

T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***FVII* PROMOTOR BÖLGE GEN DEĞİŞİMLERİNİN BEHÇET  
HASTALARINDA TROMBOZ OLUŞUMUNDAKİ ROLÜNÜN  
ARAŞTIRILMASI**

**Zehra VELİ**

**Tez Danışmanı:  
Prof. Dr. Nejat AKAR**

**2009-ANKARA**

## KABUL ONAY

Prof.Dr.Nejat AKAR danışmanlığında Zehra VELİ tarafından hazırlanan bu çalışma 23.03.2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof.Dr. Nejat AKAR

imza :

Üye : Prof. Dr. Nurşen DÜZGÜN

imza :

Üye : Prof. Dr. Gülay KINIKLI

imza :

Üye : Prof. Dr. Mesiha EKİM

imza :

Üye: Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ

imza :

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA  
Enstitü Müdürü

## ***FVII* Promotor Bölge Gen Değişimlerinin Behçet Hastalarında Tromboz Oluşumundaki Rolünün Araştırılması**

### **ÖZET**

Behçet Hastalığı, birçok sistem tutulumlarının izlendiği, kronik multisistemik bir hastalıktır. Vasküler tutulum Behçet hastalığının seyri sırasında major komplikasyon sebeplerinden birisidir. Venöz ve arteriyel trombozlar vasküler tutulumun en çok görülen şeklidir.

Koagülasyon sistemindeki bozukluk trombozun ana sebebidir. Koagülasyon mekanizması fibrin yapıda pıhtı formasyonu ile sonuçlanan bir dizi kompleks basamağı içermektedir. Koagülasyon sistemi intrinsek ve ekstrinsek olarak temel iki yoldan oluşur. Koagülasyon mekanizmasının, transmembran bir protein olup damar hasarlandığında endotelden salınan doku faktörünün *FVII*'yi aktive ederek ekstrinsek yolun aktivasyonu ile başladığı bilinmektedir. Bu da sonuç olarak protrombinin trombine dönüşümüne ve tüm diğer koagülasyon aşamalarının gelişmesine neden olur.

Ekstresek yolla koagülasyonun başlamasında rol oynayan Koagülasyon Faktörü VII (*FVII*) karaciğerde inaktif tek zincirli glikoprotein olarak sentezlenir. *FVII* geni 13. kromozomun uzun kolunda lokalize olmuştur. Promotor bölgesinde tanımlanan polimorfizmlerin tromboz oluşumu üzerindeki etkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Bu polimorfizimlerden -402G/A polimorfizminin *FVII* transkripsiyon oranını artırdığı, -401G/T ve -323ins10bç polimorfizminin *FVII* transkripsiyon oranını azalttığı yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.

Behçet hastalarında *FVII* promotor bölgesinde bulunan -323ins10bç, -401G/T, -402G/A polimorfizmlerinin tromboz oluşturma riskini araştırmak amacıyla 77 Behçet hastası ve 101 sağlıklı kontrol birey çalışmaya alındı. Klasik fenol-kloroform yöntemiyle DNA'lar izole edilmiş, uygun primerler kullanılarak amplifikasyon yapılmış daha sonra tek iplikli konformasyon polimorfizmi (SSCP) tekniği ile bant profilleri oluşturulmuştur. Her bir bant profiline ve bunlardan farklı olan bant profillerine DNA dizi analizi yapılmıştır.

Yaptığımız araştırma sonucunda altı farklı bant profili bulunmuştur. Bunlardan, üç polimorfizm bakımından heterozigot olan bant profili ilk olarak bu çalışmada gösterilmiştir ve Behçet hastalarında tromboz oluşumunda yaklaşık 11.5 kat risk getirdiği istatistiksel analiz sonucu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Behçet Hastalığı, tromboz, *FVII*, koagülasyon mekanizması, -323ins10bç, -401G/T, -402G/A

## The role of *FVII* gene polymorphism in Behçet patients with thrombosis

### ABSTRACT

Behçet disease is a multisystem disorder which causes damage at different organs. Vascular involvement is the major complication of Behçet disease. Venous and arterial thrombosis is the most common type of the vascular involvement.

Coagulation system defects are the major reasons of thrombosis. There are two common pathways which play a role in this system (intrinsic and extrinsic). When the vessel wall is damaged, Tissue Factor synthesized by the endothel and then activated FVII. Thus coagulation system is started with extrinsic pathway activation. As a result prothrombin turns into thrombin and cause that all other coagulation stage improvement.

Coagulation factor VII plays a role in the coagulation cascade which is synthesized at the liver and secreted into blood as an inactive single chain glycoprotein. *FVII* gene is located on chromosome 13q.34. *FVII* gene polymorphisms at promoter region influence thrombosis involvement. The -401G/T and -323ins10bp polymorphisms are associated with a reduced basal rate of FVII transcription; the -402G/A polymorphism confers increased transcriptional activity of FVII.

In this study we investigated -323ins10bp, -401G/T, -402G/A polymorphisms on *FVII* promoter region which may effect thrombosis risk in Behçet's disease, 77 Behçet disease patients and 101 control healthy individuals were included in this study. The Fenole-chloroform method was used for DNA isolation, suitable primers were used to amplify the region, then a different band profile samples with the single strand conformation polymorphisms technique were created. We performed a DNA sequencing for each band profile.

We found six different band profiles in our research. One band profile which is heterozygote for three polymorphisms was shown in this study firstly. Also, it was detected with statistical analysis that this profile has a 11.5 fold risk for development of thrombosis in Behçet patients.

Key words: Behçet Disease, thrombosis, FVII, coagulation system, -323ins10bp, -401G/T, -402G/A

## ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince benden desteğini, bilgisini esirgemeyen, sonsuz imkanlar sunan bundan sonraki çalışma hayatım boyunca da bilgi, destek ve yardımına her zaman ihtiyaç duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR'a, ilgi ve sevgisini her zaman hissettiren, yardımlarını esirgemeyen Uzm. Bio. Ece AKAR'a; tezimin her aşamasında yardımcı olan, tecrübeleriyle her zaman yanımda olan Bio. Dr. Ayşenur ÖZTURK'e; tez çalışmam sırasında ortaya çıkan olumsuzluklarda manevi olarak destek olan, çalışma dönemimi ve hayatın keyifli anlarını paylaştığım Tek. Kadir SİPAHİ , Uzman Bio. Özge CUMAOĞULLARI, Tek. Çiğdem ARSLAN, Uzman Bio Doruk TAYLAN, Bio. Dr. İdil ASLAN, Uzman Bio. Yonca EĞİN, Bio. Emel USLU, Uzman Bio. Didem TORUN, Uzman Bio. Zafer ERİK, Bio. Hamit Emre KIZIL ve ismini saymadığım tüm Pediatrik Moleküler Genetik Ailesine çok teşekkür ederim. Eğitimim sırasında sonuna kadar bana güvenen, destek olan, sevgi ve ilgisini eksik etmeyen, maddi ve özellikle manevi olarak bana destek olduklarını her zaman bildiğim, emeklerini asla ödeyemeceğim değerli anneme ve babama da çok teşekkür ederim.

Zehra VELİ  
Ankara, Mart 2009

## ŞEKİLLER DİZİNİ İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
ÖNSÖZ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
DİZİLERİN LİSTESİ .....	x
SİMGELER DİZİNİ .....	xi
<b>1.GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	3
2.1. Behçet Hastalığı .....	3
2.1.1. Tarihçe .....	3
2.1.2. Epidemiyoloji .....	3
2.1.3. Etyoloji ve Patogenez .....	4
2.2. Behçet Hastalığının Klinik Özellikleri.....	8
2.2.1. Yineleyici Oral Aftlar ..	8
2.2.2. Genital Ülserler .....	8
2.2.3. Deri Lezyonları .....	9
2.2.4. Göz Belirtileri ..	9
2.2.5. Artiküler Tutulum.....	9
2.2.6. Merkezi Sinir Sistemi Bulguları.....	10
2.2.7. Gastrointestinal Sistem Bulguları .....	10
2.2.8. Vasküler Sistem Bulguları .....	10
2.3. Tromboz ve Behçet Hastalığı.....	11
2.4. Koagülasyon Mekanizması .....	13
2.4.1. Ekstresek Yol .....	16
2.4.2. İntresek Yol .....	18
2.5. Faktör FVII .....	19
2.5.1.1. <i>FVII</i> Geni .....	19
2.5.1.2. FVII Yapısı ve Fonksiyonu .....	20
2.5.1.3. <i>FVII</i> Geni Mutasyon ve Polimorfizmleri .....	23
2.5.1.4. <i>FVII</i> Polimorfizmleri ve FVII Plazma Seviyesi Üzerindeki Etkileri.....	25
2.5.1.5. Faktör VII Eksikliği .....	29
2.6. Moleküler Teknikler .....	31
2.6.1. Çözeltiler ve Solüsyonlar .....	31
2.6.2. DNA Ekstraksiyonu .....	31
2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	31
2.6.4. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polimorphism- SSCP ) .....	35
2.6.5. DNA Dizi Analizi .....	37
<b>3. METARYAL VE YÖNTEM</b> .....	39
3.1. Yöntemler .....	39
3.1.1. DNA İzolasyonu .....	39
3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	40

3.1.2.1. <i>FVII</i> Geni Promotor Bölge Polimorfizmlerinin Belirlenmesi.....	41
3.1.2.2. <i>FVII</i> Geni Promotor Bölgesinin Amplifikasyonu İçin PCR Koşulları ..	41
3.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....	43
3.1.4. SSCP Jeli için Poliakrilamid Jel Hazırlanması. ....	45
3.1.5. SSCP Jeli için Gümüş Boyama. ....	46
3.1.6. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi (Pürifikasyon) .....	46
3.1.7. DNA Dizi Analizi .....	48
3.2. Bulgular.....	49
3.3. İstatistiksel Analizler.....	57
<b>4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.</b> .....	61
<b>KAYNAKLAR.</b> .....	65
<b>ÖZGEÇMİŞ.</b> .....	69

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Pıhtı oluşumu.....	13
Şekil 1.2.	Ekstresek ve İntresek yol.....	17
Şekil 2.1.	Kromozom 13’de <i>FVII</i> genin lokasyonu .....	19
Şekil 2.2.	<i>FVII</i> proteinin yapısı ve kodlayan ekzonlar .....	22
Şekil 3.1.	<i>FVII</i> geni promotor bölgesi SSCP yöntemi için kullanılan primer ile oluşan PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. İlk örnek marker ( $\Phi$ X174 DNA- <i>Hinfl</i> ), diğer örnekler ise amplifiye edilen gen bölgesine ait 214bç’lik PCR ürünleri .....	44
Şekil 3.2.	<i>FVII</i> geni promotor bölgesi DNA dizi analizi yöntemi için kullanılan primer ile oluşan PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. Son örnek marker ( $\Phi$ X174 DNA- <i>Hinfl</i> ), diğer örnekler ise amplifiye edilen gen bölgesine ait 374bç’lik PCR ürünleri.....	44
Şekil 3.3.	<i>FVII</i> geni promotor bölgesi DNA dizi analizi yöntemi için kullanılan primer ile oluşan 374 bç’lik PCR ürünlerinin pürifikasyon işlemi sonrası elektroforez fotoğrafı. Son örnek marker ( $\Phi$ X174 DNA- <i>Hinfl</i> ).....	47
Şekil 4.1.	SSCP jel görüntüsü ve oluşan bantlar.....	49
Şekil 4.2.1.	I. bant profili SSCP görüntüsü.....	50
Şekil 4.2.2.	I. bant profili DNA dizi analizi .....	50
Şekil 4.3.1.	II. bant profili SSCP görüntüsü.....	51
Şekil 4.3.2.	II. bant profili DNA dizi analizi .....	51
Şekil 4.4.1.	III. bant profili SSCP görüntüsü.....	52
Şekil 4.4.2.	III. bant profili DNA dizi analizi.....	52
Şekil 4.5.1.	IV. bant profili SSCP görüntüsü .....	53
Şekil 4.5.2.	IV. bant profili DNA dizi analizi .....	53
Şekil 4.6.1.	V. bant profili SSCP görüntüsü.....	54
Şekil 4.6.2.	V. bant profili DNA dizi analizi.....	54
Şekil 4.7.1.	VI. bant profili SSCP görüntüsü.....	55
Şekil 4.7.2.	VI. bant profili DNA dizi analizi .....	55



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<b>Çizelge 1.</b> Koagülasyon faktörleri ve özellikleri .....	15
<b>Çizelge 2.</b> Haplotiplendirme.....	56
<b>Çizelge 3.1.</b> Haplotip I'e göre diğer haplotiplerin istatistiksel olarak karşılaştırılması .....	57
<b>Çizelge 3.2.</b> -323ins10bç Polimorfizmi için istatistiksel analiz sonuçları.....	57
<b>Çizelge 3.3.</b> -401G/T Polimorfizmi için istatistiksel analiz sonuçları.....	58
<b>Çizelge 3.4.</b> -402G/A Polimorfizmi için istatistiksel analiz sonuçları.....	58
<b>Çizelge 4.1.</b> FVL Mutasyonu çıkarılmış, Haplotip I'e göre diğer haplotiplerin istatistiksel olarak karşılaştırılması .....	59
<b>Çizelge 4.2.</b> FVL Mutasyonu çıkarılmış, -323ins10bç Polimorfizminin istatistiksel analiz sonuçları .....	59
<b>Çizelge 4.3.</b> FVL Mutasyonu çıkarılmış, -401G/T Polimorfizminin istatistiksel analiz sonuçları .....	60
<b>Çizelge 4.4.</b> FVL Mutasyonu çıkarılmış, -402G/A Polimorfizminin istatistiksel sonuçları .....	60

## **DİZİLERİN LİSTESİ**

<b>Dizi 1.1.</b>	SSCP tekniği için amplifiye edilen bölge .....	42
<b>Dizi 1.2.</b>	DNA dizi analizi için amplifiye edilen bölge .....	42

## SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
A	Adenin
Arg	Arjinin
Asp	Aspartat
bç	Baz çifti
CD4	TNF alfa süper ailesi üyesi
CD8	TNF alfa süper ailesi üyesi
CD14	TNF alfa süper ailesi üyesi
C	Sitozin
Ca <sup>+2</sup>	Kalsiyum iyonu
del	Delesyon
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksiguanozin trifosfat
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
DMSO	Dimetil sülfoksit
DVT	Derin ven trombozu
EGF-2	Epidermal Büyüme Faktörü II
FI	Fibrinojen
FII	Protrombin
FIII	Tromboplastin
FIV	Kalsiyum
FV	Proakselerin
FVII	Faktör VII
FVIIa	Aktif Faktör VII
FVIII	Faktör VIII, Antihemofilik Faktör
FVIIIa	Aktif Faktör VIII
FIX	Faktör IX
FIXa	Aktif Faktör IX
FX	Faktör X
FXa	Aktif Faktör X
FXI	Plazma tromboplastin komponenti
FXII	Hageman Faktör
FXIII	Fibrin stabilize edici faktör
FVIIAg	FVII Antijen
FVII:C	FVII koagülasyon aktivitesi
g	Gram
G	Guanin
Gla	Glutamik asit

HNF4	Hepatik nükleer faktör 4
HLA	Human leukocyte antigen
HSV	Herpes Simpleks Virüs
His	Histidin
ins	İnseriyon
ICAM-1	İntersellüler adezyon molekülü-1
IL-1	İnterlökin- 1
IL-8	İnterlökin- 8
Ile	İzolösin
TNF- $\alpha$	Tümör nekrosis faktör- $\alpha$
kDa	Kilo dalton
kb	Kilobaz
K <sup>+</sup>	Potasyum
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum klorür
M	Molar
mM	Milimolar
ml	Mililitre
mg	Miligram
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
p	Kromozomun kısa kolu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	Pikomol
s	Saniye
Ser	Serin
SSCP	Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi
TE	Tris EDTA
TBE	Tris, Borik asit, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
TF	Doku Faktörü
T	Timin

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Behçet hastalığı ilk defa 1937 yılında Türk doktoru Prof. Dr. Hulusi BEHÇET tarafından teşhis edilmiştir. Artiküler (eklemler), vasküler (her çaptaki arter ve ven damarlarını tuttuğu), gastrointestinal, santral sinir sistemi gibi birçok sistem tutulumlarının izlendiği, kronik multisistemik bir hastalıktır (O' Duffy et al. 1971). Behçet hastalığının coğrafi dağılımı ile ilgili yapılan çalışmalarda Japonya, Kore, Orta Doğu'da sık görüldüğü ve hastalığın yaygınlığının tarihi İpek Yolu ile uygunluk gösterdiği anlaşılmıştır (Sakane et al. 1999). Behçet hastalığının etyolojisi henüz anlaşılamamıştır. Genetik, çevresel, bakteriyel, viral, immünolojik faktörler suçlanmakla birlikte tekrarlayıcı inflamatuvar reaksiyonlarla karakterize kronik bir multisistem hastalığıdır (Onder and Gurer 2001). Behçet hastalığında vasküler tutulum teşhisinde önemli rol almaktadır ve hastaların %30'unda görülür. Vasküler tutulumun en sık rastlanılan şekli alt ekstremitelerde görülen derin ven trombozu (DVT)' dur.

Koagülasyon sistemindeki bozukluk trombozun ana sebebidir. Koagülasyon mekanizması fibrin yapıda pıhtı formasyonu ile sonuçlanan bir dizi kompleks basamağı içermektedir. Koagülasyonu başlatan olaylar damar duvarının ağır bir şekilde hasarlanmasıdır ki bu da pıhtılaşma sürecini başlatır. Koagülasyon sistemi temel olarak intrinsek ve ekstrinsek olmak üzere iki yoldan oluşur. Koagülasyon mekanizmasının, transmembran bir protein olup hücre bütünlüğü bozulunca kanla temas eden doku faktörünün Faktör VII'yi (FVII) aktive ederek ekstrinsek yolun aktivasyonu ile başladığı bilinmektedir. FVII'nin aktivasyonu ile Faktör IX, Faktör IXa, Faktör X, Faktör Xa'ya aktive olarak pıhtı oluşumu için reaksiyonlar başlatılmış olur. Sonuç olarak protrombini trombine dönüştürecek olan ara ürün oluşur ve bu da pıhtı oluşumuyla sonlanır.

Koagülasyon mekanizmasının başlamasında anahtar rol oynayan Koagülasyon faktörü "FaktörVII" vitamin K bağımlı serin proteaz ailesindedir. Karaciğerde, inaktif tek zincir glikoprotein olarak sentezlenir. Koagülasyon faktörü, FVII'i kodlayan, *FVII* geni

13. kromozomun uzun kolunda 3.4'de lokalize olmuştur (13q3.4). 9 ekzon içerir ve genin toplam uzunluğu 12.8kb'dır.

*FVII* geninde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu polimorfizmlerin bulunuşuna göre tromboz riski artmakta ya da koruyucu bir etki oluşmaktadır (Vant Hoof 1999). *FVII* plazma seviyesi üzerinde en etkili olanlar promotor bölgesinde bulunanlardır. Buradaki mutasyonlar transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını etkileyerek, plazmada *FVII* seviyesini artırır ya da azaltırlar. Promotor bölgesinde tanımlanmış polimorfizmler -122T/C, 323ins10bç, -401G/T, -402G/A, -628A/G, -630G/A, -668A/C, -670C/A, -2989C/A, -3216C/T'dir (Sabater et al. 2006, bernardi et al. 1994, Pollak et al.1995). Yapılan çalışmalarda -323ins10bç (323. nükleotiddeki 10bç'lik insersiyon), -401G/T, -402G/A polimorfizmlerinin plazmada *FVII* seviyesi üzerindeki etkileri gösterilmiştir. -323ins10bç promotor polimorfizminin bulunuşunun *FVII* koagülasyon aktivitesini azalttığı, -401G/T polimorfizminde plazmada *FVII* koagülasyon aktivitesini azalttığı, -402G/A polimorfizminin ise artırdığı gösterilmiştir. Ayrıca -323ins10bç'lik polimorfizmi ile -401G/T polimorfizminin birlikte kalıtıldığı gösterilmiştir.

Bugüne kadar Behçet hastalarında *FVII* geni polimorfizmlerinin tromboz oluşumundaki etkisi araştırılmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada Behçet hastalarında -323ins10bç, -401G/T, -402G/A polimorfizmlerinin tromboz oluşumu üzerindeki etkileri araştırılması planlanmıştır.

