

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

***EPCR* GENİNDEKİ OLASI DEĞİŞİMLERİN TROMBOZLU OLGULARDA
s*EPCR* SEVİYELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Biyolog Afife KARABIYIK

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

**ANKARA
2009**

***EPCR* Genindeki Olası Değişimlerin Trombozlu Olgularda s*EPCR* Seviyeleri Üzerindeki Etkisinin Araştırılması**

ÖZET

Protein C yolağı, koagülasyonun düzenlenmesi için fizyolojik olarak önemli bir mekanizmadır. Bu yolak, trombin endotel hücre yüzey reseptörü trombomoduline bağlandığında harekete geçirilir. Trombin-trombomodulin kompleksi protein C'yi aktive eder. Aktive edilmiş protein C (APC), kofaktörü protein S ile birlikte faktör Va (FVa) ve faktör VIIIa'nın (FVIIIa) proteolitik inaktivasyonu ile koagülasyon kaskadının gelişmesini ve amplifikasyonunu sınırlandırır. Bu işlem, aktive edilmiş trombositlerin negatif yüklü yüzeyi üzerinde meydana gelir.

Endotelial protein C reseptörü (EPCR), bir tip I transmembran proteindir ve daha çok geniş damarların endotelinde ifade edilir. Protein C'nin (PC) EPCR'ye bağlanması, trombin-trombomodulin kompleksi için PC'nin afinitesini artırarak PC aktivasyonunu uyarır. EPCR, CD1 (major histocompatibility class I) ailesine yapısal olarak çok benzerdir. EPCR, ekstraselüler domainlerine ilaveten, bir transmembran domaini ve çok kısa bir sitoplazmik kuyruğa sahiptir. *EPCR* geni 20q11.2'de lokalizedir. Dört ekzondan oluşur. Bu reseptörün çözülmüş formu (sEPCR) ise plazmada dolaşır ve hem PC aktivasyonunu hem de APC'nin antikoagulant aktivitesini inhibe eder. Yüksek sEPCR seviyeleri tromboz için risk faktörüdür.

Çalışmamızın amacı, tromboza yatkınlığa neden olduğu düşünülen genlerden biri olan *EPCR* geninde bulunan olası değişimlerin tespit edilmesi ve bu değişimlerin plazma sEPCR seviyeleri üzerindeki etkilerinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada, sEPCR seviyeleri 50 ng / µl'den düşük 42 trombozlu olgu ve 29 kontrol DNA'sı ve sEPCR seviyesi 130 ng / µl'den yüksek 74 trombozlu olgu ve 24 kontrol DNA'sı kullanılmıştır. Kanlardan izole edilen DNA'lar sırasıyla PCR, SSCP, DNA Dizi Analizi teknikleri kullanılarak analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda sEPCR seviyeleri bilinen hastalarda c.3998C>T ve c.4678C>G baz değişimleri saptanmıştır. 3'UTR'nin RNA stabilitesindeki rolü bilindiğinden, *EPCR* geni 3'UTR'da belirlediğimiz c.4678C>G değişimi tromboz riski açısından önem taşıyabilir.

Anahtar Kelimeler: Koagülasyon, Tromboz, Endotelial Protein C Reseptörü (EPCR), solubl EPCR (sEPCR)

Screening of *EPCR* Gene on the effects of sEPCR in Thrombotic Patients

ABSTRACT

The protein C pathway is a physiologically important mechanism for the regulation of the coagulation process. The pathway is triggered when thrombin binds to the endothelial cell surface receptor thrombomodulin. The thrombin-thrombomodulin complex activates protein C. Activated protein C (APC), together with its cofactor protein S, limits the amplification and progression of the coagulation cascade by proteolytic inactivation of factors (F)Va and FVIIIa. This process occurs on the negatively charged surface of activated platelets.

Endothelial cell protein C receptor (EPCR) is a type I transmembrane protein that is almost exclusively expressed on the endothelium of large vessels. Binding of protein C (PC) to EPCR stimulates PC activation by increasing the affinity of PC for the thrombin-thrombomodulin complex. *EPCR* is similar to molecules of the class I major histocompatibility complex, in particular the CD1-subfamily. In addition to the extracellular domains, *EPCR* has a transmembrane domain and a very short cytoplasmic tail. *EPCR* gene is located on chromosome 20q11.2. It consists of four exons. A soluble form of this receptor (sEPCR) circulates in plasma and inhibits both PC activation and APC anticoagulant activity.

The aim of this study was to investigate the detection of the variations in the *EPCR* gene which has a role for thrombosis and the effects of this variations on the plasma sEPCR levels. We have 42 thrombotic patients and 29 healthy subject samples that have lower sEPCR levels (sEPCR < 50 ng / μ l) and 74 thrombotic patients and 24 healthy subject samples that have higher sEPCR levels (sEPCR > 130 ng / μ l). Following DNA extraction, PCR, SSCP and DNA sequencing analysis of *EPCR* gene were performed. We detected 3998C>T and 4678 C>G polymorphisms in patients that have known sEPCR levels. The role of 3'UTR at RNA stability is known. Thus, EPCR 3'UTR 4678G>C polymorphism might have important effect on the thrombotic risk.

Key Words: Coagulation, Thrombosis, Endothelial Protein C Receptor (EPCR), soluble EPCR (sEPCR)

TEŞEKKÜR

Bilimsel hayata esas anlamda adım atmamı sağlayan ve o günden bu yana bilgisini, tecrübelerini, yardımlarını benden esirgemeyen ve bundan sonra da fikirlerine her zaman ihtiyaç duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR'a; çalışmalarım sırasında beni maddi açıdan destekleyen TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na; yardımları için Doç. Dr. Mustafa TEKİN'e; laboratuvar çalışmam sırasında deneyimlerini, bilgisini, fikirlerini benimle paylaşmasının yanı sıra her aşamada bana destek olan, bilimsel çalışmanın zevkli yanlarını da keşfetmeme yardımcı olan ve bundan sonra da arkadaşlığına her zaman ihtiyaç duyacağım Bio. Dr. Erkan YILMAZ'a; içinde bulunduğum sıcak çalışma ortamının oluşmasında payı büyük olan Uzm. Bio. Ece AKAR'a; tez çalışmam sırasında göstermiş olduğu bilimsel ve manevi destek için Uzm. Bio. Şükrü GÜLEÇ'e; bilimsel ve hayata dair tecrübelerini her fırsatta paylaşmasının yanı sıra, samimiyeti ve içtenliği için Uzm. Bio. Yonca EĞİN'e; çabası ve sabrı için Kadir SİPAHİ'ye; koşulsuz arkadaşlığı için Uzm. Bio. Didem TORUN'a; tez çalışmam esnasında çalışma ortamını paylaşmaktan keyif aldığım değerli çalışma arkadaşlarım Uzm. Bio. Ayşenur ÖZTÜRK, Bio. Emel USLU, Bio. Cennet YILDIZ, Bio. Zafer ERİK, Bio. Özge CUMAOĞULLARI, Bio. Zehra VELİ, Bio. Esin GÜNGÖR, Bio. Emre KIZIL, Bio. Dilara AKIN, Bio. Dr. İdil ASLAN, Uzm. Bio. Aslı SIRMACI, Uzm. Bio. Filiz Başak CENGİZ, Uzm. Bio. Duygu DUMAN, Çiğdem ASLAN ve ismini sayamadığım tüm Pediatrik Moleküler Genetik ailesine çok teşekkür ederim. Ayrıca; sonsuz ve koşulsuz sevgilerini, emeklerini, tecrübelerini, sabırlarını, desteklerini ve ellerinden gelen tüm imkanları benden esirgemeyen ve yaşantımdaki her aşamada payları yadsınamayacak kadar büyük olan değerli aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. TROMBOZ	3
2.2. BEHÇETHASTALIĞI	3
2.3. İNME	4
2.4. HEMOSTAZ VE KOAGÜLASYON MEKANİZMALARI	5
2.4.1. Pıhtılaşma Mekanizması	6
2.4.2. Trombosit Tıkacı Üzerinde Plazma Koagülasyonunun İlerlemesi	6
2.4.3. Koagülasyon Fizyolojisi	9
2.4.4. Pıhtılaşma Faktörlerinin Sınıflandırılması	9
2.5. KOAGÜLASYON KASKADI	11
2.5.1. Ekstrinsik Yol	11
2.5.2. İntrinsik Yol	12
2.5.3. Ortak Yol	13
2.6. KOAGÜLASYON İNHİBİTÖRLERİ (ANTİKOAGULAN PROTEİNLER)	14
2.6.1. Protein C Sistemi	14
2.6.1.1. Protein C Yolağının Komponentleri	19
2.6.1.2. Trombin-Trombomodulin Kompleksi	20
2.6.1.3. Protein S	21
2.6.2. Endotel Hücrelerin Yüzeyindeki Protein C'nin Aktivasyonu	22
2.6.3. APC'nin Fonksiyonları	23
2.6.4. Protein C Yolağının Fizyolojisi	25
2.6.5. Protein C Yolağının Regülasyonu	26

2.7. ENDOTELYAL PROTEİN C RESEPTÖRÜ (EPCR)	26
2.8. EPCR DOKU VE PLAZMA SEVİYELERİNİ ETKİLEYEN YAYGIN <i>EPCR</i> <i>GEN</i> POLİMORFİZMLERİ	29
2.9. MOLEKÜLER TEKNİKLER	35
2.9.1. Çözeltiler ve Solüsyonlar	35
2.9.2. DNA Ekstraksiyonu	35
2.9.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	35
2.9.4. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP)	38
2.9.5. DNA Dizi Analizi	39
2.9.6. DNA'nın Enzimatik Kesimi	40
3. MATERYAL ve YÖNTEM	42
3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI	42
3.2. YÖNTEMLER	42
3.2.1. DNA İzolasyonu	42
3.2.2. <i>EPCR</i> Gen Değişimlerinin Belirlenmesi	43
3.2.3. <i>EPCR</i> Gen Değişimlerinin İncelenmesindeki PCR koşulları	44
3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi	46
3.2.5. SSCP Jeli İçin Poliakrilamid Jel Hazırlanışı	47
3.2.6. SSCP Jeli İçin Gümüş Boyama	48
3.2.7. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi (Pürifikasyon)	48
3.2.8. DNA Dizi Analizi	49
3.2.9. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesimi	49
3.2.10. <i>DdeI</i> Restriksiyon Endonükleazıyla kesimin değerlendirilmesi için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı	50
3.3. ARAŞTIRMA BULGULARI	51
3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları	51
3.3.2. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) Bulguları	52
3.3.3. <i>EPCR</i> 3. Ekzon için DNA Dizi Analizi Sonuçları	54
3.3.4. <i>EPCR</i> 4. Ekzon 1. Bölge için DNA Dizi Analizi Sonuçları	55
3.3.5. <i>EPCR</i> 4. Ekzon 1. Bölge <i>DdeI</i> Restriksiyon Enzimi kesim sonucu	56
3.3.6. İstatistiksel Analiz	57
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	61
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	69

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 1. Pıhtılaşma	5
Şekil 2. Pıhtılaşmada trombositlerin rolü	8
Şekil 3. Pıhtılaşma Mekanizmasını Başlatan Ekstrinsik Yol	11
Şekil 4. Pıhtılaşma Mekanizmasını Başlatan İntrensik Yol	13
Şekil 5. Protein C'nin Fizyolojik Rolü	14
Şekil 6. Protein C Yolağının Komponentleri	19
Şekil 7. <i>EPCR</i> genine ait 4 ekzonun PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki Görüntüsü	51
Şekil 8. <i>EPCR</i> geni ekzon 1, 2, 4-2.bölge, 4-3.bölgeye ait SSCP jel görüntüleri	52
Şekil 9. <i>EPCR</i> geni ekzon 3 ve 4-1.bölgeye ait SSCP jel görüntüleri	53
Şekil 10. <i>EPCR</i> geni ekzon 3'e ait elektroferogram görüntüsü (heterozigot örnek)	54
Şekil 11. <i>EPCR</i> geni ekzon 3'e ait elektroferogram görüntüsü (normal örnek)	54
Şekil 12. <i>EPCR</i> geni ekzon 3'e ait elektroferogram görüntüsü (homozigot örnek)	55
Şekil 13. <i>EPCR</i> geni 4.Ekzon 1.Bölge'ye ait elektroferogram görüntüsü (heterozigot örnek)	55
Şekil 14. <i>EPCR</i> geni 4.Ekzon 1.Bölge'ye ait elektroferogram görüntüsü (normal örnek)	56
Şekil 15 . <i>DdeI</i> Restriksiyon Enzimiyle yapılan kesimin PAGE'deki görüntüsü	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 1. Pıhtılaşma faktörleri	10
Çizelge 2. Polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri ve kullanılan miktarlar	44
Çizelge 3. <i>EPCR</i> Genine ait 4 ekzon için tasarlanan primerlerin dizileri	44
Çizelge 4. <i>EPCR</i> genine ait 4 ekzon için PCR ile çoğaltılmış diziler	45
Çizelge 5. s <i>EPCR</i> düzeyleri ve tromboz riski arasındaki ilişki	57
Çizelge 6. Trombozlu olgularda <i>EPCR</i> 3998C>T değişimine ait genotipik dağılım	58
Çizelge 7. Trombozlu olgularda <i>EPCR</i> 3998C>T değişimine ait allelik dağılım	58
Çizelge 8. Trombozlu olgularda <i>EPCR</i> 4678C>G değişimine ait genotipik dağılım	59
Çizelge 9. Trombozlu olgularda <i>EPCR</i> 4678C>G değişimine ait allelik dağılım	60
Çizelge 10. Behçet hastalarında <i>EPCR</i> 4678C>G değişimine ait allelik dağılım.....	60
Çizelge 11. İnme olgularında <i>EPCR</i> 4678C>G değişimine ait allelik dağılım.....	60

SİMGELER DİZİNİ

APC	Aktive protein C
Ca ⁺⁺	Kalsiyum
°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
bç	Baz çifti
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
DMSO	Dimetil sülfoksit
EPCR	Endotelyal protein C reseptörü
FVL	Faktör V Leiden
kDa	Kilo dalton
MgCl ₂	Magnezyum klorür
M	Molar
mM	Milimolar
ml	Mililitre
ng	Nanogram
PAR-1	Proteaz aktivasyon reseptörü
PC	Protein C
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	Pikomol
PS	Protein S
q	Kromozomun uzun kolu
sEPCR	Solubl EPCR
sn	Saniye
SSCP	Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi
T	Trombin
TE	Tris EDTA
TAE	Tris Asetik asit EDTA
TBE	Tris, Borik asit, EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
TM	Trombomodulin

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Protein C (PC) antikoagulant sistemi, koagülasyonun düzenlenmesi için önemlidir. Bu yolun düzenlenmesi ve prokoagulan aktive faktör V ve VIII'in degradesyonu, aktive protein C (APC) ve protein S aracılığı ileidir. APC, major bir doğal antikoagulanttır. Pıhtılaşma faktörleri FVa ve FVIIIa'yı proteolitik olarak inaktive eder. PC, plazmada bir zimojen olarak dolaşır ve trombinin kendi endotel reseptörü trombomodulene bağlanmasıyla aktive edilir. Trombin trombomodulene bağlanırken var olan potent prokoagulant fonksiyonlar tersine işler ve protein C'ye doğru yönelir. Bunu takiben, protein C, endotel hücre yüzeyinde trombin-trombomodulin kompleksi ile aktive olur (Esmon 1992).

PC'nin aktivasyonu için önemli diğer bir protein de Endotelial Protein C Reseptörü'dür (EPCR). EPCR, PC'yi bağlar ve trombin-trombomodulin kompleksiyle protein C'nin aktivasyonunu daha da artırır (Mosnier, Zlokovic et al. 2007). EPCR, 46 kilodalton (kDa), tip I transmembran proteinidir. Çoğunlukla geniş kan damarlarının endotel yüzeyinde sentezlenir. Major histocompatibility class I / CD1 ailesi proteinleriyle homoloji gösterir. Ekstraselüler domainlerine ilaveten, bir transmembran domaini ve çok kısa bir sitoplazmik kuyruğa sahiptir. *EPCR* geni 20q11.2'de lokalizedir. Dört ekzondan ibarettir. Ekzon 1 (1-24 aminoasitler arası); 5'UTR'ı, sinyal peptidi ve yedi ek rezidüyü kodlar. Ekzon 2 (24-108 aminoasitler arası) ve Ekzon 3 (108-201 aminoasitler arası) birçok ekstraselüler bölgeyi kodlar. Ekzon 4 (201-238 aminoasitler arası) ekstraselüler on ek rezidüye ilaveten transmembran domainini, sitoplazmik kuyruğu ve 3'UTR'ı kodlar. Koagülasyonun düzenlenmesinde ve inflamasyonda rol alır. Transmembran EPCR'ye ek olarak, plazmada EPCR'nin bir solubl (hücre içinde çözülmüş) formu da tanımlanmıştır. Solubl EPCR (sEPCR), membrandaki EPCR'ye benzer şekilde PC / APC'yi aynı afinite ile bağlar. APC'nin sEPCR'ye bağlanması, FVa'nın inaktivasyonuna ve APC'nin fosfolipidlere bağlanmasına müdahale eder. Ayrıca, PC'nin sEPCR'ye bağlanması APC üretimini arttırmaz (Esmon 2006). sEPCR, APC'nin antiinflamatuvar, profibrinolitik ve antikoagulan etkilerini inhibe eder. sEPCR'nin yüksek seviyeleri tromboz için bir risk faktörüdür (Uitte de Willige, Van Marion et al. 2004). Ayrıca, trombomodulin, protein C ve protein S genlerindeki mutasyonların tromboz oluşumunda rolleri bulunmaktadır (Esmon 1992; Akar, Gokdemir et al. 2002).

EPCR genindeki 23 bazlık bir insersiyonun erken miyokard infarktüsüne ve derin ven trombozuna yatkınlık oluşturduğu öne sürülmüştür (Akar, Gokdemir et al. 2002; Zecchina, Bosio et al. 2002; Ulu, Gunal et al. 2007). Ayrıca, *EPCR* geninde 4 farklı haplotip tanımlanmıştır. Bunlardan biri olan A3 Haplotipi ile s*EPCR* seviyeleri arasında güçlü bir bağlantı vardır ve A3 Haplotipi artan plazma *EPCR* seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir (Saposnik, Reny et al. 2004). Bu artan plazma seviyeleri, kısmen bu formun artan salınımıyla açıklanmıştır (Qu, Wang et al. 2006). Bu form membranda muhafaza edilmez, fakat sekrete edilir. A3 Haplotipi taşıyan populasyonlardaki s*EPCR*'nin plazmadaki yüksek seviyeleri yalnızca membran bağlı *EPCR*'nin artan ektodomain salınımından değil, ayrıca alternatif mRNA işlenmesinden de meydana gelebilir. Artan s*EPCR*'nin biyolojik sonuçları artan prokoagulant aktiviteyle ilişkilendirilmektedir (yüksek tromboz riski gibi) (Margarethe 2008). Ayrıca, ekzon 4'de tanımlanan diğer bir polimorfizmin etkisi de yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. *EPCR* geni 3'UTR'daki c.4678G>C polimorfizmi (A1 haplotipi) dolaşımdaki APC'nin artan seviyeleriyle ilişkilendirilmiş ve venöz tromboembolizm (VTE) riskini azalttığı öne sürülmüştür. FVL taşıyıcılarında, *EPCR* geninin 4678C allelinin varlığı VTE riskini azaltan, telafi edici bir antitrombotik etkiyi meydana getirir (Medina, Navarro et al. 2005).

Bu çalışmada, tromboza yatkınlığa neden olduğu düşünülen faktörlerden biri olan ve plazma çözünmüş *EPCR* düzeylerine etki edebilecek olası *EPCR* gen değişimlerinin tespit edilmesi ve bu değişimlerin trombotik hastalıklar üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. TROMBOZ

Kardiyovasküler sistem içinde kanın pıhtı kitlesi oluşturmasına trombozis ve bu kütleye de trombüs adı verilir. Kan pıhtısı, zedelenmiş damarda ise, yaşam kurtarıcı; yaşamsal bir yapıyı besleyen damarda ise, yaşamı riske edici olabilir. Ortaya çıkan trombüsün kısmen ya da tamamen parçalanması ve akımla uzak bölgelere gitmesi emboli ile sonuçlanır. Tromboz ve emboli bu nedenle yakından ilişkilidir ve genellikle tromboemboli teriminin kullanılması bu olayları belirtir. Venöz trombüs, kan akımının yavaş olmasından dolayı veya primer hastalık nedeniyle proteinlerinin aktivasyonuna bağlı olarak meydana gelir. Bu olayda trombositlerin katkısı azdır ve damar çeperi genellikle normaldir. Arteriyel trombüs oluşmasında arter çeperinin, ateroskleroza bağlı lezyonlar (ateroskleroz plağının yırtılması ile ülser oluşması gibi) tarafından bozulmuş olması kuraldır ve olayın primer nedeni trombosit doku etkileşmesine bağlı olarak trombositlerin aktivasyonudur (Greenfield 1994).

Kan pıhtılaşma olayı karmaşık bir süreç olup, henüz tamamen açıklanamamıştır. Pıhtı oluşumu ve fibrinolizis dinamik bir denge oluştururlar. Bu denge, dolaşım sisteminin yapısal içeriğinde bir bozulma oluşturduğu zaman, hastayı kanama veya pıhtılaşmanın ölüme götürmesini engeller. Birçok faktör bu dengeyi bozar (Paiement 1998).

2.2. BEHÇET HASTALIĞI

Behçet hastalığı birçok organı etkileyen kronik bir inflamatuvar bozukluktur. Atardamar ve toplardamara ait tromboz, Behçet hastalığının yaygın bir belirtisidir ve hastalıktaki trombotik eğilimin patojenik mekanizması iyi bilinmemektedir. Çeşitli genetik, çevresel, enfeksiyöz ve immünolojik faktörler bu hastalığa neden olan ajanlar olarak öne sürülmüştür. Behçet hastalığında hakim histopatolojik özellik, tüm boyutlardaki damarları; arterleri ve venleri saran vaskülitir (damar iltihabı). Endotel disfonksiyonunun Behçet hastalığının vaskülitinde önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Vasküler inflamasyonla sonuçlanan endotel bozukluğu, tromboz için de önemli bir faktördür. Fakat, vasküler endotelin hasarı, hastalığın pıhtılaşma değerinin artması durumunu tamamiyle açıklamaz.

Çünkü, diğer vaskülitik sendromlar tromboz riskini arttırmaz (Yalcindag, Batioglu et al. 2008).

Son yıllardaki çalışmalar, inflamasyon ve koagulasyon arasındaki karşılıklı ilişkiyi açıklamaktadır. APC, doğal antikoagulant aktivitesine ek olarak, inflamatuvar aracılardan sentezini sınırlayarak ve dokulardaki lökositlerin damar dışına sızışını baskılayarak inflamatuvar cevabı azaltabilir (Esmon 2003).

