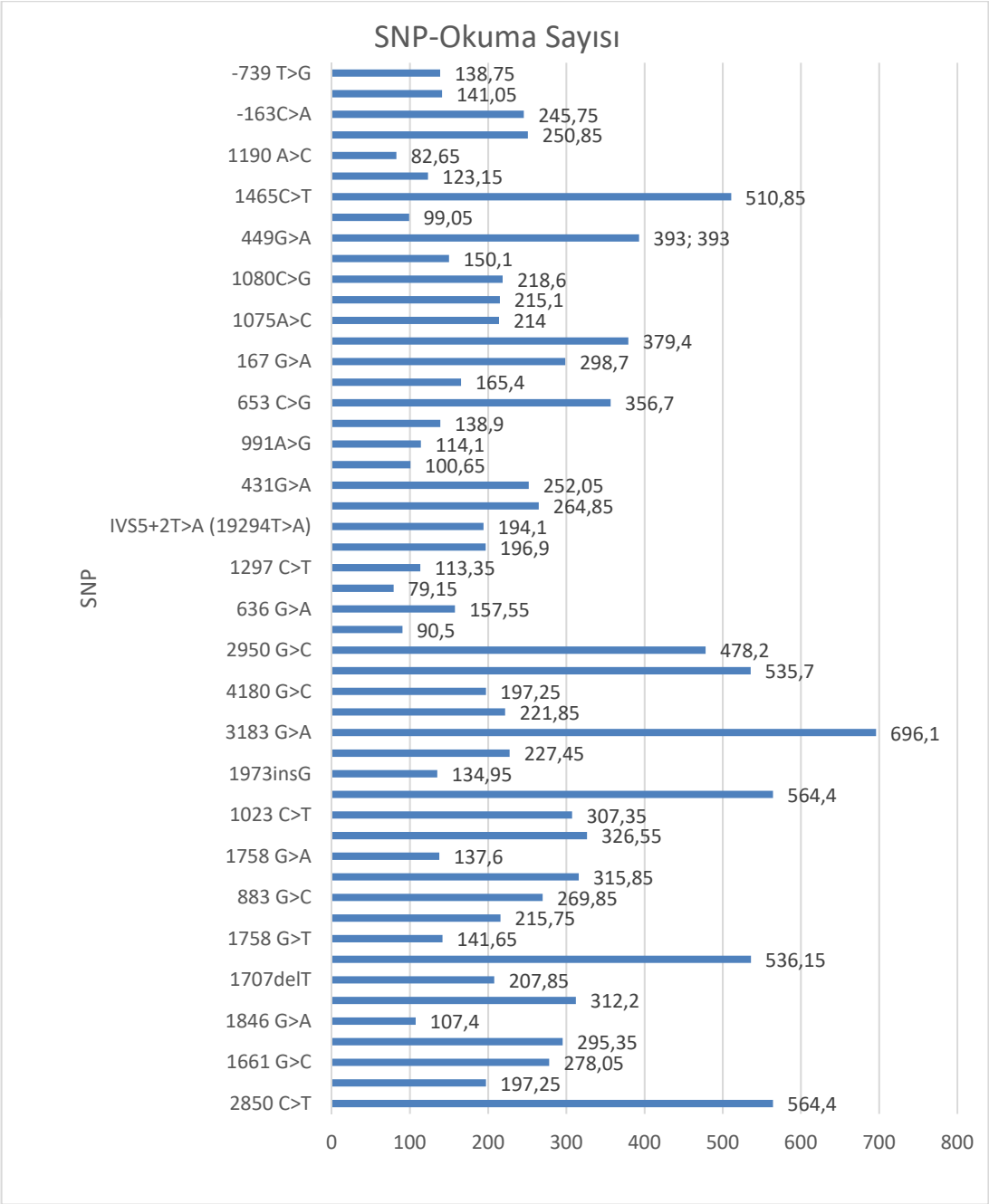
Tablo 4.6: 1-10 no'lu DNA'lara ait genotipleme.

GEN*ALEL	POLİMORFİZM	RS NUMBER	DNA 1	DNA 2	DNA 3	DNA 4	DNA 5	DNA 6	DNA 7	DNA 8	DNA 9	DNA 10
CYP2D6*2	-1584 C >G	1080985	GG	GG	GC	GC	GG	GC	GG	GG	GC	GG
CYP2D6*2	2850 C>T	16947	CC	CT	CC	CT	CT	CC	CT	TT	CT	CT
CYP2D6*2	4180 G>C	1135840	GG	GG	GG	GC	GC	GG	GG	GG	GC	GC
CYP2D6*2	1661 G>C	1058164	GG	GG	GG	GC	GG	GG	GG	CC	GC	GC
CYP2D6*3	2549delA	35742686	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*4	1846 G>A	3892097	GG	GA	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG
CYP2D6*4	100 C>T	1065852	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC
CYP2D6*6	1707delT	5030655	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*7	2935 A>C	5030867	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
CYP2D6*8	1758 G>T	5030865	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*9	2615_2617delAAG	5030656	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*11	883 G>C	5030863	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*12	124 G>A	5030862	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*14	1758 G>A	5030865	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*15	138insT	5030862	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*17	1023 C>T	28371706	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2D6*17	2850 C>T	16947	CC	CT	CC	CT	CT	CC	CT	TT	CT	CT
CYP2D6*20	1973insG	72549354	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*21	2573insG	267608296	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*29	3183 G>A	59421388	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*38	2587_2590delGACT	72549351	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*39	4180 G>C	1135840	GG	GG	GG	GC	GC	GG	GG	GG	GC	GC
CYP2D6*41	2988 G>A	28371725	AA	GA	GA	GG	GA	GA	GA	GG	GG	GA
CYP2D6*44	2950 G>C	72549349	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2C19*2	681G>A	4244285	GG	GA	GG	GA	GG	GG	GA	GG	GA	GG
CYP2C19*3	636 G>A	4986893	GG	GA	GG	GA	GG	GA	GG	GG	GG	GG
CYP2C19*4	1A>G	28399504	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
CYP2C19*5	1297 C>T	56337013	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C19*6	395G>A	72552267	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2C19*7	IVS5+2T>A (19294T>A)	72558186	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
CYP2C19 *8	358T>C	41291556	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
CYP2C19 *9	431G>A	17884712	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2C19*10	680 C>T	6413438	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C19*17	991A>G	3758581	AA	AG	AA	AA	AG	AG	AA	AA	AA	AA
CYP3A4*1B	-392G>A	2740574	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP3A4*5	653 C>G	55901263	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP3A4*6	830_831insA	4646438	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP3A4*7	167 G>A	56324128	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2C9*2	430C>T	1799853	CC	CT	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C9*3	1075A>C	1057910	AA	AC	AA	AA	AC	AC	AA	AA	AA	AA
CYP2C9*4	1076T>C	56165452	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
CYP2C9*5	1080C>G	28371686	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C9*6	818delA	9332131	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2C9 *8	449G>A	7900194	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2C9*11	1003C>T	28371685	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C9*12	1465C>T	9332239	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C9*16	485C>A	72558190	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C9*16	1190 A>C	72558193	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
CYP1A2*1C	-3860G>A	2069514	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP1A2*1F	-163C>A	762551	AA	CA	AA	AA	CA	CC	CA	CA	CA	CA
CYP1A2*1K	-729 C>T	12720461	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP1A2*1K	-739 T>G	2069526	TT	TG	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TG	TT

Tablo 4.7: 11-20 no'lu DNA'lara ait genotipleme.

GEN*ALEL	POLİMORFİZM	RS NUMBER	DNA 11	DNA 12	DNA 13	DNA 14	DNA 15	DNA 16	DNA 17	DNA 18	DNA 19	DNA 20
CYP2D6*2	-1584 C >G	1080985	GG	CG	GG	GG	CC	GG	GG	CC	GG	GG
CYP2D6*2	2850 C>T	16947	CT	CT	CT	TT	CT	TT	CT	CC	CT	TT
CYP2D6*2	4180 G>C	1135840	GG	GC	GG	GC	GG	GC	GC	GG	GC	GC
CYP2D6*2	1661 G>C	1058164	GG	GC	GG	CC	GG	GC	CG	GG	GC	GC
CYP2D6*3	2549delA	35742686	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*4	1846 G>A	3892097	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*4	100 C>T	1065852	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC	CC
CYP2D6*6	1707delT	5030655	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*7	2935 A>C	5030867	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
CYP2D6*8	1758 G>T	5030865	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*9	2615_2617delAAG	5030656	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*11	883 G>C	5030863	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*12	124 G>A	5030862	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*14	1758 G>A	5030865	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*15	138insT	5030862	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*17	1023 C>T	28371706	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2D6*17	2850 C>T	16947	CT	CT	CT	TT	CC	TT	CT	CC	CT	TT
CYP2D6*20	1973insG	72549354	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*21	2573insG	267608296	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*29	3183 G>A	59421388	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2D6*38	2587_2590delGACT	72549351	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2D6*39	4180 G>C	1135840	GG	GC	GG	GC	GG	GC	GC	GG	GC	GC
CYP2D6*41	2988 G>A	28371725	GA	GG	GA	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG
CYP2D6*44	2950 G>C	72549349	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2C19*2	681G>A	4244285	GA	GG	GG	GA	GG	GA	GG	GG	GG	GG
CYP2C19*3	636 G>A	4986893	GG	GG	GG	GG	GA	GG	GG	GG	GA	GG
CYP2C19*4	1A>G	28399504	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
CYP2C19*5	1297 C>T	56337013	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CT	CC	CC	CC
CYP2C19*6	395G>A	72552267	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2C19*7	IVS5+2T>A (19294T>A)	72558186	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
CYP2C19 *8	358T>C	41291556	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
CYP2C19 *9	431G>A	17884712	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2C19*10	680 C>T	6413438	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C19*17	991A>G	3758581	AA	AA	AA	AA	AG	AA	AA	AA	AA	AA
CYP3A4*1B	-392G>A	2740574	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP3A4*5	653 C>G	55901263	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP3A4*6	830_831insA	4646438	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP3A4*7	167 G>A	56324128	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2C9*2	430C>T	1799853	CC	CT	CT	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C9*3	1075A>C	1057910	AA	AA	AC	AA	AC	AA	AA	AA	AA	AA
CYP2C9*4	1076T>C	56165452	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
CYP2C9*5	1080C>G	28371686	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C9*6	818delA	9332131	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR	NOR
CYP2C9 *8	449G>A	7900194	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP2C9*11	1003C>T	28371685	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C9*12	1465C>T	9332239	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C9*16	485C>A	72558190	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP2C9*16	1190 A>C	72558193	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
CYP1A2*1C	-3860G>A	2069514	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
CYP1A2*1F	-163C>A	762551	CC	AA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA	CA
CYP1A2*1K	-729 C>T	12720461	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC	CC
CYP1A2*1K	-739 T>G	2069526	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TG	TT	TT

Tablo 4.9'da okuma sayılarının analiz edilen SNP noktalarına göre değişimi verilmiştir. Bazı SNP'ler genel olarak diğerlerine oranla düşük okuma sayısına sahiptir. Bunun sebeplerinden birisi bölge için tasarlanan primerin veriminin diğerlerine oranla daha düşük olması olabilir. Bütün okumalar eşik değerin üzerinde olduğu için bu verimdeki düşüklük bu çalışma için sorun teşkil etmemektedir.



