

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

***PLAZMİNOJEN (PLG) GENİNİN DENATÜRE YÜKSEK BASINÇLI SIVI
KROMATOĞRAFİ (DHPLC) İLE MUTASYON ANALİZİ ve OLASI MUTASYONLU
ÖRNEKLERİN DNA DİZİ ANALİZİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ***

Buket Nebiye DEMİR

Danışman Öğretim Üyesi
Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ

ANKARA

2011

PLAZMİNOJEN (PLG) GENİNİN DENATÜRE YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFI (DHPLC) İLE MUTASYON ANALİZİ ve OLASI MUTASYONLU ÖRNEKLERİN DNA DİZİ ANALİZİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

ÖZET

Plazminojen (PLG) geni altıncı kromozomun uzun kolu üzerinde 6q26 pozisyonunda yer almaktadır. *PLG* gen ürünü olan PLG proteini, kan pıhtısının eritilmesi yani fibrinoliz ile görevli plazmin enziminin inaktif proenzim formudur. *PLG* genindeki homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyonlar, farklı vücut bölgelerinde çoğunlukla mukoz membranları etkileyen nadir görülen bir inflamatuvar hastalık olan Tip I plazminojen eksikliği ile ilişkilendirilmiştir. Rahatsızlığın en yaygın göstergesi, özellikle göz kapağına ait yüzeylerde normal mukozanın yerini alan odunsu yapıda beyaz, sarı-beyaz ya da kırmızı kalın kitleler ile karakterize psödomembranlar oluşturan lignöz (odunsu) konjunktivittir.

Bu çalışmada lignöz konjunktivit hikayesi olan 16 indeks olgu *PLG* gen mutasyonları açısından incelenmiştir. Türk toplumu, akraba evliliklerinden ve tarih boyunca çeşitli uygarlıklara ev sahipliği yaptığından dolayı *PLG* gen değişimleri açısından oldukça heterojendir. Bu kültürel miras yanında *PLG* geni ve Tip I plazminojen eksikliği ile ilişkili mutasyonların çoğunun ilk defa Türklerde tanımlandığı dikkate alınarak, Türk lignöz konjunktivit hastalarında daha önce rapor edilmemiş mutasyonları saptamak bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

Bu çalışmada *PLG* geni önce denatüre yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (DHPLC) ile taranmış, daha sonra örnekler profil farklılıklarına göre sınıflandırılmıştır. Sınıflandırmadan sonrasında yabancı tip profilden farklılık gösteren her bir profili temsil eden birkaç referans örnek mutasyon taşıması olasılığı nedeniyle DNA dizi analizi ile incelenmiştir.

Çalışmanın sonucunda literatürde daha önce yer almayan Cys30Ter anlamsız (nonsense), +1 IVS6 G>A ayıklama bölgesi (splice site) mutasyonu, Glu161Lys, Gly199Val, Tyr264Cys, Gly401Asp, Gly684Asp yanlış anlamlı (missense-nonsynonymous) ve 582 C>T eş anlamlı (silent-synonymous) mutasyonları hastalıkla ilişkili olarak bu çalışmayla ilk defa tanımlanmıştır. Yeni tanımlanan bu değişimlerin yanında literatürde var olan Lys19Glu, Asp453Asn, Pro744Ser yanlış anlamlı 330 C>T, 771 T>C, 1083 A>G, 2286 T>G eş anlamlı ve c.*45 A>G 3'UTR mutasyonları da saptanmıştır.

2011, 106 sayfa

Anahtar Sözcükler: Plazminojen, PLG, Tip I plazminojen eksikliği, Lignöz konjunktivit, Denatüre yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, DHPLC

MUTATION ANALYSIS of PLASMINOGEN GENE (PLG) with DENATURATED HIGH PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY (DHPLC) and DNA SEQUENCE ANALYSIS of SAMPLES THAT EXPECTED to HAVE MUTATION

ABSTRACT

The *PLG* gene maps to long arm of chromosome 6 on location 6q26. PLG protein (the product of *PLG* gene) is inactive proenzyme form of plasmin that dissolve fibrin trombi by a process called fibrinolysis. It has been shown that homozygous or compound-heterozygous type I PLG deficiency is a major cause of a rare inflammatory disease affecting mainly mucous membranes in different body sites. The most common clinical manifestation is ligneous conjunctivitis, characterized by development of fibrin-rich, woodlike (“ligneous”) pseudomembranous lesions.

In this study, 16 index cases with ligneous conjunctivitis were investigated for PLG gene mutations. Turkish population is heterogeneous for PLG gene variations probably because of intermarriage and homing to many civilizations throughout history. In addition to this cultural heritage most of mutations associated with PLG and Type I plg deficiency were first identified in Turks. So, the aim of this study is identifying new mutations on Turkish ligneous conjunctivitis patients that have not been identified before.

In this study, PLG gene was scanned for mutations with denaturated high pressure liquid chromatography (DHPLC) and then samples that have different profile comparing with wild type sample were classified. After classification several reference samples belonging to each group were analyzed by DNA sequencing.

In 16 Turkish index cases with type I plasminogen deficiency we identified Cys30Ter nonsense mutation; +1 IVS6 G>A splice site mutation; Glu161Lys, Tyr264Cys, Gly199Val, Gly401Asp, Gly684Asp, Lys19Glu (K19E), Asp453Asn, Pro744Ser non-synonymous (missense) mutations; 330 C>T, 582 C>T, 771 T>C, 1083 A>G, 2286 T>G synonymous (silent) mutations and c.*45 A>G 3’UTR mutation in PLG gene. To best of our knowledge, the following PLG gene mutations are newly described: Cys30Ter, +1 IVS6 G>A, Glu161Lys, Gly199Val, Tyr264Cys, Gly401Asp, Gly684Asp and 582 C>T.

2011, 106 pages

Key Words: Plasminogen, PLG, Type I plasminogen deficiency, Ligneous conjunctivitis, Denaturated high pressure liquid chromatography, DHPLC

TEŞEKKÜR

Sadece doktora eğitimine başlamamı sağlamakla kalmayıp, eğitimim boyunca eşsiz bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, çalışmalarımda yol gösteren, iyi bir bilim insanı olma konusunda sağlam izlenimler edinmemi sağlayan değerli tez danışmanın Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a

Tez çalışmamın tasarlanması ve sonuçlanması ile hasta örneklerinin toparlanması konusunda çok büyük katkıları olan, yüksek lisans eğitimi ile akademik hayata adım atmamı sağlayarak geleceğimi bu yolda şekillendirmesi yanında doktora eğitimimde de kıymetli desteğini esirgemeyen, üstün bilimsel kişiliğiyle tüm öğrencilerine yol gösteren değerli hocam Prof. Dr. Nejat AKAR'a

Çalışmalarım süresince çok kıymetli desteklerini hissettiğim Hacettepe Üniversitesi Genel Direktörü Prof. Dr. Tezer KUTLUK'a, çalışmalarımı yürüttüğüm Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ile laboratuvar çalışanları ve başta Uzm. Bio. Semih DALKILIÇ olmak üzere Genombilim birimindeki arkadaşlarıma, çalışmalarımın bir bölümünü yürüttüğüm Ankara Üniversitesi Pediatrik Moleküler Genetik Anabilim Dalı'na ve başta Kadir SİPAHİ, Emel USLU, Çiğdem ARSLAN ve Dr. Ayşenur ÖZTÜRK olmak üzere tüm çalışanlarına,

Doktora eğitimine başlama konusunda beni yönlendiren ve destekleyen, eğitimim boyunca hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan, tez çalışmalarımda teknik destek sağlayan biricik eşim Çetin DEMİR'e, çalışmalarımı küçük yaşına rağmen hoşgören ve varlığıyla her daim bana mutluluk veren biricik kızım Duru DEMİR'e,

Bu günlere gelmem konusunda maddi-manevi her türlü desteği sağlayan, hakkını ödeyemeyeceğim sevgili annem Rüveyde DÖNMEZ'e ve kaybettiğim sevgili babam Abdullah Bülent DÖNMEZ'e, manevi desteğini her zaman hissettiğim sevgili kardeşim Betül DÖNMEZ'e,

Yurt içi doktora bursu ile doktora eğitimim boyunca maddi destek sağlayan TÜBİTAK BİDEB'e teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
DİZİLER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER DİZİNİ.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	4
2.1. Hemostaz.....	4
2.1.1. Damar Daralması (Vazokonstruksiyon).....	5
2.1.2. Trombosit Yapışması ve Agregasyonu.....	5
2.1.3. Fibrin Pıhtısı Oluşumu.....	6
2.1.4. Fibrinoliz.....	6
2.2. Plazminojen-Plazmin Özellikleri.....	9
2.3. Plazminojen Geni.....	12
2.4. Kalıtsal Plazminojen Eksikliği.....	15
2.4.1. Tip I Plazminojen Eksikliği (Hipoplazminojenemi).....	15
2.4.2. Tip II Plazminojen Eksikliği.....	28
2.5. Moleküler Teknikler ve Mutasyon Analiz Yöntemleri.....	30
2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	30
2.5.2. Denatüre Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (DHPLC).....	32
2.5.3. DNA Dizi Analizi.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1 GEREÇ.....	36
3.1.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması.....	36
3.2. YÖNTEMLER.....	38
3.2.1. DNA Eldesi.....	38
3.2.2. Primer Tasarımı.....	39
3.2.3. PCR.....	41
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	43
3.2.5. DHPLC.....	44
3.2.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	47
3.2.7. DNA Dizi Analizi.....	48
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	50
4.1. Yeni Saptanan Anlamsız Mutasyonlar.....	50
4.1.1. Cys30Ter.....	50
4.2. Yeni Saptanan Ayıklama Bölgesi Mutasyonları.....	52
4.2.1. +1 IVS6 G>A.....	52
4.3. Saptanan Yanlış Anlamlı Mutasyonlar.....	54
4.3.1. Yeni Saptanan Yanlış Anlamlı Mutasyonlar.....	54
4.3.1.1. Glu161Lys.....	54
4.3.1.2. Gly199Val.....	56
4.3.1.3. Tyr264Cys.....	58
4.3.1.4. Gly401Asp.....	60
4.3.1.5. Gly684Asp.....	62
4.3.2. Saptanan Bilinen Yanlış Anlamlı Mutasyonlar.....	64
4.3.2.1. Lys19Glu (K19E).....	64

4.3.2.2. Asp453Asn.....	66
4.3.2.3. Pro744Ser.....	68
4.4 Saptanan Eş Anlamli Mutasyonlar.....	70
4.4.1. Saptanan Yeni Eş Anlamli Mutasyonlar.....	70
4.4.1.1. 582 C>T.....	70
4.4.2. Saptanan Bilinen Eş Anlamli Mutasyonlar.....	71
4.4.2.1. 330 C>T.....	71
4.4.2.2. 771 T>C.....	73
4.4.2.3. 1083 A>G.....	74
4.4.2.4. 2286 T>G.....	76
4.5. Transle Olmayan Bölgedeki Mutasyonlar	77
4.5.1. c *45 A>G.....	77
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	79
KAYNAKLAR.....	94
EK.....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	106

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Fibrinolitik sistemin temel bileşenleri.....	9
Şekil 2.2. 6. kromozomda PLG geninin yerleşimi.....	12
Şekil 2.3. PLG ve Apo(a) cDNA'sının yapısal benzerliği.....	14
Şekil 2.4. a. Lignöz konjuktivit ve hidrosefalisi olan bir Türk bebeğin görüntüsü.....	17
b. 4 yaşında bir lignöz konjuktivit hastası kız çocuğunun görüntüsü.....	17
Şekil 2.5. a. Lignöz konjuktivit ve hidrosefalisi olan diğer bir Türk bebeğin görüntüsü.....	17
b. Aynı bebeğe ait beyin bilgisayarlı tomografi görüntüsü.....	17
Şekil 2.6. a. Lignöz dişeti iltihabı olan bir Tip I PLG eksikliği hastasının görüntüsü.....	17
b. Lignöz dişeti iltihabı olan bir Tip I PLG eksikliği hastasının görüntüsü.....	17
Şekil 2.7. PLG molekülünün yapısı ile lignöz konjuktivitli hastalarda tanımlanan mutasyonların yerleşimi.....	26
Şekil 2.8. DHPLC yöntemi ile mutant örneğin saptanması.....	33
Şekil 3.1. DNA izolasyonu yapılan örneklerin agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	39
Şekil 3.2. PCR örneklerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü.....	44
Şekil 3.3. a. Yabancıl tip kontrol örneğinin DHPLC profili.....	44
b. Mutasyon taşıyan hasta örneğinin DHPLC profili.....	44
Şekil 3.4. PLG geni ekzonlarına ait DHPLC profil örnekleri.....	46
Şekil 4.1. PLG geni ikinci ekzonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	50
Şekil 4.2. a. Cys30Ter mutasyonunu taşımayan örneğin DHPLC profili.....	51
b. Cys30Ter mutasyonunu taşımayan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	51
c. Cys30Ter mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DHPLC profili.....	51
d. Cys30Ter mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	51
Şekil 4.3. PLG geni altıncı ekzonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	52
Şekil 4.4. a. +1 IVS6 G>A değişimi taşımayan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	53
b. +1 IVS6 G>A değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	53
c. +1 IVS6 G>A değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	53
Şekil 4.5. PLG geni beşinci ekzonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	54
Şekil 4.6. a. Glu161Lys mutasyonunu taşımayan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	55
b. Glu161Lys mutasyonunu heterozigot durumda taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	55
Şekil 4.7. PLG geni altıncı ekzonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	56
Şekil 4.8. a. Gly199Val mutasyonunu taşımayan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	57
b. Gly199Val mutasyonunu heterozigot durumda taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	57
Şekil 4.9. PLG geni sekizinci ekzonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	58
Şekil 4.10. a. Tyr264Cys mutasyonunu taşımayan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü.....	59
b. Tyr264Cys mutasyonunu homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	59
Şekil 4.11. a. Gly401Asp mutasyonunu taşımayan örneğin DHPLC profili.....	61
b. Gly401Asp mutasyonunu taşımayan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü.....	61
c. Gly401Asp mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DHPLC profili.....	61
d. Gly401Asp mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	61

Şekil 4.12. <i>PLG</i> geni onyedinci ekzonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	63
Şekil 4.13. a. Gly684Asp mutasyonunu taşımayan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü...63	
b. Gly684Asp mutasyonunu homozigot durumda taşıyan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü.....	63
Şekil 4.14. <i>PLG</i> geni ikinci ekzonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	65
Şekil 4.15. a. K19E mutasyonunu taşımayan örneğin DHPLC profili.....	65
b. K19E mutasyonunu taşımayan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü.....	65
c. K19E mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DHPLC profili.....	65
d. K19E mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	65
Şekil 4.16. <i>PLG</i> geni onbirinci ekzonunun agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	67
Şekil 4.17. a. Asp453Asn mutasyonunu taşımayan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü...67	
b. Asp453Asn mutasyonunu homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	67
Şekil 4.18. a. Pro744Ser değişimini taşımayan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü.....	69
b. Pro744Ser değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	69
c. Pro744Ser değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	69
Şekil 4.19. a. 582 C>T değişimini taşımayan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	70
b. 582 C>T değişimini heterozigot durumda taşıyan hastanın DNA dizi analiz görüntüsü.....	70
Şekil 4.20. a. 330 C>T değişimini taşımayan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü.....	72
b. 330 C>T değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	72
c. 330 C>T değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	72
Şekil 4.21. a. 771 T>C değişimini taşımayan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü.....	73
b. 771 T>C değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	73
c. 771 T>C değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	73
Şekil 4.22. a. 1083 A>G değişimini taşımayan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü.....	75
b. 1083 A>G değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	75
c. 1083 A>G değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	75
Şekil 4.23. a. 2286 T>G değişimini taşımayan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü.....	76
b. 2286 T>G değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	76
c. 2286 T>G değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	76
Şekil 4.24. a. c.*45 A>G değişimini taşımayan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü.....	78
b. c.*45 A>G değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü.....	78
Şekil 5.1. <i>PLG</i> geni ekzon-intron yapısı ile saptanan mutasyonların konumu.....	80

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Lignöz konjuktivit hastalarında tanımlanan mutasyonlar ile etik kökenleri...	27
Çizelge 2.2. Displazminojenemi'ye neden olan PLG varyantları.....	29
Çizelge 3.1. Çalışmaya dahil edilen bireylerin akrabalık durumları ve temin edilen merkezler.....	37
Çizelge 3.2. <i>PLG</i> geninin ekzonlarının çoğaltılması için kullanılan primer setleri.....	40
Çizelge 3.3. <i>PLG</i> geninin çoğaltılması için PCR reaksiyonlarında uygulanan koşullar.....	42
Çizelge 3.4. <i>PLG</i> geninin ekzonlarının DHPLC analizi için kullanılan sıcaklık değerleri..	45
Çizelge 4.1. Glu161Lys mutasyon noktasının korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırması.....	56
Çizelge 4.2. Gly199Val mutasyon noktasının korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırması.....	58
Çizelge 4.3. Tyr264Cys mutasyon noktasının korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırması.....	60
Çizelge 4.4. Gly401Asp mutasyon noktasının korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırması.....	62
Çizelge 4.5. Gly684Asp mutasyon noktasının korunmuşluk açısından türler arası karşılaştırması.....	64
Çizelge 5.1 Hasta listesi ile hastaların taşıdığı mutasyonların genotip çizelgesi.....	92

DİZİLER DİZİNİ

Dizi 4.1. <i>PLG</i> geni ikinci ekzonunun dizisi üzerinde Cys30Ter mutasyon noktasının konumu	51
Dizi 4.2. <i>PLG</i> cDNA'sında Cys30Ter değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	51
Dizi 4.3. <i>PLG</i> geni altıncı ekzonunun dizisi üzerinde +1 IVS6 G>A mutasyon noktasının konumu.....	53
Dizi 4.4. <i>PLG</i> geni beşinci ekzonunun dizisi üzerinde Glu161Lys mutasyon noktasının konumu	55
Dizi 4.5. <i>PLG</i> cDNA'sında Glu161Lys değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	55
Dizi 4.6. <i>PLG</i> geni altıncı ekzonunun dizisi üzerinde Gly199Val mutasyon noktasının konumu.....	57
Dizi 4.7. <i>PLG</i> cDNA'sında Gly199Val değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	57
Dizi 4.8. <i>PLG</i> geni sekizinci ekzonunun dizisi üzerinde Tyr264Cys mutasyon noktasının konumu.....	59
Dizi 4.9. <i>PLG</i> cDNA'sında Tyr264Cys değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	59
Dizi 4.10. <i>PLG</i> geni onbirinci ekzonunun dizisi üzerinde Gly401Asp mutasyon noktasının konumu	61
Dizi 4.11. <i>PLG</i> cDNA'sında Gly401Asp değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	62
Dizi 4.12. <i>PLG</i> geni onyedinci ekzonunun dizisi üzerinde Gly684Asp mutasyon noktasının konumu	63
Dizi 4.13. <i>PLG</i> cDNA'sında Gly684Asp değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	64
Dizi 4.14. <i>PLG</i> geni ikinci ekzonunun dizisi üzerinde Lys19Glu mutasyon noktasının konumu.....	65
Dizi 4.15. <i>PLG</i> cDNA'sında Lys19Glu değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	66
Dizi 4.16. <i>PLG</i> geni onbirinci ekzonunun dizisi üzerinde Asp453Asn mutasyon noktasının konumu.....	67
Dizi 4.17. <i>PLG</i> cDNA'sında Asp453Asn değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	68
Dizi 4.18. <i>PLG</i> geni ondokuzuncu ekzonunun dizisi üzerinde Pro744Ser mutasyon noktasının konumu.....	69
Dizi 4.19. <i>PLG</i> cDNA'sında Pro744Ser değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	70
Dizi 4.20. <i>PLG</i> geni altıncı ekzonunun dizisi üzerinde 582 C>T değişiminin konumu.....	71
Dizi 4.21. <i>PLG</i> cDNA'sında 582 C>T değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	71
Dizi 4.22. <i>PLG</i> geni dördüncü ekzonunun dizisi üzerinde 330 C>T değişiminin konumu.....	72
Dizi 4.23. <i>PLG</i> cDNA'sında 330 C>T değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	73
Dizi 4.24. <i>PLG</i> geni yedinci ekzonunun dizisi üzerinde 771 T>C değişiminin konumu.....	74

Dizi 4.25. PLG cDNA'sında 771 T>C değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	74
Dizi 4.26. <i>PLG</i> geni dokuzuncu ekzonunun dizisi üzerinde 1083 A>G değişiminin konumu.....	75
Dizi 4.27. PLG cDNA'sında 1083 A>G değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	76
Dizi 4.28. <i>PLG</i> geni ondokuzuncu ekzonunun dizisi üzerinde 2286 T>G değişiminin konumu.....	77
Dizi 4.29. PLG cDNA'sında 2286 T>G değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi.....	77
Dizi 4.30. <i>PLG</i> geni ondokuzuncu ekzonunun dizisi üzerinde transle olmayan bölgedeki c.*45 A>G değişiminin konumu.....	78

SİMGELER DİZİNİ

ADP	Adenozin Difosfat
apo(a)	Apolipoprotein (a)
Arg	Arjinin
Asn	Asparajin
Asp	Aspartik asit
bç	Baz çifti
CAT	Katalaz
cDNA	Komplementer DNA
C-uç	Karboksi uç
DNA	Deoksiribonükleik asit
DHPLC	Denatüre Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
dk	Dakika
ddNTP	Dideoksinükleozittrifosfat
dNTP	Deoksiribonükleozittrifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
FUCA2	Alfa-L-fukozidaz
GC	Group-specific component
Gln	Glutamin
Glu	Glutamik asit
Glu-PLG	N-uç kısmında glutamik asit taşıyan plazminojen
Gly	Glisin
HepG2	İnsan Hepatoma Hücre Soyusu
HGMD	Human Genome Mutation Database(İnsan Genom Mutasyon Veritabanı)
His	Histidin
HKHT	Hematopoietik Kök Hücre Transplant Alıcısı
Ile	İzolösin
K	Kringle
kb	Kilobaz
kD	Kilodalton
LDL	Düşük Moleküler Ağırlıklı Lipoprotein
Leu	Lösin
Lp(a)	Lipoprotein (a)
Lys	Lizin
Lys-PLG	N-uç kısmında lizin taşıyan plazminojen
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı Ribonükleik asit
N-uç	Amino-uç
OH	Hidroksil
PA	Preaktivasyon Peptiti
PAI-1	Plazminojen Aktivatör İnhibitörü
PAP	Preaktivasyon peptiti
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PLG	Plazminojen
PRGA	Plazminojen İlişkili Gen A
PRGB	Plazminojen İlişkili Gen B
Pro	Prolin

RBC	Red Blood Cell (Kırmızı Kan Hücreleri)
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki devir sayısı
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
Ser	Serin
Serpin	Serin Proteaz İnhibitörleri
TAFI	Trombin-aktive Fibrinoliz İnhibitörü
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
Thr	Treonin
TNP	Tekli Nükleotid Polimorfizmleri
t-PA	Doku Plazminojen Aktivatörü
u-PA	Ürokinaz Plazminojen Aktivatörü
u-PAR	u-PA Reseptörü
UTR	Transle Olmayan Bölge
V	Volt
Val	Valin
vWF	Von Willebrand Faktör
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre

**PLAZMİNOJEN (PLG) GENİNİN DENATÜRE YÜKSEK BASINÇLI SIVI
KROMATOĞRAFI (DHPLC) İLE MUTASYON ANALİZİ ve OLASI
MUTASYONLU ÖRNEKLERİN DNA DİZİ ANALİZİ İLE
DEĞERLENDİRİLMESİ**

1. GİRİŞ

Kalıtsal plazminojen (PLG) eksikliği Tip I (hipoplazminojenemi) ve Tip II (displazminojenemi) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Tip I PLG eksikliği, klinik olarak subepiteliyal fibrin birikimi ve yangından oluşan kronik mukozal psödomembranöz lezyonlarla karakterize bir bozukluktur. Tip I PLG eksikliği, primer görevi fibrin pıhtısının eritilmesi (fibrinoliz) olan plazmin molekülünün inaktif proenzim formu olan PLG'yi kodlayan gende (*PLG*) meydana gelen bir mutasyon sonucu oluşur. 1995'den bu yana çeşitli araştırmacılar *PLG* genindeki homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyonların farklı vücut bölgelerinde çoğunlukla müköz membranları etkileyen nadir görülen bir inflamatuvar hastalığın nedeni olduğunu göstermişlerdir (Mingers vd 1996, Schuster vd 1997, Schott vd 1998, Schuster vd 1999, Schuster vd 2001). Rahatsızlığın en yaygın göstergesi, kırmızılık ve bunu takiben özellikle göz kapağına ait yüzeylede normal mukozanın yerini alan odunsu yapıda beyaz, sarı-beyaz ya da kırmızı kalın kitleler ile karakterize psödomembranlar oluşturan lignöz (odunsu) konjunktivittir. Diğer müköz membranlara ait psödomembran lezyonları ağız, nazofarinks, trake ve dişi genital sisteminde oluşur. Tip II PLG eksikliği ise, özgül bir klinik göstergeyle sonuçlanmamakta ve muhtemelen özellikle Asya ülkelerinde olmak üzere popülasyondaki genel polimorfik değişimleri temsil etmektedir. Lignöz konjunktivit ve psödomembran oluşumu yalnızca Tip I PLG eksikliği ile ilişkilidir (Schuster ve Seregard 2003).

Tip I PLG eksikliği Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika dahil olmak üzere dünyanın dört bir tarafında bildirilmiştir. Tip I PLG eksikliği olgularının çoğunun bildirilmediğini düşünürsek gerçek sıklık tam anlamıyla bilinmemektedir. Hastalığın sıklığı, İngiltere'de %0.26 (Tait vd 1996), İskoçya'da her 1000 kişiden 2.9'unda (Tait vd 1996), Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) %0.35 (Dykes ve Polesky 1988), Güney Alman toplumunda %0.13 (Weidinger vd 1988) ve Japon toplumunda %0.42 (Okamoto vd 2003) olarak belirlenmiştir. Bu verilere bakılarak homozigot ya da birleşik heterozigotların sıklığı 1.6/1 milyon olarak saptanmıştır (Schuster ve Seregard 2003).

Türkiye’de ya da Türklerde tanımlanmış ve bildirilmiş hasta sayısı akraba evlilikleri ve founder etkisiyle ilişkili olarak fazladır (Mehta ve Shapiro 2008). Lignöz konjuktivit Türklerde ilk kez, 1986 yılında iki kardeşte bildirilmiştir (Bateman vd 1986). Sonraki yıllarda lignöz konjuktivit, *PLG* geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan tip I *PLG* eksikliği ile ilişkilendirilmiştir. Lignöz konjuktivitin ilk defa tanımlandığı bu Türk kardeşlerin daha sonraki yıllarda *PLG* genindeki del Lys212 ve Ex17 + 1del-g mutasyonları açısından birleşik-heterozigot oldukları belirlenmiştir (Schuster vd 1999). 1994 yılında ilk defa ileri derecede lignöz konjuktiviti ve konjenital hidrosefalisi olan 18 aylık bir Türk kız çocuğunda, şiddetli kalıtsal tip I *PLG* eksikliği gösterilmiştir (Mingers vd 1996). 1997’de akrabalık ilişkisi olmayan iki Türk kızının lignöz konjuktivit ve okluzif hidrosefali ile ilişkili olarak Arg216His ve Trp597Ter mutasyonlarını homozigot durumda taşıdıkları belirlenmiştir (Schuster 1997). 1998 yılında, Türk akraba ana-babadan doğan *PLG* eksikliği olan bir bebeğin homozigot bir Glu460Stop (E460X) mutasyonu içerdiği gösterilmiştir (Schott vd 1988). 2006 yılında, ağır Tip I *PLG* eksikliği olan 21 Türk hastanın dokuzunda founder etkisini düşündürür şekilde 3 temel plazminojen polimorfizminin [406T>C (91N), 1490A>G (453N/D) ve 2362G>T (743G)] homozigot kombinasyonu saptanmıştır (Tefs vd 2006). Yukarıda bahsi geçen çalışmalar, daha çok olgu raporları ve bu olguların moleküler olarak incelendiği münferit çalışmalardır.

Anadolu coğrafyası, tarih boyunca pek çok uygarlığı bünyesinde barındırdığı için çeşitli kültürlerin kesişim noktası niteliği taşımakta, Asya ile Avrupa'nın birleşim noktasındaki stratejik konumu nedeniyle, tarih öncesi çağlardan beri birçok medeniyetin beşiği olarak tanımlanmaktadır. Türk toplumunun genetik yapısı bu kültürel miras ve akraba evliliklerinin yaygın olması nedeniyle çeşitli gen değişimleri açısından heterojendir. Daha önceki çalışmalarda incelenen olgu gruplarında yer alan Türk hastalarda, tanımlanmış *PLG* gen mutasyonlarının çokluğu dikkat çekmektedir (Schuster 1997, Schott 1998, Schuster 1999, Scully vd 2001, Çiftçi vd 2003, Mehta ve Shapiro 2008). Bununla beraber, literatürde Türk toplumundaki hipoplazminojenemi sıklığı yer almamakta ve sıklık tayini için ek epidemiyolojik çalışmaların yapılması gerektiği vurgulanmaktadır (Çiftçi vd 2003, Mehta ve Shapiro 2008). Bu çalışmada, Tip I *PLG* eksikliği gösteren 16 indeks olgu *PLG* gen mutasyonları açısından incelenmiştir. Literatürde yer alan çalışmalar münferit çalışmalardan olduğundan Türk hastalarla gerçekleştirilmiş bir *PLG* geni mutasyon tarama çalışması yapılmadığı göz önünde bulundurularak, Türk tip I *PLG* eksikliği hastalarında

tüm *PLG* genini tarayarak hastalıkla ilişkili saptanmamış mutasyonları ortaya çıkarmak bu çalışmanın amacını oluşturmaktadır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Hemostaz

Vücutun damar hasarını takiben kan akışını kontrol edebilme yeteneği, yaşamın devamı açısından son derece önemlidir. Endotel bütünlüğünün bozulmasından sonra kan pıhtılaşması ve hasarlı dokunun onarımını takiben pıhtının çözülmesi (fibrinoliz) işlemi “hemostaz” olarak adlandırılır. Hemostaz, sadece kan kaybını ve kan akışında meydana gelen aksaklığı engellemekle kalmaz, aynı zamanda hasarlı dokunun ve damar sisteminin de onarımını sağlar.

Hemostazı sağlayan unsurlar; damar duvarı (özellikle endotel ve subendotel), trombositler ve diğer kan hücreleri, pıhtılaşma faktörleri ile inhibitörleri, fibrinoliz faktörleri ile inhibitörleri, diğer plazma proteinleri (Von Willebrant Faktör, yapıştırıcı proteinler vb.) ve pıhtılaşmayı dengeleyen doğal pıhtılaşma inhibitörleridir (Hans-Jürden Kolde 2001).

Hemostazın damar daralması ile trombosit yapışması ve kümelenmeunu içeren ilk iki basamağı “Primer Hemostaz” olarak adlandırılmaktadır. Fibrin pıhtısı oluşumu ise “Sekonder Hemostaz” adını alır. Primer ve sekonder hemostazı fibrinoliz izler.

Endotel, hemostazda dinamik bir rol üstlenir. Bazı önemli antikoagülanlar ile fibrinolitik molekülleri sentezlemesi yanında çeşitli antikoagülan ve antifibrinolitik proteinlerin tutunabileceği uygun bir yüzey oluşturur. Normal koşullar altında, endotel antitrombotik bir yüzey oluşturur. Bununla birlikte, hemostatik sistemdeki bir aksama veya damar hasarı ya da aterosklerotik hastalık, miyokardi enfarktüsü ve iskemi gibi patolojik olaylar sonucu endotel hücreleri hızla değişime uğrar. Bu değişimler, endotel yüzeyini tromboza yatkın hale getirir (Cooper ve Krawczak 1997).

Hemostaz 4 basamaktan oluşmaktadır:

2.1.1. Damar Daralması (Vazokonstruksiyon)

Damar zedelenmesini takiben ilk kanama önlemi olarak hemen damarlarda daralma meydana gelir. Bu işlem, hasarlı bölgeye kan akışını sınırlar ve kan kaybını en aza indirmeyi amaçlar. Vazokonstruksiyon, otonom sinir sistemi, kas hücreleri ile serotonin, epinefrin, noradrenalin gibi pek çok aracı molekül ile sağlanır. Küçük kan damarlarındaki kanamayı durdurmada vazokonstruksiyon son derece etkili bir mekanizma olmasına karşın, daha geniş damarlardaki kanamayı durdurmada yetersiz kalmaktadır. Bu nedenle, trombosit yapışması, kümelenmesi ve trombus oluşumu gibi diğer mekanizmalara ihtiyaç duyulmaktadır (Hans-Jürden Kolde 2001).

2.1.2. Trombosit Yapışması ve Kümelenmesi

Endotel tabakanın hasarı sonucu subendotelyal kollajenin açığa çıkması trombus oluşumu açısından önemlidir. Kollajen ve trombositler arasındaki etkileşim trombosit yüzeyindeki çeşitli reseptörler (glikoproteinler) aracılığıyla sağlanır. Daha sonraki etkileşimler ise fibrinojen ve Von Willebrand Faktör (vWF) gibi plazma proteinleri ile olur. Yapışma reaksiyonundan sonra trombositler aktive olur, şekil değiştirir ve bünyelerindeki yoğun granüllerden bir takım maddeleri salarlar. vWF, fibrinojen, trombin, adenosin difosfat (ADP), tromboksan A2, serotonin, epinefrin ve arazişonik asit trombositlerin aktivatörleri arasındadır. Bu aktivatörler daha fazla trombositleri ortama davet eder ve trombositlerin birbirine yapışmasını sağlar.

Kümelenme, trombositlerin kollajen ya da trombin gibi çeşitli ajanlarla uyarılmasından sonra oluşan ek bir işlemdir. Yapışma olayında trombositlerin arasındaki etkileşimden çok yapıştırıcı proteinler ve hasarlı damar duvarı rol oynarken, kümelenme olayında trombositler arası etkileşim esastır. Kümelenme sırasındaki bu etkileşim fibrinojen ve vWF tarafından sağlanır. Trombositler, birbirlerine fibrinojen köprüleri ile tutunurlar, böylece hasarlı bölgede geçici ve gevşek bir trombosit tıkaçı oluşturulur ve kanama kısa bir süre için önlenir (A.Ü Tıp Fak 1997, Hans-Jürden Kolde 2001). Trombosit kümelenmesi primer hemostazın son basamağıdır.