Plazma sEPCR konsantrasyonları Behçetli hastalarda yüksek bulunmuştur. sEPCR seviyeleri ve yaş, cinsiyet, hastalığın süresi ya da klinik belirtileri arasında istatistiksel olarak önemli bir korelasyon saptanmamıştır. Tekrar vuku bulan damar tıkanması Behçet hastalığındaki görsel kaybın ana nedenidir. Koagulasyon yolağını içeren genlerdeki mutasyonlar, Behçet hastalığına sahip kişilerde tromboza yatkınlığa neden olabilir. Koagulasyon ve inflamatuvar reaksiyonlardaki EPCR fonksiyonları, Behçet hastalığındaki trombotik olaylar için bir risk faktörü olarak bu proteinin potansiyel bir rolü olduğunu ileri sürmektedir (Yalcindag, Batioglu et al. 2008).

2.3. İNME

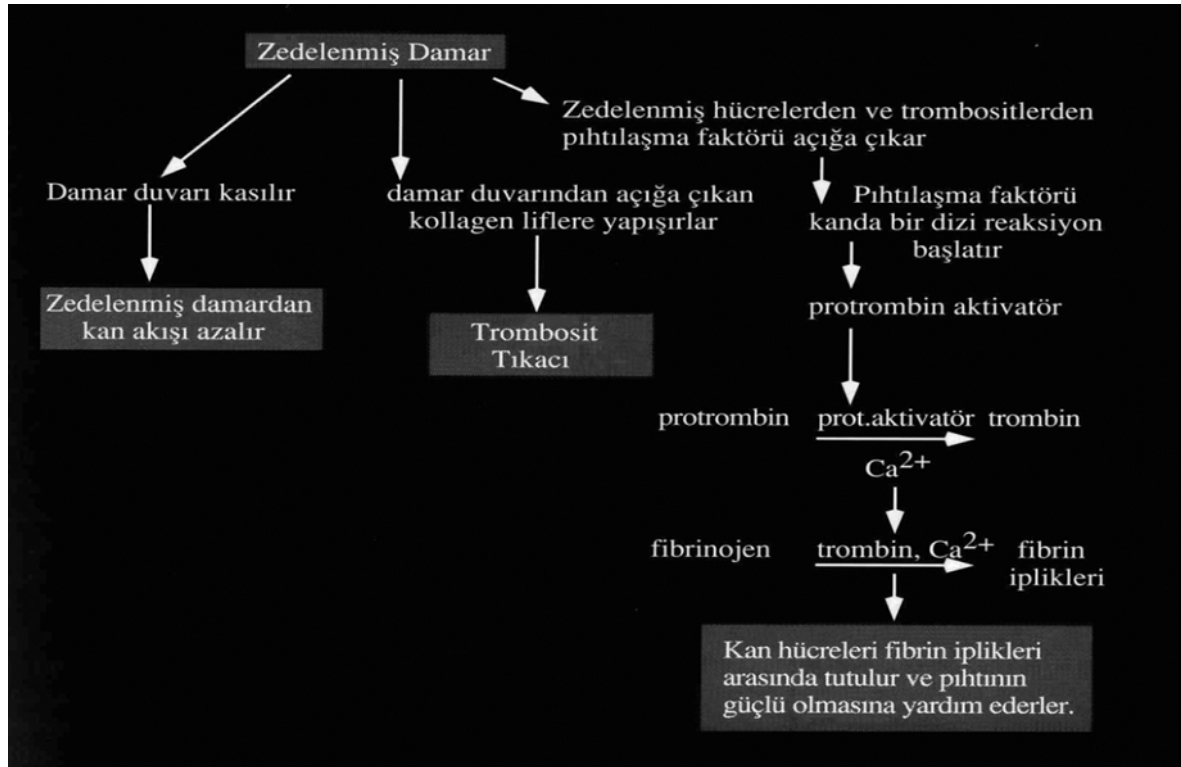
İnme veya İskemik Beyin-Damar Hastalığı, merkezi sinir sistemine giden damarların hastalıkları sonucu gelişen tıkanıklıklar ya da damar dışına kanamaların yol açtığı nörolojik belirti gelişimi olarak tanımlanabilir. İskemik inmelerin, gençlerde % 4, erişkinlerde ise yaklaşık olarak % 1 oranındaki kısmının nedeni hematolojik hastalıklardır. İnmeye neden olan bir düzineden fazla primer hematolojik hastalık bulunmaktadır (Hart and Kanter 1990). Bunların yanında trombosit aktivitesi, koagülasyon veya fibrinolizis sistemindeki bozukluklar, eritrositlerin yapısal anomalileri de inmeye neden olabilir. Ayrıca gerek inmenin kendisinin gerekse altta yatan etyolojik etmenin indüklediği çeşitli hemostatik değişiklikler de hastalarda tespit edilebilmektedir (Dahlback 1995).

Normal hemostaz sürecinde protrombotik mekanizmalar (trombin) ile fibrinolizis (plazmin) arasında kompleks bir denge bulunmaktadır. Bu denge yaşla değişir. Hemostazın bütün safhaları inme sırasında ve sonrasında çeşitli fonksiyonel değişiklikler göstermektedir. İnme için iyi bilinen bir risk faktörü olan ve hemostazın birinci fazını oluşturan trombosit aktivasyonunda da inme esnasında ve sonrasında değişimler

olmaktadır. Genel olarak trombosit agregabilitesi inme sonrasında artar (Van Kooten, Ciabattini et al. 1994). Burada rol oynayan en önemli faktörün trombin oluşumunun artması olduğu sanılmaktadır (Dahlback 1995). Dolayısıyla antitrombin-III (AT-III) ve Protein C’de kullanıma bağlı azalma olmaktadır (Weksler 1995).

Protein C, endojen bir antikoagulandır. Protein C ve kofaktörü Protein S, karaciğerde vitamin K’ya bağımlı olarak sentez edilirler. Aktive Protein C (APC) - Protein S sistemi antikoagulan etkisi yanında fibrinolizi de aktive eder. Eksikliklerinde venöz trombuslar, pulmoner tromboembolizm, nadiren arteriel embolizm oluşur (Kohler, Kasper et al. 1990). Büyük arter tıkanıklığı sonucu gelişen inmelerde Protein C ve serbest Protein S düzeyi düşmektedir. Protein C’deki düşme kullanım artımına bağlıdır. Serbest protein S düşüşü ise bir akut faz reaktanı olan ve inme olunca artan C4bBP (C4b-Binding Protein)’e Protein S’nin bağlanmasıdır (Anzola, Magoni et al. 1993). Özellikle hipertansiyon gibi başka risk faktörlerinin bulunduğu heterozigot Protein C eksikliği olan hastalarda inme riskinde ek bir artış olur (Hart and Kanter 1990).

2.4. HEMOSTAZ VE KOAGÜLASYON MEKANİZMALARI



Şekil 1. Pıhtılaşma

Hemostaz, kan kaybının önlenmesi ve kanamanın durdurulması olarak tanımlanabilir ve damar duvarında bir zedelenme olduğunda kan akımını engellemeden kanamanın durdurulması ve damar bütünlüğünün sağlanması için gereken fizyolojik sistemlerin bütünüdür. Bir damar zedelendiği ya da yırtıldığında çeşitli mekanizmalarla hemostaz sağlanır. Bu mekanizmalar; damar spazmı, trombosit tıkaçının oluşumu, kanın koagülasyonu sonucu kan pıhtısının oluşumu, fibröz dokunun pıhtı içine doğru büyümesiyle damardaki deliğin kalıcı olarak kapatılmasıdır (Kumar, Cotran et al. 2003) (Şekil 1).

2.4.1. Pıhtılaşma Mekanizması

Pıhtılaşma, kanamanın durması (hemostaz) sırasında damar dışında ve tromboz sırasında ise, damar içinde meydana gelir. Bu durum pıhtılaşma faktörleri adı verilen ve çoğu birer plazma proteini olan, doğal maddelerin kendi aralarında belirli bir hiyerarşik düzene göre etkileşimleri sonucu oluşur. Pıhtılaşma olayına kısmen öncülük eden, kısmen de onunla aynı zamanda gelişen ve onunla yakından etkileşen olay trombositlerin aktivasyonudur (Greenfield 1994).

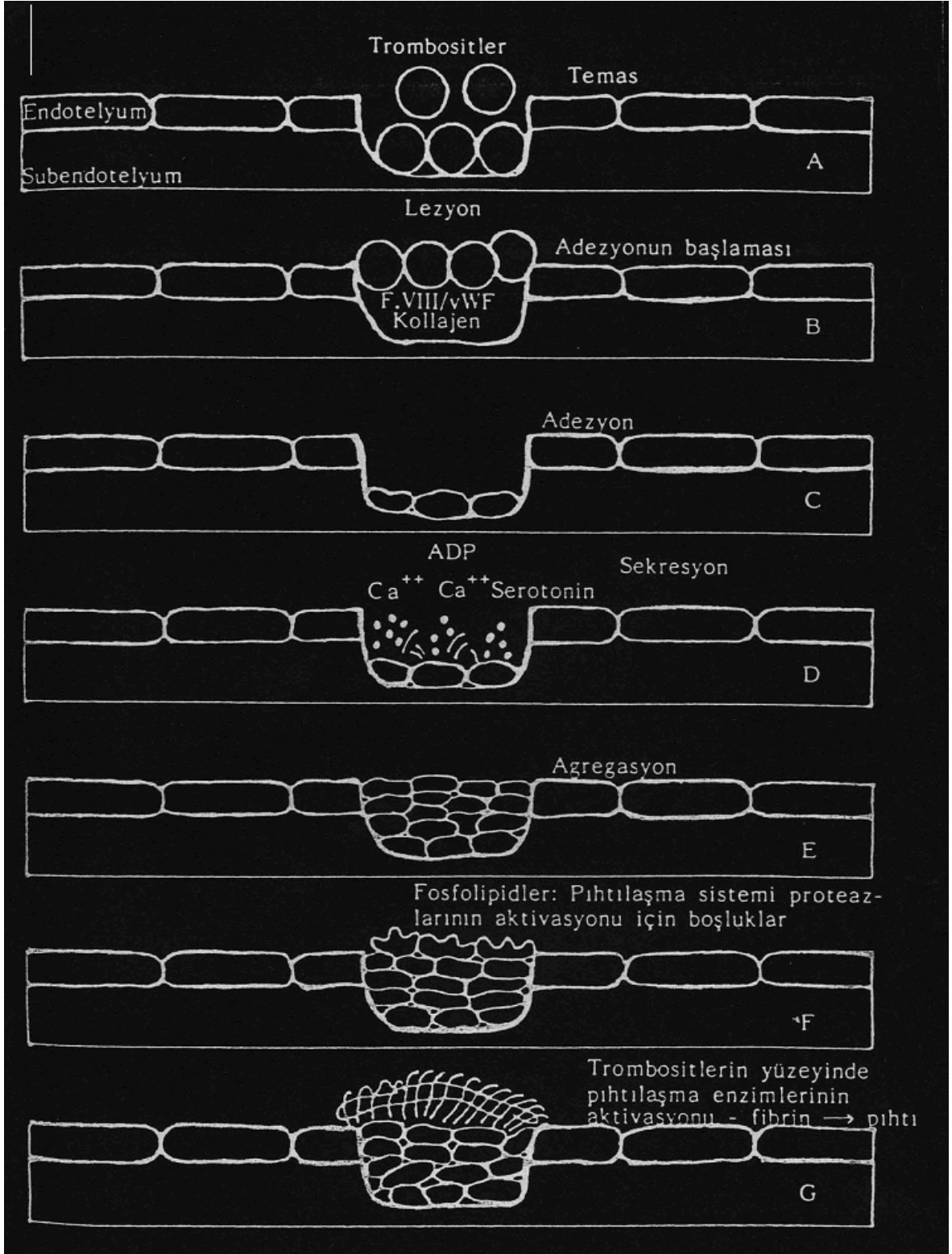
Pıhtılaşmayı oluşturan olaylar zincirinin, pıhtılaşmanın plazmadaki (intrinsik) veya dokudaki (ekstrinsik) başlatıcı sistemlerinin aktivasyonu ile başlatılmasında yalnızca ilk kısım farklıdır. Sonraki kısım her iki durum için de ortaktır (Weitz 1997).

2.4.2. Trombosit Tıkaçı Üzerinde Plazma Koagülasyonunun İlerlemesi

Bir damarın hasara uğramasından sonra şu olaylar gelişmektedir:

- 1- Dolaşan trombositler normal endotele veya birbirlerine yapışmazken endotel bütünlüğü bozulunca trombositler açığa çıkan subendotelyal kollajene yapışırlar. Buna trombosit adhezyonu denir. Bu olayda, endotelyal hücreler tarafından yapılan Von Willebrand Faktör'ü (VWF), trombosit ile subendotelyumu birleştiren köprü vazifesi görür.
- 2- Trombositler hasar bölgesinde oluşan trombin ve kollajenin başlattığı reaksiyonlar ile aktive olur.

- 3- Uyarılar sonucu bir membran fosfolipidi olan fosfotidil inozitoltrifosfatı hidrolize eden fosfolipaz C enzimi aktive olur. Bu reaksiyon ürünleri proteinkinaz C'yi aktive ederken trombosit sitoplazmasındaki kalsiyum iyonu (Ca^{++}) konsantrasyonunu artırır.
- 4- Trombositler biçim değiştirir ve uzun psödopodlar oluştururlar.
- 5- Trombosit yüzey membranının Glikoprotein IIb / IIIa reseptörleri vardır. Fibrinojen ve diğer adhezif proteinler bu reseptörlere bağlanır ve trombositlerin birbirine yapışmasına neden olur. Bu olaya trombosit agregasyonu denir.
- 6- Membran fosfolipitlerinden arakidonik asit serbestleşir ve bu, prostaglandin H2 (PGH2) ile tromboksan A2'ye (TxA2) okside olur. PGH2, kollajen ile indüklenen trombosit aktivasyonu için önemli bir kofaktördür. TxA2 ise kendi başına bir diğer trombosit aktivatörüdür.
- 7- Trombosit içeriği sekrete edilir. ADP, trombosit aktivasyonunu uyarır ve gelişmekte olan tıkaçta yeni trombositleri çağırır.
- 8- Trombosit yüzey membranı değişikliğe uğrar ve kan pıhtılaşmasının enzim / kofaktör komplekslerinin trombosit yüzünde oluşması için gerekli prokoagülan fosfolipitleri (trombosit faktör 3) ortaya çıkarır. Granüllerden trombosit faktör V'in salınımı, enzim / kofaktör komplekslerinden biri için diğer bir anahtar komponentini oluşturur. Sonuçta, trombosit yüzeyinde artan miktarlarda trombin meydana gelir ve fibrinojeni fibrine dönüştürerek hasar bölgesindeki trombosit tıkaçının sağlamlaşmasına yardım eder.
- 9- Trombosit aktinomyozinin kontraksiyonu ile trombosit içinde bir mekanizma aktive olur. Bu mekanizma trombosit tıkaçını sağlamlaştırır. Böylece kan akımı durdurulmuş olur.
- 10- Daha sonra fibrinolitik sistemin aktive olması ile pıhtı çözülür (Şekil 2) (Kayaalp 1990) (Şekil 2).



Şekil 2. Pıhtılaşmada trombositlerin rolü

2.4.3. Koagülasyon Fizyolojisi

Koagülasyon, kandaki birçok protein veya koagülasyon faktörünün kimyasal reaksiyonu sonucu fibrin oluşumu ile sonuçlanan bir mekanizmadır. Bu reaksiyona katılan proteinler fonksiyonel olarak dört grupta değerlendirilebilir:

1. Zimojenler (proenzimler): Bunlar inaktif prekürsörlerdir (Faktör XIII, XII, XI, X, IX, VII, II ve prekallikrein).
2. Kofaktörler: Bunlar zimojen aktivasyonunu arttıran maddelerdir (F VIII, V ve yüksek moleküllü kininojen).
3. Fibrinojen: Pıhtı oluşumu için gerekli son ürünüdür.
4. İnhibitörler: Bunlar pıhtı yapımını sınırlayan veya pıhtı yapmayı ortadan kaldıran maddelerdir (Plazmin, Protein C ve S, Doku faktör yolu inhibitörü (TFPI, Antitrombin) (<http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/anestezinot/yogun.htm>).

Zimojenlerden F XII, XI, X, IX, II, prekallikrein ve FVII serin proteaz yapıdadırlar. FXIII transpeptidazdır. Yine koagülasyon kaskadında birçok reaksiyon kalsiyum iyonu gerektirmektedir. Koagülasyon faktörleri karaciğerde hepatositlerde sentezlenmektedir. Yalnız FVIII karaciğerde endotel hücrelerinden sentezlenmektedir. F II, VII, IX ve X sentezleri için K vitamini gerekir (<http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/anestezinot/yogun.htm>).

2.4.4. Pıhtılaşma Faktörlerinin Sınıflandırılması

A- K vitaminine bağımlı faktörler

1. Faktör II (Protrombin)
2. Faktör VII
3. Faktör IX
4. Faktör X
5. Protein C
6. Protein S

B-Trombine duyarlı faktörler

1. Faktör I (fibrinojen)
2. Faktör V
3. Faktör VIII

4. Faktör XIII

C-Kontakt faktörleri

1. Faktör XII

2. Faktör XI

3. Yüksek Molekül Ağırlıklı Kininojen (HMWK)

4. Prekallikrein

D-Fosfolipidler ve kalsiyum iyonları

E-Koagülasyon inhibitörleri (Çizelge 1)

Faktör	Adı	Yarılanma süresi (saat)	Plazma düzeyi (U / dl)
I	Fibrinojen	90	200 – 400 mg/dl
II	Protrombin	60	50 – 150
III	Doku tromboplastini	?	0
IV	Kalsiyum		
V	Proakserelin, labil faktör	12 –36	50 – 150
VII	Prokonvertin, stabil faktör	6 – 8	50 –150
VIII	Antiheofilik faktör	8 – 12	50 – 150
IX	Christmas faktör	12 – 24	5 – 150
X	Stuart faktör	32 – 58	50 – 150
XI	Plazma tromblastin antesedan	48 – 72	50 – 150
XII	Hageman faktör	48 – 52	50 –150
XIII	Fibrin – stabilizan faktör	72 – 120	50 – 150
HMWK	Fitzgerald faktör	136	-
Prekallikrein	Flecher faktör	-	-

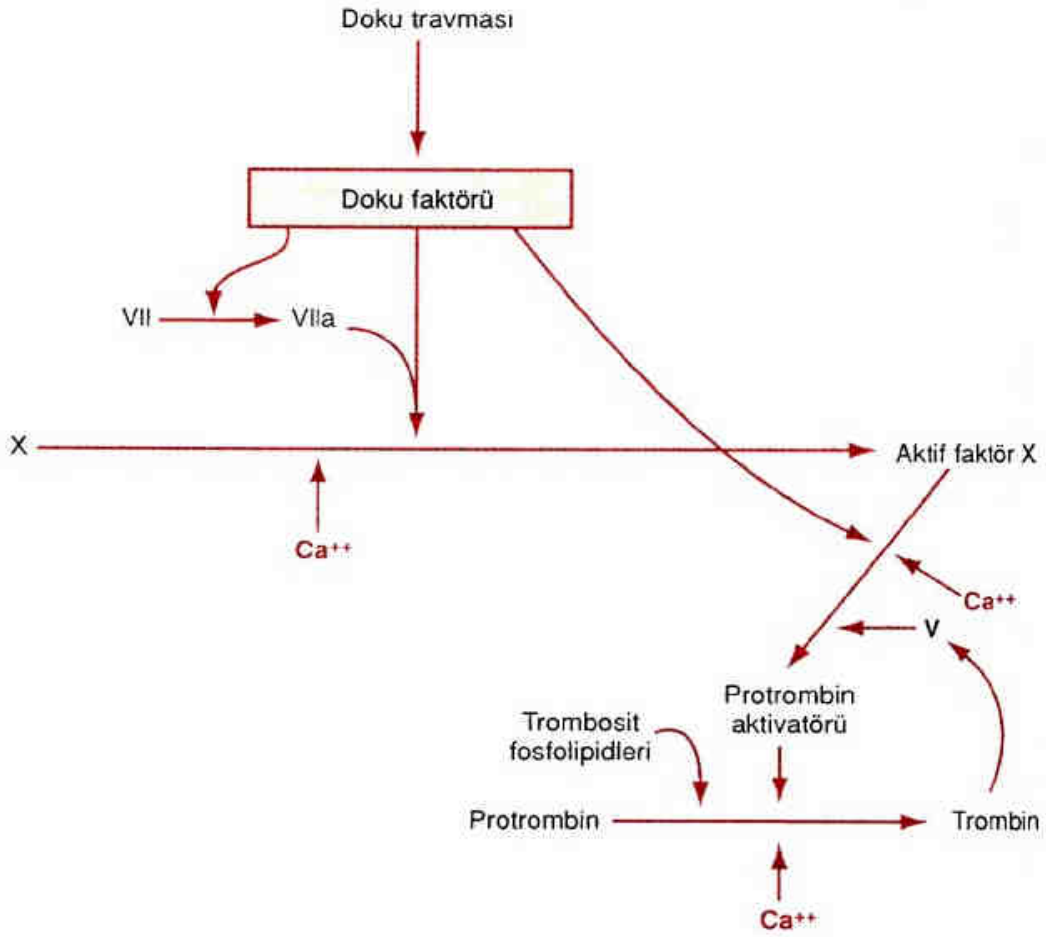
Çizelge 1. Pıhtılaşma faktörleri

2.5. KOAGÜLASYON KASKADI

Koagülasyon mekanizması fibrin yapıda pıhtı oluşumu ile sonuçlanan bir dizi kompleks basamağı içermektedir. Bu aşamalar:

1. İntrinsik yol: Yavaş ve en önemli basamaktır.
2. Ekstrinsik yol: Hızlı ve erken aktive olan basamaktır.
3. Ortak Yol: Fibrin yapımı için gerekli son basamaktır.

2.5.1. Ekstrinsik Yol



Şekil 3. Pıhtılaşma Mekanizmasını Başlatan Ekstrinsik Yol

Doku faktörü (TF) tarafından hızla aktive olan bir yoldur. Doku faktörü bir lipoproteindir. Primer olarak endotel hasarlanması ile salınmaktadır. Ayrıca trombositler ve monosit / makrofajlar tarafından da sentezlenmektedir. Ca^{++} iyonunun varlığında TF

hızla FVII'yi (FVIIa) aktive etmektedir. TF / FVIIa kompleksi de hızla FX'i aktive (FXa) etmektedir (<http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/anestezi-not/yogun.htm>).

Bu yol, dokuda oluşan doku tromboplastini (Faktör III) tarafından başlatılır. Faktör III hem direkt olarak, hem de Faktör IX'u aktive etmek suretiyle indirekt olarak, Ca^{++} yardımı ile, Faktör X'u aktive eder; yolun bundan sonraki kısmı endojen yol ile ortaktır. İntrinsik yol üzerinden oluşan koagülasyonun tamamlanması dakikalarca sürdüğü halde, ekstrinsik yol üzerinden oluşan koagülasyon saniyelerle ölçülecek kadar kısa zamanda olmaktadır (Greenfield 1994; Weitz 1997) (Şekil 3).