## **2.GENEL BİLGİLER**

### **2.1. Behçet Hastalığı**

#### **2.1.1. Tarihçe**

İlk defa 1937 yılında Türk doktoru Prof. Dr. Hulusi BEHÇET tarafından teşhis edilen hastalık bu nedenle Behçet Hastalığı ya da Behçet Sendromu olarak isimlendirilir. Sendromu Prof. Dr. Hulusi Behçet üçlü belirti (aft, genital ülser ve üveit ) olarak tanımladıktan sonra (Kiraz, Ertenli et al. 2002) Behçet hastalığının bir sendrom olmadığı ve artiküler (eklemler), vasküler (her çaptaki arter ve ven damarlarını tuttuğu), gastrointestinal, santral sinir sistemi gibi birçok sistem tutulumlarının izlendiği, kronik multisistemik bir hastalık olduğu anlaşılmıştır (O' Duffy et al. 1971).

1947 yılında Cenevre'de toplanan Uluslararası Dermatoloji Kongresinde bu hastalık tablosunun ilk defa Hulusi Behçet tarafından belirtildiği kabul edilip, hastalığa “ Morbus Behçet “ adı verilmesi kararlaştırılmıştır. Hastalığın tanımlanmasından sonra Japonya ve Uzak Doğudan Behçet hastalığı bildirilmeye başlamıştır.

#### **2.1.2. Epidemiyoloji**

Behçet hastalığının coğrafi dağılımı ile ilgili yapılan çalışmalarda Japonya, Kore, Orta Doğu'da sık görüldüğü ve hastalığın yaygınlığının tarihi İpek Yolu ile uygunluk gösterdiği anlaşılmıştır (Sakane et al. 1999). Prevalansı en yüksek ülkeler arasında Doğu Akdeniz, Kuzey Batı Afrika Ülkeleri, Orta Doğu, İran ve Japonya bulunmaktadır. Prevalans oranları Türkiye'de 5 farklı bölgede yapılan araştırmada 20-42/10.000, İspanya'da 6.4/100.000, İngiltere'de 0.64/100.000, İtalya'da 3.8/100.000, Amerika'da

8.6/100.000 (Yurdakul and Yazici 2008), Japonya'da 13.6/100.000, Almanya'da 0,55/100.000, Britanya'da 0.27-0.64/100.000 olarak bulunmuştur (Kontogiannis and Powell 2000). Özellikle Orta Doğu'da olmak üzere ailesel vakalarda bildirilmiştir (Zouboulis, Kotter et al. 1997). Ülkemizde erişkinlerde yapılmış iki araştırmada prevalansı 8-10/10.000 ve 40/10.000 olarak saptanmıştır (Azizlerli, Kose et al. 2003).

Belirtileri sıklıkla 30'lu yaşlarda başlamaktadır, fakat herhangi bir yaşta da görülebilmektedir. Çocuklarda nadir, genç erkeklerde ise seyirinin daha şiddetli olduğu görülmektedir. Erkek ve kadın oranı, Kuzey Avrupa ve Japonya'da eşit iken, bazı Akdeniz ülkelerinde ve Orta Doğu'da oran değişir (Zouboulis, Kotter et al. 1997).

### **2.1.3. Etyoloji ve Patogenez**

Behçet hastalığının etyolojisi henüz anlaşılamamıştır. Genetik, çevresel, bakteriyel, viral, immünolojik faktörler suçlanmakla birlikte tekrarlayıcı inflamatuvar reaksiyonlarla karakterize kronik bir multisistem hastalığıdır (Onder and Gurer 2001).

Tanıda laboratuvar bulguları olmadığı için 1990'da uluslararası bir çalışma grubu tarafından önerilen kriterlere dayanarak tanı koyulur. Bu kriterlere göre tekrarlayan oral ülserlerle birlikte diğer klinik bulgulardan (tekrarlayan genital ülserler, göz lezyonları, deri lezyonları gibi) en az ikisinin varlığı ile tanı koyulmalıdır (Zouboulis, Kotter et al. 1997). Etyopatogenezde rol oynayan faktörler;

#### **A. Hücresel Değişiklikler**

- a. *Nötrofiller:* Behçet hastalarının nötrofillerinde, süperoksit ve lizozomal enzim üretiminde, kemotaksiste ve nötrofillerin endotel hücrelerine



adezyonunda artış görülmüştür. Serbest radikallerde ve lizozomal enzim aktivitelerindeki artış endotel hücre hasarına neden olmaktadır. Artmış nötrofil aktivitesi ile beraberinde interlökin-1 (IL-1), interlökin-8 (IL-8) ve tümör nekrozis faktör- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) düzeylerinde artış görülmekte ve bu sitokinler de adezyon moleküllerinin yapımını artırmaktadır (Zouboulis, Kotter et al. 1997).

- b. *Lenfositler*: Behçet hastalarında CD8 hücrelerinde hafif artma ve CD4 hücrelerinde hafif azalma gibi anormal lenfosit fonksiyonları görülmektedir. CD4 azalmasında baskılayıcı hücre alt grubundaki azalma sorumlu tutulmakta ve sonuçta CD4/CD8 oranında azalma saptanmaktadır. Sayıca olmasa da fonksiyonel olarak doğal öldürücü hücre aktivitesi azalmıştır.
- c. *Monositler-Trombositler*: Behçet hastalığında monositler yoğun sitokin üreterek inflamasyona ve adezyon molekül ekspresyonunda artışa yol açmaktadır. Serumda monosit kaynaklı çözünebilir CD14 düzeyi artmıştır (Sahin, Lawrence et al. 1996). Behçet hastalarında trombositler sayıca normal olmasına rağmen aktivitesinde artış gözlenmiştir (Haznedaroglu, Karaaslan et al. 2000).

## B. Endotel Fonksiyonları

Behçet hastalığında endotelden salınan ve bir trombin reseptörü olan trombomodulin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (Duzgun, Ayaslioglu et al. 2003). Ayrıca damar duvarında prostosiklin üretim bozulmuştur (Kansu, Sahin et al. 1986). Yine Behçet hastalarında endotel yıkımına reaksiyonel olarak çıktığı düşünülen anti-endotelial hücre antikor, plazma von-Willebrand faktör antijen düzeylerinde (Direskeneli, Keser et al. 1995) ve intersellüler adezyon molekülü-1

(ICAM-1) ile E-selektin (Haznedaroglu, Karaaslan et al. 2000) ekspresyonunda artış gösterilmiştir.

### C. Genetik Değişiklikler

Tanımlandığı günden bu yana viral ve bakteriyel nedenler ayrıntılı olarak araştırılmasına karşın, bugün mikroorganizmaların patogeneze sadece tetiği çeken ve moleküler benzerlik nedeniyle ısı şoku proteinleri gibi antijenlerle çapraz reaksiyona neden olan faktörler olarak rol oynadıkları kabul edilmektedir. Behçet hastalığının patogenezinde rol oynadığı düşünülen HLA-B51, MICA, TNF gibi genler major histokompatibilite kompleks bölgesinde yer almaktadır. Ancak bunlardan sadece HLA-B51'in Behçet hastalığı patogenezinde doğrudan etkili olduğu, diğerlerinin ise HLA-B51, HLA (human leukocyte antigen) ile bağlantılı (linkage disequilibriumda) olduğu kabul edilmektedir (Al-Otaibi, Porter et al. 2005).

### D. Viral Faktörler

Behçet hastalığı özellikle oral, genital mukoza ve gözde tekrarlayan lezyonlarla seyrettiğinden hastalık ile Herpes Simpleks Virüs (HSV) arasındaki ilişki uzun yıllardır araştırılmaktadır. Behçet hastalarında serumda anti HSV-1 antikorlarının kontrollere göre daha sık saptanması ve dolaşımında HSV-1 antijeni içeren immunkomplekslerin bildirilmesi bu ilişkiyi desteklemektedir (Hamzaoui et al. 1990). Ayrıca DNA hibridizasyon ve PCR çalışmalarında hastalarda HSV-1 mRNA ve DNA düzeylerinde artış saptanmıştır (Eglin et al. 1982). Genital ve intestinal ülserlerde HSV DNA'sı gösterilmiştir. HSV üzerinde yoğunlaşan çalışmalar virüsün doğrudan infeksiyon yaparak hastalığa yol açmadığını, T hücre immünregülasyonunu bozarak etki ettiğini göstermektedir (Suzuki Kurokawa and

Suzuki 2004). Bugün için genel görüş Behçet hastalığının direk olarak HSV-1 infeksiyonu sonucunda ortaya çıkan bir hastalık olmadığıdır.

#### E. Streptokokkal Faktörler

Etyolojideki rolü en çok tartışılan ve bugünlerde daha çok ön plana çıkan bir diğer mikroorganizma da streptokoklardır (Al-Otaibi, Porter et al. 2005). Çalışmalar streptokok antijenlerinin hastalık aktivitesinde en önemli faktör olabileceğini göstermiştir. Behçet hastalığı, olguların %80'inde oral aftlarla başlar. Dış tedavilerinden sonra oral aftların artış göstermesi, Behçet hastalarının oral floralarında nadir görülen streptokok serotiplerinin dominansı ve penisilin tedavisi gibi antibakteriyel tedavilerin olumlu etkilerini gösteren araştırmalar bu fikri desteklemektedir (Direskeneli et al. 2001). Streptokokların 4 farklı türünün; *S. Sanguis*, *S. pyogenes*, *S. faecalis* ve *S. Salivarius*un Behçet hastalığında rol oynayabilecekleri düşünülmüştür (Kaneko et al. 1985). Behçet hastalığında streptokokal antijenlerin nötrofil aktivasyonuna neden olarak hastalık aktivasyonuna yol açabilecekleri düşünülmektedir (Lehner et al. 1991).

#### F. Isı Şok Proteinleri

Stres veya Isı şok proteinleri (Heat shock protein, HSP) tüm prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde infeksiyon, hipoksi, travma gibi stres koşullarında sentezlenen immunreaktif proteinlerdir. Bu nedenle stres proteinleri olarak da adlandırılmaktadırlar. 65kDa ısı şoku proteini başta mikobakterilerde gösterilmiş olmakla birlikte gram(-) ve gram(+) bakterilerde ortak olarak bulunmaktadır. Bir bakteri türünün ısı şoku proteini ile diğer bakteri türlerinin ısı şoku proteinleri arasında belirgin bir benzerlik olduğu ve çeşitli bakteriyel mikroorganizmalarda bulunan ısı şoku proteinlerinin benzer antijenik epitoplara taşıdıkları bilinmektedir. Behçet hastalığının etyolojisinde üzerinde durulan streptokok suşları ve oral

mukoza antijenleri arasında çapraz reaksiyonun gösterilmesi gram pozitif bakterilerin çoğunda bulunan ısı şoku proteinleri gibi ortak bir antijenin hastalığın çeşitli bulgularından sorumlu olabileceği hipotezinin ortaya atılmasına neden olmuştur. Behçet hastalarında mikobakteriyal 65kDa ısı şoku proteinine karşı gelişen yüksek immünglobülin-A (IgA) düzeylerinin *Streptococcus sanguis* suşları ile çapraz reaksiyon verdiği saptanmıştır. Streptokokların 65kDa ısı şok proteini içerdiği doğrulanmış ve 65kDa ısı şok proteini içinde küçük bir peptid bölgesinde Behçet hastalarının lenfositlerini spesifik olarak uyardığı gösterilmiştir (Lehner et al. 1991).

## **2.2. Behçet Hastalığının Klinik Özellikleri**

### **2.2.1. Yineleyici Oral Aftlar**

Yineleyici (Reküran) aftöz ülserler Behçet hastalığının olmazsa olmaz lezyonlarıdır. Olguların %75-90'ında hastalığın ilk bulgusu olarak ortaya çıkmaktadır. Minör aftlar, major aftlar ve herpetiform aftlar olmak üzere 3 değişik şekilde görülürler. En sık olarak %80 oranında minör aftlar görülür ve çoğunlukla dudak mukozasında, dilde ve bukkal mukozada yerleşirler. Major aftlar Behçet hastalarının %10'unda görülür, ağrılı ülserler şeklinde dudak mukozası, dil kenarı ve bukkal mukoza dışında damak, farinks ve tonsillalarda da yerleşebilirler (Al-Otaibi, Porter et al. 2005).

### **2.2.2. Genital Ülserler**

Genital ülserler Behçet hastalarında %80-90 oranında bulunur. Erkeklerde en sık skrotumda, kadınlarda ise vulvada yerleşirler. Oral aftlardan daha derindirler ve iz bırakarak iyileşirler. Bu nedenle Behçet hastalığının tanısında aktif lezyonlar kadar yaraların bıraktığı izlerinde araştırılması gerekmektedir (Al-Otaibi, Porter et al. 2005).

### **2.2.3. Deri Lezyonları**

Behçet hastalarında en sık gözlenen deri lezyonları eritema nodozum benzeri lezyonlar, papülopüstüler lezyonlar, yüzeysel tromboflebitdir. Eritema nodozum benzeri lezyonlar kadın olgularda daha sık görülürken, yüzeysel tromboflebite erkek olgularda daha çok rastlanılmaktadır. Eritema nodozum benzeri lezyonlar şiddetli inflamasyon nedeni ile eritrositlerin damar dışına çıkmaları sonucu hiperpigmente bir iz bırakarak iyileşirler (Al-Otaibi, Porter et al. 2005).

### **2.2.4. Göz Belirtileri**

Behçet hastalarında gözlenen sistemik tutulumların başında göz tutulumu gelmektedir. Genellikle ilk iki yıl içinde ortaya çıkan göz tutulumu erkeklerde ve gençlerde daha sık görülür ve daha ağır seyreder. Göz tutulumu %10-20 hastada tam görme kaybı ile sonuçlanır (Al-Otaibi, Porter et al. 2005).

### **2.2.5. Artiküler Tutulum**

Artrit ya da artralji şeklinde ortaya çıkan eklem tutulumu Behçet hastalarının yaklaşık yarısında görülür. Artrit monoartiküler veya oligoartikülerdir ve sıklıkla monoartrit şeklindedir. En sık tutulan eklemler sırasıyla diz, ayak bileği, el bileği ve dirsektir. Eklem, omurga, kalça, ve omuz eklemlerinin tutulması ise çok seyrekdir (Al-Otaibi, Porter et al. 2005).

### **2.2.6. Merkezi Sinir Sistemi Bulguları (*Nörolojik Tutulum*)**

Behçet hastalarında nörolojik tutulum sık görülmemektedir. Hastalarda meningoensefalit, pseudotümör serebri, serebellar ve beyin sapına ilişkin bulgular görülebilir. En sık tutulan bölge ise beyin sapıdır (Al-Otaibi, Porter et al. 2005).

### **2.2.7. Gastrointestinal Sistem Bulguları (*Gastrointestinal Tutulum*)**

Türk Behçet hastalarında oldukça seyrek görülen gastrointestinal tutulum Japon Behçet hastalarında sık olarak gözlenmektedir. Karın ağrısı, iştahsızlık, bulantı, kanlı diare, gastrointestinal kanal boyunca ülserasyonlar gelişebilir. Özellikle ileoçekal bölgeye lokalize olan ülserasyonlar Behçet hastalarında ölüm nedenlerinden biridir (Al-Otaibi, Porter et al. 2005).

### **2.2.8. Vasküler Sistem Bulguları (*Vasküler Tutulum*)**

Vasküler Sistem tutulumu Behçet hastalığının klinik bulgularından biri olarak görülebilir, fakat tanısı zordur (Espinosa, Cervera et al. 2002). Venöz oklüzyon, arteryel oklüzyon ve anevrizma oluşumu gibi üç temel klinik tablo ile seyredebilir. Venöz tutulum %88, arteryel tutulum ise %12 oranında bildirilmektedir (Espinosa, Cervera et al. 2002; Lee, Kang et al. 2002). Derin ven trombüslerinin sık görülmesine rağmen pulmoner emboli seyrekdir. Arteryel ve venöz tutulum birlikteliği nadir değildir ve ölümün en önemli nedenlerinden biridir (Yazici, Basaran et al. 1996). Vasküler tutulumun en sık rastlanılan şekli alt ekstremitelerde görülen derin ven trombozu (DVT)'dur. Trombozdan en fazla etkilenen büyük damarlar ise vena kava inferior ve superiordur. Arteryel oklüzyon ise en çok subklavian ve pulmoner arterleri etkiler (Kiraz, Ertenli et al. 2002). Aortda, pulmoner arterde, femoral ve popliteal arterlerde anevrizma gelişimi en önemli ölüm nedenlerindedir.

Genelde Behçet hastalarında kardiak vakaları nadirdir. Yinede düzensiz olarak ortaya çıkan vakalar kapakçık lezyonu, miyokardit (kalp kası iltahabı), endomiyokardiyal fibrosis, perikardit, intrakardiyak (kalp içi) tromboz, koroner vaskülit, ventriküler anevrizma ile birlikte bildirilmiştir (Yurdakul and Yazici 2008).

### **2.3. Tromboz ve Behçet Hastalığı**

Tromboz, damar içinde bir kan pıhtısının oluşması ve böylece kan akışını engellemesi durumuna verilen isimdir. Genelde kan akışının yavaşlaması ile birlikte damar duvarındaki aterosklerotik veya inflamatuvar değişiklikler bir araya geldiğinde tromboz oluşur. Birçok nedeni vardır ve bunların çoğunluğu henüz tam olarak anlaşılmamıştır. Ancak, en yaygın görülen nedenler kan damarlarının zedelenmesinden veya hastalanmasından ileri geldiği anlaşılmaktadır. Ayrıca, kan pıhtılaşma mekanizmasında meydana gelen bir arızada tromboza yol açabilmektedir.

Tromboz, damarda kan akımının durması sonucunda kanla beslenen organın görevini yapamamasına veya trombozun bir parçasının kopması sonucu vücudun başka bir bölgesine giderek büyük hasar veya ölüme neden olabilir.

Tromboz bacak ve kalçanın iç toplar damarlarında (ven) oluşursa daha ciddi problemler doğurur. Tromboz şayet yüzeydeki toplar damarlarda ise bu bildiğimiz varisdir ve bir öncekine göre daha az tehlikelidir. Derindeki damarlardan kopan kan pıhtısı (trombüs) kalbe doğru akar, kalpten geçen pıhtı akciğerde damar tıkanıklığına (embolizm) sebep olur. Bu da kalbin zorlanması ve hatta ölüme neden olur, çünkü akciğerde tıkanan damar nedeniyle kan akışı yavaşlar. Bunu önlemek için kalp zorlanır ve nihayet durabilir. Nadiren bu pıhtı beyin damarlarını tıkıyarak beyin kanaması veya kalp damarlarının tıkanmasına neden olabilir.

Rudolf Virchow tarafından hastalığın sebepleri teşhis edilmiştir. Virchow'a göre trombozun üç ana sebebi vardır. Bunlar; kan akışının yavaşlaması, kan yapısının bozulması yada damar iç yapısının bozulmasıdır.

Tromboz oluşumu pıhtılaşmayı önleyici ilaçların (heparin, asetil salisilik asit) veya antikoagülanların alımı ile önlenabilir.

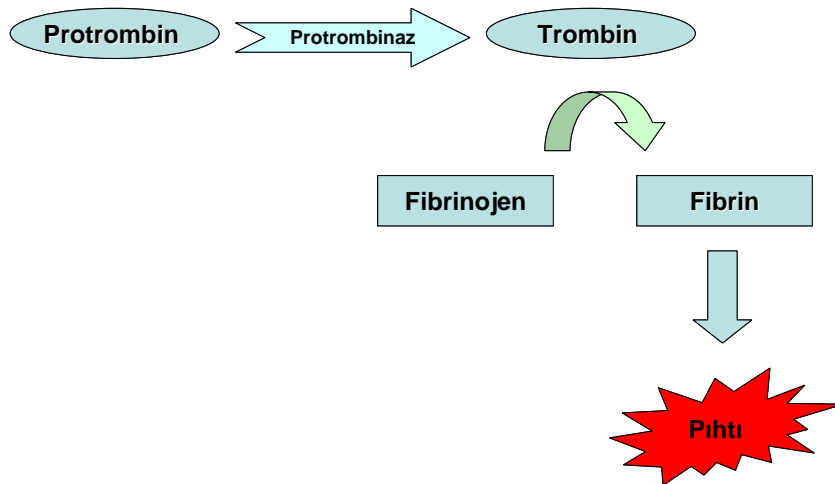
Behçet hastalığı, kronik multisistemik bir hastalıktır. Vasküler tutulum Behçet hastalığının seyri sırasında major komplikasyon sebeplerinden birisidir ve hastaların %30'unda görülür (Kiraz, Ertenli et al. 2002). Bunlar tekrarlayan flebitler (bacak venlerinin iltahaplanması), arteriyel ve venöz trombotik olaylar, anevrizma oluşumu gibi vasküler lezyonları kapsamaktadır. Behçet hastalarının %7-45'inde kardiyovasküler sistem tutulumu bildirilmiştir (H. Gök et al. 1994). Venöz sistemde daha çok olmak üzere, hem arterlerde hem de venlerde belirtiler ortaya çıkabilmektedir. Damarsal lezyonlar genellikle venöz ve/veya arteriyel trombozlardır. Venlerde en sık rastlanan lezyon yüzeysel tromboflebitdir. Tromboflebit %80 alt ekstremitelerde olur. Alt ekstremitesinde tromboflebit gelişen olguların %32'sinde zamanla süperior veya inferior vena cava tromboz olabilmektedir. Görülen diğer venöz sistem lezyonları ise vena cava superior ve/veya vena cava inferior sendromu, intrakranial venöz sinüs trombozları ve alt ekstremitelerde varisleridir. Ayrıca hastalıkta koroner arter hastalığı ve erken yaşta miyokardial infarktüs gibi kardiyak patolojilerin sıklığında artış gözlenmektedir (Sandkamp, Funke et al. 1990). Özellikle genç yaşta ortaya çıkar. Sebebi inflamatuvar olay, trombojenik eğilim ve vazospazmdir. Behçet hastalığında esas patoloji büyük arterleri olduğu kadar küçük arterleri de etkileyen vaskülitir. Küçük damarlarda immun komplekslerin birikimi sonucu ortaya çıkan nötrofil aktivasyonu, vazovazorumların dejenerasyonuna ve tıkanmaya (oklüzyona) yol açar. Aktive olmuş nötrofiller ve oksijen radikallerinin artışı ile endotel hücrelerinde hasar meydana gelir (Y. Osman et al. 2000). Bu durumda tromboz oluşumuna neden olabilir.