Şekil 4.9 : SNP noktaları ve ortalama okuma derinlikleri.

5.TARTIŞMA

Günümüzde ‘bireye özgü tedavi’ kavramının gelişmesinin temel sebebi son yıllarda psikotrop ilaç sayısındaki ciddi artışa rağmen psikiyatrik tedavilerin hala tatminkâr düzeyde olmamasıdır [76]. Görülme sıklığı açısından bakıldığında depresyon psikiyatrik hastalıklar arasında 4.sırada yer almaktadır. İlaç seçeneklerindeki büyük artışa rağmen tedavilerde istenilen oranlarda başarı sağlanamamaktadır. Tedaviye cevap oranı %30-50’dir ve son derece düşük bir oran olarak dikkat çekmektedir. Psikotrop ilaçların etkinliğinin gözlenebilmesi için haftalar geçmesi gerekmektedir, ayrıca zehirlenme olgularında en sık karşılaşılan ilaçlar psikiyatrik ilaçlardır bu sebeple psikofarmakoloji özel bir pozisyondadır. Keller ve ark. yaptığı bir çalışmada depresyon tedavisi yapılan hastaların %20’sinde herhangi bir iyileşme gözlenmemişken, %40‘ı kısmi iyileşme göstermiş ve %40’lık bölüm ise bir yılın sonunda iyileşmiştir [77]. Hastalık yoktur, hasta vardır bilgisinin zamanla zihnimize yerleşmesiyle farmakogenetik bilimi önem kazanmaya başladı. Bireye özgü tedavi sadece klinisyenleri değil, sağlık otoriterelerini, ilaç sektörünü ve ülke ekonomisini de yakından ilgilendirmektedir. Bireyler hayatlarında bir kez yaptıracakları analiz ile hayatları boyunca kullanacakları ilaçlara karşı yardımcı bir farmakogenetik haritaya sahip olacaklardır. Nöropsikiyatri alanında kullanılan neredeyse tüm ilaçlar karaciğerde üretilen ve polimorfizmi yüksek olan CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2 ve CYP3A4 enzimleri tarafından metabolize edilir. Yaygın olarak kullanılmamakla birlikte bu genlerdeki polimorfizmler DNA analiz yöntemleriyle tespit edilebilmekte ve tedaviye başlamadan önce uygun ilaç ve dozu belirlenebilmektedir.

Günümüzde söz konusu SNP analizleri farklı yöntemler kullanılarak yapılmaktadır ve henüz bir standardizasyon sağlanamamıştır. Genel olarak PCR-RFLP, Sanger dizileme, Real-time PCR, mikroarray, ASO-PCR ve yeni nesil dizileme yöntemleri kullanılmaktadır. Bu çalışma, literatürdeki bilgilere göre polimorfizmleri ve etki mekanizmaları bilinen, rutinde uygulamaları yapılmakta olan CYP genlerinin PCR

yöntemi ile çoğaltılarak tümünün tek bir panel olarak İllumina Miseq platformunda analizine imkân sağlayacak bir yöntem olarak geliştirilmiştir. Analiz metodu olarak YND sistemini seçmemiz platformun diğer yöntem ve platformlara göre sahip olduğu çok sayıda avantajdan kaynaklanmaktadır. Sanger dizileme bugün hala altın standart olarak kabul edilse bile, yüksek maliyetli olması ve uzun sürede sonuç vermesi gibi dezavantajlara sahiptir. YND teknolojisi ile yüksek miktarda verinin daha kısa sürede ve daha düşük maliyetle analizi sağlanmıştır [78,79].

Illumına MiSEQ platformu ile analiz edilecek bölgeler PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. PCR reaksiyonunda kullanılan bileşenlerin tek tek ideal oranlarda kullanımını sağlayıp ideal amplifikasyonu elde edebilmek adına optimizasyon çalışması yapılmıştır. Kullanılan primer çiftlerinin kalıp DNA'ya olan oranı amplifikasyon veriminde önemli yer teşkil etmektedir. Primer konsantrasyonunun kullanılan kalıp DNA konsantrasyonundan ortalama olarak 10^7 molar fazla olması PCR çalışmasının verimini arttırmaktadır. Primer konsantrasyonlarının 0.5µM'dan fazla olması ise PCR verimini düşürmektedir. Primer-DNA konsantrasyon oranının iyi sağlanamadığı reaksiyonlarda ise primer dimer oluşması, beklenmeyen amlifikasyonlar elde edilmesi veya amplifikasyon elde edilememesi gibi sorunlar ortaya çıkmaktadır [80]. Primer dimer PCR'ı olumsuz etkileyen bir oluşumdur ve bunun gibi sorunların engellenmesi için primer tasarımı yaparken primerin GC içeriğinin %45-50'yi geçmemesine, ileri ve geri yönlü primerlerin bağlanma ısılarının birbirine yakın olması, primer dizilerinin kalıp DNA'ya tam uyumlu olması gibi değişkenlerin çok dikkatli ayarlanması gerekmektedir [81]. Tasarlanan primerlerin uygunluğunu kontrol etmek için Primer Design and Search Tool, PCR Primer Stat ve USCS sayfalarından faydalanarak in silico PCR ve primer kontrol çalışmaları yapıldıktan sonra uygun görülen primerler sipariş verilmiştir [82,83,84].

Spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçebilmek için PCR önce yüksek sıcaklıklarda denenmelidir. Çalışmamızda bağlanma sıcaklığını ilk olarak 65°C olarak denedik. Primerlerin bağlanma sıcaklığına göre çok yüksek olduğuna karar verdiğimiz bağlanma ısısını 60°C'ye düşürdük ve CYP2D6 genine ait primerler hariç primerlerin tamamından yeterli verimde ürün elde edebildik. CYP2D6 genine ait bölgeler için 58°C bağlanma ısısı denendi ve sonuç alındı.

PCR reaksiyonunda her ürünün konsantrasyonuda en az primer konsantrasyonu kadar önemlidir. Konsantrasyon ayarlaması yapılırken ilk dikkat edilmesi gereken

bileşen $MgCl_2$ dır. $MgCl_2$ hem polimeraz enziminin aktivitesinde önemli yer oynar hem de dNTP'lere bağlanması sebebiyle miktarı çok önemlidir. Kullanılacak düşük konsantrasyonlu $MgCl_2$ polimerazın çalışmasını olumsuz etkileyerek yeterli ürün oluşmamasına yol açarken kullanılacak çok yüksek konsantrasyonlu $MgCl_2$ ise spesifik olamayan bağlanmalara sebep olarak istenmeyen ürün oluşumuna yol açar. $MgCl_2$ konsantrasyonu sadece polimeraz konsantrasyonuyla değil ortamdaki dNTP konsantrasyonuyla da uyumlu olması gerekmektedir. dNTP konsantrasyonu çok yüksek olduğu durumlarda ortamda bulunan $MgCl_2$'e bağlanarak polimerazın aktivitesini azaltır ve PCR reaksiyonun verimini düşürür. Bir diğer bileşen ise PCR tamponudur. PCR tamponu içerisinde yer alan tuz oranı ürün oluşumunda etkilidir. Uzun PCR ürünleri düşük tuz oranında daha iyi sonuç verirken kısa PCR ürünleri daha yüksek tuz oranında iyi sonuç almaktadırlar. Bizim çalışmamızdaki ürün boyları ortalama aralıkta olduğu için ortalama tuz oranı yeterli olmuştur. Artım veya azaltamaya gitmemize gerek kalmadı [85, 86].

Tasarladığımız primerler sonucu elde ettiğimiz PCR ürünlerinin boyları birbirinden çok farklı olmadığı ve ürünler çok uzun olmadığı için bağlanma süresini çok uzun tutmamıza gerek kalmadan 30 saniye gibi bir sürede yeterli verime ulaşıldı. PCR ürünün uzun olması durumunda bağlanma süresi uzatılarak, daha kısa ürünlerde ise bağlanma süresi kısaltılarak çözüme ulaşılabilir [87].

Sanger dizileme, dizileme teknolojileri arasında hala önemini korumaktadır yaklaşık olarak 30 yıldır genotiplendirme için altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak yeni nesil dizileme ile kıyaslandığında yüksek maliyet, yüksek iş gücü ve büyük bölgelerin dizilemesinde yarattığı sıkıntılar sebebiyle yerini zamanla yeni nesil dizilemeye bırakmaktadır [88]. Sanger dizileme ortalama olarak en fazla 900 bp uzunluğundaki dizileri okuyabilmektedir. Genellikle bu dizilerin ilk ve son 50 bp bölgelerinde analiz kalitesi düşmektedir. Ayrıca çok ufak diyebileceğimiz 50 bp altında olan dizilerin okunmasıda Sanger'de pek mümkün değildir. Uyguladığımız YND yönteminde ise yaklaşık olarak 300 bp uzunluğundaki bölgeler okunmaktadır. Sanger yönteminden farklı olarak YND yönteminde paralel okuma özelliğinden dolayı birden fazla bölge ve birden fazla hasta indeksler aracılığıyla yapılan barkodlama sistemiyle aynı uygulama içerisinde çalışılabilmektedir. Ayrıca YND sisteminde çok düşük ng yoğunluğa sahip örneklerde çalışılabilmektedir [79]. Gerçek zamanlı PCR yönteminde ise daha önceden tanımlanmış mutasyonlar için

hassas sonuçlar alınabilmekteyken dizi analizi yapılmadığı için belirlenmemiş mutasyonların tespiti mümkün olamamaktadır [88]. Bizim uyguladığımız protokolde analiz etmek istediğimiz noktalar belirli olmasına rağmen gerçek zamanlı PCR'ın daha yüksek maliyete sahip olması gerekçesiyle tercih edilmemiştir.

Biesecker ve ark. gerçekleştirdikleri araştırma sonucunda YND platformunda gerçekleştirilen çalışmanın teyidi amacıyla varyant doğrulaması için Sanger dizileme kullanılmıştır, fakat Sanger dizileme YND dizilemeye göre daha fazla hatalı okuduğu ortaya çıkmıştır ayrıca okuma süresi YND'ye oranla çok daha uzun sürmüştür [89]. Sanger dizilemede aynı nokta bir defa veya çift yönlü okuma ile iki defa okunurken YND sisteminde ise aynı nokta yüzlerce kez dizilenmektedir. Farklı okuma iplikçikleriyle aynı nokta birçok defa doğrulanmaktadır. Aynı anda binlerce kısa DNA fragmanı dizileyebilirken sonrasında bu diziler elektroforeze ihtiyaç duymaksızın direk olarak okunabilmektedir [90].

