

**T.C.  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DEV TROMBOSİTLİ HASTALARDA MYH9 GENİNDE  
MUTASYON TARAMASI**

**Zafer ERİK**

**Danışman Öğretim Üyesi  
Prof. Dr. Nejat AKAR**

**2009 – ANKARA**

## KABUL ONAY

Prof.Dr.Nejat AKAR danışmanlığında Zafer Erik tarafından hazırlanan bu çalışma 24 /01/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : PROF.DR NEJAT AKAR

Üye : PROF.DR. ZÜMRÜT UYSAL

Üye : PROF.DR. MEHMET ERTEM

Üye : DOÇ.DR. MUTLU ARAT

Üye: DOÇ.DR. HİLAL ÖZDAĞ

İmza : .....

İmza : .....

İmza : .....

İmza : .....

İmza : .....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

.....

Prof.Dr.Asuman KARAKAYA

Enstitü Müdürü

## ÖZET

Trombositler ortalama 2–3µm çapında küçük, disk şekilli hücrelerdir. Megakaryositlerin sitoplazmik parçalanmaları ile oluşurlar. Ortalama 7–10 günlük ömürleri vardır. Çok sayıda sitokin (trombopoietin ve diğerleri) megakaryosit gelişiminden ve trombosit oluşumundan sorumludur. Trombositlerin iki formu vardır biri normal dolaşımında bulunan dinlenme evresindeki trombosit diğeri ise aktif trombositir. Damar zedelenmesi olduğı zaman trombositler hızla aktive olur ve damar duvarında sızıntıyı önlemek amacıyla tıkaç oluşturmak için bir araya gelirler.

Ya düşük sayıda (trombositopeni) ya da fazla sayıda (trombositozis) olabilen trombositlerdeki bir anormallik ya da bozukluk, trombositopati olarak adlandırılır. Bu çalışmada özellikle trombositopeni ile birlikte anılan dev trombosit sendromlu hastalar çalışıldı. Birlikte anılmalarından dolayı makrotrombositopeni olarak da isimlendirilir. Makrotrombositopeni anormal dev trombositlerle karakterize edilir. Bu çalışmanın konusunu Myosin Heavy Chain 9, Nonmuscle (*MYH9*) ilişkili makrotrombositopeni oluşturmuştur. Kromozom 22q12–13'te bulunan *MYH9* geni kas dışı miyozin ağır zincir tip II-A'yı (NMMHC II-A) kodlar. Bu gendeki mutasyon May-Hegglin anomalisi, Sebastian, Fechtner ve Epstein sendromlarından sorumlu olmaktadır. Bu dört otozomal dominant bozukluk farklı laboratuvar ve kliniksel belirtilerle birbirinden ayrılmaktadır. (senonöral işitme kaybı, katarakt, böbrek bozukluğu ve Döhle benzeri cisimcikler gibi)

Dolayısıyla bu çalışmada 122 dev trombositli hastada mutasyon tarama yoluyla *MYH9* genindeki olası olabilecek bir mutasyonun bu hastalıklarla olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır. 122 dev trombositli hastada *MYH9* geni, tek iplikçikli konformasyon polimorfizmi (SSCP) ve *MYH9* geninin DNA dizi analizi yapılarak incelendi. Çalışmaya dahil edilen hastalardaki mutasyon taraması sonucunda bir bireyde ekzon 1 de sessiz mutasyona neden olan tekli bir baz değişimi (c.366C>T, p.45Ser>Ser) saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Makrotrombositopeni, Kas dışı Miyozin Ağır Zincir 9 (*MYH9*)

## ABSTRACT

Platelets are small, disk-shaped cells with an average diameter of 2 to 3 $\mu$ m. They are derived from cytoplasmic fragmentation of megakaryocytes. Their mean life-span is 7–10 days. Lots of cytokines (thrombopoietin and others) are responsible for megakaryocyte development and platelet formation. Platelets have two forms; one is resting platelet which is circulating during normal circulation and the other is active platelet. When the vascular injury occurs, platelets are rapidly activated and aggregate with each other to form a plug on the vessel wall that prevents vascular leakage.

An abnormality or disease of the platelets is called a thrombocytopathy which could be either a decrease (thrombocytopenia) or an increase in the number of (thrombocytosis). In this study patients with giant platelet syndrome which is usually accompanied by thrombocytopenia were analyzed. Hence, it is also called macrothrombocytopenia. Macrothrombocytopenia is characterized by the presence of abnormally large platelets this dissertation is focused on the analysis of Myosin Heavy Chain 9, Nonmuscle (*MYH9*)-related macrothrombocytopenia. *MYH9* gene, located on chromosome 22q12–13, encodes for a non muscle myosin heavy chain type II-A (NMMHC II-A). Mutations in this gene are responsible for May-Hegglin anomaly, Sebastian, Fechtner and Epstein syndromes. These four diseases are autosomal dominant macrothrombocytopenias distinguished by different combinations of clinical and laboratory signs (such as sensorineural hearing loss, cataract, nephritis, and Döhle-like bodies).

Consequently, we aimed to investigate the relationship between a possible mutation in *MYH9* gene and the diseases via mutation scanning of patients with macrothrombocytopenia. 122 patients with macrothrombocytopenia were examined by SSCP and DNA sequencing of the *MYH9* gene. After mutation scanning of all patients, a single base alteration (c.366C>T, p.45Ser>Ser) which causing a silent mutation in exon 1 in an affected individual.

**Key Words:** Macrothrombocytopenia, Myosin Heavy Chain 9, Nonmuscle (*MYH9*)

## ÖNSÖZ

Beni yüksek lisansta danışmanlığına kabul eden, tez süresi boyunca hakkını ödeyemeyeceğim iyilikleri, hoşgörüsü ve desteği ile her konuda bana yardımcı olan Sayın Prof.Dr.Nejat AKAR'a, tezin deney aşamasından yazılmasına kadar geçen her aşamada bana destek ve yardımcı olan , her türlü imkanı sağlayan, tecrübeleriyle, değerli fikirleriyle ve arkadaşlığıyla her zaman yanımda olan Bio.Dr. Erkan Yılmaz'a; tez çalışmam sırasında ortaya çıkan her olumsuzlukta, en zor anlarımda bana yardımcı olan Uzm. Bio. Yonca Eğin'e; çalışmam boyunca arkadaşlığıyla, bilgi ve önerileriyle yanımda olan Uzman Bio.Ayşenur Öztürk'e; her konuda bana yardımcı olan Uzm.Bio.İdil ASLAN'a; tezimin her aşamasında bana yardımcı olan ve her konuda fikrine danıştığım Tek.Kadir SİPAHİ'ye; bu tezi yaparken ve yazarken sıcak çalışma ortamını paylaşmaktan büyük keyif aldığım değerli çalışma arkadaşlarım Bio.Didem TORUN, Bio.Afife KARABIYIK, Bio.Zehra VELİ, Bio. Cennet YILDIZ, Bio.Özge CUMAOGULLARI, Uzm.Bio.Aslı SIRMACI, Uzm.Bio.Filiz Basak CENGİZ,Uzm.Bio.Duygu DUMAN ve ismini sayamadığım tüm Pediyatrik Moleküler Genetik Ailesine çok teşekkür ederim.Bana verdikleri sonsuz sevgi, sabır ve destek için, emeklerini asla ödeyemeyeceğim değerli aileme çok teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No:

KABUL VE ONAY .....	ii
ÖZET .....	iii
ABSTRACT .....	iv
ÖNSÖZ .....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
SEKİLLER DİZİNİ .....	x
DİZİLERİN LİSTESİ .....	xi
SİMGELER DİZİNİ .....	xii
<b>1. GİRİŞ ve AMAÇ</b> .....	1
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	2
2.1. TROMBOSİTLER .....	2
2.1.1. Trombositin Yapısı .....	2
2.1.1.1. Periferal (çevresel) bölge .....	3
2.1.1.1.1. Dış tabaka .....	3
2.1.1.1.2. Trombosit membranı .....	3
2.1.1.1.3. Membran altı bölge .....	3
2.1.1.2. Sol –Jel bölge .....	3
2.1.1.3. Organel bölgesi .....	4
2.1.1.4. Membran sistemi .....	4
2.1.2. Trombosit Fonksiyonu .....	5
2.1.2.1. Trombosit adezyonu .....	5
2.1.2.2. Trombosit aktivasyonu .....	6
2.1.2.3. Trombosit sekresyonu .....	8
2.1.2.4. Trombosit agregasyonu .....	8
2.1.3. Trombosit Oluşumu .....	11
2.1.4. Trombosit Oluşumu ve Makakaryosit Gelişiminin Düzenlenmesi .....	14
2.1.5. Trombosit Biyogenezi ve Apoptoz .....	15
2.2. KALITSAL TROMBOSİTOPENİLER .....	16
2.2.1. Wiskott-Aldrich Sendromu (WAS) ve X'e Bağlı Trombositopeni (XLT) .....	17

2.2.2. Akut Miyeloid Lösemi Eğilimli Ailesel Trombosit Bozukluğu (FPD/AML) .....	17
2.2.3. Amegakaryositik Trombositopeni .....	17
2.2.4. Konjenital Amegakaryositik Trombositopeni (CAMT).....	18
2.2.5. Radioulnar Sinostozlu Konjenital Amegakaryositik Trombositopeni (CTRUS) .....	18
2.2.6. Eksik Radius'lu Trombositopeni (TAR) .....	18
2.2.7. Normal Boyuttaki Diğer Trombositopeniler .....	18
2.2.8. Bernard-Soulier Sendromu (BSS) .....	19
2.2.9. Velocardiofacial Sendromu (VCFS) .....	19
2.2.10. Trombosit Tip ya da Yalancı von Willebrand Bozukluğu (PTvWD) ..	19
2.2.11. İyi Huylu Akdeniz Makrotrombositopeni .....	20
2.2.12. X'e Bağlı Trombositopeni ve Anemili ya da Anemisiz Diseritropoiez .....	20
2.2.13. Paris- Trousseau Tip Trombositopeni (TCPT) ve Jacobsen Sendromu (JBS) .....	20
2.2.14. Gri trombosit sendromu (GPS).....	21
2.2.15. Montreal Trombosit Sendromu (MPS).....	21
2.2.16. Glikoforin A'nın İfadesi ile Oluşan Makrotrombositopeni.....	21
2.2.17. <i>MYH9</i> İlişkili Bozukluklar.....	21
2.2.17.1. May-Hagglin anomalisi (MHA) .....	22
2.2.17.2. <i>MYH9</i> İlişkili Hastalıkların Ayırımında Kullanılan Alport Sendromu .....	23
2.2.17.3. Sebastian Sendromu (SBS), Fechtner Sendromu (FTNS) ve Epstein Sendromu (EPTS) .....	24
2.3. KAS DIŞI MİYOZİN II'NİN YAPISI ve FONKSİYONU (Non Muscle Myosin II, NM II, NMHC II, NMMHC II) .....	25
2.4. MOLEKÜLER TEKNİKLER .....	28
2.4.1. DNA Ekstraksiyonu.....	28
2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	28
2.4.3. Tek İplikçikli Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism) (SSCP).....	30
2.4.4. DNA Dizi Analizi.....	31

<b>3. MATERYAL VE YÖNTEMLER</b> .....	33
3.1. HASTA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI .....	33
3.2. YÖNTEM .....	34
3.2.1. DNA İzolasyonu .....	34
3.2.2. <i>MYH9</i> Geni Üzerindeki Uygulamalar .....	35
3.2.3. <i>MYH9</i> Geni İçin PCR Koşulları .....	35
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi .....	37
3.2.5. SSCP Jeli İçin Poliakrilamid Jel Hazırlanışı .....	37
3.2.6. SSCP Jeli İçin Gümüş Boyama .....	38
3.2.7. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi (Pürifikasyon) .....	39
3.2.8. DNA Dizi Analizi .....	39
<b>4. BULGULAR</b> .....	41
4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları .....	41
4.2. Tek İplikçikli Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) Bulguları .....	42
<b>5. TARTISMA VE SONUÇ</b> .....	45
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	48
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	54



## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa No:</u>
<b>Çizelge 2.1:</b> Değişik yüzey membran glikoproteinleri ve ligandları .....	6
<b>Çizelge 2.2:</b> Trombosit granülleri ve içerikleri.....	10
<b>Çizelge 2.3:</b> Kalıtsal trombositopenilerin trombosit boyutuna göre sınıflandırılması .....	16
<b>Çizelge 2.4:</b> <i>MYH9</i> genindeki mutasyon sonucu oluşan 4 otozomal dominant makrotrombositopeninin kliniksel ve laboratuvar özellikleri.....	25
<b>Çizelge 3.1:</b> Primerler .....	35
<b>Çizelge 5.1:</b> <i>MYH9</i> ilişkili bozukluklara neden olduğu bilinen 33 mutasyon. ....	45

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa No:</u>
Şekil 2.1:	Trombositin yapısı.....2
Şekil 2.2:	Dinlenme evresindeki trombosit.....5
Şekil 2.3:	Aktif trombosit .....5
Şekil 2.4:	Megakaryositlerden trombosit oluşumu ..... 13
Şekil 2.5:	Kas dışı miyozin II'nin genel yapısı.....26
Şekil 2.6:	Kas dışı miyozin II'nin genomik yapısı ve mutasyon spektrumu .....26
Şekil 3.1:	Çalışılan Ailenin Soy Ağacı .....33
Şekil 4.1:	Ekzon 1, ekzon 16, ekzon 30 ve ekzon 40'a ait PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel görüntüleri.....41
Şekil 4.2:	Ekzon 1, ekzon 16, ekzon 30 ve ekzon 40 için SSCP jel görüntüsü .....42
Şekil 4.3:	Ekzon 1'deki farklı bantın SSCP jel görüntüsü.....43
Şekil 4.4:	Ekzon 1 için SSCP de farklı bant veren hastanın DNA dizi analizi.....43
Şekil 4.5:	Ekzon 16, ekzon 30, ekzon 40 için DNA dizi analizi sonuçları.....44

## DİZİLERİN LİSTESİ

Dizi	Sayfa No:
<b>Dizi 3.1:</b> Ekzon 1 için için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.....	36
<b>Dizi 3.2:</b> Ekzon 16 için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.....	36
<b>Dizi 3.3:</b> Ekzon 30 için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.....	36
<b>Dizi 3.4:</b> Ekzon 40 için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.....	36

## SİMGELER DİZİNİ

°C	:	Santigrat derece
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar
bç	:	Baz çifti
dk	:	Dakika
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
g	:	Gram
kDa	:	Kilo dalton
MgCl <sub>2</sub>	:	Magnezyum klorür
M	:	Molar
MT	:	Metallotiyonein
mM	:	Milimolar
ml	:	Mililitre
mg	:	Miligram
ng	:	Nanogram
p	:	Kromozomun kısa kolu
PCR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	:	Pikomol
q	:	Kromozomun uzun kolu
sn	:	Saniye
SSCP	:	Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi

TE	:	Tris EDTA
TAE	:	Tris Asetik asit EDTA
TBE	:	Tris, Borik asit, EDTA
TEMED	:	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
NM II	:	kas dışı miyozin II
NMHC	:	Kas dışı miyozin ağır zincir II
MHC	:	Miyozin ağır zincir
MLC20	:	20kDa miyozin hafif zincir
MLC17	:	17kDa miyozin hafif zincir
HMM	:	Ağır meromiyozin
MLCK	:	Miyozin hafif zincir kinaz

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Miyozinler, filogenetik olarak 17 sınıfta gruplandırılmış olan proteinlerin büyük bir üst familyasından meydana gelmektedir. 2. sınıf, sarkomerik miyozinleri, düz kas miyozinleri ve kas dışı miyozinlerini içermektedir. Memelilerde, kas dışı miyozin ağır zincirin (NMHC) üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlar NMHC-IIA, NMHC-IIB ve NMHC-IIC olup sırasıyla *MYH9*, *MYH10* ve *MYH14* genleri tarafından şifrelenmektedir.

NMHC II-A, hücre yayılmasında, hareketinde, hücre morfolojisinin korunmasında ve sitokinezde önemli fonksiyonlara sahiptir. Kromozom 22q12–13'te bulunan *MYH9* genindeki mutasyon May-Hegglin anomalisi, Sebastian, Fechtner ve Epstein sendromlarından sorumlu olmaktadır. Bu dört otozomal dominant bozukluk farklı laboratuvar ve kliniksel belirtilerle birbirinden ayrılmaktadır. (sensöröral işitme kaybı, katarakt, böbrek bozukluğu ve Döhle benzeri cisimcikler gibi)

Bu çalışmada 122 dev trombositli hastada *MYH9* geni, DNA ekstraksiyonu, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), tek iplikçikli konformasyon polimorfizmi (SSCP) ve DNA dizi analizi yapılarak, mutasyon analizi gerçekleştirilerek mutasyonların bu hastalıklarla olan ilişkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

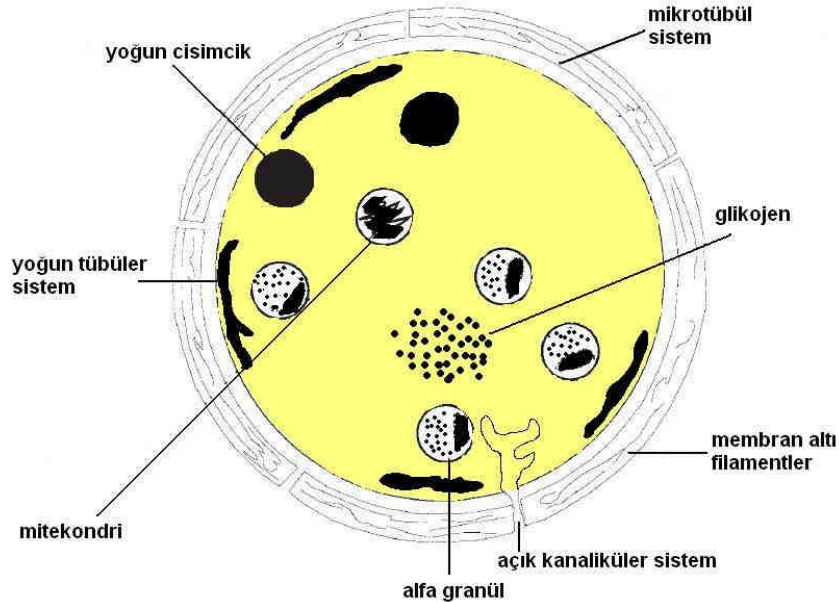
## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. TROMBOSİTLER

Trombositler küçük, disk şekilli, çekirdeksiz, 2–3 µm çapında hücrelerdir. Megakaryositlerin sitoplazmik parçalanmaları ile oluşup kan dolaşımına girerler ve 7–9 günlük bir ömre sahiptirler. Megakaryosit gelişimi ve trombosit oluşumu trombopoietin ve diğer sitokinler tarafından düzenlenir. Trombositler, kemik iliğindeki boşluklarda yer alan endotelial hücreler boyunca megakaryositlerin sitoplazmik büyüme ve bölünme aşamaları ile yayıldığı bugün genel olarak var sayılmaktadır. Fakat bu basamakta hangi sayıda ve boyutta kaç trombositin kontrol edildiği bilinmemektedir (Hartwig and Italiano 2003).