2.1.3. Fibrin Pıhtısı Oluşumu

Primer hemostaz sonucu oluşan trombosit tıkaçı sağlam ve kararlı bir yapıda değildir, hemodinamik güçler bu tıkaçı kısa bir süre sonra dağıtır. Dolayısıyla tıkaçın sağlamlaştırılması gerekmektedir ki bu işlem fibrin pıhtısı oluşumuyla sağlanır. Pıhtılaşma işleminin merkezinde, çözünebilir bir plazma proteini olan fibrinojenin çözünmeyen fibrine dönüşümü bulunmaktadır. Pıhtılaşma, bir zimojen aktivasyon reaksiyonu serisi ile oluşur. Her basamakta bir öncül protein (zimojen), bu öncül moleküldeki bir ya da daha fazla peptid bağının kesilmesi yoluyla aktif bir proteaza çevrilir. Dolayısıyla, her basamakta bir proteaz, bir zimojen, non-enzimatik bir protein kofaktörü, kalsiyum iyonları ve organize edici bir yüzey (trombositler) rol oynar. Son oluşturulan proteaz olan trombin çözünebilen bir protein olan fibrinojeni çözünmeyen fibrine çevirir. Trombinin oluşumu, aktif faktör X oluşumu basamağında birleşen intrinsik ve ekstrinsik sistemlerle sağlanır (Mazza 1988). Daha sonra, oluşan fibrin ağı, aktif faktör XIII tarafından katalizlenen kovalent çapraz bağ oluşumuyla sağlamlaştırılır.

Intrinsik yol, hasarlı endotel gibi negatif yüklü fizyolojik olmayan bir yüzeyin kan ile teması sonucu uyarılırken, ekstrinsik yol damar hasarını takiben hasarlı dokudaki hücrelerden açığa çıkan doku faktörü ile uyarılır. Her iki yol da aktif faktör X oluşumu basamağında birleşir (Şekil 1).

2.1.4. Fibrinoliz

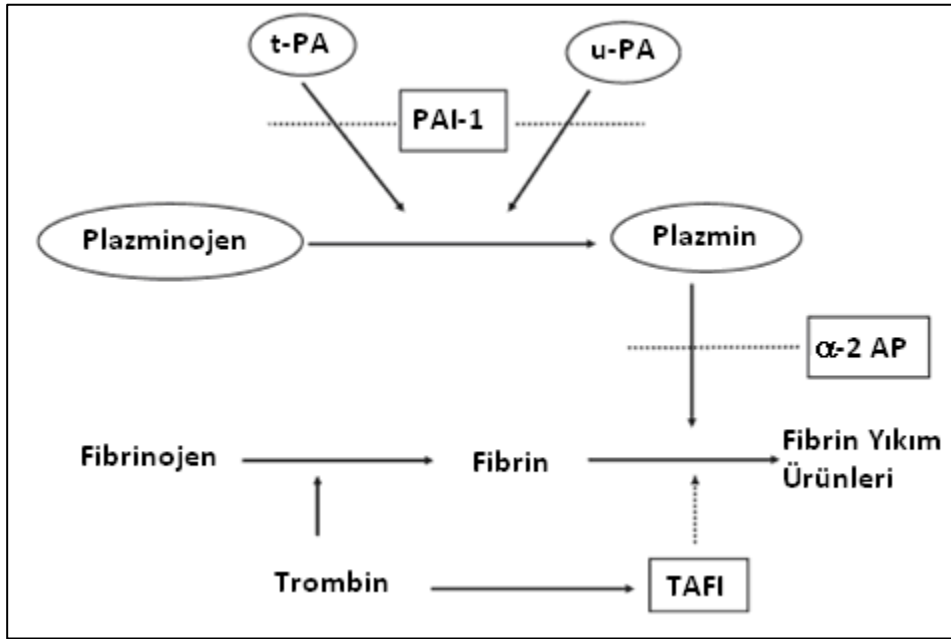
Hemostazın son basamağı, fibrinoliz yani fibrin pıhtısının eritilmesidir. Memeli kanındaki fibrinolitik sistem, kan pıhtılarının çözülmesi ve akışkan bir vasküler sistemin sağlanmasında önemli bir role sahiptir. Pıhtının fizyolojik ve farmakolojik olarak eritilmesi temel olarak bir serin proteaz olan plazmin tarafından gerçekleştirilir. Plazmin, tek zincirli bir proenzim olan plazminojen(PLG)'in PLG aktivatörleri tarafından kesilerek çift zincirli aktif forma dönüştürülmesi sonucu oluşur. Daha sonra plazmin, kan pıhtısını destekleyen fibrin ağını proteolitik olarak parçalar ve sonuçta etkilenen dokuya kan akışını tekrar sağlar (Novokhatny 2008).

Plazmin, öncülü olan PLG'den PLG aktivatörlerinin katalizlediği proteolitik bir reaksiyon sonucu meydana gelmektedir. Kanda immünolojik olarak birbirinden farklı iki fizyolojik PLG aktivatörü tanımlanmıştır, bunlar; doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve ürokinaz plazminojen aktivatörü (u-PA) şeklindedir (Rijken vd 1981) (Şekil 1). Her iki aktivatörün de plazma konsantrasyonu PLG'ye kıyasla 100.000 kat daha düşüktür. t-PA aracılı PLG aktivasyonu, primer olarak fibrinin çözülerek dolaşıma katılmasında görev almaktadır. (Collen ve Lijnen 1991). t-PA aracılığıyla PLG aktivasyonu fibrine ihtiyaç göstermektedir zira PLG ve t-PA, fibrin moleküllerinin pek çok substarata bağlanma özelliğinden sorumlu olan kringle domeynlerinde bulunan lizin-bağlanma bölgelerine tutunurlar (Lerch vd 1980). u-PA, özgül bir hücresele u-PA reseptörü (u-PAR)'ne bağlanarak hücreye bağlı PLG aktivasyonunda artışa neden olmaktadır. u-PA'nın temel görevi doku yeniden şekillenmesi ve onarımı ile makrofaj fonksiyonu, ovulasyon, embriyo aşılması ve tümör istilası sırasında periselüler proteolizisin sağlanmasıdır (Blasi 1993). Plazmin bir kere oluştuğu zaman etkisi, plazminin fibrine kringle aracılı bağlantısından dolayı fibrin yüzeylerle sınırlı kalmaktadır (Lucas vd 1983). Fibrin yüzeylere bağlı plazmin molekülünün yarılanma ömrü, dolaşımdaki plazminle kıyaslandığında iki-üç kat daha uzundur (Wiman ve Collen 1978).

Plazminin dolaşımı, fizyolojik oluşumu ve inaktivasyonunun düzenlenmesi yoluyla engellenir. Pıhtılaşma sisteminin çok basamaklı ve çok geribesleme halkası içeren doğasının aksine, fibrinolitik sistem düzenlenmesi anlamında oldukça sadedir (Novokhatny 2008). Fibrinolitik sistemin düzenlenmesi ve kontrolü, temel bileşenler arasındaki özgül moleküler etkileşimler aracılığıyla ve PLG aktivatörleri ile inhibitörlerinin kontrollü sentez, salınım ve ortadan kaldırılma mekanizmalarıyla başarılmaktadır. Fibrinolitik sistemde yer alan çoğu enzim serin proteazdır. Serin proteazlar aktif bölgelerinde serin, aspartik asit ve histidin'den oluşan bir katalitik üçlü yapısına sahiptirler. Söz konusu aktif bölge, karboksi uç (C-uç) serin proteaz domeyninde bulunmaktadır. Amino-uç (N-uç) bölgesi ise, parmak domeyni (fibronektindeki parmaklara homolog), epidermal büyüme faktörü-benzeri domeyn ve kringle domeyn olarak adlandırılan üçlü ilmik yapısı gibi işlevsel domeynlerden bir ya da birkaçını içermektedir.

Fibrinolitik sistemin temel inhibitörleri serpin (serin proteaz inhibitörleri) enzim ailesinde incelenmektedirler. Serpinler C-uç bölgelerinde, hedef enzim tarafından kesilen özgül bir peptit bağına sahip reaktif merkez ilmiği içerirler. Bu kesim sonucu, inhibitörden bir peptit

ayrılır ve inaktif bir enzim-inhibitör kompleksi oluşur. Kompleksteki enzimin aktif bölgesi bozulur, böylece kesilmiş inhibitörün kompleksten ayrılması engellenmiş olur (Huntington 2000). Fibrinolitik sistemin inhibisyonu, PLG aktivasyonu seviyesinde, temel olarak plazminojen aktivatör inhibitörü (PAI-1) veya trombin-aktive fibrinoliz inhibitörü (TAFI) ile ya da plazmin seviyesinde, temel olarak α 2-antiplazmin ile sağlanmaktadır (Şekil 1). Plazminin önemli inhibitörlerinden biri olan α 2-antiplazmin, plazmada yüksek konsantrasyonda bulunmakta ve kan pıhtısından kaçan serbest plazmini hızlı bir şekilde inaktive etmektedir (Collen 1976, Moroi ve Aoki 1978). TAFI ise, kısmen parçalanmış fibrinin karboksi-uç lizin rezidülerini ortadan kaldırmakta ve böylece fibrinolizin ikinci fazını inhibe etmektedir. Bu mekanizmalar PLG'nin fibrinoliz ve trombolizde önemli düzenleyici görevi olduğunu göstermektedir. (Rijken ve Sakharov 2001). Fibrinolitik sistemdeki bozukluklar, genelde aşırı aktivasyon (örneğin kanamaya yatkınlık) ya da yetersiz aktivasyon (örneğin trombotik problemler) sonucu oluşmaktadır (Booth 1999).



Şekil 2.1. Fibrinolitik sistemin temel bileşenleri görülmektedir. Plasminojen, t-PA ve u-PA tarafından aktive edilerek plazmine dönüştürülür. Bu enzimler de PAI-1 tarafından düzenlenir. Plazmin, fibrinin fibrin yıkım ürünlerine dönüştürülmesinden sorumludur ve α 2-antiplazmin ile ortadan kaldırılır (α 2-AP). Trombin, sadece fibrinojeni fibrine çevirmekle kalmaz fibrin substratını modifiye ederek fibrinolizi önleyen TAFI'yi de aktive eder (Rijken ve Lijnen 2009).

2.2. Plasminojen-Plazmin Özellikleri

PLG, plazmada tek zincirli bir glikoprotein olarak bulunan bir proenzim olup t-PA ve u-PA tarafından plazmin adı verilen iki zincirli aktif forma dönüştürülür (Ichinose vd 1991). Daha sonra plazmin, damar hasarının olduğu bölgede çözünmeyen fibrin pıhtısını parçalayarak fibrinolizi sağlar. Plazminin proteolitik aktivitesinin hücre göçü, inflamasyon ile doku yeniden şekillenmesi, angiogenez, embriyogenez ve yara onarımı gibi bir seri normal ya da patolojik duruma katkısı olsa da (Carmeliet ve Collen 1995) asıl görevi intravasküler trombolizdir. Plazminin temel substratı fibrin olmakla beraber ekstraselüler matriksin çeşitli bileşenleri için de substrat özgülüğüne sahiptir. Bunlar; fibronektin, proteoglikanlar ve jelatin olup plazminin ekstraselüler matriks yeniden şekillenmesi üzerinde de önemli görevleri olduğunu göstermektedir (Schuster vd 2007).

İnsan PLG'sinin aminoasit dizisi 70'li yıllarda belirlenmiştir (Wiman ve Wallen 1975, Wiman 1977, Sottrup-Jensen vd 1978). PLG, 810 aminoasit rezidüsünden oluşan 90,569 kilodalton (kD)'luk tek zincirli bir glikoproteindir (Genecards). 810 aminoasitlik bir peptit

olarak sentezlense de salgılanma sırasında 19 aminoasitlik sinyal peptit kısmı salgılanma sırasında karaciğerde kesime uğratıldığından, olgun formu 791 aminoasit rezidüsünden oluşmaktadır (Forsgren vd 1987). PLG, 24 disülfid köprüsü, 5 homolog kringle domeyni ve Asn289 ile Thr 346 olmak üzere iki glikozilasyon bölgesi içermektedir. Tek zincirli proenzim Arg-560 ve Val-561 arasındaki peptit bağının kırılmasıyla çift-zincirli aktif plazmin molekülüne dönüşür (Robbins vd 1967). Bu özel kesim işlemi, birer serin proteaz olan t-PA ve u-PA aracılığıyla gerçekleşir. Kesim sonucu oluşan plazmin molekülü tripsin benzeri özgülüğü olan iki zincirli disülfid bağlı bir serin proteazdır. Plazmin molekülünün, N-uç ağır zinciri her biri yaklaşık 80 aminoasit rezidüsü içeren 5 tane kringle domeynine sahiptir. Kringle domeynler, plazminin aktivasyon inhibitörleri, aktivasyon stimülatörleri, fizyolojik substratı olan fibrin ve primer inhibitörü olan α 2-antiplazmin ile etkileşimi gibi çoğu özelliğinden sorumlu kısımlardır. PLG kringle domeynleri, plazminojenin fibrine özgül olarak bağlanmasına ve plazminin α 2-antiplazmin ile etkileşimine aracılık eden lizin bağlanma bölgeleri içermektedir. Bu bölgeler fibrinolizin düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar (Collen 1980). Plazmin(ojen)in düşük moleküler ağırlıklı varyantları miniplazmin(ojen) ve mikroplazmin(ojen) olup hafif zincire bağlı olarak sırayla sadece bir kringle domeyni içerir ya da hiç kringle içermezler.

Plazminin C-uç hafif zinciri, tripsine homolog bir serin proteazdır ve His603, Asp646 ve Ser741'den oluşan klasik katalitik üçlüyü içermektedir. Bu bölge, diğer işlemlerde görev alan serin proteazlarla olduğu kadar (örneğin; pankreastaki sindirim enzimleri) kan pıhtılaşmasında rol alan serin proteazlarla da önemli ölçüde aminoasit dizi homolojisi gösterir (Forsgren vd 1987). Pıhtılaşma ve fibrinolizde rol alan serin proteazlar arasındaki homolojiden yola çıkarak Patthy ve arkadaşları bu enzimlerin evrimi üzerine ekzon-karılması varsayımına dayanan bir hipotez önermişlerdir (Patthy vd 1984, Patthy 1985).

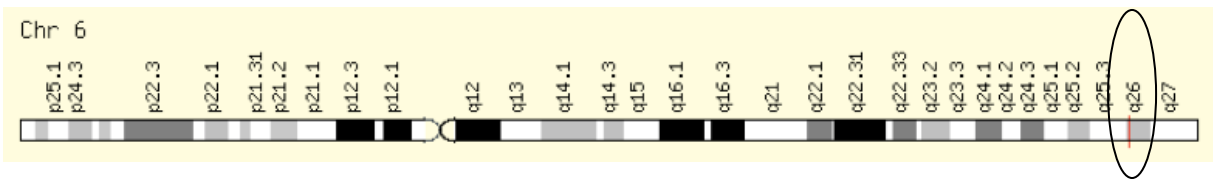
Doğal PLG, Glu- ve Lys- PLG olmak üzere 2 formda üretilir. Glu-PLG, N-uç kısmında glutamik asit içerir ve 2.2 günlük yarılanma ömrüne sahiptir. Alternatifi olan Lys-PLG (N-uç kısmında lizin bulunur) de dolaşımda bulunur fakat daha az konsantrasyondadır ve yarılanma ömrü de 0.8 gündür (Coleman vd 2006). Plazmin, Glu-PLG'yi ağır zincirin Lys76-Lys77 pozisyonunda kesip preaktivasyon peptiti (PA) adı verilen bir amino-uç fragmenti salarak Lys-PLG'e dönüştürür (Wallen 1978). PLG, Glu-PLG formunda üretilip sınırlı plazmik kesim sonucunda temelde lizin olmak üzere lizin, valin ya da metiyonin gibi modifiye formlara kolayca dönüştürülür ve bu PLG varyantları genel olarak Lys-PLG

olarak adlandırılır. Glu-PLG kapalı (sıkı) bir konformasyona sahipken Lys-PLG daha açık (gevşek) bir konformasyona sahip olup PLG aktivatörleri için tercih edilir bir substrat durumundadır (Castellino ve Ploplis 2005). Lys-PLG, PLG aktivatörleriyle daha çabuk aktive olur ve Glu-PLG'e kıyasla daha büyük bir ilgiyle fibrine bağlanır (Castellino ve Powell, 1981).

Pıhtılaşma ve fibrinoliz sistemlerindeki enzimlerin çoğu karaciğerde sentezlenmektedir. PLG de ilk olarak karaciğer dokusunda sentezlenir (Raum vd 1980). Bununla beraber ikincil kaynaklar, farede adrenal bez, böbrek, beyin, testis, kalp, akciğer, uterus, dalak, timus ve sindirim sistemi dokusunda da sentezlendiğini belirtmiştir (Zhang vd 2002). İnsanda kornea PLG sentezi için ekstrahepatik bölge olarak tanımlanmıştır (Twining vd 1999). 1984 yılında insan karaciğer mesajcıRNA (mRNA)'sından PLG için kısmi cDNA klonu oluşturulmuştur (Malinowski vd 1984) daha sonra da insan PLG'si için tam-uzunluklu cDNA klonu oluşturulmuştur (Forsgren vd 1987). Söz konusu çalışmada, tam-uzunluklu klonlarla oluşturulan insan karaciğer cDNA kütüphanesi, bilinen kısmi cDNA dizisinden elde edilen 24 nükleotitlik yapay proplar yardımıyla PLG cDNA'sı için taranmıştır. Çalışma sonucu 12 pozitif klon tanımlanmış ve bunlardan biri detaylı olarak incelenmiştir. 2.7 kilobazlık (kb) eklentinin, kodlama yapan bölgenin tümünü içermekte olduğu belirtilmiştir. 791 rezidülük glikolize olmamış proteininin 88.4 kD'luk moleküler kütleyle sahip olduğu belirtilmiştir. Kesim sonucu, aktif plazminin 63.2 kD'luk ağır ve 25.2 kD'luk hafif zincirden oluştuğu belirtilmiştir. Çalışmada beş pozisyonda, proteinin daha önce tanımlanan aminoasit dizisinden (Sottrup-Jensen vd 1978) farklılıklar saptanmıştır. Bu farklılıklar; olgun proteinin N-uç bölgesinde 65. pozisyonda ekstra bir Ile, 53. ve 342. pozisyonda Glu yerine Gln, 88. pozisyonda Asp yerine Asn ve 453. pozisyonda Asn yerine Asp değişimi olarak belirlenmiştir (Forsgren vd 1987). 1990 yılında fare PLG'sini kodlayan tam-uzunluklu cDNA izole ve karakterize edilmiştir. Araştırmacılar fare PLG'sinin insan PLG'siyle karşılaştırıldığında iki ek aminoasit içerdiği ve insan ile fare PLG'sinin protein ve DNA düzeyinde sırasıyla %79 ve %76 oranında aynı olduğunu belirtmişlerdir (Degen vd 1990).

2.3. Plazminojen Geni

İnsan PLG geni 52,012 baz uzunluğunda olup altıncı kromozomun uzun kolu üzerinde 6q26 pozisyonunda yer almaktadır (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLG&search=PLG>, 2011) (Şekil 2.2). 19 ekzon içeren *PLG* geninin bugüne dek 13 transkripti tanımlanmıştır. En uzun aminoasit dizisine sahip transkript 2741 bazçifti(bç) uzunluğunda olup 810 aminoasitlik olgunlaşmamış PLG proteinini kodlamaktadır (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192, 2011).



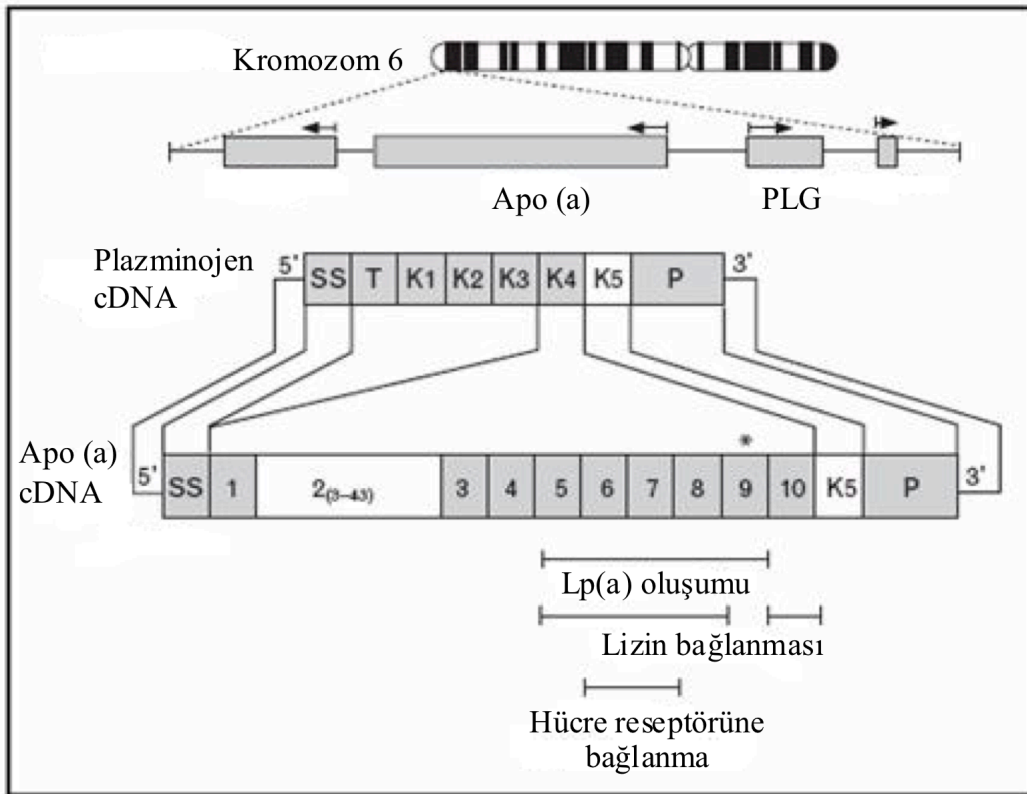
Şekil 2.2. 6. kromozomda PLG geninin yerleşimi (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PLG&search=PLG>)

1983 yılında *PLG* ve diğer 35 işaretçi gen arasında hiçbir bağlantı saptanamamıştır (Bissbort vd 1983). 1984 yılında, *FUCA2* (alfa-L-fukozidaz) ve *PLG* bağlantı analizinde bu iki genin sıkı bağlantılı olduğu belirtilmiştir. Ayrıca araştırmacılar, *PLG*-sisteminin kendi gözlemlerine göre GC (Group-specific component) ile bağlantılı olduğunu ve bu nedenle dördüncü kromozomun kısa kolu üzerinde yer aldığını önermişlerdir (Eiberg vd 1984). *PLG*'nin 4.kromozomda lokalize GC geni ile olan bağlantı analizi sonucu kadınlarda elde edilen pozitif lod skor değerine karşın erkeklerde elde edilen negatif lod skor değeri, bu bağlantının doğru olduğu konusunda soru işareti oluşturmuştur (Bissbort vd 1983). Bunun yanı sıra, diğer birkaç çalışma da *PLG*'nin 4. kromozom üzerindeki olası lokalizasyonu için negatif ya da en azından zayıf pozitif kanıt sağlamıştır (Falk vd 1985, Buetow vd 1985, Marazita 1985). 1985 yılında *PLG* geni altıncı kromozom üzerinde haritalanmış ve genin dördüncü kromozom üzerinde olduğu yönündeki tez çürütülmüştür (Murray vd 1985). Aynı yıl in situ haritalamada DNA probları kullanılarak *PLG* geninin 6q25-q27 bölgesinde lokalize olduğunu gösterilmiştir (Swisshelm vd 1985). 1987'de *PLG* lokusu somatik hücre hibritleri ve in situ hibridizasyon yöntemleri kullanılarak 6q26-q27 bölgesinde (Murray vd 1987) 1994'de ise flörosan in situ hibridizasyon yöntemi ile 6q26 lokusunda haritalanmıştır (Rao vd 1994).

İnsan *PLG* geninin yapısı ve organizasyonu, normal bireylerden elde edilen lökosit DNA'sının invitro amplifikasyonu ve üç farklı insan genom kütüphanesinden elde edilen farklı klonların izolasyonu yöntemlerinin kombinasyonu ile 1990 yılında belirlenmiştir. Bu klonlar restriksiyon haritalama, southern blot ve DNA dizi analizi yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Çalışma verileri, insan *PLG*'sini kodlayan genin 52,5 kilobaz (kb)'lık bir alana yayılmış olduğunu ve 18 intronla ayrılan 19 ekzon içerdiğini göstermiştir. Ekzonlar 75 bç'den 387 bç'e kadar değişebilen büyüklükte olup en büyük ekzon ondokuzuncu ekzondur. DNA dizi analiz sonuçları beş kringle yapısının iki ekzon tarafından kodlandığını göstermiştir. İtronlardaki intron-ekzon sınırında bulunan nükleotitler diğer ökaryotik genlerde olduğu gibi GT-AG analogudur. *PLG* mRNA'sında üç poliadenilasyon bölgesi belirlenmiştir. Çalışmada, *PLG* genomik DNA ve cDNA'sından elde edilen aminoasit dizisi ile plazma proteininin aminoasit sekans analizi ile belirlenen dizisini karşılaştırılmış ve polipeptit zincirinin bazı pozisyonlarında belirgin bir aminoasit polimorfizmi gözlenmiştir. Amplifiye genomik DNA ve genomik klonların nükleotit dizi analizi, *PLG* geninin özellikle Lipoprotein (a) (Lp(a)) bileşenlerinden apolipoprotein (a) (apo(a)) olmak üzere diğer birkaç proteinle yakın ilişkili olduğunu göstermiştir (Petersen vd 1990).

Lp(a), plazmadaki konsantrasyonu aterosklerozis ile ilişkili olan düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) benzeri bir lipoproteindir. Lp(a), *PLG* benzeri bir protein olan apo(a)'ya disülfid köprü ile kovalent olarak bağlanmış apo-B100'den oluşmaktadır (Utterman 1989). *PLG*'nin ardından, karaciğer cDNA kütüphanesinden insan apo(a)'sının klonlanması ve sekanslanması sonrası elde edilen aminoasit dizisinin analizi, apo(a) ve *PLG* arasında dikkat çekici bir homoloji olduğunu göstermiştir. Apo(a)'nın, *PLG* kringle-4 (K4)'ün çok sayıda tekrarlayan kopyası ile tek kopya *PLG* kringle 5 ve *PLG* ile %94 oranında benzerlik gösteren *PLG* serin proteaz domeyni içermekte olduğunu gösterilmiştir (McLean vd 1987) (Şekil 3). İlginç olarak, apo(a)'daki proteaz domeyni *PLG* aktivatörleri tarafından kesilmeyi engelleyen ve aktif bölgenin deformasyonuna neden olan kritik aminoasit değişimleri ve delesyonları içermesi sebebiyle katalitik olarak inaktiftir (Gabel ve Koschinsky 1995). de la Peña-Díaz ve arkadaşlarına göre bu yapısal homoloji Lp(a)'ya fibrine ve monositler ile endotel hücrelerin membran proteinlerine bağlanma kapasitesi sağlar, bu durum *PLG*'nin söz konusu yüzeylere bağlanamaması ve plazmin oluşumunun inhibisyonuna neden olur (de la Peña-Díaz vd 2000). 1987 yılında insan apo(a) geninin insan *PLG* geniyle önemli ölçüde benzerlik gösterdiği ve aynı zamanda her iki genin de

6q27'de lokalize olduğu saptanmıştır (McLean vd 1987). 1989 yılında üç iki-kuşak aile çalışmasında, 18 mayozun hiç birinde iki gen arasında rekombinasyona rastlanmamıştır ki bu durum da Lp(a) ve PLG lokusu arasındaki sıkı bağlantıyı teyit eder niteliktedir (Lindahl vd 1989). 1995'de in situ hibridizasyon ve genetik çalışmalarına göre PLG ve apo(a)'yı kodlayan genlerin bağlı oldukları ve 6. kromozom üzerinde 6q26-27 bandında lokalize oldukları belirtilmiştir. Aynı araştırmacılar 1995 yılında PLG ve Lp(a) genleri ile apo(a)-benzeri ve plazminojen-benzeri genlerin oryantasyon ve göreceli pozisyonlarını gösterdikleri bir çalışma yayınlamışlardır. Böylece PLG ve Lp(a) genlerinin ters yönde transkribe olduğunu göstermişlerdir (Magnaghi vd 1995). apo(a) geninin, PLG geninin duplikasyonu ve ekzon-karılması yolu ile evrimleşmiş olabileceği önerilmiştir (Patthy vd 1984).



Şekil 2.3. PLG geni 5 farklı kringle domeyni içermektedir (K1-K5). Bunlardan K4 ve K5 olmak üzere ikisi *apo(a)* geninde de mevcuttur. K4 domeyni *apo(a)* geninde çok sayıda tekrara sahiptir. Apo(a) ve plazminojen arasındaki bu genetik yapı benzerliği plazminojen aktivitesini inhibe ederek trombotik durumlara neden olabilir (apolipoprotein(a)=apo(a); lipoprotein(a)=Lp(a); plazminojen=PLG) (Hobbs ve White 1999).

Lp(a) hem plazminojen aktivasyonunu inhibe ederek fibrinolizi azalttığı hem de ekstrinsik yol inhibisyonunu azaltarak pıhtılaşmayı arttırdığı için fibrinolizi azaltmaktadır. Lp(a)'nın plazma seviyesindeki artış koroner arter hastalıkları gibi aterosklerotik rahatsızlıkların oluşumu için bir risk faktörüdür (Marcovina ve Koschinsky 2002). Lp(a), fibrinolizdeki (tPA)-aracılı PLG aktivasyonu üzerine etki etmekte ve in vivo'da pıhtılaşmaya meyilli bir durum oluşturmaktadır. Lp(a) fonksiyonunun potansiyel anahtarı, bazı apo(a) kringle4-benzeri domeynler içinde lizin bağlanma bölgelerinin bulunması ve bu domeynlerin apo(a)/Lp(a)'nın biyolojik substratlar ile etkileşimine aracılık etmesinin altında yatıyor olabilir. Son zamanlardaki yayınlara göre PLG aktivasyonunun apo(a) tarafından inhibisyonu, apo(a) ve PLG'nin fibrin üzerindeki bağlanma bölgeleri için yarışından ziyade, apo(a)'nın t-PA, PLG ve fibrin üçlüsü ile etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Daha küçük apo(a) izoformları içeren Lp(a) türleri fibrine daha büyük istekle bağlanırlar ve plazminojen aktivasyonu için daha etkili inhibitörlerdir (Marcovina ve Koschinsky 2002).

2.4. Kalıtsal Plazminojen Eksikliği

Kalıtsal PLG eksikliği insanda ikiye ayrılır: (i) gerçek PLG eksikliği (Tip I ya da hipoplazminojenemi), (ii) Tip II (displazminojenemi). İlkinde hem immünoreaktif PLG seviyesi hem de fonksiyonel aktivite azalmıştır, ikincisinde immünoreaktif PLG seviyesi normal ya da hafif azalmışken fonksiyonel aktivite belirgin ölçüde azalmıştır.

2.4.1. Tip I Plazminojen Eksikliği (Hipoplazminojenemi)

Tip I PLG eksikliği, *PLG* geninde meydana gelen homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyonlar sonucu oluşur. Konjenital PLG eksikliği klinik olarak, subepitelial fibrin birikimi ve yangıdan oluşan kronik, mukozal psödomembranöz lezyonlarla karakterize nadir otozomal çekinik bir bozukluktur. 1995'den bu yana, çeşitli araştırmacılar tarafından homozigot ya da birleşik heterozigot Tip I PLG eksikliğin farklı vücut bölgelerinde çoğunlukla müköz membranları etkileyen nadir görülen bir inflamatuvar hastalığın nedeni olduğu gösterilmiştir (Mingers vd 1996, Schuster vd 1997, Schott vd 1998, Schuster vd 1999, Schuster vd 2001). Rahatsızlığın en yaygın göstergesi, kırmızılık ve bunu takiben özellikle göz kapağına ait yüzeylerde normal mukozanın yerini alan odunsu yapıda beyaz, sarı-beyaz ya da kırmızı kalın kitleler ile karakterize psödomembranlar oluşturan lignöz (odunsu) konjunktivittir. Hastaların %51'inde her iki göz de rahatsızlıktan etkilenmektedir.

Tabloya korneanın da katıldığı %26-30 kadar hastada (Pfannkuch vd 1987) skarlaşma, damarlanma, keratomalazi ve korneal perforasyon sonucu körlük görülmektedir. Hastalığın süresi birkaç aydan 44 yıla kadar değişmektedir (Verhoeff 1958, Hidayat ve Riddle 1987, Pfannkuch vd 1987). Lezyonlar yerel yaralanmalarla ve/veya enfeksiyon ile tetiklenebilir ve çoğu kez lokal eksizyondan sonra tekrarlar. Diğer müköz membranlara ait psödomembran lezyonları ağız, nazofarinks, trake ve dişi genital sisteminde oluşur (Schuster ve Seregard 2003). Şiddetli etkilenen bireylerde prognoz kötüdür ve tedavi seçenekleri sınırlıdır. Çoğu olguda bebekler ya da çocuklar etkilenmiş görünmektedir fakat hastalık herhangi bir yaşta ortaya çıkabilmektedir (Doğumdan 85 yaşına kadar). Ciddi hipoplazminojenemisi olan hastaların %12'sinden fazlasında konjenital okluzif hidrosefali görülmektedir (Schuster vd 2007).