Drozda ve ark. nöropsikiyatrik ilaçlar için farmakogenetik testlerin güncel durumunu özetleyen bir derleme çalışması yapmışlardır. Bu panellerin toplu olarak değerlendirilmesi bu çalışma ile yapılmıştır. Test panelleri ve analizine imkân sağlanan varyantların toplu olarak sunulduğu bu çalışma, çalışmamıza büyük ışık tutmuştur. Rapor edilen panellerde yer alan polimorfik noktaların ilaç metabolizmalarına etkilerinin tek tek incelenmesi sonrasında, farklı popülasyonlardaki prevelanslarına bakılarak çalışmamıza dahil edilmiştir. Tablo 4.2'de piyasada bulunan test panelleri ve analiz edilen varyantların derlemesi yapılmıştır [91].

Kullanımda bulunan panellerin çalışma prensipleri çok farklı temelleri dayanmaktadır. Bu temel prensipler arasında Sanger dizileme, Real-time PCR, mikroarray, prob hibridizasyon, RFLP-PCR ve Yeni nesil dizileme (YND) bulunmaktadır.

Dong ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada klinikte kullanılan ilaç metabolizmasının yaklaşık olarak %40'ından sorumlu olan ve yüksek polimorfik özelliğe sahip olan CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 ve CYP3A5 genleri varyantları tespitine yönelik olarak tek bir multipleks reaksiyonundan 32 bilinen varyasyonun tespitine olanak sağlayan bir mikroarray tabanlı protokol geliştirmiştirler. Bu çalışmada CYP2D6 genine ait 19, CYP2C9 genine ait 8, CYP2C19 genine ait 4 ve CYP3A5 genine ait 1 polimorfizm olmak üzere toplamda 32 polimorfizm 229 örnekte analiz edilmiştir. Analiz sonucu elde edilen frekans değerleri daha önce yapılmış olan

Çin popülasyonuna ait çalışmalarla uyumlu bulunmuştur. Hazırlanan paneli oluşturan noktalar yapılan literatür taraması sonucunda ve CYP allel website'dan alınmıştır [92]. Piyasada CYP genotipleme amaçlı iki farklı ticari çip bulunmaktadır. Bunlar CodeLink P450 Bioarray ve Amplichip CYP'dir [93]. CodeLink toplamda 9 CYP genine ait 110 polimorfizm tespitini için 12 ayrı multipleks PCR'a ihtiyaç duymaktadır. Bu 12 multipleks hazırlık süreci rutinde kullanım için bir dezavantaj oluşturmaktadır. Çünkü Amplichip tek multipleks reaksiyon ile CYP2C19 ve CYP2D6 genlerine ait varyantların analizine imkân sağlamaktadır. Yapılan bu çalışma ile CodeLink P450 Bioarray ve Amplichip CYP arasındaki boşluk tamamlanmaya çalışılmıştır. CYP2D6 gen duplikasyonunun nadir görülmesi sebebiyle veri analizinin yapılabilmesi için çalışmanın daha büyük bir populasyonda yapılması gerekmektedir [92]. Amplichip CYP450 test kiti, 2004 yılında Roche tarafından CYP genotipleme amaçlı geliştirilen ilk kit olması bakımından önemli bir yere sahiptir. Bu kit ile CYP2D6 ve CYP2C19 genlerine ait 31 alelin incelenmesine imkân tanınmıştır. Testin temeli mikroarray teknolojisine dayanmaktadır. Test hızlı, güvenilir ve kullanım kolaylığına sahiptir. Testin doğruluğunu saptamak amaçlı rutinde kullanılan PCR-RFLP yöntemi ile doğulaması yapılan her 5 alelinde %100 uyumlu olduğu tespit edilmiştir [94]. Testin hasta başı maliyeti ortalama olarak 500 $'dır [95].

Kütüphane hazırlığına başlanmadan önce barkodlama için birleştirilmiş amplikonların yani havuzların ayrı ayrı Qubit ile konsantrasyonları ölçüldü ve YND amplifikasyon protokolü uygulandıktan sonra manyetik boncuklarla saflaştırma işlemi yapıldıktan sonra tekrar Qubit ile ölçüm yapıldı. Manyetik saflaştıma işleminde bazı örneklerden büyük miktarda kayıp olması sebebiyle saflaştırma sonrası konsantrasyonda düşüş gözlenmiştir. Saflaştıma aşamasında amplikonlar manyetik boncuklarla iyice karıştırılır ve amplikonların boncuklara bağlanması sağlanır. Örnekler manyetik satnda konulur ve boncuklara yapışık olan amplikonlar manyetik alanın etkisiyle tüpün çeperine yapışır. Çepere yapışamayan fragmanlar ise alkol ile yapılan yıkama sonucu tüpten uzaklaştırılır. Bu aşamada manyetik boncuklar ile amplikonlar yeterince karışmazsa amplikon kaybı yaşanabilir. Yıkama aşamasında tüpteki fazla sıvıyı alırken çeperde bulunan amplikon-manyetik boncuk kompleksine dokunulduğu zaman kompleks bozulur ve amplikonlar serbest hale geçerek yine yanlışlıkla tüpten uzaklaştırılma ihtimali ile karşı karşıya kalınır. Yapılan çalışmada 150-200 baz uzunluğundaki amplikonların saflaştırması için bir kez uygulanacak saflaştırma

protokolünün yeterli olcacağını ancak daha kısa veya daha büyük amplikonlarda protokole ilaveler yapılması gerektiği vurgulanmıştır. Arka arkaya iki saflaştırma basamağı yapılmıştır. İlk basamakta düşük Ampure XP konsantrasyonu ile büyük amplikonların bağlanması sağlanmış, sonrasında eklenen daha fazla Ampure XP ile kısa fragmanların boncuklara bağlanması sağlanmıştır. Fragman boyutuna göre saflaştırma basamaklarında düzenlemeler yapılabilmektedir [96]. Saflaştırma sonrası ölçümlerde bazı amplikonlara ait konsantrasyon değerlerimizin düşük çıkması saflaştırma aşamasında bir miktarda olsa ürün kaybettiğimizi göstermektedir.

Leeneer ve ark. 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada Sanger dizileme için hali hazırda standardize edilmiş olan PCR amplikonlarını MiSeq platformunda dizileyerek analizine imkân sağlamışlardır. Yaptığımız çalışmada bu yöntemi esas alarak rutinde uygulanabilecek daha ucuz, daha kullanılabilir ve daha esnek protokole sahip bir tanı paneli geliştirmeyi amaçladık. Leneneer ve ark. yaptığı çalışmanın en önemli özelliklerinden biri ise oluşturdukları çalışma taslağına gerekli görüldüğü takdirde yeni genler ekleyebileceklerdi. Çalışmaya toplamda 265 farklı gen dahil edilmiştir. İllumina MiSEQ platformundan indeksler en fazla 96 kombinasyona kadar çıkabilmektedirler. Bu yüzden kullanacağımız yöntemde en fazla 96 havuz oluşturulabilir. Çalışmaya 6.000-10.000 arasında değişen bir amplikon sayısı dahil etmişlerdir. Çalışmamıza toplamda 8500 amplikon dahil edilmiştir. Her havuzda bir genden sadece bir hastaya ait amplikonlar bulunmak şartıyla havuza çok sayıda amplikon konulabilir. Havuzların her biri farklı F ve R yönlü olarak ifade edebileceğimiz bir çift indeks ile işaretlendikten sonra bütün havuzlar birleştirilip amplifikasyon ve saflaştırma işlemlerinden sonra dizileme işlemi yapıldı. Leeneer ve ark. rutin olarak her hafta 6000-10000 amplikon sayısı ile Miseq çalışması gerçekleştirdiklerini belirtmişlerdir. YND'de sisteminde tespit ettikleri varyantların doğrulaması için Sanger dizileme kullanmışlardır. Sadece varyant buldukları amplikonu tekrar Sanger ile analiz ettiklerini belirtmiştirler. Sanger dizilemeye göre maliyet açısından avantaj sağlanabilmesi için en az 6000 amplikon ile çalışmanın yapılması gerektiği ve 10000 amplikon dahil edilen çalışma Sanger ile kıyaslandığında maliyetin 10 kat azaldığı saptanmıştır. 10000 amplikon dahil edilerek yapılan çalışmada çalışmanın %97'sinin en az 36x kapsama sahip olduğu belirlenmiştir [97].

BRCA1 ve BRCA2 mutasyon tespitinin yeni nesil dizileme yöntemiyle yapıldığı bir çalışma sonucunda 20x 'den daha küçük okuma derinliğine sahip okumalar

değerlendirme dışı bırakılmıştır. Bu çalışmada 20x okuma derinliğinden daha düşük okuma derinliğine sahip yaklaşık olarak %50 heterozigotluk gösteren örneklerin %30'u Sanger doğrulaması sonucu yanlış pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda <20x okuma derinliğine sahip okumaların yanlış pozitif olma ihtimaline karşı değerlendirilmesinin devre dışı bırakılması önerilmiştir [98]. Çalışmamıza toplamda 8500 amplikon dahil ettik ve kapsam alt sınırını 50x olarak seçtik. 50x altında kalan okumaları değerlendirmeye almadık ve optimizasyonu yapılmamış olarak kategorize ettik. Elde ettiğimiz en yüksek okuma sayısını 1812x, en düşük okuma sayısını ise 50x olarak tespit ettik.

Elde edilen amplikonlar standart PCR yöntemiyle elde edildi. Leener ve ark. öncesinde Sanger yönteminde kullandıkları ve optimize edilmiş olan primerleri kullanmışlardır. Biz ise primer dizaynı yaparken Ensemble'dan genlere ait referans dizileri olarak Primer3 programı ile primerleri tasarladık. Tasarladığımız primerler aynı zamanda Sanger dizilemede de rahatlıkla kullanılabilecek primerlerdir. Piyasada bulunan panellerin genel olarak negatif tarafı, eğer panel kiti kullanıp dizileme yaptıysanız ve dizileme sonucunda herhangi bir noktada mutasyon tespit ettiyseniz bu mutasyonu Sanger ile teyit etmek istediğinizde bu noktaya özgü yeni bir primer tasarlamanız ve sipariş vermeniz gerekmektedir. Bu işlem ise en az 10 gün sürmektedir. Leeneer ve ark. yaptığı çalışma gibi Sanger dizilemesine de uygun amplikonlarla YND çalışması yapıldığında bu negatif yön bertaraf edilmiş oldu [97].