2.5.2. İntrinsik Yol

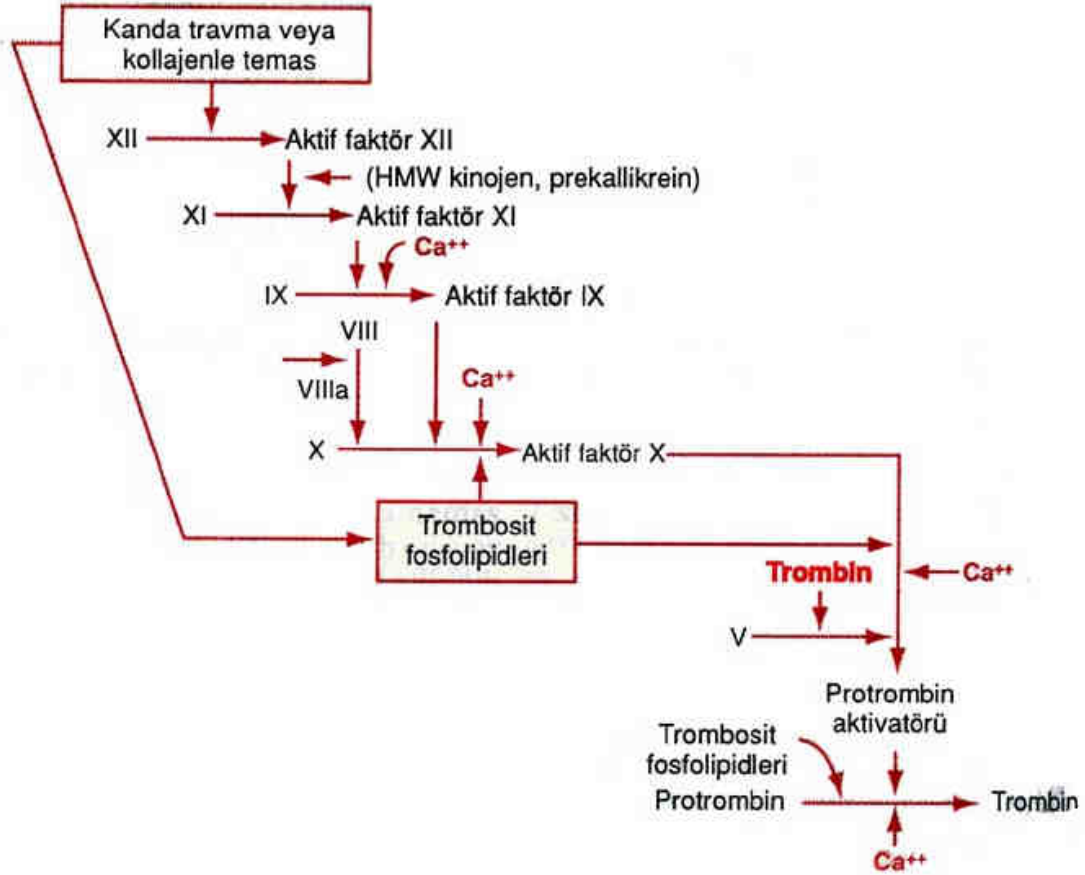
İntrinsik yolun başlangıcı son derece komplekstir. FXII'nin aktivasyonu, kanın yabancı bir yüzeyle teması ile başlar. Bu yüzey in vitro olarak bir cam, silikon veya plastik; in vivo olarak kollajendir (<http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/anestezi-not/yogun.htm>).

Bu yol, plazma içinde oluşur. Zedelenen damar çeperindeki subendotelyal kollajene temas sonucunda Hegeman faktörü (Faktör XII) aktive olur. Bu aktivasyonu Kalikrein ve yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMW-K) - prekalikrein (Pre-K) kompleksi yapar. Aktive edilmiş Hegeman faktörü (Faktör XIIa), Pre-K'den kendini aktive eden Kalikrein (Ka) oluşmasını artırır. Faktör XIIa'nin başlattığı reaksiyon zincirindeki faktörlerden her biri Ca^{++} ve diğer bazı faktörlerin yardımıyla kendisinden sonra gelen faktörü aktive eder. Böylece aktive edilmiş Faktör X (Faktör Xa) oluşur ve koagülasyonun bundan sonraki kısmı, ekstrinsik yolun aktivasyonuna bağlı koagülasyonda olduğu gibidir (Greenfield 1994; Weitz 1997).

Aktive olan FXII, FXI'i aktif hale (FXIa) geçirir. Bu basamak Ca^{++} iyonunun varlığından bağımsızdır. FXIa, Ca^{++} , TF, FVII ve fosfolipid yüzeyin varlığında FIX'u aktif hale (FIXa) getirir. FIXa, bir ko-faktör olan FVIII varlığında FX'u aktif hale (FXa) getirir. Trombin, FVIII'in etkisini artırır (<http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/anestezi-not/yogun.htm>).

İntrinsik yolun başlangıcı olan FXII, herhangi bir proteolitik basamak gerekmeden kanın herhangi bir yabancı yüzeyle teması ile aktive olmaktadır. Aktive olan FXII aynı zamanda birçok reaksiyonun zayıf aktivatörüdür. Yani FXII, FXI'i aktive ederken aynı zamanda

prekallikrein ve plazminojeni de aktive etmektedir. Prekallikreinin indüklenmesi ile kallikreinden kininojen ve son ürün olarak bradikinin, plazminojenin indüklenmesi ile de plazmin oluşmaktadır. Bu reaksiyonlar daima feed-back mekanizması ile birbirlerini etkilerler. Yani kallikrein, kininojen ve plazmin de aynı zamanda FXII'yi aktive edebilme yeteneğindedirler (<http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/anesteziot/yogun.htm>) (Şekil 4).



Şekil 4. Pıhtılaşma Mekanizmasını Başlatan İntrensik Yol

2.5.3. Ortak Yol

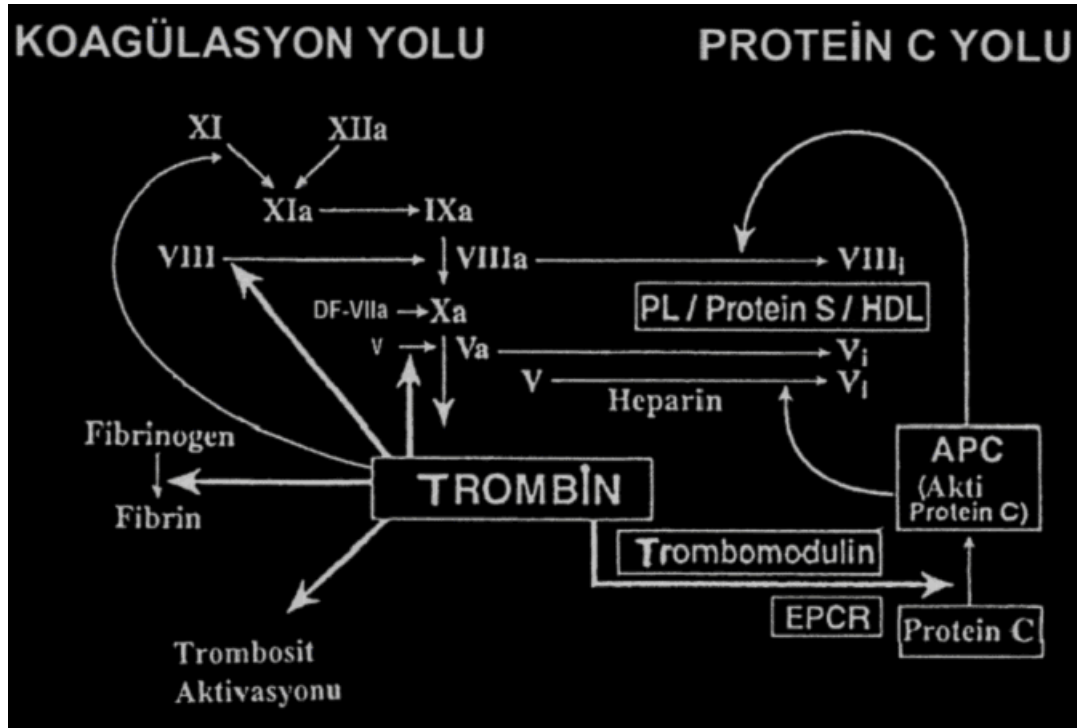
Pıhtılaşma yolunun ortak kısmında, Faktör Xa, Ca^{++} 'un, Labil faktör'ün (Faktör V) ve trombosit kaynaklı fosfolipid miçellerinin yardımı ile protrombini (Faktör II) trombine (Faktör IIa) dönüştürür. Faktör IIa, pıhtılaşma olayının gözle görünen kısmı olan fibrinojenin (Faktör I) fibrine dönüşmesi olayını başlatır; önce Faktör I'in iki peptit zincirinin her birinden iki ufak peptit parçası koparılır ve fibrin monomerleri (Faktör Ia)

oluşur; bir transglutaminaz'ın (aktive edilmiş faktör IIIa) yardımı ile Faktör Ia kovalent çapraz bağlarla polimerize olur; böylece suda çözünmeyen ve plazmin ve diğer proteolitik enzimlere oldukça dirençli olan fibrin oluşur. Fibrin iplikleri, dolaşımdaki eritrositleri ve kimi zaman da lökositleri hapseden kırmızı pıhtının matriksini oluşturur. Koagülasyon kaskadı böylelikle pıhtı oluşumu ve büyümesiyle sonuçlanır. Faktör IIa, Faktör XIII'ün aktivasyonunu da katalize eder. Ayrıca, trombosit agregasyonunun güçlü bir stimulatörüdür (Greenfield 1994; Weitz 1997; Mann 1999).

2.6. KOAGÜLASYON İNHİBİTÖRLERİ (ANTİKOAGULAN PROTEİNLER)

Organizmada fibrin oluşumunu sınırlayan veya oluşan fibrini imha eden mekanizmalar da mevcuttur. Plazmada bulunan antikaogulan proteinler; protein C yolunda bulunanlar, TFPI (tissue factor pathway inhibitör) ve proteinaz inhibitörleridir.

2.6.1. Protein C Sistemi



Şekil 5. Protein C'nin Fizyolojik Rolü

Trombosit bağımlı primer hemostasis ve kan koagülasyonu, kanamaya karşı alınan önemli koruma mekanizmaları olarak geliştirilmektedir. Bir vasküler lezyonun (damarsal yara) başlangıç tıkanması, trombosit tıkaçının oluşumu ile sağlanmaktadır (Dahlback and Villoutreix 2005). Bu, zamanla kana doku faktörünün (TF) salınmasıyla koagülasyon sisteminin başlangıcı ve sonra da dolaşımdaki faktör VIIa'nın (FVIIa) TF'ye bağlanmasıyla koordine edilir (Dahlback and Villoutreix 2005). FVIIa – TF kompleksi etkili bir şekilde, faktör VIIIa (FVIIIa) ve faktör Va (FVa) ile birlikte, faktör IX (FIX) ve faktör X'u (FX) aktif enzim halleri olan FIXa ve FXa'ya dönüştürür ve koagülasyon prosesi yayılır.

FVIII ve FV, trombin ya da FXa tarafından koagülasyon prosesinin erken aşamaları boyunca aktif formları olan FVIIIa ve FVa'ya dönüştürülen yüksek moleküler ağırlıklı inaktif pro-faktörler olarak kanda dolaşırlar. FVIIIa ve FVa, aktive olmuş trombositlerdeki gibi negatif yüklü fosfolipit membranlara bağlanır ve FIXa ve FXa ile kompleksler oluşturular. FIXa-FVIIIa kompleksi (tenase) (Dahlback 2005), FX'u aktive eder. FXa-FVa kompleksi (prothrombinase), protrombini trombine dönüştürür. Bu iki kompleksde (tenase-prothrombinase) de, kofaktörler enzimlerin katalitik verimliliğini ayrı ayrı artırır. Koagülasyon süreci, birçok prokoagülant fonksiyona sahip trombinin büyük miktarını meydana getirir. Trombin; FV, FVIII ve trombositleri aktive eder, fibrinojeni bir fibrin ağına dönüştürür, FXIII'ü inaktif bir transglutaminaza aktive eder (transglutaminaz, fibrini çapraz bağlarca bağımlı transaçilasyon reaksiyonunu katalize eden enzimdir) (Dahlback and Villoutreix 2005).

Kan koagülasyonunun reaksiyonları, normal şartlar altında prokoagülant güçlere galip gelen birçok antikoagülant mekanizma tarafından dikkatli bir şekilde kontrol edilir. Sistem, membran sınırını ve hücre yüzeyindeki multi moleküler kompleksler içindeki proteinleri kapsar (Esmon 2001; Esmon 2003). Bir koagülasyon uyarımından sonra, kan pıhtılaşma kaskadı, çok yüksek seviyede trombin üretilene kadar büyük ölçüde değişmemiş bir şekilde amplifiye olur. Doğal antikoagülant mekanizmalar (örneğin, protein C antikoagülant yolağı) aşırı trombin üretimini önlemek için amplifiye edilirler. Trombin trombomoduline bağlanır ve bu kompleks daha sonra serbest trombinden yaklaşık 1000 kat daha hızlı bir şekilde protein C'yi aktive eder. Aktive edilmiş protein C, proteolitik olarak FVa ve FVIIIa'yı inaktive eder, böylece koagülasyon sisteminin amplifikasyonunu bloke eder, bu süreç Protein S tarafından hızlandırılır (Esmon 2006) (Şekil 5).

Protein C (PC) antikoagulant yolağı, trombus formasyonunun kontrolü ve düzenlenmesinde çok önemli bir rol oynar. Vitamin K bağımlı PC, doğal antikoagulant yolağın anahtar komponentidir ve kanda bir antikoagulant serin proteaza zimojen olarak bulunur; trombin - trombomodulin kompleksi ile endotel hücrelerin yüzeyinde aktif enzime dönüştürölür (aktive olmuş protein C (APC)). PC, trombin, endotel hücre reseptörü trombomoduline bağlandığında endotel hücrelerinin yüzeyinde verimli bir şekilde aktive edilir ve bu yolak harekete geçirilir. PC sistemi, antikoagulant etkisini FVIIIa ve FVa'nın aktivitesini düzenleyerek göstermektedir. Böylece kan koagülasyonunun kontrolünü sağlar. FVIIIa ve FVa sırayla tenaz ve prothrombinaz komplekslerindeki kofaktörlerdir. Bu iki faktör trombin formasyonunun amplifikasyonu için gereklidir ve böylece fibrin oluşumunu regüle ederler. APC, FVa ve FVIIIa'nın proteolitik degradasyonu ile koagülasyon basamaklarının sıralı aktivasyon ve amplifikasyonlarını sınırlandırır (Medina, Navarro et al. 2005).

PC yolağının anahtar özelliği, trombin varlığına tepki göstermesinde yatar. Trombin konsantrasyonu arttığında trombinin çoğu ilk olarak endotel hücre yüzeyindeki olmak üzere trombomoduline bağlanır. Bu da PC'nin aktivasyonuna öncülük eder (Esmon 2003).

Koagülasyonun düzenlenmesinde PC yolağının rolü yadsınamaz. Endotoksin, ilk olarak doku faktör ekspresyonuna yol açarak çeşitli mekanizmalarla başlamaya öncülük eder. Bu da faktör VIIIa-XIa ve FVa-Xa komplekslerinin oluşumuna ve en sonunda da trombin üretimine yol açar. Trombin ya fibrin oluşumuna ve trombosit ve endotel hücre aktivasyonuna neden olur ya da trombomoduline bağlanabilir. Bu bağlanma PC'yi hızlı bir şekilde aktive eder. Bu olay EPCR ile artırılır (Esmon 2003). APC, kofaktörü protein S ile birlikte, negatif yüklü fosfolipit membranın yüzeyindeki FVIIIa ve FVa'yı degrade ederek koagülasyonu inhibe eder. APC tarafından FVIIIa'nın etkin degradasyonu yalnızca protein S'ye ihtiyaç duymaz; ayrıca, hem antikoagulant hem de prokoagulant potansiyelli bir protein olan bozulmamış FV'i de gerektirir (Dahlback and Villoutreix 2005).

PC antikoagülant yolağı trombozisi kontrol etmek için major bir sistem olarak görev görür, inflamatuvar cevabı limitler, potansiyel olarak inflamatuvar sitokinler ve iskemiye cevaptaki endotel hücre apoptozisini azaltır. Yolağın ana komponentlerinden biri olan trombomodulin, trombini bağlar, direkt olarak pıhtılaşmayı ve aynı zamanda protein C ve thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor (TAFI) aktivasyonunu artırırken hücre

aktivasyon potansiyelini de engeller. Ayrıca trombomoduline bağlanan trombin, plazma protein inhibitörleri (protein C inhibitörü ve antitrombin) aracılığıyla serbest trombinden 20 kat daha hızlı inaktive edilir. Bu, dolaşımdan trombinin artan atılımıyla sonuçlanır. İnhibe edilmiş trombin hızla trombomodulinden bağlarını koparır, antikoagulant yüzey yeniden meydana gelir. Trombomodulin üstelik direkt antiinflamatuvar etkiye sahiptir, endoteldeki sitokin formasyonunu minimize eder ve lökosit endotel hücre adezyonunu azaltır (Esmon 2003).

Bir diğer reseptör olan endotelial protein C reseptörü (EPCR), endotel hücre yüzeyinde protein C'yi bağlar, in vivo ortamda protein C aktivasyonunu yaklaşık 20 kat artırır ve onu trombin - trombomodulin aktivasyon kompleksine sunar. APC, yeteneğini EPCR'ye bağlanarak muhafaza eder. Önce APC, EPCR'den bağlarını koparır, FVa ve FVIIIa'yı inaktive ettiği uygun hücre yüzeyinde protein S'yi bağlar. Böylece daha fazla trombin üretimini inhibe eder (Esmon 2003). Trombin üretimi sonlandığında PC inaktivasyon kompleksi hızlı bir şekilde APC üretimini sonlandırır. PC ve APC, EPCR'ye eşit afinite ile bağlanır. PC aktivasyonuna EPCR'nin katılmasıyla EPCR, APC ile yüklenecektir. EPCR'ye bağlanan APC serbest APC ile yaklaşık aynı oranda plazma proteaz inhibitörleri tarafından (alfa-1 antitripsin ve protein C inhibitör) inaktive edilebilir (Esmon 2003). Bu yavaş aktivasyon, EPCR'ye bağlanan APC'ye hücrelere uyarı göndermesi için izin verir. APC - EPCR kompleksi vasıtasıyla proteaz aktivasyon reseptörün (PAR-1) kesimi bu şekilde bir hücre sinyal mekanizmasına dahil edilir, bu mekanizmalardan en önemlisi antiapoptotik aktivitelerle ilişkili gibi görünür (Riewald, Petrovan et al. 2002).

Antikoagulant özelliğine ilave olarak, APC, antiinflamatuvar ve antiapoptotik fonksiyonlara da sahiptir. Bu fonksiyonlar, APC, EPCR'ye ve PAR1'e bağlandığında gösterilir (Dahlback and Villoutreix 2005). APC inflamatuvar aracılardan (nörotransmitter) ekspresyonunu sınırlayarak ve dokulardaki lökositlerin damar dışına sızışını baskılayarak inflamatuvar cevabı azaltabilir (Yalcindag, Batioglu et al. 2008). PC antikoagulant yolağı, trombozu kontrol etmede, inflamatuvar cevabı sınırlandırmada, iskemi ve inflamatuvar sitokinlere cevaptaki endotel hücre apoptozisini potansiyel olarak azaltmada büyük rol oynayan bir sistemdir. APC'nin antiapoptotik, antiinflamatuvar ve antikoagulant özelliklerinin kombinasyonu, terapötik bir ajan olarak APC'yi cazip bir aday yapar (Esmon 2003). Şiddetli sepsis hayvan modellerinde inflamatuvar sitokin yükselmesini bastırır,

lökosit adezyonunu inhibe eder, lökosit kemotaksisini azaltır, endotel hücre apoptozisini azaltır, sfingozin-1-fosfat reseptörünün aktivasyonu boyunca olan ana endotel hücre bariyer fonksiyonuna yardım eder, şiddetli sepsisle bağdaştırılan kan basıncındaki azalmayı minimize eder. Bu fonksiyonların çoğu EPCR'ye bağlanmasına bağlıdır. Tüm bu yolak, kan koagülasyon prosesinin düzenlenmesi ve doğuştan inflamatuvar cevabın kontrolünde kritiktir (Esmon 2006).

Lökositlerle interaksiyon da inflamatuvar cevabın düzenlenmesi için EPCR'nin bağlanmasındaki diğer bir gözlemdir. Solubl EPCR (sEPCR), bir metalloproteazın hareketi boyunca endotelden salınır. Bu enzim, endotelin pherbol miristate asetatı (PMA) stimülasyonu ya da trombin interleükin-1 β 'ya (IL-1 β) cevapta aktive edilir (Xu, Qu et al. 2000). Klinik olarak, solubl reseptörün seviyeleri sepsisli ya da lupus erythematosuslu hastalarda artar. sEPCR Wegener granülomatosis'de otoantijen olan lökosit kaynaklı proteinaz III'e direkt olarak bağlanmayı kapsayan bir prosesdeki aktive olmuş nötrofillere bağlanır (Esmon 2003). Proteinaz III, aktive olmuş endotele sıkı lökosit bağlantısını içeren bir lökosit integrini olan Mac-1'e (CD11b / CD18) bağlanır. EPCR, bu integrin etkileşimlerini bloke ederek, lökositlerin sıkı bağlantısını blokeleyebilir (Esmon and Owen 1981).

PC yolağı, inflamatuvar cevaplar tarafından yapılan downregülasyona çok duyarlıdır (Yalcindag, Batioglu et al. 2008). EPCR ve trombomodulinin transkripsiyonu, tümör nekrozis faktör α (TNF α) ve diğer inflamatuvar araçlar tarafından inhibe edilir (Fukudome and Esmon 1994).

PC, vitamin K bağımlı bir serin proteaz zimojenidir. Kan koagülasyonunda önemli bir rolü vardır. Gr (-) sepsisin öldürücü etkilerini de önleyebilir. PC'nin eksikliği yaşamı tehdit eden trombofiliye yol açar. Koagülasyon sisteminin son enzimi trombin bir endotel yüzey proteini olan trombomoduline bağlandığında protein C aktive edilir (OMIM-600646).

PC sistemi fiziksel olarak önemlidir ve sistemi etkileyen genetik bozukluklar venöz trombozun en yaygın riskini oluşturur. Antikoagulant PC sisteminin fizyolojik önemi, homozigot PC yetersizliği ile doğan bebekleri etkileyen yaygın damar içi pıhtılaşma gibi şiddetli trombotik bir hastalık ile açıklanır (Dahlback and Villoutreix 2005).

APC'nin antikoagulant aktivitesi iki kofaktör tarafından çoğaltılır. Bunlar; vitamin K bağımlı protein S ve FV'in bozulmamış formudur. Protein S, FVa'nın inaktivasyonu için gereklidir. Halbuki, tenase kompleksteki FVIIIa'nın regülasyonu, protein S ve FV'nin ikisinin de sinerjistik APC kofaktör aktivitelerine ihtiyaç duyar. Protein C inhibitörü gibi proteaz inhibitörleri (α 1-antitripsin, α 2-macroglobin), APC'yi inhibe etse de, dolaşımdaki APC'nin yarı ömrü oldukça uzundur (Dahlback and Villoutreix 2005).