## 2.4. Koagülasyon Mekanizması

Hemostaz, damarın bütünlüğü veya yapısı bozulduğunda olabilecek kanamaları önleyen veya durduran, bozulmuş damar bütünlüğünü onarmak için gerekli olan fibrin ağını sağlayan ve gerekmediğinde onu uzaklaştıran kompleks bir olaydır. Bütünlüğü bozulan damarda meydana gelen kanamayı durdurmak için hemostaz mekanizması harekete geçirilir. Hemosaz sırasında 4 ana fizyolojik olay meydana gelir. Bu olaylar, damar duvarının büzülmesi (vazokonstriksiyon), trombosit plak oluşumu, pıhtı oluşumu (koagülasyon), pıhtı oluşumunun durdurulması ve pıhtının erimesi (fibrinolizis)'dir.

Damarın hasar görmesi veya bir şekilde bütünlüğünün bozulması sonucu koagülasyon reaksiyonları aktive olur. Koagülasyon reaksiyonlarının son ürünü fibrindir. Kanda eriyik şeklinde bulunan fibrinojen, pıhtılaşma olayı sırasında oluşan trombin tarafından erimeyen fibrin polimerlerine dönüştürülür. Pıhtılaşma olayında üç evre gözlenir. I. Protrombini trombine dönüştürecek ara ürünün (protrombinaz) oluşumu, II. Trombin oluşumu, III. Fibrin oluşumu (Şekil 1.1).



Şekil 1.1: Pıhtı oluşumu

Koagülasyon mekanizması fibrin yapıda pıhtı formasyonu ile sonuçlanan bir dizi kompleks basamağı içermektedir. Koagülasyon mekanizmasında yer alan plazma proteinlerine “Koagülasyon Faktörleri” denir ve bunlar çoğunlukla proteolitik enzimlerin inaktif formlarıdır. Bu faktörler çizelge 1’de gösterilmiştir.

Tüm koagülasyon faktörleri karaciğerde hepatositlerde sentezlenirken, FVIII yine karaciğerde ancak endotel hücrelerinden sentezlenmektedir. FVII, IX, X ve II’nin sentezleri için de K vitamini gerekmektedir. Faktör III, doku faktörüdür, plazmada bulunmaz. Faktör IV,  $Ca^{+2}$  iyonudur. Faktör VI, Faktör V’in aktif şeklidir. Faktör XIII’den sonra tanımlanan Fletcher ve Fitzgerald faktörleri numaralandırılmamıştır. Bu faktörler XI ve XII ile ekstrensek yolda rol alır. Fonksiyonel olarak ise dört grupta toplanabilirler:

- 1.Zimojenler (proenzimler): Faktör XIII, XII, XI, X, IX, VII, II ve prekallikrein. Bunlar inaktif öncülerdir. FXII, XI, X, IX, II, prekallikrein ve FVII serin proteaz yapıdadırlar. FXIII transpeptidazdır.
- 2.Kofaktörler: FVIII, V ve Yüksek molekül ağırlıklı kininojen. Zimojen aktivasyonunu arttıran maddelerdir.
- 3.Fibrinojen: Pıhtı oluşumu için gerekli son ürünüdür.
- 4.İnhibitörler: Pıhtı yapımını sınırlayan veya pıhtı yapıyı ortadan kaldıran maddelerdir. (Doku faktör yolu inhibitörü (TFPI, AntitrombinIII), Plazmin, Protein C ve S.).

<b>Faktör no</b>	<b>Faktör adı</b>	<b>Sentez yeri</b>	<b>Yarılanma süresi (saat)</b>	<b>Fonksiyon</b>
<b>I</b>	Fibrinojen	Hepatosit	90	Ortak yol, fibrin öncüsü
<b>II</b>	Protrombin	Hepatosit, vitamin K bağımlı	65	Ortak yol, trombin öncüsü
<b>III</b>	Doku faktörü	Endotel hücresi	?	Ekstresek yol, kofaktör
<b>V</b>	Labil faktör	Hepatosit	15	Ortak yol, kofaktör
<b>VII</b>	<b>Prokonvertin</b>	<b>Hepatosit, vitamin K bağımlı</b>	<b>5</b>	<b>Ekstresek yol, proenzim</b>
<b>VIII</b>	Antihemofilik faktör	Karaciğer sinozoidleri	10	İntrensek yol, kofaktör
	Von willebrand faktör	Endotel hücresi megakaryosit	30	Trombosit adezyonu
<b>IX</b>	Christmas faktör	Hepatosit, vitamin K bağımlı	24	İntrensek yol, proenzim
<b>X</b>	Stuart-prower	Hepatosit, vitamin K bağımlı	40	Ortak yol, proenzim
<b>XI</b>	Plazma tromboplastin antesadanı		45	İntrensek yol, proenzim
<b>XII</b>	Hageman faktör		50	İntrensek yol, proenzim
	Prekallikrein fletcher faktör		35	Enzim
	Yüksek molekül ağırlıklı kininojen= Fitzgerald faktör		150	Kofaktör
<b>XIII</b>	Fibrin stabilize eden faktör		200	Ortak yol, proenzim

**Çizelge 1:** Koagülasyon faktörleri ve özellikleri

Koagülasyonu başlatan mekanizmalar, damar duvarının veya komşu dokuların travmaya uğraması ya da kanın hasarlanmış, endotel hücreleriyle veya kan damarı endoteli dışındaki kollajen veya diğer doku elemanlarıyla teması sonucu aktive olmasıdır. Her durumda, protrombin aktivatörü oluşumuna yol açarlar. Koagülasyon mekanizmasının transmembran bir protein olup hücre bütünlüğü bozulunca kanla temas eden doku faktörünün FVII'yi aktive ederek başladığı (ekstresek yol) bilinmektedir. Bu da sonuç olarak protrombinin trombine dönüşümüne ve tüm diğer koagülasyon aşamalarının gelişmesine neden olur. Protrombin aktivatörü birbiriyle sürekli etkileşim halinde olan iki yolla oluşturulur. Bu yollar;

1. Damar duvarı ve çevresindeki dokuların travmaya uğramasıyla başlayan Ekstresek yol
2. Kanın kendi içinde başlayan İntresek yol

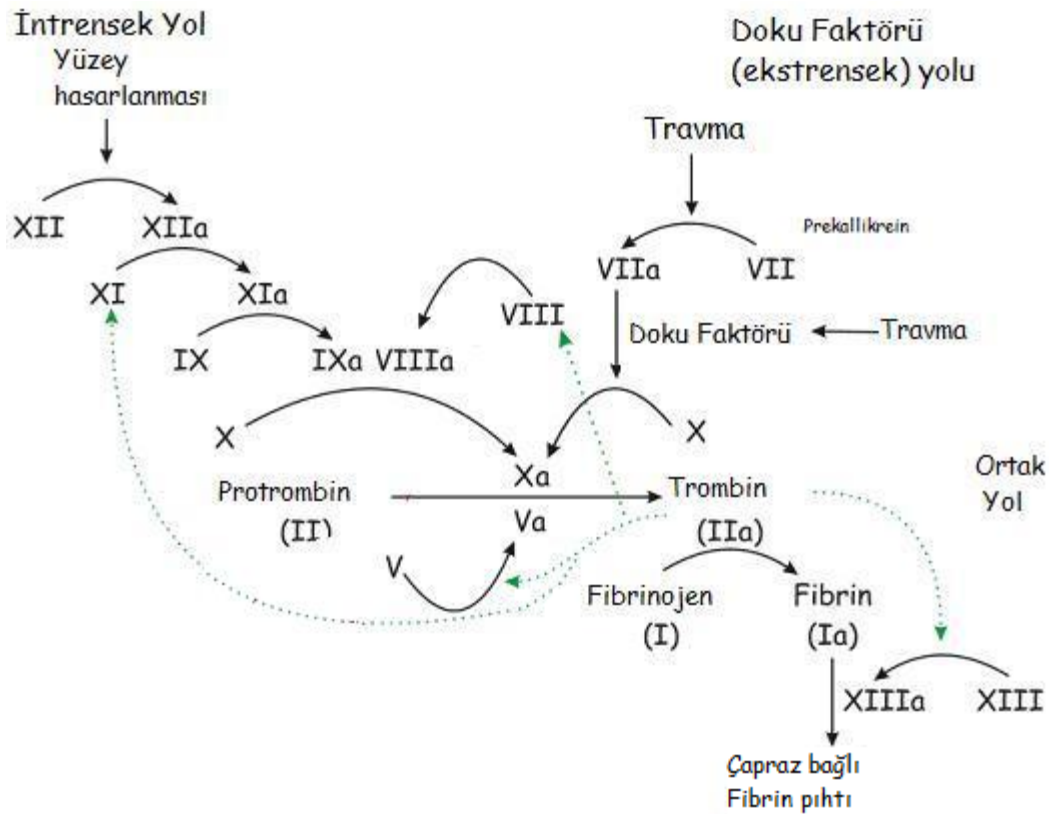
Hem intresek hem de ekstresek yolda bir seri farklı plazma proteinleri (koagülasyon faktörleri) görev alır.

#### **2.4.1. Ekstresek Yol**

Protrombin aktivatörü oluşumunu başlatan Ekstresek yol damar duvarı veya ekstravasküler dokuların travmaya uğraması ile aktive olur. Travmaya uğramış dokudan doku faktörü veya doku tromboplastini (TF) salınır. Tek zincirli glikoprotein yapısında olan TF, prekallikrein ve vitamin K varlığında kanda bulunan FVII'ye bağlanarak koagülasyonu başlatır. FVII plazmada inaktif enzim (zymojen) olarak sirküle ederken sadece %1 veya daha az bir kısmının aktif formda (FVIIa) dolaştığı bilinmektedir. FVII'ye TF bağlandıktan sonra sınırlı bir proteoliz ile FVIIa'ya dönüşür. FVIIa, TF ile bağlandığında enzimatik aktivitesi dört kat artar. Bunun sonucu sınırlı proteoliz ile FX'u aktif hale getirir (FXa). FXa, TF'ün bir parçası olan doku fosfolipitleri ile birlikte kalsiyum iyonu varlığında FV ile birleşerek protrombini trombine çevirecek ara

kompleksi (protrombinaz) oluşturur. Böylece protrombin trombine parçalanır (Eigenbrot 2002). Bunu takiben trombin bir enzim görevi yaparak fibrinojen monomerlerini kalsiyum iyonu varlığında fibrin iplikçiklerine çevirir. Fibrin iplikçikleri trombositler, kan hücreleri ve plazmayı da içine alarak pıhtıyı oluşturur (Şekil 1.2).

Trombositler de protrombinin trombine dönüşümünde önemli rol oynarlar. Çünkü protrombinin çoğu, hasarlanan dokuya daha önceden bağlanmış olan trombositler üzerindeki protrombin reseptörleri ile birleşir. Bu bağlanma, pıhtılaşmanın gerekli olduğu dokuda protrombinden trombinin oluşumunu hızlandırır.



Şekil 1.2: Ekstrensek ve İntrensek yol

## 2.4.2. İntrensek Yol

Protrombin oluşumunu ve dolayısıyla koagülasyonu başlatan İntrensek yol kanın travmaya uğraması veya kanın travmatize bir damar duvarındaki kollajenle teması sonucu başlar. Böylece kemotaksi oluşmakta, bradikininler açığa çıkmakta, kompleman sistemi ve fibrinolitik sistem aktive olmaktadır. İntrensek yol, koagülasyonda yavaş ve en önemli basamaktır.

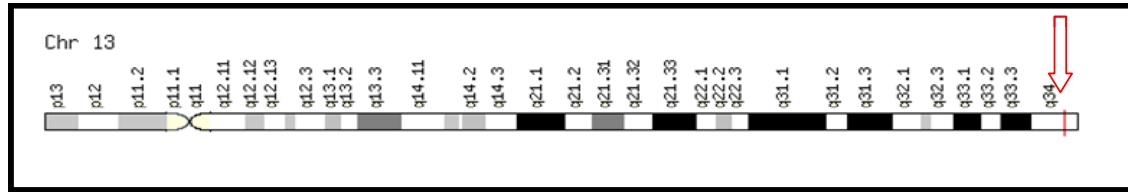
Kanın travmaya uğraması ya da damar duvarındaki kollajenle teması kandaki FXII'in "aktif FXII" olan proteolitik bir enzime dönüşmesini sağlar. Faktör XII'nin yabancı bir yüzey ile teması sonucu aktif hale geçmesi ile intrensek pıhtılaşma başlar. Cam ve asit gibi güçlü negatif yüklü yüzeyler faktör XII'yi aktive etme yeteneğindedirler. Aktif FXII (FXIIa), FXI'i enzimatik olarak aktive eder. Bu aşama için yüksek molekül ağırlıklı kininojen'e gereksinim vardır ve prekallikrein ile de hızlandırılır. Aktif FXI enzimatik etki ile FIX'u aktive eder. Aktif FIX, FVIII ve trombosit fosfolipidleriyle birlikte etki göstererek FX'u aktive ederler. Bu basamakta FVII ve TF kompleksinde FX'u aktive etmede rol alır. Bu reaksiyon agregre olmuş trombositlerin yüzeyinde oluşur. Faktörlerin trombosit fosfolipidlerine bağlanması kalsiyum iyonu köprüleri ile sağlanır. Aktif FX, FV ve trombosit birleşerek protrombin aktivatörünü oluşturur. Bu da protrombinin trombine parçalanmasını başlatır (Şekil 1.2).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar koagülasyonu başlatan olayın doku faktörünün (TF) açığa çıkması ile TF/VIIa kompleksinin oluşması olduğunu göstermektedir (TF/VIIa yolu). TF/VIIa kompleksi normal hemostazın fizyolojik aktivatörüdür ve koagülasyonun ilk basamağı olarak kabul edilmektedir.

## 2.5. FAKTÖR VII

### 2.5.1.1. *FVII* Geni

*FVII* geni 13. kromozomun uzun kolunda 3.4'de lokalize olmuştur (13q3.4). 9 ekzon ve 8 introndan oluşur. Bu gen vitamin K bağımlı koagülasyon proteinlerinin bir çoğu ile ortak ekzon-intron yapısını paylaşır ve bunların gen duplikasyon olayları ile ortaya çıktığı ileri sürülmüştür (McVey, Boswell et al. 2001) (Şekil 2.1).



Şekil 2.1 : Kromozom 13'de *FVII* genin lokasyonu

*FVII* geni koagülasyonda görev alan FVII'i kodlar. 406 amino asitten oluşan olgun protein molekülü olarak sentezlenir. Ağırlığı yaklaşık 50kDa'dur. 12.8kb uzunluğundadır. Bunun 5' ucunda 2.8kb'lık *FX* geni yer alır (McVey, Boswell et al. 2001). *FVII*, ilk olarak 38 amino asitten oluşan pre-pro öncü dizi olarak sentezlenir. Bu dizi hidrofobik translokasyon sinyali ve pro dizi büyük ölçüde korunmuş  $\gamma$ -karboksilasyon rezidülerini içerir (Wulff and Herrmann 2000). Ekzon 1a ve 1b, FVII transkriptinde ilk pre-pro öncü dizide 38 amino asit yada 60 amino asit veya her ikisini de kodlar (McVey, Boswell et al. 2001). Karaciğerde ise FVII transkriptinin yaklaşık %90'nının ekzon 1b'si yoktur. 2. ve 3. ekzonlar propeptid ve Gla domain (Glutamik asit domaini) kısımlarını kodlar. 4. ve 5. ekzonlar birinci ve ikinci Epidermal Büyüme Faktörü benzeri domaini (EGF-1 ve EGF-2) kodlarlar. Ekzon 6'dan, ekzon 8'e kadar olan ekzonlar ise aktivasyon için genetik bilgi sağlar ve serin proteaz katalitik domainini kodlarlar (Wulff and Herrmann 2000) (Şekil 2.2).

### 2.5.1.2. FVII Yapısı ve Fonksiyonu

FVII koagülasyon yolağında görev alan vitamin K bağımlı serin proteaz ailesindedir. Esas olarak diğer bir çok koagülasyon faktörü gibi karaciğerde, inaktif tek zincir glikoprotein olarak sentezlenir. Plazmada 0.5µg/ml (10nmol/L) konsantrasyonunda tek zincirli zimojen olarak dolaşır (Peyvandi, Jenkins et al. 2000). FVII'nin asıl aktivatorü Doku Faktörü (TF, Tissue Factor)'dür. Fakat diğer koagülasyon faktörleri de aktive olmasında rol oynar ( FXIIa, FIXa, FXa ve Trombin) (Lievers, Mennen et al. 2000).

Vasküler endotelin hasarlanması sonucu TF ile FVII kompleks oluşturur. Daha sonra tek zincirli zimojen haldeki FVII, Arg-152 ve Ile-153 rezidülerinden kesilerek iki zincirli aktif serin proteaza dönüşür. Bu yapı FVII'nin aktif halidir ve FVIIa olarak gösterilir (Peyvandi, Jenkins et al. 2000). Böylece FVII'nin enzimatik aktivitesi 20 - 25 kat kadar artmış olur (Lievers, Mennen et al. 2000). FVIIa'nın kısmen ve tamamen aktif formları arasında bir denge vardır. Bu denge TF etkisinde, enzimi aktifleştirme yönündedir (Peyvandi, Jenkins et al. 2000).

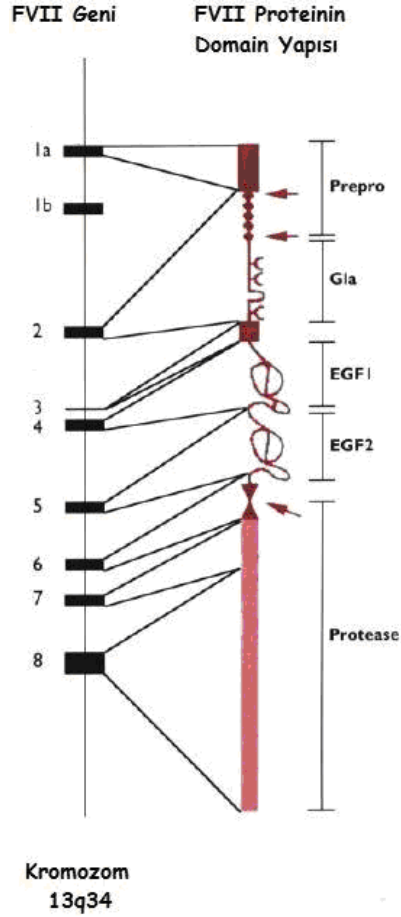
FVIIa disülfid bağıyla bağlı 152 rezidü içeren hafif zincir, 254 rezidü içeren ağır zincirden oluşur (Peyvandi, Jenkins et al. 2000). Trombin üretimi için doğrudan FX, FIX, FXII'nin aktivasyonunu sağlayarak Ekstresek yolda koagülasyonun başlangıcında yer alır.