Tüm vücut sıvılarının fibrinolitik aktivitesi fibrin depozitlerini temizlemektedir. Göz yaşında kornea tarafından salınan PLG aktivatörleri, zimojen PLG'yi korneayı hızlı bir şekilde fibrin depozitlerinden temizleyen fibrinolitik enzim plazmine dönüştürür (Mirshahi vd 1996). Plazmin aktivite eksikliği lignöz konjunktivit hastalarında ve *PLG* geni hedefli olarak bozulmuş farelerde tipik olarak görülen, fibrinden zengin visköz ya da membranöz materyal oluşumu ile sonuçlanır (Carmeliet vd 1997, Drew vd 1998, Kao vd 1998). İnflamatuar hücre ve fibroblastların aktivasyonu ile kombine inflammatuar reaksiyon, fibrinin kuruması sonucu konjunktival lezyonun odunsu bir görünüm almasını sağlar. PLG ve fibrinojen eksikliğinin birleşimi olan çift-gen knock-out fare modelinde korneal fibrin birikimi, ilişkili inflammatuar reaksiyonlar engellenmiş ve normal yara onarımı sağlanmıştır (Bugge vd 1996, Drew vd 1998, Kao vd 1998). Benzer reaksiyonlar, etkilenen diğer vücut bölgelerinde de oluşur. Trakebronşiyal fibrin depozitleri trakeobronşiyal sistemin kirpiksi mekanizmasını bozarak enfeksiyon gelişimine neden olur, bu da hastaların çoklu sinobronşiyal enfeksiyona yakalanmalarına uygun ortam hazırlar. Kulakta oluşan durum da (Marcus vd 1990) orta kulaktaki fibrin birikimine atfedilebilir. Okluzif hidrosefalinin patofizyolojik mekanizması, serebral ventrikular sistemde fibrin birikimine bağlı olabilir ki bu da beyindeki sıvı dolaşımını bozabilir (Schott vd 1998).



a.



b.

Şekil 2.4. a. Lignöz konjunktivit ve hidrocefalisi olan bir Türk bebek (Schott vd 1998) **b.** 4 yaşındaki bir lignöz konjunktivit hastası kız çocuğu (Schuster ve Seregard 2003)



a.



b.

Şekil 2.5. a. Lignöz konjunktivit ve hidrocefalisi olan bir Türk bebek (Çiftçi vd 2003) **b.** Aynı bebeğin beynine ait şişmiş ventrikülleri gösteren bilgisayarlı tomografi görüntüsü (Çiftçi vd 2003)



a.



b.

Şekil 2.6. a. Tip I PLG eksikliği hastalarında görülen lignöz dişeti iltihabı sergileyen bir hasta (Schuster ve Seregard 2003) **b.** Tip I PLG eksikliği hastalarında görülen lignöz dişeti iltihabı sergileyen diğer bir hasta (Mehta ve Shapiro 2008)

Konjenital heterozigot hipoplazminojenemi nadir görülmektedir ve ilk defa 1982 yılında tromboembolik hastalığı olan bir hastada tanımlanmıştır (Hasegawa vd 1982). Daha sonraki bazı olgu raporları ve aile çalışmaları heterozigot hipoplazminojeneminin venöz tromboz için bir risk faktörü olduğunu belirtmişlerdir (Lottenberg vd 1985, Dolan vd 1988, Leebeek vd 1989). Fakat son zamanlarda yapılan üç büyük, epidemiyolojik araştırma sonuçları, heterozigot hipoplazminojeneminin venöz tromboz için bir risk faktörü olmadığını göstermiştir (Shigeyiko vd 1992, Tait vd 1996, Demarmels vd 1998). 5 çalışmanın (Dolan vd 1988, Shigekiyo vd 1992, Sartori vd 1994, Tait vd 1996, Biasiutti vd 1997) verilerine bakıldığında heterozigot PLG eksikliği bulunan aile üyelerinde tromboz öyküsü sıklığı kontrollerle kıyaslandığında sırasıyla %6,8 ve %3,5 olup aradaki fark istatistik olarak anlamlı değildir (Brandt 2002). Hipoplazminojenemi'nin venöz tromboz için bir risk faktörü olmadığını destekleyen ikinci bir veri ise ciddi homozigot ya da birleşik heterozigot hipoplazminojenemisi olan en azından 63 hastanın hiç birinde derin ven trombozuna rastlanmamasıdır (Schuster vd 1997, Schott vd 1998, Schuster vd 1999, Schuster vd 2001, Tefs vd 2006). Ek olarak Plg +/- farelerin de geniş damarlarında tromboz saptanmamıştır (Drew vd 1998). Fibrinolitik sistemin anahtar zimojenindeki ciddi bir eksiklik olmasına karşın, lignöz konjuktivit hastalarında intravasküler tromboembolik bir olaya rastlanmaması oldukça ilginçtir (Schuster vd 1997). Tam PLG eksikliğinde dahi neyin damar sistemini trombozdan koruduğu spekülasyon olarak kalmaktadır. PLG-yoksun farelerle yapılan deneylerde sekiz saatten sonra %10 hızla spontan pıhtı çözülmesi görülmektedir (Lijnen vd 1996) ki bu durum plazmin yerine diğer fibrinolitik proteazların fonksiyonunu göstermektedir. Veriler damar içindeki fibrinin çözülmesi için damar dışı bölümlerde aktif olmayan alternatif PLG-bağımsız bir sistemin varlığını (katepsinler, elastazlar ya da matriks metalloproteinazlar gibi) düşündürmektedir. Verilerin tümü, heterozigot ya da homozigot/birleşik heterozigot hipoplazminojeneminin hiçbirinin derin ven trombozu için bir risk faktörü olmadığını göstermektedir. Bununla beraber, beyin omurilik sıvısı şantları gibi implante kateterlerdeki trombotik tıkanmaların ciddi hipoplazminojenemik hastalarda önemli ölçüde arttığı gözden kaçırılmamalıdır (Schuster vd 2007).

Psödomembran konjuktiviti ilk olarak 1847 yılında, 46 yaşında bilateral psödomembranöz konjuktiviteli bir erkek hastada tanımlanmıştır (Bouisson 1847). Birkaç yıl sonra 1854'de Von Graefe özel ismini kullanmasa da lignöz konjuktivitten bahsetmiştir (Von Graefe 1854). 1924 yılında psödomembranöz konjuktivitin histolojik tanımı yapılmıştır (Lijo'

Pavı'a 1924). Lignöz konjuktivit lezyonları esasen tekrar eden granülasyon dokusunu içerdiği için kronik konjuktivit bu türü bazı yazarlar tarafından geçici olarak "kronik granülomatoz psödomembranöz konjuktivit" olarak isimlendirilmiştir (Saubermann 1949). Verhoeff ise "palpebral konjuktivanın tekrarlayan psödomembranöz granülomasi" olarak isimlendirmiştir (Verhoeff 1958). Yaygın olarak kullanılan lignöz konjuktivit (Latince: conjunctivitis lignosa) terimi ilk defa 1933 yılında karakteristik odun-benzeri yapıya sahip bilateral tekrarlayan konjuktival psödomembranlara sahip 3 yaşındaki bir kız çocuğunda tanımlanmıştır (Borel 1933-1934). Lignöz konjuktivit hastalarının çoğu diğer müköz membranlarda da benzer psödomembranlar oluşturduklarından, bu klinik durumun sistemik karakterine uygun olarak "psödomembranöz hastalık" terimi önerilmiştir (Mingers vd 1997).

Borel, lignöz konjuktivit ailesel tekrarından bahseden ilk araştırmacıdır (Borel 1933-1934). Daha sonra, birkaç rapor lignöz konjuktivit otozomal çekinik tarzda kalıtım gösterdiğinden bahsetmiştir (Bateman vd 1986). İlk defa şiddetli kalıtsal tip I PLG eksikliği ileri derecede lignöz konjuktiviti ve konjenital hidrosefalisi olan 18 aylık bir Türk kız çocuğunda 1994 yılında gösterilmiştir (Mingers vd 1996). 1997'den bu yana lignöz konjuktivit hastalarında yaygın olarak görülen çeşitli birleşik heterozigot ve homozigot mutasyonlar tanımlanmış ve rahatsızlığın otozomal çekinik karakterde kalıtıldığı teyit edilmiştir (Schuster vd 1997, Schott vd 1998, Schuster vd 1999, Schuster vd 2001). Hastalık otozomal çekinik karakterde kalıtıldığı halde, yayınlara göre kadınlarda erkeklere göre 1.4:1 ile 2:1 arasında değişen oranda daha sık görülmektedir (Schuster vd 1997, Schott vd 1998, Schuster vd 2001, Schuster vd 2001, Schuster ve Seregard 2003, Tefs vd 2006). Bunun nedeni hormonlar gibi bilinmeyen bir takım nedenler olabilir (Schuster ve Seregard 2003). 1998'de şiddetli lignöz konjuktiviti olan bir çocukta PLG'nin tekrarlayan dozlarla yerine konmasının lignöz psödomembranları tamamen çözdüğü bildirilmiştir (Schott vd 1998). 2002'de topikal PLG uygulamasıyla lignöz konjuktivit etkin tedavisinin sağlanabildiği bildirilmiştir (Watts vd 2002).

Dünya çapında 1847'de ilk olgu bildiriminden bu yana 150'den fazla hasta bildirilmiştir (Lecame vd 2001, Schuster ve Seregard 2003). Hyaluronidaz göz damlaları, kortikosteroidler, siklosporin ve antiviral ajanlarla tedavi uygulamaları genelde hayal kırıklığı yaratmıştır (Francois ve Victoria-Troncoso 1968, Firat 1974, Babcock vd 1987, Nussgens ve Roggenkamper 1993, Schwartz ve Holland 1995). Cerrahi müdahale çoğu kez

psödomembranların daha hızlı tekrarlamasını sağlamıştır (Chambers vd 1969, Fırat 1974, Cooper vd 1979, Hidayat ve Riddle 1987, Schwartz ve Holland 1995). Antifibrinolitik ajan Traneksamik asit ile muamele sonucu diş eti lezyonları ve peritoneal lezyonlarla birlikte lignöz konjuktivit tablosu ortaya çıkmıştır, traneksamik asit PLG'nin kringle-domeynlerindeki lizin-bağlayıcı bölgeleri bloke eder ve fibrin(ojen)-PLG kompleksinin ayrılmasına neden olur (Diamond vd 1991). Bu tablo, lignöz konjuktivit patogenezinde fonksiyonel PLG eksikliğinin merkezi rolüne işaret etmektedir.

Sporadik lignöz konjuktivit olgularının çoğunun bildirilmediğini düşünürsek gerçek sıklık tam anlamıyla bilinmemektedir. İngiltere'deki geniş bir epidemiyolojik çalışmada Tip I PLG eksikliğinin sıklığı %0.26 olarak saptanmıştır (Tait vd 1996). İskoçya'da 9000'den fazla kan vericisinin incelenmesi sonucu, asemptomatik olarak her 1000 kişiden 2.9'unda heterozigot kantitatif PLG-eksikliği (Tip I) bildirilmiştir (Tait vd 1996). Bu verilere bakılarak homozigot ya da birleşik heterozigotların sıklığı 1.6/1 milyon olarak belirlenmiştir (Schuster ve Seregard 2003). Heterozigot PLG eksikliği sıklığı çeşitli araştırmacılar tarafından ABD'de %0.35 (Dykes ve Polesky 1988), Güney Alman toplumunda %0.13 (Weidinger vd 1988) ve Japon toplumunda %0.42 (Okamoto vd 2003) olarak belirlenmiştir. Bununla birlikte, sıklığın daha iyi belirlenmesi için ek epidemiyolojik çalışmalar gerekmektedir. Rahatsızlığın belirtilerinin zamanla artması ya da azalması, aynı aile içinde olsa bile etkilenen bölgenin kişiden kişiye değişmesi ve tedavinin hastaya disiplinler arası yaklaşımı gerektirmesi gibi çeşitli nedenler sıklık çalışmalarını zorlaştırmaktadır. Kantitatif PLG eksikliği Avrupa, Asya ve Kuzey Amerika dahil olmak üzere dünyanın dört bir tarafında bildirilmiştir. Türkiye'de ya da Türk hastalarda tanımlanmış ve bildirilmiş hasta sayısı muhtemelen akraba evlilikleri ile founder etkisiyle ilişkili olarak fazladır (Mehta ve Shapiro 2008).

Türklerde ilk defa, 1986 yılında lignöz konjuktivitli bir erkek ve kız kardeş bildirilmiştir (Bateman vd 1986). Araştırmacılar, dokuz etkilenmiş kardeşin daha raporlarına ulaşmışlardır ki bu durum parental akrabalık olmamasına rağmen otozomal çekinik kalıtımı düşündürmektedir (Bateman vd 1986, Cohen 1990).

İleri derecede lignöz konjuktiviti ve konjenital hidrosefalisi olan 18 aylık bir Türk kız çocuğu, 1994 yılında şant tıkanmasına bağlı olarak hastaneye kaldırılmış ve bunu hidrosefalinin dekompenzasyonu izlemiştir. İlginç bir şekilde, çocukta ne PLG antijen

seviyesi ne de PLG aktivitesi saptanabilmiştir. Bu olgu ciddi homozigot PLG eksikliğinin ilk raporu niteliğindedir (Mingers vd 1996). Daha sonra bu olguya ek olarak aynı şekilde ciddi PLG eksikliği ve oküler rahatsızlığı taşıyan 2 olgu daha saptanmış ve 1997’de PLG eksikliğiyle ilişkili lignöz konjuktivit ve diğer müköz membranlara ait ek psödomembran lezyonları içeren üç bağlantısız aile olarak, aynı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Mingers vd 1997). Hastalık, plazmin tarafından yıkım olmadığı için müköz membranların içine büyük miktarda fibrin birikimi ile karakterizedir. Hastalardan ikisine damar içi PLG verilmesi normal PLG aktivitesi sağlamıştır, bu durum önemli bir klinik gelişme olmamasına rağmen nedenin PLG eksikliği olduğunu göstermektedir (Mingers vd 1997).

1997’de akrabalık ilişkisi olmayan iki Türk kızında lignöz konjuktivit ve okluzif hidrosefali bildirilmiştir (Nüssgens ve Roggenkämper 1993, Schuster vd 1997). Her iki hastada da ciddi PLG eksikliği mevcuttur. İlk hastanın ebeveynleri ve ablası klinik olarak sağlıklıdır. Ailede venöz trombozla ilişkili hiçbir durum saptanmamıştır. Hasta dört aylıkken ilk olarak kronik bilateral konjuktivit geliştirmiştir. Çocuğun okluzif internal hidrosefalisi olduğu belirlenmiş ve ventrikuloatrial şant yerleştirilmiştir. 3 yaşındayken psödomembranlar her iki gözden de cerrahi ile uzaklaştırılmış fakat cerrahi operasyonlardan sonra tablo tekrarlamıştır. 8 yaşında hyaluronidaz-içeren göz damlaları ile lokal tedavi oldukça faydalı olmuştur. İkinci hastanın ebeveynleri akraba olup, ailesinin hiçbir üyesinde venöz tromboz öyküsü bulunmamaktadır (Mingers vd 1997). 34. gebelik haftasında ultrasonda konjenital makrosefali ve hidrosefali saptanmıştır. Dünyaya geldiği ilk gün, kraniyal ultrasonda Dandy-Walker malformasyonu saptanmış ve ventrikulo-peritoneal şant yerleştirilmiştir. 4 haftalıkken hem alt hem de üst göz kapaklarında psödomembranöz konjuktivit geliştirmiş ve tekrarlayan trakeobronşit geçirmiştir. 18 aylık olana kadar tekrarlayan trombotik tıkanmalar nedeniyle 8 kere şant değişimi yapılmıştır. Konjuktival psödomembranların tekrarlayan cerrahi operasyonlarla alınması, steroid, siklosporin, hyaluronidaz ve kromolin ajanlarının topikal uygulaması, geçici ve kısa süreli iyileşme sağlamıştır. Hasta 2 yaş 10 aylık olduğunda kendi başına oturabiliyor ve ayakta durabiliyor fakat yürüyemiyor durumdadır, hiç konuşamamıştır. 3 yaşında bronkopnömoni geçirmiş ve 3.5 yaşında ani şant tıkanması ile komaya girmiş ve geri dönüşümsüz beyin hasarı nedeniyle ölmüştür. Genetik analizler ilk hastanın PLG geninde Arg216His (R216H) ve ikinci hastanın ise Trp597Ter (W597X) mutasyonunu homozigot olarak taşıdığını göstermiştir. PLG molekülünün ikinci kringle’ını kodlayan bölgede meydana gelen Arg216His mutasyonunu taşıyan hastanın sağlıklı kız kardeşi ve ebeveynlerinin söz

konusu değişimi heterozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir. PLG'nin proteaz domeynini ortadan kaldıran Trp597Ter mutasyonunu taşıyan hastanın, sağlıklı akrabalarının aynı mutasyonu heterozigot olarak taşıdığı fakat babasının ikinci allelinde aynı kodondaki başka bir mutasyon olan Trp597Cys mutasyonunu taşıdığı saptanmıştır (birleşik heterozigot). Babanın PLG değerleri heterozigot aile bireyleriyle kıyaslandığında belirgin ölçüde düşüktür. Bu sonuçlar, lignöz konjuktivitinin otozomal-çekinik tarzda kalıtıldığını teyit eder niteliktedir. Bu mutasyonların sonucunda, mRNA transkripsiyonu ve/veya mutant PLG allelinin mRNA'sının yarı ömrü önemli ölçüde azalmış olabilir. İkinci bir olasılık, karaciğerin dolaşımdan hızlı bir şekilde uzaklaştırılan güdük PLG molekülü sentezlediğidir. Üçüncü bir olasılık ise, mutant PLG molekülünün salgılanmasındaki aksaklıktır. Nitekim, bu son mekanizma Ser572Pro mutasyonunun neden olduğu Tip I PLG eksikliği için genetik mühendislik tekniklerinin kullanıldığı bir çalışmada gösterilmiştir (Azuma vd 1997). Aynı şekilde R134K, delK212, R216H, P285T, P285A, T319_N320insN, ve R776H şeklindeki PLG mutantlarının salgılanmasında da ciddi ölçüde aksaklık ve PLG'nin yıkımında artış olduğu in vitro olarak saptanmıştır (Tefs vd 2006).

1998 yılında, Türk akraba ana-babadan doğan PLG eksikliği olan bir bebek bildirilmiştir. Prenatal ultrason incelemesi ilerleyen internal hidrosefali olduğunu göstermiş ve bebek isteğe bağlı olarak 35. gebelik haftasında sezaryen ile alınmıştır. Doğumdan 3 gün sonra, aşırı salgılama ve psödomembran oluşumu ile birlikte konjuktivanın göz kapağına ilişkin kısmında bilateral inflamasyon gelişmiştir. 2 hafta içinde konjuktival bölgede, üst ve alt göz kapaklarının iç bölgesinden yayılan ve her iki gözü de tamamen kaplayan kalın, sarımsı-beyaz, fibröz, odunsu psödomembran tabaka gelişmiştir. Psödomembranlar birkaç defa cerrahi işlemlerle alınmış fakat tekrar hızlı bir şekilde gelişmişlerdir. Ayrıca trakeobronşiyal ve nazofaringeal salgılarda hiperviskozite ile yara onarımında bozukluk da saptanmıştır. Lizin-konjuge PLG ile değişim tedavisi psödomembranların hızlı bir şekilde gerilemesini ve solunum sistemi salgıları ile yara onarımının normalizasyonunu sağlamıştır. Moleküler analizler hastanın PLG geninde, plazminin katalitik domeyninde bozukluğa neden olarak ağır Tip I PLG eksikliğine yol açan homozigot bir Glu460Stop (E460X) mutasyonu (1511G-T transversiyonu) içerdiğini göstermiştir. Bu mutasyondan dolayı mesajcı RNA (mRNA) transkripsiyonu, mutant plazminojen allelinin yarı ömrü ya da ikisi birden belirgin ölçüde azalabilir. Sonuç olarak, karaciğer dolaşımdan hızlı bir şekilde yok edilen güdük PLG molekülü sentezleyebilir ya da mutant PLG molekülünün sekresyonu azalabilir. Sağlıklı erkek kardeş ve etkilenmemiş ebeveynlerde de PLG antijen

ve aktivasyonunda azalma görülmüş ve bu mutasyon bakımından heterozigot oldukları belirlenmiştir. Aile üyelerinin hiçbirinde arteriyel veya venöz tromboz ile lignöz konjuktivit ve diğer semptomlara rastlanmamıştır (Schott vd 1998). Mingers ve arkadaşları homozigot PLG eksikliği olan hastalara kısa-dönemli tedavi olarak düşük-dozlu lys-PLG konsantresi uygulayan ilk gruptur fakat tedavinin klinik bulgular üzerinde herhangi bir etkisini saptamamışlardır (Mingers vd 1996). Schott ve arkadaşlarının çalışmasında, uzun-dönemli PLG değişim tedavisi için Mingers ve arkadaşlarının çalışmasında kullanılan dozun 2-10 katı kullanılmış ve lignöz konjuktivitinin tamamen düzelmesi ve yara onarımı ile solunum sisteminin hiperviskoz salgılarının normalizasyonu sağlanmıştır. Bu değişim tedavisiyle bulguların ortadan kalkması ve tedaviye ara verildiğinde bulguların tekrar ortaya çıkması, PLG'nin ekstravasküler fibrinolizdeki anahtar rolünü göstermekte ve ağır PLG eksikliğinin lignöz konjuktivite neden olduğunu doğrulamaktadır. Sistemik lys-PLG uygulaması yara-onarım kapasitesini tamamen geri kazandırdığı ve lignöz lezyonları çözdüğü için (Schott vd 1998) tip 1 PLG eksikliği tek başına lignöz konjuktivit ve diğer müköz membranlarla ilişkili lezyonları açıklamaktadır.

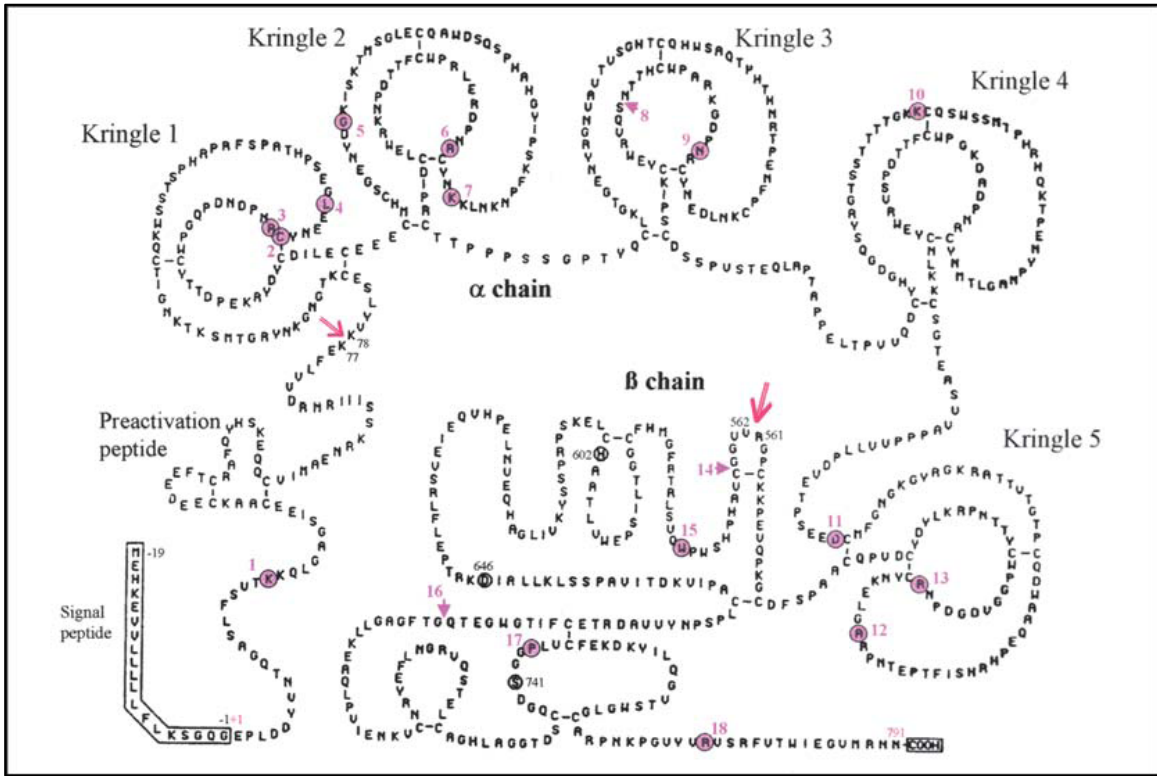
1999 yılında, lignöz konjuktivitli 5 hasta incelenmiş ve *PLG* geninde farklı birleşik heterozigot mutasyonlar tanımlanmıştır. Üç bağlantısız hastanın, *PLG* genindeki farklı yanlış-anlamli mutasyonlar için birleşik heterozigot oldukları belirlenmiştir, bunlar sırasıyla; Lys19Glu/Arg513His, Lys19Glu/Arg216His ve Lys19Glu/Leu128Pro mutasyonlarıdır. Diğer iki hasta Türk olup hem PLG antijen hem de fonksiyonel aktivite seviyeleri ölçülebilir düzeyin altında olan ve 1986 yılında Bateman ve diğerleri tarafından bildirilen 14 yaşında erkek ve onun 19 yaşındaki kız kardeşidir (Bateman vd 1986, Schuster vd 1999). 19 yaşındaki kız kardeş ilk olarak 3 haftalıkken lignöz konjuktivit geliştirmiştir. 3 yaşında, bilateral konjuktival psödomembranlar oluşmuştur ve lignöz konjuktivite birlikte tanı konmuştur. Bu membranların hızlı bir şekilde tekrarlaması 18 defa cerrahi işlem uygulanmasını zorunlu kılmıştır. 5 yaşında ses tellerinde lignöz membran oluşumu belirlenmiştir. Aynı zamanda astım benzeri bulgular da belirlenmiştir. 16 yaşında, sol ciğerde apse oluşumu bronkoskopik drenajı zorunlu kılmıştır. Ultrason ve piyelografi ile belirlenen diğer bulgular ise diş eti membranları ile renal toplama sistemindeki nodüller, kalsifiye kütleler olarak belirtilmiştir. Çoklu göz damlası, kortikosteroidler, lokal heparin ve çeşitli antibiyotiklerin çoklu kullanımı etkisiz olmuştur. 14 yaşındaki erkek kardeş, 9 aylıkken konjuktivit geliştirmiştir ve tablo 4 yaşında oldukça ağırlaşmıştır. Böylece lignöz konjuktival membranların alınması için 15 operasyon

geçirmiştir. Duodenal ülserleşme ve eosinofilik gastrik infiltrasyon da gözlenmiştir. Kardeşlerin *PLG* geninin yedinci ekzonunda del Lys212 olarak adlandırılan 3 bç'lik delesyon ve ekzon 17'yi takip eden intronQ'da 1 bç'lik delesyon (Ex17 + 1del-g) açısından birleşik-heterozigot oldukları belirlenmiştir. Bu bulgular, *PLG* genindeki bazı birleşik heterozigot mutasyonların lignöz konjuktivit ile ilişkili olabileceğini göstermektedir (Schuster vd 1999).

Ağır Tip I *PLG* eksikliği olan 50 hastanın incelendiği bir çalışmada, hastalardaki ilk klinik bulguların ortaya çıkmasındaki ortalama yaş 9.75 ay olsa da 61 yaşına kadar uzanan geniş bir aralığın söz konusu olduğu belirtilmiştir. *PLG* aktivitesi %4-51 arasında değişmektedir. Araştırmacılar, bu hastalardaki en yaygın klinik gösterge olan lignöz konjuktiviti (%80) lignöz dişeti iltihabı (%34) daha nadir görülen lignöz vajinit (%8) ile solunum sistemi (%16), kulak (%14), gastrointestinal sistem (%2) olgularının izlediğini belirtmişlerdir. İki serebellumda Dandy-Walker malformasyonu taşıyan dört hastada konjenital okluzif hidrosefali vardır, hastalar arasında venöz tromboz geçiren yoktur. 21 hastanın anne ve babası akraba olup bunların 19'u Türk'tür. Çalışma sonucunda bütün hastalarda plazma *PLG* seviyesinin önemli ölçüde düşük olduğu belirlenmiştir. 38 hastanın 31'inde *PLG* geninde birleşik heterozigot ya da homozigot mutasyon ve 7 hastada sadece tek bir heterozigot mutasyon tanımlanmıştır. Türk 21 hastanın 12'sinde hiçbir mutasyon saptanamazken, 9 hastanın founder etkisini düşündürür şekilde 3 temel *PLG* polimorfizminin (406T>C (91N), 1490A>G (453N/D) ve 2362G>T (743G)) homozigot kombinasyonunu taşıdığı saptanmıştır. Hastalar arasında en yaygın görülen genetik değişimin %34'lük oranla (50 hastanın 17'sinde) K19E değişimi olduğu belirtilmiştir. Heterozigot, homozigot ya da birleşik heterozigot hipoplazminojenemi hastalarında K19E mutasyonu yanında *PLG* genine ait diğer genetik anormallikler belirlenmiştir. Bunlar: **Yanlış anlamlı mutasyonlar:** T9N, L128P, R134K, G142R, G176D, T181P, R216H, D219N, R234H, P285A, P285T, R306H, N307I, T352I, P353A, P491R, A505V, R513H, S575P, W597C, A675T, P744S, C765G, R776H; **Anlamsız mutasyonlar:** C133X, K378X, Q380X, E460X, R471X, Q540X, W597X; **Çerçeve kayması mutasyonları:** W417fsX432, E455fsX493, V563fsX580, L650fsX652; **Ayıklama bölgesi mutasyonları:** IVS11-2A/G, IVS11-7T/G, IVS11+1G/A, IVS17+1delG, **Delesyon mutasyonu:** K212del **İnseriyon mutasyonu:** T319_N320insN şeklindedir (Schott vd 1998, Schuster vd 1997, Schuster vd 1999, Schuster vd 2001, Tefs vd 2006, Azuma vd 1993). Çalışmada mutant

PLG proteinlerindeki bozuk salınımın, Tip I PLG eksikliğinde temel moleküler patomekanizma olabileceği önerilmiştir (Tefs vd 2006).

Tip I PLG eksikliği çeşitli hayvan modellerinde de çalışılmıştır. *PLG* geni homozigot olarak bozulmuş farelerin ($PLG^{-/-}$) gastrointestinal sistem, rektal doku, trake, larinks, vajina, uterus, karaciğer, akciğer ve midede fibrince zengin ülseratif lezyonlar geliştirdiği ve büyümede gecikme gösterip düşük fertiliteye sahip oldukları belirlenmiştir (Ploplis vd 1995, Bugge vd 1995, Bugge vd 1996, Drew vd 1998). 1998 yılında *PLG* geni hedefli olarak bozulan farelerin fibrince zengin viskoz ya da membranöz materyal oluşumu ile karakterize lignöz konjuktivit geliştirdikleri ve bu tabloya hidrosefalinin de eşlik ettiği belirlenmiştir (Drew vd 1998, Kao vd 1998). Hedefli gen bozma yöntemiyle oluşturulan PLG-yoksun fareler ile hem u-PA hem de t-PA genleri için homozigot-yoksun farelerde (u-PA^{-/-}/ t-PA^{-/-} fare) lignöz konjuktivit, eksik yara onarımı ve internal hidrosefali göstergeleri saptanmıştır (Drew vd 1998, Kao vd 1998). Hem insanlarda hem de hayvan modellerinde PLG eksikliğine hidrosefalinin de eşlik etmesi ciddi Tip I PLG eksikliğinin okluzif hidrosefaliye neden olduğunu düşündürse de altta yatan mekanizmalar bilinmemektedir (Schuster ve Seregard 2003).



Şekil 2.7. PLG molekülünün yapısı ve lignöz konjuktivitli hastalarda tanımlanan mutasyonların yerleşimi görülmektedir. Aminoasit rezidüleri amino-uç glutamik asit rezidüsüne 1 numara verilerek (+1) numaralanmış ve 791 numaralı rezidü ile sonlanmıştır. Sinyal peptidi (kutu içinde negatif numaralarla gösterilmiş) 19 aminoasit içermektedir ve Gly-Glu bağı arasından (-1/+1 pembe renkli) sinyal peptidaz tarafından kesilmektedir. Preaktivasyon peptidi (PAP) Lys77 ve Lys78 arasından kesim sonucu oluşur (kırmızı renkli açık ok). Plazminojenin plazmine dönüşümü Arg561 ve Val562 arasından kesim sonucu (kırmızı renkli açık ok) gerçekleşir. Plazminin katalitik domeyni His603, Asp646 ve Ser741'den (yuvarlak içinde) oluşan katalitik üçlüyü içerir. Anlamsız ne yanlış anlamlı mutasyonlar ile bir delesyon mutasyonu mavi boyalı yuvarlaklar ile belirtilmiş olup insersiyon ve ayıklama bölgesi mutasyonları pembe kapalı oklar ile belirtilmiştir (Schuster ve Seregard 2003).

Çizelge 2.1. Şekil 2.4’de numaralarla gösterilen mutasyonlar ile etnik kökenleri görülmektedir (Schuster ve Seregard 2003).

Numara	Genetik Değişim	Etnik Köken	Taşınma Şekli
1	Lys19Glu	ABD	Homozigot
		Türk	Homozigot
		İsveç	Homozigot
		Belçika	Homozigot
		Alman	Birleşik Heterozigot
		Alman	Birleşik Heterozigot
2	Cys133Stop	İsveç	Birleşik Heterozigot
		İsveç	Birleşik Heterozigot
		İsveç	Birleşik Heterozigot
		İsveç	Birleşik Heterozigot
		İsveç	Birleşik Heterozigot
3	Arg134Lys	İsveç	Birleşik Heterozigot
4	Leu128Pro	İsveç	Birleşik Heterozigot
5	Gly176Asp	Türk	Homozigot
6	Arg216His	Türk	Homozigot
		Alman	Birleşik Heterozigot
7	del Lys212	Türk (Kardeş)	Birleşik Heterozigot
		Türk (Kardeş)	Birleşik Heterozigot
8	Ins Asn320	Alman (Kardeş)	Birleşik Heterozigot
		Alman (Kardeş)	Birleşik Heterozigot
		Alman (Kardeş)	Birleşik Heterozigot
9	Asn307Ile	Türk	Homozigot
10	Lys378Stop	Alman (Kardeş)	Birleşik Heterozigot
		Alman (Kardeş)	Birleşik Heterozigot
		Alman (Kardeş)	Birleşik Heterozigot
11	Glu460Stop	Türk	Homozigot
12	Ala505Val	?	?
13	Arg513His	Alman	Birleşik Heterozigot
14	Gly565ins-G	Türk	Homozigot
15	Trp597Stop	Türk	Homozigot
16	Ex17 + 1del-g	Türk (Kardeş)	Birleşik Heterozigot
		Türk (Kardeş)	Birleşik Heterozigot
17	Pro744Ser	Türk	Homozigot
18	Arg776His	Türk	Heterozigot

2.4.2. Tip II Plazminojen Eksikliği

Tip I PLG eksikliği (hipoplazminojenemi) serum PLG aktivitesinde ve PLG antijen seviyesindeki azalmayla karakterizeyken displazminojenemi ya da tip II PLG eksikliğinde PLG düzeyi normal ya da hafifçe azalmışken, varyant PLG molekülündeki anormallik nedeniyle PLG aktivitesinde belirgin azalma söz konusudur. Displazminojenemi, özgül bir klinik göstergeyle sonuçlanmamakta ve muhtemelen özellikle Asya ülkelerinde olmak üzere popülasyondaki genel polimorfik değişimleri temsil etmektedir. Lignöz konjuktivit ve psödomembran oluşumu yalnızca Tip I PLG eksikliği ile ilişkilidir. Muhtemelen azalmış aktiviteye sahip normal düzeyde PLG antijeni, Tip II eksikliğinde görüldüğü üzere, normal yara onarımı için yeterlidir (Schuster ve Seregard 2003).