Yeni nesil dizileme çalışmasının tamamlanmasının ardından verilerin analizine başlamadan önce elde edilen verilerin kalite değerlendirilmesi yapılması gerekmektedir. Kalite değerlendirmesinin dayandırıldığı birçok değişken vardır. Çalışma sonucunda dizilemenin doğruluğunu değerlendirmek için kullanılan en yaygın ölçüm platformu olan Q30 skorumuz %92,1 olarak tespit edilmiştir. Dizileme aşamasında ne kadar fazla oran Q30 skoruna ulaşmışsa, o oranda okuma mükemmeldir ve sıfır hata sıfır belirsizlik vardır. Yapılan çalışmalar sonucu düşük Q30 skoru yanlış pozitifliği artırabildiği düşünülmüştür. $Q = -10 \log10 P$ formülüne dayandırılan hesaplamada Q'nun değeri 30 olduğunda 1000 bazda 1 baz hatalı okuma olasılığını gösterir. Q30 skoru için geçerli görülen değer %80 ve üzeri olarak belirtilmiştir [99]. Bu değer okunan bütün bazların %80'inin Q30 skorunun üzerinde bir kalite değerine sahip olduğunu göstermektedir [100].

Analiz kalite değerlendirmelerinden bir diğeri ise cluster density olarak bilinen küme yoğunluğudur. Diziler akış hücresi üzerinde okuma plakaları üzerinde yer alan adaptörlere bağlanırlar. Akış hücresi üzerinde oluşan kütüphane kümelerinin yoğunluğu yürütme değerlendirmesinde çok önemli bir faktördür. Kullanmış olduğumuz kit için ideal küme yoğunluğu değeri 1000-1200 K/mm^2'dir [101]. Çalışma sonucu elde ettiğimiz değer ise 875 K/mm^2'dir. Sonuç optimal aralıktan düşük olmasına rağmen oluşan kümelerden alınan sinyallerde herhangi bir sorun olmadığı ve diğer kalite parametrelerinin de normal aralıkta olması sebebiyle analize devam edilmiştir. Düşük küme yoğunluğunda genellikle okunan toplam baz sayısında düşüş yaşanırken Q30 skoru korunmaktadır [102]. Küme oluşumunda kantifikasyon çok önemlidir, çünkü çok düşük bir küme yoğunluğu verimi düşürür aynı zamanda yoğun küme oluşumuda kümelenme çakışması nedeniyle azalan veri verimiyle sonuçlanır [103]. Çok fazla DNA yüklendiğinde küme yoğunluğu artar, artan küme yoğunluğu sebebiyle kümeler birbirine yakınlaşarak çözünürlüğü azaltır. Bu sebeple elde edilen kaliteli veri azalır. %PF değeri %94,92 literatürde %80 üzeri PF değeri idel olarak kabul edilmektedir [101, 102].

Çalışmada okunan toplam baz sayısını gösteren değer olan estimated yield 5100.0 MB olarak ölçülmüştür. İllumina firmasının uygun gördüğü aralık ise 5000-6500 MB aralığındaki okumalardır [101].

Yürütmeye ait bütün parametreler değerlendirilip kalite değerlendirmesi olumlu sonuçlandıktan sonra, dizilemenin varyant tespit kısmına geçildi.

Shi ve ark. tarafından yapılan çalışmada ilaç metabolizmasında en etkili olduğu düşünülen beş CYP (CY93A4 %37, CYP2C9 %17, CYP2D6 %15, CYP2C19 %10 ve CYP1A2 %9) genine ait 50 SNP analizi yapılmıştır. Yapılan çalışmaya 200 kişilik Çin popülasyonu dahil edilmiştir. 50 SNP noktasına özel primer dizaynı yapıldıktan sonra multipleks PCR metoduyla toplamda 3 pleks olacak şekilde SNP'ler 18,16,16 olarak amplifiye edilmiştir ve sonrasında SAP (shrimp alkaline phosphatase) ile purifiye edilen PCR ürünleri MALDI-TOF MS analiz metoduyla analiz edilmiştir. MALDI-TOF MS yöntemi hızlı, ucuz ve doğru sonuç veren bir yöntem olması sebebiyle tercih edilmiştir. Biyomoleküller iyonize edildikten sonra manyetik/elektrik alandan geçirilerek protein profili çıkarılmıştır. Çalışma sonucunda 5 gene ait 50 SNP'den 17'sinin MAF değeri %1'den büyük olarak tespit edilmiştir. Elde edilen alel frekansları P450 veri tabanıyla kıyaslandığında bu 17 SNP nin 8 tanesinin alel frekansı

Kafkas ırkıyla önemli ölçüde farklı bulunmuştur. Bu veriler farklı etnik gruplar arasında alel frekansları arasında olabilecek frekans farklılığını göstermiştir [104]. Yapılan bu çalışmada panelimize dahil ettiğimiz noktaların tamamı yer almaktadır.

Ota ve ark. 2014 yılında 1017 kişilik Japon toplumunda klinik olarak kullanılan ilaçların çoğunun metabolizmasından sorumlu olduğunu iddia ettikleri CYP varyant profilini belirleme çalışmasında bulunmuşlardır. Bu varyant prevelansını belirleyebilmek içinde yeni bir yöntem olarak TagMan PCR genotipleme testi geliştirmiştirler. Validasyon için 219 örnek PCR-RFLP yöntemi ile analiz edilmiştir. Analiz edilen varyantlar CYP1A2*1C, CYP2C9*3, CYP2C19*2, CYP2C19*3, CYP2D6*10 ve CYP3A4*3'dir. Çalışma sonucu elde edilen veriler daha önce rapor edilen prevelans değerleriyle uyumlu bulunmuştur. Ota ve ark. yaptığı çalışmada analiz edilen noktalar panelimizde analiz edilen noktalara oranla kısıtlı kalmaktadır [105].

CYP1A2*1A aleli tüm varyantların karşılaştırıldığı referans normal alel olarak kabul edilir. CYP1A2 tarafından metabolize edilen ilaçların eliminasyonunda bireyler arası büyük farklılıklar gözlemlenmiştir. CYP1A2 geni için tanımlanmış 25'den fazla varyant bulunmakta olup, bu varyantlardan 12 tanesi fonksiyoneldir olup enzim aktivitesini değiştirmektedirler. Sık rastlanması ve fonksiyonel olması sebebiyle üzerinde en çok durulan varyantlar CYP1A2*1C, CYP1A2*1F ve CYP1A2*1K"dır. CYP1A2*1F en çok incelenen alel olup, indükleyici varlığında hızlı metabolizma fenotipine neden olurken, *1K ve *1C enzim aktivitesinde azalmaya sebep olmaktadır *1F alleli, Kafkasyalıların%25-50'sinde, Asyalıların%30'unda ve Etiyopyalıların %50'sinde bulunur. [106].

Myrand ve ark. yaptığı çalışmada CYP1A2*1C varyantına ait ve enzim aktivitesinde azalmaya sebep olan A alel frekansını 0.010 olarak tespit edilmiştir. Bu alelin Japon, Mısır, Tunus popülasyonuna ait alel frakansları ise sırasıyla 0.237, 0.070, 0.070 olarak tespit edilmiştir [107]. Çalışmamıza dahil edilen 20 hastada CYP1A2*1C (-3860 G>A) polimorfizmini normal olarak taşımaktadır. *1F (-163 C>A) değişimini ise heterozigot olarak taşıyan 13 hasta, homozigot olarak taşıyan 4 hasta tespit edilmiştir. Türk toplumuna dair literatür taramasında da A alel frekansı benzer şekilde yüksek çıkmıştır [108]. Noktanın tespitinde en düşük kapsam derinliği 55 olarak tespit edilmiştir.

Kohlrausch ve ark. yaptığı bir çalışmada ise CYP1A2*1F varyantını homozigot taşıyan şizofren hastalarda atipik antipsikotik ilaç grubuna mensup Klozapin ilaç kullanımına bağlı nöbetlere eğilimin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir [109]. *1F varyantı enzim aktivitesinde artışa sebep olmaktadır. Yapılan başka bir çalışmada ise 38 kişilik çin popülasyonunda alel frekansını 0.290, 51 kişilik Hint popülasyonunda 0.420 ve 39 kişilik Malezya popülasyonunda ise 0.220 olarak tespit edilmiştir [110].

CYP21A2'deki genetik polimorfizmler sık gözlenmekte olup ilaçlara yanıtı etkileyebilirler. Enzim aktivitesi oldukça değişken seviyelerde ifade edilmekte olup farmakogenetik açıdan incelenmesi bireye yönelik tedavi açısından büyük önem taşımaktadır.

CYP2D6 enzimini kodlayan CYP2D6 geninin tanımlanmış 100'den fazla varyantı bulunmuştur. Tanımlanan bu varyantlar CYP Mutation Databese sayfasında bildirilmiştir. Bildirilen varyantların bir kısmının metabolizma üzerindeki etkileri hala tanımlanmamış olmakla birlikte literatüre yeni katılan veriler ışığında sayfa güncellenmektedir. Literatürde tanımlananan aleller, nokta mutasyonu, bir ve daha fazla baz delesyonu, bir ve daha fazla baz insersiyonu veya duplikasyonları içermektedir. Çalışmamızda duplikasyonların tespiti sağlanamadı. Zayıf metabolizer (PM), orta hızlı metabolizör (IM), normal matabolizör (EM) ve ultra hızlı metabolizör (UM) belirlenen başlıca fenotipler olmuştur.Zayıf metabolizörler (PM), aktif CYP2D6 aleli içermedikleri tespit edilmiştir. Literatürde bildirilen başlıca inaktif aleller CYP2D6*3, *4, *5, *6, *7, *8, *11, *12, *14, *15, *20, *21, *38 ve *44 alelleri olmuştur. CYP2D6 enzim aktivitesi bakımından ırklar arasında olan farklılıkları göstermek amaçlı çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu polimorfizmlere dair, Kafkasyalılar ve Uzak doğulularda yapılan bir çalışma sonucunda Kafkasyalılarda (Avrupalılar ve Beyaz Kuzey Amerikalılar) %5-10'luk ve Uzak Doğulular'da (Çin, Japon ve Koreliler) %1'lik bir prevalansı görülmüştür [111-113]. Afrika popülasyonunda yapılan çalışmada ise ciddi bir tutarsızlık görülmüştür. Afrikan-Amerikan toplumunda zayıf metabolizör prevelansı %1,9 iken, Nijeryalılarda %8,6, Zimbabwe'de %2, Tanzanya'da %0,5 ve Güney Afrikalılarda bu oran %18,8'dir. Bölgedeki bu tutarsızlığın sebebinin bölgesel bir varyasyon olduğu düşünülmektedir. Bu CYP2D6 fenotiplendirme çalışması siyah popülasyonun varsayıldığı gibi homojen olmadığını göstermiştir [114]. Türk popülasyonunda yapılan çalışma sonucu zayıf metabolizör prevelansı %3,4-3,8 olduğu bildirilmiştir [115, 116]. Yapılan başka bir