2.6.1.2. Trombin-Trombomodulin Kompleksi

Trombomodulin birçok domain ile kompleks bir moleküldür. Bu domainlere farklı fonksiyonlar atfedilir. N terminal domaini, karboksihidrat bağlayan proteinler olan lektinlerle benzer sekansa sahiptir ve PC aktivasyonunu kapsamaz. Lektin domainin antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gösterilir. Çözünebilir izole edilmiş domain ya da mevcut hücresel trombomodulin olarak iç içe geçmiş ve eklenmiş olsa bile, domainin varlığı, endotel hücre disfonksiyonu için basamak oluşturur ve endotel hücre aktivasyonunu içeren nükleer faktör kappa beta ve MAP - kinaz yollarını downregüle eder. Olasılıkla endoteldeki bir sinyal reseptör, ya lektin domaini tarafından bloklanır ya da lektin domaini bağlantısı vasıtasıyla negatif regülatör sinyalleri göndermek için açılır. MAP - kinaz sinyal yolağı, hastalık durumunda downregüle edildiğinde, bu antiinflamatuvar aktivite azaltılmaya başlanır. PC ve TAFI aktivasyonunu içermesine ilaveten, trombomodulinin epidermal growth faktör (EGF) domainleri atherosklerozisin olası gelişiminde ve yara iyileşmesinde de rol alır (Esmon 2003). Membranın üzeri, O - bağı şekerlerle şiddetli bir şekilde modifiye edilen ve sık sık bir kondroitin sülfatla modifiye edilen bir bölgedir. Kondroitin sülfatla modifiye edildiğinde trombomodulin trombinin yaklaşık 10 kez daha sıkı bağlar; antitrombin ve PC inhibitörü tarafından bağı trombinin inaktivasyonunu hızlandırır (Esmon 1989). Tüm insan trombomodulin molekülleri, kondroitin sülfat kısımlarına sahip değildir.

T-TM kompleksi yalnızca PC'yi aktive etmez, ayrıca plazmada mevcut bir fibrinolizis inhibitör olan TAFI'yi de (trombin aktive edebilen fibrinolizis inhibitörü) aktive edebilir. TAFI, T-TM kompleksi tarafından aktivasyonundan sonra fibrinden C terminal lizin rezidülerini çıkaran bir karboksipeptidaz B olarak fonksiyon yapan bir proenzim olarak dolaşır. Bu, fibrinolizisin inhibisyonuna neden olur. Çünkü bu lizinler plazminojen için bir

bağlanma bölgesi meydana getirirler ve aktivasyona aracılık eden doku plazminojen aktivatörü bu lizin rezidülerince stimüle edilir. TAFI için diğer substratlar onların C terminal arjinin rezidülerinin kaldırılmasıyla inhibe edilen pro-inflamator anaphylatoxinler C3a ve C5a'dır. TAFI'nın etkili aktivasyonu için T-TM kompleksinin yapısal ihtiyaçları PC'nin bu aktivasyonlarından çok az farklıdır. Böylece, TM'nin EGF3'ü TAFI aktivasyonu için önemlidir, oysa ki PC aktivasyonu PC'nin EGF4 ile etkileşimine dayanır (Dahlback and Villoutreix 2005).

2.6.1.3. Protein S

Protein S, çeşitli domainler içeren vitamin K bağımlı bir proteindir. Bu domainler, bir N terminal fosfolipid bağlayan Gla domaini, bir trombin duyarlı bölge (TSR), dört EGF-like domain ve iki laminin G tipi domaindir (Lam G) (Kurosawa, Stearns-Kurosawa et al. 1997). Protein S, negatif yüklü fosfolipid membranlar için yüksek afiniteye sahiptir ve APC ile membran bağlı bir kompleks oluşturur. Gla domaini, TSR, EGF1 ve EGF2, APC ile interaksiyon için önemlidir. APC ve Protein S arasındaki interaksiyon, FVa ve FVIIIa'daki kesim bölgelerine ilgisi olan aktif bölgenin uygun lokalizasyonu için önemli olabilen fosfolipid membran ve APC'nin aktif bölgesi arasındaki uzaklığı azaltmayı planlar. İki Lam-G domaini (özellikle Lam-G2), FVIIIa'nın degradasyonundaki FV ile protein S'nin sinerjistik APC kofaktör aktivitesi için önemlidir (Dahlback and Villoutreix 2005).

İnsan plazmasındaki Protein S yalnızca PC yolağının önemli bir komponenti değildir, ayrıca klasik tüm yolakların bir düzenleyicisi olan C4b-binding proteini (C4BP) ile de yüksek afiniteye bir kompleks oluşturması gibi bütün sistemlerin düzenlenmesine de katılır. İnsan plazmasında, Protein S'nin % 30 ile % 40'ı serbest protein olarak dolaşır, kalan kısmı ise C4BP'ye bağlı bulunur. Yalnızca serbest protein iken APC'ye bir kofaktör olarak fonksiyon yapabilir. Protein S, tüm sistemi ve apoptotik hücrelerin fagositozunu etkiler (Dahlback and Villoutreix 2005).

Protein S ve C4BP arasındaki interaksiyon Ca^{++} varlığında yüksek afiniteye sahiptir. C4BP için bağlanma bölgesi, C4BP'nin bağlanmasına katkıda bulunan bölgeleri ve iki Lam-G domainini içerir. C4BP, ahtapot benzeri bir yapı oluşturan tek bir β zinciri ve yedi özdeş α

zinciri ihtiva eden tek bir moleküler yapıya sahiptir (Kurosawa, Stearns-Kurosawa et al. 1997). Zincirler, ard arda sıralanan birçok tam kontrol protein (CCP) domainleri içerir (sekiz CCP içeren α zincir ve üç CCP'ye sahip β zincir ile). Her α zincir bir C4b molekülüne bağlanabilir (C4b, activated complement protein C4) ve onu kandaki komplemant (serumdaki proteinlerin kompleks sistemi) bir regülatör enzim olan faktör I için bir substrata dönüştürebilir. Böylece, C4BP klasik kompleman yolağın önemli bir regülatörüdür. β zincir CCP1'deki hidrofobik bir parça ile protein S'yi bağlar (Dahlback and Villoutreix 2005).

Protein S, apoptotik hücrelerde açığa çıkarılan negatif yüklü fosfolipid yüzeye bağlanır ve apoptotik hücrelerin patolojisine aracılık eder. Aksine, protein S-C4BBP kompleksinin bağlanması fagositik prosesi inhibe eder (Dahlback and Villoutreix 2005). Apoptotik hücre yüzeyine Protein S ve Protein S-C4BP komplekslerinin lokalizasyonunun, komplemanlara ek olarak koagülasyonun lokal downregülasyonuna katkısı olabilir. Bu gözlem, apoptotik hücrelerin civarında inflamasyon ve gözlenen koagülasyon aktivasyonunun yetersizliğinin nedenini açıklayabilir.

2.6.2. Endotel Hücrelerin Yüzeyindeki Protein C'nin Aktivasyonu

PC, bir gama-karboksiglutamik asit rezidüsüne (Gla) zengin domain, iki epidermal büyüme faktör (EGF) domaini, kısa bir aktivasyon peptidi ve serin proteaz (SP) domaininden ibarettir (Dahlback and Villoutreix 2005). Gla rezidüleri Gla domainindeki glutamik asit rezidülerinin bir vitamin K bağımlı posttranslasyonel karboksilasyonunun sonucu olarak ortaya çıkmıştır. Gla rezidüleri Ca^{++} 'u bağlar ve domainin özgü katlanması için önemlidir. PC / APC'nin Gla domaini, negatif yüklü fosfolipit membranlara ve üstelik EPCR'ye bağlanır. Her iki etkileşim de PC'nin fizyolojik fonksiyonu için önemlidir (Esmon 2000; Esmon 2003). T-TM-EPCR kompleksi vasıtasıyla PC'nin aktivasyonu boyunca, PC'nin aktivasyon peptidi serbest bırakılır ve serin proteaz domainin aktif konformasyonuna dönüştürülür.

Tüm vasküler endoteller TM içerir. Konsantrasyonu, özellikle endotel hücre yüzeyi ve kan hacmi arasındaki oranın doruğa ulaştığı yerdeki kapillerde yüksektir. Kapiller sirkülasyonundaki TM'nin yüksek konsantrasyonu, trombinin trombomoduline

bağlanmasını ve PC'yi aktive etmesini sağlar. Trombinin prokoagülant özellikleri TM'ye bağlandığında kaybedilir. Çünkü TM trombindeki fonksiyonel olarak önemli exosite I' i tutar ve böylece diğer trombin bağlayan proteinlerle etkileşimi bloklar. TM, birçok domaini içeren bir tip I transmembran proteinidir. Altı EGF domaini tarafından izlenen bir N terminal tip C lektin domaini, bir kondroitin sülfat kenar zinciri içeren Ser / Thr'ce zengin bölge, bir transmembran bölgesi ve bir kısa sitoplazmik kuyruktan oluşur (Esmon 2003). EGF domainleri PC'nin aktivasyonunda çok önemli bir rol oynar. Trombin, EGF5 ve EGF6'ya bağlanır. Esasında EGF4, PC'nin SP domainlerindeki 37,60,70 ve 148 looplarında lokalize olan rezidülerce oluşturulan bir pozitif yüklü kümeyle interaksiyona girer (Fuentes-Prior, Iwanaga et al. 2000; Esmon 2003). EPCR, PC'nin Gla domainine bağlanarak PC'nin aktivasyonunu artırır, böylece T-TM kompleksinin aktive edilmesiyle PC substratını düzene sokar. EPCR'nin PC'nin Gla domainine bağlanması için önemli olan fosfolipit bağlanma için bir fosfolipit bağlanma oluğu yaratan sekiz zincirli bir beta tabaka ve iki alfa helikse sahiptir (Dahlback and Villoutreix 2005). TM'ye bağlanan trombin, etkili bir biçimde antitrombin (AT) ve PC inhibitörü tarafından inhibe edilir. Kondroitin sülfat yanındaki zincir, inhibisyonu stimüle eder (Esmon 2003). Bu nedenle, TM birçok önemli antikoagülant özelliğe sahiptir. TM, trombini PC'nin bir aktivatörüne dönüştürür ve ayrıca trombinin inhibisyonunu hızlandırır.

2.6.3. APC 'nin Fonksiyonları

PC sisteminin komponentlerinin birkaçı, antikoagulant etkilerinden başka diğer biyolojik olayları da etkilerler. PC ve APC nötrofillerin göçünü ve nötrofillerin endotel hücre yüzeyine adhezyonlarını direkt olarak engeller. TM'nin lektin domaini direkt olarak antiinflamatuvar özelliğe sahiptir, NF- κ B'yı ve MAP-kinaz yolağını down regüle eder. TM-lektin domaininin eksikliğine sahip fare çalışmalarında, bu domainin, lökosit adhezyonunu azalttığı gösterilmiştir (Dahlback and Villoutreix 2005).

Protein S ve protein S-C4BP kompleksi antiinflamatuvar özelliklere sahiptir. Serbest protein S'nin antiinflamatuvar etkileri, negatif yüklü fosfolipide protein S'nin bağlanmasıyla ilişkilidir. C4BP, kompleman sistemin kuvvetli bir regülatörüdür ve protein S-C4BP kompleksinin negatif yüklü fosfolipid membranlara lokalizasyonu (örneğin, apoptotik hücrelerdeki) lokal antiinflamatuvar etkileri sağlar (Dahlback and Villoutreix 2005).

Faktör Va ve VIIIa inaktivasyonuna ek olarak, APC'nin hücresele seviyede antikoagülant, antiapoptotik ve antiinflamatuvar aktiviteye sahip olduğu gösterilir. Bu apoptotik aktiviteye en azından kısmen, PAR-1 kesiminde yer alan APC-EPCR kompleksi aracılık eder. APC'nin antiapoptotik aktivitesi, ya APC (EPCR bağımlı davranış) ya da PAR-1 aktivasyon peptidlerinin fareyi iskemik inmeden koruyabildiği gözlemiyle desteklenen PAR-1 aktivasyonu boyunca gözlemlenir. PAR-1'in APC'nin in vivo TNF α salınımını, monositlerden TNF α salınımını ve nükleer faktör kappa β nükleer translokasyonunu inhibe ettiği, invivo lökosit adhezyonunu bloke ettiği, PAR-1 aktivasyonunun artışıını bloke ettiği, PAR-1 aktivasyonunun arttığı doku faktörü ekspresyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Esmon 2003).

APC, invivo ortamda ve birçok hücre tipinde invitro olarak da direkt antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliklere sahiptir. Bu etkilerin çoğu, PAR-1'in proteolitik kesimine aracılık eden APC ve membrandaki PAR-1 ve EPCR'nin eşzamanlı olarak varlıklarına dayanır (Esmon 2000; Esmon 2003; Esmon 2004). PAR-1 bir 7 transmembran domainidir, trombin tarafından primer olarak kesilen G proteiniyle birleştirilmiş bir reseptördür. Reseptörün yeni N terminali, reseptörün proteolitik aktivitesinden sonra meydana çıkmıştır, böylelikle intraselüler sinyal olayları başlar (Sambrano, Weiss et al. 2001). APC'nin antiapoptotik etkilerinin çoğu, esas endotel hücreler ya da endotel benzeri hücre hatları kullanılarak gösterilmiştir. Kültüre edilmiş insan göbek veni endotel hücrelerinde, APC'nin, NF- κ β regulated genlerinin aşağı yönünü (downstream) bloke ederek gen ekspresyonunu etkilediği bulunmuştur. İnsan göbek veni endotel hücrelerinin APC ile muamele edilmesinden sonra, gen ekspresyon profili bir antiapoptotik ve antiinflamatuvar yöne değişmiştir (örneğin, apoptozisle alakalı genler bastırılmış, antiapoptotik mRNA transkriptleri ve proinflamatuvar sinyal yollarını downregüle ettiği bilinen genler upregüle edilmiştir). APC varyantları, sepsis ya da inmede terapotik değere sahiptir. APC'nin EPCR bağımlı ve PAR-1 bağımlı bir durumdaki göbek venleri ya da insan beyin endotelindeki sürekli değişim halindeki sitozolik Ca⁺⁺'u değiştirdiği bulunmuştur (Dahlback and Villoutreix 2005).

Ayrıca, APC, caspase-3 aktivasyonunun azalması, Bax / Bcl-2 oranının normalizasyonu ve tumor supressor p53'ün transkripsiyonel bağımlı inhibisyonu boyunca hipoksik insan beyin endotelinde apoptozisi engellerler. APC'nin bu etkileri EPCR ve PAR-1'e bağımlıdır. Ayrıca, hem faredeki inme modelinde hem de kültüre edilmiş kortikal

nöronlarda EPCR bağımlı ve PAR-1 bağımlı APC'nin nöroprotektif olduğu da gösterilmiştir. In vivo yararlı etkilerin endotel hücrelerin apoptozisini azaltıp azaltmadığı, kan akışı boyunca antiinflamatuvar etkilere aracılık edip etmediği, nöronlardaki direkt sitoprotektif etkilere sebep olup olmadığı henüz tam olarak belirlenmemiştir. İnmeli aynı fare modelinde, protein S'nin aynı şekilde nöroprotektif olduğu saptanmıştır, ancak mekanizması tam olarak bilinmemektedir (Dahlback and Villoutreix 2005).

APC, üstelik, EPCR bağlanması ve PAR-1 kesimiyle ilişkilendirilmeyen antiinflamatuvar özellikleri de eksprese edebilir. APC, TNF α ve IL-1'in üretiminin azalmasıyla sonuçlanan monosit aktivasyonunun ve endotoksin, PMA ve interferon γ meydana getiren yollarını ve kesin membran reseptörlerinin (CD11b, CD14, CD18) downregülasyonlarının korunmasını inhibe eder (Dahlback and Villoutreix 2005).

2.6.4. Protein C Yolağının Fizyolojisi

Trombomodulin endotel üzerinde lokalize olur. Genelde immün doku kimyası ile her endotel hücrenin kopya sayısı ortaya çıkar, kopya sayısı için çeşitlilik vasküler yataklar arasında 10 kattan daha azdır (Trombomodulin ekspresyonunun çok düşük olduğu beyin mikrosirkülasyonu bir istisnadır) (Esmon 2003). Endotel hücrenin kan hacmine oranı, kan geniş damarlardan kapillere taşınırken yüzlerce kat artar. Her endotel hücresi başına 100.000 trombomodulin kopyası olduğu varsayıldığında, kapillerdeki trombomodulin konsantrasyonunun makul bir tahmini 100-500 nmol / L arasındadır. Trombomodulin trombine yaklaşık 1-10 nmol / L'lik bir Kd ile bağlanır, bu da kondroitin sülfatın varlığına bağlıdır. Bu yüzden trombin vasküler yataklar boyunca geçerken trombomodulinin yüksek konsantrasyonları trombinin prokoagülant reaksiyonlarının direkt bloke edildiği inhibitörler vasıtasıyla hızlı trombin inaktivasyonuna ve hızlı PC aktivasyonuna öncülük ederek hemen hemen tüm trombin ortadan kaldırma eğiliminde olacaktır (Esmon and Owen 1981; Esmon 1989; Esmon 2001). Bu anlayış ile, PC yolağındaki şiddetli bozukluklar mikrovasküler tromboz ile ilişkilidir. Özellikle derinin (purpura fulminans) PC bozukluğu varlığında, bu lezyonların gelişmesi ve tersine çevrilmesi (doku ölümlerinin olmadığı varsayılınca) PC'nin yönetimiyle hızlı bir şekilde engellenir ve tersine çevrilebilir. Bu lezyonlar septik hastalarda, özellikle de PC suplementasyonunun kısa bir

süre için lezyon gelişimini durdurur gibi görüldüğü meningokoksemili hastalarda görünebilene benzerlik gösterir (Esmon 2003).

2.6.5. Protein C Yolağının Regülasyonu

Down Regülasyon: Hem trombomodulin hem EPCR, IL-1 β ve TNF α gibi inflamatuvar sitokinler tarafından transkripsiyonel seviyede downregüle edilebilir (Fukudome and Esmon 1994). Ek olarak, trombomodulin aktivitesi lökositlerden salınan oksidantlar tarafından dramatik bir şekilde azaltılabilir. Son olarak lökosit elastas selüler formundan oldukça az aktiviteye sahip trombomodulinin solubl formlarını hızlı bir şekilde serbest bırakır, çünkü onlar EPCR hızlandırma etkisine çok fazla sahip değildirler ve yüksek afinite trombin bağlanması için kondroitin içermezler. Damar duvarındaki bu inflamatuvar saldırının net etkisi PC aktivasyonunu ve trombomodulin ekspresyonunu azaltmak içindir. Bu, meningokoksemili hastaların bir alt grubunda gösterilir ve şiddetli sepsislilerdeki APC seviyelerinin direkt denemeleri, PC aktivasyon disfonksiyonunun epeyce bir çeşidini gösterir (Esmon 2003). Trombin ve IL-1 β , PC aktivasyon potansiyelini azaltan sEPCR'nin salınımına öncülük edebilir (Xu, Qu et al. 2000). Bu, trombin varlığında her nasılsa *EPCR* gen transkripsiyonundaki bir trombin artış vasıtasıyla dengelenir. Hücrel olarak salınan proteinler, PC aktivasyonunu inhibe edebilir. Eozinofil major ana proteini, potansiyel olarak hipereozinofilik kalp hastalığındaki tromboza katkıda bulunan trombomodulin bağımlı PC aktivasyonunun potansiyel bir inhibitörüdür (Esmon 2003).

Up Regülasyon: İn vitroda Platelet faktör IV'ün PC aktivasyon oranlarını yaklaşık 4 kat arttırdığı gösterilmiştir (Esmon 2003). Vasküler hasar bölgesindeki trombositlerden platelet faktör IV'ün salınımı, hasarlı bölgenin trombus büyümesini sınırlamak için potansiyel bir mekanizma sağlar.

2.7. ENDOTELYAL PROTEİN C RESEPTÖRÜ (EPCR)

PC antikoagulant yolağı, koagülasyon ve inflamasyon arasındaki ara yüzey noktasında durur. Yolağın en son tanımlanan üyesi endotelial protein C reseptörüdür (EPCR). EPCR,

koagülasyonun düzenlenmesinde, antiinflamatuvar ve antiapoptotik proseslere aracılık eden PC'yi aktive etmede önemli bir rol oynar (Qu, Wang et al. 2006).

EPCR, endotelial hücrelerin yüzeyinde bulunmuştur, bir tip I transmembran proteindir. APC'nin oluşumunu hızlandıran ve inflamatuvar cevabın düzenlenmesinde rol aldığı düşünülen bu reseptör, çoğunlukla büyük damar endotelinde sentezlenir (Zecchina, Bosio et al. 2002; Esmon 2004). Trombin-trombomodulin kompleksi vasıtasıyla PC'nin aktivasyonu, PC EPCR'ye bağlandığında artar (Yalcindag, Batioglu et al. 2008). PC'nin EPCR ile interaksyonu, trombin-trombomodulin kompleksinin ilgisini arttırarak PC aktivasyonunu uyarır. Bir endotel hücre spesifik PC reseptörü olan EPCR, PC ve APC'ye benzer afinite ile bağlanabilir (Taylor, Peer et al. 2001; Ulu, Gunal et al. 2007).

İlk olarak geniş kan damarlarının endotelinde bulunmuştur. Fakat, dendritik hücreler ve lökositlerde de ifade edilir. Bu dendritik hücre ekspresyonu doğuştan gelen bağışıklıkta önemli çıkarımlara sahip olabilir (Yalcindag, Batioglu et al. 2008). EPCR üstelik doğuştan bağışıklıkta rol oynayan dendritik hücrelerde de bulunur (Esmon 2006). Bu dendritik hücre ekspresyonu, vasküler endotelde trombomodulin ve EPCR seviyeleri azaltıldığında inflamatuvar bağırsak hastalıklarında önemli olası etkilere sahip olabilir.

APC-EPCR-PAR-1 sinyali, yara iyileşmesinde kuvvetli bir rolü olan insan keratinosit proliferasyonunu arttırır. PAR-1'in APC aktivasyonu sepsis gibi inflamatuvar hastalıklarda önemlidir (Esmon 2006).

EPCR, APC inflamatuvar aktivitesine aracılık eden akciğer pnömositlerinde de gözlenmiştir (Esmon 2006). Böylece, şiddetli inflamatuvar akciğer hastalıklarında koruyucu etkilere sahip olabilir.

EPCR'nin düşük ekspresyon seviyeleri nötrofillerde de saptanmıştır. Bu reseptöre bağlanan APC ya da potansiyel olarak PC'nin nötrofil kemotaksisini inhibe ettiği öne sürülür (Esmon 2006). PC'nin bu inhibitör fonksiyonunu, APC ile paylaşıyor gibi görünmesi ilginçtir. Fakat, bunun nasıl gösterildiği net değildir. Çünkü EPCR'nin sitoplazmik kuyruğu son derece kısadır (RRG) ve bundan dolayı, bilinen sinyal motiflerinden yoksundur.