#### 2.1.1. Trombositin Yapısı

Basit görünen trombositlerin fonksiyonları karmaşıktır. Dinlenme evresindeki trombositlerin yapı ve fonksiyonu, anatomik olarak dört bölgeye ayrılarak çok iyi anlaşılmıştır (White 1987)



Şekil 2.1. Trombositin yapısı.

### **2.1.1.1. Periferal (çevresel) bölge**

Bu bölge açık kanaliküler sistemi oluşturan bir membran ve bunun içe doğru olan kıvrımlarından oluşmaktadır. Burası üç farklı bölgeye bölünebilir: dış tabaka, membran ve membran altı bölge (Nurden and Caen 1978).

#### **2.1.1.1.1. Dış tabaka**

10–20 nm kalınlığında glikokaliks ve glikoproteince zengin bir bölgedir. Temel olarak hücre-hücre, hücre-damar duvarı etkileşimi için reseptör olarak işlev görmektedirler. Trombosit yapışması ve kümelenmesi hakkında bu reseptörler detaylıca tartışılmıştır (Nurden and Caen 1978).

#### **2.1.1.1.2. Trombosit membranı**

Bir çok yönden trombosit membranı diğer kan hücrelerinin membranları ile benzerdir:

- 1- Fosfolipit bakımından zengin çift tabakalı lipitten oluşması
- 2- Hücre içi ve hücre dışı işlemler arasında fizikokimyasal ayırımı sağlaması
- 3- Anyon ve katyon pompalarını içermesi ( $Na^+/K^+$ -ATPaz gibi) zardan geçen iyonların dengelenmesinde kritiktir. Trombosit membranı pıhtılaşma için önemli bir katalizördür (Tracy 1988).

#### **2.1.1.1.3. Membran altı bölge**

Anatomik ve fonksiyonel olarak membran glikoproteinleri ve yaygın sitoplazmik filament sistemi ile ilişkilendirilmiş farklı mikrofilament ağlarını içerir (Zucker-Franklin 1970).

### **2.1.1.2. Sol –Jel bölge**

Sitoplazmanın matriksine sol-jel bölge denir ve polimerizasyonun değişkenlik gösteren durumlarında iki fiber sisteminden meydana gelir. Alt membranın hemen altında dinlenme evresindeki trombositin şeklini korumaya yardım eden sıkıca kıvrılmış (helezonlaşmış) mikrotübüller bulunur. Aktivasyon ile mikrotübüller, merkezde



kümelenmiş organellerin etrafında sık halkalar halinde daralırlar. Bu kasılma olayı için hareketi sağlayan kuvvet sitoplazmik filamentler tarafından oluşturulur (White 1968).

Sol-jel içindeki ikinci grup fiberler aktin mikrofilamentleridir. Dinlenme evresindeki trombositte aktinin sadece % 30-40'ı filamentlere polimerize olur (Fox, Boyles et al. 1984). Aktivasyonla polimerizasyonda bir artış olur. Yeni filamentler hücrenin dış yüzeyinde (periferinde) ve gelişen filopodia içinde görünmeye başlar (Fox 1993).

### **2.1.1.3. Organel bölgesi**

Bu bölge farklı bir bölge olarak çok iyi ayırt edilebilen bir yer değildir ancak sitoplazma boyunca dağılmış depo granülleri, yoğun cisimcikleri, peroksisomları, lizozomları ve mitokondrileri içerir. Aslında bu bölge belli başlı metabolik işlemlerle ilgilidir ve aynı zamanda yaygın değişkenlik gösteren proteinler, kalsiyum, serotonin, adenin nükleotidi ve enzimler için bir depo yeri gibi rol alır (White 1973; White 1974).

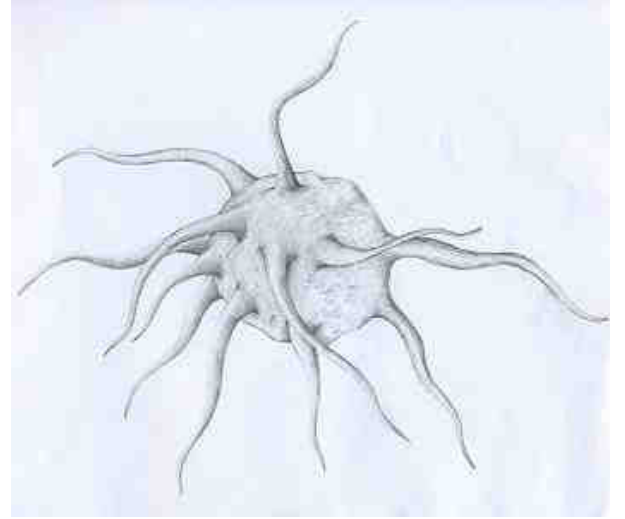
### **2.1.1.4. Membran sistemi**

Membran sistemi dördüncü ve son bölgeyi oluşturur. Plazma membranı aynı zamanda trombosit içindeki derinlere giden çok sayıda kıvrımlar içerir. Genellikle “açık kanaliküler sistem” olarak isimlendirilen bu kanallar hücresel transport için geniş bir yüzey alanı oluştururken devam eden reaksiyon süresince ve şekil değişikliği ile trombosit aktivasyonunu tamamıyla sürdürür (White 1973; White 1974).

Yoğun tübüler sistem ikinci bir membran sistemi oluşturur ve hücrenin iç kısmında yer alır. Ata hücrenin endoplazmik retikulumundan türemiş olan yoğun tübüler sistem hem kalsiyum için hem de prostoglandin senteziyle ilişkili enzimler için bir depo yeri olarak rol oynar. Bu iki membran sistemi birbirleriyle doğrudan ilişki içindedirler ve içeriklerinin değiş tokuş edilmesine izin verirler (Cutler, Rodan et al. 1978).



**Şekil 2.2.** Dinlenme evresindeki trombosit.



**Şekil 2.3.** Aktif trombosit.

### **2.1.2. Trombosit Fonksiyonu**

Normal koşullar altında trombositler diğer trombositlerle ya da damar endoteli ile etkileşmeden serbestçe kan damarında dolaşırlar. Endotelde zedelenme olması durumunda pıhtı oluşumuna neden olan bir olaylar zinciri tetiklenir. Bu olaylar dizisi karmaşık birçok biyokimyasal ve hücre sel süreçlerin olduğu dört genel kategoriye bölünerek açıklanmıştır: adezyon, aktivasyon, agregasyon ve sekresyon (Weiss 1975).

#### **2.1.2.1. Trombosit adezyonu**

Trombositler zarar görmüş, bozulmuş ya da fonksiyonunu yitirmiş endotelyuma bağlanma eğilimi gösterir. Zarar gören bölge, spesifik membran glikoproteinleri olarak tanımlanmış olan adeziv proteinler aracılığı ile trombositler tarafından örtülür. Fonksiyonel olarak örtüşen çok sayıdaki resöptör aynı liganda bağlanabilir ve spesifik bir reseptör birden fazla liganda yanıt verebilir. Reseptörler bir de integrinler ve integrin olmayanlar olarak gruplandırılabilir. İntegrinler  $\alpha$ - ve  $\beta$ - altbirimlerinden oluşan heterodimerik hücre yüzey mellekülleridir. İntegrinlerin genellikle düşük ve yüksek olmak üzere iki afinite seviyesi vardır. Afiniteleri sitoplazmik domainlerinin fosforilasyonu ve sitoplazmik sinyallerle değiştirilir. Trombositler,  $\beta_1, \beta_2$  ve  $\beta_3$  alt birimleri ile toplamda altı farklı integrin içerirler ( $\alpha_2\beta_1$ ,  $\alpha_5\beta_1$ ,  $\alpha_6\beta_1$ ,  $\alpha_L\beta_2$ ,  $\alpha_{IIb}\beta_3$ , ve  $\alpha\nu\beta_3$ ) (Bouvard, Brakebusch et al. 2001).

Değişik yüzey membran glikoproteinleri ve ligandları aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

**Çizelge 2.1:** Değişik yüzey membran glikoproteinleri ve ligandları.

Reseptör	Ligand	İntegrin İçeriği	Biyolojik Aktivitesi
GPIa/IIa	Kollajen	$\alpha 2\beta 1$	Adezyon
GPIb/IX	vWF	-	Adezyon
GPIc/IIa	Fibronektin	$\alpha 5\beta 1$	Adezyon
GPIIb/IIIa	Kollajen	$\alpha 11b\beta 3$	Agregasyon
	Fibrinojen		
	Fibronektin		
	Vitronektin		
	vWF		
GPIV	Trombospondin, kollajen	-	Adezyon
GPVI	Kollajen		
Vitronektin reseptörü	Vitronektin, trombospondin	$A\nu\beta 3$	Adezyon
VLA-6	Laminin	$A6\beta 1$	Adezyon

Adezyonu başlatan olay temastır. Süreç, dolaşımda dinlenme evresinde bulunan trombositin “durması” ve zarar görmüş damara “yapışmasıdır”. Bu önemli olay trombosit glikoproteinini Ib-IX kompleksi ile damar endotelial hücreler tarafından sentezlenen büyük bir protein olan von Willebrand (vWF) arasındaki etkileşimle gerçekleşmektedir (Roth 1992).

### 2.1.2.2. Trombosit aktivasyonu

Aktivasyon çok çeşitli biyokimyasal ve mekanik uyarılarla tetiklenebilir. Bu biyokimyasal agonistlerin çoğu, damar duvarına yapışmış olan trombositler tarafından üretilir ya da salgılanır. Trombosit aktivasyonunun üç aşamada gerçekleştiği kabul edilir:

- 1) Uyarı: Genellikle agonistlerin ortaya çıkmasına yol açarak trombosit aktivasyonuna neden olan bir olay vardır. Agonistlerin trombositlere bağlanması bu hücrenin aktivasyonunu başlatır.
- 2) Hücre içindeki ikincil mesajcıların uyarıyı iletmeleri.

- 3) Cevap: Trombosit iskelet yapısının değişmesi (trombositin Şekil deęiŐtirmesi), trombositlerin fibrinojen aracılığı ile yapıŐıp kŭme oluŐturmaları ve granŭl sekresyondur (Koca 2007).

Trombosit aktivasyonunu başlatan agonistler zayıf ve gŭclŭ olarak sınıflandırılırlar. Gŭclŭ agonistler (kollajen, trombin vb.) agregasyonun engellendiği Şartlarda dahi granŭl sekresyonunu uyarabilirler. Zayıf agonistler (ADP, epinefrin vb.) ise yalnız baŐlarına granŭl sekresyonunu uyaramazlar; ancak agregasyonu uyarabilirler. Agregasyon neticesinde sekresyon gerŐekleŐebilir (Koca 2007).

Trombosit agonist reseptŖrleri çoğunlukla transmembran uzantıları da olan plazma membran proteinleridir. Tam anlamıyla karakterize edilebilen reseptŖrlerin çoğu "G proteinleri ile ilişkili olan reseptŖrler" gurubundandır. Bu reseptŖrlerin ortak Ŗzellikleri yedi adet transmembran kıvrımı olan tek bir polipeptid yapısında olmaları ve oluŐturdukları uyarıyı ikincil mesajcılara ileten, G proteinleri olarak adlandırılan adaptŖr proteinler kullanmalarıdır (Koca 2007).

Sırasıyla G proteini tarafından tetiklenen birbirini takip eden iki tane hŭcre iÇi uyarılma yolu vardır. Fosfoinozitid hidroliz yolu, G proteini tarafından fosfolipaz C'nin aktivasyonu ile başlar. Fosfatidilinositol-4-5-bifosfat (PIP<sub>2</sub>) iki ikincil mesajcıya parŐalanır (inositol-1,4,5-trifosfat (IP<sub>3</sub>) ve diaŐilgliserol) (Berridge 1987). IP<sub>3</sub> yoğun tŭbŭler sistemden kalsiyum salınmasını uyarır. Bu olay fizyolojik trombosit cevaplarından sorumlu hŭcre iÇi enzimlerin aktivasyonu iÇin gereklidir (Rink and Sage 1990).

Sitoplazmada serbest kalsiyum dŭzeyinin artıŐıyla ikinci hŭcre iÇi uyarılma yolu olan eikozanoid yol aktive olur. Kalsiyum dŭzeyinin artıŐı ile uyarılan sitoplazmik fosfolipaz A<sub>2</sub> yoğun tŭbŭler sistem membranından ve belki de sitoplazma zarından araŐidonik asit ayrılmasını sağlar. AraŐidonik asit sitoplazmada baŐlıca tromboksan A<sub>2</sub>'ye (TxA<sub>2</sub>) metabolize edilir. Hŭcre dıŐına salınan TxA<sub>2</sub>, civardaki trombositleri de uyararak trombosit aktivasyonunun amplifiye olmasını sağlar (Koca 2007).

### 2.1.2.3. Trombosit sekresyonu

Trombosit aktivasyonu, hücre dışı sinyallere, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmelerine, membran birleşmelerine ve trombositlerde bulunan üç farklı granül ( $\alpha$ -granüller, yoğun cisimcikler ve lizozomlar) içeriğinin dışarı çıkarılmasına (sekresyona) cevap oluşturan bir komplekstir.  $\alpha$ -granüllerin birbirleriyle ve plazma membranının yaptığı içe doğru oluşan derin kıvrımlarla (açık kanaliküler sistem) birleşmesi kanıtlanmıştır (Ginsberg, Taylor et al. 1980; Stenberg, Shuman et al. 1984). Lizozomlar çok sayıda asit hidrolaz (proteinazlardan ketepsinler) içermektedirler. Lizozom sekresyonu,  $\alpha$ -granüller ve yoğun cisimciklerin sekresyonundan daha yavaş olmaktadır (Holmsen and Day 1970).

ADP'nin reseptörüne bağlanmasını takip eden olaylar; kalsiyumun hızla sitoplazmaya akması, hücre içi kalsiyum depolarının hareketi, şekil değişikliği, adenil siklazın inhibisyonu,  $IP_3$  oluşumunun uyarılması, yüzey GPIIb/IIIa ifadesi, fosfolipaz  $A_2$ 'nin uyarılması, yoğun granüllerin ve alfa granüllerinin içeriklerinin salgılanması şeklinde rapor edilmiştir (Nurden, Savi et al. 1995).

### 2.1.2.4. Trombosit agregasyonu

Trombosit aktivasyonu ile GPIIb/IIIa, konformasyonel bir değişime uğrar. Bunu genelde protein ligandlarıyla, kısmen de fibrinojenle uygun bir bağlanma yapabilmek için yapar. GPIIb/IIIa,  $\alpha_{IIb}$ ,  $\beta_3$  alt birimlerini içerir.  $\alpha$ -alt birimi bir ağır zincir ve bir hafif zincir içerir. Ağır zincir tamamen hücre dışındayken hafif zincir trombosit membran açıklıklarında bulunur ve kısa bir hücre dışı domainle sonlanır (Poncz, Eisman et al. 1987).

GPIIb/IIIa- fibrinojen kompleksinin elektron mikroskopi çalışmalarında GPIIb/IIIa'nın globüler baş bölgesi fibrinojen molekülünün distal ucu ile etkileşim halinde olduğu ve kuyrukların fibrojen molekülüne  $90^0$ 'lik açı yapacak şekilde lateral olarak uzatılmış halde olduğu görülmüştür. Dolayısı ile GPIIb/IIIa, bir fibrinojen molekülünün ucuna doğru bağlanırken, kuyruklar zıt yöne doğru yönelir, bu da yakın trombositlerin arasında "köprü" oluşturmaya imkân sağlar (Weisel, Nagaswami et al. 1992).

İn vivo ortamda kanın subendoteliyal dokuya temasına neden olan bir damar zedelenmesi neticesinde trombositler diğer hücreler ve ekstrasellüler matriks moleküllerine

(immobilize vWF, kollajen, laminin, fibronektin) yapışır (adezyon). Adezyonu takiben, trombositler subendoteliyal matriks üzerinde birçok yeni reseptör-substrat bağlanması ile sıkı bir şekilde yayılırlar. Kollajen, adenosin difosfat (ADP), epinefrin, trombin gibi herhangi bir agonist trombosit yüzeyindeki reseptörüne yapıştığı zaman hücrede belirgin biyokimyasal değişikliklere neden olur (aktivasyon). Aktive olması neticesinde trombositin şekli değişir ve diğer hücrelerle etkileşimleri uyarılır. In vitro şartlarda aktivasyonu takiben trombositin küresel bir şekil kazandığı ve birçok filopodial uzantıların ortaya çıktığı izlenir. Aktin iskeleti tarafından meydana getirilen bu şekil değişimi ile hücre yüzeyi ve trombositlerin birbirleri ile temas alanları artar. İşte, şekil değişiminin ve trombosit aktivasyonu neticesinde GPIIb/IIIa reseptöründe meydana gelen konfigürasyon değişikliğinin avantajıyla trombositler bu reseptörün ligandı olan fibrinojeni bağlamak suretiyle kümeleşirler (agregasyon). Agregasyonun ilk aşaması tersinebilir. Takiben, yoğun ve granül içerikleri salgılanır (sekresyon) ve bu granüllerin yapısında bulunan agonistlerin de katkısıyla agregasyon tersinemez hale gelir. Son olarak, damar kesisi bölgesinde trombositlerin de katkılarıyla oluşan pıhtının deney tüpünde olduğu gibi büzüşerek yara dudaklarını birbirlerine yaklaştırdığı kabul edilmektedir (retraksiyon). Pıhtı büzüşmesinde trombosit aktin iskeletinin görev yaptığı ve bu süreçte integrin GPIIb/IIIa'nın düzenleyici rolü olduğu düşünülmektedir (Koca 2007).