FVII yapısı ve fonksiyonu FIX, FX, Protrombin ve Protein C ile benzerdir. Bunlar vitamin K bağımlı, tripsin süperfamilyasına ait serin proteaz ailesindedir ve N terminal bölgeleri Glutamik asit rezidülerinden post transkripsiyonel  $\gamma$ -karboksilasyonuna ihtiyaç duyarlar. Bu yapısal elementler Gla domaini olarak adlandırılır. Bu modifikasyonlardan oluşan negatif yük kümeleri, bu proteinlerin membran bağlayıcı modül oluşumundaki konformasyon baskılayıcı işleminde kalsiyum bağlanmasını sağlar. Membran etkileşimi bu proteinlerin fonksiyonu için gereklidir (McVey, Boswell et al. 2001; Eigenbrot 2002).



FVII, FIX, FX ve Protein C gen duplikasyonu ile ortaya çıktığı ileri sürülen, 4 farklı domainden oluşan homolog modüler yapı içerirler. FVII'nin N terminal Gla domaini 10  $\gamma$ -karboksilatlı Glutamik asit rezidüsüne sahiptir ve His193, Asp242 ve Ser344 üçlü katalitik rezidüsünü içeren C terminal serin proteaz tarafından takip edilen Epidermal büyüme faktöründe korunmuş iki domainde (EGF-1, EGF-2) homoloji gösteren dizi amfipatik helikal bölge (hem hidrofobik, hem de hidrofilik özelliğe sahip) ile bağlıdır (McVey, Boswell et al. 2001; Eigenbrot 2002). Kısaca FVII'nin yapısında N terminal bölgesinde Gla domaini, onu takip eden EGF-1 ve EGF-2 domainleri, C terminal bölgesinde de serin proteaz domaini yer alır (Şekil 2.2).

Birçok ökaryotik promotordan farklı olarak, vitamin K bağımlı koagülasyon proteinlerinin promotor bölgesinde TATA kutusu yoktur. Buna ek olarak, ACTTTC dizisi FVII, IX, X'un proksimal promotorunda benzer lokasyonda bulunur. Bu diziyeye karaciğer transkripsiyon faktörü 'hepatosit nükleer faktör- 4' (HNF-4) bağlanır (Pollak, Hung et al. 1996). Aynı zamanda promotor bölgede Sp1 bağlanma bölgesi de bulunmaktadır. Sp1 nükleotid dizisi ACTTTG ve CCCCTCCCC olan promotor bölgesindeki ilk 180bp'lik diziyeye bağlandıkları gösterilmiştir. Bu bölgeler mutasyona uğradığında FVII promotor aktivitesinin düştüğü gözlenmiştir (Pollak, Hung et al. 1996; Carew, Pollak et al. 1998).



**Şekil 2.2:** FVII proteinin yapısı ve kodlayan ekzonlar

FVIIa, TF yokluğunda substratları olan FX, FIX göre hiç katalitik aktivite göstermez. TF hücresel reseptör gibi işlev görür ve bir dizi reaksiyon sonucu FVII/FVIIa'nın proteolitik aktivitesini kat kat artırır. Bu reaksiyonlar;

1. TF'ün hücre membranı üzerindeki yeri FVII'nin Gla domainin fosfolipitlerle etkileşmesine izin verir. Böylece FVII'nin TF'e olan afinitesi artar.
2. FVII'nin TF'e bağlanması, TF'ün proteolitik aktivasyona daha duyarlı hale getirir.
3. FVIIa'nın aktif bölgesinin allosterik etkisi sayesinde TF enzimin proteolitik aktivitesini güçlendirir.
4. Son olarak hücre yüzeyinde FVIIa'da lokalize olan TF membrane ve kendi makromoleküler substratları (FIX, FX) ile arasında uygun bir mesafe yer alır. TF-FVIIa kompleksi ile kesmek için etkili olan proteolitik parçalanmasını sağlar (McVey, Boswell et al. 2001; Eigenbrot 2002).

Amino asit rezidüleri FVII'nin TF'e bağlanması için önemlidir ve TF-FVIIa fonksiyonel aktivitesi FVII varyantlarının doğal disfonksiyonlarının tanımlanması ve her ikisinde yani FVII ve TF'ün varyantlarının karakterizasyonu (tanımlanması) bölge spesifik in-vitro mutagenез ekspresyonla belirlenmiştir. FVII/FVIIa'nın TF'e bağlanması kapsamlı ortak yüzey ile olur. Mutasyon analizlerinin temelini bu duruma dayandığı ileri sürülmüştür. Bunun doğrulanması TF'ün extrasellüler domaini FVIIa tarafından tutulduğu zaman oluşan kompleksin kristal yapısı çözüldüğünde olmuştur (McVey, Boswell et al. 2001; Eigenbrot 2002).

İki protein arasındaki ortak yüzey FVIIa'nın 4 domaininin ve TF'ün ekstrasellüler domainlerindeki içine alır. FVIIa'nın Gla domaini, TF'ün C terminal membrane proksimal domaini ile etkileşir. FVIIa'nın EGF-1 domaini TF'ün iki domaini ile de temas eder. FVIIa'nın EGF-2 ve serin proteaz domaini TF'ün N terminal domaini ile sürekli etkileşen yüzey oluşturur (McVey, Boswell et al. 2001; Eigenbrot 2002).

### **2.5.1.3. FVII Geni Mutasyon ve Polimorfizmleri**

Tüm literatürde 238 bireyde *FVII* genindeki mutasyonlar tanımlanmıştır ve 70 mutasyon belirlenmiştir. Bu mutasyonların FVII aktivitesini artırdığı ya da azalttığı bildirilmiştir. Bunlar 49 tane missense mutasyon, 3 tane nonsense mutasyon, 6 tane splice junction, 4 promotor mutasyonu, 1 insersiyon, 7 delesyondur. Mutasyonlar gen boyunca tanımlanmıştır ve proteinin tüm domainlerini etkilemektedir (Wulff and Herrmann 2000).

Akraba olmayan, birbirinden ilgisiz bireylerde bazı tekrarlayan mutasyonlar görülmüştür. Bunlar; R79Q/W, 6071G>A, Q100R, 9731G>A, 10553-10554insCTCAGCGAGCACGAC, 10553-10568del, A244V, A294V, M298I, R304Q, C310F, G342E, T359M, ve 11125del. Diğer mutasyonlarda ise bireylerin aynı haplotipleri ve aynı etnik geçmişi paylaştıkları görülmüştür. Bunlar; Q100R, 9731G>A, A244V, A294V, M298I, G342E, ve 11125del (McVey, Boswell et al. 2001). FVII

eksikliğine neden olan en sık görülen mutasyonlar; A294V yanlış anlamlı mutasyonu ve ekzon 8'deki 11128delC ve A294V ikili mutasyonlarıdır (Wulff and Herrmann 2000). Mutasyonların bir kısmında plazmadaki FVII seviyesi düşük olduğundan hem FVII aktivitesi, hemde FVII antijen seviyesi düşük, diğerlerinde ise FVII antijen seviyesi normal fakat FVII aktivitesinin düşük olduğu gözlenmiştir (Peyvandi, Jenkins et al. 2000).

*FVII* geninde mutasyon olan bireylerin çoğunluğu ya asemptomik ya da klinik fenotipi iyi bilinmemektedir. Genelde şiddetli kanama fenotipi *FVII* geninde mutasyonu homozigot taşıyan bireylerde FVII aktivitesinin normalden %2 altında olmasıyla gözlenir. Fakat in-vitro çalışmalarda önemli oranda hafif kanamalı fenotipte bireylerinde benzer FVII aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Bu grupları ayırt etmede in-vitro denemelerin düşük FVII aktivitesine duyarlılığındaki eksiklikten dolayı olabileceği ileri sürülmektedir (McVey, Boswell et al. 2001).

Plazmadaki FVII antijen (FVIIAg) ve FVII koagülasyon aktivitesinin (FVII:C) seviyesindeki değişiklik popülasyonlarda önemlidir (FVIIAg seviyesi yaklaşık olarak %18, FVII:C seviyesi %26 ; van't Hooft 1999). Bu seviyelerin genetik ve çevresel faktörlerden etkilendiği bilinmektedir (Yaş, cinsiyet, kolesterol, trigliserit seviyesi; (Balleisen, Assmann et al. 1985)).

Son çalışmalarda FVIIAg ve FVII:C plazma seviyeleri ile *FVII* genindeki polimorfik markerlar arasında ilişki bulunmuştur. FVII:C plazma seviyesi ve hastalıklar arasında önemli ölçüde olası bir ilişki dikkati çekmiştir (McVey, Boswell et al. 2001).

*FVII* geninde çeşitli polimorfizmler tanımlanmıştır. Bu polimorfizmlerin bulunuşuna göre tromboz riski artmaktadır (van 't Hooft, Silveira et al. 1999). 10976. nükleotiddeki G'den A'ya dönüşümle oluşan R353Q polimorfizmi ekzon 8'de yer alır (McVey, Boswell et al. 2001). 353. nükleotiddeki 2. kodonun değişimi ile olur. İki allel R ve Q taşır (Quek, Low

et al. 2006). *FVII* geninin 5' ucunda bulunan -323. nükleotiddeki 5' CCTATATCCT 3' 10bç'lik dizinin insersiyonu diğer bir polimorfizmdir. Promotor bölgesinde yer alan bu 10bç'lik polimorfizmin 2 alleli vardır. 10bç'lik insersiyonun yokluğu (0bp) ve 10bç'lik insersiyonun varlığı terimleri ile ifade edilir (Quek, Low et al. 2006).

R353Q polimorfizmi ve -323ins10bç polimorfizmi birbiriyle güçlü bağlantı gösterir ve FVII:C ve FVIIAg seviyelerine etkileri çalışılmıştır. Bu polimorfizmler plazma FVII:C ve FVIIAg seviyesindeki değişiklikte %20-30 ilgili olduğu bulunmuştur (McVey, Boswell et al. 2001).

*FVII* genindeki diğer bir polimorfizm intron 7'de gösterilmiştir. Bu polimorfizm dizilerin çeşitli tekrarlarını içerir. R6, en yaygın görülen intron 7 polimorfizmidir ve 37bç'lik dizinin 6 kopyasını içerir. R7 ikinci derecede yaygın olan intron 7 polimorfizmidir, 37bç'lik dizinin 7 kopyasını içerir (Quek, Low et al. 2006). Promotor bölgesindeki -122T>C polimorfik varyantı, intron 1a 73G>A polimorfizmi ve ekzon 5'deki H115H kodonunda C>T polimorfizmi diğer polimorfizmlerdir (Wulff and Herrmann 2000). Son olarak -401G/T, -402G/A, -628A/G, -630G/A, -668A/C, -670C/A, -2989C/A, -3216C/T polimorfizmleri de *FVII* geninin promotor bölgesinde tanımlanmıştır (Bernardi, Patracchini et al. 1993; Pollak, Hung et al. 1996; Sabater-Lleal, Almasy et al. 2006).

#### **2.5.1.4. FVII Polimorfizimleri ve FVII Plazma Seviyesi Üzerindeki Etkileri**

Genetik varyasyonlar FVII plazma seviyesinin belirlenmesinde önemli bir rol alırlar. Son 10 yıldır yapılan çalışmalarda *FVII* geninin 8. ekzonundaki polimorfizmin (R353Q) plazma FVII:C seviyesinde genotipik etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu polimorfizm 353. kodonun 2. pozisyonunda yer alan A'dan G'e olan baz değişimi Arjininden Glutamine değişime neden olur (Liu, Heng et al. 2002). Green ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında ilk defa Avrupa popülasyonunda R353Q polimorfizmi heterozigot bireylerde %22 oranında FVII:C seviyesini düşürdüğünü belirtmişlerdir. Aynı genetik

etki sonraki çalışmalarda İngilizleri, İrlandalıları, Fransızları, İtalyanları, İsveçleri, Amerikanlıları, Afrikalıları, Gujarat Hintlerini ve Japonları içine alan etnik gruplarla teyit edilmiştir (Liu, Heng et al. 2002). Malesyalılarda ve Hintlilerde 353Q alleli, R alleleline göre FVII:C seviyesini düşürdüğü gösterilmiştir. 353. nükleotidde allellerin bulunuşu FVII:C seviyesi üzerindeki etkisi sırasıyla R353R>R353Q>Q353Q'dır (Quek, Low et al. 2006).

FVIIAg seviyesi ve genotip ilişkisi sadece tüm populasyonda değil koroner arter hastalarında da incelenmiştir. Buna ek olarak 353Q allelini taşıyan FVIIa'nın düşük seviyeleri ile de bağdaştırılmıştır (Liu, Heng et al. 2002). Ayrıca bir çok araştırmada FVII seviyesinin koroner arter hastalığında risk faktörü olarak rol oynadığı gösterilmiştir (Quek, Low et al. 2006). İlginç bir şekilde bazı populasyonlarda FVII seviyesi R353Q polimorfizmi belli olan genotiplerde trigliserit seviyesiyle bağlantılı bulunmuştur (Liu, Heng et al. 2002).

Rekombinant 353Q ifadelenme çalışmalarında da bu amino asit değişiminin FVII seviyesini azaltan salgılanma bozukluğuna neden olduğu kanıtlanmıştır (Lindman, Pedersen et al. 2005).

FVII plazma seviyesi üzerinde etkili genetik faktörlerden biri de *FVII* geninin promotor bölgesinde yer alan -323. nükleotiddeki 10bç'lik insersiyon polimorfizmidir (-323ins10bç) (Lievers, Mennen et al. 2000). Yapılan birçok çalışmada R353Q ve -323ins10bç polimorfizmlerinin bağlantılı olduğu (Quek, Low et al. 2006) ve plazma FVII seviyesiyle ilgili olduğu gösterilmiştir (Liu, Heng et al. 2002).

Promotor bölgesinde -323. nükleotiddeki 10bç'lik insersiyonun 2 alleli vardır. P0, 10bç'lik insersiyonun yokluğunu, P10 ise 10bç'lik insersiyonun varlığını ifade eder. P10 alleli düşük seviyedeki FVII koagülasyon aktivitesi ile ilgilidir. Humphries ve arkadaşları

yaptıkları çalışmalarında P10 allelinin sıklığını 0.11, Sacchi ve arkadaşları ise 0.2 olarak hesaplanmışlardır (Lievers, Mennen et al. 2000).

Singapur, Çin, Malezya ve Hindistanı içine alan etnik grupta yapılan bir çalışmada R353Q ve 10bç'lik promotor bölge polimorfizminin buluşunun önemli ölçüde farklılık gösterdiği belirlenmiştir. Bunlar arasında Çin popülasyonunda en düşük sıklıkta olduğu gösterilmiştir (Quek, Low et al. 2006).

Bu iki polimorfizm 209 erkek ve 214 kadınlarda oluşan sağlıklı Çin popülasyonunda taranmıştır. Allel sıklığı sırasıyla 10bç ve 353Q da 0.036 ve 0.045 bulunmuştur ve iki polimorfizm arasında güçlü bağlantı gözlenmiştir. FVII koagülasyon aktivitesi (FVII:C) ve FVII antijen (FVIIAg) seviyesi arasında güçlü bir genotip ilişkisi bulunmuştur. Bilinen alleller bakımından heterozigot bireylerin FVII:C ve FVIIAg seviyesi homozigot bireylere göre daha düşüktür (Liu, Heng et al. 2002).

Cinsiyete göre analiz edildiğinde erkek ve kadınlarda 10bç'lik insersiyon polimorfizmi FVIIAg seviyesiyle ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte R353Q ve -323ins10bç polimorfizmleri sadece kadınlarda FVII:C seviyesi ile ilişkilendirilmiştir. Çin popülasyonunda 10bç'lik insersiyon *FVII* geni transkripsiyonunu azaltabileceği böylece FVII proteinin sentezini azaltacağı ve FVII:C seviyesinde azaltabileceği gösterilmiştir (Liu, Heng et al. 2002).

İtalyan yapılan bir çalışmada heterozigot bireyler 0bp/10bp, homozigot bireylere göre %23.5 düşük FVII:C ve %18.7 düşük FVIIAg seviyesine sahip oldukları gösterilmiştir.

Hücre transfeksiyon çalışmalarında 10bç'lik insersiyon taşıyan haberci gen normal allele karşılaştırıldığında düşük FVII transkripsiyonel aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir (Lindman, Pedersen et al. 2005).

Genin promotor bölgesinin protein sentezinin hızını kontrol ettiği bilinir. Herhangi küçük değişiklik protein üretiminde önemli değişikliğe neden olabilir (Liu, Heng et al. 2002). FVII plazma seviyesi üzerindeki promotor polimorfizmlerinin etkisi R353Q polimorfizmine göre daha baskındır (Liu, Heng et al. 2002). 10bç'lik insersiyon, FVII promotor bölgesinin transkripsiyon faktörleriyle etkileşmesini engelleyerek, (McVey, Boswell et al. 2001) FVII proteinin sentez sürecini ya değiştirir ya da engeller ve sonuç olarak sentez oranı azalır ve böylece FVII plazma seviyesi düşer (Liu, Heng et al. 2002).

Yapılan iki çalışmada, *FVII* promotor bölge polimorfizmlerinin FVII koagülasyon aktivitesini belirleyen fonksiyonel polimorfizmler olarak belirlenmiş ve Tromboz oluşma riskine etki ettiği görülmüştür. HepG2 hücrelerinde yapılan araştırmalarda -323ins10bç promotor polimorfizminin bulunuşu %33 FVII koagülasyon aktivitesini azalttığı bulunmuştur. Daha sonra Hooft ve arkadaşları tarafından -323ins10bç ile birlikte kalıtılan -401G/T polimorfizmi FVII plazma seviyeleri üzerinde etkili olduğunu göstermişlerdir (Lievers, Mennen et al. 2000).

İki tane tek nükleotid polimorfizmi promotor bölgesinde belirlenmiştir. Bunlar -401'deki G→T değişimi ve -402'deki G→A değişimidir. Promotor bölgesinde yer aldıklarından bu iki polimorfizm nükleer proteinlerin bağlanmasını etkilediği gösterilmiştir ve spesifik Nükleer faktör bağlanma noktası olabileceği düşünülmüştür (van 't Hooft, Silveira et al. 1999).

-401T alleli bazal transkripsiyon oranını ve plazma FVII konsantrasyonunu düşürdüğü bulunmuştur. -402A alleli bazal transkripsiyon oranını yükselttiği ve dolayısıyla plazma FVII seviyesini yüksettiği gösterilmiştir. Aynı zamanda -402A alleli, -401T alleleline göre populasyonlarda üç kat daha sık gözlenmektedir. -401G/T promotor polimorfizminin Beyaz ırkta R353Q ile güçlü bağlantı gösterdiği ve -323ins10bç ile de tam bağlantı gösterdiği bilinmektedir (Lindman, Pedersen et al. 2005). -401T ve 353Q alleleri -401G ve R353 allellerinden daha düşük FVII:C ve FVIIAg plazma konsantrasyonuyla



ilişkilendirilmiştir. Bunun tersi, -402A alleli, homozigot -402G allele göre yüksek FVII:C ve FVIIAg konsantrasyonu ile ilişkilendirilmiştir.

-402G/A polimorfizminin, yine promotor bölgede bulunan -670C/A ve -630G/A polimorfizimleri ile bağlantılı olduğu ileri sürülmektedir (Lindman, Pedersen et al. 2005). -401G/T polimorfizmiyle de -323ins10bç ve -122C/T polimorfizimlerinin bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Bernardi, Patracchini et al. 1993; Pollak, Hung et al. 1996).

### **2.5.1.5. Faktör VII Eksikliği**

Faktör VII eksikliği ilk olarak 1951 yılında Alexander ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır ve tanımlandığında Serus Protrombin Conversion Accelerator (SPCA) eksikliği olarak adlandırılmıştır (Lapcorella and Mariani 2008). Faktör VII eksikliği, Faktör VIII, Faktör IX ve Von Willebrand faktör eksikliklerinden sonra dördüncü sıradadır. Genel olarak toplumlarda 1/300.000 ile 1/500.000 arasındaki sıklıkta görülmektedir. Bütün doğuştan kanama bozukluklarının da % 0.5'ni oluşturmaktadır. Erkek ve kadınlar eşit oranda etkilenmektedir. Akraba evliliklerinin sık olduğu ülkelerde daha fazla sayıda hasta rapor edilmektedir (Shen, Lin et al. 2001).

Nadir olarak görülen Faktör VII eksikliği kanama bozukluğuna neden olur. Sebebi tam olarak bilinmemektedir. Kalıtsal bir kanama bozukluğu olan FVII eksikliği, otozomal resesif geçiş gösterir. Homozigot bireylerde belirgin FVII düzeyi düşüklüğü görülürken heterozigot bireylerde orta düzeyde bir FVII düzeyi eksikliği görülür, hatta klinik bulgu vermeyebilir (Millar, Kembal-Cook et al. 2000).