Plazma PLG fonksiyonel ve antijen değerlerinin saptanmasına ek olarak PLG aktivatörleri ile plazma plazmin oluşum hızı, izoelektrik fokuslama-immünofiksasyon/zimografi ile yapısal polimorfizmleri saptama yöntemleri PLG varyantlarının belirlenmesinde kullanılan etkili araçlardır. En önemlisi de çeşitli fiziksel ve biyokimyasal parametreler kullanılarak hastanın plazma örneğinden PLG izolasyonu ve PLG molekülünün karakterizasyonudur (Robbins 1990).

Displazminojenemi ilk olarak 1978’de tekrar eden tromboz şikayeti olan 31 yaşındaki bir Japon hastada tanımlanmıştır (Aoki vd 1978). Bahsi geçen anormal PLG, sonraları “Tochigi I” olarak isimlendirilmiş olup Japonya ve diğer Asya ülkelerinde displazminojeneminin en yaygın nedeni durumundadır. Bunu takiben, displazminojenemiye neden olan daha az yaygın diğer PLG varyantları tanımlanmış ve Nagoya, Osaka, Kanagawa, Kagoshima, Tokyo, Chicago, Frankfurt ve Maywood olarak isimlendirilmiştir (Robbins 1990). Bunların bazılarında moleküler defekt tanımlanmıştır (Çizelge 2.2) (Schuster vd 2007).

Çizelge 2.2. Displazminojenemi'ye neden olan PLG varyantları, *PLG* gen mutasyonları ve PLG fonksiyonel aktivite değerleri görülmektedir (Schuster vd 2007)

PLG Varyantları	PLG gen mutasyonları		PLG Aktivitesi (%)
	Birinci allel	İkinci allel	
Kagoshima	A601T	A601T	~10
Tochigi, Tochigi II, Nagoya II	A601T	YT	55
Nagoya Id2, Id3, Osaka IV, V	A601T	V355F	19
Nagoya I	V355F	YT	51
Osaka II	A601T	D676N	21
Osaka III	D676N	YT	52
Kanagawa-I	G732R	YT	51
Kanagawa-I/Tochigi	G732R	A601T	8
-	G693R	YT	49
-	C548G	YT	53
-	L696P	YT	49

YT: Yabanıl Tip

Bozuk fonksiyona sahip diğer PLG varyantları Chicago III (Wohl vd 1982), Paris I (Kazama vd 1981, Soria vd 1983) adıyla tanımlanmıştır. Çoğu olguda PLG varyantı probanddaki trombozla ilişkili olmasına karşın, heterozigot durumdaki diğer aile bireylerinde trombotik olaylara rastlanmamıştır.

Displazminojeneminin sıklığı Japonya'da %2-3.87 (Aoki vd 1978, Kikuchi vd 1992, Ooe vd 1999, Okamoto vd 2003), Çin'de %1.5-2.2 (Li vd 1994, Ooe vd 1999), Kore'de %1.6 (Ooe vd 1999) ve İskoçya'da %0.03 (Tait vd 1996) olarak bulunmuştur.

İlk çalışmalar, *PLG* genindeki düşük aktiviteye sahip bozuk fonksiyonlu PLG oluşumuna neden olan heterozigot değişimlerin trombotik olaylara zemin hazırlayabileceğini önermiş (Aoki vd 1978, Dolan vd 1988, Scharrer vd 1988, Ichinose vd 1991) fakat sonraki daha geniş kapsamlı çalışmalar displazminojeneminin tromboz için bir risk faktörü olmadığını göstermiştir (Tait vd 1996, Shigeyiko vd 2000, Okamoto vd 2003). Sadece %1.5 ya da %4.8'lik rezidüel fonksiyonel PLG aktivitesine sahip homozigot displazminojenemi hastalarının bile sağlıklı olduğu belirlenmiş ve venöz tromboz ya da lignöz konjunktivit geliştirmedikleri gözlenmiştir (Okamoto vd 2003). Bu bulguların altında yatan patogenetik mekanizma için tahminlerden biri, yabanıl tip PLG gibi normal konsantrasyonda sentezlenen displazminojenemik PLG varyantlarının hücre yüzeylerine ve fibrin(ojen)e

bağlanma kapasitelerinin tam olduğudur. Bu nedenle, düşük konsantrasyondaki yerel PLG aktivitesi bile damar içi ve dışı fibrin depozitlerini çözmede yeterli görünmektedir. Ailesel PLG eksikliğinin diğer trombofilik bozukluklarla birlikteliği durumunda trombofili için risk oluşturduğunu belirtilmiştir (Tait vd 1996).

1978 yılında 15 yıldır tekrarlayan tromboz şikayeti ile rapor edilen bir hastanın PLG aktivitesinin kontrol bireylerinin yarısı kadar olduğu belirlenmiştir. Heterozigot aile bireylerinde normal ve anormal plazminojenin hemen hemen eşit oranda bulunduğu saptanmıştır (Aoki vd 1978). Heterozigot durumdaki 12 aile bireyinin normal PLG aktivitesinin yarısına sahip olmaları ve homozigot durumda olan bir aile üyesinin gerçekte hiç PLG aktivitesi olmamasına karşın normal düzeyde PLG antijenine sahip olması moleküler anomalinin otozomal karakterde kalıtıldığını göstermektedir (Sakata ve Aoki, 1980).

2.5 Moleküler Teknikler ve Mutasyon Analiz Yöntemleri

2.5.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu; herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını sağlayan basit ama çok başarılı bir invitro DNA sentez yöntemidir. PCR, DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir. Bu teknik 1985 yılında araştırmacı Kary Mullis tarafından bulunmuş ve 1993 yılında Kary Mullis'e Nobel ödülü kazandırmıştır. PCR tekniği ile DNA'nın çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında; çoğaltılacak hedef DNA örneği (genelde genomik DNA), çoğaltılması planlanan bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan yapay DNA primerleri, bu DNA primerlerine bağlanıp bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan ısıya dayanıklı DNA polimeraz, sentezde kullanılacak olan deoksiribonükleozittrifosfatlar (dNTP'ler, A,C,G,T) ve polimerazın çalışması için uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{+2}) sağlayan tampon karışımı gereklidir (Akar, 1999).

PCR reaksiyonu, DNA'nın yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasına (denatürasyon), sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasına (hibridizasyon), daha da sonra

zincirin uzamasına (polimerizasyon) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım bir PCR siklusunu oluşturur ve çoğaltılmış ürünün miktarı teorik olarak, bu üç temel basamağın tekrarlanma sayısına bağlıdır. Yeni DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Bir döngü 4-5 dakika sürer ve çok kez tekrar edilir. İşlem, thermocycler (ısı döngücüsü) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklıkları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemle; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanmak üzere bol miktarlarda hedef DNA parçaları elde edilir (Akar 1999, Klug vd 2000).

PCR reaksiyonunda ilk aşama; çoğaltılacak olan DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılması basamağı olan "denatürasyon" basamağıdır. Denatürasyon aşamasında insan genomik DNA'sı için 94-98°C sıcaklık uygundur. İkinci aşama; uygun sıcaklıkta primer olarak adlandırılan 18-20 baz uzunluğundaki sentetik oligonükleotidlerin 37-65°C arasında hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyonu) basamağıdır. Üçüncü aşama; DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği sıcaklık olan 72°C'da dNTP'lerin iplikçiğe eklenerek zincirlerin uzaması (polimerizasyon, çift iplikli DNA sentezi) basamağıdır. Bu üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur. Bu PCR döngüsünün belirli sayıda tekrarlanmasıyla hedef DNA 10^6 - 10^{12} kez çoğaltılabilir. Bir döngü sonucunda, başlangıçta "n" olan DNA zincir sayısı "2n"e yükselir. Döngüler arka arkaya çok kez tekrarlanırken herbir döngünün ürünü, bir sonrakinde kalıp olarak kullanıldığı için her döngüde istenen DNA segmentinin miktarı 2 katına çıkar (Akar, 1999).

PCR'dan iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlıdır. DNA polimerazın iyi çalışabilmesi en etkin olduğu pH'nın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerden birisidir. Bu amaçla genellikle, Tris.HCl pH: 8,4 tepkime karışımında son değişimi 10 mM olacak şekilde kullanılır. PCR karışımında tek değerli katyonların özellikle 50-60 mM düzeyinde K⁺ bulunmasının çoğaltılmayı önemli ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Yine karışımında 100 µg/ml jelatin bulunmasının benzer etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, serbest magnezyum (MgCl₂) konsantrasyonunun azalması ile Taq Polimeraz doğruluğu artırılabilir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü Mg²⁺ iyonunu bağladıklarından; her PCR protokolünde Mg²⁺ konsantrasyonu empirik olarak

ayarlanmalıdır. Fazla Mg⁺², enzimin spesifikliğini azaltır, azı ise; enzimin inaktif olmasına yol açar (Akar 1999).

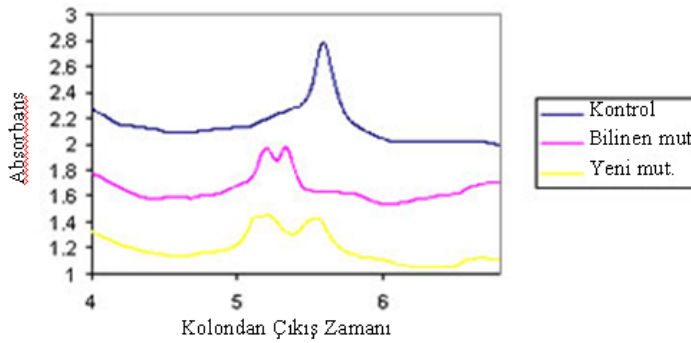
2.5.2. Denatüre Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (DHPLC)

DHPLC, mutasyon saptanması, çift zincirli ve tek zincirli nükleik asitlerin büyüklüklerinin saptanması, karışık mikroorganizma türlerin ayrılması gibi amaçlarla kullanılan bir yöntemdir. DHPLC mutasyon saptamada yüksek özgüllük ve hassasiyete sahip bir indirekt mutasyon analiz yöntemi olarak kullanılmaktadır. DHPLC yöntemi ile tekli nükleotit polimorfizmleri (SNPler), insersiyon ve delesyonlar gibi genetik değişimler saptanabilir. Sistemin temeli heterozigot PCR ürünlerinin ısıtılıp soğutulduktan sonra hibridizasyonla heterodubleks oluşturmalarına ve bu heterodublekslerin saptanmasına dayanır. Çalışılacak bölge, önce PCR ile çoğaltılır ardından PCR'dan alınan örnekler termal döngü cihazına konarak önce ısıtılır ve denatürasyon sağlanır, sonra kademeli olarak soğutularak örneklerin renatüre olması sağlanır. Sistem, denatürasyon-renatürasyon işlemi sonucu oluşan heterodubleksler ve homodublekslerin kısmi denatüre edici koşullar altında ayrılması ve saptanmasına dayanır.

Sistemde kısmi denatüre edici koşulları sağlayan bir fırın ve fırının içinde polistiren-divinilbenzen (PS-DVB) kopolimer boncuklarından oluşan bir gözeneksiz matriks içeren kartuş bulunmaktadır. Doğaları gereği kartuşun içindeki boncuklar elektrostatik olarak nötral ve hidrofobiktir bu nedenledir ki nükleik asitlerle çabuk reaksiyona girmezler. Sistemde ayrıca iki çeşit çözelti bulunmaktadır, bunlar; trietilamonyumasetat (TEAA) ve asetonitril (ACN)'dir. TEAA, nükleik asitlerin boncuklara tutunması için köprü görevi gören iyon eşleyici bir moleküldür. Bu iyon eşleyici molekül hem hidrofobik hem pozitif yüklüdür ve TEAA'nın hidrofobik kısmı PS-DVB boncuklarının hidrofobik zincirleriyle etkileşime girerken pozitif yüklü kısım nükleik asitlerin anyonik fosfat iskeletiyle etkileşime girer. Bu iyon eşleyici çözelti nükleik asit ve kartuş matriksi arasında köprü görevi görür.

Kartuş matriksi "durağan faz" olarak adlandırılır. "Hareketli Faz" DNA'nın kartuştan ayrılmasını sağlayan çözeltilerin kombinasyonundan oluşur. 0.1 M TEAA'nın %25 Asetonitril ile karışımı (Wave Optimize Çözelti B) DNA'yı ayırmak için kullanılır. Asetonitrilin artan konsantrasyonları kartuş matriksinden geçtikçe kartuş ve DNA/TEAA

arasındaki hidrofobik etkileşim kırılır ve DNA kartuştan ayrılmaya başlar. Bu ayrılma işlemi “ters faz iyon eşleyici sıvı kromatografisi” olarak adlandırılır. Kısmi denatüre edici koşullar altında heterodubleksler homodublekslerden önce kartuştan ayrılır. Cihazda bulunan ultraviyole saptayıcısı kartuştan ayrılan DNA parçacıklarını saptar ve pikler şeklinde değerlendirir.



Şekil 2.8. DHPLC’de kontrol örneği (mavi) ile mutasyon taşıdığı bilinen (pembe) ve mutasyon taşıdığı saptanan (sarı) örneğin profil farklılığı

Örneklerin taşıdığı mutasyonları etkin bir şekilde saptayabilmek için, söz konusu domeynlerin belli bir sıcaklıkta %75-99’unun erimemiş biçimde helikal yapıda olması gerekmektedir. %75-99 oranında helikal yapıda olan heterodubleks, kartuştaki hidrofobik boncuklara bağlanabilir fakat kısmi denatüre edici sıcaklık koşulları altında yapısındaki kararsızlık nedeniyle homodublekslerden daha önce kolondan ayrılır ve sistem tarafından ultraviyole saptayıcı ile belirlenir. Belli bir PCR ürünü, baz içeriğine bağlı olarak genelde farklı sıcaklık derecelerinde farklı ölçülerde erime gösteren birden fazla domeyne sahiptir. Dolayısıyla farklı domeynlerin her birinin %75-99 oranda helikal yapıda olduğu sıcaklık derecesi farklıdır. Belli bir sıcaklık derecesinde, bir domeyn %75-99 oranında helikal yapıda iken bir diğeri tamamen erimiş olabilir. Bu durumda, tamamen eriyen domeyndeki olası bir genetik değişim saptanamaz. Bu nedenle, tüm amplikonun değerlendirilmesi için, her bir domeynin analizine olanak verecek şekilde farklı 2-3 sıcaklık derecesinin kombinasyonu ile çalışılır. Sisteme yüklenen her bir örnek tek bir sıcaklık derecesinde yaklaşık 7.5 dakika gibi kısa bir zamanda değerlendirilir.

Her çalışmada mutlaka sistemin kendi standardı ve yabancı tip kontrol örneği kullanılmalıdır. Sistemin kendi standardı, sistemin düzgün çalışıp çalışmadığının kontrolü amacıyla kullanılır. Sistem standardı, bilinen bir mutasyonu heterozigot olarak taşıyan bir DNA örneğidir. Bu heterozigot DNA örneğinin, hangi sıcaklıkta taşıdığı mutasyona özgül

profil sergilediği saptanmıştır ve deney öncesi bu standart örnek, özgül sıcaklık derecesinde yürütülerek mutasyona özgül profilin elde edilip edilmediğine bakılır. Eğer saptanan sıcaklık derecesinde standart örneğe özgül profil elde edilmişse, sistemin düzgün çalıştığına kanaat getirilir ve deney aşamasına geçilebilir. Deney sırasında mutlaka yabancı tip kontrol örneği kullanılmalıdır, bu örnek; incelenen bölgede herhangi bir genetik değişim içermediği DNA dizi analizi ile teyit edilmiş bir homozigot yabancı tip örnek olmalıdır. Yabancı tip kontrol örneği ile kıyaslandığında farklı profil sergileyen örnekler mutasyon taşımaya aday kabul edilerek DNA dizi analizi ile değerlendirilir.

Sistemin tek dezavantajı, heterodubleksleri saptadığı için homodubleks oluşturan homozigot mutant genotipteki değişimlerin saptanamamasıdır. Homozigot mutant genotipte mutasyonları saptamak için, her örnek eşit miktarda homozigot yabancı tip örneklerle karıştırılmalı ve homozigot mutant değişimler için yapay heterozigot durum oluşturulmalıdır. DHPLC sonuçlarının DNA dizi analizi ile karşılaştırılması sonucu, DHPLC'nin %99 güvenilirlikle mutasyon saptadığı belirlenmiştir. Ek olarak, DHPLC'nin SSCP gibi geleneksel indirekt mutasyon analiz yöntemlerinin saptayamadığı SNP'leri başarıyla saptadığı belirlenmiştir.

2.5.3. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ya da "Sequencing" DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Bunun için iki temel teknik geliştirilmiştir. Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise, belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir (Klug ve Cummings, 2002, Ek A).

DNA dizi analizinde, dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz ile kataliz edilir. Yöntemde, kimyasal değişikliğe uğratılmış dideoksinükleotid trifosfatlar (ddNTP) kullanılarak bir dizi DNA parçacıkları elde edilir. ddNTP'nin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmaz. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır ancak 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Deneyde, dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı kalıp DNA zinciri, uygun primer, radyoaktif nükleosid trifosfatların dördü ve az miktarda ddNTP

sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların herbirinde çok az miktarda modifiye nükleosid kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak, bir dizi DNA parçacığı meydana gelir. Elektroforez sonrası DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir (Akar, 1999, Bölüm 8; Klug ve Cummings, 2002, Ek A). Bu yöntem, rekombinant Taq polimerazların geliştirilmesiyle PCR ile de gerçekleştirilebilir hale gelmiştir. Tepkime karışımında; dizisi belirlenecek DNA  rneği, polimeraz enzimi, oligonükleotid primer, dört farklı dNTP, dört farklı ddNTP ile enzimin çalışması için tampon görevi görecek olan maddeler bulunur. PCR'da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir (Akar, 1999, Bölüm 8).

Genomların dizi analizi için otomatik DNA dizi analizi aletleri, radyoaktif izotoplar yerine de floresan boyalar kullanılır. Bu sistemde dört farklı renkte boya kullanılarak dizinin okunmasını sağlayan dört farklı renkteki piklerin oluşturduğu bir model ortaya çıkar (Klug ve Cummings, 2002, Ek A).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışma Grubunun Oluşturulması

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Genetik Hastalıklar Bilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi ile Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi'nden tedarik edilen 16 lignöz konjuktivitli indeks olgu dahil edilmiştir. Lignöz konjuktivit hastalarından dokuzunun aile bireyleri de çalışmaya dahil edilirken, yedisi aile bireyleri olmadan tek numune olarak çalışmaya alınmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerden/ailesinden imzalı bilgilendirilmiş onam formu alınmıştır.

Aşağıdaki çizelgede hastaların akrabalık durumları ve temin edildikleri merkezler görülmektedir.

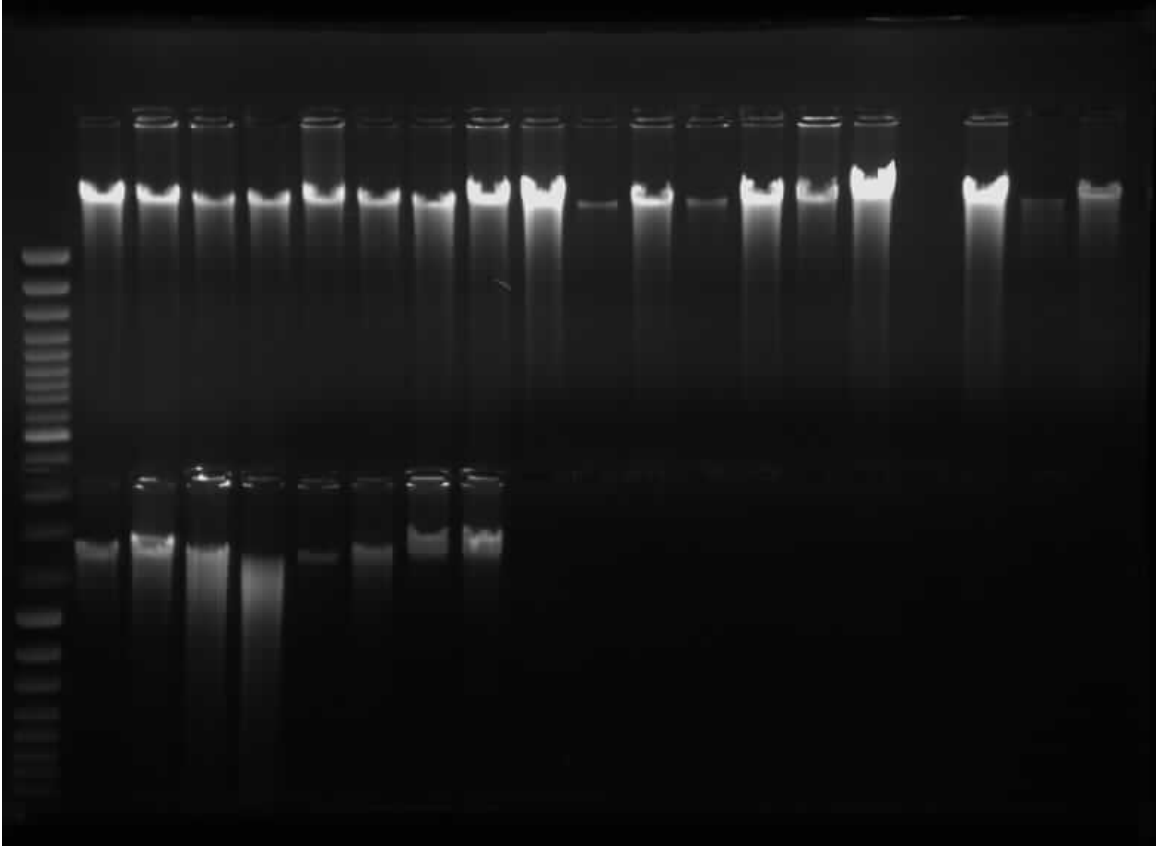
Çizelge 3.1. Çalışmaya dahil edilen örneklerin akrabalık durumları ve temin edildikleri merkezler görülmektedir. Akraba olan bireyler birarada listelenmiş ve aynı renk kodları ile ifade edilmiş, akrabası olmayıp tek numune olarak gelen hastalar ise beyaz renkle ifade edilmiştir.

ÖRNEK KODU	AKRABALIK	MERKEZ
PLG 44	HASTA	AKDENİZ ÜNİ.
PLG 45	HASTA	CERRAHPAŞA
PLG 48	ANNE	CERRAHPAŞA
PLG 49	BABA	CERRAHPAŞA
PLG 46	BABA	CERRAHPAŞA
PLG 47	HASTA	CERRAHPAŞA
PLG 50	HASTA	CERRAHPAŞA
PLG 51	HASTA	ANKARA ÜNİ.
PLG 52	BABA	ANKARA ÜNİ.
PLG 53	HASTA	ANKARA ÜNİ.
PLG 54	ANNE	ANKARA ÜNİ.
PLG 177	BABA	MERAM ÜNİ.
PLG 178	HASTA	MERAM ÜNİ.
PLG 179	ANNE	MERAM ÜNİ.
PLG 180	HALA	CERRAHPAŞA
PLG 181	HASTA	CERRAHPAŞA
PLG 184	ANNE	CERRAHPAŞA
PLG 182	BABA	CERRAHPAŞA
PLG 183	HASTA	CERRAHPAŞA
PLG 187	HASTA	CERRAHPAŞA
PLG 188	KARDEŞ	CERRAHPAŞA
PLG 189	KARDEŞ	CERRAHPAŞA
PLG 193	HASTA	İSTANBUL ÜNİ.
PLG 194	HASTA	İSTANBUL ÜNİ.
PLG 195	HASTA	MERAM ÜNİ.
PLG 196	HASTA	ÇUKUROVA ÜNİ.
PLG 197	KARDEŞ	KOCAELİ ÜNİ.
PLG 198	KARDEŞ	KOCAELİ ÜNİ.
PLG 199	BABA	KOCAELİ ÜNİ.
PLG 200	HASTA	KOCAELİ ÜNİ.
PLG 201	ANNE	KOCAELİ ÜNİ.
PLG 202	BABA	ANKARA ÜNİ.
PLG 203	HASTA	ANKARA ÜNİ.
PLG 204	ANNE	ANKARA ÜNİ.

3.2. YÖNTEMLER

3.2.1. DNA Eldesi

Hastaların kanları 1 ml 0,5 M EDTA'lı (Etilendiamintetraasetikası, Sigma, ABD) tüpler içerisine 9 ml olarak alınır. 50 ml'lik falkon tüpe konularak üzerine 1/2,5 oranında yani 25 ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorür (NH₄Cl) (Merck, Darmstadt, Almanya), 10 mM Potasyum Bikarbonat (KHCO₃) (Merck, Darmstadt, Almanya), 0,5 M EDTA] ilave edilerek 15 dakika (dk) buzda bekletilir. +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür, çökelek üzerine tekrar RBC lizis solüsyonu ilave edilir. RBC lizis solüsyonu ile yıkama işlemine tüm eritrositler lize oluncaya kadar devam edilir. Kırmızı küreler elimine edildikten sonra geriye çekirdekli hücreler olan lökositler kalır. Geriye kalan bu lökositler üzerine beyaz küre hacminin 2,5 katı kadar Nükleaz Tamponu [10 mM Tris-HCl pH: 7,5 (Tris Base, Owl Scientific, ABD-HCl, Merck, Almanya), 400 mM NaCl (Merck, Darmstadt, Almanya), 2 mM EDTA] eklenir. Bunun üzerine 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (Quantum, Montreuil, Fransa), son konsantrasyonu %0,5 olacak şekilde de %10'luk SDS (Sodyum Dodesil Sülfat, Sigma, ABD) ilave edilerek 37°C'lik su banyosunda (Kottermann, Almanya) bir gece bekletilir. Ertesi gün 1:1 oranında Fenol/Kloroform 25:24:1 oranlarıyla sırasıyla; Fenol (Merck, Almanya): Kloroform (Merck, Almanya): İzoamilalkol (Merck, Almanya) ilave edilerek 10 dk boyunca elde iyice çalkalanır. 10 dk çalkaladıktan sonra 15 dk buza gömülü bekletilir. Daha sonra +4°C, 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edildiğinde belirgin iki faz ayrılır. Üstteki faz yani süpernatant dikkatlice başka bir tüpe alınır ve üzerine miktarın 1/10'u oranında 2 M Sodyum Asetat (C₂H₃O₂Na) (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel, Türkiye) ilave edilir. Tüp nazikçe çalkalanır, DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilir. Ertesi gün +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj edilir. Dikkatli bir şekilde süpernatant dökülür, DNA dipte pellet halindedir. Tüp ağzı açık 10 dk kurutulur. Kurutulan DNA 500 ml %70'lik etanol ile tekrar santrifüj edilir. Süpernatant dökülür ve DNA kurutulur. Etanol kokusu tümüyle gittikten sonra DNA üzerine TE solüsyonu (10 mM Tris-HCl ve 1 mM EDTA) eklenerek bir gece 37°C'lik su banyosunda bekletilerek çözülür. TE içerisinde çözünen DNA +4°C'de saklanır. Elde edilen DNA'lar niteliksel olarak %1'lik agaroz jel elektroforeziyle (Şekil 6), niceliksel olarak spektrofotometre ile değerlendirilir.



Şekil 3.1. Periferik kanlarından DNA izolasyonu yapılan örneklerin %1'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

3.2.2. PLG Geni Yapısının in silico Analizi ve LPa'dan Bağımsız Özgül Primerlerin Tasarımı

PLG geninin, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılması için kullanılacak özgül primerler tasarlanmıştır. Bunun için önce *Lp(a)* geni ile homoloji gösteren bölgeler NCBI (National Center for Biotechnology Information/<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e-veritabanında yer alan Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) seçeneğinin bl2seq alt seçeneği kullanılarak belirlenmiş ve söz konusu fragmentler *PLG* geni üzerinde yerleştirilmiştir. Özgül *PLG* bölgelerinin çoğaltılması için, *LPa* geni ile homoloji göstermeyen kısımlardan primerler tasarlanmıştır. Tasarlanan primerlerin *PLG* geninde özgül bölgeleri çoğaltıp çoğaltmadığının kontrolü için yine NCBI e-veritabanındaki blast seçeneği kullanılmıştır. Primer-BLAST alt seçeneğinde ileri ve geri yöndeki primer çiftlerinin insan genomunda hangi bölgeleri çoğalttığının belirlenmesi ve hedef ampikonun dizisi ile kıyaslanması yoluyla primerlerin özgüllüğü teyit edilmiştir. *PLG* ve *Lp(a)* genleri arasındaki homolojinin çok yüksek olduğu bölgelerde, *PLG*'e özgül

bölgelere ulaşmak için çoğaltılmak istenen ekzonun çok ileri ya da gerisinden primer tasarlamak zorunda kalınmış ve böylece çalışmaya olanak vermeyecek kadar büyük ampikonlar elde edilmiştir (1000-3600 bç). Bu ekzonların etkin bir şekilde çoğaltılması için ilk PCR ürünlerinin sulandırılarak kalıp olarak kullanıldığı, ikinci bir PCR reaksiyonu kurulmuştur (nested PCR). Nested PCR için, ampikon boyunu 200-600 bç gibi çalışmaya uygun boyuta indirgeyecek yeni primer çiftleri tasarlanmıştır. Nested PCR primer setleri, ilk ampikonda *PLG*'e özgül amplifikasyon elde edildiği için ekzonu içine alacak ve evrensel primer tasarlama kurallarına uyacak şekilde istenen yerlerden tasarlanabilir. Böylece 19 ekzonlu *PLG* geni 28 ayrı PCR reaksiyonuyla çoğaltılmıştır. PCR için kullanılan primer setleri aşağıdaki tabloda listelenmiştir (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.2. *PLG* geninin 19 ekzonunun çoğaltılması için kullanılan primer setleri ve ampikon boyutları

	İLERİ	GERİ	Uzunluk
EKZON 1	5'-CCACTTAATGCTACCAGTCT-3'	5'-CTCACACTCACATTCACACA-3'	1509 bç
EKZON 1 nested	5'-AGGACTCTTTATTCAAGGTA-3'	5'-CTTCACAGGAACTTAAACT-3'	400 bç
EKZON 2	5'-CTGACCATTATTCCACTTG-3'	5'-AATTACAGATTCTGCGTAG-3'	213 bç
EKZON 3	5'-TGATCTTTAGCATGTCTCAC-3'	5'-CTGTCCTAACTCAGAATTCA-3'	336 bç
EKZON 4	5'-AGAATGTAAGCTCCATGACG-3'	5'-CAGACACAGAGGGACAACCT-3'	463 bç
EKZON 5	5'-ACCACAATATGTGAATAAGC-3'	5'-AAGTTCAGAATTTCCATGAT-3'	2974 bç
EKZON 5 nested	5'-GATGACAATCTCAGATGGGA-3'	5'-TCTTCCGAGAGGTGAATAC-3'	366 bç
EKZON 6	5'-GAATTACATCGGAATGAGAG-3'	5'-ACTTCTTGAGGAATGCTAAA-3'	345 bç
EKZON 7	5'-AAGAAAGTCCTTGAATAACA-3'	5'-AAGACCAATAACATCCATA-3'	444 bç
EKZON 8	5'-AACATCCATCTGTGCATTCT-3'	5'-GTCAATGGGATTTACATTC-3'	584 bç
EKZON 9	5'-AAGGAAATGAACTTTAGCAC-3'	5'-TTCTGACCACAATAGCATT-3'	371 bç
EKZON 10	5'-CGTGTGGGATTCTAAGTA-3'	5'-TGTTTCTCCATGTTCATGT-3'	3419 bç
EKZON 10 nested	5'-TCATAATTCTCAGAGGCTAC-3'	5'-CTAAGAGAAATTTGGTCTA-3'	371 bç
EKZON 11	5'-TAGGTAGGTGACAAGGAAA-3'	5'-ATGGATGATTATGAAGAGC-3'	3111 bç
EKZON 11 nested	5'-CTTTGAAATGTACACAGTTG-3'	5'-AAGGTGAGTGGTTAAGTTGA-3'	618 bç
EKZON 12-13	5'-GGCTCTTCATAATCATCCAT-3'	5'-CCAAGTAGCTTCCTTCTTT-3'	3072 bç
EKZON 12 nested	5'-GGCTCTTCATAATCATCCAT-3'	5'-ATGTCACTAAAGGGAAGAGG-3'	439 bç
EKZON 13 nested	5'-AGGATAGACATGAAATGCGT-3'	5'-ACCTCTAAGCTTGCTCTTTG-3'	434 bç
EKZON 14-15	5'-TTGATCACTTCTCCAACAAA-3'	5'-AGGAAGAGTGAGAAAGGAAA-3'	2058 bç
EKZON 14 nested	5'-AATTTGTCTCGAATTACACC-3'	5'-ATCACTGTGCCTACAGATTT-3'	451 bç
EKZON 15 nested	5'-TACTACCATCCTGATGCTG-3'	5'-CTCCCTTCTCTTATCCA-3'	385 bç
EKZON 16-17	5'-CTTCTCACTCTTCTCCCT-3'	5'-AATCTGCATGACAAACCACT-3'	3055 bç
EKZON 16 nested	5'-CCAAGAACATTCCTTAACTG-3'	5'-ACCCAGACATAAAGCAAATA-3'	380 bç
EKZON 17 nested	5'-GCAGAGCAGTCAAACATAAC-3'	5'-TTAAGACATAGACAGGTGCC-3'	300 bç
EKZON 18-19	5'-CTTATCACAAACCCTCATCAT-3'	5'-TTCATCTCAGTGTGAGGAAT-3'	3661 bç
EKZON 18 nested	5'-CTCAGGAACACAGAATCATA-3'	5'-CTTAGATGATCTGAATACGC-3'	507 bç
EKZON 19 nested I	5'-TATGGATAGTAGAAGGATGG-3'	5'-GTTTGATTACTGCCAGTTAT-3'	337 bç
EKZON 19 nested II	5'-TGAGGGAGTGATGAGAAATA-3'	5'-CGTTAGCTGATGAGGTAAT-3'	440 bç

3.2.3. PCR

PLG geni polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmıştır. Ekzon 1, ekzon 5, ekzon 10, ekzon 11, ekzon 12, ekzon 13, ekzon 14, ekzon 15, ekzon 16, ekzon 17, ekzon 18 için *Lp(a)* ile homoloji göstermeyen bölgelerden dış PCR, ardından nested PCR uygulanmıştır. Ekzon 19 ise aynı şekilde fakat iki farklı nested PCR reaksiyonu ile çoğaltılmıştır. Homolojinin her bir ekzonun ayrı ayrı çoğaltılmasına imkan vermediği durumlarda, söz konusu ekzonlar birlikte çoğaltılmış ardından nested PCR ile ampliconlar ayrılmıştır (ekzon 12-13, ekzon 14-15, ekzon 16-17, ekzon 18-19). Diğer ekzonlar tek bir özgül primer seti kullanılarak çoğaltılmışlardır.