EPCR, kalp ve akciğerdeki venler ve arterlerin endotel hücrelerinde güçlü bir şekilde, akciğer ve derideki kapillerde son derece az eksprese edilir, karaciğer ve böbreklerin küçük damar endotelindeyse hiç eksprese edilmez (Ye, Fukudome et al. 1999).

PC antikoagulant yolağı, kan pıhtılaşma kaskadının negatif regülasyonunda kritiktir (Esmon 2003). EPCR de bu yolda önemli rol oynar (Esmon 2000). EPCR, immun cevaba katılan Major histocompatibility class 1 / CD1 protein ailesiyle homoloji gösterir (Fukudome and Esmon 1994). CD1 ailesinin varlığında, bu moleküllerin glikolipidlere bağlandığı gösterilir ve mevcut antijenler tüberkülozdaki gibi bakteriyel invazyondan vücudu korumayı kapsayan immün reaksiyonları T hücrelerine sağlar. CD1 ailesi üyeleri gibi EPCR de bir lipide sahiptir. Bu fosfolipid varlığında, EPCR, antijen sunuş oluğuna bağlanır. Bu lipid sıkı protein bağlanması için gereklidir, fakat bakteriyel mücadeleyle ilişkili immün reaksiyonlardaki rolü bilinmemektedir. Oysa ki EPCR'ye bağlanan bloklanmış PC / APC, düşük dozda *E.coli* infüzyonuna Habeş maymununun koagülant (fibrinojendeki büyük azalış ve d-dimerindeki artış) ve inflamatuvar (IL-6 artışı) cevabını şiddetlendirir (Esmon 2003).

Bir transmembran proteini olmasına rağmen EPCR'nin solubl formu da plazmada saptanmıştır (Kurosawa, Stearns-Kurosawa et al. 1997; Qu, Wang et al. 2006). sEPCR, bir metalloproteazın aracılık ettiği endotelden ektodomain salınımı ile üretilir (Xu, Qu et al. 2000). sEPCR, PC ve APC'ye yüksek afiniteyle bağlanır. Fakat, APC'ye bağlanması APC'nin antikoagulant aktivitesine engel olmaktadır (Liaw, Neuenschwander et al. 2000). sEPCR seviyesinin yükselmesi muhtemel hastalık süreçlerinin çeşitli temellerini oluşturan geniş damarlardaki endotelin trombin aktivasyonunu yansıtır. Ama sEPCR'nin fizyolojik önemi *invivo* olarak çok iyi bilinmemektedir. sEPCR seviyelerinin sistemik inflamatuvar bozukluklarda ve sepsisli hastalarda arttığı bulunmuştur (Ulu, Gunal et al. 2007). Koagülasyona aracılık eden EPCR'nin fonksiyon kaybına yol açan mekanizmalardan biri de plazmadaki sEPCR'nin artan seviyeleridir. sEPCR seviyeleri sağlıklı denekler arasında çeşitlilik ve bimodal dağılım gösterir. *EPCR* haplotipleri sEPCR'nin artan plazma seviyeleri ile ilişkili bulunmuştur (Saposnik, Reny et al. 2004; Ulu, Gunal et al. 2007). sEPCR'nin azalan seviyeleri antikoagulant tedavi boyunca gözlenmiştir (Stearns-Kurosawa, Swindle et al. 2002) ve ana retinal ven tıkanmasına sahip hastalarda sEPCR seviyeleri önemli bir şekilde yan retinal ven tıkanmasına sahip olanlardan ve kontrollerden daha yüksek bulunmuştur (Yalcindag, Batioglu et al. 2008).

EPCR'deki anormallikler, değiştirilmiş trombotik eğilimler ve bulaşıcı ajanlara hiper inflamatuvar cevaplarla ilişkili olabilir. Farelerde, *EPCR* ekspresyonundaki artışların ve azalışların, koagülasyon ve inflamatuvar prosesi ayarladığı gösterilmiştir. Genetik polimorfizmler, protein ekspresyonu, ailesel ve kazanılmış trombotik hastalıklardaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir. *EPCR* genotipinin anlaşılması, hastalardaki trombotik olayların riskinin teşhisine yardım edebilir (Esmon 2006).

EPCR Geni 20q11.2 de lokalizedir (OMIM-600646). Transkripsiyon başlama noktası translasyon başlama (met) kodonunun 79 baz çifti yukarısındadır (upstream) ve TATA kutusunun 84 bazçifti aşağısındadır (downstream) (Hayashi, Nakamura et al. 1999; Simmonds and Lane 1999). Promotor bölgesinde AP1, SP1 ve AP2 bağlanma bölgeleri tanımlanmıştır (Hayashi, Nakamura et al. 1999). 4 ekzon içerir. Ekzon 1, 5' UTR'ı ve sinyal peptidi kodlar. Ekzon 2 ve 3, ekstraselüler bölgenin çoğunu, ekzon 4 ise transmembran domainini, sitoplazmik kuyruğu ve 3'UTR'ın çoğunu kodlar (Simmonds and Lane 1999). *EPCR*, CD1 ve MHC sınıf 1 proteinleriyle iki boyutlu yapı açısından benzerdir. İki α heliks bölgesini ayakta tutan 1 β sheet tabakasıyla katlanır. Bu, PC ve APC için potansiyel bir bağlanma oyuğu oluşturur (OMIM-600646).

EPCR, 49 kD'luk bir protein olarak eksprese edilir, bu deglikozilasyonla 25 kD'a düşürülür. 238 aminoasitlik bir transmembran proteini olan *EPCR*, 15 amino asit N terminal sinyal sekansı, 4 potansiyel N-glikolizasyon bölgesi ve 4 Cys residüsüyle bir ekstraselüler domain, bir C terminal 25 amino asit transmembran bölgesi ve yalnızca 3 amino asitten oluşan kısa bir sitoplazmik kuyruktan oluşur. Northern blot analizi, yalnızca endotel hücre hatlarında 1,3 kb *EPCR* transkriptinin yüksek seviyelerini ortaya koymuştur (OMIM-600646).

2.8. EPCR DOKU VE PLAZMA SEVİYELERİNİ ETKİLEYEN YAYGIN EPCR GEN POLİMORFİZMLERİ

EPCR geninde farklı mutasyonlar ve polimorfizmler bulunmuştur. Bunlardan bazıları tromboz riskiyle ilişkilidir (Akar, Gokdemir et al. 2002; Saposnik, Reny et al. 2004). *EPCR* mutasyonları üstelik çocuklarda şiddetli yaygın enfeksiyon (sepsis) riskine de etki

eder (Sipahi, Pocan et al. 2006). EPCR'nin bir diğerk fonksiyonu ise, septik Őoka cevabı dűzenlemektir (Yalcindag, Batioglu et al. 2008).

EPCR genindeki ya da plazma sEPCR seviyelerindeki varyasyonlar tromboz riskini etkiler. Gendeki bir fonksiyon kaybına yol aĀan mutasyonlar membran űzerinde azalan EPCR aktivitesine yol aĀar. Bűylece APC oluŐumu azalır, daha az FVa ve FVIIIa inaktivasyonu gerĀekleŐir ve bu, daha fazla trombin űretimine yol aĀar. Tromboz riskinde artıŐ meydana gelir. Diğerk yandan, EPCR'nin aŐırı ekspresyonu azalan tromboz riskiyle sonuĀlanabilir. Plazmadaki sEPCR seviyesinin venűz tromboz riskini etkileyip etkilemediđi net deđildir. Hipotetik olarak; yűksek olduđu kadar dűŐuk plazma sEPCR seviyeleri de riski arttırabilir. Artan plazma sEPCR seviyeleri, daha yűksek bir trombotik riskle iliŐkilendirilebilir. Āűnkű, sEPCR hem PC aktivasyonunu hem de APC antikoagulant aktivitesini inhibe eder. Ayrıca, yűksek sEPCR, membran űzerinde dűŐuk EPCR seviyesine yol aĀabilir ve azalan PC aktivasyonuna iŐaret edebilir. Ancak, aksine, dűŐuk plazma sEPCR ekspresyonunu da yansıtabilir, bu da azalan APC oluŐumuna neden olur, bűylelikle de artan tromboz riskine neden olabilir (Uitte de Willige, Van Marion et al. 2004).

EPCR geninin 3. ekzonunda endotel yűzeyinde eksprese edilmeyen kısa bir proteinin sentezine yol aĀarak *EPCR* fonksiyonunu deđiŐtiren 23 baz Āiftlik bir insersiyon (4031ins23) tanımlanmıŐtır (Zecchina, Bosio et al. 2002; Ulu, Gunal et al. 2007). 23 bĀ'lik insersiyon, 5 aminoasitin insersiyonuna ve proteinin erken sonlanmasına neden olur. Bűylece proteini kısa bırakarak PC aktivasyonunun azalmasına yol aĀar. Bu, arteriel ve venűz tromboz riski olarak űne sűrűlűr (Zecchina, Bosio et al. 2002) ve fetal kayıplarla iliŐkilendirilir (Franchi, Biguzzi et al. 2001). Mutasyonla olan fonksiyon kaybı basal Őartlarda iyi tolere edilse de azalan PC aktivasyon kapasitesi muhtemelen APC űretiminin azalmasını gerektiren Őartlarda (trombozis, sepsis ve inflamasyon gibi) kritik olmaya baŐlar. Bu Őartlarla iliŐkilendirilmiŐ belirgin bir sitokin űretimi, normal *EPCR* allelini downregule edebilir (in vitro TNF- α 'nın EPCR ekspresyonunu downregűle etmesi gibi) (Fukudome and Esmon 1994). Trombofilik hastalarda tanımlanmasına rađmen, trombozda bu mutasyonun rolűnű tayin etmek dűŐuk alelik sıklıktan dolayı zordur (Ulu, Gunal et al. 2007).

Dođal antikoagulant yolaklardaki polimorfizmler bir fonksiyon kazanımıyla da sonuĀlanabilir ve bűylece venűz tromboembolizm (VTE) riskinde bir azalmaya neden

olurlar. *EPCR* geninin 4. ekzonunda iki polimorfizm tanımlanmıştır (c.4678G>C ve c.4600A>G (farklı numaralandırmalar da mevcuttur)). Bunlar, *EPCR* genindeki 4 farklı haplotipin ikisinin temsilcileri olan tek nükleotid polimorfizmleridir.

Ekzon 4'de lokalize olan *EPCR* c.4600A>G değişimi (SNP no: rs 867186) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), reseptörün transmembran bölgesinde bir aminoasit değişimini (Ser219Gly) öngörür. G alleli artan sEPCR seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir (A3 haplotipi) ve VTE'nin artan riskiyle bağdaştırılmıştır (Medina, Navarro et al. 2005). EPCR plazma seviyeleri lupus gibi bazı hastalık durumlarında normal kişilerdekinden daha yüksektir. Plazma EPCR seviye varyasyonu daha dikkatli bir şekilde incelendiğinde, sEPCR seviyelerinin bir bimodal yada trimodal dağılım gösterdiği görülmektedir. A3 Haplotipinde, kodlanan sekanstaki değişiklik, EPCR'nin transmembran-kapsayan domaini içindeki 219. rezidüde Serinin Glisinle yer değiştirmesiyle sonuçlanır. Glisin büyük olasılıkla transmembran heliksini stabilize ettiği için; değişiklik, belki EPCR salınımına katkıda bulunduğu bilinen metalloproteaza duyarlılığını ve membran içindeki EPCR'nin lokasyonunu etkileyecektir (Esmon 2006). Farklı haplotiplerle transfekte edilmiş hücreler çalışıldığında, A3 haplotipiyle transfekte edilenlerin daha fazla salınan sEPCR'ye sahip olduğu ve EPCR salınımını arttıran inflamatuvar araçlarla maruz bırakıldığında A1 haplotipi ile transfekte edilen hücrelerden daha fazla sEPCR'ye sahip oldukları gösterilmiştir (Qu, Wang et al. 2006). A3 haplotipi venöz tromboz için bir risk faktörü olarak görülür. Yükselen plazma EPCR seviyeleri açıklanmamış fetal ölümün artan riskiyle ilişkili bulunmuştur. A3 haplotipi ayrıca koroner kalp hastalığında da risk arttırıcı olarak saptanmıştır (Esmon 2006). Protrombin aktivasyonunun yükselen belirteçleri (fragment1-2) ve artan plazma sEPCR seviyeleri bu haplotiple ilişkilendirilmiştir. A3 haplotipi ve yükselen protrombin aktivasyonu arasındaki korelasyon göz önüne alındığında, bu haplotip tarafından yönlendirilen artan plazma EPCR seviyelerinin trombotik hastalıklara katkıda bulunduğu sonucuna varılmaktadır.

A3 haplotipi varlığında plazma sEPCR seviyeleri artar ve PC aktivasyonu azalır. A3 haplotipi endotel hücrelerdeki hücresel salınımı artırır ve böylece, bu haplotipi taşıyan hastalarda görülen yüksek sEPCR seviyelerinin artmasına muhtemelen direkt olarak yardımcıdır (Qu, Wang et al. 2006). Daha az yaygın olan A3 haplotipi A2 haplotipinden 4 nükleotid pozisyonunda farklılık gösterir (A3; 1651. nt G, 3610. nt C, 4216. nt A, 6936. nt G). A3 haplotipinin dağılımı cinsiyetle alakalı bulunmuştur. Derin ven trombozlu erkeklerde daha sık görülür. Böylece A3 haplotipinin erkeklerde tromboz riskini arttırdığı

görülür, fakat, kadınlarda sEPCR seviyesi A3 haplotipi taşıyanlarda artsa bile tromboz riskini arttırmadığı gözlenmiştir. Geniş arterial damarlardaki EPCR ekspresyonunun yüksek seviyeleri, hemostazı sağlayan PC aktivasyonunu promote eder. Venoz tromboz ve miyokard enfaktüs için farklı populasyonlarda *EPCR* gen ekspresyonu ve mutasyonları (özellikle 23 bç lik insersiyon) çalışılmıştır (Ulu, Gunal et al. 2007). Fakat yüksek sEPCR seviyelerinin etkisi ve bunun A3 haplotipiyle alakası (arterial trombozdaki) hala tam olarak bilinmemektedir. A3 haplotipinin *EPCR* genindeki sıklığı c.1651C>G polimorfizmi ile izlenir. 1651. nükleotiddeki tek nükleotid polimorfizmi, *EPCR* geninin promotor bölgesinde, başlangıç kodonunun 886 nükleotid upstreamında lokalize olur. Yapılan bir çalışmada yüksek sEPCR seviyeleri homozigot ya da heterozigot olarak A3 haplotipini taşıyanlar, sEPCR seviyeleri 100 ng / ml'nin altındaki hastaların hiçbirisi A3 haplotipi taşımamıştır. A3 haplotipi ve artan sEPCR seviyeleri arasında güçlü bir bağlantı vardır. Artan sEPCR seviyeleri kontrollerle kıyaslandığında pediatrik yaşta inme riskini artırır. sEPCR'nin yüksek plazma seviyeleri, koagülasyona aracılık eden EPCR'nin fonksiyonunu kaybetmesine öncülük eder. *EPCR* 1651G alleli inme riskini 3.2 kat artırır. Azalan APC de A3 ile ilişkili bulunmuştur ve tromboz için bir risk faktörüdür (Saposnik, Reny et al. 2004; Ulu, Gunal et al. 2007). Çünkü PC aktivasyonunu düşürerek antikoagülasyonu inhibe eder. A3 hücre hattı transkripsiyonu A1 hücre hattından 5-7 kat daha fazladır (Qu, Wang et al. 2006).

Diğer bir polimorfizm de 3'UTR'da lokalize olan c.4678G>C değişimidir (SNP no: rs9574) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), dolaşımdaki APC'nin artan seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir ve VTE riskini azalttığı öne sürülmüştür (A1 haplotipi). FVL taşıyıcılarında, *EPCR* geninde 4678C allelinin varlığı VTE riskini azaltan, telafi edici bir antitrombotik etkiyi meydana getirir (Medina, Navarro et al. 2005). *EPCR* 4678CC genotipini taşıyanlar 4678GC ya da 4678GG taşıyanlara oranla ilk trombotik olaylarını önemli derecede geç tecrübe ederler. 40 yaşında hala trombozdan yoksun olma olasılığı 4678C taşıyanlarda, 4678 GC,GG taşıyanlara oranla daha yüksektir. Ayrıca, 4678 C alleli ve CC genotipinin sıklığı asemptomatik FVL taşıyıcılarına kıyasla semptomatik FVL taşıyıcılarında daha düşüktür. 4678CC genotip sıklığı sağlıklı kişilerde VTE'li hastalardan daha yüksektir. Yani, 4678CC genotipi VTE'ye karşı koruyucudur. Ayrıca, ortalama APC seviyesi, 4678CC genotipi taşıyanlarda 4678 GC,GG taşıyanlara oranla önemli ölçüde daha yüksektir. Bu değerler hem kontrollerde hem de VTE'li hastalarda gösterilmiştir (Medina, Navarro et al. 2005).

FVL taşıyıcılarındaki koruyucu etkisiyle ilişkilendirilen 4678 CC genotipi, CC genotipi taşıyan sağlıklı kişilerde ve VTE hastalarında daha önce gözlenen plazma APC seviyelerindeki artışla ilişkilendirilebilir. Ancak, c.4600A>G polimorfizmi FVL mutasyonu taşıyanlarda VTE riskini etkilemez. 4600G alleli ve 4600AG genotipinin sıklığı, semptomatik ve asemptomatik FVL taşıyıcılarında benzerdir. Çalışmalar, c.4600A>G polimorfizminin VTE riskini etkilemediğini gösterir. Fakat Spaposnik ve ark., 4600G allelinin erkek taşıyıcılarının VTE'nin artan riskine sahip olduğunu göstermiştir (Medina, Navarro et al. 2005).

VTE riski ile c.4678G>C polimorfizminin ilişkisini açıklayan moleküler mekanizma henüz tanımlanamamıştır. *EPCR* c.4678G>C polimorfizmi, *EPCR* genindeki 1451C>T, 1541G>A, 2532T>C, 3428T>C ve 3997T>C polimorfizmiyle tam bir linkaj içindedir. 4678C allelinin (haplotip 1) kendi kendine APC seviyelerini arttırmaya neden olup olmadığını ya da *EPCR* geninin bu haplotipindeki 4678C ile bağlantılı diğer varyasyonlardan dolayı mı olup olmadığını bilinmemektedir. PC bir zimojendir. Antikoagulant fonksiyonunu göstermesi için aktive edilmeye ihtiyaç duyar. PC aktivasyonu, endotel hücre membranındaki *EPCR* konsantrasyonuna orantılı gibi görünür. Böylece, *EPCR* ekspresyonundaki 4678C alleli ile ilişkili bir artış, plazma APC seviyelerindeki artışı açıklar. Fonksiyonel transkripsiyon bağlama bölgeleri genelde genin promotor bölgesinde lokalize olur. Fonksiyonel transkripsiyon bağlanma bölgesinin 3'UTR'da olduğu örnekler de vardır. Alternatif olarak, 4678C alleli artan mRNA stabilitesi ve protein ekspresyonuyla da ilişkilendirilir. Birçok tromboz hastası, bir yatkınlık yaratan genetik ve / veya çevresel risk faktöründen daha fazlasına sahiptir ve riskin yatkınlık yaratan faktörlerin sayısına oranla arttığına dair kesin kanıtlar vardır. Doğal antikoagulant yolaklardaki diğer polimorfizmler bir fonksiyon kazanımı meydana getirebilir ve böylece VTE riskinde bir azalış meydana gelir. 4678C varyasyonu ya da onunla bağıntıda olan diğer varyasyonlar artan *EPCR* sentezini ve PC aktivasyonunu meydana getirir. APC'nin plazma konsantrasyonundaki böyle bir artışın sonucu; başlangıç yaşında bir gecikme ya da VTE riskinde bir azalıştır. 4678 CC genotipli FVL mutasyonu taşıyıcıları GG ya da GC genotipi taşıyanlardan 3 kat daha az VTE riskine sahiptirler. Bu, 4678CC genotipi taşıyan kişilerde daha önce gözlenen yüksek APC seviyelerinden dolayı olabilir (Medina, Navarro et al. 2005).

Medina ve ark. (Medina, Navarro et al. 2005) A3 haplotipinin ve 3'UTR'daki ilave bir dimorfizmin (A1 Haplotipinin) (3'UTR, 4678G>C değişimi) FVL'li hastalardaki tromboz sıklığındaki katkısını analiz etmiştir ve A3 haplotipinin etkisi olmadığını gözlemlemiştir, ancak 4678CC genotipi ile tromboz oluşumu arasında azalan bir sıklık gözlemlemişlerdir. Belki bu gözlemin temeli, EPCR ekspresyon seviyelerini arttırabilen bu EPCR mRNA'sının kuvvetli stabilitesi üzerine oturabilir.

EPCR haplotipleri ve tromboz riski arasında henüz güçlü bir ilişki bulunmasa da, PC ve sEPCR seviyesi arasında bir bağlantı vardır (Ulu, Gunal et al. 2007).

2.9. MOLEKÜLER TEKNİKLER

2.9.1. Çözeltiler ve Solüsyonlar

Bu çalışmada, DNA izolasyonunda kırmızı kan hücrelerini lize etmek için; RBC lizis çözeltisi, fenol / kloroform karışımı; polimeraz zincir reaksiyonu ürünlerini görmek için kullandığımız agaroz jeli hazırlamak için; TBE (Tris- HCl Borik asit EDTA), TAE (Tris-HCl Asetik asit EDTA) çözeltileri; SSCP jeli hazırlamak için; akrilamid-bisakrilamid çözeltisi, amonyum per sülfat çözeltisi ve TEMED solüsyonları kullanılmıştır (Sambrook 1989).

2.9.2. DNA Ekstraksiyonu

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

2.9.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Hücreden kaynaklanmış bir yöntem olarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA klonlanmasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur ve pek çok durumda konakçı hücrelerin kullanıldığı klonlamanın yerini almıştır. Yani, bir çeşit in vitro klonlamadır (Öner 2000).

PCR, hedef DNA dizilerinin invitro koşullarda çoğaltılmasıdır. İlk olarak 1985 yılında Kary Mullis tarafından geliştirilmiş olan bu yöntem, bir dizi DNA polimeraz reaksiyonu içerdiğinden, polimeraz zincir reaksiyonu olarak adlandırılmaktadır. 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).