Sık görülmeyen bir durum olduğundan hastalığın patofizyolojisi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Ancak FVII'nin hem polimorfizimlerinin hem de plazmadaki düzeyinin hastalığa neden olabileceği belirtilmiştir (Millar, Kembal-Cook et al. 2000).

Londra'da yapılan çalışmada (Northwick Park Heart Study) FVII:C istemik kalp hastalığında ölümcül olaylarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Japonların yaptığı bir çalışmada FVII:C koroner arter hastaları için bağımsız bir risk faktörü olduğu ileri srlmştir (Liu, Heng et al. 2002).

Almanya'da yapılan bir çalışmada (Munster heart) ise koroner arter hastaları için bağımsız risk faktörü olarak bulunmasada, yüksek FVII:C seviyesi ölümcül koroner arter hastalığı eğilimine neden olduğu gösterilmiştir. Bunlara ek olarak birçok klinik çalışmalarla bu durum desteklenmiştir (Liu, Heng et al. 2002).

## **2.6. Moleküler Teknikler**

### **2.6.1. Çözeltiler ve Solüsyonlar**

DNA izolasyonunda kırmızı kan hücrelerini lize etmek için Red Blood Cell (RBC) lizis çözeltisi, fenol / kloroform karışımı; polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerini görmek için kullandığımız agaroz jeli hazırlamak için TBE (Tris Hidrojen klorür Borik asit EDTA - Etilendiamin tetraasetikasit-), SSCP jeli hazırlamak için akrilamid bisakrilamid çözeltisi, amonyum per sülfat çözeltisi (APS) ve TEMED (N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin) solüsyonları kullanılmıştır.

### **2.6.2. DNA Ekstraksiyonu**

DNA, kan örneklerinden fenol-kloroform yöntemi ile izole edilmiştir. İzole edilen DNA yı çöktürmek için etanol kullanılmıştır.

### **2.6.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu**

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), ilk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir. PCR, hedef DNA dizilerinin in-vitro koşullarda çoğaltılmasıdır. Bu yöntem polimeraz enzimi varlığında bir dizi DNA polimeraz reaksiyonu içerdiğinden, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olarak adlandırılmaktadır (Akar, 1999). Polimeraz zincir reaksiyonu, dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in-vitro olarak çoğaltılmasını sağlayan ve DNA molekülünün milyonlarca, hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapmaya olanak sağlayan bir tekniktir.

PCR yönteminin uygulamaları arasında klonlama, genetik bozuklukların tanısı, mutasyonların saptanması, in-vitro mutasyon yaratılması, DNA haritalaması, enfeksiyon hastalıklarında bakteri ve virüs tanımı, insan embriyolarındaki tek bir hücrede ya da gametlerdeki genetik bozuklukların incelenmesi gibi uygulamalar yer almaktadır (Öner, 2002). Basit, hızlı ve çok yönlü bir teknik olması PCR teknolojisinin moleküler biyolojide ve modern genetikte çok kullanılan bir teknik olmasına neden olmuştur.

Yöntemin temeli, çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesinin iki ucunu özgül olarak tanıyıp bağlanabilen sentetik oligonükleotit primerler kullanılarak istenilen bölgenin çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Akar, 1999). Bu teknikte tek bir gen bölgesi çoğaltılabileceği gibi, genin sadece bir parçası da çoğaltılabilir. PCR'nin prensibi; tekrarlanan üç basamağa dayanır.

- **A. Denatürasyon:** Bu basamakta PCR reaksiyonu içinde yer alan çift zincirli kalıp DNA'nın birbirinden ayrılması sağlanır. Genelde 94-95°C'de 0.5-2 dakika denatürasyon yeterlidir.

- **B. Primerlerin yapışması (hibridizasyon):** Bu basamakta birbirinden ayrılmış DNA zincirlerine primerlerin 55-60°C'de bağlanması gerçekleştirilir. Optimal "annealing" sıcaklığı "T<sub>m</sub>" (melting temperature) derecesinden 5°C daha düşüktür. 0.5-2 dakika "annealing" için yeterlidir. Eğer spesifik olmayan PCR ürünleri elde ediliyorsa her defasında "annealing" derecesi 1-2°C artırılarak optimize edilebilir.

- **C. Zincir uzaması (polimerizasyon):** Zincir uzaması taq polimeraz aktivitesinin en yüksek olduğu 70-75°C arasında gerçekleştirilir. 2kb'a kadar olan PCR ürünlerinin oluşturulması için bir dakika süre yeterlidir. Daha uzun DNA fragmanlarının çoğaltılabilmesi için bu süreye her kb için bir dakika eklenmelidir.

Bir PCR döngüsü bu üç adımdan (çift iplikli DNA'nın ayrılıp tek iplikli hale getirilmesi, sentetik oligonükleotit primerlerin tek iplikli DNA'ya bağlanması, polimeraz enzimi ile zincirin uzaması) oluşur ve her adım farklı sıcaklıklarda gerçekleşir (sırasıyla 94°C - 98°C, 37°C - 65°C, 72°C). Elde edilecek ürünün miktarı teorik olarak, bu üç temel basamağın tekrar sayısına bağlıdır. Oluşturulan DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. Yani n sayıda döngü sonucu 2n sayıda ürün elde edilir. İşlem ısı dönüştürücü (thermocycler) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklık koşulları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemle; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir (Akar,1999).

Bir PCR için gerekli temel bileşenler ; Çoğaltılacak DNA bölgesini içeren DNA kalıbı, çoğaltılacak bölgenin başlangıcını ve sonunu belirleyen iki primer, çoğaltılacak bölgeyi kopyalayacak olan ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, yeni zincirin yapımında kullanılacak olan deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP), DNA polimeraz enzimi için gerekli olan kimyasal ortamı (uygun pH ve iyon koşullarını) sağlayan tampon karışımıdır.

PCR reaksiyonunda çoğaltılacak hedef gen bölgesi seçildikten sonra ilk adım; zincirlerin birbirinden ayrılmasıdır. İnsan genomik DNA'sı için 94-98°C uygundur. Reaksiyon karışımının 94°C'ye dek ısıtılması ile kalıp DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır. Bir sonraki adım, çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen, 5' ucuna komplementer, 18-20 baz uzunluğundaki bir çift sentetik oligonükleotitin, 37-65°C arasında hedef DNA'ya bağlanması aşamasıdır. Ortam sıcaklığının primerlerin bağlanması için gerekli olan ısıya düşürülmesi ile iki primer tek iplikli DNA molekülleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan DNA dizilerini tanıyarak bağlanır. Son adım ise, 72°C'de ortama eklenen dNTP'lerle çift zincirli DNA'ların sentezidir. DNA polimeraz enzimi uygun tampon ve dört çeşit dNTP varlığında primerin 3' hidroksil ucundan uzamasını sağlar. Bu şekilde kalıp DNA zincirine tamamlayıcı olan yeni DNA molekülü sentezlenmiş olur. Bunların üzerine hemen ısıya dayanıklı DNA polimerazlar tutunur ve primerlerin 3' ucuna deoksinükleotitleri ekleyerek her iki zincir üzerinde DNA sentezi

yaparlar. Bir PCR döngüsünü oluşturan bu üç adımın 20-30 kez tekrarlanması ile hedef DNA'yı  $10^6$ - $10^{12}$  kat çoğaltmak mümkündür (Akar, 1999).

PCR reaksiyonu için kullanılan polimeraz enzimi *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ısıya dayanıklı Taq polimeraz enzimidir. Enzim, yüksek ısılarda iyi çalışması ve hızlı DNA sentezi yapması nedeni ile tercih edilmektedir (Akar, 1999). Taq polimeraz enziminin hata yapma oranı oldukça yüksektir. Çünkü bu enzimin 3'-5' hata tamiri aktivitesi yoktur. Eğer yüksek oranda doğruluk gerekiyorsa hata tamir aktivitesi olan enzimler tercih edilmelidir.

Sentetik oligonükleotit primerlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca  $T_m: 4(GC)+2(AT)$  formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmekte ve hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini arttırmaktadır. Spesifikliğı arttıran bir diğer unsur oligonükleotidlerin uzunluğudur. Optimal uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid olmalıdır. Kullanılacak oligonükleotidlerin seçimi PCR işlemi için çok önemlidir.

Kullanılacak sentetik oligonükleotit primerlerin seçimi sırasında primer dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan primer çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmamalıdır; aksi takdirde primerin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak PCR'in olumsuz olarak etkilenmesine neden olur. Primerlerin nükleotit içerikleri de rastgele olmalıdır, tekrarlayan diziler içermemelidir.

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 10mM olacak şekilde kullanılır. PCR karışımında tek değerli katyonların özellikle 50-60mM düzeyinde  $K^+$  bulunmasının çoğaltılmayı önemli ölçüde arttırdığı

saptanmıştır. Yine karışımında 100µg/ml jelatin bulunmasının benzer etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, serbest magnezyum (MgCl<sub>2</sub>) konsantrasyonunun azalması ile Taq Polimeraz doğruluğu arttırılabilir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü Mg<sup>+2</sup> iyonunu bağladıklarından; her PCR protokolünde Mg<sup>+2</sup> konsantrasyonunu ampirik olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg<sup>+2</sup>, enzimin spesifikliğini azaltır, azı ise enzimin inaktif olmasına yol açar (Akar, 1999).

PCR'ın kullanım alanları; DNA'nın dizi analizi ve DNA haritalamasında, insan genom projesindeki araştırmalarda, genetik hastalıkların teşhisinde, DNA parmak izi analizinde, adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesinde, allellik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde, tarımda (tohum saflığının belirlenmesi), sistematik ve evrim çalışmalarında (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde), klonlama deneylerinde, mutagenез çalışmalarında, fosil DNA çalışmalarında, gen ifadelerinin karşılaştırılmasında kullanılmaktadır.

#### **2.6.4. Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformational Polymorphism)**

Mutasyon taraması için birçok moleküler teknik geliştirilmiş olmakla birlikte en sık kullanılan yöntemlerden biri tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi (SSCP)'dir. PCR tekniği kullanılarak elde edilen ürünlere uygulanan bu yöntem; denatüre edici olmayan jellerde tek iplikli DNA'da oluşan değişimin, jeldeki yürüme farklılığına dayanarak belirlenmesini sağlar. Bu yöntem nükleotid dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşan tek baz değişikliklerini, delesyon ve insersiyonları belirlemeyi mümkün kılar .

Aynı boyuttaki tek zincirli DNA parçacıkları (ssDNA) içerdikleri nükleotit değişikliklerine bağlı olarak jelde farklı pozisyonlarda yürürler. DNA'daki herhangi bir

değişiklik DNA parçacığının konformasyonunun ve dolayısı ile elektroforetik hareket yeteneğinin değişmesine neden olur .

SSCP ile mutasyon taraması yönteminde mutasyon taranacak DNA bölgesi önce PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılan DNA molekülleri yüksek ısı ile çift iplikli halden tek iplikli hale getirilip (99°C'de denatüre edilir), elektroforez jeline yüklenir. Poliakrilamid jel elektroforezinde göç hızlarına bakılarak sonuçlar değerlendirilir. Tek iplikli DNA'nın farklı bantlar göstermesi; mutasyonu işaret etmektedir. SSCP tekniği aynı anda birçok örnekte düşük maliyette mutasyon taramasını sağladığından moleküler genetik çalışmalarına hız kazandırmaktadır. Yöntemden en iyi şekilde sonuç alabilmek için, kullanılan PCR ürününün 200 bç civarında olması gerekmektedir (Akar, 1999).

Teorik olarak SSCP ile 200bç'lik bir dizide mutasyon belirleme oranı %90; 400bç'lik bir dizide mutasyon belirleme oranı %80'dir. İncelenen dizinin uzunluğu arttıkça SSCP'nin mutasyon belirleme yeteneği azalır. Ancak SSCP tekniğinin mutasyon belirleme yeteneği mutasyonun tek zincirli DNA'nın oluşturduğu konformasyonu ve elektroforetik hareketini nasıl etkilediğine bağlı olduğundan incelenecek dizinin ve mutasyonun özelliklerine bağlı olarak duyarlılıkta çok büyük değişiklikler gözlemlenmiştir (Öner, 2002).

Poliakrilamid jele yüklenen PCR örnekleri, elektroforez sonrasında gümüş boyama ile görünür hale getirilir. Bu yöntemle yapılan mutasyon analizi radyoaktif olmaması nedeni ile tercih edilen bir teknik olarak göze çarpmaktadır. SSCP hızlı ve basit bir yöntemdir ancak duyarlılığı sınırlıdır (Akar, 1999).



### 2.6.5. DNA Dizi Analizi

Rekombinant DNA teknolojisinin geliştirilmesi ile DNA dizi analizi yöntemleri de geliştirilmeye başlanmıştır. DNA dizi analizi ya da “sequencing” DNA’nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir ve bunun için iki temel teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden Maxam ve Gilbert’in kimyasal yöntemi, DNA’nın belirli bazlardan kırılmasına dayanmaktadır. Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir (Öner, 2002).

**a)Maxam-Gilbert yöntemi:** Dizisi saptanacak DNA parçacığının komplementer zincirleri ayrılıp, zincirlerden biri kullanılır. Dizisi saptanacak zincir 5’ ucundan polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak radyoaktif fosfor ile işaretlenir. Bu işaret sayesinde elektroforez sonrası belirli bir DNA parçacığının tanınması sağlanmaktadır. İkinci adımda ise, dört ayrı tüpteki DNA örneğine, zinciri belirli nükleotidlerden kıran dört ayrı kimyasal reaksiyon uygulanır. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpte farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış moleküller elde edilir. DNA’nın kırıldığı dört farklı reaksiyonda guaninden(G>A), adeninden(A>G), yalnız sitozinden(C) ve sitozin timinden (C+T) kırılma olur. Bu reaksiyonlarda, pürinlerin kırılmasında dimetilsülfat kullanılır. Bu reaktif, adenine göre guanini daha etkin olarak metiller ve ısı uygulandığında zincir metillenmiş bölgeden kırılır. Bu durumda daha çok guaninden zincir kırılması gerçekleşir (G>A). Asit ortamında ise bunun aksine adeninden kırılan zincirler daha fazladır(A>G). Primidinlerin kırılma reaksiyonlarında hidrazin kullanılır. Hidrazin DNA’yı hem sitozin hem de timinden kırar. Ancak yüksek tuz derişiminde (2M NaCl) yalnız sitozin reaksiyona girer. Böylece reaksiyondan biri sitozini(C), diğeri sitozin ve timini (C+T) belirlemektedir. Sonuçta, kırıldığı noktaya göre, hepsi 5’ ucundan işaretli ancak boyları farklı bir dizi parçacık elde edilir. Bunlar da elektroforezden sonra DNA parçalarının uçları radyoaktif olarak işaretli olduğu için otradyografi ile görüntülenebilir (Akar, 1999, Maxam AM, Gilbert W., 1992).

**b) Sanger DNA dizi analizi yöntemi:** Dideoksi ya da zincir sonlanma reaksiyonu olarak bilinen Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleşmektedir. Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır (Akar, 1999).

Bu yöntem için dizisi belirlenecek olan DNA'ya, dört farklı dNTP'ye, dört farklı ddNTP'lere, reaksiyonu kataliz edecek DNA polimeraz enzimine ve serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır. İlk olarak analiz için kullanılacak kalıp DNA asimetrik amplifikasyon yöntemiyle hazırlanır. Böylece daha fazla kalıp DNA elde edilir. PCR' da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir (Akar, 1999). Yöntemde kullanılan ddNTP'lerin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmamaktadır. 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 nükleotid trifosfatların dördü ve az miktarda ddNTP'den sadece birini içerir. Zincir sonlanması için dört reaksiyon tüpünde farklı bir ddNTP bulunur. Elektroforez sonrası DNA bantları otoradyografi ile görüntülenir. Bu bantlar yukarıdan aşağıya doğru okunarak dizi saptanır (Akar, 1999).

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.

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Ailesinde Behçet öyküsü olmayan 101 sağlıklı bireyden oluşan kontrol grubu oluşturulmuştur. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Sağlığı Anabilim Dalı tarafından bölümümüze gönderilen Tromboz geçirmiş Behçet hastalığı görülen 77 birey çalışma grubunu oluşturmuştur. Ayrıca her iki gruptaki bireyler yetişkin hastalardan oluşmaktadır. Çalışmaya katılan tüm ailelere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır.

#### 3.1.YÖNTEMLER

##### 3.1.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu klasik fenol/kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Araştırmaya katılan bireylerden 1ml 0,5M Etilendiamintetraasetik asitli (EDTA) (Scharlau, İspanya) polietilen tüp içerisine 9ml kan örneği alınmıştır. Bu kan örneği falkon tüpüne (50mL) konur ve içerisinde 25ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya) eklenir, 20 dk buzda bekletilir. +4°C, 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra süpernatant dökülür. Tüpün dibindeki çökelek üzerine tekrar RBC lizis solüsyonu ilave edilir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000µL RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800µL'si ependorf tüpüne alınarak -20°C'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200µL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20µg/mL olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu 10mM

Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1mM pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Memmert, Almanya) bekletilir.

Ertesi gün proteinlerin DNA'dan uzaklaştırılması amacıyla tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzooamilalkol (Merck, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4°C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilir.

Üçüncü gün tüpler +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500µL %70'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir ve +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda alkol dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C veya -20°C'de saklanabilmektedir.

### **3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)**

Bu çalışmada Behçet hastaları *FVII* promotor bölgesinde bulunan -323ins10bç, -401G/T ve -402G/A polimorfizmleri taranmıştır. PCR tekniği kullanılarak -323ins10bç, 401G/T ve -402G/A polimorfizmlerini kapsayan gen bölgesinin amplifikasyonu gerçekleştirilmiştir. Amplifikasyon için iki farklı primer kullanılmıştır. Birinci primer SSCP tekniği için tasarlanmıştır. İkinci primerde polimorfizmleri DNA dizi analizinde daha rahat görmek amacıyla tasarlanmış ve daha büyük bir bölge amplifiye edilmiştir.

### 3.1.2.1. *FVII* Geni Promotor Bölge Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

Yapılan araştırmalarda *FVII* promotor bölge polimorfizmleri olan -323ins10bç, 401G/T ve -402G/A polimorfizmleri *FVII* gen ekspresyonunu etkiledikleri gösterilmiştir. Bu nedenle bu polimorfizmler seçilmiştir. Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi (SSCP) ve DNA dizi analizi için farklı primerler kullanılarak PCR tekniğine tabi tutulmuştur.

### 3.1.2.2. *FVII* Geni Promotor Bölgesinin Amplifikasyonu İçin PCR Koşulları

*FVII* geni promotor bölge polimorfizmlerinin belirlenmesi için yapılan polimeraz zincir reaksiyonunda (PCR) son konsantrasyonları 10pmol/µl olacak şekilde iki farklı primer çifti kullanıldı. PCR bileşenleri; (NH<sub>4</sub>)SO<sub>2</sub> 10X Taq tampon çözeltisi ( Fermentas, ABD), 25mM MgCl<sub>2</sub> ( Fermentas, ABD), son konsantrasyon 2mM olacak şekilde dNTP [(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)(Metabion, ABD)], son konsantrasyonu 10pmol/µl Forward ve Reverse primerler (Metabion, ABD), Taq DNA polimeraz (Fermentas, ABD) belirli oranlarda kullanılarak PCR şartları sağlanmış son hacim 50µl'e ddH<sub>2</sub>O ile tamamlanmıştır.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 95°C'de 5 dakika, bunu takip eden 34 siklusta; 94°C'de 1 dakika, 60°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika, 72°C'de 7 dakika olarak PCR cihazında gerçekleştirilmiştir (Thermal Cycle, Biometra, Almanya).

Polimeraz zincir reaksiyonu sonunda SSCP tekniği için 214bç uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Dizi 1.1). DNA dizi analizi tekniği için ise 374bç uzunluğunda oligonükleotid ürün elde edilmiştir (Dizi 1.2). Bu uzunluktaki PCR ürünleri için %2'lik agaroz jelle Brom Fenol Mavisi (Merck, Almanya) ile 5µl PCR ürünü yüklenerek jelle görüntülenmiştir (Şekil 3.1, 3.2).