PCR reaksiyonu 25 µl son hacim ve 2 mM MgCl₂ için 16,8 µl didistile su; 2,5 µl 10X PCR tamponu (Fermentas, Litvanya); 2 µl 25mM MgCl₂ (Fermentas, Litvanya); 0,5 µl 10 mM dNTP karışımı (Fermentas, Litvanya); 0,5 µl 10mM ileri primer (Metabion, Almanya); 0,5 µl 10 mM geri primer (Metabion, Almanya); 0,2 µl Taq polimeraz (Fermentas, Litvanya), 100 ng kalıp DNA (50ng/µl DNA'dan 2 µl) kullanılacak şekilde kurulmuştur. MgCl₂ konsantrasyonunun 2 mM yerine 1-1,5-2,5 ve 3 mM kullanıldığı durumlarda (sırasıyla 1-1,5-2,5 ve 3 µl MgCl₂) karışıma eklenecek didistile su miktarı son hacmi 25 µl'ye tamamlayacak şekilde hesaplanmıştır.

PCR reaksiyonlarında 25 µl son hacim için ekzon 5 nested, ekzon 7, ekzon 12 nested ve ekzon 15 nested için 1,5 mM; ekzon 1 nested, ekzon 2, ekzon 4, ekzon 5, ekzon 6, ekzon 8, ekzon 9, ekzon 10 nested, ekzon 11, ekzon 12-13, ekzon 13 nested, ekzon 14 nested, ekzon 17 nested, ekzon 18 nested, ekzon 19 nested I ve ekzon 19 nested II için 2 mM; ekzon 1, ekzon 16-17 ve ekzon 18-19 için 2,5 mM; ekzon 3, ekzon 10, ekzon 11 nested ve ekzon 16 nested için 3 mM MgCl₂ kullanılmıştır. Ekzon 1 için ekstra bantları engellemek amacıyla standart PCR bileşenlerine ek olarak son hacmin %5'i kadar DMSO (25 µl son hacim için 1.25 µl) kullanılmış ve ekzon 14-15 için standart 10XPCR tamponu yerine özel bir tampon olan RDA tamponu kullanılmış ve RDA tamponunun içinde MgCl₂ yer aldığından ayrıca MgCl₂ kullanılmamıştır. PCR reaksiyonları ekzon 2, ekzon 5 nested, ekzon 6, ekzon 7, ekzon 12 nested, ekzon 14 nested, ekzon 15 nested, ekzon 18-19, ekzon 18 nested, ekzon 19 nested I ve ekzon 19 nested II için 50°C'da; ekzon 1 nested, ekzon 4, ekzon 8, ekzon 9, ekzon 10, ekzon 10 nested, ekzon 13 nested ve ekzon 17 nested için 55°C'da; ekzon 3, ekzon 11 ve ekzon 12-13 için 57°C'da; ekzon 1, ekzon 5, ekzon 11 nested, ekzon 14-15,

ekzon 16-17 ve ekzon 16 nested için 60°C’da gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonları, DHPLC analizi için 25 µl, DNA dizi analizi için ise 50 µl son hacimde kurulmuştur.

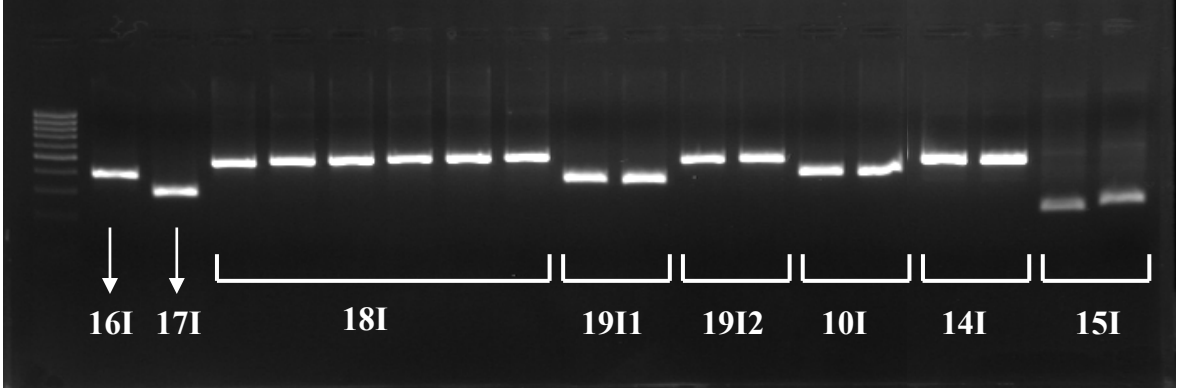
Çizelge 3.3. *PLG* geninin 19 ekzonunun çoğaltılması için uygulanan PCR reaksiyonlarına ait sıcaklık ve MgCl₂ konsantrasyonu ile standart PCR bileşenlerine ek kullanılan kimyasallar görülmektedir

EKZONLAR	SICAKLIK	MgCl₂ Konsantrasyonu	ÖZEL KOŞULLAR
EKZON 1	60°C	2,5 mM	%5 DMSO
EKZON 1 nested	55°C	2 mM	–
EKZON 2	50°C	2 mM	–
EKZON 3	57°C	3 mM	–
EKZON 4	55°C	2 mM	–
EKZON 5	60°C	2 mM	–
EKZON 5 nested	50°C	1,5 mM	–
EKZON 6	50°C	2 mM	–
EKZON 7	50°C	1,5 mM	–
EKZON 8	55°C	2 mM	–
EKZON 9	55°C	2 mM	–
EKZON 10	55°C	3 mM	–
EKZON 10 nested	55°C	2 mM	–
EKZON 11	57°C	2 mM	–
EKZON 11 nested	60°C	3 mM	–
EKZON 12-13	57°C	2 mM	–
EKZON 12 nested	50°C	1,5 mM	–
EKZON 13 nested	55°C	2 mM	–
EKZON 14-15	60°C	–	10XRDA Tamponu
EKZON 14 nested	50°C	2 mM	–
EKZON 15 nested	50°C	1,5 mM	–
EKZON 16-17	60°C	2,5 mM	–
EKZON 16 nested	60°C	3 mM	–
EKZON 17 nested	55°C	2 mM	–
EKZON 18-19	50°C	2,5 mM	–
EKZON 18 nested	50°C	2 mM	–
EKZON 19 nested I	50°C	2 mM	–
EKZON 19 nested II	50°C	2 mM	–

PCR reaksiyonları 96 kuyucuklu PCR platelerinde ya da 0.2 ml’lik eppendorf tüplerinde gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

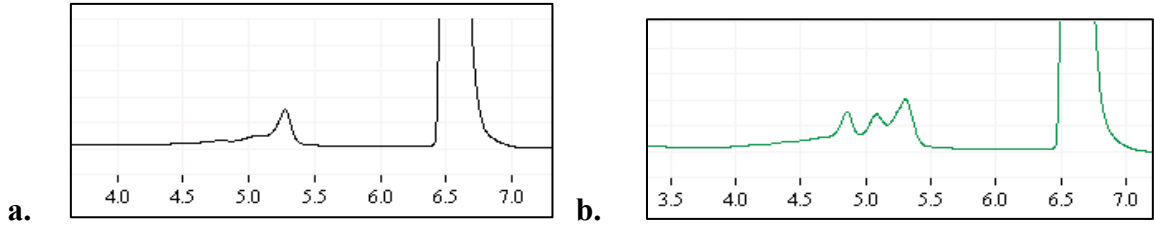
Agaroz (Sigma, ABD) kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Bu çalışmada PCR ürünlerini %2'lik agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiştir. %2'lik agaroz jel için 2 g agaroz tartılıp, TBE (Tris-Borik asit-EDTA) 1X solüsyonu ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır. TBE 5X solüsyonu; 54 g Trizma® (Sigma, ABD), 27,5 g Borik asit (Carlo Erba, İtalya), 20 ml 0,5 M EDTA (Sigma, ABD)'nın 800 ml kadar deiyonize suda çözünmesi ve ardından yine deiyonize su (ddH₂O) ile 1 l'ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılmış, üzerine Etidyum Bromür'ün (Sigma, ABD) %5'lik stok solüsyonundan 2'şer µl ilave edildikten sonra iyice karıştırılmış, jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülmüştür. 96'lık plateler kullanılarak yapılan PCR'ları yürütmek için ELECTRO-FAST® STRETCH SYSTEMS özel 96 kuyucuklu dar tarak aralığına sahip jel sistemi (ABgene, İngiltere) kullanılmış, plate kullanılmadan yapılan PCR'ları yürütmek için ise SCIE-PLAS jel sistemi (SCIE-PLAS, İngiltere) kullanılmıştır. Agarozun polimerizasyonu için yaklaşık 30 dk beklendikten sonra jel, tabağıyla birlikte jel elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilmiş ve elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulmuştur. PCR ürünlerinden 2 µl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 0.5 µl 6X loading dye yükleme boyası (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromofenol mavisi, 0.03% ksilen siyanol FF, 60% gliserol, 60 mM EDTA) (Fermentas, Litvanya) ile karıştırılmış ve jellerdeki kuyucuklara yüklenmiştir. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker PCR ürünleriyle birlikte jelle 2 µg kadar yüklenmiş ve LABNET POWER STATION 300 güç kaynağı (Labnet, Amerika) kullanılarak 90-100 V akımda 30 dk kadar yürütülmüştür (Wealtec, Tayvan). ELECTRO-FAST® STRETCH SYSTEMS jel sistemi kullanılarak hazırlanan jellerde marker olarak 200-500-1000 bç'lik üç banta sahip AB-0894: Electro-Fast® Marker (ABgene, İngiltere), diğer standart jel sistemi ile hazırlanmış jellerde yükleme yaparken GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder, 100-3000 bp (Fermentas, Litvanya) ya da GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Litvanya) kullanılmıştır. Elektroforez sonrası değerlendirme SYNGENE InGenius (SYNGENE, İngiltere) ultraviyole ışık kaynağına sahip görüntüleme sisteminde yapılmıştır.



Şekil 3.2. PCR örneklerinin %2'lik agaroz jel görüntüsü

3.2.5. DHPLC

Hazırlanan PCR örneklerine, mutasyon analizinin gerçekleştirilmesi için denatüre yüksek basınçlı sıvı kromatografisi(DHPLC) uygulanmıştır. DHPLC hassas ve güvenilir bir indirekt mutasyon analiz yöntemidir. Sistemin temeli, heterozigot PCR ürünlerinin ısıtılıp soğutulduktan sonra hibridizasyonla heterodupleks oluşturmalarına ve bu heteroduplekslerin saptanmasına dayanır. DHPLC analizi için Transgenomic WAVE® MD System 4000 Plus sistemi kullanılmıştır.



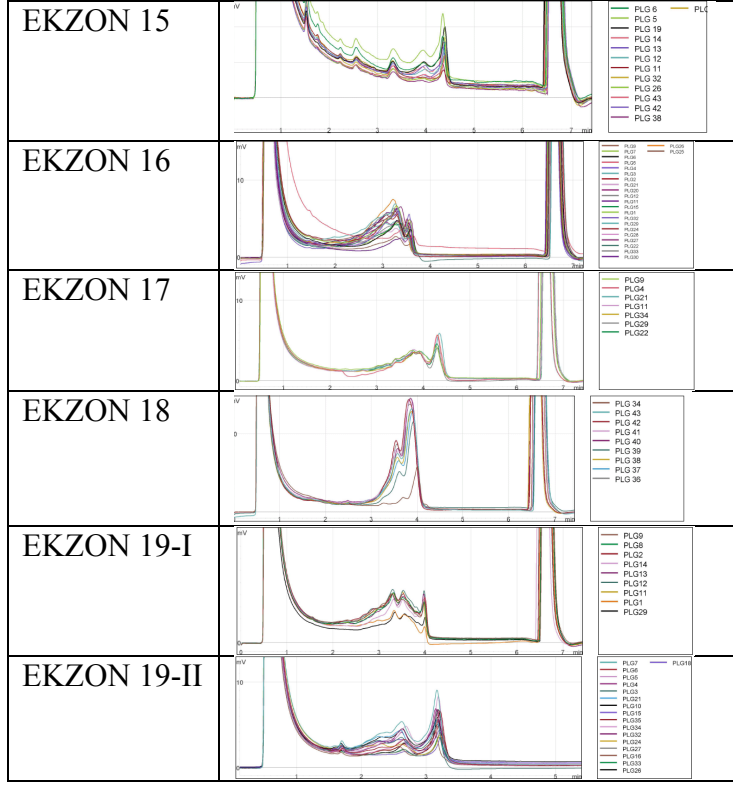
Şekil 3.3. a. Mutasyon taşıması nedeniyle homodupleks oluşturan ve tek pik veren yabancıl tip kontrol örneği(siyah) **b.** Heterozigot olması nedeniyle heterodupleks oluşturan örneğin(yeşil) DHPLC profilindeki farklılığa bağlı olarak ayrılması

Hazırlanan hastalara ait PCR örnekleri, DHPLC ile değerlendirilmek üzere ısı döngü cihazında önce denatüre edilip ardından renatürasyona tabi tutulmakta ve böylece heterodupleksler ile homoduplekslerin oluşumu sağlanmaktadır. Homo ve heteroduplekslerin oluşumunu sağlayan termal döngü programı: 95°C'da 5 dakika, 93°C'da 1 dakika, her döngüde 2°C düşüş ile 1 dakika olacak şekilde 26 döngü, 40°C'da 1

dakika şeklidir. Böylece, örnekler DHPLC ile çalışılmakta ve profil farklılıklarına göre sınıflandırılmaktadır. DHPLC analizi ile herbir ekzon, aşağıdaki tabloda listelenen sıcaklık derecelerinde değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.4. *PLG* geninin 19 ekzonunun DHPLC analizi için kullanılan sıcaklık değerleri

	1. SICAKLIK (°C)	2. SICAKLIK (°C)	3. SICAKLIK (°C)	4. SICAKLIK (°C)
EKZON 1	53	54.7	57.5	59
EKZON 2	60.2	-	-	-
EKZON 3	51.7	55	56.8	-
EKZON 4	56.7	58.5	62.5	-
EKZON 5	55	57.3	60.5	-
EKZON 6	53.5	57.2	59	60
EKZON 7	57.3	58.5	61	-
EKZON 8	52.5	57.3	60	61,1
EKZON 9	54	57	60.5	-
EKZON 10	54.6	57.5	60.7	-
EKZON 11	53.7	55	59	60.2
EKZON 12	54.8	58.3	59.3	62
EKZON 13	51.5	58	59.4	-
EKZON 14	58.6	-	-	-
EKZON 15	56.5	58.5	-	-
EKZON 16	56.5	59.7	-	-
EKZON 17	58.4	59.7	-	-
EKZON 18	56.8	59.2	62	-
EKZON 19-1	56	59.1	-	-
EKZON 19-2	55.8	58.3	59.2	-



Şekil 3.4. *PLG* geni ekzonlarına ait DHPLC profil örnekleri

3.2.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

DNA dizi analizi için 50 µl son hacimde hazırlanan PCR örnekleri, kolon bazlı bir saflaştırma sistemi olan Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kiti (Promega, Amerika) kullanılarak saflaştırılmıştır. Önce, kitin içinden çıkan toplama tüpleri içine kolonlar yerleştirilmiş ve toplama tüplerinin üzerine hasta numaraları yazılmıştır. Elektroforezden sonra tüpün içinde kalan 48 µl PCR ürününün üzerine aynı oranda yani 48 µl “membran binding solution” eklenmiş ve karıştırıldıktan sonra kolonlara aktarılmıştır. Kolonlar 14.000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Tüpün dibinde toplanan sıvı dökülmüş ve kolonlar tekrar aynı toplama tüpü içerisine konularak üzerlerine 700 µl “wash buffer” eklenmiştir. Tüpler 1 dakika 14.000 rpm’de santrifüj edilmiş ve tüpün dibindeki sıvı dökülerek kolonlar tekrar aynı toplama tüpü içerisine yerleştirilmiştir. Bu sefer kolonlar üzerine 500 µl wash buffer uygulanmış ve bu sefer 5 dakika 14.000 rpm’de santrifüj edilmiştir. Bu aşamada yeni 1,5 µl’lik eppendorf tüpler alınarak tüplerin üzerlerine ve kapağına hasta numaraları yazılmıştır. Santrifüj sonrası toplama tüpünün içindeki sıvı dökülerek kolonlar 14.000 rpm’de 1 dakika boş çevrilmiş ve kalan sıvının da

böylelikle uzaklaşması sağlanmıştır. 1 dakika sonunda tüpler, hazırlanan 1,5 µl'lik eppendorfların içine yerleştirilmiş ve kolonun ortasına kit içerisinde yer alan nükleazlardan yoksun sudan 25 µl konulmuştur. Tüpler 1 dakika beklendikten sonra 14.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve tüpün dibinde su içinde çözülmüş halde saflaştırılmış PCR ürünü elde edilmiştir.

Elde edilen saf PCR ürünleri yukarıda anlatıldığı şekilde %2'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülmüş ve görüntülenmiştir.

3.2.7. DNA Dizi Analizi

Yöntemde, kimyasal değişikliğe uğratılmış dideoksinükleozittrifosfatlar (ddNTP) kullanılarak bir dizi DNA parçacıkları elde edilmektedir. ddNTP'nin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmaz. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır ancak 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Sekans reaksiyonu sonunda DNA zincir sentezi her bir noktada durmuş olur. Böylece birbirinden sadece bir baz fark içeren fragmentler dizisi oluşur. Otomatize analiz sistemlerinde birbirinden bir baz farklılık içeren bu fragmentler dizisi kapiller elektroforez ile değerlendirilir.

Protokol şu şekildedir:

- DHPLC çalışması sonucu belirlenen her farklı profile ait örnek grubunu temsil eden bir ya da iki adet referans örnek "DNA Dizi Analizi" için hazırlanmıştır.
- Söz konusu referans örneklerin önce PCR'ı yapılmış ardından PCR örnekleri kolon bazlı bir saflaştırma sistemi olan Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System kiti kullanılarak saflaştırılmıştır.
- Saflaştırılmış örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezi ile değerlendirilmiş ve kalite kontrolü yapılmıştır.
- Kalitesi belirlenen saflaştırılmış PCR örnekleri DNA dizi analiz reaksiyonunun kurulması için kalıp olarak kullanılmış ve özel kitler yardımıyla DNA dizi analiz reaksiyonu kurulmuştur.

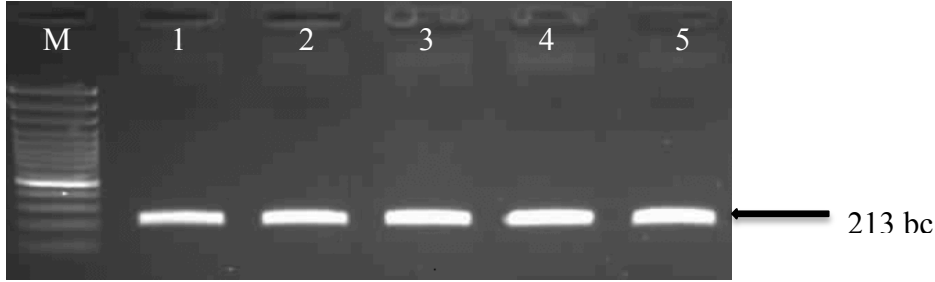
- Sekans reaksiyonu için 0,2 ml'lik, 96 tane kuyucuk içeren plaklar kullanılmıştır.
- Her bir kuyucuğa 8 µl DTCS Quick start master karışımı, 20 pmol primer, 0,5-10 µl saflaştırılmış PCR ürünü ve son hacmi 20 µl'ye tamamlayacak şekilde distile su kullanılarak dizi analiz reaksiyonu kurulmuştur.
- Sekans reaksiyonu 96°C'da 20 saniye, 50°C'da 20 saniye ve 60°C'da 4 dakika olacak şekilde termal döngü cihazında gerçekleştirilmiştir (Biometra, Almanya).
- Dizi analizi reaksiyonu sonrası, reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğun dibine 5 µl durdurma solüsyonu (1,5 M C₂H₃O₂Na, 50 mM EDTA, 20 mg/ml'lik Glikojen) pipetlenmiştir.
- Örneklerin üzerine 60 µl %95'lik soğuk etanol eklenmiş ve +4°C'de 4000 rpm'de 30 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.
- Üstteki kısım dökülerek %70'lik alkolden 200 µl eklenmiş, +4°C'de 4000 rpm'de 5 dk santrifüjlenmiştir.
- Santrifüj sonrası üstteki kısım dökülmüş ve işlem bir kez daha tekrarlanmıştır.
- Sonra plak 300 rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifüjlenerek fazla etanol uzaklaştırılmıştır.
- Plak, liyofilizatör cihazına (Thermo, ABD) yerleştirilmiş ve yüksek vakum altında örnekler kurutulmuştur.
- Kuruyan örneklerin üzerine 25 µl formamid içeren solüsyondan konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlanmıştır.
- Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak DNA dizi analizi cihazına yerleştirilmiş (CEQ8000XL, Beckman Coulter, ABD) ve cihazın bağlı bulunduğu bilgisayar aracılığı ile sonuçlar pikler şeklinde görüntülenmiştir.
- DNA dizi analiz sonuçları "Sequencher 4.7" programında değerlendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Yeni Saptanan Anlamsız (Nonsense) Mutasyonlar

4.1.1. Cys30Ter

PLG geninin ikinci ekzonunda sistein aminoasitini kodlayan TGT kodonunun TGA sonlanma kodonuna dönüşümüne neden olan bir T>A değişimi saptanmış ve değişim Cys30Ter olarak isimlendirilmiştir. Cys30Ter anlamsız mutasyonunun, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren “Human Genome Mutation Database” (İnsan Genom Mutasyon Veritabanı) (HGMD) e-veritabanında değerlendirilmesi sonucu, literatürde daha önce bildirilmediği dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. Mutasyonun isimlendirilmesi HGMD kayıtlarındaki *PLG* dizisine göre yapılmıştır.

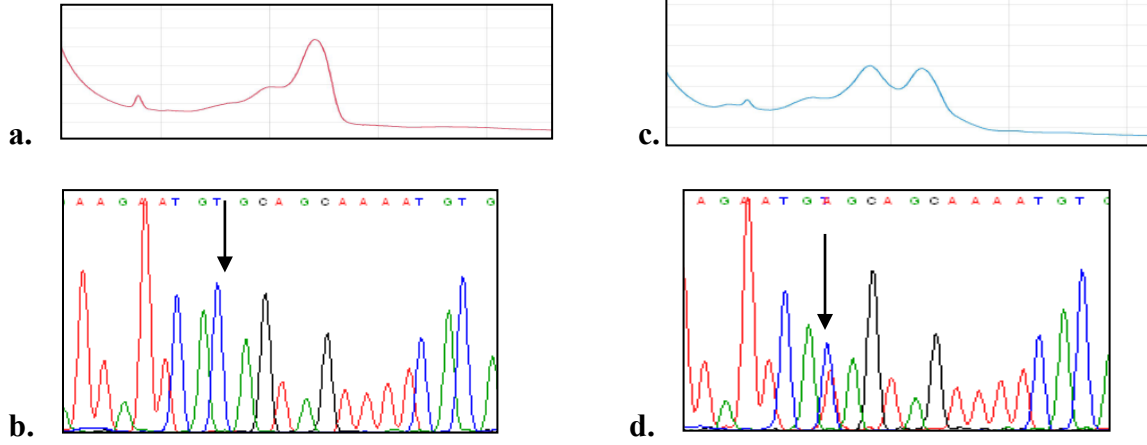


Şekil 4.1. 213 bp uzunluğundaki ikinci ekzonun %2'lik agaroz jel elektroforez görüntüsü

M: Fermentas GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder

1-5 nolu örnekler: Hasta grubuna ait 213 bp'lik PCR ürünleri

Söz konusu mutasyon, DHPLC analizinde şüpheli görünüme sahip örneğin DNA dizi analizi ile değerlendirilmesi suretiyle saptanmıştır. Mutasyon taşımadığı bilinen yabancı tip kontrol örneği ile hasta örneklerinin DHPLC profillerinin karşılaştırılması sonucu, yabancı tipin sergilediği profilden farklı profil sergileyen örnekler DNA dizi analizi ile değerlendirilmiştir. DNA dizi analizi sonrası tek bir hastada Cys30Ter anlamsız mutasyonu heterozigot durumda saptanmıştır, mutasyonu taşıdığı belirlenen örneğin DHPLC profili ve DNA dizi analizi görüntüsü aşağıdaki şekilde görülmektedir. Mutasyon 19 ekzonlu *PLG* geninin ikinci ekzonunda meydana gelmesi ve transkripsiyonu oldukça erken bir aşamada sonlandırması açısından önem arz etmektedir.



Şekil 4.2. a. Cys30Ter mutasyonunu taşımayan homozigot yabancı tip örneğin DHPLC profili b. Cys30Ter mutasyonunu taşımayan homozigot yabancı tip örneğin DNA dizi analizi görüntüsü c. Cys30Ter mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DHPLC profili d. Cys30Ter mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

İkinci ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```
ctgaccattattccaacttgatctccacctctagGTCAAGGAGAGCCTCTGGATGACTATGTGAAT
ACCCAGGGGGCTTCACTGTTCACTGTCAGTGTCACTAAGAAGCAGCTGGGAGCAGGAAG
TATAGAAGAATGTGCAGCAAAATGTGAGGAGGACGAAGAATTCACCTGCAGgt
atttcattgtcgttgacactacgcaggaatctgtaatt
```

Dizi 4.1. 213 bç'den oluşan ikinci ekzon üzerinde Cys30Ter anlamsız mutasyonuna neden olan T>A değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İtronlar küçük, ikinci ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

Cys30Ter değişiminin transkriptte denk geldiği nokta ve neden olduğu değişim "Ensembl" e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve aşağıda gösterilmiştir.

```

          Y K
CAGCTGGGAGCAGGAAGATAGAAGAATGTGCAGCAAAATGTGAGGAGGACGAAGAATTC
CAGCTGGGAGCAGGAAGTATAGAAGAATGTGCAGCAAAATGTGAGGAGGACGAAGAATTC
-Q--L--G--A--G--S--I--E--E--C--A--A--K--C--E--E--D--E--E--F--

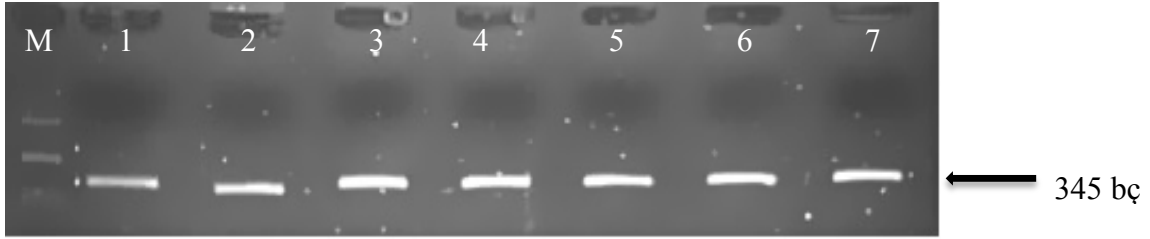
```

Dizi 4.2. PLG cDNA'sında Cys30Ter değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. Cys30Ter mutasyonuna neden olan T>A değişiminin gerçekleştiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

4.2. Yeni Saptanan Ayıklama Bölgesi (Splice Site) Mutasyonları

4.2.1. +1 IVS6 G>A

PLG geninin altıncı ekzonunun bitimini takip eden altıncı intronun ilk bazında bir G>A değişimi saptanmış ve değişim mutasyon isimlendirme kurallarına göre +1 IVS6 G>A olarak isimlendirilmiştir. +1 IVS6 G>A değişiminin, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren “Human Genome Mutation Database” (HGMD) e-veritabanında değerlendirilmesi sonucu, literatürde daha önce bildirilmediği dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir.

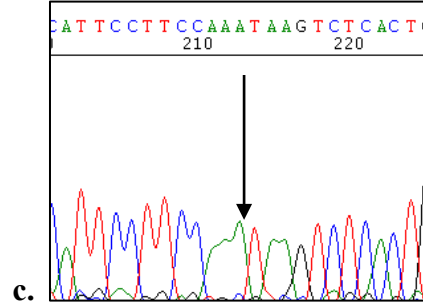
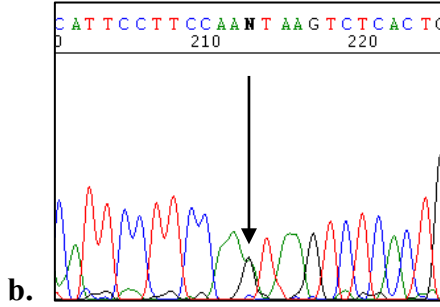
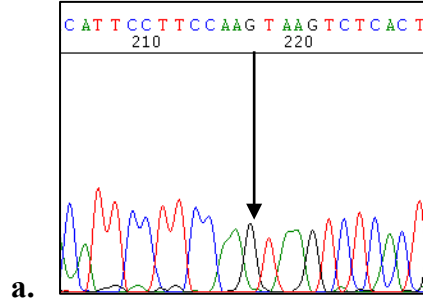


Şekil 4.3. 345 bp uzunluğundaki altıncı ekzonun %2’lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.

M: AB-0894: Electro-Fast® Marker

1-7 nolu örnekler: Hasta grubuna ait 345 bp’lik PCR ürünleri

+1 IVS6 G>A mutasyonu hasta grubumuzdaki iki hastada homozigot ve söz konusu hastalardan birinin anne ile babasında heterozigot olarak saptanmıştır. Mutasyonu taşıyan hastalardan birinin kliniğinde ligoz konjunktivite ek olarak hidrosefali de mevcuttur. Mutasyonu taşımayan yabancı tip birey ile mutasyonu heterozigot ve homozigot durumda taşıyan bireylerin DNA dizi analiz görüntüsü şekilde görülmektedir.



Şekil 4.4. a. +1 IVS6 G>A değişimini taşımayan homozigot yabancıl tip örneğin DNA dizi analiz görüntüsü b. +1 IVS6 G>A değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü c. +1 IVS6 G>A değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

Altıncı intronun ilk bazında meydana gelen +1 IVS6 G>A değişiminin meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```
gaattacatcggaatgagaggcaagtcgcacttaagtgagtaggattctggttttactctctattttgcttcatccatttcagttttcttctt
cctctctgtccttcttcccactctgtccagAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACCTATGAC
GGCAAATTTCCAAGACCATGTCTGGACTGGAATGCCAGGCCTGGGACTCTCA
GAGCCCACACGCTCATGGATACATTCCTTCCAAgtaagtctcactgggaaaaacattccatgtttaat
taaggctctgcagctctatcagacatttgctgtcatttagatatttagcattcctcaagaagt
```

Dizi 4.3. 345 bç'den oluşan altıncı ekzon üzerinde +1 IVS6 G>A değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İtronlar küçük, altıncı ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

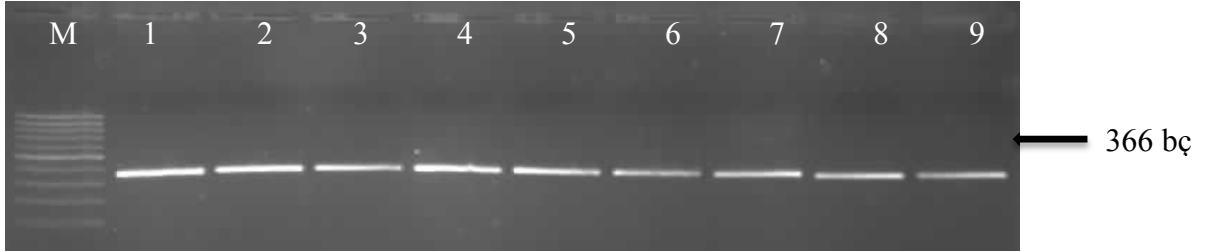
Mutasyon çoğu gende intron başlangıcında ayıklama işaretçisi olarak bulunan GT dizisinde meydana geldiğinden, ayıklama mekanizmasını etkileyebileceği ve bu nedenle transkript yapısını değiştirerek proteinin fonksiyonunu etkileyebileceği düşünülmektedir.