Polimeraz zincir reaksiyonu, spesifik DNA dizilerinin invitro enzimatik sentezlerinin metodudur. Bu spesifik bölgelerin sınırlarını oluşturmak için değişik sayıda ve uzunlukta oligonükleotit primerler kullanılır, bunlar karşı anlamlı kalıp iplikçiklere bağlanırlar. Ardarda tekrarlayan döngüler serisi; kalıp DNA'nın tek iplikçikli hale getirilmesi, primerlerin kendi eşlenik bölgelerine yapışması, yapışan primerlerin DNA polimeraz ile DNA sentezlenmesi olarak gerçekleşir. Döngüler serisi sayesinde ürün miktarı logaritmik olarak artar. Primer uzatılması safhasında sentezlenen ürünler bir sonraki döngüde kalıp görevi görür. Bu sayede hedef DNA kopya sayısı her döngüde yaklaşık olarak iki katına çıkar. Böylece 20 döngü sonunda polimeraz zincir reaksiyonu yaklaşık bir milyon kat (2^{20}) ürün verir. *Thermus aquaticus*'un termostabil DNA polimerazının izole edilerek kullanılması büyük kolaylık yaratmıştır. Reaksiyon bileşenlerinin (kalıp, primerler, dNTP, tampon) tek tüp içinde toplanmasıyla reaksiyon basit bir sıcaklık döngüler zinciri haline gelmiştir. Çeşitli reaksiyon parametrelerinin (enzim, primer, Mg^{++} konsantrasyonu, sıcaklık döngü profili) değiştirilmesiyle spesifikliğin ve üretimin artırılması mümkündür (Akar 1999; Öner 2000).

Polimeraz zincir reaksiyonunun özgünlüğü ve hedef bölgenin çoğaltılmasının kontrolü jel elektroforezinde yapılır. Uygun primerin ve uygun yapışma sıcaklığının kullanımıyla istenmeyen sekansların üretilmesi engellenmiş olur. Bu etki genellikle jel profillerinin doğru yorumlanmasını sağlar. Polimeraz zincir reaksiyonu primer olarak istenen hedef bölgeyi çoğaltmakta kullanılsa dahi aynı zamanda eldeki bazı dizileri kısmen değiştirmek için de kullanılan oldukça güçlü ve kullanışlı bir tekniktir. Primer dizileri fiziksel olarak hedef bölgenin içinde yer aldığı için kalıpla primerin 5' ucundaki bazı çapraz, uygunsuz yapışmaları tolere edebilmektedir. Bu yolla sentetik primerlerdeki bazı değişiklikleri kullanarak yeni sekanslar oluşturmak mümkün olabilmektedir. Buna "site directed mutagenesis" denmektedir. Bu sayede bir klonlama yapılırken doğal olarak restriksiyon kesim noktaları yaratmak da mümkün olabilmektedir. Bu yöntemle ayrıca delesyon, insersiyon, nükleotit değişimleri gibi mutasyonlara özel ürün çoğaltmak da mümkün olabilmektedir (Saiki, Gelfand et al. 1988).

Polimeraz zincir reaksiyonunun bir başka önemli özelliği de tanısal uygulamalarda kullanımında iyi işlenmemiş, yeterli saflıkta olmayan, az miktarda ve hasar görmüş DNA'larda da iyi sonuç alınmış olmasıdır (Saiki, Gelfand et al. 1988).

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerektirir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı diziler ile hibridize olur. Isıya dayanıklı bir polimeraz, deoksinükleotid trifosfatları (dNTP; A, C, T, G) kullanarak çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. Polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle Tris ve KCl), ayrıca önemli olan bir kofaktör olan Mg^{+2} iyonları gereklidir (Öner 2000).

Polimeraz zincir reaksiyonunda, çoğaltılacak hedef gen bölgesi seçildikten sonra ilk adım, yüksek sıcaklık ile DNA'nın iki zincirinin birbirinden ayrılma evresi olan denatürasyondur. Çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincir haline getirilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar 90-95 °C 'de yaklaşık 5 dakika süreyle ısıtılır. İnsan genomik DNA'sı için 94-98 °C uygundur. Bir sonraki adım; çoğaltılacak olan bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen 5' ucuna komplementer sentetik oligonükleotidlerin 37-65 °C'ler arasında hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyonu) sağlamaktır. Sıcaklık 50-70 °C arasında bir değere düşürülerek primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler 15-30 nükleotid uzunluğunda yapay oligonükleotidlerdir ve çoğaltılacak DNA'nın sınırlandırılması için başlangıç noktası ve bitiş noktası olarak görev yaparlar. Son adımda; ortama eklenen dNTP'lerle çift iplikçikli DNA'ların sentezi (polimerizasyonu) sağlanır. Reaksiyon karışımına DNA polimeraz enziminin eklenmesiyle 70-75 °C sıcaklıkları arasında DNA sentezi gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur. Bu üç adım polimeraz zincir reaksiyonunun bir döngüsünü oluşturur 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 . Her döngü, yeniden tek zincirli DNA oluşturmak üzere ısıtılarak başlar ve önceki döngü sonrası oluşmuş DNA molekülleri kalıp olarak işlev görür. Bu olayın 30-40 kez tekrarlanmasıyla bir DNA hedefini 10^6 - 10^{12} arasında çoğaltmak mümkün olur. İşlem ısı dönüştürücüsü (thermocycler) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklık koşulları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemle; klonlama, dizi analizi, klinik

tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir (Akar 1999; Strachan Tom. 1999; Öner 2000).

PCR reaksiyonu için; kalıp olarak kullanılacak DNA molekülü, çoğaltılması hedeflenen bölgeyi sağdan ve soldan çevreleyen, bu bölgedeki DNA dizisini tanıyıp bağlanabilen bir çift sentetik oligonükleotit primer, ısıya dayanıklı DNA polimeraz enzimi, deoksinükleotit trifosfatlar (dNTP), DNA polimerazın çalışabilmesi için uygun pH ve iyon koşullarını sağlayan tampon karışımı gereklidir. Kullanılan oligonükleotit primerlerin seçimi sırasında primer dizisinin çoğaltılması hedeflenen DNA bölgesi içinde sadece bir kez bulunmasına dikkat edilmelidir. Ayrıca, kullanılan primer çiftinin uç bölgelerinde ve dizisi içerisinde birbirine uygunluk gösteren bölgeler bulunmamalıdır; aksi takdirde oligonükleotidin uç bölgeleri birbiri üzerine kıvrılarak ya da uygunluk gösteren bölgeler birbirine bağlanarak PCR'ın olumsuz olarak etkilenmesine neden olur. Oligonükleotitlerin nükleotid içerikleri de rastgele ancak orantılı olmalı, tekrarlayan diziler içermemeli ve guanin, sitozin nükleotitlerinin oranı %50'yi geçmemelidir. Oligoprimlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca $T_m: 4(GC)+2(AT)$ formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotitlerin nükleotid konsantrasyonlarına bağlıdır ve hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini arttırmaktadır. Spesifikliği arttıran bir diğer unsur da oligonükleotitlerin uzunluğudur. Kullanılan oligonükleotitlerin seçimi PCR işlemi için çok önemlidir (Akar 1999).

2.9.4. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP-Single Strand Conformation Polymorphism)

Mutasyon taraması için birçok moleküler teknik geliştirilmiştir. Bu yöntemlerden biri de tek iplikçikli uygunluk polimorfizmidir (SSCP). PCR tekniği kullanılarak uygulanan bu yöntem; denatüre edici olmayan jellerde tek iplikli DNA'da oluşan değişimin, jeldeki yürüme farklılığına dayanarak belirlenmesini sağlar. Bu yöntem, nükleotid dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşan tek baz değişikliklerini, delesyon ve insersiyonları belirlemeyi mümkün kılar (Akar 1999).

Tek zincirli DNA parçacığı bazı koşullarda nükleotit dizisine bağlı olarak belirli bir Şekil alır. Bir baz değişimi DNA parçacığının konformasyonunun ve dolayısı ile elektroforetik hareket yeteneğinin değişmesine neden olur (Öner 2000).

SSCP ile mutasyon taraması yönteminde, mutasyon taranacak DNA bölgesi önce PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılacak bölgenin baz içeriğine göre bir sıcaklık hesabı yapılır. PCR ürününün spesifikliğini arttırmak için belli oranda oligonükleotid ve formamid içeren yükleme boyası ile karıştırılır ve yüksek ısıda (99°C) tek zincirli hale getirilip, vertikal elektroforez jeline yüklenir. Poliakrilamid jel hesaplanan sıcaklık değerinde belirli bir voltajda yürütülür. Göç hızlarına bakılarak sonuçlar değerlendirilir. Baz dizisi farklı olan DNA parçacığı normal DNA parçacığına göre bant kayması gösterir. 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 baz çifti 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 2000).

2.9.5. DNA Dizi Analizi

DNA baz dizilerinin saptanması için yöntemler, 1970'li yılların sonuna doğru geliştirilmiştir. 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 yöntemin de dizi analizi yapılacak DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj jel elektroforezi olmak üzere üç ana aşaması bulunmaktadır (Akar 1999).

Dideoksi ya da zincir sonlanma reaksiyonu olarak bilinen Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği yöntemde, belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekteştirilmektedir (Öner 2000). Sanger'in enzimatik yöntemi, dizi analizi yapılacak

DNA parçasının 5'-3' yöndeki ipliğinin sentezini belirli bazlarda durdurma esasına dayanır (Sambrook 1989). Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır (Sanger 2004). Sentez reaksiyonu DNA polimeraz ile kataliz edilir. Dizi analizi yapılacak DNA parçasının sentezi için dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı; dizisi belirlenecek DNA örneği, DNA polimeraz, oligonükleotid, DNA parçalarının görüntülenebilmesi için biri radyoaktif ya da florokrom boyalarla işaretli deoksinükleotit trifosfatları (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve dört dideoksinükleotit trifosfattan (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) sadece birini ve enzimin çalışması için tampon görevi görecek olan maddeleri içerir. Bu yöntem için dizisi belirlenecek olan DNA'ya, dört farklı dNTP'ye, dört farklı ddNTP'lere, reaksiyonu kataliz edecek DNA polimeraz enzimine ve serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır. İlk olarak analiz için kullanılacak kalıp DNA asimetrik amplifikasyon yöntemiyle hazırlanır. Böylece daha fazla kalıp DNA elde edilir. PCR'da olduğu gibi denatürasyon, yapışma, uzama sikluslarının belirli sayıda tekrarlanmasıyla gerçekleştirilir (Akar 1999). Yöntemde kullanılan ddNTP'lerin 3' ucunda hidroksil (OH) grubu bulunmamaktadır. Bu durumda molekül yeni sentezlenen DNA'ya katılır, ancak serbest 3'-OH grubu taşımadığı için kendisine nükleotid ilave edilemez ve zincir sentezi sonlanarak bir DNA parçacığı elde edilir. Bu nedenle DNA sentezi dideoksinükleotidin eklenmesi ile durdurulur ve farklı uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilir. Oluşan parçalar, elektroforez jelinde büyüklüklerine göre ayrılır ve otoradyografi ile görüntülenir. 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 2000).

Günümüzde DNA dizi analizi için Sanger'in enzimatik yöntemi esasına dayalı tam otomatik kapiller sistemli çalışan DNA dizi analiz cihazları, radyoaktif izotoplar yerine ise floresan boyalar kullanılmaktadır (Öner 2000). Sistem sahip olduğu lazer ışığı teknolojisiyle farklı özellikteki floresan boyaları algılar, her nükleotid için ayrı renkte bir pik oluşturarak nükleotid dizisini belirler.

2.9.6. DNA'nın Enzimatik Kesimi

DNA'nın enzimatik kesimi Restriksiyon Endonükleaz enzimleri kullanılarak yapılır.

PCR ürünlerinin incelenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden birisi de, PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri ile muamele edilerek incelenmesidir (Sambrook 1989). Restriksiyon endonükleaz enzimleri kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyan ve bu dizilimlere yakın bölgelerden veya bu dizilimler içindeki spesifik bölgelerden DNA'yı kesen yapılardır. Restriksiyon enzimleri, DNA çift sarmalında kendilerine özgü tanıma dizilerini şeker ve fosfat omurgasından kırarlar ve bu şekilde DNA'yı manüple etmeyi mümkün kılarlar (Akar 1999). RE'ler çift zincirli sarmal DNA moleküllerinde özel nükleotit dizilerini tanıyan ve DNA'nın her iki zincirini kesen enzimlerdir. Bu enzimler DNA'da özgün kısa dizileri tanır ve kesme işleminin tanıma yerinde veya tanıma yerinin dışında başka bir özel dizide gerçekleştirirler. Kesim sonucunda küt veya yapışkan uçlu DNA parçaları oluşur (Temizkan and Sarıkaya A.T. 1999).

Tanıma dizileri birçok restriksiyon enzimi için DNA zincirinin her iki iplikçiğinde birbirinin komplementeridir ve bunlar 'palindromik diziler' adını alır. Bu enzimlerin birçoğunun tanıdığı bölge palindromiktir. Yeni oluşan parçalar birbirine iki yönlü olarak simetriklerdir. RE'lerin büyük kısmı bakterilerde çok az bir kısmı da virüs ve ökaryotlarda bulunmaktadır. Başlıca görevleri; dışardan bakteriye giren bazı özel gen veya işaretleri taşıyan genetik materyalleri ayrıştırarak mutasyonları engellemek ve genetik yönden kararlılığı sağlamaktır. Bu mekanizma, gerçekte bir çeşit savunmadır. Bakteriye özgü bu enzimler, çift sarmallı DNA üzerinde özgün bölgeyi tanırlar ve çift sarmallı DNA'nın her iki zincirindeki fosfodiester bağı keserek DNA'yı iki parçaya ayırırlar (Akar 1999).

RE'ler bakterilerden izole edilirler. Bakteriye istila eden viral DNA'yı parçalayarak, virüs enfeksiyonunu önlediği için bu ismi almışlardır (Öner 2000). Yabancı DNA girişine karşı ilgili DNA kesimlerinde metilasyon yapmak suretiyle bir savunma mekanizması olarak işlev yaparlar. Restriksiyon endonükleaz enzimleri isimlendirilirken enzimin elde edildiği cinsin isminin ilk harfi, daha sonra bakteri türünün ilk iki harfi ve son olarak bazen soya ait bir harfle birlikte ilk izolasyondan başlayarak Romen rakamıyla enzimin izolasyon sırası belirtilir. İzoşizomerler ise; farklı mikroorganizmalardan elde edilip, DNA üzerinde aynı diziyi tanıyıp kesim yapan RE'lerdir (Akar 1999).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMA GRUBUNUN OLUŞTURULMASI

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı; Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Çalışmaya solubl EPCR (sEPCR) seviyeleri bilinen hastalara ait kan örnekleri dahil edilmiştir. Sağlıklı bireylerde sEPCR seviyesi 100 ng/µl civarındadır. Bu yüzden çalışmamıza düşük ve yüksek seviyedeki bireyler dahil edilmiştir. Hasta-Kontrol çalışmasına toplam 169 birey seçilmiş olup bunların 71 tanesi (29 kontrol, 42 tromboz olgulu) plazma sEPCR seviyesi < 50 ng/µl olan ve 98 tanesi (24 kontrol, 74 tromboz olgulu) ise plazma sEPCR seviyesi >130 ng/µl olan bireylerdir. Çalışmaya katılan tüm ailelere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır.

3.2. YÖNTEMLER

Bu çalışmadan önce bireylerin sEPCR seviyeleri ELISA (Diagnostica Stago Asserachrom sEPCR, ASNIERES-FRANCE) yöntemi ile belirlenmiştir. İçlerinden plazma sEPCR seviyesi 50 ng/µl'nin altındaki ve 130 ng/µl'nin üzerindeki örnekler çalışmaya dahil edilmiştir. EPCR geninin 4 ekzonuna ait primerlerle bu seçilen bireylerin DNA'ları amplifiye edilmiştir. İlgili gende SSCP ve DNA dizi analizi yöntemleriyle mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir.

3.2.1. DNA İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan 1 ml 0.5M Etilendiamintetraasetikası (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) 10 mM 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, pellet 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 üzerine 20  g/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 (Almanya) bekletilir.

 kinci 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.  ki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir eppendorfa alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar % 95'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir. Eppendorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20 C'de bir gece bekletilir.

   nc  gün tüpler +4  C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilerek DNA   kt r l r. Süpernatant kısmı dökülerek tüpe 500  L % 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 üzülmesi sağlanır.  zole edilen DNA +4  C veya -20  C'de saklanmıştır.

3.2.2. EPCR Gen Değişimlerinin Belirlenmesi

EPCR gen değişimlerinin belirlenmesinde kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu için yapılan PCR karışımında içeriği üretici firmalar arasında fark olsa da genellikle 500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl (Ph 8.3); 15 mM MgCl₂ bulunur. 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  M olacak şekilde stok hazırlanır.

	Son Konsantrasyon
Distile Su	-
10x PCR Tamponu	1x
dNTP Karışımı	0.2 mM
Primer Karışımı	20 µM
MgCl ₂	1.5 mM
Taq DNA Polimeraz	1 ünite
DNA Örneği	100-300 ng
Toplam Miktar	

Çizelge 2. Polimeraz zincir reaksiyonunun bileşenleri ve kullanılan miktarlar

3.2.3. EPCR Gen Değişimlerinin İncelenmesindeki PCR koşulları

Ekzon	5'primer	3'primer	Uzunluk (bç)	Primerin bağlanma sıcaklığı
1	gccccctagtaggaaatga	gagatgtgcccccgactc	293	61°C
2	caggcctccaaagacttcat	cctactcacaggccaaggtc	264	61°C
3	gcacctctctgcacagtc	ccatccattgtctggaacc	384	61°C
4-1.bölge	taaacgggtcccttctctct	ctccccctcccaaatcttc	384	61°C
4-2.bölge	caccagaaggttgagtgac	acgcctcaggtgattctgtc	247	61°C
4-3.bölge	ccatcctccaaagacagacag	ccagaaatttgcaaagtgga	278	61°C

Çizelge 3. EPCR Genine ait 4 ekzon için tasarlanan primerlerin dizileri

PCR komponentleri yukarıda çizelgede belirtilen oranlarda son hacim 50µl olacak şekilde reaksiyona sokulmuştur.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise: 95°C' de 5 dk; başlangıçta 1 kez, (94 °C'de 1 dk, 61 °C'de 1 dk, 72 °C'de 1 dk) 34 kez, 72 °C'de 12 dk; sonda 1 kez olarak gerçekleştirilmiştir (Biometra, Almanya). PCR sonrasında oligonükleotid ürünler elde edilmiştir. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jele 9 µl yüklenmiştir.

GCCCCCTAGTAGGAAATGAGACACAGTAGAAATAACACTTTATAAGCCTCTTC
CTCCTCCCATCTCCTGGCCTCCTTCCATCCTCCTCTGCCAGACTCCGCCCTCC
CAGACGGTCTCACTTCTCTTTTCCCTAGACTGCAGCCAGCGGAGCCCGCAGCC
GGCCCGAGCCAGGAACCCAGGTCCGGAGCCTCAACTTCAGGATGTTGACAACA
TTGCTGCCGATACTGCTGCTGTCTGGCTGGGCCTTTTGTAGCCAAGACGCCTCA
GATGGTGAGTCGGGGGCACATCTCCTGCCTCAGGATGGTTCTGGAGAATCTCA

Ekzon 1

CCGGCCCAGGCTGAAGCTGACTCTGCCCCCAGGCCTCCAAAGACTTCATATGC
TCCAGATCTCCTACTTCCGCGACCCCTATCACGTGTGGTACCAGGGCAACGCGT
CGCTGGGGGGACACCTAACGCACGTGCTGGAAGGCCAGACACCAACACCAC
GATCATTAGCTGCAGCCCTTGCAGGAGCCCGAGAGCTGGGCGCGCACGCAGA
GTGGCCTGCAGTCTACCTGCTCCAGTTCACGGCCTCGTGCGCCTGGTGCACC
AGGAGCGGACCTTGGCCTGTGAGTAGGCGCGCAGCGGGGGCGGGGTCTGGGC

Ekzon 2

GTTCTTTTCCCCTTGGTGGGCCTCGCCCCACACCTGGCACCCTCTCTGCACAGT
CCCCTGACCCTGACTGTCTATCCACAGTTCCTCTGACCATCCGCTGCTTCCTGG
GCTGTGAGCTGCCTCCCGAGGGCTCTAGAGCCCATGTCTTCTTCGAAGTGGCTG
TGAATGGGAGCTCCTTTGTGAGTTTCCGGCCGGAGAGAGCCTTGTGGCAGGCA
GACACCCAGGTCACCTCCGGAGTGGTCACCTTCACCCTGCAGCAGCTCAATGC
CTACAACCGCACTCGGTATGAACTGCGGGAATTCCTGGAGGACACCTGTGTGC
AGTATGTGCAGAAACATATTTCCGCGGAAAACACGAAAGGTATGATGGGACG
GGGCCAGGCCTGCAAGCTGGGGAGAGGGCGGGTTCAGACAAATGGATGGA

Ekzon 3

EPCR Geni Ekzon 4 PCR'ı 3 bölgeye ayrılarak gerçekleştirilmiştir:

GCAGCTTCAGTCAGTTGGTAAACGGGTCCTTTCTCTGGGGCAGAAACGCTTT
GGGGTTTGACTCAAATCATGGACTCCTTGGGGGCCTATTCTTCGGGCTAACTCT
TTGCATGTTCTGCAGGGAGCCAAACAAGCCGCTCCTACACTTCGCTGGTCCTGG
GCGTCTGGTGGGCAGTTTCATCATTGCTGGTGTGGCTGTAGGCATCTTCCTGT
GCACAGGTGGACGGCGATGTTAATTACTCTCCAGCCCCCTCAGAAGGGGCTGG
ATTGATGGAGGCTGGCAAGGGAAAGTTTCAGCTCACTGTGAAGCCAGACTCCC
CAACTGAAACACCAGAAGGTTTGGAGTGACAGCTCCTTTCTTCTCCCACATCTG
CCCCTGAAGATTTGAGGGAGGGGAGATGGAGAGGAG

Ekzon 4-1. bölge

```
AGCTCACTGTGAAGCCAGACTCCCCAACTGAAACACCAGAAGGTTGGAGTGA  
CAGCTCCTTTCTTCTCCCACATCTGCCCACTGAAGATTTGAGGGAGGGGAGATG  
GAGAGGAGAGGTGGACAAAGTACTTGGTTTGCTAAGAACCTAAGAACGTGTAT  
GCTTTGCTGAATTAGTCTGATAAGTGAATGTTTATCTATCTTTGTGGAAAACAG  
ATAATGGAGTTGGGGCAGGAAGCCTATGGCCCATCCTCCAAAGACAGACAGA  
ATCACCTGAGGCGTTCAAAAGATATAACCAAATAACAAGTCATCCACAATCA
```

Ekzon 4-2. bölge

```
TTGGGGCAGGAAGCCTATGGCCCATCCTCCAAAGACAGACAGAATCACCTGAG  
GCGTTCAAAAGATATAACCAAATAACAAGTCATCCACAATCAAAATACAACA  
TTCAATACTTCCAGGTGTGTCAGACTTGGGATGGGACGCTGATATAATAGGGT  
AGAAAGAAGTAACACGAAGAAGTGGTGGAAATGTAAAATCCAAGTCATATGG  
CAGTGATCAATTATTAATCAATTAATAATTAATAAAATTTCTTATATTTAAGG  
CATTGTTATCTCCTCCACTTTGCAAATTTCTGGAAAAGTAACCTATACCCATT
```

Ekzon 4-3. bölge

Çizelge 4: *EPCR* genine ait 4 ekzon için PCR ile çoğaltılmış diziler. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir. (GeneID: 10544)

3.2.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz (Sigma, ABD), kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. PCR ürünleri % 2'lik agaroz jelde değerlendirilir. % 2'lik jel için 3 gr agaroz tartılıp, TAE 1X (Tris-HCl Asetik asit, EDTA) ile 150 ml'ye 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'in (Sigma, ABD) % 5'lik stok solüsyonundan 5 µl ilave edilir. İyice karıştırıldıktan sonra önceden uygun taraklar konularak hazırlanmış olan jel tabağına (Thermo Midicell Primo, ABD) 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 Mavisi (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılarak jele yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (ΦX174 DNA HaeIII BioLabs, ABD) PCR ürünleri

ile birlikte jele 2 µl yüklenir. 80V akımda 25-30 dk yürütülür. Ultraviyole ışık (Spectroline, ABD) altında incelenir ve fotoğraflarır.