**Çizelge 2.2:** Trombosit granülleri ve içerikleri.

<b>Trombosit granülleri ve içerikleri</b>	
<b>Yoğun cisimcikler</b>	
	ATP ADP serotonin kalsiyum fosfat guanin nükleotid
<b>Alfa granülleri</b>	
*Enzimler	$\alpha$ 1 antitripsin $\alpha$ 2 makroglobulin $\alpha$ 2 antiplazmin C1-esteraz inhibitörü
*Adezyon proteinleri	Fibrinojen Fibronektin vWF Trombospondin Vitronektin GP IIb/IIIa P-Selektin
*Büyüme faktörleri	PDGF (Platelet Derived Growth Factor) TGF $\beta$ (Transforming Growth Factor $\beta$ ) Epidermal Growth Factor Endotelial Growth Factor
*Sitokin benzeri proteinler	IL 1 CD 40 Ligand PF4 (Trombosit faktör 4) $\beta$ -Tromboglobulin (BTG)
*Koagülasyon faktörleri	HMWK Plazminojen PAI-1 Faktör V Faktör XI Fibrinojen Pr. S
<b>Lizozomlar</b>	
	$\beta$ Galaktosidaz $\beta$ Glukuronidaz $\alpha$ arabinosid N-asetil glukozamidaz Elastaz Kollejenaz Katepsin

### 2.1.3. Trombosit Oluşumu

Kan pulcuklarının oluşum mekanizması üzerine yaklaşık 100 yıldır çalışılmaktadır. 1906 da James Homer Wright Massachusetts General Hospital da trombositlerin dev öncülleri olan megakaryositlerden nasıl oluştuğunun detaylı bir analizini yaparak ilk adımı atmıştır. Yıllar boyunca trombositlerin megakaryositlerden nasıl oluştuğunu açıklayan çok sayıda teori önerilmiştir. Demarkasyon membran sistemi (DMS) 1957 de Yamada tarafından detaylıca tanımlanmıştır. Başlangıçta megakaryosit sitoplazması içinde sınırları önceden şekillendirilmiş “ trombosit alanları” olarak önerilmiştir (Yamada 1957). Mikroskop uzmanları gelişen megakaryositlerin membran ve trombosit organelleriyle dolmaya başladığını tanımlamışlardır. Bu membranlarda tanımlanan alanların, gelişen trombositler için bir sistem oluşturduğunu önermişlerdir (Shaklai and Tavassoli 1978). Serbest kalan trombositlerin, megakaryosit plazmasındaki bu alanlar arasında bulunan DMS kırılma çizgileri boyunca büyük bir parçalanma ile oluştuğu önerilmiştir. DMS modeli trombositlerin ayrıntılı olarak hazırlanmış bir iç membranın yeniden organizasyon süreci boyunca oluştuğunu ifade etmektedir (Kosaki 2005).

Megakaryosit plazma membranının içe doğru kıvrılmasıyla meydana gelen tübüler membranların, her yerde sürekli bir iletişim ağı oluşturmak için birbirine bağlandığı ve kollara ayrıldığı tahmin edilmiştir. Yakın tübüllerin kaynaşması, son aşamada oluşan bir trombositin sitoplazmasının çevresinde olan bir düz membran oluşturmak için bir mekanizma olarak kabul edilmiştir. Modellerde, megakaryosit sitoplazmasının trombosit seviyesinde hacimlere nasıl bölündüğünü ve kendi membranının trombositleri nasıl sardığını açıklamak için hep kullanılmış olan DMS çok sayıdaki tutarsız gözlemlerden dolayı güven kaybetmiştir. Örneğin eğer trombositler megakaryosit sitoplazması içinde DMS tarafından açıklanıyorsa, o zaman trombosit alanları dinlenme evresindeki trombositlerle aynı yapısal özellikleri göstermeliydi ancak böyle bir durum söz konusu değildi (Radley and Hartshorn 1987). Megakaryosit içindeki trombosit alanlarının marjinal mikrotübül sarmallarından yoksun olması, dinlenme evresindeki trombosit yapısının en seçici özelliklerinden biriydi. Yine doğrudan trombosit alanlarının patlayarak çatlaması ya da paramparça olarak fonksiyonel trombositte olgunlaşmasını gösteren canlı megakaryositler üzerinde yapılmış bir çalışmanın bulunmamasıdır. Aksine mikrotübül depolimerizasyon ajanları tarafından uyarılan protrombosit büzülmesinin öncesi ve sonrasında megakaryositlerin DMS'si



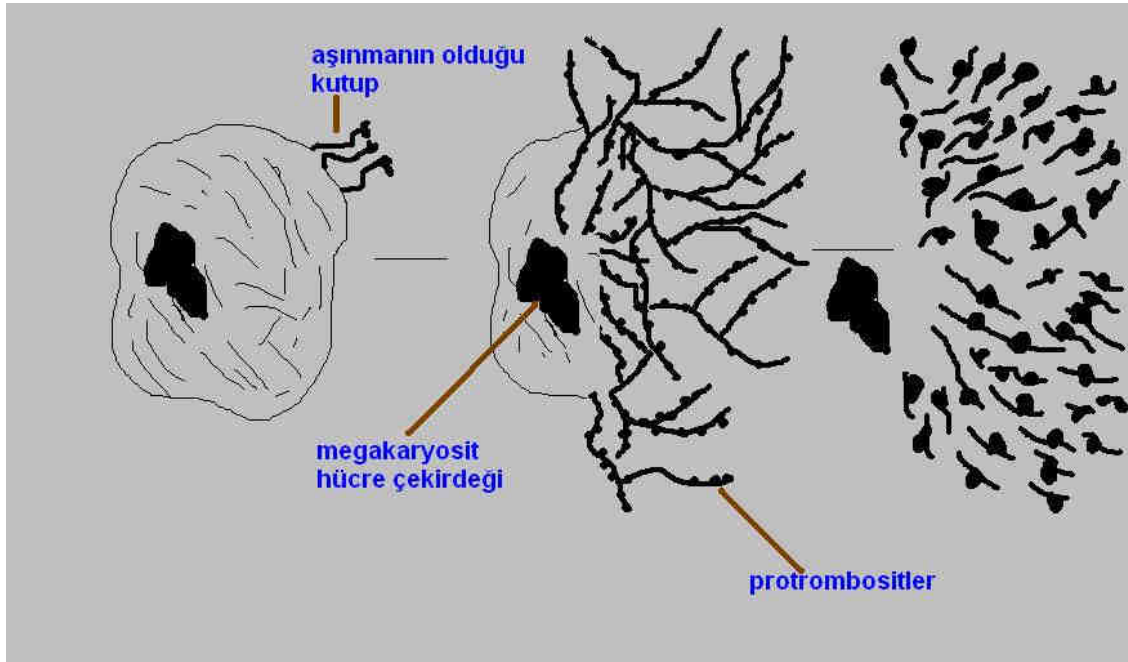
üzerine odaklanılan çalışmalar, protrombositlerin kapsamlı büyümeleri için özelleşmiş bu membran sisteminin içe kıvrılarak (evajinasyon) plazma membranı sağlamak amacıyla öncelikle membran rezervuarı olarak işlevsel olabileceği ortaya atılmıştı. Radley ve Haller DMS'nin belki de yanlış adlandırılmış olabileceğini belirtmiş ve bu membranöz ağı tanımlamak için "invajinasyon membran sistemi" ni daha uygun bir isim olarak öne sürmüşlerdir (Radley and Haller 1982).

Toplanan önemli kanıtlar trombosit oluşumundaki protrombosit modelini desteklemiştir. Protrombosit terimi genellikle megakaryositten çıkan dar stoplazmik uzantılarda büyüklüğü (milmetreye kadar) tanımlamak için kullanılır (Becker and De Bruyn 1976). Bu uzantılar dar stoplazmik köprülerle birbirine bağlanmış çeşitli boncuk boyutundaki trombositler ile karakterize edilir ve megakaryositten trombosit dönüşüm sırasındaki ara yapıları temsil ettiği düşünülür. Bu yalancı ayak benzeri yapılardan trombositlerin oluşumundaki asıl kavram Wright tarafından trombositlerin megakaryositlerden köken aldığı tanımlaması ve disk benzeri parçalar ya da megakaryositten çıkan yalancı ayaklardan gelen segmentleri açıklamasıyla oluşmuştur (Wright 1906).

Trombosit oluşumu sırasında megakaryositlerden gelişen bu sitoplazmik olayları Thiery, Bessis ve Behnke daha sonradan detaylıca açıklamıştır (Thiery and Bessis 1956; Behnke 1969). Klasik protrombosit teorisi, megakaryositlerin uzun yalancı ayak benzeri yapıları oluşturup ardından trombosit oluşturmak için parçalandıklarını ortaya atan Becker ve De Bruyn tarafından tanımlanmıştır (Becker and De Bruyn 1976). Bu modelde DMS hala megakaryosit sitoplazmasını trombosit alanlarına böldüğü öngörülüyordu. Radley ve Haller daha sonra trombositlerin, yalnızca birleşmiş protrombosit ekseni boyunca bağlanan boncuk boyutundaki trombositlerden köken aldığı kabul edilen "akış Modeli"ni geliştirmişlerdir. DMS'nin trombosit alanlarını açıklamak için fonksiyonel olmadığını daha ziyade bir rezervuar olarak protrombosit oluşumu sırasında membran yüzeyini ters çevirdiğini (tersyüz ettiğini) ileri sürmüşlerdir. Gelişen trombositlerin, yalnızca protrombosit oluşturan plazma membranı ile sarıldıkları varsayılmıştır (Radley and Haller 1982).

Bugün deneysel bulguların çoğu trombosit oluşumu ile ilgili olarak modifiye edilmiş bir protrombosit modelini savunmaktadır. Protrombositlerin ürünleri olan yapısal

ve fonksiyonel olarak kan trombositleri ile benzer olan trombositlerin olgunlaşmasında hem in vivo hem de in vitroda protrombositler gözlenmiştir (Choi, Nichol et al. 1995; Cramer, Norol et al. 1997). Bu gözlemler sıçanları, köpekleri, inekleri ve insanları kapsayan memeli türlerinin geniş bir aralığında yapılmıştır (Leven 1987). Kemik iliğinden büyüyen megakaryositler, dolaşıma katıldıkları varsayılan kan damarını kaplayan endotel bağlantı bölgeleri boyunca trombosit oluşturmak için ilave parçalanmalara maruz kalırlar (Tavassoli and Aoki 1989). Farelerde iki farklı hematopoietik transkripsiyon (Nükleer faktör eritroid 2 (NF-E2), transkripsiyon faktör GATA-1) faktörünün olmayışından dolayı bu olaylar gerçekleşmez. Bu fareler in vitro da protrombosit oluşturamazlar ve şiddetli trombositopeni gösterirler. Esas alınan bu bulgular protrombosit yapımının trombosit oluşumunda önemli bir rol olduğunu destekler (Lecine, Villeval et al. 1998).



**Şekil 2.4.** Megakaryositlerden trombosit oluşumu.

Trombopoietin keşfedilmesi ve trombosit oluşumunun in vitroda yeniden düzenlendiği megakaryosit kültürlerinin geliştirilmesi, protrombosit oluşturma eylemini yapan megakaryositleri çalışmak için sistemler sağlamıştır. Megakaryosit sitoplazmasının içeriğinin neredeyse tamamının protrombosit uzantılarına ve son basamakta ince sitoplazmik iplerle bağlanan boncuklar olarak gözüken partikül boyutlu trombositlere dönüşmektedir. Dönüşüm 5- 10 saatte gerçekleşmektedir ve megakaryosit sitoplazmasında bir kutuptaki aşınma ile başlar. Önce kalın yalancı ayaklar oluşur sonra uzayarak çapı 2–4

µm de değişmeyen ince tüplere dönüşür. Bu ince tübüller sırasıyla dinamik bir kıvrılma ve dallanma işlemleri geçirir ve uzunluğu boyunca yoğunlaşırlar. En sonunda megakaryositten geriye yalın bir çekirdek kalır ve etrafı karmakarışık bir protrombosit ağı ile çevrenir. Hücre gövdesinin protrombosit parçacıklarına parçalanmaya başladığı anda megakaryosit olgunlaşması sona erer. Partikül boyutlu trombositlerin arasındaki sitoplazmik köprülerin kopmasıyla her bir yapının dolaşıma bir trombosit verdiği inaniılmaktadır (Italiano, Lecine et al. 1999).

#### **2.1.4. Trombosit Oluşumu ve Megakaryosit Gelişiminin Düzenlenmesi**

Megakaryosit gelişimi ve trombosit oluşumu çeşitli aşamalarda çok sayıda sitokin tarafından düzenlenmektedir (Kaushansky 2003). Bu mekanizmalar normal trombosit sayısını korumak için yaklaşık olarak 3 basamakta düzenlenmektedir. İnterlökin-3, interlökin-6, interlökin-11, interlökin-12, GM-CSF (Granülosit Makrofaj Koloni Uyarıcı Faktör) ve eritropoietin gibi özel sitokinler megakaryosit öncüllerinin çoğalmasını düzenler (Segal, Stueve et al. 1988).

Lösemi inhibitör faktör (LIF) ve interlökin-1 $\alpha$  sitokinleri megakaryosit gelişimini ve trombosit salınımı düzenler. Trombopoietin (TPO) 1995 yılında beş farklı grupta saflaştırılıp kopyalanmış bir sitokindir ve trombosit oluşumunun temel düzenleyicisidir (Kaushansky 2006). Trombopoietin, hematopoietik kök hücre basamağında sitoplazmik olgunlaşmaya kadar megakaryosit gelişiminin bütün basamaklarında düzenleyicidir. Kit ligand (KL) (kök hücre faktörü, steel faktör, mast hücresi büyüme faktörü olarak da bilinir) bir sitokin olup hem membrana bağlı hem de serbest halde bulunur. İlk hematopoietik hücreleri etkiler. İnterlökin-6, interlökin-11 ve KL aynı zamanda megakaryosit gelişiminin her basamağında düzenleyici olsa da yalnızca TPO ya da interlökin-3 ile birlikte işlevsel görünmektedir. İlginç olan ise in vitro da TPO ve yukarıda bahsi geçen sitokinlerin trombosit oluşumunun (protrombosit ve trombosit üretiminde) son basamağı için gerekli olmayışıdır (İto, Ishida et al. 1996).

### 2.1.5. Trombosit Biyogenezi ve Apoptoz

Trombosit oluşumundaki olaylarda megakaryositler, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesi, membran yoğunlaşması ve büzüşmesini içeren apoptozla ilgili bazı özellikler gösterir. Bu benzerliklerden dolayı apoptozun protrombosit oluşumunda ve trombosit salınımında bir mekanizma olup olmadığını belirlemeye yönelik ek araştırmalar yapılmıştır. Apoptoz ya da programlanmış hücre ölümü, yaşlanan megakaryositlerdeki çekirdek yıkımından sorumludur (Ito, Ishida et al. 1996).

Sadece özelleştirilmiş bir apoptotik olayın trombosit üretimi ve salınımına neden olabileceği düşünülmüştür. Hem proapoptotik hem de antiapoptotik çok sayıda apoptotik faktör megakaryositlerde tanımlanmıştır (Kaluzhny and Ravid 2004). Bcl-2 ve Bcl-x<sub>L</sub> gibi apoptoz inhibitör edici proteinler ilkin megakaryositlerde ifade edilir. Megakaryositlerde aşırı ifade oldukları zaman her iki faktör protrombosit oluşumunu engeller. Bcl-2 olgun kan trombositlerinde, Bcl-x<sub>L</sub> ise yaşlanmış megakaryositlerde bulunmaz (Sanz, Benet et al. 2001).

Programlı hücre ölümüne yol açan enzimlerden kaspazlar ve nitrik oksidi (NO) içeren proapoptotik faktörler de megakaryositlerde ifade olmaktadır. Bulgular kaspazların trombosit toplanmasında güçlü bir rolü olduğunu göstermiştir. Kaspaz aktivitesinin protrombosit oluşumu için gerekli olduğu belirlenmiştir. Kaspaz 3 ve 9 olgun megakaryositlerde aktiftir ve bu kaspazların inhibisyonu protrombosit oluşumunu engeller (De Botton, Sabri et al. 2002).

Nitrik oksit partikül boyutlu trombositlerin salınımına karışmaktadır ve trombosit salınımı artırmak için trombopoietin ile birlikte çalışabilir (Battinelli and Loscalzo 2000). Megakaryositlerde ifade olan diğer proapoptotik faktörler ise trombosit oluşumundan sorumludur (Kim, Jung et al. 2002). Ayrıca kaspaz 3 ve 9 son aşamada farklılaşmış megakaryositlerde de aktiftir. Fakat sadece kaspaz 3 trombositlerde bol miktarda bulunurken kaspaz 9 bulunmaz (Clarke, Savill et al. 2003). Benzer şekilde kaspaz 12 de megakaryositlerde varken trombositlerde yoktur (Kerrigan, Gaur et al. 2004).

## 2.2. KALITSAL TROMBOSİTOPENİLER

Burada kalıtsal trombositopeniler trombosit boyutuna göre sınıflandırılmış olup bozukluklardan kısaca bahsedilmiştir.