çalışmada ise yavaş metabolizör prevelansı %1,49 olarak bildirilmiştir [117]. Orta hızlı metabolizörlerin (IM), sahip oldukları alellerden biri aktif diğeri inaktif olan bireyler olduğu tespit edilmiştir. Literatürde bildirilen başlıca aleller ise CYP2D6*9, *10, *17, *29 ve*41 olmuştur [118, 119]. Normal metabolizör bireylerin (EM) hiçbir mutasyon içermediği veya içerdiği değişim fonksiyonunda herhangi bir değişikliğe yol açmadıkları tespit edilmiştir. Enzim fonksiyonuna normal olarak devam etmiştir ve tanımlanan normal metabolizör alelleri ise CYP2D6*1, *2, *39 olmuştur. Hızlı Metabolizörler (UM), bu fenotipe sahip bireyler CYP2D6 geninde duplikasyon tespit edilmiş bireylerdir. Genin kopya sayısına dair yapılan bir çalışmada baba ve iki çocuğunda kopya sayısının 12'ye kadar çıktığı tespit edilmiştir [120]. Bu bireylerde kullanılan ilaçlar çok hızlı metabolize edildiğinden, hücre içerisinde gereken sürede kalamayıp ilacın beklenen etkisi görülemememiştir [121]. Bir yayında hızlı metabolizörler birey sıklığı beyaz ırk'ta %1-5, siyah ırkta %0-2, sarı ırkta %2 ve Arabistanlı'larda %10-16 oranında bildirilmiştir [118]. Aynacıoğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise Türk toplumunda hızlı metabolizör birey sıklığı %4 olarak bildirilmiştir [117]. Biz çalışmamızda duplikasyon varlığını saptayamadık bunun sebebi kullandığımız yöntemin amplifikasyon dizilemesine bağlı bir yöntem olmasından ve bu yötemle duplikasyon ve büyük delesyon varlığının tespitinin mümkün olmamasından kaynaklanmaktadır.

Optimizasyon amaçlı rastgele seçilen 20 hastamız ile yaptığımız çalışmada CYP2D6*2 (-1584 C>G, 2850 C>T, 4180 G>C, 1661 G>C) alelini taşıyan hastalar tespit edilmiştir. Bu alellerin dışında panel ile tespit ettiğimiz aleller CYP2D6*4 (1846 G>A, 100 C>T), CYP2D6*10 (100 C>T), CYP2D6*17 (1023 C>T), CYP2D6*39 (4180 G>C) ve CYP2D6*41 (2988 G>A) alelleridir.

CYP2C9 genine ait yapılan çalışmalar sonucunda yüksek derecede polimorfik olduğu tespit edilmiş olup veri bankasında bugüne dair 30'un üzerinde alelik form tanımlanmıştır. CYP2C9*1 yabanıl-tip olarak tanımlanmış ve en sık gözlenen alel olmuştur. Yabanıl alelden sonra gözlenen mutant aleller arasında ilk sıralarda CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 alelleri gözlenmiştir [122]. CYP2C9*1 aleli için homozigot bireyler hızlı metabolize edici bireylerdir [123]. CYPC29*2, CYP2C9*2, CYP2C9*3, CYP2C9*4, CYP2C9*5 alelleri ise ilaç metabolizma hızında azalmaya sebep olmaktadır [124]. *2 ve *3 alel frekansına beyaz ırkta daha çok rastlanmaktadır, Türk toplumunda yapılan çalışmalarda beyaz ırka benzerlik göstermektedir. CYP2C9*6

varyantı ise fonksiyonunu kaybetmiş bir aleldir ve Afrika kökenli Amerikan bir kişide tanımlanmıştır [122]. Japon popülasyonunda yapılan bir çalışma sonucunda CYP2C9*7, *8, *9, *10, *11 ve *12 varyantları literatüre kazandırılmıştır [125]. Aynacıoğlu ve ark. yaptıkları çalışmada CYP2C9*11 varyantının metabolizma hızında yaklaşık olarak %60-80 oranında azalmaya sebep olduğunu ve hücre içi ilaç derişiminde yabanıl tipe göre üç kat artış olduğu gözlenmiştir. Aynı çalışmada CYP2C9*12 varyantının metabolizma hızında azalmaya neden olurken CYP2C9*8 varyantının ise metabolizma hızında artışa sebep olduğu bildirilmiştir [126].

Türk toplumunun da benzerlik gösterdiği beyaz ırkta CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 alelleri diğer ırklara göre daha sık rastlanmakta iken, tanımlanan diğer aleller daha az gözlenmektedir [122].

Panel analizi sonucunda Türk toplumunda daha önce yapılan çalışmalara benzer şekilde CYP2C9*2 ve CYP2C9*3 alelleri gözlenmiştir. Bu alellerin dışında tanımlanan diğer aleller tespit edilmemiştir ve literatür taraması ile paralel sonuçlar bulunmuştur.

CYP2C19 enzimi, mevcut kullanımda olan ilaçların %5-10'unun metabolizmasından sorumludur. Toplumlar arası frekansları önemli derecede farklılıklar gösterdiği yapılan çalışmalardan anlaşılmaktadır. Avrupa kökenli kişilerin %2-6'sı, Japon popülasyonunun %15-20'si ve Afrika toplumunun ise %10-20'si CYPC19 enzimi için yavaş metabolizör varyantına sahiptir [127]. Huezo-Diaz ve ark. yaptıkları çalışmada CYP2C19*17 alel sıklığını beyaz ırkta %24,2 olarak bulmuşlardır [128]. Rudberg ve ark. yaptığı çalışmada ise CYP2C19*17 %22, CYP2C19*2 %18,1 ve CYP2C19*1 sıklığını ise %59,3 olarak saptamışlardır [129]. Aynacıoğlu ve ark. 1999 yılında 404 kişilik Türk popülasyonunda yaptıkları çalışma sonucunda ise CYP2C19*2 ve CYP2C19*3 alel sıklıkları sırasıyla %12 ve %4 olarak saptanmıştır [117].

Sim ve ark. yaptıkları çalışmada CYP2C19 varyantları ile depresyon semptomları arasındaki ilişkiyi anlamlandırmaya çalışmışlardır. CYP2C19*2 genotipli yavaş metabolizör bireylerin hızlı metabolizör bireylere göre daha az depresif semptom taşıdığı gözlenmiştir [130].

Yin ve ark. 2006 yılında 53 kişilik Çin popülasyonunda yaptıkları çalışmada CYP2C19*1 %63,4, CYP2C19*2 %30,8 ve CYP2C19*3 alel sıklığı %5,8 olarak tespir edilmiştir. Bu popülasyonun büyük çoğunluğu majör depresyon tanısı almış olup

Toronto yan etki ölçeğine göre advers etkileri değerlendirilmiştir. Yapılan bu değerlendirme sonucunda yavaş metabolizör olarak tanımlanan varyanta sahip bireylerde advers etki skorları daha yüksek bulunmuştur [131].

Literatür taraması sonucu oluşturulan YND paneli ile analiz ettiğimiz hastalarda CYP2C19 genine ait tespit ettiğimiz polimorfizmler CYP1C19*2 (636 G>A), CYP2C19*5 (1297 C>T) ve CYP2C19*17 (991 A>G) olmuştur. Tespit ettiğimiz aleller Türk toplumunda sıklıkla tespit edilen alelleridir [128].

Adam A. ve ark. Avrupa ve Afrika popülasyonunda yaptıkları bir çalışmada Avrupa popülasyonunda CYP3A4*1B varyantına hiç rastlanmazken, Afrikalılarda bu varyantın sıklığı %82 olarak saptanmıştır. Bu farklılıkların nedeni etnik, ırksal ve çevresel faktörler olabilir [132].

Sayitoğlu ve ark.'nın 2006 yılında 148 denekle yaptıkları çalışma sonucunda CYP3A4*1B varyant sıklığını %1,4 olarak tespit etmişlerdir [133]. Fakat bu sonuç daha önceden yapılan çalışmalardan elde edilen frekans değerlerine göre çok düşük bulunmuştur [134, 135]. Çalışmamıza katılan 20 denekte CYP3A4*1B varyantı tespit edilememiştir. Ayrıca çalışmamızda CYP3A4 genine ait hiçbir varyant tespit edilememiştir.

Bu çalışmada antidepresan ilaç metabolizmasında rol oynayan CYP enzimlerini kodlayan genlerin polimorfik bölgelerinin PCR yöntemi kullanarak çoğaltılması ile yeni nesil dizileme platformuna uygun bir tanı yöntemi geliştirilmiştir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Depresyon tedavisinde kullanılan antidepresan ilaçların metabolizmasında rol oynayan CYP enzimlerini kodlayan CYP2D6, CYPC29, CYP2C19, CYP3A4 ve CYP1A2 genlerinin sahip olduğu SNP'lerin analizine imkân sağlayacak olan bölgeler ilgili primerler ile çoğaltılmıştır. Primer tasarımı yapılırken primerlerin termodinamik özellikleri dikkate alınarak her primerin birbirine benzer koşullarda ve aynı verimle çalışması amaçlanmıştır. Primer tasarımı yaparken Primer3 programı kullanılmıştır. Primer dimer ve sekonder yapı oluşturma potansiyellerini tespit edebilmek adına USCS In-Silico PCR, BiSearch ve PCR Primer Stats sayfalarından faydalanılmştır. Farklı konsantrasyonlarda kullanılan kimyasal bileşenleri ile en iyi verim sağlanan PCR koşulları belirlenmiştir. Primer, buffer, MgCl2, dNTP bileşenlerinin konsatrasyonlarının PCR ürünlerine etkilerine bakılmıştır. Farklı bağlanma sıcaklıkları denenerek özgül olmayan ürün oluşumu engellenmeye çalışılmıştır. Elde edilen amplikonlar havuzlara ayrılarak şablon oluşturulmuş ve oluşturulan şablona göre amplikonlar birleştirilip kütüphane oluşturulmuştur. Oluşturulan kütüphane birleştirildikten sonra Nextera XT kitleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR işleminden sonra İllumina Miseq yeni nesil dizileme platformunda dizilenmiştir. Dizileme işlemi gerçekleştikten sonra cihazdan alınan .fastq ve .bam uzantılı çıktı dosyaları alınıp IGV ve SEQ analiz programları ile analiz edilmiştir. Elde edilen okuma sayıları literatürde belirtilen referans çalışmalara göre belirlenen eşik değerinin üzerinde tespit edilmiştir. Panel içeriğinde yer alan CYP2D6 (-1584C>G, 2850C>T, 4180G>C, 1661G>C, 2549delA, 1846G>A, 100C>T, 1707delT, 2935 A>C, 1758G>T, 2615_2617delAAG, 883 G>C, 124 G>A, 1758 G>A, 138insT, 1023 C>T, 1973insG, 2573insG, 3183 G>A, 2587_2590delGACT, 2988G>A, 2950G>C), CYP2C19 (681G>A, 636G>A, 1A>G, 1297C>T, 395G>A, 19294T>A, 431G>A, 680C>T, 991A>G), CYP3A4 (-392 G>A, 653C>G, 830_831insA, 167G>A), CYP2C9 (430C>T, 1075A>C, 1076T>C, 1080 C>G, 818delA, 449G>A, 1003C>T, 1465C>T, 485C>A, 1190A>C) ve CYP1A2(-3860G>A, -163C>A, -729C>T, -739T>G) noktaları belirtilen eşik okuma değerinin

üzerinde okuma sayıları ile analiz edilmiştir. Panel kapsamında analizi öngörülen noktaların tamamı en az 50x okuma ile analiz edilmiştir.