4.3. Saptanan Yanlış Anlamlı (Missense, nonsynonymous) Mutasyonlar

4.3.1. Yeni Saptanan Yanlış Anlamlı Mutasyonlar

4.3.1.1. Glu161Lys

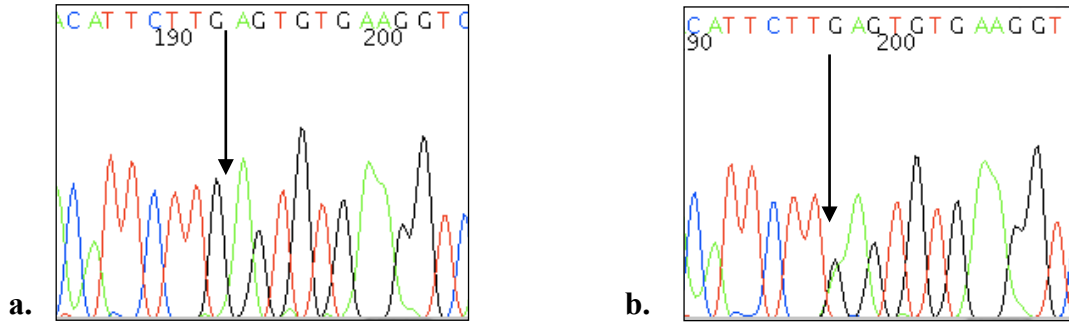
PLG geninin beşinci ekzonunda glutamik asit'in lizin'e dönüşümüne neden olan bir G>A değişimi saptanmış ve değişim Glu161Lys olarak isimlendirilmiştir. Glutamik asit (E) i kodlayan GAG kodonu, AAG şeklinde değişerek lizin aminoasitini kodlar duruma gelmiştir. Glu161Lys yanlış anlamlı mutasyonunun, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren "Human Genome Mutation Database" (HGMD) e-veritabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. Mutasyonun isimlendirilmesi HGMD kayıtlarındaki *PLG* dizisine göre yapılmıştır. Çalışma grubumuzda, söz konusu mutasyon sadece çalışma grubumuzdaki bir hasta ve akrabasında heterozigot durumda saptanmıştır.



Şekil 4.5 366 bç uzunluğundaki beşinci ekzonun %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

M: Fermentas GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder

1-9 nolu örnekler: Hasta grubuna ait 366 bç'lik PCR ürünleri



Şekil 4.6. a. Glu161Lys değişimi taşımayan homozigot yabanıl tip bir örneğin DNA dizi analizi görüntüsü **b.** Glu161Lys değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

Beşinci ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```

gatgacaatctcagatgggaatcgagagcatctccttctgccttgctaataagcaagctgattttagaatatagtctaagtctcttttc
catcctccccagATTCTCACCTGCTACACACCCCTCAGAGGGACTGGAGGAGAACTAC
TGCAGGAATCCAGACAACGATCCGCAGGGGCCCTGGTGCTATACTACTGATCC
AGAAAAGAGATATGACTACTGCGACATTCTTGAGTGTGAAGGgtcaggagtgggtctagaa
aatgttttcattctgccttcacctgtaaataattgttgtaaagcccctcccacagggatgttattaataattgagtaacgtattcacc
tctcgaaaga
  
```

Dizi 4.4. 366 bç'den oluşan beşinci ekzon üzerinde Glu161Lys yanlış anlamlı mutasyonuna neden olan G>A değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İntronlar küçük, beşinci ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

Glu161Lys değişiminin transkriptte denk geldiği nokta ve neden olduğu aminoasit değişimi “Ensembl” e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve aşağıda gösterilmiştir.

```

GAGTGTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAACTATGACGGCAAAATTTCCAAG
GAGTGTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAACTATGACGGCAAAATTTCCAAG
-E--C--E--E--E--C--M--H--C--S--G--E--N--Y--D--G--K--I--S--K-
  
```

Dizi 4.5. *PLG* cDNA'sında Glu161Lys değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. Glu161Lys mutasyonuna neden olan G>A değişiminin gerçekleştiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

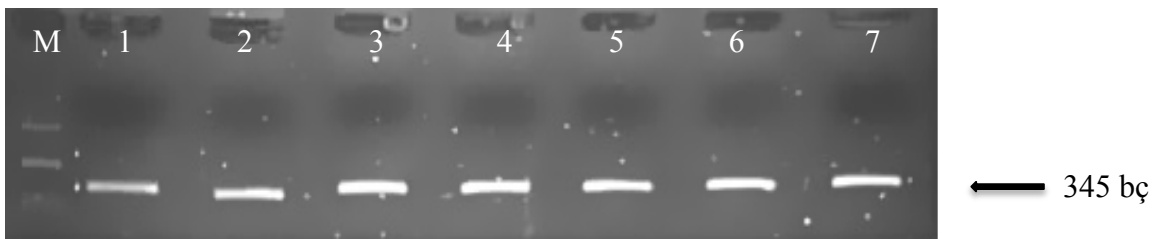
NCBI e-veritabanı içerisinde yer alan “multiple alignment tool” seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Glu161Lys mutasyonunun türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktaya denk geldiği belirlenmiştir. Bu durum glutamik asit’in bulunduğu konumun, PLG fonksiyonu açısından önemli olduğunu ve bu noktadaki değişimin PLG’in fonksiyonunu etkileyebileceğini göstermektedir, bu nedenle birbirinden farklı dört organizmada da aynı konumda yer alacak şekilde korunmuştur.

Çizelge 4.1. Sırası ile insan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizileri karşılaştırıldığında Glu161Lys mutasyonu ile lizine dönüşen glutamik asit’in türler arasında korunduğu ve dolayısıyla kritik öneme sahip bir noktada bulunduğu belirlenmiştir. Değişimin olduğu nokta kırmızı ile işaretlenmiştir.

İnsan	GPWCYTTDPEKRYDYCDIL E CEEECMHCSGENYDYGKISKTMSGLEC
Şempanze	GPWCYTTDPEKRYDYCDIL E CEEECMHCSGENYDYGKISKTMSGLEC
Domuz	GPWCYTTDPETRFDYCDI P CEDECMHCSGEHYEGKISKTMSGIEC
Fare	GPWCYTTDPDKRYDYCNIP E CEEECMYCSGEKYEGKISKTMSGLCD

4.3.1.2. Gly199Val

PLG geninin altıncı ekzonunda glisin’in valin’e dönüşümüne neden olan bir G>T değişimi saptanmış ve değişim Gly199Val olarak isimlendirilmiştir. Glisin’i kodlayan GGA kodonu, GTA şeklinde değişerek valin aminoasitini kodlar duruma gelmiştir. Gly199Val yanlış anlamlı mutasyonunun, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren “Human Genome Mutation Database” (HGMD) e-veritabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. Mutasyonun isimlendirilmesi HGMD kayıtlarındaki *PLG* dizisine göre yapılmıştır.

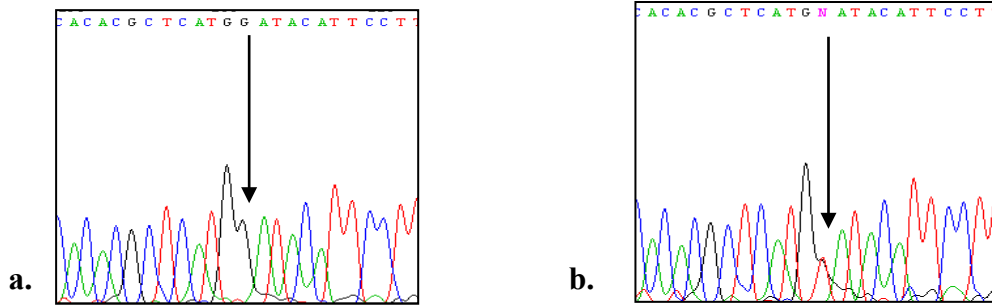


Şekil 4.7. 345 bp uzunluğundaki altıncı ekzonun %2’lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.

M: AB-0894: Electro-Fast® Marker

1-7 nolu örnekler: Hasta grubuna ait 345 bp’lik PCR ürünleri

Söz konusu mutasyonu birbiriyle bağlantısız iki lignöz konjunktivit hastasının heterozigot durumda taşıdığı belirlenmiştir. Mutasyon direkt olarak DNA dizi analizi ile saptanmış olup mutasyona ait DNA dizi analiz görüntüsü aşağıda görülmektedir.



Şekil 4.8. a. Gly199Val mutasyonunu taşımayan homozigot yabancıl tip örneğin DNA dizi analizi görüntüsü **b.** Gly199Val mutasyonunu heterozigot durumda taşıyan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü

Altıncı ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```
gaattacatcggaatgagaggcaagtcgcacttaagtgagtaggattctggttttactctctattttgcttcattccattcagttttctt
cttctctctgtccttcttccactctgtccagAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACCTAT
GACGGCAAATTTCCAAGACCATGTCTGGACTGGAATGCCAGGCCTGGGAC
TCTCAGAGCCCACACGCTCATGGATACATTCCTTCCAAgtaagtctcactgggaaaaacatt
ccatgttaattaaggctctgcagctctatcagacatttgcatttagatatttagcattctcaagaagt
```

Dizi 4.6. 345 bp'den oluşan altıncı ekzon üzerinde Gly199Val yanlış anlamlı mutasyonuna neden olan G>T değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İtronlar küçük, altıncı ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

```
ACCATGTCTGGACTGGAATGCCAGGCCTGGACTTCTCAGAGCCCACACGCTCATGGATAC
ACCATGTCTGGACTGGAATGCCAGGCCTGGACTTCTCAGAGCCCACACGCTCATGGATAC
-T--M--S--G--L--E--C--Q--A--W--D--S--Q--S--P--H--A--H--G--Y-
```

Dizi 4.7. *PLG* cDNA'sında Gly199Val değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. Gly199Val mutasyonuna neden olan G>T değişiminin gerçekleştiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

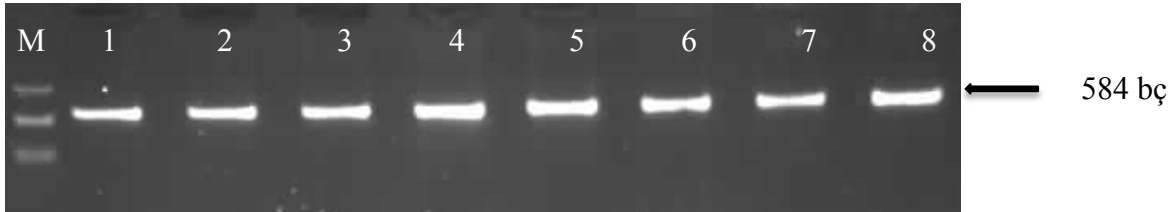
NCBI e-veritabanı içerisinde yer alan “multiple alignment tool” seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Gly199Val mutasyonunun türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktaya denk geldiği belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Sırası ile insan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizileri karşılaştırıldığında Gly199Val mutasyonu ile valin'e dönüşen glisin'in türler arasında arasında korunduğu ve dolayısıyla kritik öneme sahip bir noktada bulunduğu belirlenmiştir. Değişimin olduğu nokta kırmızı ile işaretlenmiştir.

İnsan	GENYDGKISKTMSGLECAWDSQSPHAHG Y IPSKFPNKNLKKNYCR
Şempanze	GENYDGKISKTMSGLECAWDSQSPHAHG Y IPSKFPNKNLKKNYCR
Domuz	GEHYEGKISKTMSGIECQSWGSSQSPHAHG Y LPSKFPNKNLKMNYCR
Fare	GEKYEGKISKTMSGGLDCAWDSQSPHAHG Y IPAKFPSKNLKMNYCR

4.3.1.3. Tyr264Cys

PLG geninin sekizinci ekzonunda tirozin'in sistein'e dönüşümüne neden olan bir A>G değişimi saptanmış ve değişim Tyr264Cys olarak isimlendirilmiştir. Tirozin'i kodlayan TAT kodonu, TGT şeklinde değişerek sistein aminoasitini kodlar duruma gelmiştir. Tyr264Cys yanlış anlamlı mutasyonunun, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren "Human Genome Mutation Database" (HGMD) e-veritabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. Mutasyonun isimlendirilmesi HGMD kayıtlarındaki *PLG* dizisine göre yapılmıştır.

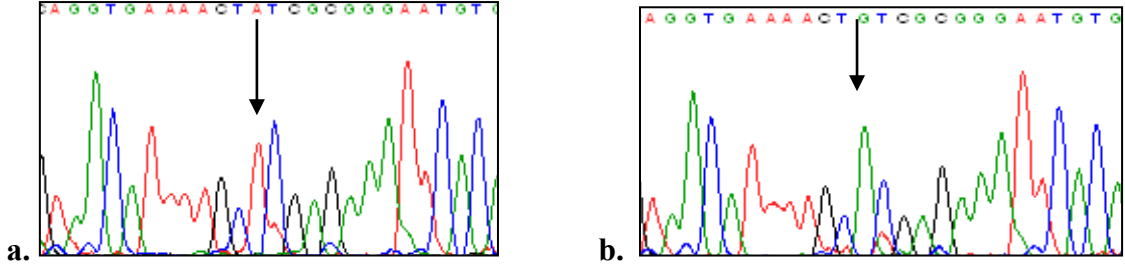


Şekil 4.9. 584 bp uzunluğundaki sekizinci ekzonun %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü

M: AB-0894: Electro-Fast® Marker

1-8 nolu örnekler: Hasta grubuna ait 584 bp'lik PCR ürünleri

Söz konusu mutasyon sadece tek bir hastada homozigot durumda saptanmıştır. Mutasyon homozigot durumda saptandığı için örneklerin DHPLC profilleri mutasyonu teşhis eder nitelikte değildir. Şekilde mutasyonu taşıyan hastanın DNA dizi analiz görüntüsü görülmektedir.



Şekil 4.10. a. Tyr264Cys mutasyonunu taşımayan homozigot yabancı tip örneğin DNA dizi analiz görüntüsü **b.** Tyr264Cys mutasyonunu homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

Sekizinci ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```

aacatccatctgtgcattctctattttaaaattattcattgtagggctgggcacgggtggctcacgcctgtaatcccagcacttccggagg
ccgaggtgggcggatcacgaggtcaggagttcaagaccaacctggccaatatgatgaaccccaccttactaaaaatacaaaa
aaattagccagttgtggtgacacgcacctgtagtctgagctactcgggaggctgaggcaggagaatgacttgaaccaggaggc
agaggtgacgtgagctgagatcgtgccactgactccagcctgggcgacagagcgagactccgtctcaaaaaatatatatattcatt
gtaactattttgccattcaagCAACACCTCCACCATCTTCTGGTCCCACCTACCAGTGTCTG
AAGGGAACAGGTGAAAACATCGCGGGAATGTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCAC
CACCTGTCAGCACTGGAGTGCACAGACCCCTCACACACATAACAGGACACCAG
AAAACTCCCCTGCAAgtaatccccctcggtctcattctgctgctatggaatgtgaaatcccattgac

```

Dizi 4.8. 584 bç'den oluşan sekizinci ekzon üzerinde Tyr264Cys yanlış anlamlı mutasyonuna neden olan A>G değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İtronlar küçük, onbirinci ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

Tyr264Cys değişiminin transkriptte denk geldiği nokta ve neden olduğu aminoasit değişimi "Ensembl" e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve aşağıda gösterilmiştir.

```

GGTGAAAACTATCGCGGGAATGTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCAGCACTGG
GGTGAAAACTATCGCGGGAATGTGGCTGTTACCGTGTCCGGGCACACCTGTCAGCACTGG
-G--E--N--Y--R--G--N--V--A--V--T--V--S--G--H--T--C--Q--H--W-

```

Dizi 4.9. PLG cDNA'sında Tyr264Cys değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. Tyr264Cys mutasyonuna neden olan A>G değişiminin gerçekleştiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG0000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

NCBI e-veritabanı içerisinde yer alan "multiple alignment tool" seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla

Tyr264Cys mutasyonunun türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktaya denk geldiği belirlenmiştir.

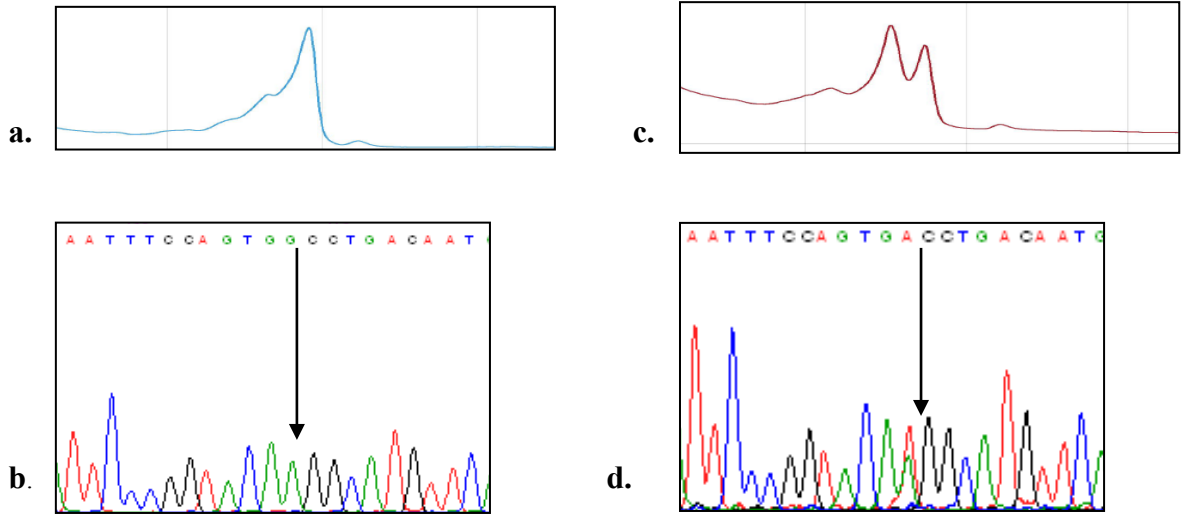
İnsan	RCTTPPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPH
Şempanze	RCTTPPPSSGPTYQCLKGTGENYRGNVAVTVSGHTCQHWSAQTPH
Domuz	RCTTPPPTSGPTYQCLKGRGENYRGTVSVTASGHTCQRWSAQSPH
Fare	RCTTPPPPSPTYQCLKGRGENYRGTVSVTVSGKTCQRWSEQTPH

Çizelge 4.3. Sırası ile insan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizileri karşılaştırıldığında Tyr264Cys mutasyonu ile sistein'e dönüşen tirozin'in türler arasında arasında korunduğu ve dolayısıyla kritik öneme sahip bir noktada bulunduğu belirlenmiştir. Değişimin olduğu nokta kırmızı ile işaretlenmiştir.

4.3.1.4. Gly401Asp

PLG geninin onbirinci ekzonunda glisin'in aspartik asit'e dönüşümüne neden olan bir G>A değişimi saptanmış ve değişim Gly401Asp olarak isimlendirilmiştir. Glisin (G)'i kodlayan GGC kodonu, GAC şeklinde değişerek aspartik asit aminoasitini kodlar duruma gelmiştir. Gly401Asp yanlış anlamlı mutasyonunun, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren "Human Genome Mutation Database" (HGMD) e-veritabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. Mutasyonun isimlendirilmesi HGMD kayıtlarındaki *PLG* dizisine göre yapılmıştır.

Söz konusu mutasyon, DHPLC analizinde şüpheli görünüme sahip örneğin DNA dizi analizi ile değerlendirilmesi suretiyle saptanmıştır. DNA dizi analizi sonrası Gly401Asp yanlış anlamlı mutasyonunu taşıdığı belirlenen örneğin DHPLC profili şekilde görülmektedir.



Şekil 4.11. a. Gly401Asp mutasyonunu taşımayan homozigot yabancıl tip örneğin DHPLC profili b. Gly401Asp mutasyonunu taşımayan homozigot yabancıl tip örneğin DNA dizi analiz görüntüsü c. Gly401Asp mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DHPLC profili d. Gly401Asp mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

Gly401Asp mutasyonu ligoz konjunktivit hastalarının hiçbirinde saptanmayıp PLG 48 kodlu hasta yakınında heterozigot olarak belirlenmiştir. Mutasyonu taşıyan hasta yakını hastanın annesi olup işitme engelli olduğu bilinmektedir.

Onbirinci ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```

cttgaaatgtacacagttgttagaagttgaggaccatTTTTgttggtacaacattattgtacctataatgggaatatttcaaagc
cactgttaacactttgttagaacaaaatgtagagggtgctgggtgccctgaatattctcccactctgtgacctgtattgttt
ggaatttcagTG CCTGACAATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCCGATAAA
GGCCCCTGGTGTTTTACCACAGACCCAGCGTCAGGTGGGAGTACTGCAA
CCTGAAAAAATGCTCAGGAACAGAAGCGAGTGTTGTAGCACCTCCGCCTG
TTGTCCTGCTTCCAGATGTAGAGACTCCTTCCGAAGAAGgtaagaaatctgtgctgg
acatctacacacttgacgctgggatgaaaagccatggaaaatctcactgatgcagaaacctccatgctacacagaaatc
aagtgttttagagggtctgcatgtggaaggaagcctcagtcactctcaaggaggcagaggtgtgactttggcaca
cgtgagtggtgctgcttaggacaggtgcaaacctcaaggtgctcaactaaccactcactt

```

Dizi 4.10. 618 bç'den oluşan onbirinci ekzon üzerinde Gly401Asp yanlış anlamlı mutasyonuna neden olan G>A değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İtronlar küçük harfler, onbirinci ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

Gly401Asp değişiminin transkriptte denk geldiği nokta ve neden olduğu aminoasit değişimi "Ensembl" e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve dizide gösterilmiştir.

GCCCTGACAATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCCGATAAAGGCCCCCTGGTGTGTTTACC
 GGCCCTGACAATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCCGATAAAGGCCCCCTGGTGTGTTTACC
 -G--L--T--M--N--Y--C--R--N--P--D--A--D--K--G--P--W--C--F--T-

Dizi 4.11. PLG cDNA'sında Gly401Asp mutasyonunun meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. Gly401Asp mutasyonuna neden olan G>A değişiminin gerçekleştiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

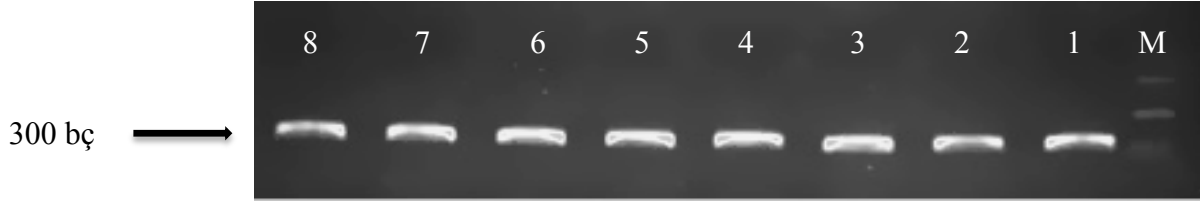
NCBI e-veritabanı içerisinde yer alan “multiple alignment tool” seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Gly401Asp mutasyonunun türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktaya denk geldiği belirlenmiştir. Bu durum glutamik asit'in bulunduğu konumun, PLG fonksiyonu açısından önemli olduğunu ve bu noktadaki değişimin PLG'nin fonksiyonunu etkileyebileceğini göstermektedir.

Çizelge 4.4. Sırası ile insan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizileri karşılaştırıldığında Gly401Asp mutasyonu ile aspartik asit'e dönüşen glisin'in türler arasında korunduğu ve dolayısıyla kritik öneme sahip bir noktada bulunduğu belirlenmiştir. Değişimin olduğu nokta kırmızı ile işaretlenmiştir.

İnsan	WSSMTPHRHQKTPENYPNAGLTMNYCRNPDADKGPWCFTTDPSVR
Şempanze	WSSMTPHRHQKTPENYPNAGLTMNYCRNPDADKGPWCFTTDPSVR
Domuz	WVSMTPHRHEKTPGNFPNAGLTMNYCRNPDADKSPWCYTTPRVR
Fare	WAAMFPHRHSKTPENFPDAGLEMNYCRNPDGDKGPWCYTTPDPSVR

4.3.1.5. Gly684Asp

PLG geninin onyedinci ekzonunda glisin'in aspartik asit'e dönüşümüne neden olan bir G>A değişimi saptanmış ve değişim Gly684Asp olarak isimlendirilmiştir. Glisin'i kodlayan GGC kodonu, GAC şeklinde değişerek valin aminoasitini kodlar duruma gelmiştir. Gly684Asp yanlış anlamlı mutasyonunun, “Human Genome Mutation Database” (HGMD) e-veritabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. Mutasyonun isimlendirilmesi HGMD kayıtlarındaki PLG dizisine göre yapılmıştır.

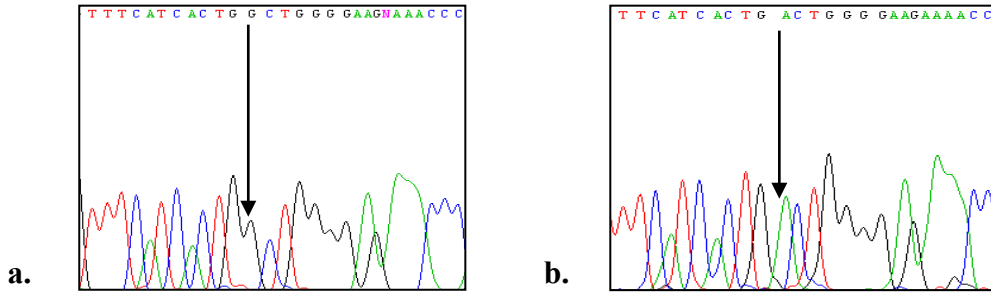


Şekil 4.12. 300 bç uzunluğundaki onyedinci ekzonun %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.

M: AB-0894: Electro-Fast® Marker

1-8 nolu örnekler: Hasta grubuna ait 300 bç'lik PCR ürünleri

Söz konusu mutasyonu, lignöz konjuktivit hastalarından sadece birinin homozigot durumda taşıdığı belirlenmiştir. Mutasyon direkt olarak DNA dizi analizi ile saptanmış olup mutasyona ait DNA dizi analiz görüntüsü şekilde görülmektedir.



Şekil 4.13. a. Gly684Asp mutasyonunu taşımayan homozigot yabani tip örneğin DNA dizi analizi görüntüsü **b.** Gly684Asp mutasyonunu homozigot durumda taşıyan örneğin DNA dizi analiz görüntüsü

Onyedinci ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```
gcagagcagtcacaacataactgctgatgcttttcttcagTCCTGCCGTCATCACTGACAAAGTAATCCC
AGCTTGCTGCCATCCCCAAATTATGTGGTCGCTGACCGGACCGAATGTTTCAT
CACTGGCTGGGGAGAAACCCAAGgtgagataaattccattgccacataacgaattggtttgacctacagtc
atgtacaaaatgatcattttggagaaagctgtgcaaattcctatccatgaatgtgtccacccactcctgattttgctgggacctgt
ctatgtcttaa
```

Dizi 4.12. 300 bç'den oluşan onyedinci ekzon üzerinde Gly684Asp yanlış anlamlı mutasyonuna neden olan G>A değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İntronlar küçük, onyedinci ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

TTCATCACTGCTGGGGAGAAACCCAAGGTACTTTTGGAGCTGGCCTTCTCAAGGAAGCC
TTCATCACTGGCTGGGGAGAAACCCAAGGTACTTTTGGAGCTGGCCTTCTCAAGGAAGCC
-F--I--T--G--W--G--E--T--Q--G--T--F--G--A--G--L--L--K--E--A--

Dizi 4.13. PLG cDNA'sında Gly684Asp değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. Gly684Asp mutasyonuna neden olan G>A değişiminin gerçekleştiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

NCBI e-veritabanı içerisinde yer alan “multiple alignment tool” seçeneği kullanılarak sırası ile insan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Gly684Asp mutasyonunun türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktaya denk geldiği belirlenmiştir.

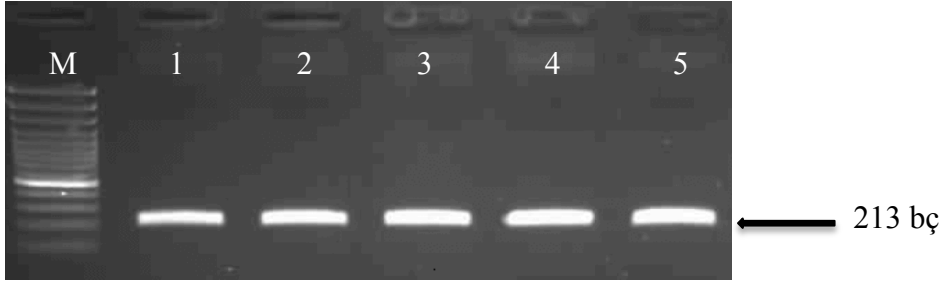
Çizelge 4.5. Sırası ile insan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizileri karşılaştırıldığında Gly684Asp mutasyonu ile aspartik asit'e dönüşen glisin'in türler arasında korunmuş ve dolayısıyla kritik öneme sahip bir noktada bulunduğu belirlenmiştir. Değişimin olduğu nokta kırmızı ile işaretlenmiştir.

İnsan	ALLKLSSPAVITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGTFGA
Şempanze	ALLKLSSPAIITDKVIPACLPSPNYVVADRTECFITGWGETQGTFGA
Domuz	ALLKLSSPAIITDKVIPACLPTPNYVVADRTACYITGWGETKGTGGA
Fare	ALLKLSRPATITDKVIPACLPSPNYMVADRTICYITGWGETQGTFGA

4.3.2. Saptanan Bilinen Yanlış Anlamlı Mutasyonlar

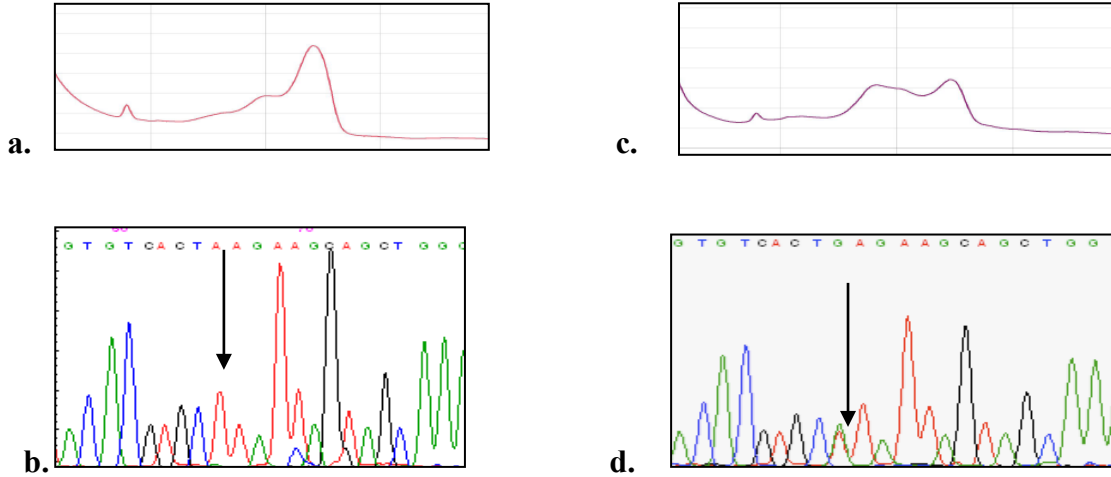
4.3.2.1. Lys19Glu (K19E)

PLG geninin ikinci ekzonunda lizin'in glutamik asit'e dönüşümüne neden olan bir A>G değişimi saptanmış olup bu değişimin literatürde bahsi geçen Lys19Glu olduğu belirlenmiştir. Lizin (K)'i kodlayan AAG kodonu, GAG şeklinde değişerek glutamik asit (E)'i kodlar duruma gelmiştir. Lys19Glu yanlış anlamlı mutasyonu HGMD'de yer almakta olup ayrıca çeşitli çalışmalarda da bildirilmiştir. Söz konusu mutasyon, 2003 yılındaki bir çalışmada ailesel hipoplazminojenemi'nin temel nedeni olarak gösterilmiştir (Tefs vd 2003). Ağır Tip I PLG eksikliği olan 50 hasta ile yapılan bir çalışmada, %34'lük oranla hastalar arasında en yaygın görülen genetik değişim olarak saptanmıştır (Tefs vd 2006).



Şekil 4.14. 213 bp uzunluğundaki ikinci ekzonun %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü
M: Fermentas GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder
1-5 nolu örnekler: Hasta grubuna ait 213 bp'lik PCR ürünleri

Çalışmamızda Lys19Glu mutasyonu taranan hastaların 1'inde homozigot 1'inde heterozigot durumda saptanmıştır.



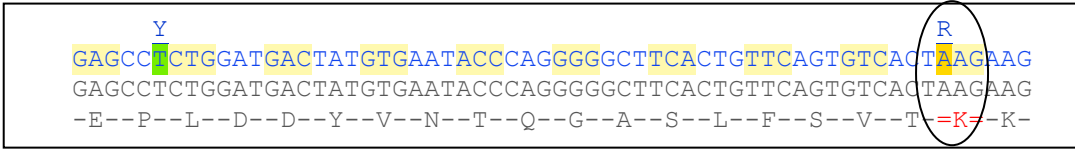
Şekil 4.15. **a.** Lys19Glu mutasyonunu taşımayan homozigot yabanıl tip örneğin DHPLC profili **b.** Lys19Glu mutasyonunu taşımayan homozigot yabanıl tip örneğin DNA dizi analiz görüntüsü **c.** Lys19Glu mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DHPLC profili **d.** Lys19Glu mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

İkinci ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```
ctgaccattttaccacttggatctcccactctagGTCAAGGAGAGCCTCTGGATGACTATGTGAATA
CCCAGGGGGCTTCACTGTTTCAGTGTCACTAAGAAGCAGCTGGGAGCAGGAAGT
ATAGAAGAATGTGCAGCAAATGTGAGGAGGACGAAGAATTCACCTGCAGgtattt
ccattgtcgttgacactacgcaggaatctgtaatt
```

Dizi 4.14. 213 bp'den oluşan ikinci ekzon üzerinde Lys19Glu yanlış anlamı mutasyonuna neden olan A>G değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İtronlar küçük, onbirinci ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

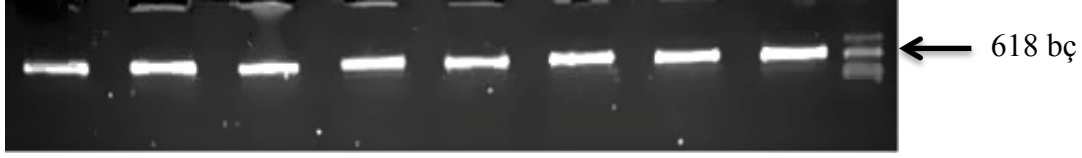
Lys19Glu değişiminin transkriptte denk geldiği nokta ve neden olduğu aminoasit değişimi “Ensembl” e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve aşağıda gösterilmiştir.