**Çizelge 2.3:** Kalıtsal trombositopenilerin trombosit boyutuna göre sınıflandırılması.

Kalıtsal Trombositopeni	Kısa Adı	On line Mendelian inheritance in man (OMIM)	Sendromik (S)/ Sendromik Değil (SD)	Kalıtım Biçimi	Gen	Gendeki Yeri
<b>KÜÇÜK TROMBOSİTLER</b>						
Wiskott-Aldrich Sendromu	WAS	301000	S	X'e bağlı	WAS	Xp11
X'e bağlı Trombositopeni	XLT	313900	SD			
<b>NORMAL TROMBOSİTLER</b>						
Akut Miyeloid Lösemil Eğilimli Ailesel Trombosit Bozukluğu	FPD/AML	601399	S	Otozomal Dominant	CBFA2	21q22
Amegakaryositik trombositopeni	CAMT	604498	SD	Otozomal Resesif	c-mpl	1p34
Radioulnar sinostozlu Amegakaryositik Trombositopeni	CTRUS	605432	S	Otozomal Dominant	HOXA11	7p15-14
Eksik Radius'lu Trombositopeni	TAR	274000	S	Otozomal Resesif		
Diğer Trombositopeniler	THC2	188000	SD	Otozomal Dominant		10p12 Heterojenlik
<b>BÜYÜK TROMBOSİTLER</b>						
Bernard-Soulier Sendromu	BSS	231200	SD	Otozomal Dominant	GPIba GPIbβ GPIX	17p13 22q11 3q21
Velocardiofacial Sendromu	VCFS	192430	S	Otozomal Dominant	(Bitişik Gen Sendromu) GPIbβ	22q11
Trombosit Tip ya da Yalancı von Willebrand Bozukluğu	PTvWD	177820	SD	Otozomal Dominant	GPIba	17p12
İyi Huylu Akdeniz Makrotrombositopeni		153670	SD	Otozomal Dominant		
X'e Bağlı Trombositopeni ve Anemili ya da Anemisiz Diseritropoiez	XLTT	300367 314050	S	X'e bağlı	GATA-1	Xp11
Paris- Trousseau Tip Trombositopeni	TCPT	188025/600588	S	Otozomal Dominant	(Bitişik Gen Sendromu) Fli-1 Ets-1	
Jacobsen Sendromu	JBS	147791				
<b>MYH9 İlişkili Bozukluklar</b>						
May-Hegglin Anomalisi	MHA	155100	SD	Otozomal Dominant	MYH9	22q12-13
Sebastian Sendromu	SBS	605249	SD			
Fechtner Sendromu	FTNS	153640	S			
Epstein sendromu	EPTS	153650	S			
Gri Trombosit Sendromu	GPS	139090	SD	Otozomal Dominant		
Montreal trombosit Sendromu	MPS		SD	Otozomal Dominant		
Glikoforin A'nın İfadesi ile Oluşan Makrotrombositopeni			S	Otozomal Dominant		

### **2.2.1. Wiskott-Aldrich Sendromu (WAS) ve X'e Bağlı Trombositopeni (XLT)**

WAS ve XLT, X'e bağlı bozukluklar olup küçük trombosit ve trombositopeni ile karakterize edilirler. WAS az rastlanılan bir hastalıktır. Avrupa'da görölme sıklığı 250.000 de 1 dir. WAS ve XLT, X kromozomunun kısa kolunda bulunan 502 amino asitlik bir protein kodlayan gendeki mutasyonlardan kaynaklanır (Villa, Notarangelo et al. 1995).

### **2.2.2. Akut Miyeloid Lösemi Eğilimli Ailesel Trombosit Bozukluğu (FPD/AML)**

FPD/AML otozomal dominant bozukluk olup uzun süre kanamalı trombositopeni ve akut miyeloid lösemi eğilimiyle karakterize edilir (AML) (Dowton, Beardsley et al. 1985).

### **2.2.3. Amegakaryositik Trombositopeni**

Kalıtsal trombositopeninin bu grubu defektif megakaryositik farklılıklardan türetilerek üç form içermektedir. Bunlar konjenital amegakaryositik trombositopenia (CAMT), eksik radi'li trombositopeni ve radioulnar sinostozlu konjenital amegakaryositik trombositopenidir. (CTRUS) Bu bozuklukların moleküler temelleri, ya trombopoietin (TPO) sinyal yolundaki anormallikler ya da homeobox genlerindeki fonksiyon bozukluklarıyla ilişkilidir. Trombopoietin ve reseptörü c-mpl megakaryosit ve trombosit oluşum reaksiyonlarının tamamını doğrudan düzenlemektedir (Wendling 1999).

İn vivo çalışmalar, hayvanlarda TPO'nun önemli derecede trombosit sayısında artışa neden olduğunu TPO bakımından işlevsiz (knock-out) farelerde ağır trombositopeni ortaya çıktığını gösterdi (Gurney and de Sauvage 1996).

#### **2.2.4. Konjenital Amegakaryositik Trombositopeni (CAMT)**

CAMT otozomal resesif bir kemik iliği bozukluk sendromudur. Moleküler nedeni ifadedeki eksiklik ya da trombopoietin reseptörü *c-mpl*'nin fonksiyonudur. *c-mpl* geninde çerçeve kayması ya da anlamsız mutasyonların (nonsense) yanında yanlış anlam mutasyonları (missense) tanımlanmıştır (Ballmaier, Germeshausen et al. 2001).

#### **2.2.5. Radioulnar Sinostozlu Konjenital Amegakaryositik Trombositopeni (CTRUS)**

Konjenital amegakaryositik trombositopeni, aplastik anemi, proksimal radyal unlar sinostoz, klinodaktili (Parmakların kıvrık kalması), sindaktili (yapışık parmaklılık), hip displazi, sensoral işitme kaybı ile karakterize olan CTRUS otozomal dominant bir bozukluktur (Thompson, Woodruff et al. 2001).

Akraba olmayan hastalar, kesilmiş *Hoxa11* proteini ile sonuçlanan tek bir baz çifti delesyonu bakımından heterozigot bulunmuştur. *Hoxa11* geni, kemik morfolojisinde, hematopoietik farklılaşma ve çoğalmada merkezi düzenleyici proteinleri kodlayan homeobox genleri ailesindedir. Farelerde Hox genlerin temel etkilerinin iskelet sisteminin gelişimi üzerine olduğu yayınlanmıştır (Davis, Witte et al. 1995).

#### **2.2.6. Eksik Radius'lu Trombositopeni (TAR)**

TAR sendromu hipomegakaryositik trombositopeni ve bilateral radyal aplazi ile karakterize olan otozomal resesif bir bozukluktur. En yaygın amegakaryositik trombositopenidir (Balduini, Iolascon et al. 2002).

#### **2.2.7. Normal Boyuttaki Diğer Trombositopeniler**

Buradaki sorumlu gen *THC2* olup kromozom 10p12.1 de yer almaktadır (Savoia, Del Vecchio et al. 1999).

### **2.2.8. Bernard-Soulier Sendromu (BSS)**

Bernard-Soulier sendromu (BSS) dev trombosit, trombosit azlığı, uzun süreli kanama zamanı ile karakterize edilen bir otozomal resesif kanama bozukluğudur. Bernard ve Soulier tarafından 1948 'de tanımlanmıştır (Bernard and Soulier 1948). BSS, von Willebrand faktör için trombosit reseptörü olan glikoprotein (GP)Ib/IX/V kompleksindeki sayılabilir ya da ölçülebilir anormalliklerden dolayı oluşur (Lopez, Andrews et al. 1998). Trombosit membranındaki GPIb/IX/V kompleksinin eksikliği sonucunda trombosit hasar görmüş damar duvarına yapışamaz ve bu yüzden hasta kan kaybeder. Merkezi sitoplazmik domainde GPIb aktin çapraz bağlantılı protein filamin A ile ilişkilidir. Dolayısı ile GPIb/IX/V ve hücre iskeleti arasındaki defektli bağlantı dev trombositlerin moleküler nedenini öne sürer (Saito, Matsushita et al. 2005).

BSS klasik olarak resesif bir bozukluk olarak tanımlanmış olsa da literatür dikkatlice tarandığında bir beyaz ırka mensup soy ağacında hafif formdaki BSS'nin aktarımının otozomal dominant olduğu gösterilmiştir. Buna ek olarak GPIbα'nın heterozigot yanlış anlam mutasyonu hafif bir otozomal dominant makrotrombositopeni gösteren ailelerde saptanmıştır (Balduini, Iolascon et al. 2002).

### **2.2.9. Velocardiofacial Sendromu (VCFS)**

Hemizigot 22q11 delesyonu ile ilişkili konjenital bir bozukluktur. Yarı damak, kalp anormallikleri, tipik beniz ve öğrenme bozukluğu ile karakterizedir (Shprintzen, Goldberg et al. 1981).

### **2.2.10. Trombosit Tip ya da Yalancı von Willebrand Bozukluğu (PTvWD)**

PTvWD nadir bir otozomal dominant trombosit bozukluğudur. von Willebrand tip 2B bozukluklarının tümüyle benzer laboratuvar ve kliniksel özellikler gösteren bir kanama eğilimi ve makrotrombositopeni ile karakterize edilir (Miller, Cunningham et al. 1991).



### **2.2.11. İyi Huylu Akdeniz Makrotrombositopeni**

Literatür de tanımlanmış çok sayıda nedeni bilinmeyen otozomal dominant ve trombosit oluşumuna etkisi olmayan çok sayıda makrotrombositopeni bulunmaktadır. 1975 von Behrens trombosit sayısı ve ortalama trombosit hacmini (MVP) sağlıklı görünen İtalya ve Balkan yarımadasından 145 hasta incelemiştir. Bu hastaların çoğu nedeni bilinmeyen makrotrombositopeni bakımından etkilenmiş olup Kuzey Avrupa'daki kontrollerde gözlenmemiştir. Bu durum Akdeniz Makrotrombositopeni olarak adlandırılmıştır (Behrens 1975).

### **2.2.12. X'e Bağlı Trombositopeni ve Anemili ya da Anemisiz Diseritropoiez**

1977'de Thompson ve arkadaşları talasemili X'e bağlı trombositopeni gösteren bir aile tanımlamışlardır. Bu aile bireyleri, dalak büyümesi, nokta biçiminde deri kanamaları olan peteşi, trombositin fonksiyon bozukluğundan dolayı uzayan kanama süresi, kanda retikülosit çoğalması,  $\beta$ -talasemi benzeri dengesiz (hemo)globin zincir sentezi gibi bozukluklara sahiptiler (Thompson, Wood et al. 1977).

Bazı kadınlarda daha küçük defektler (retikülosit çoğalması, dengesiz globin sentezi) bulundu. Bu ailede transkripsiyon faktörünün DNA bağlanma bölgesine olan etkileşimini azaltan, Xp11-12 de lokalize *GATA-1* geninde bir R216Q mutasyonu tespit edilmiştir (Raskind, Niakan et al. 2000).

### **2.2.13. Paris- Trousseau Tip Trombositopeni (TCPT) ve Jacobsen Sendromu (JBS)**

Ets transkripsiyon faktör ailesi çok sayıda fizyolojik ve patolojik olayları içine almaktadır. Proto onkogen olan iki üyesi Fli-1 ve Ets-1, kan damarı oluşumunda ve kan oluşumunda ayrı ve/veya örtüşen fonksiyonlar sergilerler. Kromozom 11'in uzun kolunda yer alırlar. JBS ve TCPT'li hastalarda 11q23.3-11q24.2 delesyon kesim noktaları tipiktir ve iki makrotrombositopenik sendrom otozomal dominant olarak kalıtılır (Balduini, Iolascon et al. 2002).

#### **2.2.14. Gri trombosit sendromu (GPS)**

Nadir kalıtsal trombositopenidir. Trombositler büyük ve içeriği artırılmış  $\alpha$ -granüllerine sahiptir. Sorumlu gen bilinmemektedir (Raccuglia 1971). May-Grünwald-Giemsa (MGG) ile boyanan trombositler  $\alpha$ -granüllerindeki anormalliklerden dolayı gri görünür (Cramer, Vainchenker et al. 1985). Bu sendromda trombositlerde normalde  $\alpha$ -granüllerinde bulunan vWF, fibronektin, trombosit faktör 4 (PF 4), trombosit kökenli büyüme hormonu, trombospondin ve  $\beta$ -tromboglobulin gibi maddeler bulunmamaktadır (Levy-Toledano, Caen et al. 1981).

#### **2.2.15. Montreal Trombosit Sendromu (MPS)**

Bu sendromun ayırıcı özelliği in vitroda trombositlerin kendiliğinden toplanmasıdır. İlk kez 1963 yılında bir soy ağacında otozomal dominant olarak kalıtıldığı gösterilmiştir. Bulgularda trombosit sayısının çok düşük, büyüklüğünün ise artmış olduğu gözlenmiştir (Balduini, Iolascon et al. 2002).

#### **2.2.16. Glikoforin A'nın İfadesi ile Oluşan Makrotrombositopeni**

Glikoforin A, eritroid özgül proteindir ve ifadesinin, magakaryosit oluşumunu ve olgunlaşmamış trombosit salınımı birlikte etkileyebileceği öne sürülmektedir (Balduini, Iolascon et al. 2002).

#### **2.2.17. MYH9 İlişkili Bozuklar**

May-Hegglin anomalisi (MHA), Sebastian sendromu (SBS), Fechtner sendromu (FTNS) ve Epstein sendromu (EPTS) otozomal dominant dev trombosit hastalığı olup, işitme kaybı, katarakt, böbrek iltihabı (bunlar Alport belirtileri olup bozukluk tipine göre değişen kombinasyonlarının olup-olmamasına göre ayırım) ve parçalı çekirdek gösteren döhle benzeri cisimcikler gibi kliniksel ve laboratuvar bulguların farklı kombinasyonları ile birbirlerinden ayrılırlar (Seri, Pecci et al. 2003).

### 2.2.17.1. May-Hagglin anomalisi (MHA)

#### Kısa Tarihi

May-Hegglin anomalisi nadir bir otozomal dominant bozukluk olup, trombositopeni, dev trombosit, kendine özgü lökosit inklüzyon cisimcikleri ile karakterizedir. 1909 yılında Alman tıpcı Richard May ‐lökosit inklüzyonu‐ (Leukocyten einschlässe) adlı bir makale yayınladı. 24 yaşında bir bayan ayağındaki bilateral ödemden dolayı kendisine yönlendirilmişti. Fiziksel incelemeler ateş, dalak büyümesi ya da lenf bezi hastalığı olmadığını gösterdi ancak hasta hafif anemiye sahipti. May, kan yaymasında eosin-metilenblue ile boyanmış soluk mavi ikiden üçe ya da dörde kadar inklüzyon cisimlerini içeren çok sayıda lökosit (nötrofil, eozinofil, bazofil) gözlemlemişti. Daha sonra bu sitoplazmik inklüzyonların doğasını aydınlatmak için değişik boyama teknikleri uygulamıştı. Dolayısıyla her bir boyama metoduyla inklüzyon cisimciklerinin nasıl boyandığı hakkında detaylı bilgi vermiş olan May, kan hücrelerinin morfolojisine yoğun bir ilgi göstererek değişik boyama teknikleri geliştirmişti. May-Grünwald boyasını icat etmiştir. May, incelediği diğer 100 hastada benzer inklüzyon cisimciklerini bulamamıştı. Çok sayıda trombosit bulunmasına karşın nadir olarak dev trombositler not edilmişti. Birkaç hafta içinde hastanın semptomları geçmiş ve hasta çalışabilir duruma gelmişti. Hastanın kan tablosu 4 aylık bir gözlemlerde değişmemişti. Aile çalışmaları tamamlanmamıştı. Hasta şehirden ayrılmıştı takip etmek olanaksız olmuştu. May, inklüzyon cisimciklerinin parazit ya da fagositozdan dolayı oluşabileceği tahmininde bulunmuştur. Bu bozukluğu ilk olarak açıkladığı ve karakteristik lökosit inklüzyonlarını ile dev trombositleri tanımladığı için hastalık May’ e atfedilmiştir (Saito and Kunishima 2008).

Daha sonraları İsviçre’nin ünlü tıpcısı Robert Hegglin yaptığı araştırmada Döhle benzeri cisimcikleri ve dev trombositleri tanımlamıştır. Hegglin, bozukluk hakkındaki kendi özet yayında May’ in makalesinde belirtmediği üç yeni noktayı açıkça not etmiştir. Birincisi, kan hücrelerinin iki farklı neslinde (lökositler ve trombositlerde) anormalliklerin varlığını vurgulamıştır. İkincisi, trombositopeniyi tanımlamıştır. Üçüncüsü ise bozukluğun ailesel doğasını açıklamıştır ve bozukluğun tek bir gen mutasyonu ile dominant olarak aktarıldığı yorumunu yapmıştır. Hegglin, May’in 1909 yılındaki makalesinden söz etmemiştir ve bu bozukluğun kan hücrelerinin iki soyunda da sitoplazmik olgunlaşmanın durdurulması ile oluşabileceği tahmininde bulunmuştur (Saito and Kunishima 2008).

Bozukluğun nedeni bağlantı analizleriyle kromozom 22q12.3-22q13.2 de haritalanıncaya kadar bilinmiyordu. Bozukluktan sorumlu olan gen pozisyonel aday gen yaklaşımı ile belirlendi. Buna göre sorumlu gen büyük bir sitoplazmik protein olan kas dışı miyozin ağır zincir tip IIA' yı (NMMHC-IIA) kodlayan *MYH9* olarak belirlendi (Saito and Kunishima 2008).

Bugün May-Hagglin anomalisindeki lökosit inklüzyonlarının anormal kas dışı miyozin tip IIA'nın (NMMHCA) kümelenmesiyle oluştuğu kabul edilmektedir. Anormal NMMHCA kümelenir ve nötrofil sitoplazmasında birikir ve bu anormal NMMHCA'nın hücre altı lokalizasyonu her *MYH9* mutasyonlu bireyin nötrofilinde bulunmaktadır (Saito and Kunishima 2008).

*MYH9* bozukluklarındaki NMMHCA'nın nötrofildeki lokalizasyon düzeni flörsan işaretli NMMHCA granüllerinin sayısı, şekli ve büyüklüğüne göre üç grup içinde sınıflandırılabilir: tip I, II ve III. Tip I de NMMHCA bir ya da iki büyük ve yoğun lekeli sitoplazmik odak (foci) biçiminde. Tip II nötrofiller çok sayıda daireselden ovale sitoplazmik leke içermektedir. Tip III ya da benekli leke, Wright ya da May-Grünwald-Giemsa (MGG) boyalı inklüzyon cisimciklerinin hiç tanımlanmadığı, izole edilmiş makrotrombositopeni ve Epstein sendromlu (EPS) hastalarda saptandı (Kunishima, Matsushita et al. 2003).

#### **2.2.17.2. MYH9 İlişkili Hastalıkların Ayırımında Kullanılan Alport Sendromu:**

İlk kez Dr. Arthur Cecil Alport tarafından 1927 yılında tanımlanmıştır (Alport 1927) . Bazal membran tip IV kollajen yapımında bozukluk ile karakterizedirler. Erken çocukluk döneminde hematüri atakları ile ortaya çıkan ve özellikle erkeklerde son dönem böbrek yetmezliğine yol açan, genetik bir hastalıktır. İşitme kaybı ve göz lezyonları da belirtileri arasında yer alır(Grunfeld, Grateau et al. 1987).

### **2.2.17.3. Sebastian Sendromu (SBS), Fechtner Sendromu (FTNS) ve Epstein Sendromu (EPTS)**

1990 yılında Greinacher ve arkadaşları Sebastian sendromunu, May-Hegglin anomalili, Chediak-Higashi sendromlu ve Döhle cisimciklerinin bulunduğu sepsisli hastalardan farklı olarak nötrofil inklüzyonlu otozomal dominant makrotrombositopeninin yeni bir varyantı olarak tanımlamıştır. Çok çekirdekli lökositlerdeki inklüzyonlar Fechtner sendromlu hastalarda bulunanlarla benzerdir (OMIM 605249). Epstein sendromu da otozomal dominant bir bozukluk olup, makrotrombositopeni, böbrek iltihabı, sensorinöral işitme kaybı ile karakterize edilir (Seri, Savino et al. 2002).