Ticari olarak firmaların sunduğu pahalı kitlere alternatif olabilecek bir çalışma olduğu öngörülmüştür. Ticari olarak üretilmiş olan bir farmakogenetik kiti ile yapılan çalışmada sadece farmakogenetik test istemiyle gelen hasta çalışılırken havuz oluşturma sistemiyle laboratuvarda çalışılması gereken genlerin neredeyse tamamı çalışmaya dahil edilebilmektedir. Havuz oluşturma siteminde aynı anda birçok hasta ve hastalığın çalışılmasına imkan sunarak hem maddi hemde süre olarak alternatiflerine oranla daha ekonomik bir yöntemdir.

Sonuç olarak; YND teknoloji gelişmekte olan bir platformdur, yakın süreçte bütün laboratuvarlar bu sisteme entegre olacaktır. Araştırma laboratuvarlarından ziyade yoğun olarak hasta çalışan rutin laboratuvarlarda kullanımı büyük ölçekli tasarruf sağlayacaktır. Amplikon sayısını azaltabilecek şekilde multipleks PCR çalışmaları ile iş yükünün azaltılabilmesi için çalışmalara devam edilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

[1] Kirchherr, H., Kühn-Velten, W N. (2006). Quantitative Determination of fortyeight antidepressant and antipsychotics in human serum by HPLC Tandem mass spectrometry: A multi-level, single sample approach. J Chromatogr B.;843: 100–113

[2] Kirchneiner, J., Brosen, K., Dahl, ML., Gram, LF., Kasper, S.…… Roots, I. (2001). CYP2D6 and CYP2D9 genotype-based dose recommendations for antidepressants; a first step towards subpopulation-specific dosages. Acta Psychiatr Scand; 104(3): 73-192

[3] Orsulak, PJ. (1989). Therapeutic monitoring of antidepressant drugs – Guidelines updated.Ther Drug Monit ; 11: 497-507

[4] Daly, AK. (2004). Development of analytical technology in pharmacogenetic research. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol; 369:133-40.

[5] Campbell, NRC., Dunnette, JH., Mwaluko, G., Loon, J., Weinshilboum, RM. (1984). Platelet phenol sulfotransferase and erythrocyte catechol-Omethyltransferase activities: correlation with methyldopa metabolism. Clin Pharmacol Ther; 35: 55-63

[6] Aronson, JK., Hardman, M. (1992).ABC of monitoring drug therapy: measuring plasma drug concentrations. BMJ;305:1078-1080

[7] Winter, ME. (2004). Basic Clinical Pharmacokinetics. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins:73-74.

[8] Lyketsos, C. (2006). Lessons from neuropsychiatry. J Neuropsychiatry Clin Neurosci , 18,445–449.

[9] American Psychiatric Association. (1994). Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. IV edition Washington DC.

[10] Nussbaum, RL., McInnes, RR., Willard, HF., Boerkoel, CF. (2005). Thompson & Thompson Tıbbi Genetik 6. Baskı, Güneş Kitabevi

[11] Alving, A., Carson, P., Flanagan, C., Ickes, C. (1956). Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. Science. 124(3220):484–485.

[12] Vogel, F. (1959). Moderne problem der humangenetik. Ergeb Inn Med U Kinderheilk.;12:52–125

[13] Kalow, W. (1964). Pharmacogenetics, heredity and the response to drugs. Vol.89, No. 4

[14] Vesell, ES. (1968). Genetic control of drug levels in man: phenylbutazone. Science.159(3822):1479-80

[15] Motulsky Arno G. (2006). Pharmacogenetics, pharmacogenomics and ecogenetics. Zhejiang Univ SCIENCE B 7(2):169-17088

[16] International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome.Nature, , 431, 931-945.

[17] Felker, BL., Hedrick, SC., Chaney, FE. (2003). Identifying depressed patients with a high risk of comorbid anxiety in primary care. Prim Care Companion J Clin Psychiatry, 5:104-110.

[18] Örsel, S. (2004). Depresyonda tedavi:Genel ilkeler ve kullanılan antidepresan ilaçlar.Klinik Psikiyatri 2004;Ek:4:17-24.

[19] Kaplan, H.I. and Sadock, B.J. (1996). Mood disorders,In 'Synopsis of Psychiatry.8.Edition, ,Williams and Wilkins,Baltimore,Marylands 524-580,1998

[20] Kalow, W. (1968). Pharmacogenetics, heredity and the response to drugs. Vol.89, No. 4

[21] Prien, FP. (1987). Long term management of affective disorders. Psychopharmacology: Third Generation of Progress. YH Meltzer (Ed), Raven Press Book Ltd, New York, s.1051,1987

[22] Kennedy, S., Lam, W., Nutt, D., Michael, E. (2004). Treating Depression Effectively. Applying Clinical Guidelines. Thomson Publishing, Hampshire, UKs;157

[23] Stahl, M. (2000) Depression and Bipolar Disorders. Essential Pyschopharmacology. Neuroscientific Basis and Practical Applications, 2. Baský, Cambridge University Press, s.135-199

[24] Tural, Ü., Önder, E. (2001). Depresif Bozuklukların Tedavisinde Moklobemid Kullanımı. Klinik Psikiyatri, Ek 4: 12-16

[25] Sambunaris, A., Hesselink, JK., Pinder, R., Panagides, J., Stahl, SM. (1997). Development of new antidepressants. J Clin Psychiatry;58:40-53

[26] Richelson, E. (1982). Pharmacology of antidepressants in use in the United States. J Clin Psychiatry; 43:4-13.

[27] Montigny, C., Pineyro, G., Chaput, Y., Blier, P. (1992). Electrophysiological studies on the effect of long-term 5-HT reuptake inhibition on the function of 5HT neurons. Clin Neuropharmacol;115:440A-441A.

[28] Stahl, M. (2000). Classical Antidepresants, Serotonin Selective Reuptake Inhibitors, and Noradrenerjic Reuptake Inhibitors. Essential Pyschopharmacology. Neuroscientific Basis and Practical Applications, Cambridge University Press, s.199-245.

[29] Stahl, M. (2004). Depression and Bipolar Disorders. Essential Pyschopharmacology. Neuroscientific Basis and Practical.Klinik Psikiyatri; Ek 4:17-24

[30] Nussbaum, RL., McInnes, RR., Willard, HF., Boerkoel, C. (2005). Thompson & Thompson Tıbbi Genetik 6. Baskı, Güneş Kitabevi

[31] Alving, A., Carson, P., Flanagan, C., Ickes, C. (1956). Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. Science. 124(3220):484–485.

[32] Vogel, F. (1959). Moderne problem der humangenetik. Ergeb Inn Med U Kinderheilk.;12:52–125

[33] Kalow, W. (1968). Pharmacogenetics, heredity and the response to drugs. Vol. 89

[34] Vesell ES. (1968). Genetic control of drug levels in man: phenylbutazone. Science.159(3822):1479-80

[35] International Human Genome Sequencing Consortium. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome.Nature, , 431, 931-945.

[36] Evans, W.E.; McLeod, H.L. (2003). Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. N. Engl. J. Med., 348, 538-549.

[37] Hoffman, E.P. (2007). Skipping toward personalized molecular medicine. N. Engl. J. Med.,357, 2719-2722.

[38] Lesko, L.J. (2007). Personalized medicine: elusive dream or imminent reality? Clin, Pharmacol, Ther.,81, 807-816.

[39] Tomalik-Scharte, D., Lazar, A., Fuhr, U. (2008). Kirchheiner, J. The clinical role of genetic polymorphisms in drug-metabolizing enzymes. Pharmacogenomics J.8, 4-15

[40] Biltekin, T. (2013). Tip Iı Diabetes Mellitus Tedavisinde Farmakogenetik. Bitirme Ödevi. Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Kayseri

[41] Lüleyap, Ü. (2008). Moleküler Genetiğin Esasları (1), Nobel Kitabevi: 379-390.

[42] Pimentel, M., Molina, G., Dion´ısio, A., Roberto, M., Junior, M. (2011). The Use of Endophytes to Obtain Bioactive Compounds and Their Application in Biotransformation Process. Biotechnology Research International: 1–11.

[43] Kang, M., Song, W., Shim, B., Oh, S., Lee, H. (2010). Pharmacologically Active Metabolite of Currently Marketed Drugs: Potential Resources for New Drug Discovery and Development. Pharmaceutical Soceity of Japan 130

[44] Kumar, G., Surapaneni, S. (2001). Role of Drug Metabolism in Drug Discovery and Development. Medicinal Research Reviews 21: 391–411.

[45] Guengerich, F. (2001) Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. Chem Res Toxicol 14: 611–650.

[46] Fura, A., Shu, Z., Zhu, M., Hanson, R., Roongta V. (2004). Discovering drugs through biological transformation: role of pharmacologically active metabolites in drug discovery. I Med Chem 47: 4339–4351.

[47] How Humans Cope with Exposure to Xenobiotics. (2016). Retrieved from Http://Books.Mhprofessional.Com/Medical/Goodmanandgilman/Pdfs/Chapter3.Pdf

[48] Baillie,T., Cayen, M., Fouda, H., Gerson, R., Green, J. (2002). Drug metabolites in safety testing. Toxicology and Applied Pharmacology 182: 188–198.

[49] Klingenberg, M. (1958). Pigments of rat liver microsomes, Arch Biochem Biophys.

[50] Garfihnkel, D. (1958). Studies on pig liver microsomes. I. Enzymic and pigment composition of different microsomal fractions, Arch Biochem Biophys. 77(2), 493-509.

[51] Omura, T. and Sato, R. (1962). A new cytochrome in liver microsomes, J Biol Chem. 2371375-6.

[52] Omura, T. and Sato, R. (1964). The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. Ii. Solubilization, Purification, and Properties, J Biol Chem. 2392379-85

[53] Sim, S. and Ingelman-Sundberg, M. (2010). The Human Cytochrome P450 (CYP) Allele Nomenclature website: a peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. Hum Genomics.;4(4):278-81.