Dizi 4.15. PLG cDNA’sında Lys19Glu değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görölmektedir. Lys19Glu mutasyonuna neden olan A>G değişiminin gerçekteleştiği nokta işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

4.3.2.2. Asp453Asn

PLG geninin onbirinci ekzonunda aspartik asit’in asparajin’e dönüşümüne neden olan bir G>A değişimi saptanmış olup bu değişimin Forsgren ve arkadaşlarının 1987 yılındaki çalışmalarında (Forsgren vd 1987) bildirdikleri Asp453Asn olduğu belirlenmiştir. Aspartik asit’i kodlayan GAT kodonu, AAT şeklinde değişerek asparajin’i kodlar duruma gelmiştir. 1990 yılında Petersen ve arkadaşları da aynı değişimden bahsetmiş ve normal popülasyondaki bir polimorfizm olarak nitelendirmiştir (Petersen vd 1990). Söz konusu mutasyon, Schott ve arkadaşlarının *PLG* eksikliği olan bir Türk bebeği bildirdikleri 1998 yılındaki yazılarında da belirtilmiş ve hastaya ek olarak 4 sağlıklı bireyde de bulunmuştur (Schott vd 1998). 2008 yılında Zaas ve arkadaşları, Asp453Asn mutasyonunun invaziv aspergliozis oluşumuna yatkınlık yarattığını belirtmişlerdir. Söz konusu çalışmada 236 allojenik hematopoietik kök hücre transplant alıcısı (HKHT) ile bağlantı çalışması yapılmış ve söz konusu mutasyonu taşımanın HKHTdan sonra invaziv aspergliozis gelişimi riskini önemli ölçüde arttırdığını belirtmişlerdir (Zaas vd 2008). Asp453Asn mutasyonu, literatürde *PLG* varyantlarının *PLG* eksikliği dışındaki klinik rahatsızlıklarla ilişkilendirildiği tek değişimdir.

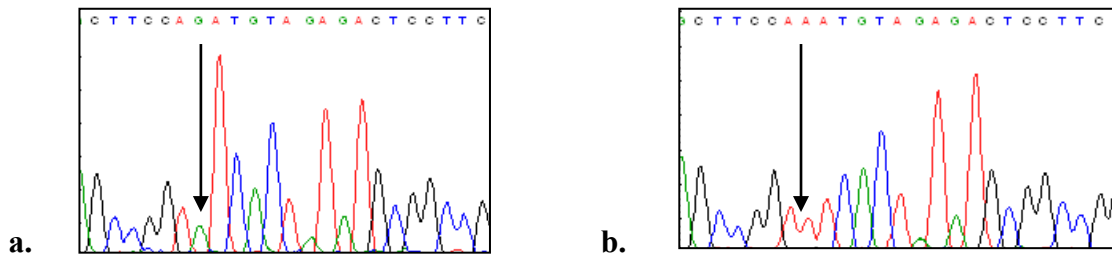


Şekil 4.16. 618 bç uzunluğundaki onbirinci ekzonun %2'lik agaroz jel elektroforezi görüntüsü görülmektedir.

M: L AB-0894: Electro-Fast® Marker

1-8 nolu örnekler: Hasta grubuna ait 618 bç'lik PCR ürünleri

Çalışmamızda Asp453Asn mutasyonu taranan 16 hastanın 3'ünde heterozigot, 4'ünde homozigot durumda saptanmıştır.



Şekil 4.17. a. Asp453Asn mutasyonunu taşımayan homozigot yabancı tip örneğin DNA dizi analiz görüntüsü **b.** Asp453Asn mutasyonunu homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

Onbirinci ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```

ctttgaaatgtacacagttgtttagaagttgaggaccattttgtttgttacaacattattgtacctataatgggaatattcaagccactt
gtaaacactttgttagaacaataatgtagagggtgctgggtgcccctgaatattctcccacctctgtgacctgtattgttttggaaattcc
agTGGCCTGACAATGAACTACTGCAGGAATCCAGATGCCGATAAAGGCCCTG
GTGTTTTACCACAGACCCAGCGTCAGGTGGGAGTACTGCAACCTGAAAAAAT
GCTCAGGAACAGAAGCGAGTGTGTAGCACCTCCGCCTGTTGTCCTGCTTCCA
GATGTAGAGACTCCTTCCGAAGAAGgtaagaaatctgtgctggacatctacacacttgacgctgggatg
aaaagccatggaaaatctcactgatgcagaaacctccatgctacacagaaatcaagtgttttagagggtctccatgtggaagg
aagcctcagtgcactctctcaaggaggcagaggtgtgacttttggcacaacgtgagtgaggctgtgccttaggacaggtgcaaacc
ctccaaggtgctcaacttaaccactcactt

```

Dizi 4.16. 618 bç'den oluşan onbirinci ekzon üzerinde Asp453Asn yanlış anlamlı mutasyonuna neden olan G>A değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İntronlar küçük, onbirinci ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

Asp453Asn değişiminin transkriptte denk geldiği nokta ve neden olduğu aminoasit değişimi "Ensembl" e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve şekilde gösterilmiştir.

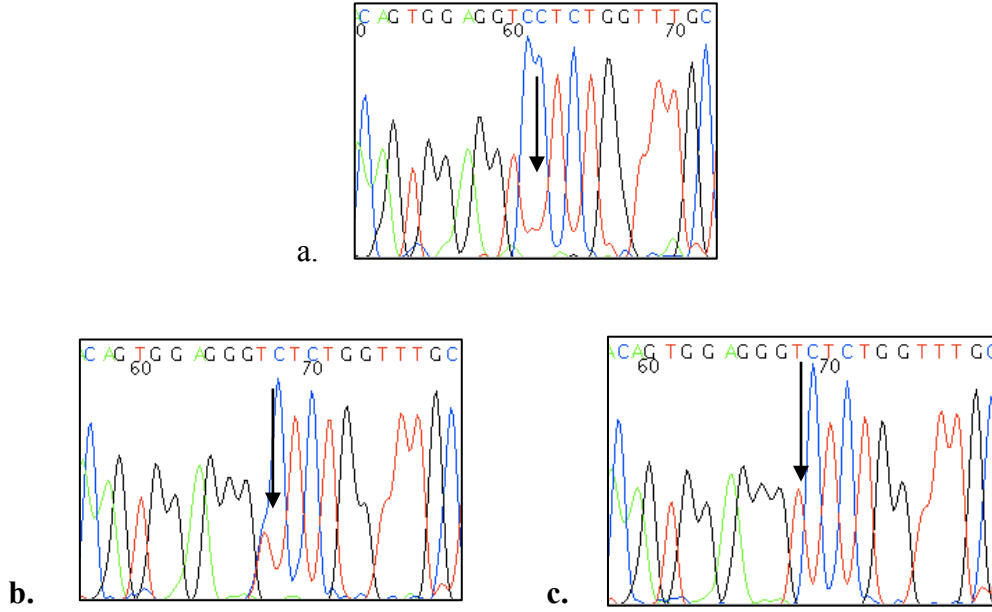

```
AGTGTGTTGTAGCACCTCCGCCTGTTGTCCTGCTTCCAGATGTAGAGACTCCTTCGAAGAA
AGTGTGTTGTAGCACCTCCGCCTGTTGTCCTGCTTCCAGATGTAGAGACTCCTTCCGAAGAA
-S--V--V--A--P--P--P--V--V--L--L--P--D--V--E--T--P--S--E--E--
```

Dizi 4.17. PLG cDNA'sında Asp453Asn değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görölmektedir. Asp453Asn mutasyonuna neden olan G>A değişiminin gerçekleştiği nokta işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

4.3.2.3. Pro744Ser

PLG geninin ondokuzuncu ekzonunda prolin'in serin'e dönüşümüne neden olan bir C>T değişimi saptanmıştır. Prolin'i kodlayan CCT kodonu, TCT şeklinde değişerek serin'i kodlar duruma gelmiştir. Pro744Ser yanlış anlamlı mutasyonu HGMD'de yer almakta olup ilk olarak 2006 yılında tanımlanmıştır (Tefs vd 2006).

Söz konusu mutasyon hasta grubumuzdan sadece bir kişide homozigot durumda ve bu hastanın iki kardeşinde heterozigot durumda saptanmıştır. Hasta mutasyonu homozigot durumda taşımakta, sağlıklı aile bireyleri ise heterozigot durumda taşımaktadır. Bu bulgu literatürde yer alan *PLG* genindeki homozigot mutasyonların hastalığa neden olduğu ile ilgili bilgiyle tutarlılık göstermektedir. Mutasyonu heterozigot ve homozigot durumda taşıyan örneklerin DNA dizi analizi görüntüsü şekilde görölmektedir.



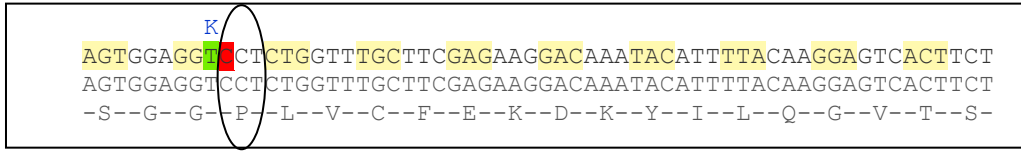
Şekil 4.18. a. Pro744Ser değişimini taşımayan homozigot yabancı tip örneğin DNA dizi analiz görüntüsü b. Pro744Ser değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü c. Pro744Ser değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

Ondokuzuncu ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşığıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```
tatggatagtagaaggatggcatcccataataaaaggcaggcagcctaaccctcacatgcattttctcctctgtatagGGTGA
CAGTGGAGGTCTCTGGTTTGCTTCGAGAAGGACAAATACATTTTACAAGGAGTC
ACTTCTTGGGGTCTTGGCTGTGCACGCCCAATAAGCCTGGTGTCTATGTTTCGTGT
TTCAAGGTTTGTACTTGGATTGAGGGAGTGATGAGAAATAATTAATTGGACGGG
AGACAGAGTGACGCACTGACTCACCTAGAGGCTGGAACGTGGGTAGGGATTTAG
CATGCTGGAAATAACTGGCAGTAATCAAAC
```

Dizi 4.18. 337 bç'den oluşan ondokuzuncu ekzon üzerinde Pro744Ser değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İntronlar küçük harfler, ondokuzuncu ekzon siyah büyük harfler ile, transle olmayan 3' downstream dizi ise mavi büyük harflerle belirtilmiştir.

Pro744Ser değişiminin transkriptte denk geldiği nokta ve neden olduğu aminoasit değişimi "Ensembl" e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve şekilde gösterilmiştir.



Dizi 4.19. PLG cDNA'sında Pro744Ser değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. Pro744Ser mutasyonuna neden olan C>T değişiminin gerçekleştiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

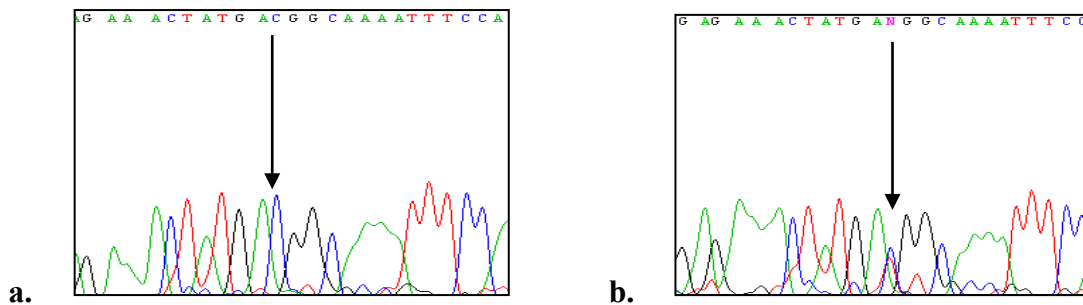
4.4 Saptanan Eş Anlamlı (Synonymous) Mutasyonlar

4.4.1. Saptanan Yeni Eş Anlamlı Mutasyonlar

4.4.1.1. 582 C>T

PLG geninin altıncı ekzonunda aminoasit değişimine neden olmayan bir C>T değişimi saptanmıştır. Değişim sonucu aspartik asit'i kodlayan GAC kodonu GAT şekline dönüşmüştür. GAT kodonu da aspartik asit aminoasitini kodlamaktadır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmemiştir, değişim ensembl e-veritabanı esas alınarak 582 C>T şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda 582 C>T değişimi sadece bir lignöz konjunktivit hastası ve hastanın babasında heterozigot durumda saptanmıştır.



Şekil 4.19. a. 582 C>T değişimini taşımayan homozigot yabancıl tip örneğin DNA dizi analizi görüntüsü b. 582 C>T değişimini heterozigot durumda taşıyan hastanın DNA dizi analiz görüntüsü

Altıncı ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```
gaattacatcggaatgagaggcaagtcgaccttaagtgagtaggattctggttttactctctattttgcttcatccatttcagttttcttctctctctctgtccttccttcccactctgtccagAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACCTATGACGGC  
AAAATTTCCAAGACCATGTCTGGACTGGAATGCCAGGCCTGGGACTCTCAGAGCC  
CACACGCTCATGGATAATTTCCTTCCAAgtaagtctcactgggaaaacattccatgtttaattaaggctctgc  
agctctatcagacatttgctgtcatttagatattttgacattcctcaagaagt
```

Dizi 4.20. 345 bç'den oluşan altıncı ekzon üzerinde 582 C>T değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İntronlar küçük, altıncı ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

```
GAGTGTGAAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACCTATGACGGCAAAATTTCCAAG  
GAGTGTGAAGAGGAATGTATGCATTGCAGTGGAGAAAACCTATGACGGCAAAATTTCCAAG  
-E--C--E--E--E--C--M--H--C--S--G--E--N--Y--D--G--K--I--S--K--
```

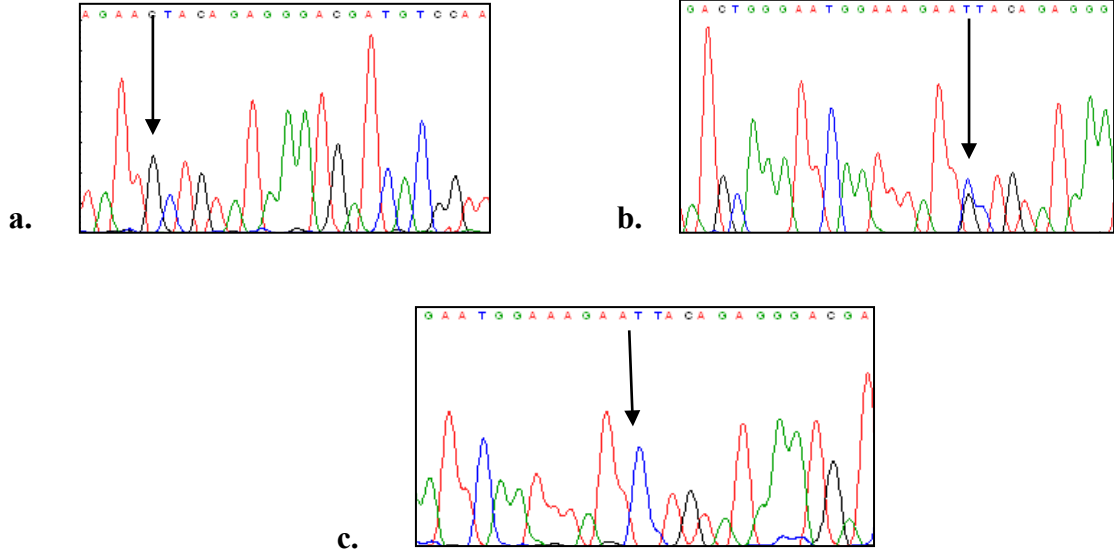
Dizi 4.21. PLG cDNA'sında 582 C>T değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. 582 C>T değişimine neden olan C>T değişiminin gerçekleştiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG0000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

4.4.2. Saptanan Bilinen Eş Anlamlı Mutasyonlar

4.4.2.1. 330 C>T

PLG geninin dördüncü ekzonunda aminoasit değişimine neden olmayan bir C>T değişimi saptanmıştır. Değişim sonucu asparajin'i kodlayan AAC kodonu AAT şekline dönüşmüştür. AAT kodonu da asparajin aminoasitini kodlamaktadır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmiş ve ensembl e-veritabanında 330 C>T şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda 330 C>T mutasyonu hastaların 4'ünde heterozigot, 3'ünde homozigot durumda saptanmıştır.



Şekil 4.20. a. 330 C>T değişimini taşımayan homozigot yabanıl tip örneğin DNA dizi analiz görüntüsü b. 330 C>T değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü c. 330 C>T değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

Dördüncü ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

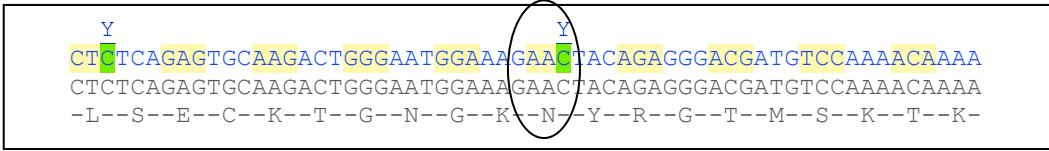
```

agaatgtaagctccatgacggccaagcctctggctgactgtgccccgtgtgtcccagcatcctgggtgggctcgatacaca
gagagctcataagtagcatttgaatacatgaatcaagaatggctcagttactgcagccttttgcagatgcaaagatgatctttt
agaaagcagaaacagggggtctggtgcatgagatcttttctcaacgtgactatgctgtgcagacctcatgtggtgtcttgtaa
agacttgaccactgtgtggactccctcagTGTATCTCTCAGAGTGAAGACTGGGAATGGA
AAGAACTACAGAGGGACGATGTCCAAAACAAAAAATGGCATCACCTGTCAA
AAATGGAGTTCCAATTCTCCCCACAGACCTAGgtaagacattcccttcatctttgtgtcatctact

```

Dizi 4.22. 463 bç'den oluşan dördüncü ekzon üzerinde 330 C>T değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İntronlar küçük, dördüncü ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

330 C>T değişiminin transkriptte denk geldiği nokta “Ensembl” e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve dizide gösterilmiştir.

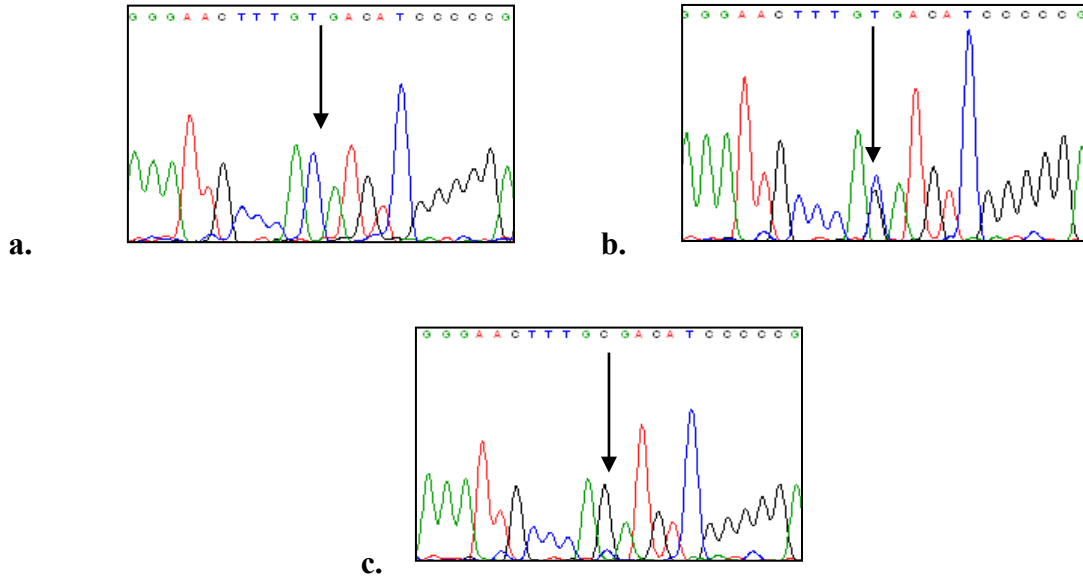


Dizi 4.23. PLG cDNA'sında 330 C>T değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. 330 C>T değişimine neden olan C>T değişiminin gerçekleştiği nokta işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

4.4.2.2. 771 T>C

PLG geninin yedinci ekzonunda aminoasit değişimine neden olmayan bir T>C değişimi saptanmıştır. Değişim sonucu sistein'i kodlayan TGT kodonu TGC şekline dönüşmüştür. TGC kodonu da sistein aminoasitini kodlamaktadır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmiş ve ensembl e-veritabanında 771 T>C şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda 771 T>C değişimi taranan 16 hastanın 1'inde heterozigot, 3'ünde homozigot durumda saptanmıştır.



Şekil 4.21. a. 771 T>C değişimini taşımayan homozigot yabancı tip örneğın DNA dizi analiz görüntüsü b. 771 T>C değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğın DNA dizi analizi görüntüsü c. 771 T>C değişimini homozigot olarak taşıyan örneğın DNA dizi analizi görüntüsü

Yedinci ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```
aagaaagtccttgaatacaggccaacctgttctctgtgcatctctgaacacagccttcatctgattacctctccatgccc
gactgtgcttagcacacagcaggtgctcaatgtttgctcttgaaaaagagcttatccatgaatgtaaatttcagtgctactaaaa
tctttctgtccattcagATTTCCAAACAAGAACCTGAAGAAGAATTACTGTCGTAACCC
CGATAGGGAGCTGCGGCCTTGGTGTTCACCACCGACCCCAACAAGCGCTGG
GAACTTTGTGACATCCCCCGCTGCAgtgagtatgatgcacaccagattccaggattggacctgcct
gttcttgaaatcaaaaagaaacatgtgtcagtgctgagtcagcctctgaaaagtgacctacaagtcctatgggatgtattggt
ctt
```

Dizi 4.24. 444 bç'den oluşan yedinci ekzon üzerinde 771 T>C değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İntronlar küçük, yedinci ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

771 T>C değişiminin transkriptte denk geldiği nokta “Ensembl” e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve aşağıda gösterilmiştir.

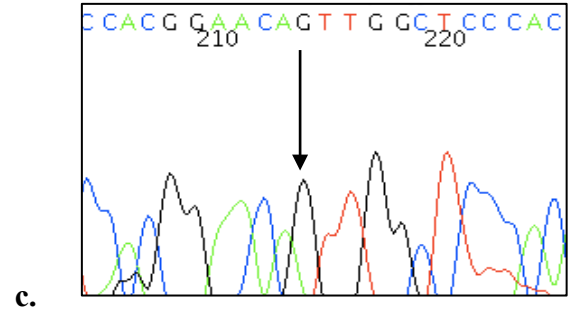
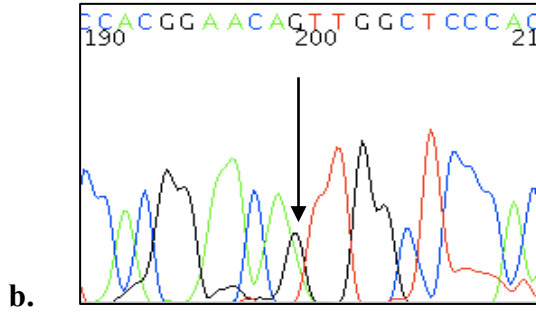
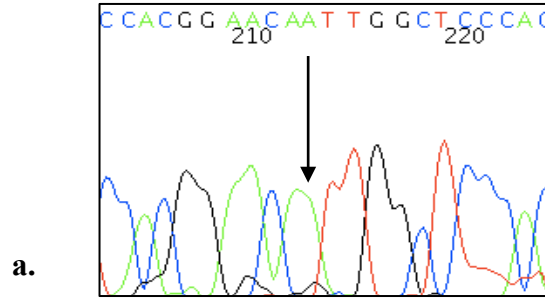
```
GAGCTGCGGCCTTGGTGTTCACCACCGACCCCAACAAGCGCTGGGAACTTTGTGACATC
GAGCTGCGGCCTTGGTGTTCACCACCGACCCCAACAAGCGCTGGGAACTTTGTGACATC
-E--L--R--P--W--C--F--T--T--D--P--N--K--R--W--E--L--C--D--I-
```

Dizi 4.25. PLG cDNA'sında 771 T>C değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. 771 T>C değişimin gerçekleştiği nokta işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

4.4.2.3. 1083 A>G

PLG geninin dokuzuncu ekzonunda aminoasit değişimiyle sonuçlanmayan bir A>G değişimi saptanmıştır. Değişim sonucu glutamin'i kodlayan CAA kodonu CAG şekline dönüşmüştür. CAG kodonu da glutamin aminoasitini kodlamaktadır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmiş ve ensembl e-veritabanında 1083 A>G şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda 1083 A>G değişimi taranan 16 hastanın 3'ünde heterozigot, 5'inde homozigot durumda saptanmıştır.



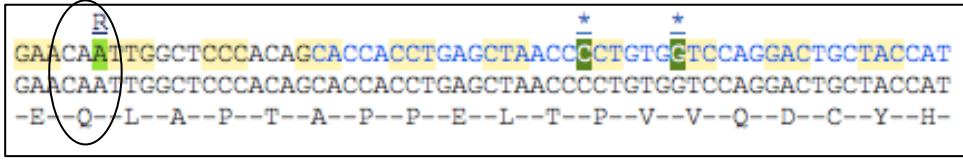
Şekil 4.22. a. 1083 A>G değişimini taşımayan homozigot yabancı tip örneğin DNA dizi analiz görüntüsü b. 1083 A>G değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü c. 1083 A>G değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

Dokuzuncu ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```
aaggaatgaacttagcacggtttttcccgtaacgggtgttctcaaaagcgtggttcctagactttttcttttggaaagctaaactc
acaatcactcttttcagAAATTTGGATGAAAACACTACTGCCGCAATCCTGACGGAAAAA
GGGCCCCATGGTGCCATAACAACAGCCAAGTGCGGTGGGAGTACTGTA
AGATACCGTCCTGTGACTCCTCCCCAGTATCCACGGAACAATTGGCTCCCAC
AGgtaagcaagggtatgggagcttactgaggccaagttttctctattttgtataaccagtggcatcatcacaatatacagta
gctttgtaagttaatgctattgtggtcagaa
```

Dizi 4.26. 371 bç'den oluşan dokuzuncu ekzon üzerinde 1083 A>G değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İntronlar küçük, dokuzuncu ekzon ise büyük harfler ile belirtilmiştir.

1083 A>G değişiminin transkriptte denk geldiği nokta "Ensembl" e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve şekilde gösterilmiştir.

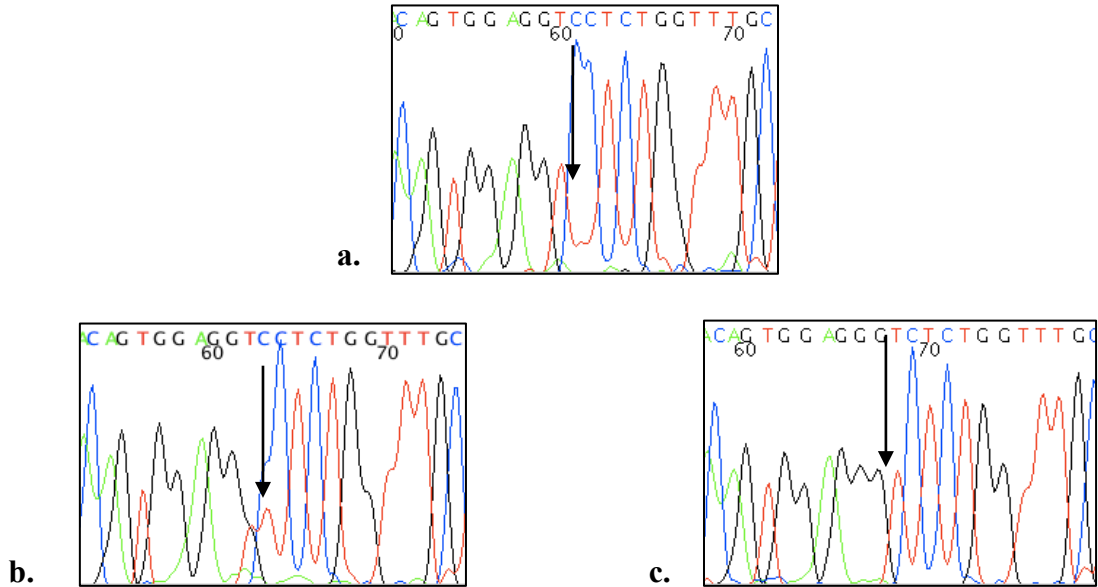


Dizi 4.27. PLG cDNA'sında 1083 A>G değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. 1083 A>G değişimin gerçekleştiği nokta işaretlenmiştir (Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

4.4.2.4. 2286 T>G

PLG geninin ondokuzuncu ekzonunda aminoasit değişimiyle sonuçlanmayan bir T>G değişimi saptanmıştır. Değişim sonucu glisin'i kodlayan GGT kodonu GGG şekline dönüşmüştür. GGG kodonu da glisin aminoasitini kodlamaktadır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmiş ve ensembl e-veritabanında 2286 T>G şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda 2286 T>G değişimi taranan 16 hastanın 7'sinde homozigot durumda saptanmıştır. Mutasyonu taşımayan yabancı tip örnek ile mutasyonu heterozigot ve homozigot taşıyan örneklerin görüntüsü şekilde görülmektedir.



Şekil 4.23. a. 2286 T>G değişimini taşımayan homozigot yabancı tip örneğin DNA dizi analiz görüntüsü b. 2286 T>G değişimini heterozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü c. 2286 T>G değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

Ondokuzuncu ekzonda mutasyonun meydana geldiği nokta, aşağıdaki dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```
tatggatagtagaaggatggcatcccataataaaaggcaggcagcetaaccctcacatgcattttctctccctctgtatagGGTGA
CAGTGGAGG CCTCTGGTTTGCTTCGAGAAGGACAAATACATTTTACAAGGAGTC
ACTTCTTGGGGTCTTGGCTGTGCACGCCCAATAAGCCTGGTGTCTATGTTTCGTGT
TTCAAGGTTTGTACTTGGATTGAGGGAGTGATGAGAAATAATTAATTGGACGGG
AGACAGAGTGACGCACTGACTCACCTAGAGGCTGGAACGTGGGTAGGGATTAG
CATGCTGGAAATAACTGGCAGTAATCAAAC
```

Dizi 4.28. 337 bç'den oluşan ondokuzuncu ekzon üzerinde 2286 T>G değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. İntronlar küçük harfler, ondokuzuncu ekzon siyah büyük harfler ile, transle olmayan 3' downstream dizi ise mavi büyük harflerle belirtilmiştir.

2286 T>G değişiminin transkriptte denk geldiği nokta “Ensembl” e-veritabanı kullanılarak belirlenmiş ve şekilde gösterilmiştir.

```
AGTGGAGG CCTCTGGTTTGCTTCGAGAAGGACAAATACATTTTACAAGGAGTCACTTCT
AGTGGAGGTCCTCTGGTTTGCTTCGAGAAGGACAAATACATTTTACAAGGAGTCACTTCT
-S--G--G--P--L--V--C--F--E--K--D--K--Y--I--L--Q--G--V--T--S-
```

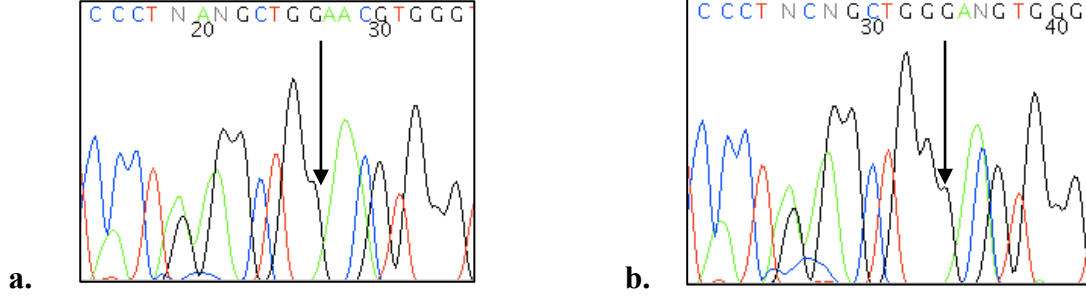
Dizi 4.29. PLG cDNA'sında 2286 T>G değişiminin meydana geldiği noktanın kodon düzeni ile aminoasit dizisi görülmektedir. 2286 T>G değişimin gerçekleştiği nokta işaretlenmiştir (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Sequence_cDNA?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192).

4.5. Transle Olmayan Bölgedeki (UTR) Mutasyonlar

4.5.1. c.*45 A>G

PLG geninin ondokuzuncu ekzonu içinde, transle olmayan bölgede bir A>G değişimi saptanmıştır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmiş ve ensembl e-veritabanında c.*45 A>G şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda c.*45 A>G değişimi taranan 16 hastanın 5'inde homozigot durumda saptanmıştır.