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 1000 ml'ye tamamlanır (Sambrook 1989).

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X solüsyonu, 54 g Tris (Amresco, ABD), 27,5 g Borik asit (AppliChem, Almanya), 20 ml 0,5 M pH8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 ml hacime 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) 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 polimerleşmesinden ve tarakların çıkarılmasından sonra camlar vertikal jel elektrofezine yerleştirilerek üzeri TBE 1X solüsyonuyla doldurulur. PCR ürünlerine spesifikliği 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 mavisi içermektedir. 40 µl PCR ürünlerine 8 µl yükleme boyası eklenerek 99 °C'de 8 dk denatüre edilir.

Örneklerden 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 (AgNO₃) (AppliChem, Almanya) tartılıp distile su ile 500 ml'ye tamamlanır. İkinci çözelti % 15'lik sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisidir. 150 g katı sodyum hidroksitin distile su ile 1000 ml'ye tamamlanmasıyla hazırlanır. Son solüsyon ise % 7,5'lik Sodyum bikarbonat solüsyonudur ve bu solüsyon % 7,5'lik sodyum bikarbonat (Na₂CO₃) 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)

EPCR geni için belirlenen bölgeler polimeraz zincir reaksiyonu ile taranıp SSCP tekniği ile farklı bant profili veren DNA'lar belirlendikten sonra bu DNA'lar ile tekrar PCR yapılır ve PCR ürünleri PCR pürifikasyon kiti (Agencourt, ABD) kullanılarak temizlenir. Mıknatıs üzerine yerleştirilen plate'e 50 µl pcr ürünü konur. Üzerine 1.8 katı kadar (90 µl) agencourt clean solüsyonundan eklenir. 3-4 dk beklenerek DNA'ların mıknatıslı alana yapışması sağlanır. Üst kısımda yer alan supernatant atılır ve 200 µl %70' lik etanol eklenir. 30 sn beklenir. Süpernatant pipetle uzaklaştırılır. Bu işlem iki kez tekrarlanır. Oda sıcaklığında örnekler 10-15 dk kurumaya bırakılır. Kurutma işleminden sonra 40 µl deiyonize su ile sulandırılarak DNA'nın çözünmesi sağlanır. Daha sonra her bir ekzon için temizlendiği düşünülen DNA'lar % 2'lik agaroz jelde incelenir.

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) kullanılır. 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 gerçekleştirilir. 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 gerçekleştirilir. "Cycle sequencing" sonlandıktan hemen sonra reaksiyonun durdurulması için her bir kuyucuğa 5 µl durdurma solüsyonu (1,5 M Sodyum asetat, 50 mM EDTA, 20 mg/ml'lik Glikojen) eklenir. Örneklerin üzerine 60 µl % 95'lik soğuk etanol eklenerek +4 °C'de 4000 rpm'de 4 dk santrifüjlenerek (Hettich, Almanya) yıkama işlemi gerçekleştirilir. Üstteki kısım dökülerek % 70'lik alkolden 200 µl eklenip, +4 °C'de 4000 rpm'de 2 dk santrifüjlenerek üstteki kısım dökülür. Bu işlem bir kez daha tekrarlandıktan sonra plak 300 rpm'e çıkana kadar ters olarak santrifüjlenip fazla etanol uzaklaştırılır. Plak, liyofilizatör cihazına (Christ, Almanya) yerleştirilir ve yüksek vakum altında örnekler kurutulur. Kuruyan örneklerin üzerine 25 µl formamid içeren solüsyondan konularak DNA zincirlerinin birbirlerinden ayrı tutulması sağlanır. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatıldıktan sonra plak, DNA dizi analizi cihazına yerleştirilir ve elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software programı kullanılarak dalgalar halinde görünür hale getirilir.

3.2.9. PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimi ile Kesimi

PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde yapılan kontrolünde, doğru gen bölgesinin amplifikasyonu görülmüş, SSCP'ye tabi tutulan ürünlerden farklı bant verenler için DNA Dizi Analizi yapılmıştır. Belirlenen baz değişimi sonucunda restriksiyon endonükleaz ile kesimlemeye gidilmiştir.

EPCR geninde c.4678C>G değişiminin taraması için kullanılan enzim *DdeI* (*HpyF3I*) (Fermentas, Litvanya) Restriksiyon Endonükleaz enzimidir. PCR ürününde *DdeI* enzimi için tek bir kesim noktası bulunmaktadır. *DdeI* enzimi normal bazı tanıyan bir enzimdir. Kesim yeri 5'-C[^]T N A G-3' dizileridir. Kesim gerçekleşmişse 384 bç.'lik PCR ürünü, 237 ve 147 bç.'lik iki parçaya ayrılır. % 7'lik poliakrilamid jelde (PAGE) yürütülen örnekler gümüş boyamayla değerlendirilmiştir ve UV ışık altında fotoğraflanmıştır (Spectroline, ABD).

12 µl hacimdeki PCR ürünleri, RE Tamponu ve her birey için 10 ünite/µl *DdeI* olacak şekilde hazırlanan tampon-enzim karışımı ile muamele edilmiştir. PCR ürünü-enzim-tampon karışımı, enzimin optimum çalışma sıcaklığı olan 37°C' de, 16 saat inkübasyona bırakılmıştır.

3.2.10. *DdeI* Restriksiyon Endonükleazıyla kesimin değerlendirilmesi için Poliakrilamid Jel Hazırlanışı

RE kesim sonuçları % 7'lik poliakrilamid jelde değerlendirilmiştir. Enzimle kesimi yapılan PCR ürünleri denatürasyona tabi tutulmamıştır. *DdeI* enzimi ile kesim yapılmış PCR ürünleri 3 µl Brom-fenol mavisi (BBF, Merck; Almanya) ile muamele edilerek jele yaklaşık 10 µl yüklenmiştir. Enzimle kesim ürünlerinin değerlendirilebilmesi için 3 µl marker (ΦX174 DNA/BsuRI(HaeIII)) (Fermentas, Litvanya), kesilmemiş PCR ürünü (Uncut) ve kesilen örnekler ile birlikte jele yüklenmiştir. 200 V akımda 5 saat yürütülmüştür. % 7'lik poliakrilamid jel gümüş boyamaya tabi tutularak bant profili incelenmiştir.

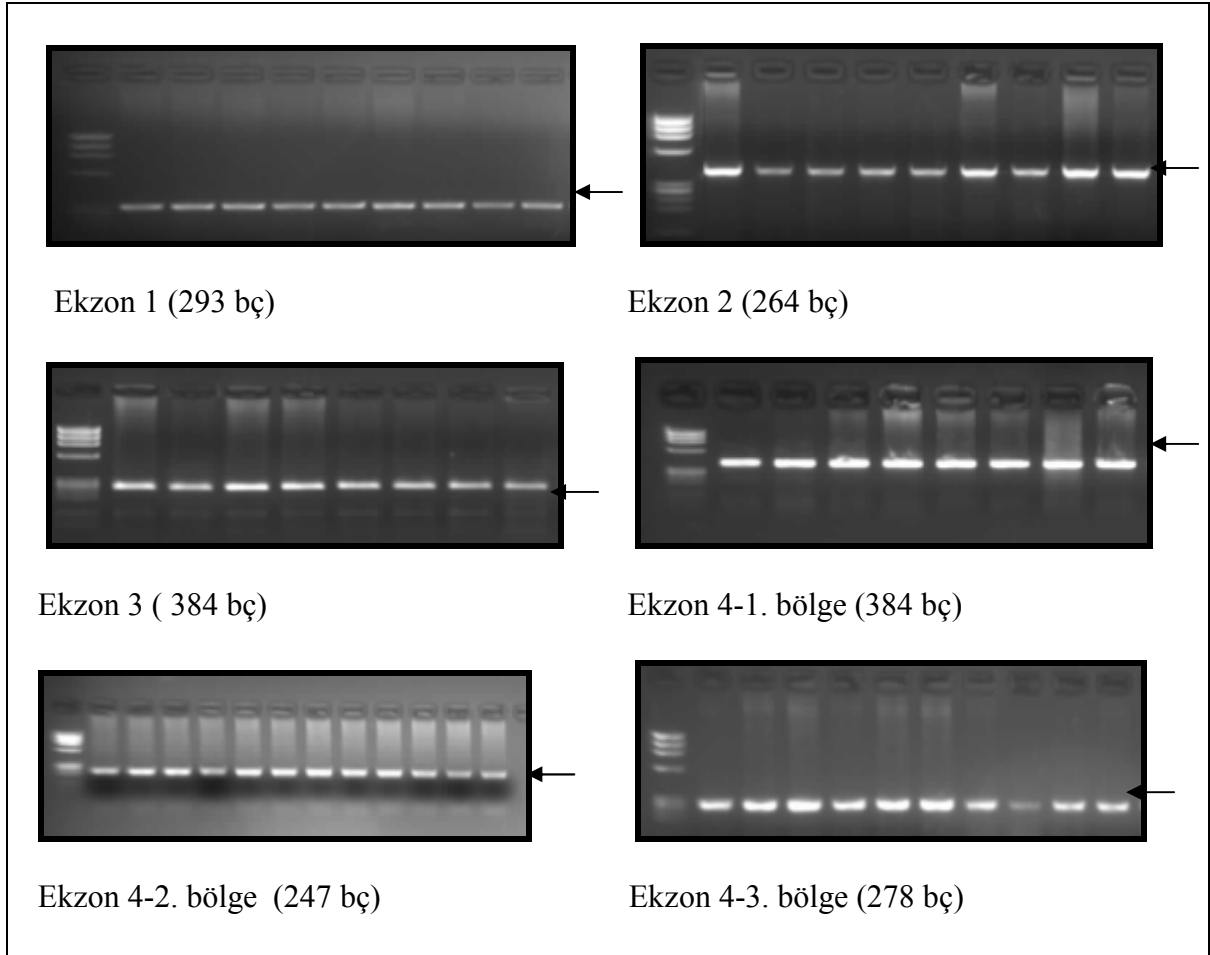
Her iki allelde bu polimorfizmi taşımayan (negatif) bireylerde, kesilmiş PCR ürünü seviyesinde iki band (237 bç/147 bç.), c.4678 C>G polimorfizmini tek allelde taşıyan (heterozigot) bireylerde, biri kesilmemiş PCR ürünü seviyesinde diğeri onun altında iki band (384 bç. / 237 bç. / 147 bç.) olduğu görülmüştür.

3.3. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yaptığımız çalışmada sEPCR seviyeleri 50 ng/µl'den düşük (71) ve 130 ng/µl'den yüksek (97) olduğu bilinen kişilerin DNA'ları çalışmaya dahil edilmiştir. *EPCR* genine ait 4 ekzon PCR ve SSCP teknikleriyle taranmıştır.

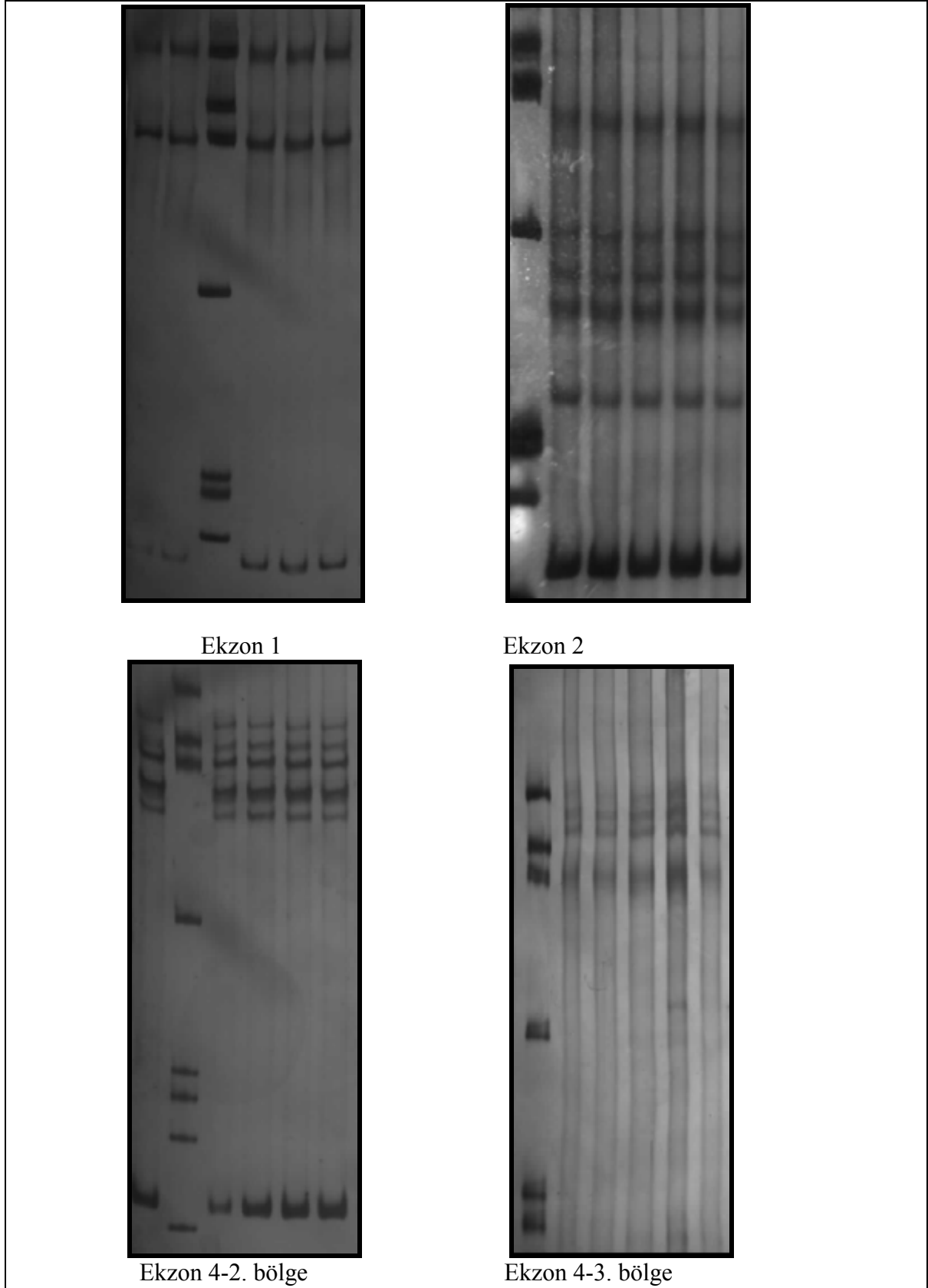
3.3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

4 ekzona ait PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 80V'da 10 dk yürütülmüştür.



Şekil 7. *EPCR* genine ait 4 ekzonun PCR ürünlerinin %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü

3.3.2. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (SSCP) Bulguları



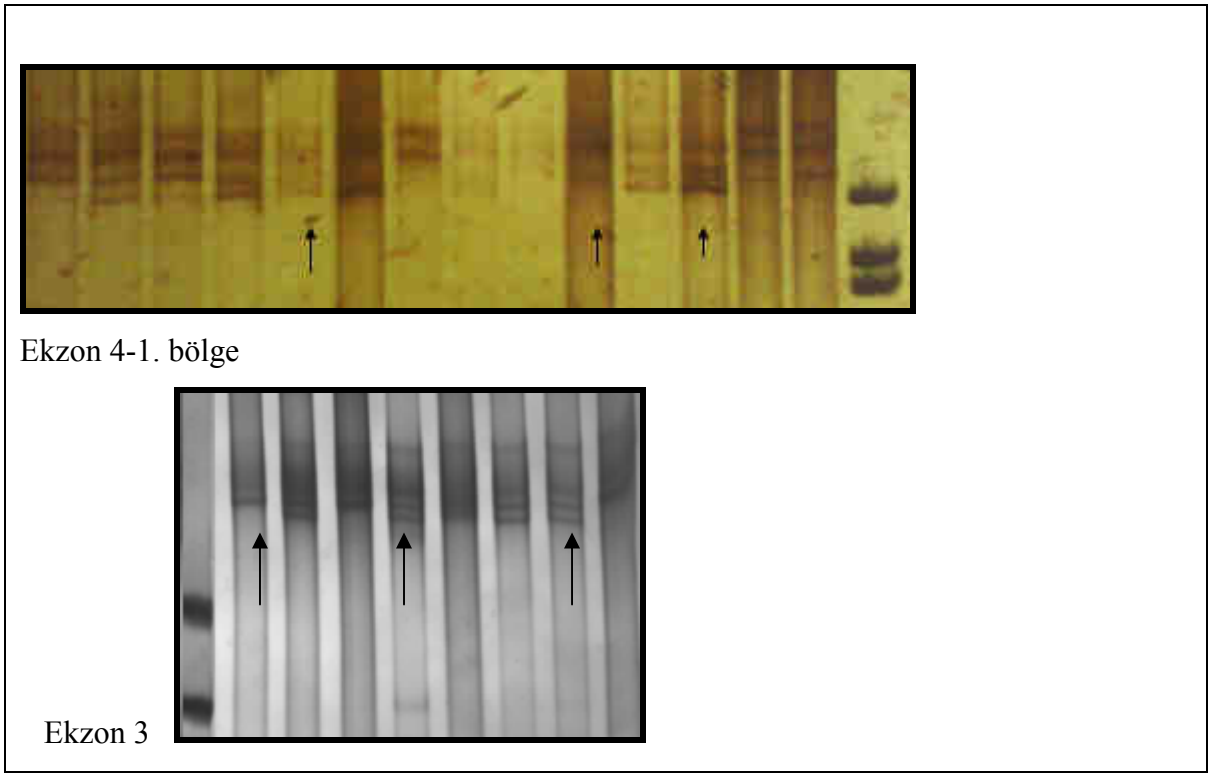
Şekil 8. *EPCR* geni ekzon 1, 2, 4-2.bölge, 4-3.bölge için SSCP jel görüntüleri

Ekzon 1: 293 bç'lik bölgenin SSCP tekniği kullanılarak yapılan taraması sonucunda farklı bant örneği tespit edilmemiştir.

Ekzon 2: 264 bç'lik bölgenin SSCP tekniği kullanılarak yapılan taraması sonucunda farklı bant profili tespit edilmemiştir.

Ekzon 4-2. bölge: 247 bç'lik bölgenin SSCP tekniği kullanılarak yapılan taraması sonucunda farklı bant profili tespit edilmemiştir.

Ekzon 4-3. bölge: 278 bç'lik bölgenin SSCP tekniği kullanılarak yapılan taraması sonucunda farklı bant profili tespit edilmemiştir.



Şekil 9. EPCR geni ekzon 3 ve 4-1.bölgeye ait SSCP jel görüntüleri

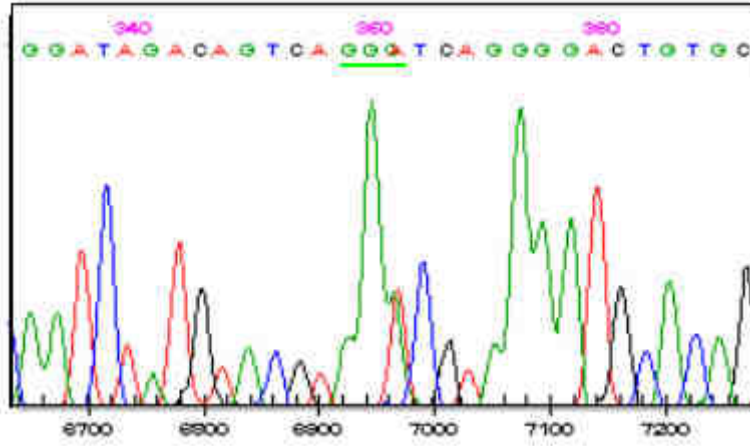
Ekzon 3: 384 bç'lik bölgenin SSCP tekniği kullanılarak yapılan taraması sonucunda farklı bant profili tespit edilmiştir.

Ekzon 4-1. bölge: 384 bç'lik bölgenin SSCP tekniği kullanılarak yapılan taraması sonucunda farklı bant profili tespit edilmiştir.

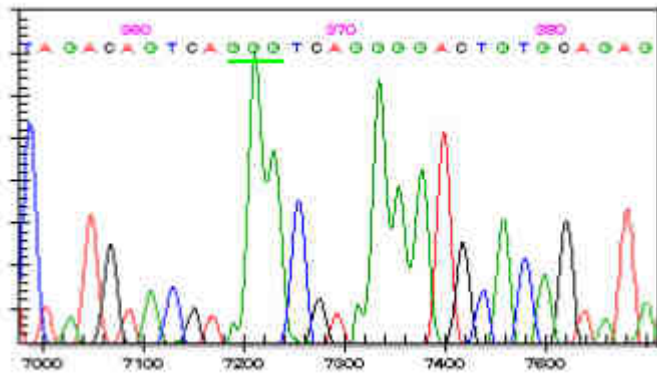
SSCP'ler sonucunda farklı bant profili veren örnekler belirlendikten sonra DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan DNA dizi analizi sonuçları *EPCR* geninde taranan bölgeye ait diziyle karşılaştırılarak farklılık olup olmadığına bakılmıştır.

3.3.3. *EPCR* 3. Ekzon için DNA Dizi Analizi Sonuçları

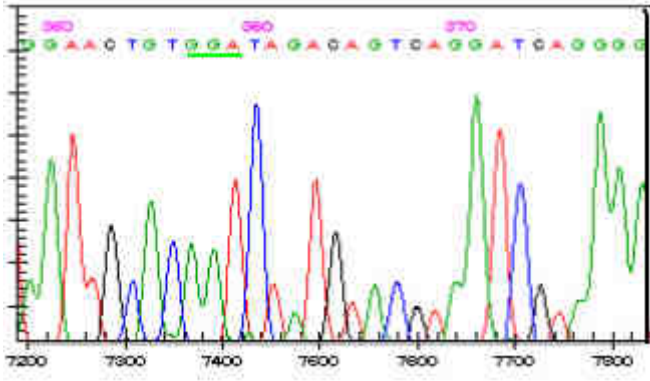
Bu bölge için SSCP'de farklı bant profili veren hasta DNA'larında herhangi bir değişimin olup olmadığını saptanması amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. 3.ekzon reverse primeri ile yapılan DNA dizi analizinde sonuçları aşağıda gösterilmiştir. *EPCR* 3.ekzona ait primerlerle yapılan DNA dizi analizinde yapılan karşılaştırmalar sonucunda *EPCR* geni 2. intronda c.3998C>T değişimi saptanmıştır (SNP NO: rs2069952) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) . Bu değişim kısmi konsensus bölgesinde bulunmaktadır.