*FVII* geni promotor bölgesinin SSCP tekniği için yapılan amplifikasyonda kullanılan primerler;

Forward: 5'-GGC CTG GTC TGG AGG CTC TCT TC-3'

Reverse : 5'-CGC TGG CAA CAA AAC CGT CCG CTC-3' (Metabion, ABD)

```
CAGGCAACGGCCTAGCTGGCCTGGTCTGGAGGCTCTCTTCAAATATTTACATC
CACACCCAAGATACG/AG/TCTTTGAGATTTGACTCGCATGATTGCTATGGGAC
AAGTTTTCATCTGCAGTTTAAATCTGTTTCCCAACTTACATTCTATATCCTA
GGGGTTTGGAAATTCTAGATCGTATTTGAAGTGTGGTGCCACACACACCTTAA
CACCTGCACGCTGGCAACAAAACCGTCCGCTCTGCAGCACAGCTGGGGTCAC
```

**Dizi 1.1:** SSCP tekniği için amplifiye edilen bölge

*FVII* geni promotor bölgesinin DNA dizi analizi tekniği için yapılan amplifikasyonda kullanılan primerler;

Forward: 5'-GTA AGA TGT GGA CCG CTG GA-3'

Reverse : 5'-ACA AAA CCG TCC GCT CTG-3' (Metabion, ABD)

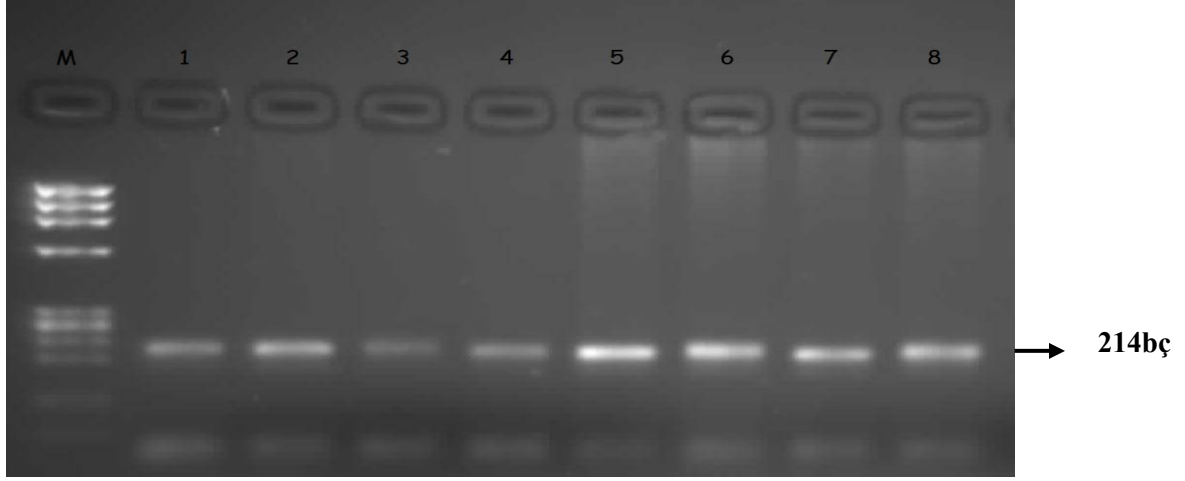
```
CAAACAAAAAGACGTAAGATGTGGACCGCTGGA GAATGGGGGTGCTGCCTGCA
GTCAAAACGGAGTGGGGGTGCCAGCTCAGGGCCAGAATGATCCTATTCCCGG
CACTTCTCAGTGAGGCTCTGTGGCTCACCTAAGAAACCAGCCTCCCTTGCAGGC
AACGGCCTAGCTGGCCTGGTCTGGAGGCTCTTCAAATATTTACATCCACACC
CAAGATACG/AG/TCTTTGAGATTTGACTCGCATGATTGCTATGGGACAAGTTTT
CATCTGCAGTTTAAATCTGTTTCCCAACTTACATTCTATATCCTAGGGGTTTG
GAATTCTAGATCGTATTTGAAGTGTGGTGCCACACACACCTTAACACCTGCAC
GCTGGCAACAAAACCGTCCGCTCTGCAGCACAGCTGGGGTCACCTGACCTTCT
```

**Dizi 1.2:** DNA dizi analizi için amplifiye edilen bölge

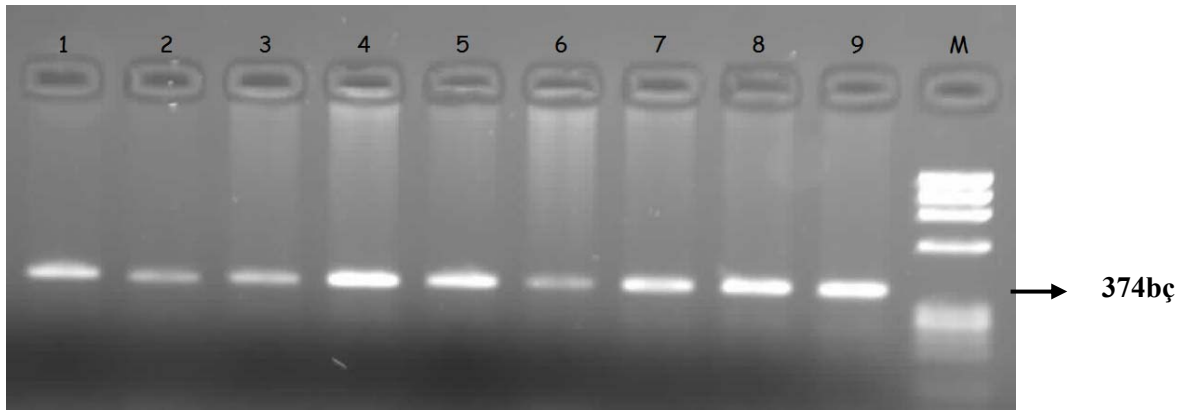
### 3.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Bio Basic Inc, USA); kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Biz bu çalışmamızda *FVII* geni promotor bölgesi için PCR ürünlerini %2'lik agaroz jelde değerlendirdik. %2'lik agaroz jel için 2g TBE 1X ( Tris-HCl, Borik asit, EDTA) solüsyonu ile 100ml' ye tamamlandı. TBE 1X solüsyonu; TBE 5X solüsyonunun 1/5 oranında ddH<sub>2</sub>O ile seyreltilmesiyle hazırlanır. TBE 5X solüsyonunun hazırlanışı; 54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20ml 0.5M pH:8 EDTA (AppliChem, Almanya) ve deiyonize su (ddH<sub>2</sub>O) ile 1000mL'ye tamamlanarak hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Beko, Türkiye) kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromid'in (Sigma, ABD) %5'lik stok solüsyonundan 2µl ilave edildikten sonra iyice karıştırılır ve jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür.

Jel dökülmeden önce jel tabağı uygun taraklar kullanılarak hazırlanır. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklenir. Agaroz donduktan sonra jel tabağıyla birlikte jel elektroferez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilir. Elektroferez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstünü kapatacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 5µl alınarak temiz bir parafilm (Parafilm, Chicago, ABD) üzerinde 3-5µl Brom-Fenol Mavisini (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılır ve jellere yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (ΦX174 DNA-HaeIII BioLabs, ABD; ΦX174 DNA-HinfI BioLabs, ABD) PCR ürünleriyle birlikte jele 2µl kadar yüklenir. 90-100 V akımda 30-40 dk kadar yürütülür (Biometra, ABD). Ultraviyole ışıkta (Spectroline, ABD) incelenir. Image Analyser'da (Alpha Imager, ABD) fotoğraflar (Şekil 3.1- Şekil 3.2).



**Şekil 3.1:** *FVII* geni promotor bölgesi SSCP yöntemi için kullanılan primer ile oluşan PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. İlk örnek marker ( $\Phi$ X174 DNA-HinI), diğer örnekler ise amplifiye edilen gen bölgesine ait 214bç'lik PCR ürünleri.



**Şekil 3.2 :** *FVII* geni promotor bölgesi DNA dizi analizi yöntemi için kullanılan primer ile oluşan PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. Son örnek marker ( $\Phi$ X174 DNA-HinI), diğer örnekler ise amplifiye edilen gen bölgesine ait 374bç'lik PCR ürünleri.



### 3.1.4. SSCP Jeli için Poliakrilamid Jel Hazırlanması

%8'lik poliakrilamid jelin hazırlanması: Bu jelin hazırlanmasında %40'lik 49:1 oranındaki akrilamid/bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bunun için 196g Akrilamid (Merck , Almanya) ve 4g N,N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) 200ml distile su ile 37°C'de ısıtılarak çözdürür ve hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanır (Sambrook et al. 1989).

Jel yapımı için TBE5X solüsyonu hazırlanır. Akrilamid monomerlerinin polimerleşme reaksiyonunu katalizleyen TEMED (Tetra Etil Metilen deamin) ise hazır olarak bulunur. Jelin polimerleşmesi için kullanılan %10'luk Amonyum Persülfat; 0.3g Amonyum Persülfat (AppliChem, Almanya) distile su ile 30ml'lik hacime tamamlanarak hazırlanır.

Elektroforez Aparatının Hazırlanması: Camlar bol su ile iyice yıkandıktan sonra deiyonize suyla durulanır. %70'lik alkolle temizlenir ve kurulanır. 1.5mm'lik spacerlar yardımıyla arada 1.5mm boşluk bırakılması sağlanır ve klemplerle sabitlenir. Jel döküldükten sonra yine 1.5mm'lik tarak oturtulur.

Bu çalışmada kullanılan %8'lik poliakrilamid jelin hazırlanmasında stok olarak hazırlanan %40'lık akrilamid/ bisakrilamid solüsyonundan 28ml, TBE 5X tamponundan 28ml, 600µl 10%'luk Amonyum Persulfat (Schlarlau, İspanya) ve 70.0ml deiyonize su bir beherde manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırıldıktan sonra üzerine, 40µl TEMED (Tetra Etil Metilen deamin, Sigma, ABD) konularak, hazırlanan camların arasına dökülür. Yükleme yapılacak kuyucukları oluşturmak üzere uygun taraklar takılarak donması beklenir. Jelin polimerleşmesinden ve tarakların çıkarılmasından sonra camlar vertikal jel elektrofezine yerleştirilerek üzeri TBE 1X solüsyonuyla doldurulur.

40µl PCR ürünlerine 8µl yükleme boyası eklenerek 99°C'de 8 dk denatüre edilir. Örneklerden 10µl kuyucuklara yüklenerek 130V'da baz çifti uzunluklarına göre 10-12 saat süreyle +4°C'de akıma tabi tutulur. Bantlar, gümüş boyama tekniğiyle boyanarak görünür hale getirilir.

### **3.1.5. SSCP Jeli için Gümüş Boyama**

Yapılan poliakrilamid jelde oluşan bantları görünür hale getirmek için Gümüş boyama yapılır. Gümüş boyama için üç farklı solüsyon kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi %1'lik gümüş nitrat çözeltisidir. 5g gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) (Scharlau, İspanya) tartılıp distile su ile 500ml'ye tamamlanır. Bu solüsyonun oda sıcaklığında koyu bir kabın içinde saklanması gerekir. İkinci çözelti %15'lik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisidir. 150g katı sodyum hidroksit distile su ile 1000ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanır. Son solüsyon ise %7,5'lik Sodyum bikarbonat solüsyonudur ve bu solüsyon %7,5'lik sodyum bikarbonat (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.

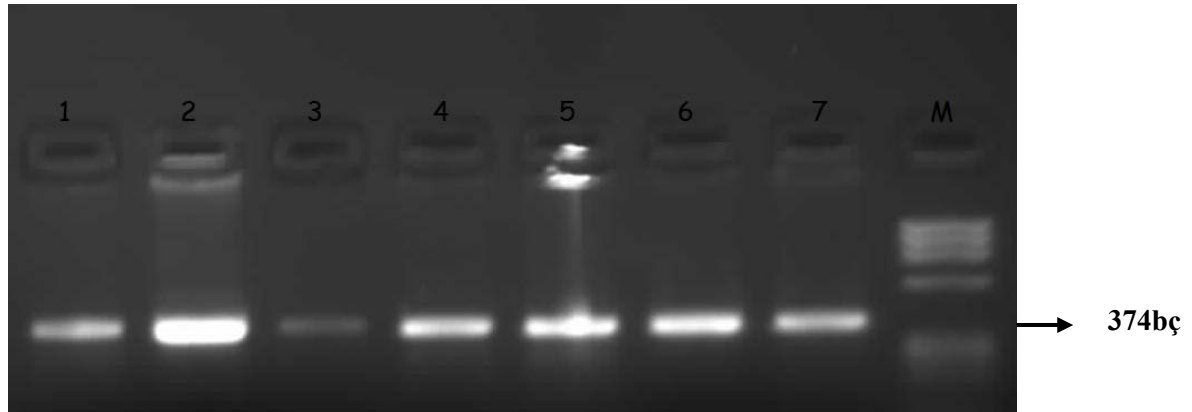
Elektroforez sonrası jelle stok solüsyonundan distile su ile 9:1 oranında seyreltilerek hazırlanan %0,1'lik gümüş nitrat solüsyonu ile 5 dk muamele edilir. Bu aşamada bantlar görünür hale gelir. Daha sonra %1,5'lik NaOH solüsyonuna formaldehit eklenip gümüş solüsyon aşamasını takiben jelle muamele edilir. Jel %0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonu içinde birkaç dakika bırakılarak boyama işlemi sonlandırılır. Bu solüsyonda reaksiyon durdurulur, jelin daha fazla kararması önlenir. Böylece jeller görünür hale getirilerek bant farklılığı olan örnekler belirlenir.

### **3.1.6. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi (Pürifikasyon)**

*FVII* geni promotor bölgesinin SSCP yönteminde bant profillerinin oluşturulmasını takiben bu bant profillerinin hangi polimorfizme ait olduğunu saptamak için DNA dizi

analizine tabi tutulmuşlardır. Belirlenen örnekler DNA dizi analizi için hazırlanan primerler ile amplifiye edildikten sonra primer, dNTP fazlalıklarının uzaklaştırılması amacıyla pürifikasyon işlemi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.4).

Maksimum 50µL PCR ürünü alınarak pürifikasyon işlemi yapılmıştır. İşlem pürifikasyon kitinin 96 kuyulu özel plate'inde yapılır. Alınan PCR ürününün 1.8 katı AgenCourt clean solüsyonu eklenir ve karışması sağlanır. Plate 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra mıknatıs özelliğindeki plate üzerine yerleştirilir. 10 dk bekletilir. Solüsyon içindeki mıknatıs özellikli manyetik toparın PCR ürünü ile birlikte plate'e yapıştığı ve kahverengi halka oluştuğu gözlenir. Oluşan kahverengi alan dışında kalan kısım mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. 200µL %70'lik etanol eklenir, 30s sonra alkol alınır. Bu işlem 2 kere tekrar edilir. Oda sıcaklığında manyetik plate üzerinde alkolün buharlaşması sağlanır. Kuruma sağlandıktan sonra 40µL bidistile su ile sulandırılır. %2'lik jelde sonuçlar incelenir. Bant yoğunluğuna göre DNA dizi analizinde kullanılacak PCR ürünü belirlenir (Şekil 3.4).



**Şekil 3.4:** *FVII* geni promotor bölgesi DNA dizi analizi yöntemi için kullanılan primer ile oluşan 374 bp'lik PCR ürünlerinin pürifikasyon işlemi sonrası elektroforez fotoğrafı. Son örnek marker ( $\Phi$ X174 DNA-HinI).

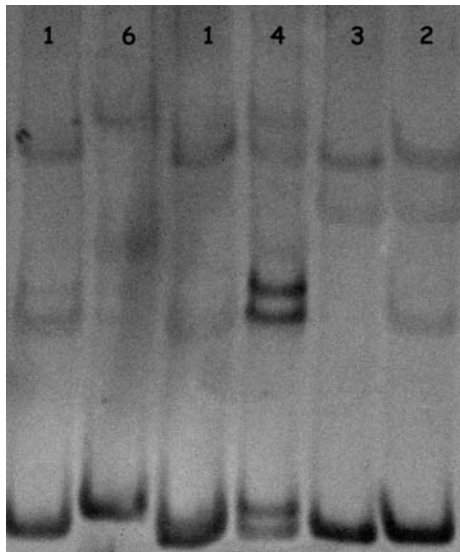
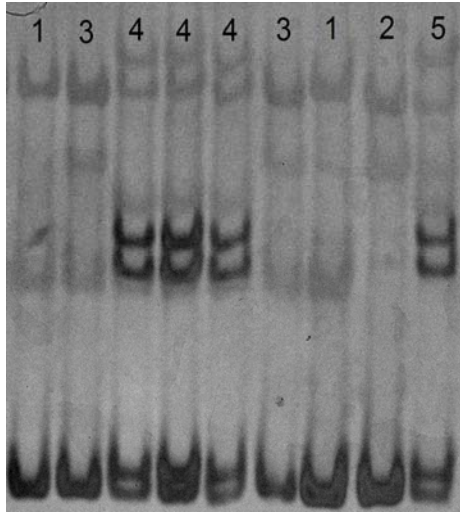
### 3.1.7. DNA Dizi Analizi

*FVII* geni promotor bölgesi SSCP tekniği ile oluşturulmuş bant profilleri ve farklı olduğu tespit edilen bant profilleri, nükleotit dizilerinin belirlenmesi için kapiller sistem otomatik sekans cihazı (CEQ800XL, Beckman Coulter, USA) kullanıldı. DNA dizi analizi için hazırlanan primerlerle yapılan PCR işlemi sonrası pürifikasyon işlemine tabi tutulan örnekler DNA dizi analizine alındı. Bunun için 0,2ml'lik, 96 tane kuyucuk içeren plateletler kullanılıp her bir kuyucuğa 12µl premiks (2µl 10X reaksiyon tamponu, 1µl dNTP karışımı, 2µl ddUTP, 2µl ddGTP, 2µl ddCTP, 2µl ddATP, 1µl polimeraz enzimi), 5µl temizlenmiş PCR ürünü, 20pmol primer konularak "cycle sequencing" işlemi gerçekleştirildi. Bunun için plate, PCR cihazına (Biometra, Almanya) yerleştirilip 94°C' de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C'de 20s denatürasyon, 50°C'de 20s yapışma ve 60°C' de 4 dk'lık uzama evresi gerçekleştirildi.

"Cycle sequencing" sonlandıktan hemen sonra reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğun dibine 5µl durdurma solüsyonu (1,5 M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, 50mM EDTA, 20 mg/ml' lik Glikojen) pipetlendi. Örneklerin üzerine 60µl %95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000rpm'de 4 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama işlemi gerçekleştirildi. Üstteki kısım dökülerek %70'lik alkolden 200µl eklenip, +4°C'de 4000rpm'de 2 dk santrifüjlenerek üstteki kısım döküldü. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plak 300rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifüjlenip fazla etanol uzaklaştırıldı. Plate, liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilip ve yüksek vakum altında örnekler kurutuldu. Kuruyan örneklerin üzerine 25µl formamid içeren solüsyondan konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlandı. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plate, DNA dizi analizi cihazına yerleştirildi ve elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software programı kullanılarak dalgalar halinde görünür hale getirildi.

### 3.2. BULGULAR

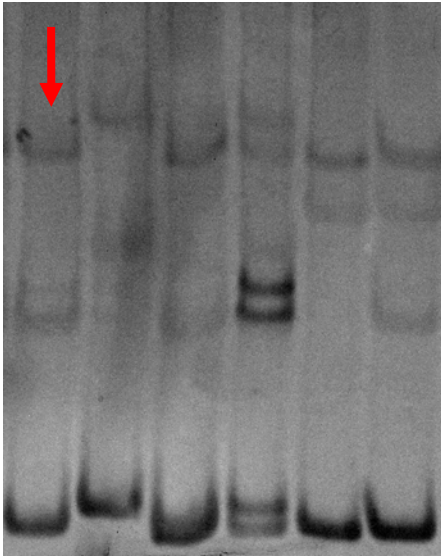
Bu çalışmada *FVII* genin promotor bölgesinde bulunan -323ins10bç, -401G/T, -402G/A polimorfizimlerinin Behçet hastalarındaki sıklığına bakılmış ve böylece bu polimorfizimlerin Behçet hastalarında tromboz oluşumundaki etkisi hakkında bilgi edinilmiştir. SSCP tekniği kullanarak bant profilleri oluşturulmuştur. Öncelikle SSCP tekniği için hazırlanan primerlerle amplifikasyon yapılmıştır. Bu amplifikasyonda 214 bç lik bölge çoğaltılmıştır. Daha sonra SSCP tekniği ile farklı bant profilleri belirlenmiştir (Şekil 4.1).