[54] Alan, F. (2015). Role of the Liver in Metabolism.Retrieved. Retrieved From Http://Books.Mhprofessional.Com/Medical/Goodmanandgilman/Pdfs/Chapter3.Pdf

[55] Sim, S. and Ingelman-Sundberg, M. (2012). Peer-reviewed database of CYP variants and their associated effects. Hum Genomics.;4(4)

[56] Shows, T.B., McAlpine, P.J., Boucheix, C., Collins, F.S. (1987). 'Guidelines for human gene nomenclature. An international system for human gene nomenclature (ISGN, 1987)', Cytogenet. Cell Genet. Vol. 46,

[57] Göktaş, M.T. (2013). Behçet hastalarında sitokrom P450 2C (CYP2C9 ve CYP2C19) ve P-glikoprotein genetik polimorfizm ve aktivitelerinin incelenmesi.Yüksek lisans tezi.Hacettepe Üniversitesi, Tıbbi Farmakoloji.ANKARA

[58] Ingelman-Sundberg, M. (2004). Pharmacogenetics of cytochrome P450 and its applications in drug therapy: the past, present and future, Trends Pharmacol Sci. 25(4), 193-200.

[59] Reny, J.L., Fontana, P. (2015). Antiplatelet drugs and platelet reactivity: is it time to halt clinical research on tailored strategies? Expert Opin Pharmacother;16(4):449–52.

[60] Dean, L. (2012) Codeine Therapy and CYP2D6 Genotype. 2012 Sep 20 [Updated 2016 Mar 8]. In: Medical Genetics Summaries [Internet]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)

[61] Murray, M. (2006). Role of CYP pharmacogenetics and drug–drug interactions in the efficacy and safety of atypical and other antipsychotic agents. J Pharm Pharmacol.Jul;58(7):871-85

[62] Daly, A.K. (2003) Pharmacogenetics of the major polymorphic metabolizing enzymes, Fundam. Clin. Pharmacol., 17:27-41.

[63] Url-1<www.genetiks.com.tr/servisler/>, date retrieved 28.05.2017.

[64] Samer, C., Lorenzini, K., Rollason, V., Daali, Y., Desmeules, JA. (2013). Applications of CYP450 testing in the clinical setting. Mol Diagn Ther;17(3):165–84.

[65] Tomonori, A. (2017). CYP2C19 variants and epoxyeicosatrienoic acids in patients with microvascular angina. Int J Cardiol Heart Vasc. 2017 Jun; 15: 15–20.

[66] Neha, D. (2016). Rapid and ultra-rapid metabolizers with CYP2C19*17 polymorphism do not respond to standard therapy with proton pump inhibitors. Meta Gene. 2016 Sep; 9: 159–164

[67] Goodman, MT. (2003). Association of caffeine intake and CYP1A2 genotype with ovarian cancer. Nutr Cancer. 2003;46(1):23-9.

[68] Gunes, A. (2008). Variation in CYP1A2 activity and its clinical implications: influence of environmental factors and genetic polymorphisms. Pharmacogenomics.

[69]Get to Know an Enzyme. (2007). Retrieved 25 Mart from http://www.hanstenandhorn.com/

[70] Albekairy, A., Alkatheri, A., Fujita, S., Hemming, A., Howard, R., Reed, A. (2013). Cytochrome P450 3A4*1B as Pharmacogenomic Predictor of Tacrolimus Pharmacokinetics and Clinical Outcome in the Liver Transplant Recipients. Saudi J Gastroenterol. 2013 Mar-Apr; 19(2): 89–95.

[71] Padmanabhan, R., Jay, E., Wu, R. (1974). Chemical synthesis of a primer and its use in the sequence analysis of the lysozyme gene of bacteriophage T4. Proc Natl Acad Sci U S A. 1974 Jun;71(6):2510-4.

[72] Maxam, M., Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proc Natl Acad Sci U S A. Feb;74(2):560-4.

[73] Sanger F. (1981). Determination of nucleotide sequences in DNA. Biosci Rep.Jan;**1**(1):3-18.

[74] Quail, M. A., Smith, M., Coupland, P. (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. BMC genomics, 13, 341.

[75] Liu, L., Li, Y., Li, S. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. BioMed Research International 2012.

[76] Arıcıoğlu, F. and Çetin, M. (2010). Psikiyatride Bireye Özgü Tedavi: Belki Biraz Eski Veya Biraz Yeni, Ama Geleceğin Tedavisi. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni, 20: 269-273.

[77] Keller, M. B., Shapiro, R. W., Lavori, P. W. (1982). Recovery in major depressive disorder: analysis with the life table and regression models. Arch Gen Psychiatry, 39(8): 905-10.

[78] Behjati, S. and Tarpey PS. (2013). What is next generation sequencing? Arch Dis Child Educ Pract Ed. ;98(6):236-8.

[79] Rizzo, JM. and Buck, MJ. (2012). Key principles and clinical applications of next-generation DNA sequencing. Cancer Prev Res (Phila). 2012;5(7):887-900.

[80] Ruano, G., Fenton, W., Kidd, KK. (1989). Biphasic amplification of very dilute DNA samples via 'booster' PCR. Nucleic Acids Res.11;17(13):5407.

[81] Brownie, J., Shawcross, S., Theaker, J. (1997). The elimination of primer-dimer accumulation in PCR. Nucleic Acids Res.15;25(16):3235-41.

[82] Url-2 < http://bisearch.enzim.hu/ > retrieved 22.05.2017.

[83] Url-3 <http://www.bioinformatics.org/sms2/pcr_primer_stats.html> retrieved 22.05.2017.

[84] Url-4 <https://genome.ucsc.edu/> retrieved 22.05.2017.

[85] Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002). Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. J Clin Lab Anal.;16(1):47-51.

[86] Shuber, AP., Grondin, VJ., Klinger, KW. (1995). A simplified procedure for developing multiplex PCRs. Genome Res. 1995 Dec;5(5):488-93.

[87] Henegariu, O., Heerema, NA., Dlouhy, S., Vance, G., Vogt, P. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol. Biotechniques. Sep;23(3):504-11.

[88] Kawashiri M. Nomura A, Konno T., Hayashi K. (2014). Can Next-Generation Sequencing Replace Sanger Sequencing for Screening Genetic Variants?. Circulation Journal Vol.78: 2846-47. Tuononen, K., Maki-Nevala, S., Sarhadi, VK. (2013). Comparison of targeted nextgeneration sequencing (NGS) and real-time PCR in the detection of EGFR, KRAS, and BRAF mutations on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor material of non-small cell lung carcinoma-superiority of NGS. Genes Chromosomes Cancer. May;52(5):503

[89] Benowitz, S. (2016). New study challenges gold standard for validating DNA sequencing results: Findings suggest newer next generation DNA sequencing results are more accurate. Retrieved from https://www.genome.gov/27564480/2016-newsfeature-new-study-challenges-gold-standard-for-validatingdna-sequencing-results/.

[90] Taşlıdere, H. (2016). Mental retardasyon ve/veya multipl konjenital anomalili olguların Yeni Nesil Dizileme Tekniği ile genetik etiyolojisinin araştırılması [Uzmanlık Tezi]. İzmir: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı

[91] Drozda, K., Müller, D. J., Bishop, J. R. (2014). Pharmacogenomic Testing for Neuropsychiatric Drugs: Current Status of Drug Labeling, Guidelines for

Using Genetic Information, and Test Options. Pharmacotherapy 2014;34(2):166–184)

[92] Dong, Y., Xiao, H., Wang, Q., Zhang, C., Liu, X., Yao, N., …… Li, H. (2015). Analysis of genetic variations in CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 genes using oligonucleotide microarray. Int J Clin Exp Med ;8(10):18917-18926

[93] Chou, W., Yan, F., Robbins-Weilert, D., Ryder T., Liu W., Perbost, C., Fairchild, M., Leon, J., Koch, W., Wedlund, P. (2003). Comparison of two CYP2D6 genotyping methods and assessment of genotype-phenotype relationships. Clin Chem; 49: 542-551.

[94] The AmpliChip CYP450 test: cytochrome P450 2D6 genotype assessment and phenotype prediction

[95] The Medical Letter On Drugs and Therapeutics. (2005). Retrieved from www.medicalletter.org

[96] Bronner, I., Quail, M., Turner, D.J. (2009). Improved Protocols for Illumina Sequencing. Curr Protoc Hum Genet ; 0 18

[97] Leeneer, K., Hellemans, J., Steyaert, W. (2014). Flexible, Scalable, and Efficient Targeted Resequencing on a Benchtop Sequencer for Variant Detection in Clinical Practice.

[98] Hernan, I., Borras, E., Dias, M.S., Gamundi, M.J. (2012). Detection of Genomic Variations in BRCA1 and BRCA2 Genes by Long-Range PCR and Next-Generation Sequencing. The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 14, No. 3

[99] Eastman, A., and Yuan, Z. (2015). Development and validation of an rDNA operon based primer walking strategy applicable to de novo bacterial genome finishing. Cancer Prev Res (Phila).;5(7):887-900.

[100] Url-5 <https://www.illumina.com/systems/sequencing> date retrieved 2017.

[101] Url-6 <https://www.illumina.com/content/dam/illumina> date retrieved 2017

[102]Url-7<https://genohub.com/loading-concentrations-optimal-cluster-density/ date retrieved 2017

[103] Borgström, E., Lundin, S., and Lundeberg, J. (2011). Large Scale Library Generation for High Throughput Sequencing. PLoS One 5: e10029.

[104] Shi, Y., Xiang, P., Li, L., Shen M. (2011). Analysis of 50 SNPs in CYP2D6, CYP2C19, CYP2C9, CYP3A4 and CYP1A2 by MALDI -TOF mass spectrometry in Chinese Han population. Forensic Science International 207; 183-187

[105] Ota, T., Kamada, Y., Hayashida, M., Iwao-Koizumi, K., Murata, S., Kenji K. (2015). Combination Analysis in Genetic Polymorphisms of Drug-Metabolizing Enzymes CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A5 in the Japanese Population. Int. J. Med. Sci., Vol. 12

[106] Zhou, Q., Yu, X.M., Lin, H.B., Wang, L., Yun, Q.Z., Hu, S.N. ve Wang, D.M. (2009). Genetic polymorphism, linkage disequilibrium, haplotype structure and novel allele analysis of CYP2C19 and CYP2D6 in Han Chinese. The Pharmacogenomics Journal, 9, 380–394.

[107] Myrand, S., Sekiguchi, K., Man, M., Lin, X., Tzeng, R., Teng, ……, Wilner, K. (2008). Pharmacokinetics/genotype associations for major cytochrome P450 enzymes in native and first-and third-generation Japanese populations: comparison with Korean, Chinese, and Caucasian populations. Clinical Pharmacology and Therapeutics, 84(3), 347–361.