Fechtner sendromu, Alport sendromunun bir varyantı olarak rapor edilmiştir. Alport sendromu ile böbrek iltihabı, sensorinöral işitme kaybı ve göz anormalliklerinin üçlü grubunu paylaşmaktadır ve makrotrombositopeni ve Döhle benzeri cisimcikler denen çok çekirdekli lökosit inklüzyonlarının ek özelliklerini sunmaktadır. Epstein sendromu, katarakt ve granülositte Döhle benzeri cisimciklerin olmaması ile Fechtner sendromundan ayrılır (Seri, Pecci et al. 2003).

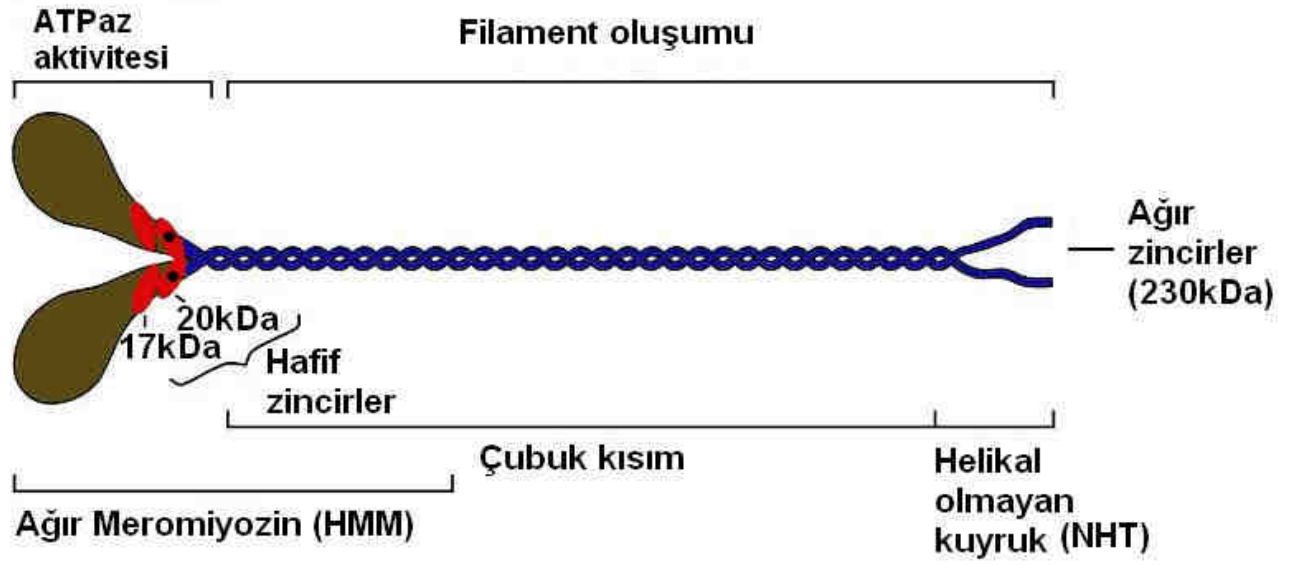
Fechtner sendromu gibi May-Hegglin anomalisi ve Sebastian sendromunun her ikisi de trombosit azlığı, dev trombosit ve lökosit inklüzyonu ile karakterizedir. Ultrastrüktürel çalışmalara dayanılarak bu iki bozukluk birbirinden ayrılmıştır. May-Hegglin anomalisinde Döhle benzeri cisimcikler, paralel mikrofilamentler boyunca yönelmiş ribozom kümelerini içeren şekilsiz bir sitoplazmadan oluşurken Sebastian sendromunda yüksek derecede dağılmış filamentlerden ve çok az sayıda ribozomdan oluşmaktadır (Seri, Pecci et al. 2003).

**Çizelge 2.4:** *MYH9* genindeki mutasyon sonucu oluşan 4 otozomal dominant makrotrombositopeninin kliniksel ve laboratuvar özellikleri.

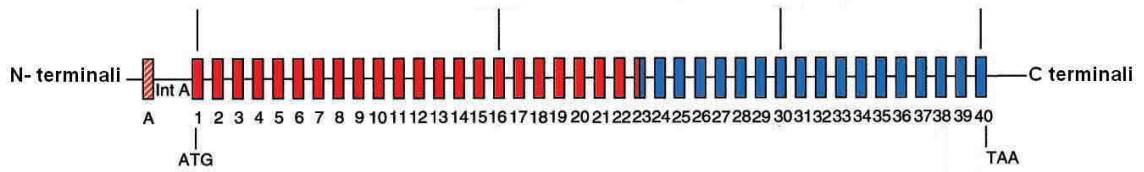
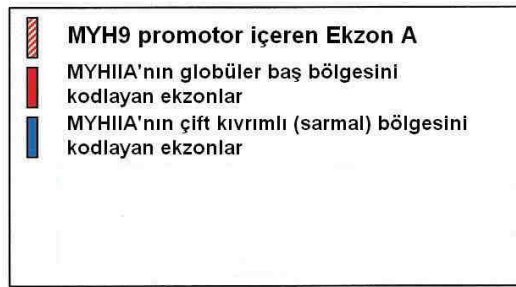
Kliniksel özellik	May-Hegglin Anomalisi	Sebastian Sendromu	Fechtner sendromu	Epstein Sendromu
Makrotrombositopeni	Var	Var	Var	Var
Lökosit İnklüzyonu (Döhle benzeri cisimcikler)	Var (Paralel filamentler )	Var	Var	Yok
İşitme Sorunu	Yok	Yok	Var	Var
Katarakt	Yok	Yok	Var	Yok
Böbrek İltihabı	Yok	Yok	Var	Var

### 2.3. KAS DIŞI MİYOZİN II'NİN YAPISI ve FONKSİYONU (Non Muscle Myosin II, NM II, NMHC II, NMMHC II)

Miyozinler, filogenetik olarak 17 sınıfta gruplandırılmış olan proteinlerin büyük bir üst familyasından meydana gelmektedir. 2. sınıf, sarkomerik miyozinleri, düz kas miyozinleri ve kas dışı miyozinlerini içermektedir (Hodge and Cope 2000). Memelilerde, kas dışı miyozin ağır zincirin (NMHC) üç farklı izoformu bulunmaktadır. Bunlar NMHC-IIA, NMHC-IIB ve NMHC-IIC olup sırasıyla *MYH9*, *MYH10* ve *MYH14* genleri tarafından şifrelenmektedir (Golomb, Ma et al. 2004).



Şekil 2.5. Kas dışı miyozin II'nin genel yapısı



Şekil 2.6. Kas dışı miyozin II'nin genomik yapısı ve mutasyon spektrumu.

Her kas dışı miyozin ağır zinciri (230 kDa) bir homodimer ve bağlı iki çift hafif zincirden oluşur. Çiftlerden biri genellikle düzenleyici hafif zincir (20kDa) olarak diğeri ise temel hafif zincir (17kDa) olarak adlandırılır (Golomb, Ma et al. 2004).

Kas dışı miyozin II molekülü, amino terminal ucunda globüler baş bölgesi ve helikal olmayan karboksi terminal ucu ile sonlanan çift kıvrımlı koldan oluşur. Miyozin molekülü aktine bağlanarak MgATP hidrolizleyen ve filament oluşumundan sorumlu çubuk bölgesine bağlanabilen iki amino terminal globüler motor bölge içermesi nedeniyle iki işlevlidir (Verkhovsky, Svitkina et al. 1995).

İki globüler baş, çift sarmallı  $\alpha$ -helikal olarak düzenlenmiş bir birinin etrafında sarılmış çubuk fragmentini takip eder. Çubuk kısımdaki amino asit sekansı, yan yana iki  $\alpha$ -heliksin arasında oluşan hidrofobik etkileşimler ile tekrar eden yedi rezidü ile karakterizedir. Straussman ve arkadaşları bu yan yana bölgelerden birindeki mutasyonu tanımlayarak Glu ya da Leu değil de Asp'nin mutasyon olan bölgeyle ilişkili çift sarmallı çubukta nasıl esnek dolaşma yaptığını göstermiştir (Straussman, Ben-Ya'acov et al. 2007).

Helikal olmayan kuyruk bölgesi her üç kas dışı miyozin izoformunda da çift sarmallı çubuk kısmını takip eder. Bu bölge üç izoform arasında değişik amino asit sekansı göstermesinden dolayı ilgi çekmektedir. Dolayısıyla da kas dışı miyozin izoformları arasında ayırt edilebilen özgül antikorlar üretmek için antijen üzerinde bulunan antikorun bağlandığı eşsiz bölgeler (epitop) sağlar. Helikal olmayan kuyruk bölgesi aynı zamanda protein kinaz C (PKC) ve kazein kinaz II tarafından kas dışı miyozin ağır zincir fosforilasyonu için çok sayıda bölge içerir. Kas dışı miyozin II'nin aktivitesini aktifleştiren kritik basamak 20kDa miyozin hafif zincir (MLC<sub>20</sub>) üzerindeki Ser<sup>19</sup> fosforilasyonudur. Bu ilk olarak saflaştırılmış trombosit kas dışı miyozin II kullanılarak NM II-A için in vitro da tanımlanmıştır (Adelstein and Conti 1975).

Ser<sup>19</sup> fosforilasyonu aktin aktive edilmiş MgATPaz aktivitesi, filament toplanması ve in vitroda hareket için gereklidir. İlave Th<sup>18</sup> fosforilasyonu, MgATPaz aktivitesinde ve filament toplanmasında artışla sonuçlanırken in vitroda hareketlilikte bir değişiklik olmamaktadır (Ikebe, Koretz et al. 1988).



Miyozin aktivasyonuna neden olan çok sayıda kinaz ile MLC<sub>20</sub> üzerindeki Ser<sup>19</sup> fosforile edilebilir. Bunlar içinde en iyi tanımlanmış olan Ca<sup>+2</sup>-kalmodulin bağımlı miyozin hafif zincir kinaz (MLCK) ve Rho aktive edici kinazdır (Matsumura 2005; Zhao and Manser 2005).

Rho kinaz miyozin fosfatazın miyozin bağlayıcı alt birimini içeren çok sayıda substratı fosforile edebilsede MLCK, MLC<sub>20</sub> için özgül görünmektedir (Kimura, Ito et al. 1996).

## **2.4. MOLEKÜLER TEKNİKLER**

### **2.4.1. DNA Ekstraksiyonu**

DNA'lar, kan örneklerinden, fenol / kloroform yöntemiyle izole edilmiş ve etanol ile muamele edilerek çöktürülmüştür (Sambrook 1989).

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

PCR, hedef DNA dizilerinin in-vitro koşullarda çoğaltılmasıdır. Bu yöntem bir polimeraz enzimiyle gerçekleştirildiği için polimeraz zincir reaksiyonu adını almaktadır. İlk kez 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiştir (Akar 1999).

PCR yöntemi, hızlı ve az miktarda DNA örneği ile çalışmaya olanak sağladığı için moleküler biyolojide, adli tıpta, evrim çalışmalarında ve pek çok alanda en önemli tekniklerden biri haline gelmiştir. Yöntemin temeli, çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesinin iki ucunu özgül olarak tanıyıp bağlanabilen sentetik oligonükleotit primerler kullanılarak istenilen bölgenin çoğaltılması esasına dayanmaktadır (Akar 1999).

PCR reaksiyonu temel olarak üç aşamadan oluşmaktadır. Bunlar, DNA'nın yüksek ısı ile birbirinden ayrılması (denatürasyon), sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon), son olarak zincirin uzaması (polimerizasyon)'dur. Bu üç aşamaya bir PCR döngüsü denir ve çoğaltılacak ürün miktarı bu döngünün tekrar sayısına bağlıdır. Bu döngü sayısı genellikle 30-40'dır. Bir PCR işleminde "n" döngü sonunda kalıp

DNA'nın istenilen bir bölgesi yaklaşık  $2^n$  kez çoğaltılmış olur. İlk adımda, çift zincirli DNA 90-95°C'de yaklaşık 5–10 dk süreyle tek zincirli hale gelinceye kadar ısıtılır. Ardından sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülür ve DNA'nın uç kısımlarına komplementer olan oligonükleotidlerin tek zincirli DNA'ya özgül olarak bağlanması sağlanır. Bu oligonükleotidler kalıp DNA'nın sentezi için başlangıç noktası olarak görev yaparlar. DNA sentezi 70-75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Öner 2002).

PCR reaksiyonu için kullanılan DNA 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).

PCR' dan iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlı olarak değişir. Taq DNA polimerazın iyi çalışabilmesi için en etkin olduğu pH'ın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerdendir. Bu amaçla reaksiyonlarda son konsantrasyon 10Mm olacak şekilde Tris.HCl pH:8.4 tampon olarak kullanılmaktadır. PCR karışımında 50-60mM düzeyinde potasyum ve 100 µg/ml jelatin bulunmasının çoğalmayı önemli miktarda artırdığı saptanmıştır. Magnezyum (Mg) +2 değerlikli olup DNA polimeraz'ın çalışmasını sağlayan en önemli faktördür. Sahip olduğu pozitif yük sayesinde negatif yüklü DNA molekülleri arasına girerek oligonükleotidlerin DNA moleküllerine bağlanmasını kolaylaştırır. DNA, dNTP ve proteinlerin tümü magnezyum(Mg) iyonlarına bağlandığı için her PCR reaksiyonunda Mg konsantrasyonu deneysel olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg miktarı Taq DNA polimeraz enziminin spesifikliğini azaltırken, az miktarda olması enzim aktivitesini düşürür ve enzim inaktivasyonuna yol açar (Akar 1999).

PCR reaksiyonunda diğer bir önemli faktör deoksiniükleotid trifosfatlar (dNTP)dır ve bunlar son konsantrasyonları 2 mM olacak şekilde kullanılmalıdır. Reaksiyon sırasında ortamda dTTP, dCTP, dATP, dGTP'nin bulunması gereklidir. Kullanılan her bir deoksiniükleotid trifosfatın (dNTP) konsantrasyonunun eşit olması doğru ürün elde edilmesi açısından önemlidir. dNTP'nin az miktarda kullanımı oluşan PCR ürününün miktarının azalmasına; fazla miktarda kullanımı ise yanlış oligonükleotid eşleşmesi sonucu hedef DNA dışındaki bölgelerin çoğalmasına neden olur (Akar 1999).

PCR spesifliğinde oligonükleotidlerin uzunluğu önemli yer tutar. Optimal uzunluk yaklaşık 15-30 nükleotid olmalıdır. Oligoprimlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca  $T_m: 4(GC)+2(AT)$  formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotidlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlıdır ve hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifliğini arttırmaktadır. Kullanılan oligonükleotidlerin nükleotid içerikleri rastgele ancak orantılı olmalıdır. Tekrarlayan diziler içermemeli, guanin sitozin oranı % 50'i geçmemelidir. Oligonükleotid dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan oligonükleotid çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmamalıdır; aksi takdirde oligonükleotidin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak ya da uygunluk gösteren bölgeler birbirine bağlanarak PCR'ın olumsuz etkilenmesine neden olur (Akar 1999).

#### **2.4.3. Tek İplikçikli Konformasyon Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polymorphism) (SSCP)**

Mutasyon taraması için birçok moleküler teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi (SSCP) dir. Bu yöntem ile nükleotid dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşmuş tek baz değişikliklerini belirlemek mümkündür (Akar 1999).

Tek zincirli DNA parçacığı bazı koşullarda nükleotid dizisine bağlı olarak belirli bir şekil alır. Bir baz değişimi DNA parçacığının konformasyonunun ve dolayısı ile elektroforetik hareket yeteneğinin değişmesine neden olur (Öner 2002).

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, elektroforez jeline yüklenir. Poliakrilamid jel elektroforezinde göç hızlarına bakılarak sonuçlar değerlendirilir. Tek iplikli DNA'nın farklı bantlar göstermesi; mutasyonu işaret etmektedir (Akar 1999).

SSCP tekniği aynı anda birçok örnekte düşük maliyette mutasyon taramasını sağladığından moleküler genetik çalışmalarına hız kazandırmaktadır. Yöntemden iyi şekilde sonuç alabilmek için, kullanılan PCR ürününün 200 bp civarında olması gerekmektedir (Akar 1999).

Teorik olarak SSCP ile 200 bç lik bir dizide mutasyon belirleme oranı % 90; 400 bç 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).

#### **2.4.4. DNA Dizi Analizi**

DNA dizi analizi DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. Nükleotid dizilerinin saptanmasında Maxam-Gilbert kimyasal degradasyon yöntemi ve Sanger dideoksi enzimatik yöntemi olmak üzere iki temel teknik geliştirilmiştir. Her iki yöntemde dizi analizi yapılacak DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezi olmak üzere üç ana aşaması bulunmaktadır (Öner 2002).

Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemde ise, belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleştirilmektedir (Öner 2002).

Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır. Sentez reaksiyonu DNA polimeraz ile kataliz edilir. Tepkime karışımında; dizisi belirlenecek DNA örneği, polimeraz enzimi, oligonükleotid, dört farklı dNTP, dört farklı ddNTP ile enzimin çalışması için tampon görevi görecek olan maddeler bulunur. PCR'da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir [88]. 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; Öner 2002).

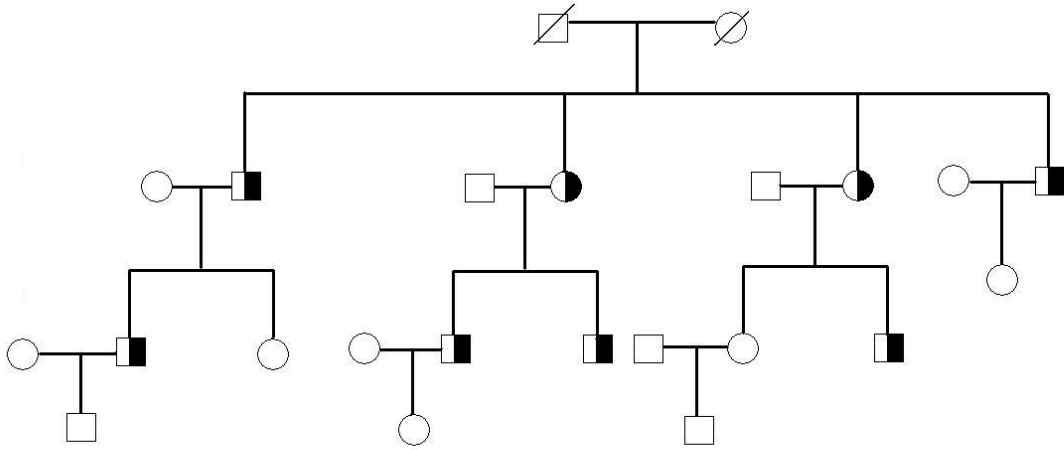
Günümüzde dizi analizi için otomatik DNA dizi analiz cihazları, radyoaktif izotoplar yerine de flöresan boyalar kullanılmaktadır. Sistem, üzerindeki lazer ışığı ile farklı özellikteki flöresan boyaları algılar, her nükleotid için ayrı renkte bir pik oluşturarak nükleotid dizisini belirler (Öner 2002).