Şekil 4.24. a. c.*45 A>G değişimini taşımayan homozigot yabancı tip örneğin DNA dizi analiz görüntüsü b. c.*45 A>G değişimini homozigot olarak taşıyan örneğin DNA dizi analizi görüntüsü

Ondokuzuncu ekzonun transle olmayan kısmında değişimin meydana geldiği nokta, dizide kırmızı ile işaretlenmiştir.

```

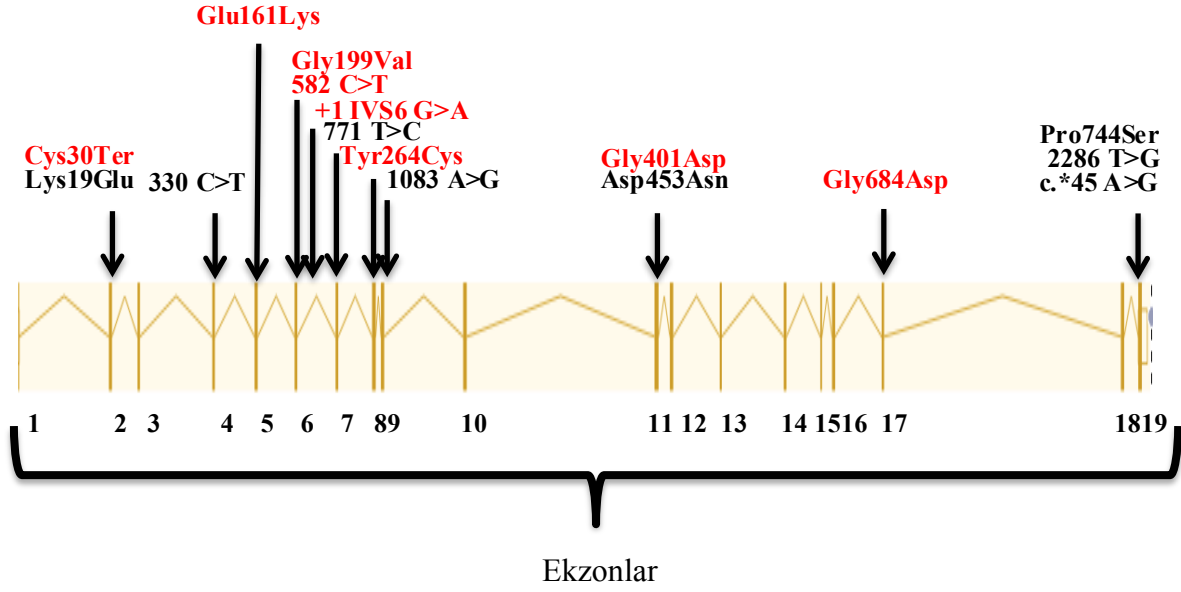
TGAGGGAGTGATGAGAAATAATTAATTGGACGGGAGACAGAGTGACGCA
CTGACTCACCTAGAGGCTGGACGTGGGTAGGGATTTAGCATGCTGGAAA
TAACTGGCAGTAATCAAACGAAGACACTGTCCCCAGCTACCAGCTACGCC
AAACCTCGGCATTTTTTGTGTTATTTTCTGACTGCTGGATTCTGTAGTAAG
GTGACATAGCTATGACATTTGTTAAAAATAAACTCTGTACTTAACTTTGAT
TTGAGTAAATTTGGTTTTGGTCTTCAACAtttcatgctctttgtcaccaccacatttttaatg
ggcagatgggggatttagctgcttttgataaggaacagctgcacaaaggactgagcaggctgcaaggtcacagagggg
agagccaagaagttgtccacgcatctacatcagctaacg
  
```

Dizi 4.30. 440 bç'den oluşan ve ondokuzuncu ekzonun transle olmayan bölgesi ile 3' UTR'yi de içine alan dizi üzerinde değişiminin meydana geldiği nokta kırmızı ile işaretlenmiştir. Ondokuzuncu ekzonun transle olan bölgesinin amplikon içinde yer alan kısmı siyah büyük harfler, transle olmayan kısım mor büyük harfler, 3'UTR kısmı ise küçük yeşil harflerle gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Genetik hastalıkların incelenmesi ve araştırılmasında öncelikli aşama hastalıkla ilişkili genin tanımlanmasıdır. Geni tanımlanmış olan hastalıkta takip eden ikinci aşama geniş hasta gruplarında ilgili gendeki mutasyonların saptanmasıdır. Bugün insan genetiği üzerinde yapılan araştırmaların üzerinde en yoğun olarak durduğu konuların başında bireyler arası farklılıklar ile genlerdeki mutasyonlar ve bunların olası etkileşimleri yer almaktadır. İnsan genetik hastalıklarında tanımlanmış bütün mutasyonları bünyesinde barındıran “Human Genome Mutation Database” (HGMD) barındırdığı bu verileri Biobase aracılığıyla hastalıkların doğası, ilgili genlerin ürünlerinin yapı ve işlevleri ile bir bütün olarak incelenmesine imkan tanımaktadır. Biobase ve HGMD yalnızca mutasyon verilerini değil, tanımlanmış bütün tekli nükleotid polimorfizmlerini (TNP) bünyesinde barındıran NCBI dbSNP verilerini de analizlerinde değerlendirmeye almaktadır. Bu nedendir ki genetik hastalıklara neden olan genlerdeki mutasyonların tanımlanması önemlidir.

Bu tez çalışmasının konusu olan Tip I PLG eksikliğine neden olan *PLG* gen mutasyonları bugüne dek çeşitli hasta gruplarında araştırılmıştır. Analiz edilen bu hasta gruplarında münferit olarak Türk hastalar da yer almış ve mutasyonlar tanımlanmıştır (Schuster vd 1997, Schott vd 1998, Tefs vd 2006). Ancak bugüne dek yalnızca Türk hastalarla yapılan geniş kapsamlı bir *PLG* gen analiz çalışması bulunmamaktadır. Sunulan çalışma kapsamı ile bu eksikliği gidermeye yönelik olarak tasarlanmıştır. Beklenildiği gibi çalışma sonucunda bilinen yanlış anlamlı, eş anlamlı ve 3' transle olmayan bölge mutasyonları yanında literatürde daha önce yer almayan yeni anlamsız (nonsense), yanlış anlamlı (missense, nonsynonymous), eş anlamlı (synonymous) mutasyonlar ile ayıklama bölgesi (splice site) mutasyonu tanımlanmıştır (Şekil 5.1). Saptanan mutasyonlardan literatürde daha önce yer almayan Cys30Ter anlamsız, +1 IVS6 G>A ayıklama bölgesi mutasyonu, Glu161Lys, Gly199Val, Tyr264Cys, Gly401Asp, Gly684Asp yanlış anlamlı ve 582 C>T eş anlamlı mutasyonları bu çalışmayla ilk defa tanımlanmıştır. Yeni tanımlanan bu değişimlerin yanında literatürde var olan Lys19Glu, Asp453Asn, Pro744Ser yanlış anlamlı 330 C>T, 771 T>C, 1083 A>G, 2286 T>G eş anlamlı ve c.*45 A>G 3'UTR mutasyonları da saptanmıştır.



Şekil 5.1. *PLG* geni ekzon-intron yapısı ve saptanan mutasyonların konumu, yeni tanımlanmış olan mutasyonlar kırmızı ile yazılmıştır. (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/Summary?db=core;g=ENSG00000122194;r=6:161123270-161174338;t=ENST00000308192)

Yeni Tanımlanan Anlamsız (Nonsense) Mutasyonlar

Cys30Ter

PLG geninin ikinci ekzonunda sistein aminoasitini kodlayan TGT kodonunun TGA sonlanma kodonuna dönüşümüne neden olan bir T>A değişimi saptanmış ve değişim Cys30Ter olarak isimlendirilmiştir. Cys30Ter anlamsız mutasyonunun, HGMD'de değerlendirilmesi sonucu, literatürde daha önce bildirilmediği dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir.

Cys30Ter anlamsız mutasyonu, 19 ekzonlu *PLG* geni ürünü olan *PLG* molekülünün translasyon sırasında ikinci ekzon gibi erken bir evrede sonlanmasına neden olması açısından oldukça önemlidir. Oldukça erken evrede gerçekleşen bu sonlanmanın işlevsiz *PLG* molekülü oluşumuna yol açacağı şüphesizdir.

Cys30Ter anlamsız mutasyonu sadece *PLG* 183 kodlu hastada heterozigot durumda saptanmıştır. Aynı hasta söz konusu mutasyona ek olarak Glu161Lys yanlış anlamlı mutasyonunu heterozigot olarak taşımaktadır. Bu durum, literatürde belirtildiği gibi sadece

homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyonların Tip I PLG eksikliğine neden olduğu yönündeki verilerle tutarlıdır. Zira hastanın PLG 182 kodlu babası da Glu161Lys mutasyonunu heterozigot durumda taşımasına rağmen Cys30Ter mutasyonu taşımamakta olup sağlıklıdır. Hasta ve babası Asp453Asn değişimini homozigot olarak taşımakla birlikte literatürde bu değişimin çok sık görüldüğü belirtilmiş ve mutasyon olmaktan çok normal popülasyondaki bir polimorfizm olarak nitelendirilmiştir (Petersen vd 1990).

Hastanın ve babasının aynı zamanda 330 C>T ile 1083 A>G eş anlamlı mutasyonlarını homozigot durumda ve yeni tanımladığımız 582 C>T eş anlamlı mutasyonunu heterozigot taşıdığı belirlenmiştir. Bu mutasyonlar molekülün aminoasit dizilimini değiştirmeyip aynı aminoasiti kodladıkları için hastalığa neden olabilecek değişimler olarak düşünülmemektedir. Zira, hem hasta hem de babası aynı eş anlamlı değişimleri aynı genotipte taşımaktadır fakat hastanın babasıyla karşılaştırıldığında Glu161Lys yanlış anlamlı mutasyonuna ek olarak Cys30Ter anlamsız mutasyonunu birleşik heterozigot durumda taşımasının hastalığın ortaya çıkışını sağladığı görülmektedir.

Yeni Saptanan Ayıklama Bölgesi (Splice Site) Mutasyonları

+1 IVS6 G>A

PLG geninin altıncı ekzonunun bitimini takip eden altıncı intronda bir G>A değişimi belirlenmiş ve +1 IVS6 G>A şeklinde isimlendirilmiştir. HGMD'de değerlendirilmesi sonucu, literatürde daha önce bildirilmediği dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir.

Çoğu intron GT dizisi ile başlamakta ve AG ile bitmektedir (5'-3' yönünde). Bu diziler sırasıyla ayıklama verici ve ayıklama alıcı bölgeler olarak tanımlanır. Genlerin çoğunda bu diziler mevcuttur ve ayıklama sinyalini görevi görürler (<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch5A4.htm>). Bu nedenle GT ya da AG dizilerinde meydana gelecek bir değişim ayıklama mekanizmasını etkileyerek transkriptin farklı şekilde ayıklama olmasını sağlayarak ve dolayısıyla oluşacak proteinin yapı ve özelliğini değiştirebilecektir.

Söz konusu mutasyonu PLG 178 ve PLG 195 kodlu hastaların homozigot, PLG 178 kodlu hastanın PLG 177 kodlu babası ile PLG 179 kodlu annesinin heterozigot durumda taşıdığı belirlenmiştir. PLG 178 kodlu hastanın lignöz konjuktivit yanında hidrosefalisinin de olduğu ve akraba evliliği neticesinde dünyaya geldiği bilinmektedir. Literatürdeki yaygın kanı ile tutarlı şekilde mutasyonu homozigot olarak taşıyan bireylerin hastalığı sergilerken heterozigot taşıyan aile bireylerinin sergilemediği görülmüştür. PLG 178 kodlu hasta +1 IVS6 G>A mutasyonuna ek olarak Asp453Asn yanlış anlamlı mutasyonu ile 330 C>T, 1083 A>G ve 2286 T>G eş anlamlı mutasyonlarını, PLG 195 kodlu hasta ise 1083 A>G ve 2286 T>G eş anlamlı mutasyonlarını homozigot olarak taşımaktadır.

Yeni Saptanan Yanlış Anlamlı (Missense, nonsynonymous) Mutasyonlar

Glu161Lys

PLG geninin beşinci ekzonunda glutamik asit'in lizin'e dönüşümüne neden olan bir G>A değişimi saptanmış ve değişim Glu161Lys olarak isimlendirilmiştir. Glutamik asit (E) i kodlayan GAG kodonu, AAG şeklinde değişerek lizin aminoasitini kodlar duruma gelmiştir. Glu161Lys yanlış anlamlı mutasyonunun HGMD'de değerlendirilmesi sonucu, literatürde daha önce bildirilmediği dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. İnsan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Glu161Lys mutasyonunun türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktaya denk geldiği belirlenmiştir. Bu durum glutamik asit'in bulunduğu konumun, *PLG* fonksiyonu açısından önemli olduğunu ve bu noktadaki değişimin *PLG*'in fonksiyonunu etkileyebileceğini göstermektedir, bu nedenle birbirinden farklı dört organizmada da aynı konumda yer alacak şekilde korunmuştur.

Çalışma grubumuzda, söz konusu mutasyon sadece PLG 183 kodlu hastada heterozigot durumda saptanmıştır. Söz konusu hasta yukarıda bahsi geçen Cys30Ter anlamsız mutasyonunu da heterozigot durumda taşıyan hastadır. Hastanın babası olan PLG 182 kodlu hastanın da söz konusu mutasyonu aynı genotipte taşıdığı belirlenmiştir. Fakat literatürde belirtildiği gibi mutasyonu homozigot ya da başka bir mutasyonla birleşik-heterozigot durumda taşımadığı için hastalıktan etkilenmediği düşünülmektedir.

Gly199Val

PLG geninin altıncı ekzonunda glisin'in valin'e dönüşümüne neden olan bir G>T değişimi saptanmış ve değişim Gly199Val olarak isimlendirilmiştir. Glisin'i kodlayan GGA kodonu, GTA şeklinde değişerek valin aminoasitini kodlar duruma gelmiştir. Gly199Val yanlış anlamlı mutasyonunun HGMD'de değerlendirilmesi sonucu, literatürde daha önce bildirilmediği dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. İnsan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Gly199Val mutasyonunun türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktaya denk geldiği belirlenmiştir. Bu durum glisin'in bulunduğu konumun, *PLG* fonksiyonu açısından önemli olduğunu ve bu noktadaki değişimin *PLG*'in fonksiyonunu etkileyebileceğini göstermektedir, bu nedenle birbirinden farklı dört organizmada da aynı konumda yer alacak şekilde korunmuştur.

Söz konusu mutasyonu, *PLG* 193 ve *PLG* 194 kodlu birbiriyle bağlantısız iki lignöz konjunktivit hastasının heterozigot durumda taşıdığı belirlenmiştir. Bunlardan *PLG* 193 kodlu hastanın klinik bulgularında lignöz konjunktivite ek olarak genitoüriner sistem tutulumu da saptanmıştır. Hastalar aynı zamanda Asp453Asn yanlış anlamlı mutasyonunu da heterozigot durumda taşımakta olup, buna ek olarak 330 C>T ve 1083 A>G eş anlamlı mutasyonlarını heterozigot, 2286 T>G eş anlamlı mutasyonu ile c. *45 A>G transle olmayan bölge mutasyonunu homozigot durumda taşıdıkları belirlenmiştir.

Tyr264Cys

PLG geninin sekizinci ekzonunda tirozin'in sistein'e dönüşümüne neden olan bir A>G değişimi saptanmış ve değişim Tyr264Cys olarak isimlendirilmiştir. Tirozin'i kodlayan TAT kodonu, TGT şeklinde değişerek sistein aminoasitini kodlar duruma gelmiştir. Tyr264Cys yanlış anlamlı mutasyonunun HGMD'de değerlendirilmesi sonucu, literatürde daha önce bildirilmediği dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. İnsan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Tyr264Cys mutasyonunun türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktaya denk geldiği belirlenmiştir. Bu durum tirozin'in bulunduğu konumun, *PLG* fonksiyonu açısından önemli olduğunu ve bu noktadaki değişimin *PLG*'in

fonksiyonunu etkileyebileceğini göstermektedir, bu nedenle birbirinden farklı dört organizmada da aynı konumda yer alacak şekilde korunmuştur.

Mutasyonu sadece PLG 44 kodlu bir hastanın homozigot durumda taşıdığı belirlenmiştir. Hastanın bu mutasyonu homozigot taşıması, literatürdeki hastalığa homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyonların neden olduğu yönündeki genel kanı ile uyumludur. Hasta aynı zamanda Asp453Asn mutasyonunu da homozigot durumda taşımakta olsa da yukarıda da değinildiği gibi bu mutasyon daha çok normal popülasyondaki bir polimorfizm olarak kabul edilmektedir. PLG 44 kodlu hasta aynı zamanda 330 C>T ve 1083 A>G eş anlamlı mutasyonlarını homozigot olarak taşımaktadır.

Gly401Asp

PLG geninin onbirinci ekzonunda glisin'in aspartik asit'e dönüşümüne neden olan bir G>A değişimi saptanmış ve değişim Gly401Asp olarak isimlendirilmiştir. Glisin (G)'i kodlayan GGC kodonu, GAC şeklinde değişerek aspartik asit aminoasitini kodlar duruma gelmiştir. Gly401Asp yanlış anlamlı mutasyonunun, insan genlerinde tanımlanmış mutasyonları içeren "Human Genome Mutation Database" (HGMD) e-veritabanında değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmemiş dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. İnsan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Gly401Asp mutasyonunun türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktaya denk geldiği belirlenmiştir. Bu durum glisin'in bulunduğu konumun, *PLG* fonksiyonu açısından önemli olduğunu ve bu noktadaki değişimin *PLG*'in fonksiyonunu etkileyebileceğini göstermektedir, bu nedenle birbirinden farklı dört organizmada da aynı konumda yer alacak şekilde korunmuştur.

Söz konusu mutasyon, DHPLC analizinde şüpheli görünüme sahip örneğin DNA dizi analizi ile değerlendirilmesi suretiyle saptanmıştır. Mutasyon hiçbir lignöz konjunktivit hastasında saptanmazken PLG 48 kodlu hasta yakınında heterozigot olarak saptanmıştır. Mutasyonu taşıyan aile bireyi, PLG 45 kodlu lignöz konjunktivit hastasının annesi olup işitme engelli olduğu bilinmektedir.

Gly684Asp

PLG geninin onyedinci ekzonunda glisin'in aspartik asit'e dönüşümüne neden olan bir G>A değişimi saptanmış ve değişim Gly684Asp olarak isimlendirilmiştir. Glisin'i kodlayan GGC kodonu, GAC şeklinde değişerek valin aminoasitini kodlar duruma gelmiştir. Gly684Asp yanlış anlamlı mutasyonunun HGMD'de değerlendirilmesi sonucu literatürde daha önce bildirilmediği dolayısıyla bizim çalışmamızla ilk defa saptanmış bir mutasyon olduğu belirlenmiştir. İnsan, şempanze, domuz ve fare aminoasit dizilerinin karşılaştırılması yoluyla Gly684Asp mutasyonunun türler arasında korunmuş olan kritik önemdeki bir noktaya denk geldiği belirlenmiştir. Bu durum glisin'in bulunduğu konumun, *PLG* fonksiyonu açısından önemli olduğunu ve bu noktadaki değişimin *PLG*'in fonksiyonunu etkileyebileceğini göstermektedir, bu nedenle birbirinden farklı dört organizmada da aynı konumda yer alacak şekilde korunmuştur.

Gly684Asp mutasyonu sadece *PLG* 196 kodlu hastada homozigot olarak saptanmıştır. Hastanın bu mutasyonu homozigot taşıması, literatürdeki hastalığa homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyonların neden olduğu yönündeki genel kanı ile uyumludur. Aynı hastanın 771 T>C, 2286 T>G eş anlamlı mutasyonları ile c. *45 A>G 3'transle olmayan bölge mutasyonunu da homozigot durumda taşıdığı belirlenmiştir.

Bilinen Yanlış Anlamlı Mutasyonlar

Lys19Glu (K19E)

PLG geninin ikinci ekzonunda lizin'in glutamik asit'e dönüşümüne neden olan bir A>G değişimi saptanmış olup bu değişimin literatürde bahsi geçen Lys19Glu olduğu belirlenmiştir. Lizin (K)'i kodlayan AAG kodonu, GAG şeklinde değişerek glutamik asit (E)'i kodlar duruma gelmiştir. Lys19Glu yanlış anlamlı mutasyonu HGMD'de yer almakta olup ayrıca çeşitli çalışmalarda da bildirilmiştir.

Söz konusu mutasyon, 2003 yılındaki bir çalışmada İskoçyalı hastalarla çalışılmış ve 15 propozitinin 13'ünde bir hastada homozigot olmak üzere saptanmıştır ve ailesel hipoplazminojenemi'nin temel nedeni olarak gösterilmiştir (Tefs vd 2003). Ağır Tip I *PLG*

eksikliği olan 50 hasta ile yapılan bir çalışmada, Lys19Glu mutasyonu %34'lük oranla hastalar arasında en yaygın görülen genetik değişim olarak bildirilmiştir (Tefs vd 2006). Bizim hasta grubumuzda ise Lys19Glu mutasyonu PLG 181 kodlu hastada ve hastanın PLG 180 kodlu halasında heterozigot, PLG 53 kodlu hastada homozigot hastanın PLG 52 kodlu babası ve PLG 54 kodlu annesinde heterozigot olarak saptanmıştır. Hastalar dışındaki diğer aile bireyleri sağlıklıdır. Bu durum hipoplazminojeneminin en yaygın nedeni olarak gösterilen Lys19Glu mutasyonunun bizim hasta grubumuzda diğer toplumlarda görüldüğü kadar sık görülmediği düşündürmektedir.

PLG 181 kodlu hastanın Lys19Glu mutasyonuna ek olarak 330 C>T, 771 T>C, Asp453Asn ve 1083 A>G eş anlamlı mutasyonlarını heterozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir. PLG 53 kodlu hastanın ise 330 C>T eş anlamlı mutasyonunu heterozigot ve Asp453Asn eş anlamlı mutasyonunu homozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir.

Asp453Asn

PLG geninin onbirinci ekzonunda aspartik asit'in asparajin'e dönüşümüne neden olan bir G>A değişimi saptanmış olup bu değişimin Forsgren ve arkadaşlarının 1987 yılındaki çalışmalarında (Forsgren vd 1987) bildirdikleri Asp453Asn olduğu belirlenmiştir. Aspartik asit'i kodlayan GAT kodonu, AAT şeklinde değişerek asparajin'i kodlar duruma gelmiştir. 1990 yılında Petersen ve diğerleri de aynı değişimden bahsetmiş ve normal popülasyondaki bir polimorfizm olarak nitelendirmiştir (Petersen vd 1990). Söz konusu mutasyon, 1998 yılında PLG eksikliği olan bir Türk bebeğin bildirildiği bir çalışmada da belirtilmiş ve hastaya ek olarak 4 sağlıklı bireyde de bulunmuştur (Schott vd 1998). 2008 yılında Zaas ve arkadaşları, Asp453Asn mutasyonunun invaziv asperglizis oluşumuna yatkınlık yarattığını belirtmişlerdir (Zaas vd 2008). Asp453Asn mutasyonu, literatürde PLG varyantlarının PLG eksikliği dışındaki klinik rahatsızlıklarla ilişkilendirildiği tek değişimdir.

Bizim çalışmamızda Asp453Asn değişimi, PLG 44 kodlu hastada homozigot, PLG 178 kodlu hastada homozigot ve hastanın PLG 177 kodlu annesi ile PLG 179 kodlu babasında heterozigot, PLG 181 kodlu hasta ve hastanın PLG 184 kodlu annesinde heterozigot ve hastanın PLG 180 kodlu halasında homozigot, PLG 183 kodlu hasta ile hastanın PLG 182 kodlu babasında homozigot, PLG 193 ve PLG 194 kodlu hastalarda heterozigot, PLG 53

kodlu hasta ile hastanın PLG 54 kodlu annesinde homozigot ve hastanın PLG 52 kodlu babasında heterozigot olarak saptanmıştır. Değişimin hem sağlıklı aile bireylerinde hem de lignöz konjunktivit hastalarında oldukça yaygın olduğu görülmektedir. Bu durum, literatürde Asp453Asn değişiminin mutasyon olmaktan çok normal popülasyondaki bir polimorfizmi temsil ettiğine dair yaygın kanı ile uyumludur. İlginç olan nokta, Asp453Asn değişimini taşıyan tüm hastalarda dördüncü ekzondaki 330 C>T ve dokuzuncu ekzondaki 1083 A>G eş anlamlı mutasyonlarının da heterozigot ya da homozigot olarak saptanmış olmasıdır. Bu durumda 330 C>T ve 1083 A>G değişimleri Asp453Asn eş anlamlı mutasyonu ile birlikte taşınıyor gibi görünmektedir. Dolayısıyla Asp453Asn yanında aminoasit diziliminde farklılığa yol açan başka bir mutasyonu taşımayan hastalarda, 330 C>T ve 1083 A>G eş anlamlı mutasyonlarının Asp453Asn ile birlikte taşınması hastalığın ortaya çıkmasına neden oluyor olabilir.

Pro744Ser

PLG geninin ondokuzuncu ekzonunda prolin'in serin'e dönüşümüne neden olan bir C>T değişimi saptanmıştır. Prolin'i kodlayan CCT kodonu, TCT şeklinde değişerek serin'i kodlar duruma gelmiştir. Pro744Ser yanlış anlamlı mutasyonu HGMD'de yer almakta olup ilk olarak 2006 yılında tanımlanmıştır (Tefs vd 2006).

Söz konusu mutasyon hasta grubumuzdan sadece PLG 187 kodlu bir kişide homozigot durumda ve bu hastanın PLG 188 ve 189 kodlu iki kardeşinde heterozigot durumda saptanmıştır. Bu bulgu literatürde yer alan *PLG* genindeki homozigot mutasyonların hastalığa neden olduğu ile ilgili bilgiyle tutarlılık göstermektedir. Hastanın aynı zamanda 2286 T>G ve c. *45 A>G değişimlerini homozigot olarak taşıdığı belirlenmiştir.

Yeni Saptanan Eş Anlamlı (Synonymous) Mutasyonlar

582 C>T

PLG geninin altıncı ekzonunda aminoasit değişimine neden olmayan bir C>T değişimi saptanmıştır. Değişim sonucu aspartik asit'i kodlayan GAC kodonu GAT şekline dönüşmüştür. GAT kodonu da aspartik asit aminoasitini kodlamaktadır. Söz konusu

değişim daha önce literatürde bildirilmemiş olup değişim ensembl e-veritabanı esas alınarak 582 C>T şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda 582 C>T değişimi sadece PLG 183 kodlu bir lignöz konjuktivit hastası ve hastanın PLG 182 kodlu babasında heterozigot durumda saptanmıştır. Söz konusu hasta Cys30Ter ve Glu161Lys mutasyonlarının saptandığı hastadır.

Bilinen Eş Anlamlı Mutasyonlar

330 C>T

PLG geninin dördüncü ekzonunda aminoasit değişimine neden olmayan bir C>T değişimi saptanmıştır. Değişim sonucu asparajin'i kodlayan AAC kodonu AAT şekline dönüşmüştür. AAT kodonu da asparajin aminoasitini kodlamaktadır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmiş ve ensembl e-veritabanında 330 C>T şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda 330 C>T eş anlamlı mutasyonu PLG 178 kodlu hastada homozigot hastanın PLG 177 kodlu babası ile PLG 179 kodlu annesinde heterozigot durumda, PLG 183 kodlu hasta ile hastanın PLG 182 kodlu babasında homozigot olarak saptanmıştır. 330 C>T eş anlamlı mutasyonu PLG 181 kodlu hasta ile hastanın PLG 184 kodlu annesinde heterozigot ve hastanın PLG 180 kodlu halasında homozigot, PLG 193 ve PLG 194 kodlu hastalarda heterozigot, PLG 53 kodlu hastada ve hastanın PLG 52 kodlu babasında heterozigot PLG 54 kodlu annesinde homozigot olarak saptanmıştır, PLG 44 kodlu hastada homozigot olarak saptanmıştır. Bunlara ek olarak 330 C>T eş anlamlı mutasyonu hastalarda saptanmadığı halde PLG 188, PLG 189, PLG 197, PLG 201, PLG 202 ve PLG 49 kodlu hasta yakınlarında saptanmıştır. Görüldüğü gibi 330 C>T eş anlamlı mutasyonuna hem hasta hem de sağlıklı hasta yakınlarında sık olarak rastlanmaktadır.

771 T>C

PLG geninin yedinci ekzonunda aminoasit değişimine neden olmayan bir T>C değişimi saptanmıştır. Değişim sonucu sistein'i kodlayan TGT kodonu TGC şekline dönüşmüştür.

TGC kodonu da sistein aminoasitini kodlamaktadır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmiş ve ensembl e-veritabanında 771 T>C şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda 771 T>C değişimi PLG 45 kodlu hastada homozigot ve hastanın PLG 48 kodlu anne ile PLG 49 kodlu babasında heterozigot durumda, PLG 47 kodlu hastada homozigot ve hastanın PLG 46 kodlu babasında heterozigot, PLG 181 kodlu hasta ve hastanın PLG 184 kodlu annesinde heterozigot, PLG 196 kodlu hastada homozigot, PLG 200 kodlu hastada homozigot ve hastanın PLG 199 kodlu babası, PLG 201 kodlu annesi ile PLG 197,198,199 kodlu kardeşlerinde heterozigot, PLG 203 kodlu hastada ve hastanın PLG 204 kodlu annesinde homozigot ve PLG 202 kodlu babasında heterozigot olarak saptanmıştır. Bunların dışında 771 T>C eş anlamlı mutasyonu hastada görülmediği halde PLG 188 ve PLG 189 kodlu hasta yakınlarında saptanmıştır. Bu veriler 771 T>C eş anlamlı mutasyonunun hem hasta hem de hasta yakınlarında sık görülmekte olduğunu ortaya koymaktadır.

1083 A>G

PLG geninin dokuzuncu ekzonunda aminoasit değişimiyle sonuçlanmayan bir A>G değişimi saptanmıştır. Değişim sonucu glutamin'i kodlayan CAA kodonu CAG şekline dönüşmüştür. CAG kodonu da glutamin aminoasitini kodlamaktadır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmiş ve ensembl e-veritabanında 1083 A>G şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda 1083 A>G değişimi PLG 44 kodlu hastada homozigot, PLG 53 kodlu hasta ile hastanın PLG 54 kodlu annesinde homozigot ve PLG 52 kodlu babasında heterozigot, PLG 178 kodlu hastada homozigot ve hastanın PLG 177 kodlu babası ile PLG 179 kodlu annesinde heterozigot durumda, PLG 181 kodlu hasta ile hastanın PLG 184 kodlu annesinde heterozigot ve hastanın PLG 180 kodlu halasında homozigot, PLG 183 kodlu hasta ile hastanın PLG 182 kodlu babasında homozigot, PLG 193 ve PLG 194 kodlu hastalarda heterozigot ve PLG 195 kodlu hastada homozigot olarak saptanmıştır. Bununla beraber hastalarda saptanmadığı halde PLG 197, PLG 201 ve PLG 202 kodlu sağlıklı hasta yakınlarında saptanmıştır. Bu veriler 1083 A>G eş anlamlı mutasyonunun hem hasta hem de hasta yakınlarında sık görülmekte olduğunu ortaya koymaktadır.

2286 T>G

PLG geninin ondokuzuncu ekzonunda aminoasit değişimiyle sonuçlanmayan bir T>G değişimi saptanmıştır. Değişim sonucu glisin'i kodlayan GGT kodonu GGG şekline dđnüşmüřtür. GGG kodonu da glisin aminoasitini kodlamaktadır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmiş ve ensembl e-veritabanında 2286 T>G şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda 2286 T>G değişimi PLG 45 kodlu hastada homozigot ve hastanın PLG 49 kodlu babası ile PLG 48 kodlu annesinde heterozigot, PLG 178 kodlu hastada homozigot ve hastanın PLG 177 kodlu babası ile PLG 179 kodlu annesinde heterozigot, PLG 187 kodlu hasta ile PLG 188 ve PLG 189 kodlu kardeşlerinde homozigot, birbirinden bağımsız PLG 193, 194, 195, 196 kodlu hastalarda homozigot durumda saptanmıştır. Ayrıca hastada saptanmadığı halde PLG 52 kodlu hasta yakınında da heterozigot olarak saptanmıştır. Bu veriler 2286 T>G eş anlamlı mutasyonunun hem hasta hem de hasta yakınlarında sık görölmekte olduğunu ortaya koymaktadır.

Transle Olmayan Bölgedeki (UTR) Mutasyonlar

c.*45 A>G

PLG geninin ondokuzuncu ekzonu içinde, transle olmayan bölgede bir A>G değişimi saptanmıştır. Söz konusu değişim daha önce literatürde bildirilmiş ve ensembl e-veritabanında c.*45 A>G şeklinde isimlendirilmiştir.

Çalışmamızda c.*45 A>G değişimi PLG 45 kodlu hastada homozigot ve hastanın PLG 49 kodlu babasında heterozigot, PLG 187 kodlu hasta ile PLG 188 ve PLG 189 kodlu kardeşlerinde homozigot, birbirinden bağımsız PLG 193, 194, 196 kodlu hastalarda homozigot, durumda saptanmıştır. Ayrıca değişim hastada bulunmazken PLG 52 ve PLG 204 kodlu hasta yakınlarında da belirlenmiştir. Bu veriler c.*45 A>G mutasyonunun hem hasta hem de hasta yakınlarında sık görölmekte olduğunu ortaya koymaktadır.

Daha önceki çalışmalarda incelenen olgu gruplarında yer alan Türk hastalarda, bildirilmiş *PLG* gen mutasyonların çokluğu dikkat çekmektedir (Schuster 1997, Schott 1998, Schuster

1999, Scully vd 2001, Mehta ve Shapiro 2008). Bunun nedeni, Anadolu'nun tarih boyunca pek çok uygarlığı bünyesinde barındırarak çeşitli kültürlerin kesişim noktası niteliği taşıması, Asya ile Avrupa'nın birleşim noktasındaki stratejik konumu nedeniyle tarih öncesi çağlardan beri birçok medeniyete ev sahipliği yapması olarak düşünülebilir. Bu nedenlerden dolayıdır ki Türk toplumunun genetik yapısı bu kültürel miras ve akraba evliliklerinin yaygın olması nedeniyle çeşitli gen değişimleri açısından heterojendir. Tez çalışmamız, *PLG* geninde önceden tanımlanmış mutasyonların yanında yeni anlamsız, yanlış anlamlı, eş anlamlı ve ayıklama bölgesi mutasyonlarını ortaya koyarak önceki yayınlarla tutarlı bir şekilde Türk toplumunun *PLG* gen değişimleri açısından heterojen bir yapıya sahip olduğunu gösterir niteliktedir.

Hemostaz yolağında önemli bir role sahip olan PLG proteininin mutasyonlarına, trombotik hastalıklarda rastlanmaması (gösterilmemiş verilerimiz) ancak, bu gendeki mutasyonların başta gözler olmak üzere ağız, nazofarinks, trake ve dişi genital sisteminde oluşan membranöz lezyonlardaki fibrinin temizlenmemesine yol açarak Tip I PLG eksikliği hastalığına neden olması, metabolizma ve hastalıkların anlaşılması ile açıklanmasında sistem biyolojisi yaklaşımlarının ne kadar gerekli ve vazgeçilmez olduğunu ortaya koymaktadır. Bu çerçevede geniş kapsamlı ve yüksek işlem hacimli mutasyon analizlerinin tüm genom boyunca yürütülmesi son derece önemli olmaya devam etmektedir.