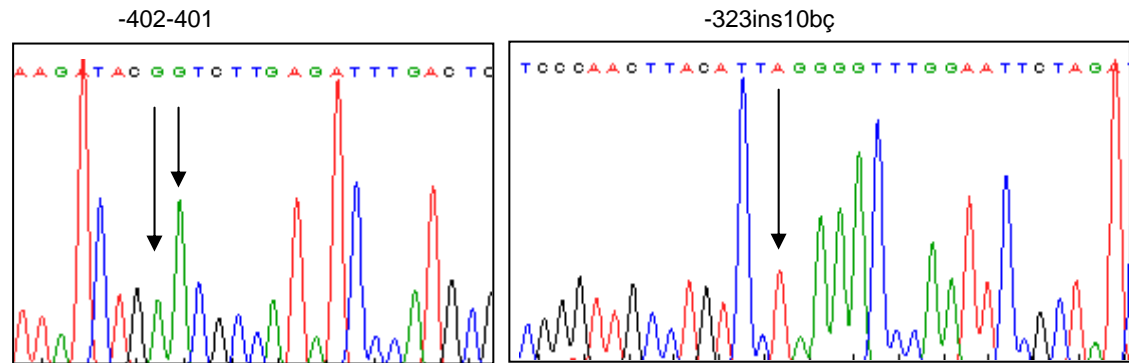
Şekil 4.1: SSCP jel görüntüsü ve oluşan bantlar

Yapılan SSCP sonucu farklı 6 bant profili belirlenmiştir. Bu bant profillerinin hangi polimorfizmi taşıdıklarını belirlemek için her biri DNA dizi analizine tabi tutulmuştur. DNA dizi analizi için hazırlanan primerlerle 374bç'lik bir bölge amplifiye edilmiş, pürifikasyon işleminden sonra DNA dizi analizi yapılmıştır.

I. bant profili için yapılan DNA dizi analizi sonucu; -401G/G, -402G/G, -323ins10bç w/w haplotipini içerdiği görülmüştür (Şekil4.2.1- 4.2.2).

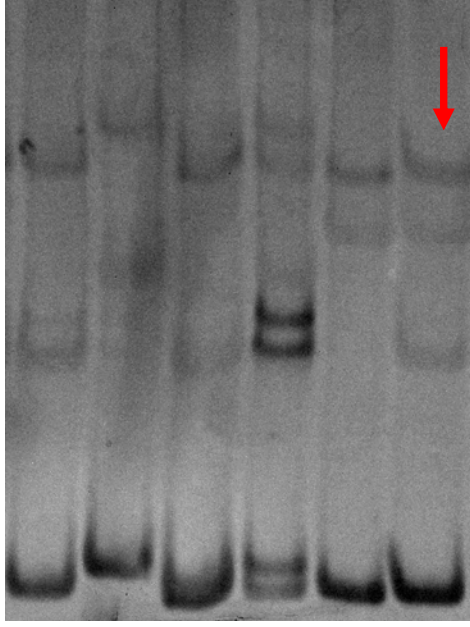


Şekil 4.2.1: I. bant profili SSCP görüntüsü

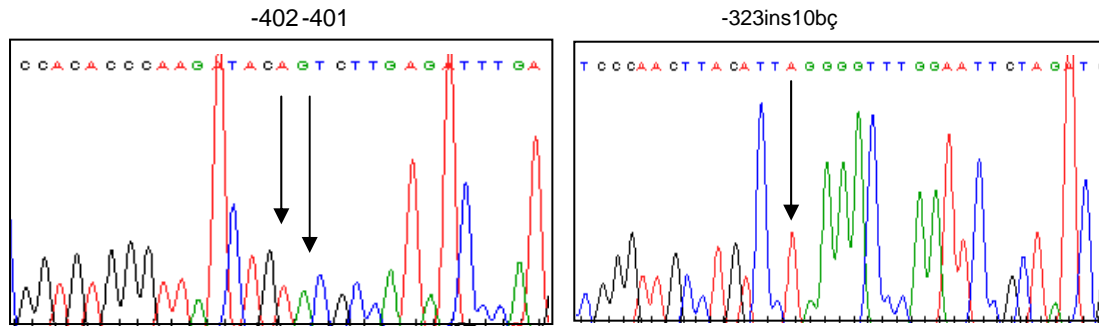


Şekil 4.2.2: I. bant profili DNA dizi analizi

II. bant profili için yapılan DNA dizi analizi sonucu; -401G/G, -402A/A, -323ins10bç w/w haplotipini içerdiği görülmüştür (Şekil 4.3.1- 4.3.2).

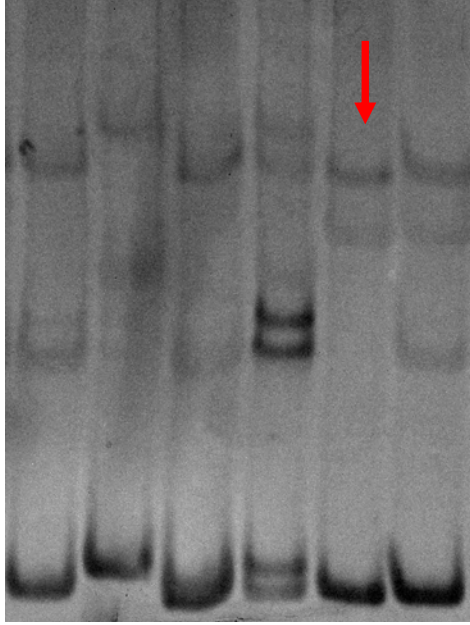


Şekil 4.3.1: II. bant profili SSCP görüntüsü

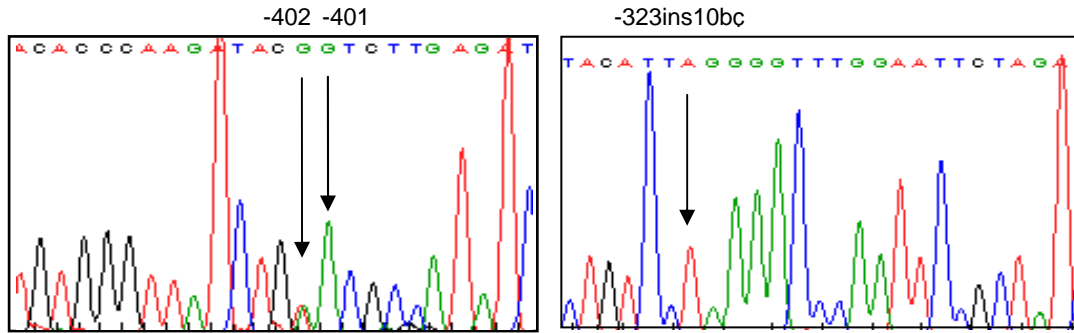


Şekil 4.3.2: II. bant profili DNA dizi analizi

III. bant profili için yapılan DNA dizi analizi sonucu; -401G/G, -402G/A -323ins10bc w/w haplotipini içerdiği görülmüştür (Şekil 4.4.1- 4.4.2).



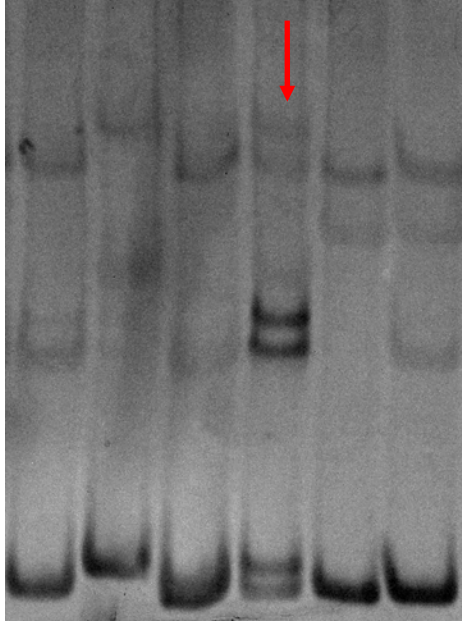
Şekil 4.4.1: III. bant profili SSCP görüntüsü



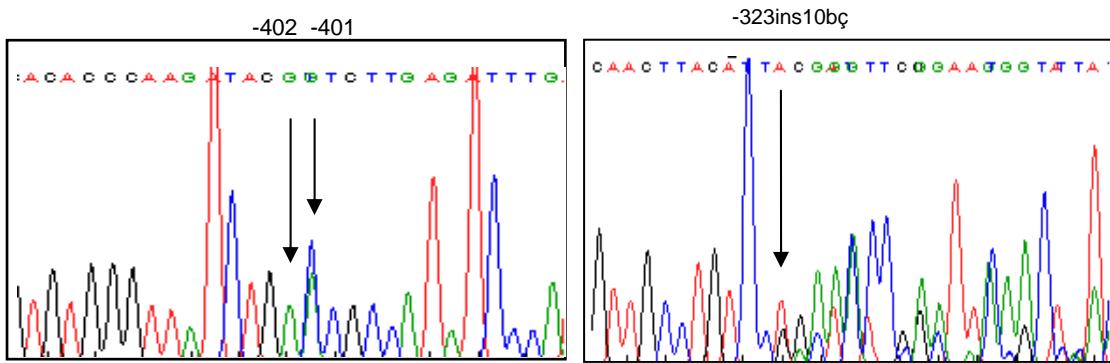
Şekil 4.4.2: III. bant profili DNA dizi analizi



IV. bant profili için yapılan DNA dizi analizi sonucu; -401G/T, -402 G/G, -323ins10bç w/m haplotipini içerdiği görülmüştür (Şekil 4.5.1- 4.5.2).

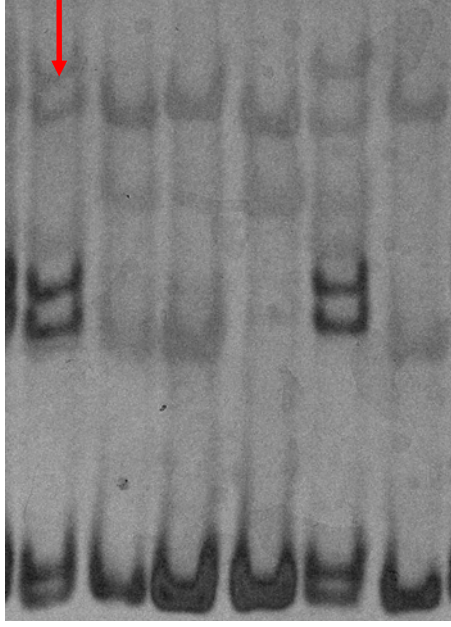


Şekil 4.5.1: IV. bant profili SSCP görüntüsü

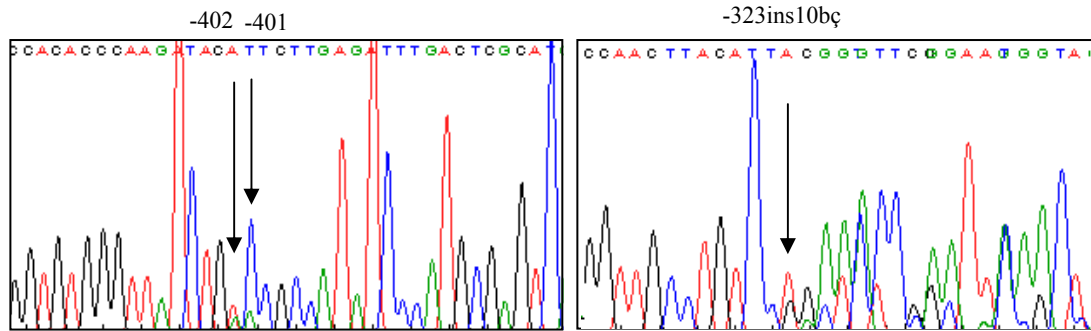


Şekil 4.5.2: IV. bant profili DNA dizi analizi

V. bant profili için yapılan DNA dizi analizi sonucu; -401G/T, -402 G/A, -323ins10bç w/m haplotipini içerdiği görülmüştür (Şekil 4.6.1- 4.6.2).

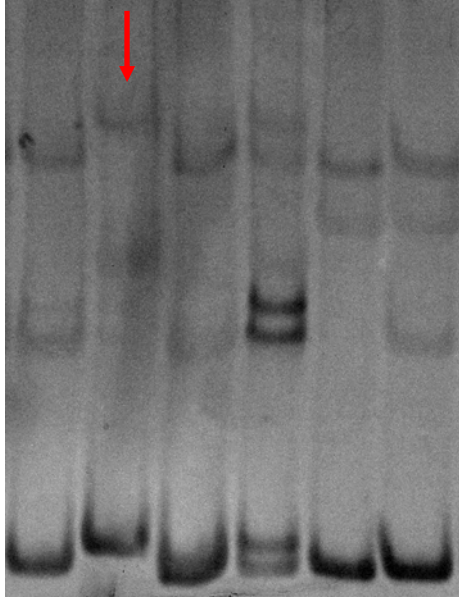


Şekil 4.6.1: V. bant profili SSCP görüntüsü

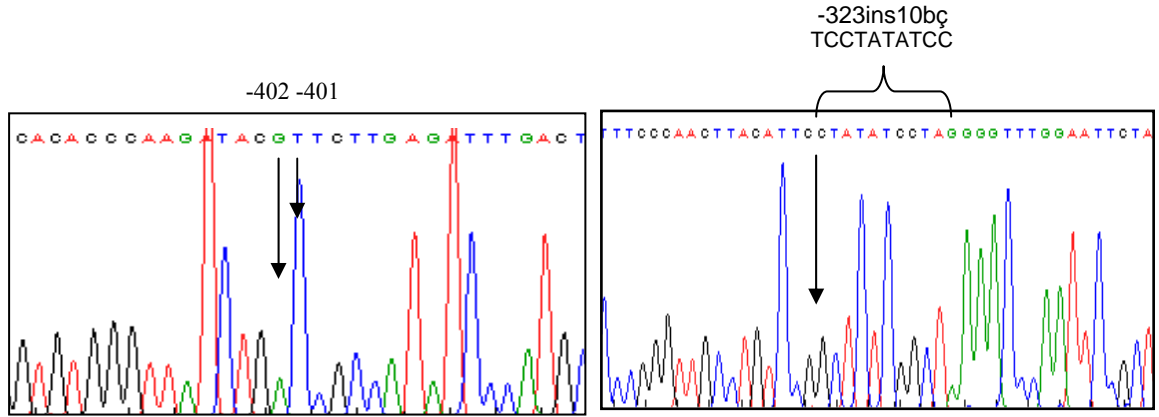


Şekil 4.6.2: V. bant profili DNA dizi analizi

VI. bant profili için yapılan DNA dizi analizi sonucu; -401T/T, -402G/G, -323ins10bç m/m haplotipini içerdiği görülmüştür (Şekil 4.7.1- 4.7.2).



Şekil 4.7.1: VI. bant profili SSCP görüntüsü



Şekil 4.7.2: VI. bant profili DNA dizi analizi

Çizelge 2’de sonuç olarak oluşan haplotiplerimiz gösterilmiştir.

<b>Haplotip I</b>	-323ins10bç w/w	-401 G/G	-402 G/G
<b>Haplotip II</b>	-323ins10bç w/w	-401 G/G	-402 A/A
<b>Haplotip III</b>	-323ins10bç w/w	-401 G/G	-402 G/A
<b>Haplotip IV</b>	-323ins10bç w/m	-401G/T	-402 G/G
<b>Haplotip V</b>	-323ins10bç w/m	-401G/T	-402 G/A
<b>Haplotip VI</b>	-323ins10bç m/m	-401T/T	-402 G/G

Çizelge 2 : Haplotiplendirme

### 3.4. İstatistiksel Analizler

Elde edilen veriler kullanılarak baz değişiminin ve insersiyonun bulunmadığı, normal olarak kabul edilen Haplotip I'e göre diğer haplotipler karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmada Odds Ratio (OR) ve Chi kare testi için TAD programı kullanılarak istatistiksel sonuçları hesaplanmıştır. p değeri 0,05'den küçük bulunan sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Sonuçlar çizelge 3'de gösterilmiştir.

	<i>Kontrol</i> n=101 (%)	<i>Behçet Hastalığı</i> n=77 (%)	p	OR
<b>HAPLOTİP I</b>	43 (42.6)	34 (44.15)	-	1
<b>HAPLOTİP II</b>	2 (1.98)	1 (1.29)	0.81	0.63 (0.05-7.27)
<b>HAPLOTİP III</b>	19 (18.8)	9 (11.68)	0.6	0.59 (0.24-1.49)
<b>HAPLOTİP IV</b>	31 (30.69)	17 (22.08)	0.66	0.69 (0.33-1.45)
<b>HAPLOTİP V</b>	1 (0.99)	9 (11.68)	<b>0.01</b>	<b>11.38 (1.37-94.3)</b>
<b>HAPLOTİP VI</b>	5 (4.45)	7 (9.09)	0.55	1.77 (0.52-6.07)

Çizelge 3.1: Haplotip I'e göre diğer haplotiplerin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	<i>Kontrol</i> n=101 (%)	<i>Behçet Hastalığı</i> n=77 (%)	p	OR
<b>-323ins10bç w/w</b>	64 (63.36)	44 (57.14)	-	1
<b>-323ins10bç w/m</b>	32 (31.68)	26 (33.77)	0.61	1.18 (0.6-2.25)
<b>-323ins10bç m/m</b>	5 (4.95)	7 (9.09)	0.60	2.03 (0.61-6.8)
<b>w</b>	160 (79.21)	114 (74.03)	-	1
<b>m</b>	42 (20.79)	40 (25.97)	0.25	1.34 (0.82-2.19)

Çizelge 3.2: -323ins10bç Polimorfizmi için istatistiksel analiz sonuçları

	<i>Kontrol</i> n=101 (%)	<i>Behçet Hastalığı</i> n=77 (%)	p	OR
<b>-401 G/G</b>	64 (63.36)	44 (57.14)	-	1
<b>-401 G/T</b>	32 (31.6)	26 (33.77)	0.61	1.18 (0.6-2.25)
<b>-401 T/T</b>	5 (4.9)	7 (9.09)	0.60	2.03 (0.61-6.8)
<b>G</b>	160 (79.2)	114 (74.03)	-	1
<b>T</b>	42 (20.8)	40 (25.97)	0.248	1.34 (0.82-2.19)

**Çizelge 3.3:** -401G/T Polimorfizmi için istatistiksel analiz sonuçları

	<i>Kontrol</i> n=101 (%)	<i>Behçet Hastalığı</i> n=77 (%)	p	OR
<b>-402 G/G</b>	79 (78.2)	58 (37.66)	-	1
<b>-402 G/A</b>	20 (19.8)	18 (11.69)	0.58	1.22 (0.59-2.52)
<b>-402 A/A</b>	2 (1.9)	1 (0.65)	0.77	0.68 (0.06-7.69)
<b>G</b>	178 (88.1)	134 (87.01)	-	1
<b>A</b>	24 (11.9)	20 (12.99)	0.75	1.11 (0.59-2.09)

**Çizelge 3.4:** -402G/A Polimorfizmi için istatistiksel analiz sonuçları

Elde edilen verilerden FV Lieden mutasyonu (G1691A) taşıyan hastalar çıkartılarak istatiksels analiz yapılmıştır. Sonuçlar tablo 4’de gösterilmiştir.

FVL (-)

	<i>Kontrol</i> n=101 (%)	<i>Behçet Hastalığı</i> n=68 (%)	p	OR
<b>HAPLOTİP I</b>	43 (42.6)	30 (44.12)	-	1
<b>HAPLOTİP II</b>	2 (1.98)	-	0.98	0.36 (0.16-8.2)
<b>HAPLOTİP III</b>	19 (18.8)	8 (11.76)	0.5	0.6 (0.2-1.5)
<b>HAPLOTİP IV</b>	31 (30.69)	16 (23.5)	0.5	0.7 (0.3-1.58)
<b>HAPLOTİP V</b>	1 (0.99)	8 (11.76)	<b>0.01</b>	<b>11.5 (1.3-96.5)</b>
<b>HAPLOTİP VI</b>	5 (4.45)	6 (8.82)	0.6	1.72 (0.4-6.15)

**Çizelge 4.1:** FVL Mutasyonu çıkarılmış, Haplotip I’e göre diğer haplotiplerin istatistiksel olarak karşılaştırılması

FVL (-)

	<i>Kontrol</i> n=101 (%)	<i>Behçet Hastalığı</i> n=68 (%)	p	OR
-323ins10bç w/w	64 (63.36)	38 (27.9)	-	1
-323ins10bç w/m	32 (31.68)	24 (17.6)	0.5	1.26 (0.6-2.45)
-323ins10bç m/m	5 (4.95)	6 (4.4)	0.56	2.02 (0.5-7.0)
w	160 (79.21)	100 (73.5)	-	1
m	42 (20.79)	36 (26.5)	0.2	1.37 (0.8-2.28)

**Çizelge 4.2:** FVL Mutasyonu çıkarılmış, -323ins10bç Polimorfizminin istatistiksel analiz sonuçları

FVL (-)

	<i>Kontrol</i> n=101 (%)	<i>Behçet Hastalığı</i> n=68 (%)	p	OR
<b>-401G/G</b>	64 (63.36)	38 (27.9)	-	1
<b>-401G/T</b>	32 (31.6)	24 (17.6)	0.5	1.26 (0.6-2.45)
<b>-401T/T</b>	5 (4.9)	6 (4.4)	0.56	2.02 (0.5-7.0)
<b>G</b>	160 (79.2)	100 (73.5)	-	1
<b>T</b>	42 (20.8)	36 (26.5)	0.2	1.37 (0.8-2.28)

**Çizelge 4.3:** FVL Mutasyonu çıkarılmış, -401G/T Polimorfizminin istatistiksel analiz sonuçları

FVL (-)

	<i>Kontrol</i> n=101 (%)	<i>Behçet Hastalığı</i> n=68 (%)	p	OR
<b>-402 G/G</b>	79 (78.2)	52 (38.2)	-	1
<b>-402 G/A</b>	20 (19.8)	16 (11.76)	0.6	1.2 (0.57-2.5)
<b>-402 A/A</b>	2 (1.9)	-	0.9	0.38 (0.01-9.2)
<b>G</b>	178 (88.1)	120 (88.2)	-	1
<b>A</b>	24 (11.9)	16 (11.76)	0.97	0.98 (0.5-1.9)

**Çizelge 4.4:** FVL Mutasyonu çıkarılmış, -402G/A Polimorfizminin istatistiksel analiz sonuçları



#### 4. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

*FVII* geni promotor bölgesinde bulunan polimorfizimlerin, plazma *FVII* seviyesi üzerinde etkili olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu polimorfizimlerin plazmadaki *FVII* aktivitesini artırdığı ya da azalttığı bildirilmiştir. Plazmada *FVII* aktivitesinin yokluğu genelde yaşla bağdaşmaz (McVey, Boswell et al. 2001).