### 3. MATERİYAL VE YÖNTEMLER

#### 3.1.HASTA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı; Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmada Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Kliniği Hematoloji laboratuvarına verilen tam kan örnekleri ve periferik yaymalar değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede:

1-Tam kan sayımında MPV değeri >12 fl bulunun olgular,  
2-MPV değerinin normal olmasına karşın periferik yaymada ağırlıklı olarak iri trombositlerin görüldüğü olgular çalışmaya dahil edildi. Çalışmanın yapıldığı dönemde belirtilen kriterlere uygun 122 örnek tespit edildi ve değerlendirmeye alındı. Yaş ortalaması 13.6 olan olgularda cinsiyetler arasında farklılık bulunmamaktaydı. Olgulardan 2, 2 ve 1 tanesi aynı ailelerden gelmekte olup hem bu olgularda hem de diğer olgularda bilinen sendromik bir hastalık bulunmamaktaydı. Çalışmaya katılan tüm hastalardan katıldıklarına dair onam formu alınmıştır. Şekil 3.1 de çalışılan ailenin soy ağacı gösterilmiştir.



Şekil 3.1: Çalışılan ailenin soy ağacı.

## 3.2.YÖNTEM

Yaptığımız çalışmada dev trombositli 122 hasta DNA'sı tarandı. Taramalarda SSCP tekniği kullanıldı. Üç aileden çalışılan olguların DNA'sı, doğrudan DNA dizi analizi yapılarak incelenmiştir.

### 3.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan 1 ml 0.5M Etilendiamintetraasetikasil (EDTA) (Sigma, ABD) polietilen tüp içerisine 9 ml kan örneği alınır. Alınan kan örneği 50 ml.lik falkon tüp içerisinde 25 ml RBC( Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya) 10mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)]eklenir, çalkalanarak 20 dk buzda bekletilir. Soğutmalı santrifüjde (Hettich, Almanya) +4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek, çökelek üzerine tekrar 25 ml RBC Lizis solüsyonu eklenir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000 µL RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800 µL'si ependorf tüpüne alınarak -20°C'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200 µL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/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 [10 mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8; 100 mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1 mM pH: 8.0 EDTA (AppliChem, Almanya) eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Memmert, Almanya) bekletilir.

İkinci gün tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform(Merck, Almanya), izoamil alkol (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 eppendorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar % 95'lik alkol (Türkiye) eklenir. Eppendorf 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 500 µL % 70’lik alkol eklenir ve +4°C 4000 rpm’de 20dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında alkol dökülür ve tüpler kurutma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüplerin 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 saklanmıştır.

### 3.2.2. *MYH9* Geni Üzerindeki Uygulamalar

*MYH9* geni üzerinde yaptığımız incelemelerde kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu için yapılan PCR karışımı içeriği 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8.3); 15 mM MgCl<sub>2</sub> olarak ayarlanır. Bazı tamponlarda BSA (Bovine Serum Albumine), gliserol, betain, DMSO (Dimetil sülfoksit) de bulunabilir. dNTP (Fermentas, Litvanya) karışımından 10 mM stok hazırlanır. Primerler (ABD) liyofilize olarak alınır, 100 µM olacak şekilde stok hazırlanır.

### 3.2.3. *MYH9* Geni İçin PCR Koşulları

*MYH9* geninde ekzon 1, ekzon 16, ekzon 30 ve ekzon 40’ta mutasyon taraması yaptık. Ekzon 1 ve ekzon 16 ATP hidrolizinin olduğu aktinin bağlandığı miyozin baş bölgesinde, ekzon 30 ve ekzon 40 ise filament oluşumundan sorumlu miyozinin çubuk kısmında bulunmasından dolayı seçilmiştir. Bu ekzonlar için uygun primerler daha önce yayınlanmış olan bir makaleden alınmıştır\*.

**Çizelge 3.1:** Primerler. \*Buradaki primerler daha önce kullanılmıştır (Dong, Li et al. 2005).

Ekzon	5’primer	3’primer	Uzunluk (bç)	Primerin bağlanma sıcaklığı
1*	tgccaagaagctggtatgg	taacgctccttgagggttg	234	55.9 °C
16*	tgttctaggcatgttctaggca	ttctacatggatggaggacg	295	55.9 °C
30*	ggaaactgctgaggaggtga	agaggaaatgcaaaggatgg	242	55.9 °C
40*	tgcttcttctggtgggag	acagcagtccaagaaggtg	353	55.9 °C



Polimeraz zincir reaksiyon koşulları ise şu şekildedir: 95 °C’ de 5 dk, 35 döğü ile 94 °C de 0,5 dk, 55,9 °C 0,5 dk ve 72 °C 0,5 dk tekrarlanır. Son aşamada 4 °C de 5 dk bekletilir. PCR ürünleri % 2’lik agaroz jele 10 µl yüklenmiştir.

#### Ekzon 1

TGCCAAGAAGCTGGTATGGGTGCCTTCCGACAAGAGTGGCTTTGAGCCAGCCA  
GCCTCAAGGAGGAGGTGGGCGAAGAGGCCATCGTGGAGCTGGTGGAGAATGG  
GAAGAAGGTGAAGGTGAACAAGGATGACATCCAGAAGATGAACCCGCCCAAG  
TTCTCCAAGGTGGAGGACATGGCAGAGCTCACGTGCCTCAACGAAGCCTCGGT  
GCTG CACAACCTCAAGGAGCGTTA

**Dizi 3.1:** Ekzon 1 için için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.

#### Ekzon 16

TGTTCTAGGCACGGAAGTGAGACCGCATGCATGTGTTTTCTTCTCCAGGCCGGC  
AAGCTGGACCCGCATCTCGTGCTGGACCAGCTGCGCTGCAACGGTGTTCGA  
GGGCATCCGTATCTGCCGCCAGGGCTTCCCAACAGGGTGGTCTTCCAGGAGT  
TTCGGCAGAGGTGAGCCAGGGCCCGGAGCCCGCTTCTCCTGGGCCCTGCTGTG  
CGTGCAAGTCCCAGAGGTGGGCTGCTGCTCCCTGGCAGGATCCTGTCGTG  
AGGGAGCGA CGTCCTCCATCCATGTAGAA

**Dizi 3.2:** Ekzon 16 için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.

#### Ekzon 30

GGAAACTGCTGAGGAGGTGAAGAGGAAGCTCCAGAAGGACCTGGAGGGCCTG  
AGCCAGCGGCACGAGGAGAAGGTGGCCGCCTACGACAAGCTGGAGAAGACCA  
AGACGCGGCTGCAGCAGGAGCTGGACGACCTGCTGGTGGACCTGGACCACCA  
GCGCCAGAGCGGTGCAACCTGGAGAAGAAGCAGAAGAAGTTTGACCAGGTG  
TGTGGCCGTTGGCC CCATCCTTTGCATTTCTCT

**Dizi 3.3:** Ekzon 30 için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.

#### Ekzon 40

TGCTTCTTTCTGGTGGGAGCAGCCAGGCACCTGGTTTCCCTCTCGAATTCATT  
TGAGATGTGTGGGCTGTGCTGTGGCCGCCCTGGCCTGGCCGGGCCCCTGAC  
CCTCTGCTTCTACCTCTGCCCCAGGCGCGGGGACCTGCCGTTTGTCTGCCCC  
GCCGAATGGCCCGAAAGGCGCCGGGGATGGCTCCGACGAAGAGGTAGATGG  
CAAAGCGGATGGGGCTGAGGCCAAACCTGCCGAATAAGCCTCTTCTCTCTGAG  
CCTGAGATGGATGGACAGACAGACACCACAGCCTCCCTTCCAGACCCCGCA  
GCACGCCTCTCCC CACCTTCTTGGGACTGCTGT

**Dizi 3.4:** Ekzon 40 için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.

### 3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Sigma, ABD), kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Bizim çalışmamızda PCR ürünlerini % 2'lik agaroz jelde değerlendirdik. % 2'lik jel için 3 g agaroz tartılıp TAE 1X (Tris-HCl Asetik asit, EDTA) ile 150 ml'e tamamlanır. TAE 1X solüsyonu TAE 50X solüsyonunun 1/5 oranında distile su ile seyreltilmesiyle hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromit (Sigma, ABD)'in % 5'lik stok solüsyonundan 5 µl ilave edilir. İyi karıştırıldıktan sonra önceden uygun taraklar konularak hazırlanmış olan jel tabağına (Thermo Midicell Primo) dökülür. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklenir. Jelin donmasından sonra jel tabağı ile birlikte elektroforez tankına yerleştirilir. Elektroforez tankı TAE 1X solüsyonu ile jelin üstü kapanacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 10 µl alınıp, 3 µl Brom-Fenol Mavis (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılarak jele yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (QX174 DNA Hae III BioLabs, ABD) PCR ürünleri ile birlikte jele 2 µl kadar yüklenir. 80 V akımda 25–30 dk yürütülür. Ultraviyole ışık (Spectroline, ABD) altında incelenir ve fotoğraflanır.

### 3.2.5. SSCP Jeli İçin Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

% 7 lik poliakrilamid jelin hazırlanması: Bu jelin hazırlanmasında % 40 lık 49:1 oranındaki akrilamid/ bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bunun için 196 g akrilamid (Merck, Almanya) ve 4 gr N,N'-metilen-bis-akrilamid (Sigma, Almanya) 200 ml distile su ile 37°C'de ısıtılarak çözündürülür ve hacim distile su ile 1000ml'ye tamamlanmıştır.

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu, 54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5 g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20 ml 0,5 M pH: 8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 ml hacme tamamlanarak yapılmıştır.

Jelin polimerleşmesi için kullanılan % 10'luk Amonyum Persülfat; 0.3 g Amonyum Persülfat(AppliChem, Almanya) distile su ile 3 ml'lik hacme tamamlanarak hazırlanmıştır.

Akrilamid monomerlerinin polimerleşme reaksiyonunu katalizleyen TEMED (Tetra Etil Metilen deamin) (AppliChem, Almanya) ise hazır olarak bulunur.

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

Jelin polimerlesmesinden ve tarakların çıkarılmasından sonra camlar vertikal jel elektrofezine yerleştirilerek üzeri TBE 1X solüsyonuyla doldurulur. PCR ürünlerine spesifikliğı arttırmak amacıyla belli bir oranda denatüre edici yükleme boyası eklenmiştir. Kullanılan yükleme boyası toplam hacminde % 95 formamid, 20mM EDTA, % 0,05 Xyelene Cyanol, % 0,05 Brom-fenol mavisini içermektedir. 40 µl PCR ürünlerine 8 µl yükleme boyası eklenerek 99 °C'de 8 dk denatüre edilir.

Örneklere 10 µl kuyucuklara yüklenerek 130 V da baz çifti uzunluklarına göre 15–18 saat süreyle +4°C de akıma tabi tutulur. Bantlar, gümüş boyama tekniğiyle boyanarak görünür hale getirilir.

### **3.2.6. SSCP Jeli İçin Gümüş Boyama**

Gümüş boyama için üç farklı solüsyon kullanılmaktadır. Bunlardan birincisi % 1'lik gümüş nitrat çözeltisidir. 5 g gümüş nitrat (AgNO<sub>3</sub>) (AppliChem, Almanya) tartılıp distile su ile 500 ml' ye tamamlanır. İkinci çözelti % 15 lik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisidir. 150 g katı sodyum hidroksit distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanır. Son solüsyon ise % 7,5'lik Sodyum B 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 jel, stok solüsyonundan distile su ile 9:1 oranında seyreltilerek hazırlanan % 0,1'lik gümüş nitrat solüsyonu ile 5 dk muamele edilir. Daha sonra % 1,5'lik sodyum hidroksit solüsyonuna formaldehit eklenip gümüş solüsyonunu aşamasını takiben jelle muamele edilir.

Jel % 0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonu içinde birkaç dakika bırakılarak boyama işlemi sonlandırılır. Böylelikle jeller görünür hale getirilerek bant farklılığı olan örnekler belirlenir.

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

*MYH9* geni için belirlenen bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu ile taranıp SSCP (single strand conformation polymorphism) tekniği ile farklı bant görüntüsü veren DNA'lar belirlendikten sonra bu DNA'lardan tekrar PCR yapıldı ve PCR ürünleri PCR pürifikasyon kiti (Agencourt, Beckman Coulter, USA) kullanılarak temizlendi. Mıknatıs özelliğindeki magnet üzerine yerleştirilen plate'e 50 µl pcr ürünü konuldu. Üzerine 1.8 katı kadar (90 µl) agencourt clean solüsyonundan eklendi. 3–4 dk beklenerek DNA'ların mıknatıslı alana yapışması sağlandı. Üst kısımda yer alan supernatant atıldı ve 200 µl % 70 lik etanol eklendi. 30 sn. beklendi. Süpernatant pipetle uzaklaştırıldı. Bu işlem iki kez tekrar edildi. Oda sıcaklığında örnekler 10–15 dk. kurumaya bırakıldı. Kurutma işleminden sonra 40 µl deiyonize su ile sulandırılarak DNA'nın çözünmesi sağlandı. Daha sonra her bir ekzon için temizlendiği düşünülen DNA'lar % 2'lik agaroz jelde incelendi.

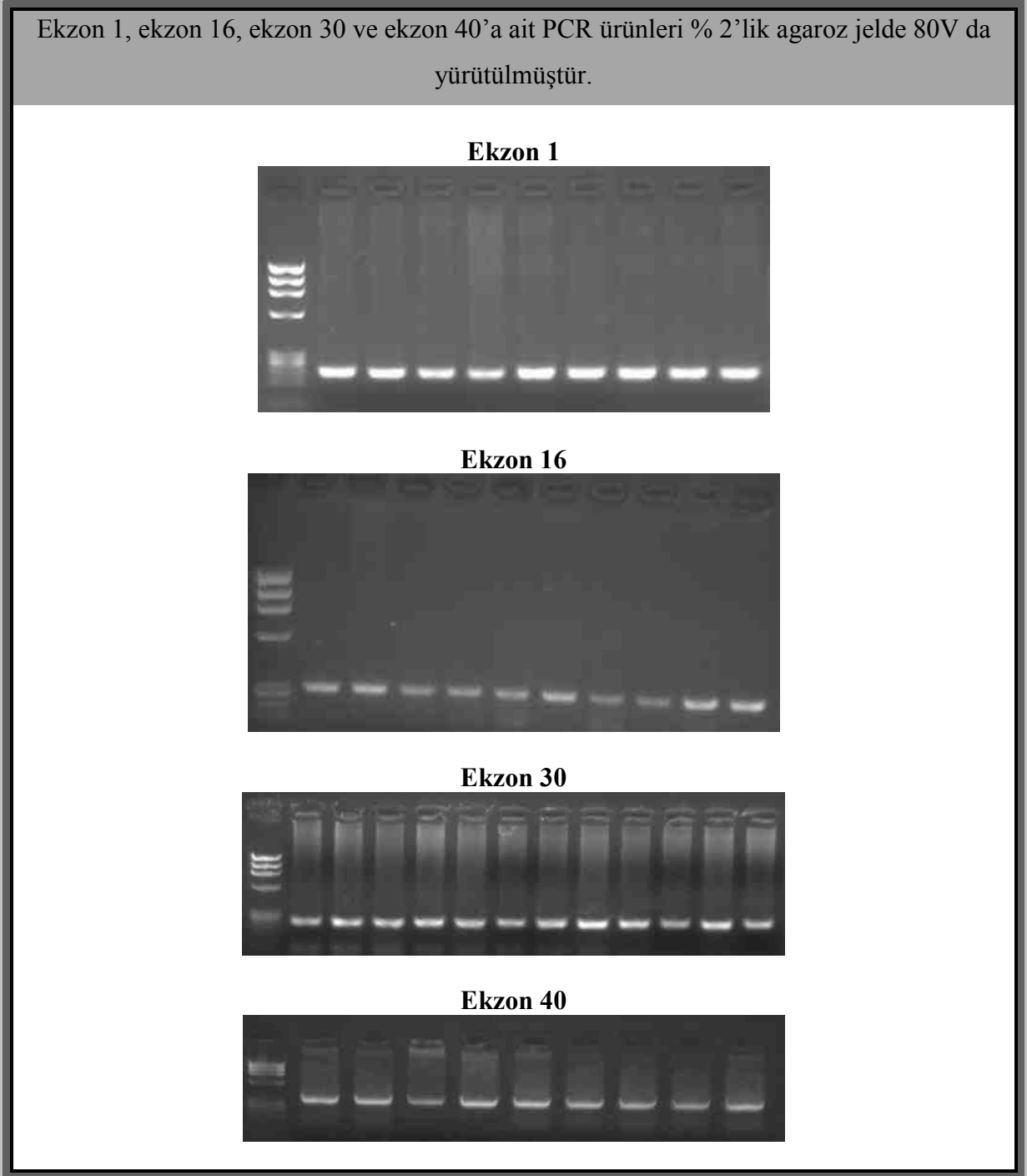
### **3.2.8. DNA Dizi Analizi**

Her bir ekzon için birbirinden farkları tespit edilen DNA örneklerinin nükleotit dizilerinin belirlenmesi için kapiller sistem otomatik sekans cihazı (CEQ800XL, Beckman Coulter, USA) kullanıldı. Bunun için 0,2 ml'lik, 96 tane kuyucuk içeren plaklar kullanılıp her bir kuyucuğa 12 µl premiks (2 µl 10X reaksiyon tamponu, 1µl dNTP karışımı, 2µl ddUTP, 2µl ddGTP, 2µl ddCTP, 2µl ddATP, 1µl polimeraz enzimi), 5µl temizlenmiş PCR ürünü, 20 pmol primer konularak “cycle sequencing” işlemi gerçekleştirildi. Bunun için plaklar, PCR cihazına (Biometra, Almanya) yerleştirilip 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, 30 siklus 96°C'de 20 s denatürasyon, 50°C'de 20 s yapışma ve 60°C'de 4 dk'lık uzama evresi gerçekleştirildi. “Cycle sequencing” sonlandıktan hemen sonra reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğun dibine 5 µl durdurma solüsyonu (1,5 M C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>Na, 50 mM EDTA, 20 mg/ml'lik Glikojen) pipetlendi. Örneklerin üzerine 60µl % 95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 4 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama işlemi gerçekleştirildi. Üstteki kısım dökülerek % 70'lik alkolden 200 µl eklenip, +4°C'de 4000 rpm'de 2 dk santrifüjlenerek üstteki kısım döküldü. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan

sonra plak 300 rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifüjlenip fazla etanol uzaklaştırıldı. Plak, liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilip ve yüksek vakum altında örnekler kurutuldu. Kuruyan örneklerin üzerine 25 µl formamid içeren solüsyondan konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlandı. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak, DNA dizi analizi cihazına yerleştirildi ve elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software programı kullanılarak dalgalar halinde görünür hale getirildi.