[108] Samimifar, M., and Ramazani, A. (2014). Frequency of Two Genetic Polymorphisms of CYP1A2 Gene in Iranian Population. Annual Research & Review in Biology 4(11): 1769-1776

[109] Kohlrausch, F.B., Severino-Gama, C., Lobato, M.I., Belmonte-de-Abreu, P., Carracedo, Á., Hutz, M.H. (2013). The CYP1A2–163C>A polymorphism is associated with clozapine-induced generalized tonic-clonic seizures in Brazilian schizophrenia patients. Psychiatry Research, 209(2), 242–245.

[110] Zhou, S.F., Liu, J. P. ve Chowbay, B. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical impact. Drug Metabolism Reviews, 41(2), 89–295

[111] Lou, Y. (1990). Differences in drug metabolism polymorphism between Orientals and Caucasians. Drug Metab ; 22:451-75

[112] Yue, Q., Svensson J., Alm, C., Sjoqvist, F., Sawe, J. (1989). Interindividual and inter-ethnic differences in the demethylation and glucuronidation of codeine. Br J Clin Pharmac; 28:629-37

[113] Kalow, W. (1997). Pharmacogenetics in biological perspective. Pharmacol Rev ;49:369-79

[114] Masimirembwa, C., Hasler, J., Bertilssons, L., Johansson, I., Ekberg, O., Ingelman-Sundberg, M. (1996). Phenotype and genotype analysis of debrisoquine hydroxylase (CYP2D6) in a black Zimbabwean population. Reduced enzyme activity and evaluation of metabolic correlation of CYP2D6 probe drugs. Eur J Clin Pharmacol; 51:117-22.

[115] Abraham, B. K., Adithan C. (2001). GENETIC POLYMORPHISM OF CYP2D6. Indian Journal of Pharmacology; 33: 147-169

[116] Teh, L., Bertilsson, L. (2012). Pharmacogenomics of CYP2D6: molecular genetics, interethnic differences and clinical importance. Drug Metab Pharmacokinet; 27 (1): 55-67

[117] Aynacıoğlu, A. S., Bozkurt, A., Kortunay, S., Nacak, M., Schröder, T., Kayaalp, S., Brockmöller, K. (1999). Low frequency of defective alleles of cytochrome P450 enzymes 2C19 and 2D6 in the Turkish population. CLINICAL PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS; 66:185-92

[118] Ingelman-Sundberg, M. (2005). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. Pharmacogenomics J; 5 (1): 6-13.

[119] Sobrino, B., Brión, M., Carracedo, A. (2005). SNPs in forensic genetics: a review on SNP typing methodologies. Forensic Sci Int. 2005 ;154 (2-3): 181-94.

[120] Johansson, I., Lundqvıst, E., Bertılsson, L., Dahl, M.L., Sjöqvist, F., Ingelman-Sundberg, M. (1993). Inherited amplification of an active gene in the cytochrome P450 CYP2D locus as a cause of ultrarapid metabolism of debrisoquine, Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 11825- 11829.

[121] Zanger, U.M., Raimundo, S., Eichelbaum, M. (2004) Cytochrom P450 2D6: overview and update on pharmacology, genetics, biochemistry, Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol., 369: 23-37.

[122] Özkaynakçı, Z.A. (2006). Fenitoin Tedavisinde Genetik Polimorfizmin Önemi, Doktora Tezi, Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü; 23-77.

[123] Ieiri I., Mamiya K., Urae A. (1997). Steroselective 4' –hydroxylation of phenytoin: relationship to s-mephenytoin polymorphism in Japanese. Br.J.Clin. Pharmacol.; 43: 441-445

[124] Ieiri I., Tainaka H., Morita T. (2000). Catalytic activity of three vriants (Ile, Leu, Thr) at amino acid residue 359 in human CYP2C9 gene and simultaneous detection sing single-strand conformation polymorphism analysis. Ther Drug Monit.,22:237-244.

[125] Morais, S.M.F., Wilkinson, G.R., Blaisdell, J. (1994). Identification of a new genetic defect responsible for the polimorphism of (S)-mephenytoin metabolism in Japanese.Mol. Pharmacol.;46: 594-598.

[126] Herken, H., Aynacıoğlu, Ş., Esgi, K., Virit, O. (2001). Psikiyatri Hastalarında Sitokrom P450 2D6 Yavaş ve Ultra Hızlı Metabolizör Sıklıkları; 12(2): 83-88.

[127] Wıjnen, R., Buıjsch, O., Drent, M., Kuipers, C., Neef, C., Bast, A., Bekers, O., Koek, G. (2002). the prevalence and clinical relevance of cytochrome P450 polymorphisms.

[128] Huezo-Diaz, P., Perroud, N., Spencer, EP., Smith, R., Sim, S., Virding, S., Uher,….., Aitchison K. (2012). CYP2C19 genotype predicts steady state escitalopram concentration in GENDEP. J Psychopharmacol, 26:398-407.

[129] Rudberg, I., Hermann, M., Refsum, H., Molden, E. (2008). Serum concentrations of sertraline and N-desmethyl sertraline in relation to CYP2C19 genotype in psychiatric patients. Eur J Clin Pharmacol, 64:1181-1188.

[130] Sim, S., Nordin, L., Andersson, T., Virding, S., Olsson, M., Pedersen, N. (2010). Association between CYP2C19 polymorphism and depressive symptoms. Am J Med Genet Part B, 153B:1160-1166

[131] Yin, O., Wing, Y., Cheung, Y., Wang, Z., Lam, S., Chiu, H., Chow, M. (2006). Phenotypegenotype relationship and clinical effects of citalopram in Chinese patients. J Clin Psycopharmacol, 26:367-372.

[132] Adam, A., Howard, L., Sharon M. (2005). *1,2 CYP3A4 and CYP3A5 genotyping by Pyrosequencing BMC Medical Genetics, 6:19

[133] Sayutoğlu, M., Yıldız, İ., Hatırnaz, Ö., Özbek, U. (2006). Common Cytochrome p4503A (CYP3A4 and CYP3A5) and Thiopurine S-Methyl Transferase (TPMT) Polymorphisms In Turkish Population. Turk J Med Sci 3611-15

[134] Hustert, E., Haberl, M., Burk, O. (2001). The genetic determinants of the CYP3A5 polymorphism. Pharmacogenetics 11:773-9.

[135] King, BP., Leathart, JB., Mutch, E. (2003). CYP3A5 phenotype-genotype correlations in a British population. Br J Clin Pharmacol 55:625- 9.

EKLER

EK A: Etik Kurul Onay Belgesi

EK B : Asgari Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

EK A

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42)
KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Nöropsikiyatrik İlaç Kullanımında Yeni Nesil Dizileme Yöntemi İle Farmakogenetik Tanı Paneli Geliştirilmesi

18.10.2016

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Adnan Menderes Bulvarı Vatan caddesi 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	(0212) 523 22 88 - 1028
	FAKS	(0212) 533 23 26
	E-POSTA	egaslan@bezmialem.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Fahri AKBAŞ			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyoloji			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	
DEĞERLENDİRİLEN BİLGİLER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	-	-	Gerekli Değil ☐ Var ☒
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	10.09.2016	1	Gerekli Değil ☐ Var ☒
KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:5/66**	**Tarih: 18.10.2016**		
	Yürütücülüğünü Doç. Dr. Fahri AKBAŞ ' ın yaptığı "Nöropsikiyatrik İlaç Kullanımında Yeni Nesil Dizileme Yöntemi İle Farmakogenetik Tanı Paneli Geliştirilmesi" başlıklı çalışmanın Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.			

Sayfa 1 / 3

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Murat MERAL

EK B

ASGARİ BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU
10.09.2016 VERSİYON NO:1

Katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı **"Nöropsikiyatrik ilaç kullanımında yeni nesil dizileme yöntemi ile farmakogenetik tanı paneli geliştirilmesi"**dır. Bu çalışmaya hiçbir genetik veya klinik özellik kriteri belirlenmeksizin "hedef bir hastalık grubu belirlenmeksizin" 20 hasta dâhil edilmiştir. Bu veriler sadece akademik çalışma kapsamında kullanılacak olup isim ve/veya kimliği belirleyici herhangi bir bilgi belirtilmeyecektir. Sizden daha önceden alınmış olan ya da tıbbi durumunuz nedeniyle rutin poliklinik kontrollerinizde sizden alınacak olan kan numunelerinden artan miktar üzerinde analizler gerçekleştirilecektir. Bu analizler için sizden kesinlikle ilave, rutin dışı bir kan alma işlemi olmayacaktır. Yukarıda belirtildiği gibi rutin tetkik kapsamında alınmış ya da alınacak olan kan numunelerinden genetik materyaliniz izole edilecek ve bu materyal üzerinde söz konusu analizler yapılacaktır. Söz konusu genetik materyal uzun süreler için uygun koşullarda saklanabilir ve gelecekteki bilimsel çalışmalar için de kullanılabilir. Bu çalışma size direkt olarak fayda sağlamayacaktır, fakat bu çalışmayla elde edeceğimiz bulgular doğrultusunda sizden sonra ki kişiler için elimizde veriler bulunmuş olacaktır. Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir. Araştırmamıza bu açıklamalardan sonra katılıp katılmamakta tamamen özgürsünüz. Ayrıca araştırmamızın herhangi bir zamanında da araştırmadan ayrılma hakkına sahipsiniz. Ancak sizden ricamız bu çalışmada bize destek ve yardımcı olmanızdır.

Bu bilgilendirmenin haricinde sormak istediğiniz çalışmayla ilgili her soruya 05075122636 no'lu telefondan bizlere ulaşarak sorabilirsiniz. Bu açıklamalardan sonra çalışmamıza gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorsanız bu formu imzalamanız gerekmektedir.

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi biliyorum.

"Nöropsikiyatrik ilaç kullanımında yeni nesil dizileme yöntemi ile farmakogenetik tanı paneli geliştirilmesi" araştırması kapsamında alınan biyolojik örneğimin(kan),

☐İleride yapılması planlanan tüm araştırmalarda kullanılmasına izin veriyorum.

Katılımcı (Gönüllü)

Adı, Soyadı :

Telefon : İmza :

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad **:** Nigâr Duygu TORLAK

Doğum Tarihi ve Yeri **:** 24.04.1988 / İstanbul

E-posta : duygu_torlak@hotmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** **:** 2012, Fatih Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik
- **Yükseklisans :** 2018, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Biyoteknoloji Anabilim Dalı, Biyoteknoloji Yüksek Lisans Programı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2012-2016 yılları arasında Burç Genetik Tanı Merkezi, Moleküler Genetik departmanında çalıştı.
- 2016-…. Haseki Eğitim Araştırma Hastanesi Genetik Hastalıkları Tanı Merkezi, Moleküler Genetik Departmanında çalışıyor.