Yapılan son çalışmalarda, *FVII* antijen (*FVIIAg*) ve *FVII* koagülasyon aktivitesinin (*FVII:C*) plazma seviyeleri ile *FVII* genindeki polimorfizimler arasında ilişki bulunmuştur. *FVII:C* plazma seviyesi ve hastalıklar arasında önemli ölçüde muhtemel bir ilişki dikkati çekmiştir. *FVII:C* seviyesindeki yükselme önceden tanımlandığı gibi koroner kalp hastalığı için önemli bir belirteçtir. Ancak bu bilgiye ters düşen çalışmalarda bulunmaktadır. Bazı çalışmalar *FVII:C* plazma seviyesindeki yükselmenin koroner kalp hastalığı riskini ortaya çıkardığını gösterirken bazıları böyle bir belirtecin olmayacağını ileri sürmüştür (McVey, Boswell et al. 2001).

*FVII:C* veya *FVIIAg* yüksek seviyeleri kardiyovasküler hastalarında saptanmıştır. Japon popülasyonunda yapılan bir çalışmada yüksek seviyede *FVII:C*, yüksek oranda koroner arter hastalığı (%18), düşük seviyede *FVII:C* ise düşük oranda koroner arter hastalığı (%4,3) ile ilişkilendirilmiştir (Liu, Heng et al. 2002).

*FVII* seviyesinin yaş, kolesterol, trigliserit seviyesi, doymuş yağ bazlı diyet, menopoza, doğum kontrol ilaçları, vücut kütle indeksi, erkeklerde testesteron konsantrasyonu ve promotor bölge polimorfizmi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Promotor bölge polimorfizimlerinin *FVII* seviyesi üzerindeki etkisinin moleküler mekanizması açıklanmıştır. Fonksiyonel promotor polimorfizimleri transkripsiyon

mekanizmasındaki nükleer proteinlerin bağlanma özelliğini etkiler. Bu şekilde transkripsiyonu önler ya da artırır (Lindman, Pedersen et al. 2005).

*FVII* promotor bölge -323ins10bç, -401 G/T, -402 G/A polimorfizmleri plazmada *FVII* ifadenmesi üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. Yapılan birçok araştırmada -401T alleli bazal transkripsiyon oranının azalttığı ve *FVII*'nin plazma konsantrasyonunu düşürdüğü gösterilmiştir. -402A alleli ise transkripsiyonel aktiviteyi artırdığı ve plazma *FVII* seviyesini artırdığı gösterilmiştir (McVey, Boswell et al. 2001).

HepG2 hücrelerinde yapılan bir çalışmada -323ins10bç polimorfizminin allelleri, 10bç'lik insersiyonu içeren ve insersiyonu içermeyen *FVII* dizileri olarak karşılaştırılmıştır. Allelik frekansı 0.2 olan -323ins10bç polimorfizminin %33 oranında promotor aktivitesini azaltığı bulunmuştur (Pollak, Hung et al. 1996).

Çin popülasyonunda yapılan bir araştırmada ise -323ins10bç polimorfizminin bulunmasının *FVII* aktivitesini düşürdüğü gözlenmiş, bu durumda bu etnik grubu Tromboz ve Koroner arter riskinden koruduğu belirtilmiştir (Liu, Heng et al. 2002).

-401G/T ve -323ins10bç polimorfizmlerinin bağlı olduğu ve birlikte kalıtıldığı daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (Bernardi, Patracchini et al. 1993; Lievers, Mennen et al. 2000; Ghiu, Ferrell et al. 2004). -402G/A polimorfizminin ise farklı olarak kalıtıldığı bilinmektedir (Campo, Valgimigli et al. 2006). Bu polimorfizmlerin bulunmasına göre tromboz riski artmaktadır (van 't Hooft, Silveira et al. 1999).

Behçet hastalığının altında yatan patofizyolojik olaylar tam olarak tanımlanmasa da esas patolojik bozukluk vaskülitir. Vasküler bozukluk Behçet hastalığının klinik tanısında en önemli belirtidir. Behçet hastalığında vasküler bozukluk diğer vasküler hasarlardan oldukça farklıdır. Öyleki tüm arterleri, venleri ve damarları kapsar. Bunun yanında

patolojik venöz tromboz karakteristik vaskülitten farklıdır ve Behçet hastalığının olağan klinik belirtisidir (Kiraz, Ertenli et al. 2002).

Şimdiye kadar yapılan birçok çalışmada Behçet hastalığında tromboz oluşumunun nedenleri araştırılmıştır. Koagülasyon sistemi hasarları trombozun ana sebeplerindedir. Bunlardan bir tanesi de *Faktör V* gen değişimidir. FV Leiden (FVL) mutasyonu 1691. nükleotitdeki G'den A'ya oluşan tek nokta mutasyonu sonucu 506. amino asitin arjininden guanine değişimiyle sonuçlanır. FVL mutasyonu plazmadaki trombin aktivitesini yükseltir (Bouaziz-Borgi, Nguyen et al. 2007; Rahimi, Vaisi-Raygani et al. 2008). Bununla beraber Faktör V 1691G venöz trombozların en sık saptanan kalıtsal risk faktörüdür.

Yapılan çalışmalarda FVL mutasyonu bakımından heterozigot bireylerde venöz tromboembolizm riskinde mutasyonu taşımayan bireylere göre artış gözlenmiştir (Rahimi, Vaisi-Raygani et al. 2008). Diğer bir çalışmada ise derin ven trombozu için bağımsız bir risk faktörü olarak gösterilmiştir. Akar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada FVL mutasyonunun sıklığı heterozigot taşıyan venöz tromboz gözlenen Behçet hastalarında önemli ölçüde yüksek bulunmuştur (Ates, Duzgun et al. 2003).

FVL mutasyonu Ortadoğu popülasyonunda yüksek sıklıkta saptanmış, Asya popülasyonunda ise ciddi bir şekilde mutasyonun görülmediği belirtilmiştir (Rahimi, Vaisi-Raygani et al. 2008).

Şimdiye kadar yapılan sadece bir çalışmada Behçet hastalarında FVII plazma düzeyine bakılmış, ancak polimorfizmler açısından araştırılmamıştır. Yapılan çalışmada Behçet hastalarında plazmada aktif FVII seviyesi yüksek bulunmuştur ancak tromboz belirtisi taşıyan Behçet hastalarında, tromboz belirtisi taşımayanlara göre farklılık gözlenmemiştir (Ozatli, Sayinalp et al. 2002).

Yaptığımız bu çalışmada Behçet hastalarında *FVII* promotor bölgesindeki -323ins10bç, -401 G/T, -402 G/A polimorfizmler tromboz oluşturma riski açısından araştırılmıştır. Araştırma sonucu haplotiplendirme yapılmış ve Behçet hastalarında farklı 6 haplotip belirlenmiştir. Çalışmamızda, olguların *FVII* düzeylerine bakılmamış olması ve olgu sayısının nisbeten az olması, sonuçlarımız açısından dezavantaj getirmektedir. Belirlediğimiz haplotiplerden V'incisi tüm polimorfizmler bakımından heterozigot olarak kalıtılmaktadır ve ilk kez bizim çalışmamızda gösterilmiştir.

İstatiksel analiz için oluşturulan 2 gruptan birisinde *FVL* mutasyonunu taşıyan bireyler göz ardı edilmiştir. İkinci grupta ise *FVL* mutasyonunu taşıyan Behçet hastaları analizlere dahil edilmemiştir. Elde ettiğimiz sonuçlara göre bu iki grup arasında önemli farklılık gözlenmemiştir. İstatiksel analiz sonucunda Behçet hastalarıyla kontrol grubu karşılaştırıldığında da her iki grupta da, haplotip V'i taşımanın, haplotip I'e göre yaklaşık 11.5 kat risk getirdiği belirlenmiştir. Sonuç olarak üç polimorfizmi birden taşımanın Behçet hastalarında tromboz oluşumu açısından risk getirdiği görülmüştür. Bu sonucumuz, Behçet hastalarının takibinde önem kazanabilir.

## 5. KAYNAKLAR

- Al-Otaibi, L. M., S. R. Porter, et al. (2005). "Behcet's disease: a review." *J Dent Res* 84(3): 209-22.
- Akar, N. 1999. *Klinik Moleküler Patolojiye Giriş*, AÜTF Antip AS Yayınları, 508 sayfa, Ankara
- Ates, A., N. Duzgun, et al. (2003). "Factor V gene (1691A and 4070G) and prothrombin gene 20210A mutations in patients with Behcet's disease." *Pathophysiol Haemost Thromb* 33(3): 157-63.
- Azizlerli, G., A. A. Kose, et al. (2003). "Prevalence of Behcet's disease in Istanbul, Turkey." *Int J Dermatol* 42(10): 803-6.
- Balleisen, L., G. Assmann, et al. (1985). "Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population--II. Baseline data on the relation to blood pressure, blood glucose, uric acid, and lipid fractions." *Thromb Haemost* 54(3): 721-3.
- Bernardi, F., P. Patracchini, et al. (1993). "Molecular analysis of factor VII deficiency in Italy: a frequent mutation (FVII Lazio) in a repeated intronic region." *Hum Genet* 92(5): 446-50.
- Bouaziz-Borgi, L., P. Nguyen, et al. (2007). "A case control study of deep venous thrombosis in relation to factor V G1691A (Leiden) and A4070G (HR2 Haplotype) polymorphisms." *Exp Mol Pathol* 83(3): 480-3.
- Campo, G., M. Valgimigli, et al. (2006). "Tissue factor and coagulation factor VII levels during acute myocardial infarction: association with genotype and adverse events." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(12): 2800-6.
- Carew, J. A., E. S. Pollak, et al. (1998). "Severe factor VII deficiency due to a mutation disrupting an Sp1 binding site in the factor VII promoter." *Blood* 92(5): 1639-45.
- Direskeneli, H., G. Keser, et al. (1995). "Anti-endothelial cell antibodies, endothelial proliferation and von Willebrand factor antigen in Behcet's disease." *Clin Rheumatol* 14(1): 55-61.
- Duzgun, N., E. Ayaslioglu, et al. (2003). "Plasma thrombomodulin levels in patients with Behcet's disease." *Rheumatol Int* 23(3): 130-3.
- Eigenbrot, C. (2002). "Structure, function, and activation of coagulation factor VII." *Curr Protein Pept Sci* 3(3): 287-99.
- Espinosa, G., R. Cervera, et al. (2002). "Vascular involvement in Behcet's disease." *Isr Med Assoc J* 4(8): 614-6.

- El-Ghoroury E.A., El-Din H.G., Abdel-Kader M., Ragab S. 2008. Study of factor VII, tissue factor pathway inhibitor and monocyte tissue factor in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 19(1):7-13.
- Ghiu, I. A., R. E. Ferrell, et al. (2004). "Selected genetic polymorphisms and plasma coagulation factor VII changes with exercise training." *J Appl Physiol* 96(3): 985-90.
- Hasan GÖK, Ahmet ALTINBAŞ et al. (1994). "Behçet Hastalığı ve Kardiyovasküler Sistem" *T Klîn Kardiyoloji* 7:209-212
- Haznedaroglu, E., Y. Karaaslan, et al. (2000). "Selectin adhesion molecules in Behcet's disease." *Ann Rheum Dis* 59(1): 61-3.
- Kansu, E., G. Sahin, et al. (1986). "Impaired prostacyclin synthesis by vessel walls in Behcet's disease." *Lancet* 2(8516): 1154.
- Kiraz, S., I. Ertenli, et al. (2002). "Pathological haemostasis and "prothrombotic state" in Behcet's disease." *Thromb Res* 105(2): 125-33.
- Kontogiannis, V. and R. J. Powell (2000). "Behcet's disease." *Postgrad Med J* 76(900): 629-37.
- Lapcorella, M. and G. Mariani (2008). "Factor VII deficiency: defining the clinical picture and optimizing therapeutic options." *Haemophilia* 14(6): 1170-5.
- Lee, Y. J., S. W. Kang, et al. (2002). "Coagulation parameters and plasma total homocysteine levels in Behcet's disease." *Thromb Res* 106(1): 19-24.
- Lievers, K. J., L. I. Mennen, et al. (2000). "The -323Ins10 polymorphism for factor VII is not associated with coronary atherosclerosis in symptomatic men. The REGRESS study group." *Thromb Res* 97(5): 275-80.
- Lindman, A. S., J. I. Pedersen, et al. (2005). "The influence of the -401G/T and -402G/A polymorphisms of the coagulation FVII promotor on plasma levels of FVII." *Thromb Res* 116(4): 313-20.
- Liu, Y., C. K. Heng, et al. (2002). "Genotype associations of factor VII gene with plasma factor VII coagulant activity and antigen levels in healthy Chinese." *Blood Coagul Fibrinolysis* 13(3): 217-24.
- McVey, J. H., E. Boswell, et al. (2001). "Factor VII deficiency and the FVII mutation database." *Hum Mutat* 17(1): 3-17.
- Millar, D. S., G. Kemball-Cook, et al. (2000). "Molecular analysis of the genotype-phenotype relationship in factor VII deficiency." *Hum Genet* 107(4): 327-42.
- Onder, M. and M. A. Gurer (2001). "The multiple faces of Behcet's disease and its aetiological factors." *J Eur Acad Dermatol Venereol* 15(2): 126-36.

Öner, C. 2002. Genetik Kavramlar. Ankara, Palme Yayıncılık.

Osman Yeşildağ, Mustafa Yazıcı et al. (2000). "Venöz Tromboz, Pseudotumor Serebri ve Birlikte Miyokard Enfarktüsüne Yol Açan Bir Behçet Hastalığı Olgusu" T Klin Kardiyoloji 13:28-34

Ozatli, D., N. Sayinalp, et al. (2002). "Unchanged global fibrinolytic capacity despite increased factor VIIa activity in Behcet's disease: evidence of a prethrombotic state." Rheumatol Int 21(4): 137-40.

Peyvandi, F., P. V. Jenkins, et al. (2000). "Molecular characterisation and three-dimensional structural analysis of mutations in 21 unrelated families with inherited factor VII deficiency." Thromb Haemost 84(2): 250-7.

Pollak, E. S., H. L. Hung, et al. (1996). "Functional characterization of the human factor VII 5'-flanking region." J Biol Chem 271(3): 1738-47.

Quek, S. C., P. S. Low, et al. (2006). "The effects of three factor VII polymorphisms on factor VII coagulant levels in healthy Singaporean Chinese, Malay and Indian newborns." Ann Hum Genet 70(Pt 6): 951-7.

Rahimi, Z., A. Vaisi-Raygani, et al. (2008). "Prevalence of factor V Leiden (G1691A) and prothrombin (G20210A) among Kurdish population from Western Iran." J Thromb Thrombolysis 25(3): 280-3.

Sabater-Lleal, M., L. Almasy, et al. (2006). "Genetic architecture of the F7 gene in a Spanish population: implication for mapping complex diseases and for functional assays." Clin Genet 69(5): 420-8.

Sahin, S., R. Lawrence, et al. (1996). "Monocyte activity in Behcet's disease." Br J Rheumatol 35(5): 424-9.

Sandkamp, M., H. Funke, et al. (1990). "Lipoprotein(a) is an independent risk factor for myocardial infarction at a young age." Clin Chem 36(1): 20-3.

Shen, M. C., J. S. Lin, et al. (2001). "Novel mutations in the Factor VII gene of Taiwanese Factor VII-deficient patients." Br J Haematol 112(3): 566-71.

Suzuki Kurokawa, M. and N. Suzuki (2004). "Behcet's disease." Clin Exp Med 4(1): 10-20.

van 't Hooft, F. M., A. Silveira, et al. (1999). "Two common functional polymorphisms in the promotor region of the coagulation factor VII gene determining plasma factor VII activity and mass concentration." Blood 93(10): 3432-41.

Wulff, K. and F. H. Herrmann (2000). "Twenty two novel mutations of the factor VII gene in factor VII deficiency." Hum Mutat 15(6): 489-96.

Yazici, H., G. Basaran, et al. (1996). "The ten-year mortality in Behcet's syndrome." *Br J Rheumatol* 35(2): 139-41.

Yurdakul, S. and H. Yazici (2008). "Behcet's syndrome." *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22(5): 793-809.

Zouboulis, C. C., I. Kotter, et al. (1997). "Epidemiological features of Adamantiades- Behcet's disease in Germany and in Europe." *Yonsei Med J* 38(6): 411-22.



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Zehra VELİ

Doğum Yeri : Ankara / Türkiye

Doğum Tarihi : 29.07.1983

Yabancı Dili : İngilizce

## EĞİTİM DURUMU

2002/2006 Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Alanı )

1998/2001 Özel Arı Fen Lisesi

1989/1998 Özel Arı Koleji

## STAJLAR

06/2005-08/2005 **Gülhane Askeri Tıp Akademisi** / Mikrobiyoloji Laboratuvarı

08/2005-09/2005 **Hacettepe Tıp Fakültesi** / Acil Biyokimya Laboratuvarı

## KONGRELER

34. Ulusal Hematoloji Kongresi, İzmir, 2008

**FVII promotor bölge gen değişimlerinin haplotip gruplandırılmasıyla tromboz oluşumda rolünün araştırılması**

Poster, Genç Katılımcı Ödülü

I. Prof. Dr. Orhan ULUTİN Trombogenetik Sempozyumu, İstanbul, 2009

**FVII Promotor Bölge Gen Değişimlerinin Behçet Hastalarında Tromboz Oluşumundaki Rolü**

5. Ankara Biyoteknoloji Günleri, Ankara, 2006

6. Ankara Biyoteknoloji Günleri, Ankara, 2007

**ARAŞTIRMA KONULARI**

2005/2006 Prof. Dr. Cumhuri Çökmüş, **Toprakta İzole Edilen Mikroorganizmaların Birbirleri Karşı Olan Antibakterial Etkileri**

2005/2006 Prof. Dr. Cevat Ayvalı, **İmmunoglobulin Reseptörleri**

**SÖZLÜ SUNUMLAR**

Z. VELİ, **FVII Promotor Bölge Gen Değişimlerinin Behçet Hastalarında Tromboz Oluşumundaki Rolünün Araştırılması**, Öğrenci Seminerleri, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 2008

Z. VELİ, **FVII Promotor Bölge Gen Değişimlerinin Behçet Hastalarında Tromboz Oluşumundaki Rolü**, I. Prof. Dr. Orhan ULUTİN Trombogenetik Sempozyumu, Marmara Üniversitesi, İstanbul, 25.03.2009

**POSTER SUNUMLARI**

A. Öztürk, Z. Veli, Ö. Cumaoğulları, N. Akar, **Faktör VII Promotor Bölge Polimorfizimlerinin Behçet Hastaları, Kanser Hastaları ve Aterosklerozlu Hastalarında Haplotip Gruplandırılmasıyla Tromboz Oluşumunda Rolünün Araştırılması**, 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, Çeşme, Ekim 8-11, 2008

**ÖDÜLLER**

Genç Katılımcı Ödülü, 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, Çeşme