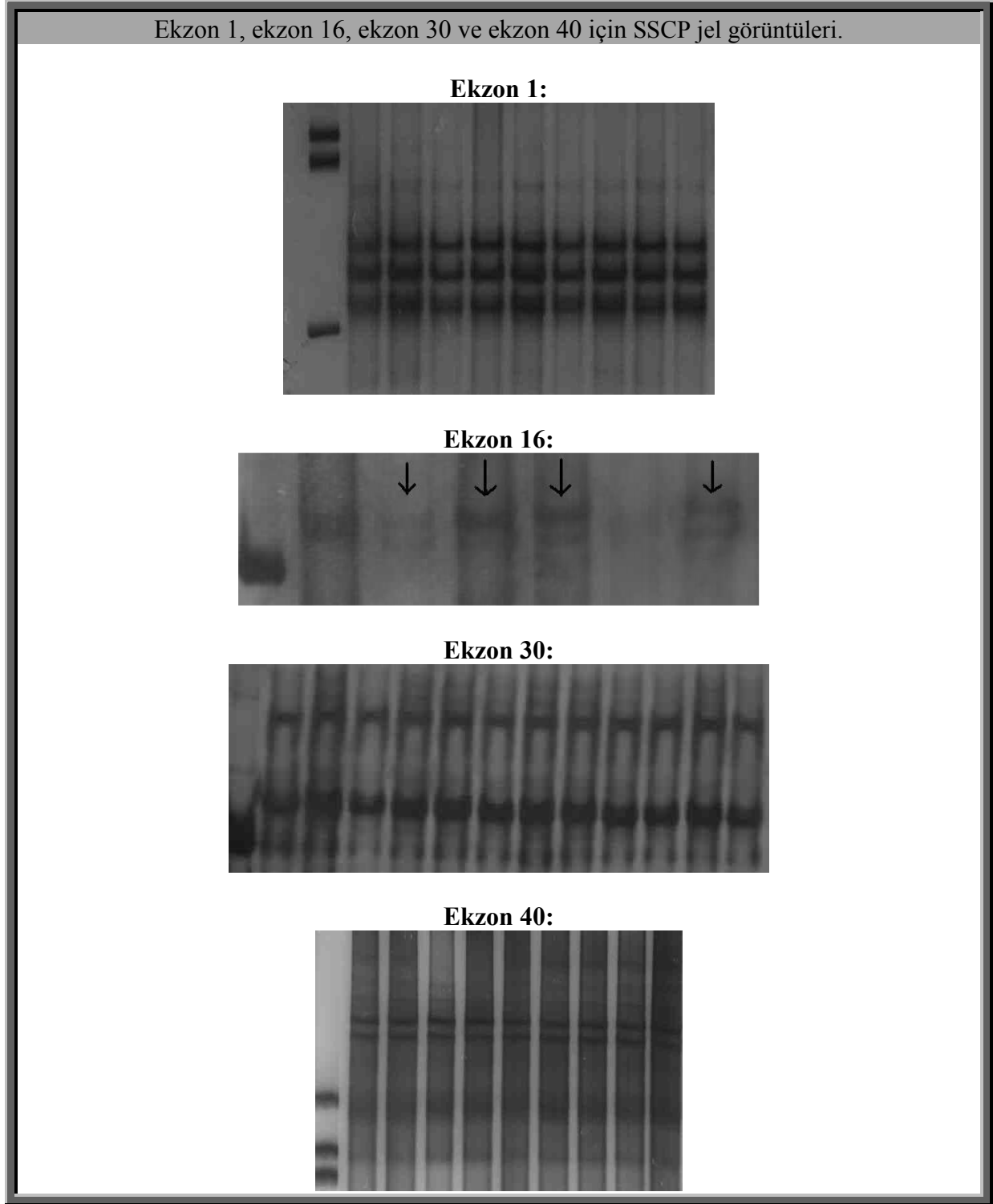
## 4. BULGULAR

### 4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları



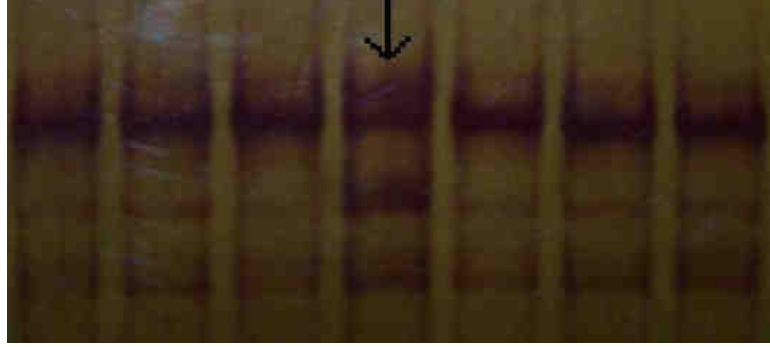
**Şekil 4.1.** Ekzon 1, ekzon 16, ekzon 30 ve ekzon 40'a ait PCR ürünleri % 2'lik agaroz jel görüntüleri.

## 4.2. Tek İplikçikli Konformasyon Polimorfizmi (SSCP) Bulguları



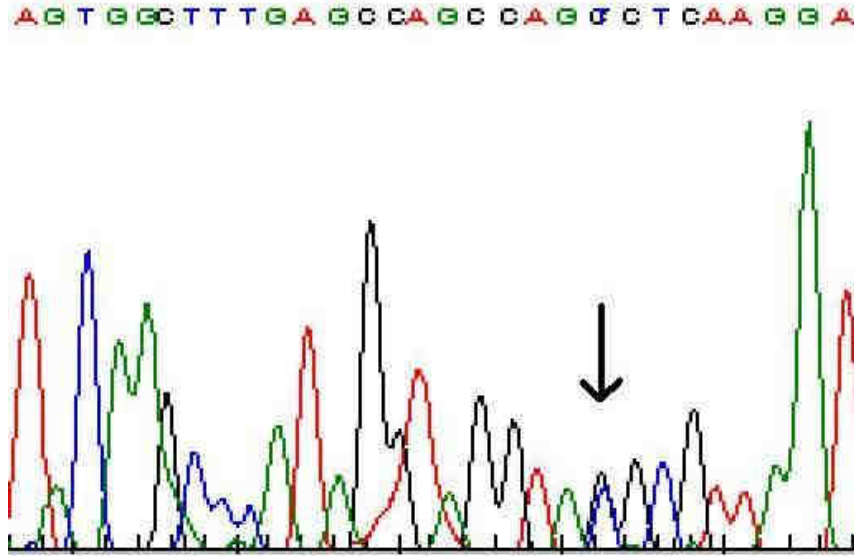
**Şekil 4.2.** Ekzon 1, ekzon 16, ekzon 30 ve ekzon 40 için SSCP jel görüntüsü.

234 bç'lik ekzon 1 de SSCP tekniği kullanılarak yapılan tarama sonucunda farklı bant örneği tespit edilmiştir.



Şekil 4.3. Ekzon 1'deki farklı bantın SSCP jel görüntüsü.

SSCP ler sonucunda farklı bant görüntüsü veren DNA'lar belirlendikten sonra DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan DNA dizi analizi sonuçları *MYH9* geninde taranan ekzona ait diziyle karşılaştırılarak farklılık olup olmadığına bakılmıştır. Ekzon 1 için SSCP de farklı bant veren bir hastanın DNA dizi analizi sonucu aşağıdaki gibidir.

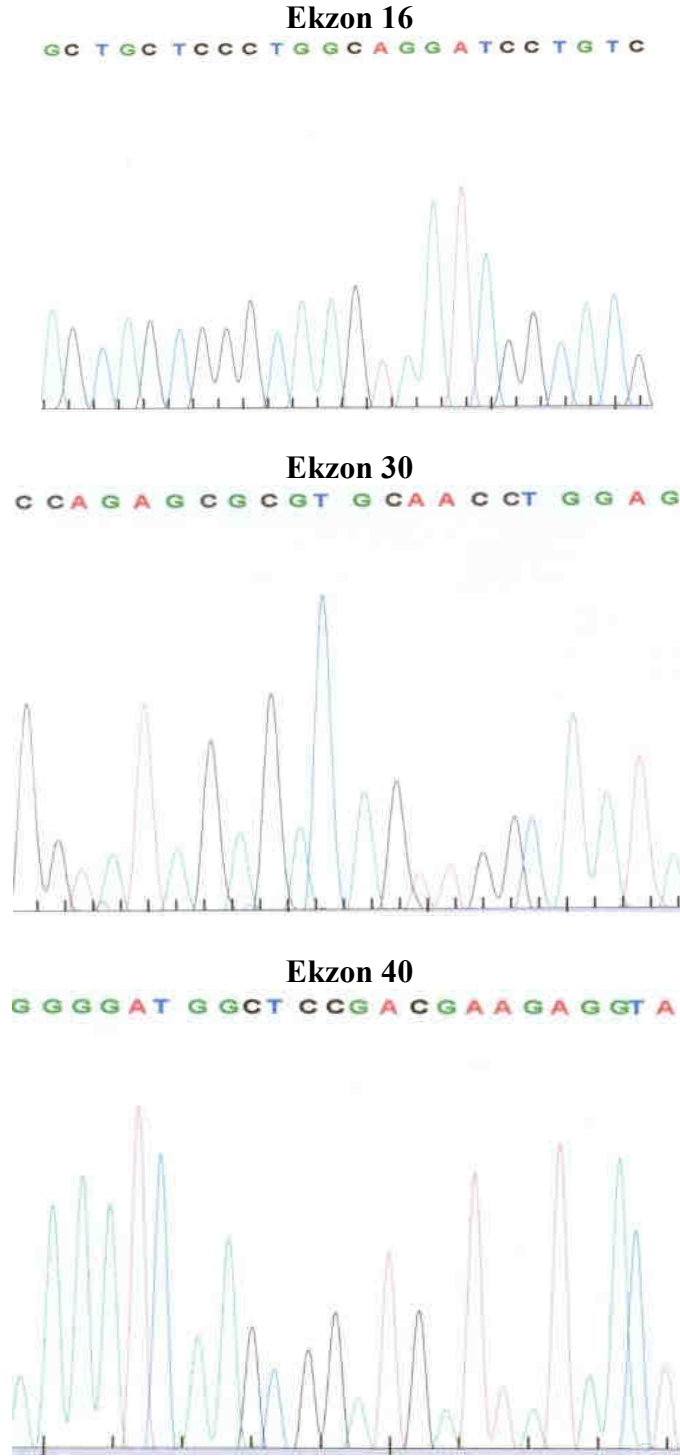


Şekil 4.4. Ekzon 1 için SSCP de farklı bant veren hastanın DNA dizi analizi.

Ekzon 1'e ait primerlerle yapılan DNA dizi analizi sonucunda 122 dev trombositli hastalardan birinde, p.45Ser>Ser sessiz mutasyonuna (silent mutation) neden olan C → T (c.366C>T) baz değişimini saptadık.



Ekzon 16, ekzon 30, ekzon 40 için SSCP de farklı bant veren ancak herhangi bir değişim saptayamadığımız DNA dizi analizi sonuçları.



Şekil 4.5. Ekzon 16, ekzon 30, ekzon 40 için DNA dizi analizi sonuçları.

## 5. TARTISMA VE SONUÇ

Çizelge 5.1: *MYH9* ilişkili bozukluklara neden olduğu bilinen 33 mutasyon.

MYH9 ilişkili bozukluklara neden olduğu bilinen 33 mutasyon			(PMID: 18676005)
Ekzon	Baz değişimi	Amino asit değişimi	PMID (PubMed - indexed for MEDLINE)
Ekzon 1	c.279C>G	p.N93K	10973259
Ekzon 1	c.283G>A	p.A95T	11776386
Ekzon 1	c.287C>T	p.S96L	11752022
Ekzon 10	c.1119G>C	p.K371N	11590545
Ekzon 16	c.2104C>T	p.R702C	10973259
Ekzon 16	c.2105G>A	p.R702H	11590545
Ekzon 16	c.2114G>A	p.R705H	11023810
Ekzon 16	c.2116C>G	p.Q706E	16642488
Ekzon 16	c.2152C>T	p.R718W	18059020
Ekzon 24	c.3195_3215del	p.E1066_A1072del	12792306
Ekzon 25	g.64823_63604del	p.V1092_R1162del	18284620
Ekzon 25	c.3340T>C	p.S1114P	11590545
Ekzon 25	c.3463A>G	p.T1155A	18059020
Ekzon 25	c.3464C>T	p.T1155I	10973260
Ekzon 26	c.3493C>T	p.R1165C	10973259
Ekzon 26	c.3494G>T	p.R1165L	11776386
Ekzon 26	c.3613_3621del	p.L1205_Q1207del	11776386
Ekzon 30	c.4198C>T	p.R1400W	11752022
Ekzon 30	c.4270G>T	p.D1424Y	11776386
Ekzon 30	c.4270G>A	p.D1424N	11159552
Ekzon 30	c.4270G>C	p.D1424H	10973259
Ekzon 30	c.4340A>T	p.D1447V	18059020
Ekzon 31	c.4546G>T	p.V1516L	16818291
Ekzon 37	c.5446A>G	p.I1816V	12533692
Ekzon 38	c.5521G>A	p.E1841K	10973259
Ekzon 40	c.5770delG	p.G1924fs	18192507
Ekzon 40	c.5773delG	p.D1925fs	18059020
Ekzon 40	c.5774delA	p.D1925fs	11776386
Ekzon 40	c.5779delC	p.P1927fs	11159552
Ekzon 40	c.5797delC	p.R1933fs	18059020
Ekzon 40	c.5797C>T	p.R1933X	10973259
Ekzon 40	c.5821delG	p.D1941fs	18059020
Ekzon 40	c.5833G>T	p.E1945X	12792306

NMHC II-A, hücre yayılmasında, hareketinde, hücre morfolojisinin korunmasında ve sitokinizde önemli fonksiyonlara sahiptir (Dong, Li et al. 2005).

İnsanlarda *MYH9*'daki tekli amino asit mutasyonları çok sayıda farklı doku ve hücrede bozuklukla sonuçlanır. Ancak az da olsa kan trombositlerindeki bozukluk sonucunda kanama bozukluğu, böbrek iltihabı, işitme kaybı, lökosit inklüzyonu ve katarakt görülebilir. Kas dışı miyozin ağır zincir tip II-A (NMHC II-A) da tanımlanmış nokta mutasyonlarının aralığı Asn<sup>93</sup> ile başlamakta ve Arg<sup>1933</sup> ile sonlanmaktadır (Heath, Campos-Barros et al. 2001).

Beklenildiği gibi farklı yerlerde görülmelerine rağmen tekli amino asit mutasyonları moleküllerin korunmuş kısımları ile sınırlıdır. Aynı mutasyon çok sayıda farklı bozukluklara yol açarken yukarıda sözü edilen organ ve hücreler her zaman etkilenmektedir. Arg<sup>702</sup>Cys sürekli olarak böbrek, işitme ve trombositlerdeki bozukluklarla ilişkilendirilen göreceli frekansta bir mutasyondur. Kas dışı ağır zincir tip II-A'nın izoformlarındaki ağır meromyozinin (HMM) aktivitesi üzerine olan mutasyonlardan Asn<sup>93</sup>Lys mutasyonu, aktin aktive edilmiş MgATPaz aktivitesini ve in vitro hareketliliğin her ikisini de düşürerek Arg<sup>702</sup>Cys göre daha çok etki göstermektedir (Hu, Wang et al. 2002).

Miyozin çubuğundaki dört farklı mutasyonunu (Arg<sup>1165</sup>Cys, Asp<sup>1424</sup>Asn, Glu<sup>1841</sup>Lys and Arg<sup>1933</sup>Stop) in vitroda çalışan Franke ve arkadaşları bu mutantların baskın rol oynayarak düzgün yabancıl tip çubuk parçalarının toplanmasına müdahale ettiğini göstermiştir (Franke, Dong et al. 2005).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar NM II-A'nın trombositlerin megakaryositlerden oluşumu sırasındaki rolünü anlamaya olanak sağlamıştır. Chen ve arkadaşları NM II-A bakımından işlev dışı bırakılmış fare embriyonik kök hücrelerini tamamıyla protrombosit oluşturabilen megakaryositlere farklılaştırmayı göstermiştir. Öte yandan bu hücrelerde NM II-A'nın, ya ekzojen ifadeyle ya da MLC<sub>20</sub>'nin taklit edilmiş fosforilasyonu ile aktivitesinin yükselmesi protrombosit oluşumunu önemli derecede azalttığı göstermiştir (Chen, Naveiras et al. 2007). Benzer şekilde Chang ve arkadaşları engellenmiş Rho kinaz ya da miyozin hafif zincir kinaz (MLCK) aktivitesi sonucunda protrombosit oluşumunda

artış olduğunu bulmuştur. Bu deneyler NM II-A aktivitesinin protrombosit oluşumu negatif yönde düzenlendiğini göstermesinden dolayı ilginçtir. (Chang, Aurade et al. 2007).

NM II-C ile ilgili olarak, NMHC II-A'daki mutasyona uğramış Arg<sup>702</sup>Cys ile homoloji gösteren NMHC'deki Arg<sup>726</sup>Ser mutasyonu sonucunda insanlarda işitme kaybı olduğu bulunmuştur. Dolayısıyla NM II-A ve NM II-C'nin her ikisinin de işitmede rol oynadığı belirtilmiştir (Donaudy, Snoeckx et al. 2004).

Şu anki verilerle *MYH9* mutasyonları için iki olası mekanizma önerilmiştir. Birincisi, mutant ağır zincirler kararsızdır ve hücre tarafından degrade edilmiştir. Dolayısıyla yabancı tip yetersizliğinden ötürü hematolojik belirtiler gözlenmiştir. İkinci olasılık ise, mutant ağır zincirler dominant aktiviteye sahip olup yabancı tip ağır zincirin yeteneğini, yabancı tip seviyesinde hücrel fonksiyon sergilemek için inhibe etmesidir. Bu durum,

- i. bipolar filamentlerin toplanmasını bozarak
- ii. bipolar filamentlerin yeteneğini zayıflatarak (aktin filamentlerin düzgün yerdeğiştirmeleri önlemek için)
- iii. yabancı tip ağır zinciri aktivite bölgesinden uzak tutarak oluşabilir (Franke, Montague et al. 2007).

Biz çalışmamızda 122 dev trombositli hastada mutasyon tarama yoluyla *MYH9* genindeki olası olabilecek bir gen değişiminin bu hastalıklarla olan ilişkisini araştırmayı amaçladık ve yalnızca ekzon 1 de, p.45Ser>Ser sessiz mutasyonuna (silent mutation) neden olan C → T (c.366C>T) baz değişimini saptadık. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarla mutasyonların, kas dışı miyozin II'nin yapısını ve fonksiyonunu nasıl bozduğunu ve *MYH9* ilişkili hastalıklara neden olan biyokimyasal mekanizmaların tam olarak anlaşılmasını mümkün kılacaktır.

## 6. KAYNAKLAR

- Adelstein, R. S. and M. A. Conti (1975). "Phosphorylation of platelet myosin increases actin-activated myosin ATPase activity." Nature 256(5518): 597-8.
- Akar N. (1999). Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş (Genişletilmiş ikinci baskı). Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi An Tıp A.S Yayınları.
- Balduini, C. L., A. Iolascon, et al. (2002). "Inherited thrombocytopenias: from genes to therapy." Haematologica 87(8): 860-80.
- Ballmaier, M., M. Germeshausen, et al. (2001). "c-mpl mutations are the cause of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia." Blood 97(1): 139-46.
- Battinelli, E. and J. Loscalzo (2000). "Nitric oxide induces apoptosis in megakaryocytic cell lines." Blood 95(11): 3451-9.
- Becker, R. P. and P. P. De Bruyn (1976). "The transmural passage of blood cells into myeloid sinusoids and the entry of platelets into the sinusoidal circulation; a scanning electron microscopic investigation." Am J Anat 145(2): 183-205.
- Behnke, O. (1969). "An electron microscope study of the rat megacaryocyte. II. Some aspects of platelet release and microtubules." J Ultrastruct Res 26(1): 111-29.
- Behrens, W. E. (1975). "Mediterranean macrothrombocytopenia." Blood 46(2): 199-208.
- Bernard, J. and J. P. Soulier (1948). "[Not Available]." Sem Hop 24(Spec. No.): 3217-23.
- Berridge, M. J. (1987). "Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers." Annu Rev Biochem 56: 159-93.
- Bouvard, D., C. Brakebusch, et al. (2001). "Functional consequences of integrin gene mutations in mice." Circ Res 89(3): 211-23.
- Chang, Y., F. Aurade, et al. (2007). "Proplatelet formation is regulated by the Rho/ROCK pathway." Blood 109(10): 4229-36.
- Chen, Z., O. Naveiras, et al. (2007). "The May-Hegglin anomaly gene MYH9 is a negative regulator of platelet biogenesis modulated by the Rho-ROCK pathway." Blood 110(1): 171-9.
- Choi, E. S., J. L. Nichol, et al. (1995). "Platelets generated in vitro from proplatelet-displaying human megakaryocytes are functional." Blood 85(2): 402-13.
- Clarke, M. C., J. Savill, et al. (2003). "Compartmentalized megakaryocyte death generates functional platelets committed to caspase-independent death." J Cell Biol 160(4): 577-87.
- Cramer, E. M., F. Norol, et al. (1997). "Ultrastructure of platelet formation by human megakaryocytes cultured with the Mpl ligand." Blood 89(7): 2336-46.

- Cramer, E. M., W. Vainchenker, et al. (1985). "Gray platelet syndrome: immunoelectron microscopic localization of fibrinogen and von Willebrand factor in platelets and megakaryocytes." Blood 66(6): 1309-16.
- Cutler, L., G. Rodan, et al. (1978). "Cytochemical localization of adenylate cyclase and of calcium ion, magnesium ion-activated ATPases in the dense tubular system of human blood platelets." Biochim Biophys Acta 542(3): 357-71.
- Davis, A. P., D. P. Witte, et al. (1995). "Absence of radius and ulna in mice lacking hoxa-11 and hoxd-11." Nature 375(6534): 791-5.
- De Botton, S., S. Sabri, et al. (2002). "Platelet formation is the consequence of caspase activation within megakaryocytes." Blood 100(4): 1310-7.
- Donaudy, F., R. Snoeckx, et al. (2004). "Nonmuscle myosin heavy-chain gene MYH14 is expressed in cochlea and mutated in patients affected by autosomal dominant hearing impairment (DFNA4)." Am J Hum Genet 74(4): 770-6.
- Dong, F., S. Li, et al. (2005). "Genotype-phenotype correlation in MYH9-related thrombocytopenia." Br J Haematol 130(4): 620-7.
- Downton, S. B., D. Beardsley, et al. (1985). "Studies of a familial platelet disorder." Blood 65(3): 557-63.
- Fox, J. E. (1993). "The platelet cytoskeleton." Thromb Haemost 70(6): 884-93.
- Fox, J. E., J. K. Boyles, et al. (1984). "Actin filament content and organization in unstimulated platelets." J Cell Biol 98(6): 1985-91.
- Franke, J. D., F. Dong, et al. (2005). "Rod mutations associated with MYH9-related disorders disrupt nonmuscle myosin-IIA assembly." Blood 105(1): 161-9.
- Franke, J. D., R. A. Montague, et al. (2007). "An MYH9 human disease model in flies: site-directed mutagenesis of the Drosophila non-muscle myosin II results in hypomorphic alleles with dominant character." Hum Mol Genet 16(24): 3160-73.
- Ginsberg, M. H., L. Taylor, et al. (1980). "The mechanism of thrombin-induced platelet factor 4 secretion." Blood 55(4): 661-8.
- Golomb, E., X. Ma, et al. (2004). "Identification and characterization of nonmuscle myosin II-C, a new member of the myosin II family." J Biol Chem 279(4): 2800-8.
- Grunfeld, J. P., G. Grateau, et al. (1987). "Variants of Alport's syndrome." Pediatr Nephrol 1(3): 419-21.
- Gurney, A. L. and F. J. de Sauvage (1996). "Dissection of c-Mpl and thrombopoietin function: studies of knockout mice and receptor signal transduction." Stem Cells 14 Suppl 1: 116-23.
- Hartwig, J. and J. Italiano, Jr. (2003). "The birth of the platelet." J Thromb Haemost 1(7): 1580-6.

- Heath, K. E., A. Campos-Barros, et al. (2001). "Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutations define a spectrum of autosomal dominant macrothrombocytopenias: May-Hegglin anomaly and Fechtner, Sebastian, Epstein, and Alport-like syndromes." Am J Hum Genet 69(5): 1033-45.
- Hodge, T. and M. J. Cope (2000). "A myosin family tree." J Cell Sci 113 Pt 19: 3353-4.
- Holmsen, H. and H. J. Day (1970). "The selectivity of the thrombin-induced platelet release reaction: subcellular localization of released and retained constituents." J Lab Clin Med 75(5): 840-55.
- Hu, A., F. Wang, et al. (2002). "Mutations in human nonmuscle myosin IIA found in patients with May-Hegglin anomaly and Fechtner syndrome result in impaired enzymatic function." J Biol Chem 277(48): 46512-7.
- Ikebe, M., J. Koretz, et al. (1988). "Effects of phosphorylation of light chain residues threonine 18 and serine 19 on the properties and conformation of smooth muscle myosin." J Biol Chem 263(13): 6432-7.
- Italiano, J. E., Jr., P. Lecine, et al. (1999). "Blood platelets are assembled principally at the ends of proplatelet processes produced by differentiated megakaryocytes." J Cell Biol 147(6): 1299-312.
- Ito, T., Y. Ishida, et al. (1996). "Recombinant human c-Mpl ligand is not a direct stimulator of proplatelet formation in mature human megakaryocytes." Br J Haematol 94(2): 387-90.
- Kaluzhny, Y. and K. Ravid (2004). "Role of apoptotic processes in platelet biogenesis." Acta Haematol 111(1-2): 67-77.
- Kaushansky, K. (2003). "Thrombopoietin: a tool for understanding thrombopoiesis." J Thromb Haemost 1(7): 1587-92.
- Kaushansky, K. (2006). "Lineage-specific hematopoietic growth factors." N Engl J Med 354(19): 2034-45.
- Kerrigan, S. W., M. Gaur, et al. (2004). "Caspase-12: a developmental link between G-protein-coupled receptors and integrin alphaIIb beta3 activation." Blood 104(5): 1327-34.
- Kim, J. A., Y. J. Jung, et al. (2002). "Gene expression profile of megakaryocytes from human cord blood CD34(+) cells ex vivo expanded by thrombopoietin." Stem Cells 20(5): 402-16.
- Kimura, K., M. Ito, et al. (1996). "Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase)." Science 273(5272): 245-8.
- Koca E, Haznedaroğlu İ.C, Büyükaşık Y. "Trombosit aktivasyonu." Türk J Cardiol 2007;10:82-90.
- Kosaki, G. (2005). "In vivo platelet production from mature megakaryocytes: does platelet release occur via proplatelets?" Int J Hematol 81(3): 208-19.

- Kunishima, S., T. Matsushita, et al. (2003). "Immunofluorescence analysis of neutrophil nonmuscle myosin heavy chain-A in MYH9 disorders: association of subcellular localization with MYH9 mutations." Lab Invest 83(1): 115-22.
- Lecine, P., J. L. Villeval, et al. (1998). "Mice lacking transcription factor NF-E2 provide in vivo validation of the proplatelet model of thrombocytopoiesis and show a platelet production defect that is intrinsic to megakaryocytes." Blood 92(5): 1608-16.
- Leven, R. M. (1987). "Megakaryocyte motility and platelet formation." Scanning Microsc 1(4): 1701-9.
- Levy-Toledano, S., J. P. Caen, et al. (1981). "Gray platelet syndrome: alpha-granule deficiency. Its influence on platelet function." J Lab Clin Med 98(6): 831-48.
- Lopez, J. A., R. K. Andrews, et al. (1998). "Bernard-Soulier syndrome." Blood 91(12): 4397-418.
- Matsumura, F. (2005). "Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes." Trends Cell Biol 15(7): 371-7.
- Miller, J. L., D. Cunningham, et al. (1991). "Mutation in the gene encoding the alpha chain of platelet glycoprotein Ib in platelet-type von Willebrand disease." Proc Natl Acad Sci U S A 88(11): 4761-5.
- Nurden, A. T. and J. P. Caen (1978). "Membrane glycoproteins and human platelet function." Br J Haematol 38(2): 155-60.
- Nurden, P., P. Savi, et al. (1995). "An inherited bleeding disorder linked to a defective interaction between ADP and its receptor on platelets. Its influence on glycoprotein IIb-IIIa complex function." J Clin Invest 95(4): 1612-22.
- Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM 605249)  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispomim.cgi?id=605249>
- Öner, C. (2002). *Genetik Kavramlar*. 6. Baskıdan Çeviri. Ankara: Palme Yayıncılık.
- Poncz, M., R. Eisman, et al. (1987). "Structure of the platelet membrane glycoprotein IIb. Homology to the alpha subunits of the vitronectin and fibronectin membrane receptors." J Biol Chem 262(18): 8476-82.
- Raccuglia, G. (1971). "Gray platelet syndrome. A variety of qualitative platelet disorder." Am J Med 51(6): 818-28.
- Radley, J. M. and C. J. Haller (1982). "The demarcation membrane system of the megakaryocyte: a misnomer?" Blood 60(1): 213-9.
- Radley, J. M. and M. A. Hartshorn (1987). "Megakaryocyte fragments and the microtubule coil." Blood Cells 12(3): 603-14.
- Raskind, W. H., K. K. Niakan, et al. (2000). "Mapping of a syndrome of X-linked thrombocytopenia with Thalassemia to band Xp11-12: further evidence of genetic heterogeneity of X-linked thrombocytopenia." Blood 95(7): 2262-8.



- Rink, T. J. and S. O. Sage (1990). "Calcium signaling in human platelets." Annu Rev Physiol 52: 431-49.
- Roth, G. J. (1992). "Platelets and blood vessels: the adhesion event." Immunol Today 13(3): 100-5.
- Saito, H. and S. Kunishima (2008). "Historical hematology: May-Hegglin anomaly." Am J Hematol 83(4): 304-6.
- Saito, H., T. Matsushita, et al. (2005). "Giant platelet syndrome." Hematology 10 Suppl 1: 41-6.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed.—Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor , NY . pp. 18. 47-18.74. ISBN 0-87969-309-6.
- Sanz, C., I. Benet, et al. (2001). "Antiapoptotic protein Bcl-x(L) is up-regulated during megakaryocytic differentiation of CD34(+) progenitors but is absent from senescent megakaryocytes." Exp Hematol 29(6): 728-35.
- Savoia, A., M. Del Vecchio, et al. (1999). "An autosomal dominant thrombocytopenia gene maps to chromosomal region 10p." Am J Hum Genet 65(5): 1401-5.
- Segal, G. M., T. Stueve, et al. (1988). "Analysis of murine megakaryocyte colony size and ploidy: effects of interleukin-3." J Cell Physiol 137(3): 537-44.
- Seri, M., A. Pecci, et al. (2003). "MYH9-related disease: May-Hegglin anomaly, Sebastian syndrome, Fechtner syndrome, and Epstein syndrome are not distinct entities but represent a variable expression of a single illness." Medicine (Baltimore) 82(3): 203-15.
- Seri, M., M. Savino, et al. (2002). "Epstein syndrome: another renal disorder with mutations in the nonmuscle myosin heavy chain 9 gene." Hum Genet 110(2): 182-6.
- Shaklai, M. and M. Tavassoli (1978). "Demarcation membrane system in rat megakaryocyte and the mechanism of platelet formation: a membrane reorganization process." J Ultrastruct Res 62(3): 270-85.
- Shprintzen, R. J., R. B. Goldberg, et al. (1981). "The velo-cardio-facial syndrome: a clinical and genetic analysis." Pediatrics 67(2): 167-72.
- Stenberg, P. E., M. A. Shuman, et al. (1984). "Redistribution of alpha-granules and their contents in thrombin-stimulated platelets." J Cell Biol 98(2): 748-60.
- Straussman, R., A. Ben-Ya'acov, et al. (2007). "Kinking the coiled coil--negatively charged residues at the coiled-coil interface." J Mol Biol 366(4): 1232-42.
- Tavassoli, M. and M. Aoki (1989). "Localization of megakaryocytes in the bone marrow." Blood Cells 15(1): 3-14.
- Thiery J.B, Bessis M. (1956). "Platelet genesis from megakaryocytes observed in live cells." C R. Acad Sci Paris;242:290.

- Thompson, A. A., K. Woodruff, et al. (2001). "Congenital thrombocytopenia and radio-ular synostosis: a new familial syndrome." Br J Haematol 113(4): 866-70.
- Thompson, A. R., W. G. Wood, et al. (1977). "X-linked syndrome of platelet dysfunction, thrombocytopenia, and imbalanced globin chain synthesis with hemolysis." Blood 50(2): 303-16.
- Tracy, P. B. (1988). "Regulation of thrombin generation at cell surfaces." Semin Thromb Hemost 14(3): 227-33.
- Verkhovsky, A. B., T. M. Svitkina, et al. (1995). "Myosin II filament assemblies in the active lamella of fibroblasts: their morphogenesis and role in the formation of actin filament bundles." J Cell Biol 131(4): 989-1002.
- Villa, A., L. Notarangelo, et al. (1995). "X-linked thrombocytopenia and Wiskott-Aldrich syndrome are allelic diseases with mutations in the WASP gene." Nat Genet 9(4): 414-7.
- Weisel, J. W., C. Nagaswami, et al. (1992). "Examination of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex and its interaction with fibrinogen and other ligands by electron microscopy." J Biol Chem 267(23): 16637-43.
- Weiss, H. J. (1975). "Platelet physiology and abnormalities of platelet function (first of two parts)." N Engl J Med 293(11): 531-41.
- Wendling, F. (1999). "Thrombopoietin: its role from early hematopoiesis to platelet production." Haematologica 84(2): 158-66.
- White, J. G. (1968). "Effects of colchicine and Vinca alkaloids on human platelets. I. Influence on platelet microtubules and contractile function." Am J Pathol 53(2): 281-91.
- White, J. G. (1973). "Identification of platelet secretion in the electron microscope." Ser Haematol 6(3): 429-59.
- White, J. G. (1974). "Electron microscopic studies of platelet secretion." Prog Hemost Thromb 2(0): 49-98.
- White J.G.(1987). Platelet ultrastructure. In: Bloom AL, Thomas DP (eds.) Haemostasis and Thrombosis, 2nd ed. Churchill Livingston, Edinburgh, p.20.
- Wright J. (1906). "The origin and nature of blood platelets." Boston Med Surg J 154:643-5
- Yamada, E. (1957). "The fine structure of the megakaryocyte in the mouse spleen." Acta Anat (Basel) 29(3): 267-90.
- Zhao, Z. S. and E. Manser (2005). "PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation." Biochem J 386(Pt 2): 201-14.
- Zucker-Franklin, D. (1970). "The submembranous fibrils of human blood platelets." J Cell Biol 47(1): 293-9.

## ÖZGEÇMİŞ

### 1. Kişisel Bilgiler;

Adı Soyadı : Zafer ERİK  
Doğum Yeri : ANKARA  
Doğum Tarihi : 02/03/1982  
Yabancı Dili : İngilizce

### 2.Eğitim Bilgileri;

Lise : Kayabayazıtöğlü lisesi (1996- 1999)  
Üniversite : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2000 – 2005)