Şekil 10. *EPCR* 3. Ekzon reverse primeri ile yapılan DNA dizi analizi (heterozigot örnek)



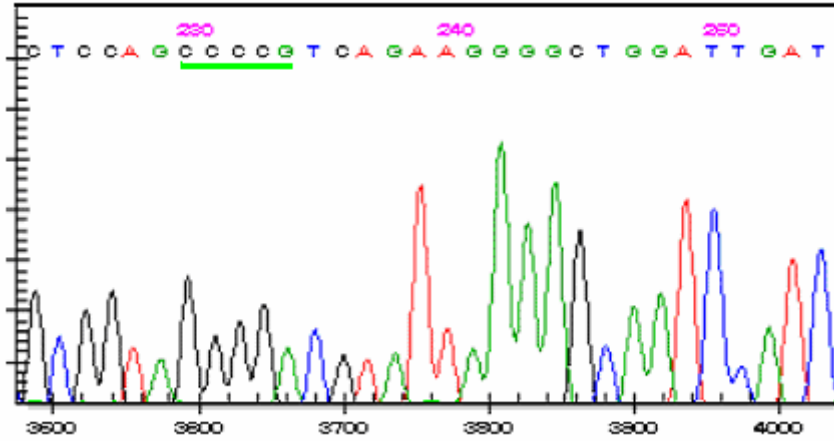
Şekil 11. *EPCR* 3. Ekzon reverse primeri ile yapılan DNA dizi analizi (normal örnek)



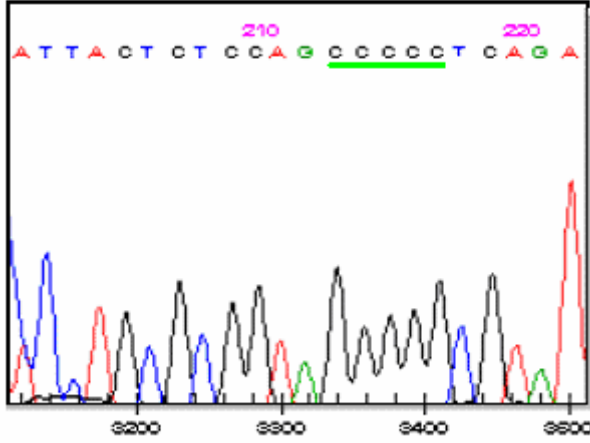
Şekil 12. EPCR 3.Ekzon reverse primeri ile yapılan DNA dizi analizi (homozigot örnek)

3.3.4. EPCR 4. Ekzon 1. Bölge için DNA Dizi Analizi Sonuçları

Bu bölge için SSCP'de farklı bant profili veren hasta DNA'larında herhangi bir değişimin olup olmadığının saptanması amacıyla DNA dizi analizi yapılmıştır. 4.ekzon 1. bölge primerleriyle yapılan DNA dizi analizinde 3'UTR'da c.4678C>G değişimi saptanmıştır (SNP NO: rs9574) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) .



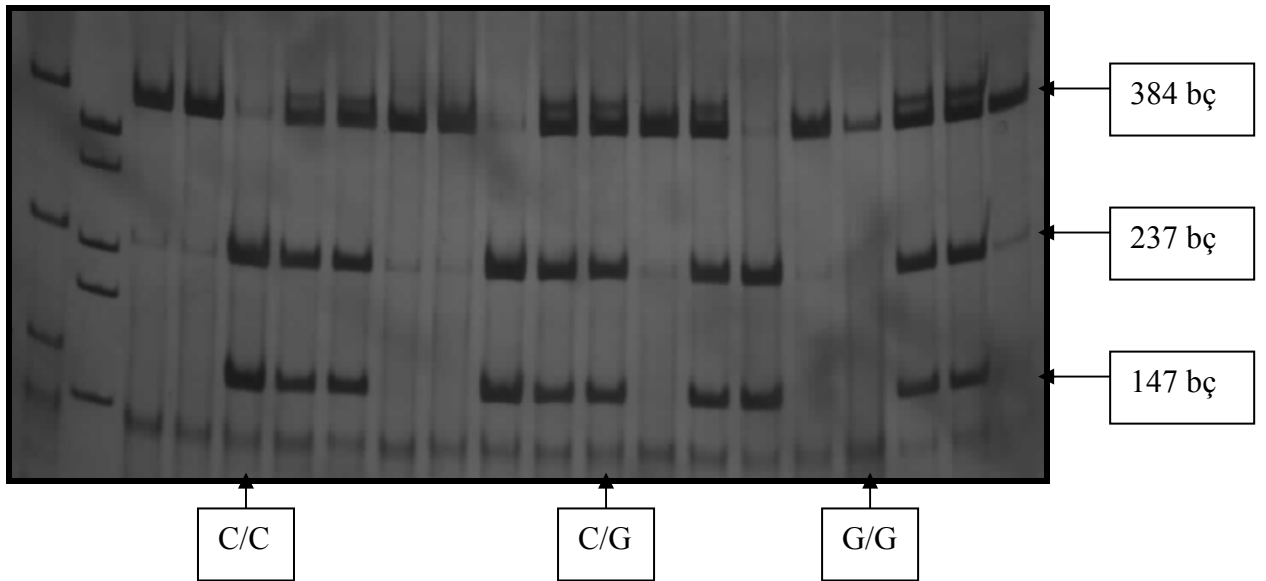
Şekil 13. EPCR 4.Ekzon 1.Bölge forward primeri ile yapılan DNA Dizi Analizi görüntüsü



Şekil 14. *EPCR* 4.Ekzon 1.Bölge forward primeri ile yapılan DNA Dizi Analizi görüntüsü

3.3.5. *EPCR* 4. Ekzon 1. Bölge *DdeI* Restriksiyon Enzimi kesim sonucu

EPCR 4.Ekzon 1.Bölge sekanslarında görülen değişimi saptayabilmek için bu bölgede G>C değişimini tanımlamak amacıyla 5'-C[^]TNAG-3' dizisini kesen *DdeI* Restriksiyon Endonükleaz enzimi ile kesim yapılmıştır.



Şekil 15 . *DdeI* Restriksiyon Enzimiyle yapılan kesimin PAGE'deki görüntüsü

Reaksiyon komponentleri; 12µl PCR ürünü + 2 µl tampon + 1µl DdeI = 15 µl toplam hacim olmak üzere hazırlanır. 37 °C'de 16 saat süreyle reaksiyon gerçekleşmiştir (Biorad, ABD). Enzimle kesim sonunda kesim ürünleri PAGE'de (poliakrilamid jel elektroforezi) 200 V'da 5 saat yürütülerek sonuçlar değerlendirilmiştir (Şekil 15). 384 bç'lik bölge, kesim sonucunda, 237 bç ve 147 bç'lik iki bölgeye ayrılmıştır.

4.ekzon 1. bölgeye ait primerlerle yapılan DNA dizi analizinde görülen C>G değişimi *DdeI* Restriksiyon Enzimiyle yapılan kesim sonucunda teyit edilmiştir.

3.3.6. İstatistiksel Analiz

Yüksek sEPCR düzeyinin tromboz açısından risk getirmekte olduğunu öne süren çalışmamız daha önce yapılan diğer çalışmalarla desteklenen bulgularca da doğrulanmaktadır. Bu da, çalışmaya dahil edilen örneklerin seçiminin homojen olduğunun ortaya konması açısından önemlidir. sEPCR seviyesi 50 ng / µl'den düşük 29 kontrol ve 42 trombozlu olgu ve sEPCR seviyesi 130 ng / µl'den yüksek 24 kontrol ve 74 trombozlu olgu ile yapılan çalışmamızda; yüksek sEPCR seviyesine sahip olmak, düşük seviyedekilerle kıyaslandığında tromboz için 2.12 kat risk getirmektedir (Çizelge 5).

	KONTROL	TROMBOZ OLGUSU	OR	CI (%95)
sEPCR<50 ng/µl	29	42	1	-
sEPCR>130 ng/µl	24	74	2.12	1.1-4.12

Çizelge 5. sEPCR düzeyleri ve tromboz riski arasındaki ilişki

Gen taramasında saptanan *EPCR* geni c.3998C>T polimorfizminin genotipleri, sEPCR düzeylerine göre karşılaştırılmıştır. Düşük sEPCR düzeyine sahip kontrol bireyleri arasında; 8 kişide CC genotipi, 10 kişide CT genotipi ve 8 kişide TT genotipi saptanmıştır. Trombozlu olgularda ise; 16 kişide CC, 12 kişide CT, 13 kişide TT genotipine rastlanmıştır. Yüksek sEPCR düzeyine sahip kontrol bireyleri arasında ise; 2 kişide CC, 9

kişide CT genotipi ve 10 kişide TT genotipi saptanmıştır. Trombozlu olgularda 16 kişide CC, 25 kişide CT, 10 kişide TT genotipine rastlanmıştır (Çizelge 6).

	C3998T	KONTROL	TROMBOZ OLGUSU	OR	CI (%95)
sEPCR<50 ng/μl	CC	8	16	1	-
	CT	10	12	0.6	0.18-1.97
	TT	8	13	0.8	0.23-2.76
sEPCR>130 ng/μl	CC	2	16	4	0.73-21.8
	CT	9	25	1.32	0.44-4.3
	TT	10	19	0.95	0.3-2.97

Çizelge 6. Trombozlu olgularda *EPCR* c.3998C>T değişimine ait genotipik dağılım

Allelik dağılıma baktığımızda; düşük sEPCR seviyesine sahip kontrollerde 28 C, 28 T; yüksek sEPCR seviyesine sahip kontrollerde ise 13 C, 29 T alleli saptanmıştır. Düşük sEPCR seviyesine sahip trombozlu olgularda; 44 C, 38 T alleli saptanmıştır. Yüksek sEPCR seviyesine sahip trombozlu olgularda ise; 57 C, 63 T alleli saptanmıştır (Çizelge 7). Yapılan analizler sonucunda, bu değişimi taşımanın tromboz için risk faktörü olması açısından anlamlı olmadığı saptanmıştır.

	C3998T	KONTROL	TROMBOZ OLGUSU	OR	CI (%95)	P
sEPCR<50 ng/μl	C	28	44	1	1	-
	T	28	38	0.86	0.43-1.7	P< 0.7
sEPCR>130 ng/μl	C	13	57	2.79	1.29-6.00	-
	T	29	63	1.38	0.72-2.63	P< 0.07

Çizelge 7. Trombozlu olgularda *EPCR* c.3998C>T değişimine ait allelik dağılım

	4678C>G	KONTROL	TROMBOZ OLGUSU	OR	CI (%95)
sEPCR<50 ng/μl	G/G	7	7	1	-
	C/G	11	29	2.63	0.75-9.26
	C/C	11	6	0.54	0.12-2.31
sEPCR>130 ng/μl	G/G	9	12	1.33	0.34-5.18
	C/G	15	59	3.93	1.19-12.94
	C/C	-	3	7	0.30-160.33

Çizelge 8. Trombozlu olgularda *EPCR* c.4678C>G değişimine ait genotipik dağılım

Çalışmamızda saptamış olduğumuz *EPCR* geni c.4678C>G polimorfizminin genotipleri, sEPCR düzeylerine göre karşılaştırılmıştır. Düşük sEPCR düzeyine sahip bireyler arasında kontrollerde; 11 kişide CC genotipi, 11 kişide CG genotipi ve 7 kişide GG genotipi saptanmış olup, trombozlu olgularda; 6 kişide CC, 29 kişide CG, 7 kişide GG genotipine rastlanmıştır. Yüksek sEPCR düzeyine sahip kontrol bireyleri arasında ise; CC genotipine rastlanmamış, 15 kişide CT genotipi ve 9 kişide GG genotipi saptanmıştır. Trombozlu olgularda 3 kişide CC, 59 kişide CG, 12 kişide GG genotipine rastlanmıştır (Çizelge 8).

Allelik dağılıma bakacak olursak;

Düşük sEPCR seviyesine sahip kontrollerde 33 C, 25 G ; yüksek sEPCR seviyesine sahip kontrol bireylerinde ise 15 C, 33 G alleli saptanmıştır. Düşük sEPCR seviyesine sahip trombozlu olgularda; 41 C, 25 G ; Behçet hastalarında 2 C, 2 G ; inme olgularında ise 2 C, 2 G alleli saptanmıştır. Yüksek sEPCR seviyesine sahip trombozlu olgularda 65 C, 83 G; Behçet hastalarında 14 C, 18 G; inme olgularında 11 C, 17 G alleli saptanmıştır (Çizelge 9,10,11).

	4678C>G	KONTROL	TROMBOZ OLGUSU	OR	CI (%95)	P
sEPCR<50 ng/μl	G	25	43	1	-	-
	C	33	41	0.72	0.36-1.41	P< 0.7
sEPCR>130 ng/μl	G	33	83	1.46	0.77-2.76	-
	C	15	65	2.51	1.19-5.31	P< 0.2

P=0.042

Çizelge 9. Trombozlu olgularda *EPCR* c.4678C>G değişimine ait allelik dağılım

	4678C>G	KONTROL	BEHÇET	OR	CI (%95)
sEPCR<50 ng/μl	C	33	2	1	-
	G	25	2	1.32	0.17-10.02
sEPCR>130 ng/μl	C	15	14	15.4	3.10-76.46
	G	33	18	9	1.93-41.91

Çizelge 10. Behçet hastalarında *EPCR* c.4678C>G değişimine ait allelik dağılım

	4678C>G	KONTROL	İNME	OR	CI (%95)
sEPCR<50 ng/μl	C	33	2	1	-
	G	25	2	1.32	0.17-10.02
sEPCR>130 ng/μl	C	15	11	12.1	2.38-61.48
	G	33	17	8.5	1.81-39.75

Çizelge 11. İnme olgularında *EPCR* c.4678C>G değişimine ait allelik dağılım

Tromboz olgularında allelik dağılım ele alındığında, *EPCR* c.4678C>G değişiminin düşük sEPCR üzerinde etkili olmadığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Ancak, yüksek seviyede C allelini taşımak tromboz açısından 2.51 kat risk getirmektedir (Çizelge 9). Behçet ve inmeli olgular ayrı ayrı incelendiğinde ise; bu değişimin yüksek sEPCR seviyesine sahip bireylerde tromboz riski üzerinde etkili olabileceğini düşündürmektedir (Çizelge 10,11). Ancak istatistiksel olarak daha net bir sonuç alınabilmesi için örnek sayısının artırılması faydalı olacaktır.

4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Koagülasyon mekanizması; negatif ve pozitif feedback reaksiyonları, multienzim sistemleri, humoral ve hücresele prokoagulant ve antikoagulantları içinde barındıran kompleks bir reaksiyon dizisidir. Koagülasyon ile ilgili bilgilerin geçmişı çok eskilere dayandığı halde; uygulama alanına giren ilk bilgiler üzerine dayanan çalışmalar, farklı boyutları ile günümüzde de çok yoğun bir şekilde devam etmektedir. Koagülasyon, kalp damar hastalıklarının başlıca sorumlusu olarak kabul edilir. Hastalıkların nedenlerinin ortaya konması açısından son yıllarda yapılan genetik çalışmaların sayısı artmıştır.

Membran bağlı EPCR, trombin-trombomodulin kompleksi vasıtasıyla organ hasarını önlemeye yardımcı olmada antikoagulant protein C aktivasyonunun artmasına yardımcı olur. Membran bağlı EPCR proteini, trombin-trombomodulin kompleksi vasıtasıyla, protein C aktivasyonunu arttırarak organ hasarının önlenmesinde etkili olmaktadır (Esmon 2004). *EPCR*, dendritik hücreler ve lökositlerde, akciğer pnömositlerinde, nötrofillerde, kalp ve akciğerdeki venler ve arterlerin endotel hücrelerinde eksprese edilir (Esmon 2006). Ekstraselüler bölge, transmembran bölgesi ve çok kısa da bir sitoplazmik kuyruktan oluşur. Metalloproteaz aktivitesi EPCR'nin bütün ekstraselüler domaininin kesimine yol açar. Bu da solubl EPCR (sEPCR) oluşumunu sonuçlandır. sEPCR, PC ve APC'ye benzer afinitelerle bağlanır. Fakat, negatif yüklü membran yüzeyleriyle PC / APC'nin etkileşimini bloklayarak APC'nin antikoagulant aktivitesini inhibe eder. Sağlıklı kişilerdeki plazma sEPCR seviyesi yaklaşık 100 ng / µl konsantrasyonundadır. sEPCR seviyeleri, sistemik inflamatuvar hastalıklarında artar. Antikoagulant tedavi boyunca ise seviyenin azaldığı görülür. Ayrıca, PC seviyeleri ve sEPCR seviyeleri pozitif bir korelasyon göstermiştir. Sigara kullanımı, vücut kitle indeksi, ABO kan grubu ve diğer pıhtılaşma faktörlerinin (F II, V, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII A ve B alt ünitesi, fibrinojen, protein S, antitrombin) plazma sEPCR seviyeleri üzerinde hiçbir etkiye sahip olmadığı saptanmıştır (Uitte de Willige, Van Marion et al. 2004). Düşük sEPCR seviyelerinin düşük trombin üretimini yansıttığı olasıdır. Trombinin kültüre edilmiş hücrelerde sEPCR salınımını uyardığı rapor edilmiştir (Gu, Katsuura et al. 2000).

EPCR geninde birçok moleküler genetik çalışma yapılmış ve bazı nükleotid değişimleri tanımlanmıştır. Ekzon 3'de 6367. pozisyonda 23 bç'lik bir insersiyon, intron 2'de bir

polimorfizm (C6333T), ekzon 4'de bir polimorfizm (A6936G), 3'UTR'da ise diğeri bir polimorfizm (G7014C) tanımlanmıştır (Uitte de Willige, Van Marion et al. 2004).

23 bç'lik insersiyon, 5 aminoasitin insersiyonuna ve proteinin sentezinin erken sonlanmasına neden olur. Böylece PC aktivasyonunun azalmasına yol açar. Bu, tromboz riski olarak öne sürülmüştür (Zecchina, Bosio et al. 2002) ve fetal kayıplarla ilişkilendirilmiştir (Franchi, Biguzzi et al. 2001).

EPCR'nin 4 yaygın haplotipi bulunmaktadır. *EPCR* genindeki varyasyonların ya da plazma s*EPCR* seviyelerinin DVT için risk faktörü olup olmadığının araştırıldığı bir çalışmada, bunlardan A3 haplotipinin, s*EPCR* seviyelerindeki varyasyonların % 86.5'ini açıkladığı gösterilmiştir (Uitte de Willige, Van Marion et al. 2004). A3 Haplotipi için spesifik olan G alleli artan plazma s*EPCR* seviyeleriyle ilişkilendirilmiştir (Saposnik, Reny et al. 2004). Diğeri haplotipler plazma s*EPCR* seviyeleri üzerinde aynı etkiyi göstermemiştir. Haplotip 4 ise, çok az artan riskle bağdaştırılmıştır (Uitte de Willige, Van Marion et al. 2004). Çalışmamızda haplotip 2, 3 ve 4'ü içeren baz değişikliklerine rastlanmamıştır.

Venöz tromboz riski ve *EPCR* haplotipleri arasındaki ilişkiye bakıldığında; Haplotip 1, azalan riskle ilişkilendirilmiştir. Haplotip 2 ve 3, venöz trombozla ilişkilendirilmemiştir. Haplotip 4 ise, çok az artan riskle ilişkilendirilmiştir ve kadınlarda bu risk oranı daha da fazladır. Haplotip 4 hariç, diğeri haplotiplerin getirdiği riskler cinsiyetle alakalı bulunmamıştır. Bu çalışmada, 4 haplotipin hiçbiri de bir şekilde artan riskle ilişkilendirilmemiştir (Uitte de Willige, Van Marion et al. 2004). Ancak yapılan başka bir çalışmada, A3 haplotipinin dağılımı cinsiyetle alakalı bulunmuştur ve derin ven trombozlu erkeklerde daha sık görülür. (Ulu, Gunal et al. 2007). Ve yine bu çalışmanın aksine Saposnik et al, artan plazma s*EPCR* seviyeleriyle ilişkilendirilen A3 haplotipinin venöz tromboz için aday bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur (Saposnik, Reny et al. 2004). A3 Haplotipindeki Ser219Gly değişimi moleküldeki bir konformasyonel değişime neden olur. Değişiklik, belki *EPCR* salınımına katkıda bulunduğu bilinen metalloproteinaza duyarlılığını ve membran içindeki *EPCR*'nin lokasyonunu etkileyebilir (Esmon 2006). A3 haplotipi venöz tromboz için bir risk faktörü olarak görülür. A3 haplotipi ayrıca koroner kalp hastalığında da risk artırıcı olarak saptanmıştır (Esmon 2006). Fakat yüksek s*EPCR* seviyelerinin etkisi ve bunun A3 haplotipiyle alakası (arterial

trombozdaki) hala bilinmemektedir. Artan sEPCR seviyeleri kontrollerle kıyaslandığında pediatrik yaşta inme riskini arttırır. sEPCR'nin yüksek plazma seviyeleri, koagülasyona aracılık eden EPCR'nin fonksiyonunu kaybetmesine öncülük eder. *EPCR* A3 Haplotipi inme riskini 3.2 kat arttırır. Azalan APC de A3 ile ilişkili bulunmuştur ve tromboz için bir risk faktörüdür (Saposnik, Reny et al. 2004; Ulu, Gunal et al. 2007).

A1 Haplotipinin ise, dolaşımdaki APC'nin yüksek seviyeleriyle ve DVT'nin azalan riskiyle ilişkilendirildiği rapor edilmiştir (Uitte de Willige, Van Marion et al. 2004). Bu çalışma, tromboz riski ve *EPCR* haplotipleri arasında güçlü bir bağ olmadığını, düşük sEPCR seviyelerinin DVT riskini azalttığını öne sürer. Düşük plazma sEPCR seviyeleri, metalloproteolitik kesimin azalışı ya da etkisini kaybedişinin bir sonucu olabilir. Espana et al, A1 haplotipi için spesifik olan C allelindeki polimorfizmin (G7014C) DVT riskinde 2,6 kat azalışa neden olduğunu göstermiştir (España F 2001). Ancak, Galligan et al tarafından yapılan başka bir çalışmada aynı polimorfizmin venöz tromboz riskiyle ilişkisi bulunamamıştır (Galligan, Powell et al. 2002). FVL taşıyıcılarında, *EPCR* geninde 4678C allelinin varlığı VTE riskini azaltan, telafi edici bir antitrombotik etkiyi meydana getirir. *EPCR* 4678CC genotipini taşıyanlar 4678GC ya da 4678GG taşıyanlara oranla ilk trombotik olaylarını önemli derecede geç tecrübe ederler. 40 yaşında hala tromboz geçirmeme olasılığı 4678C taşıyanlarda, 4678 GC,GG taşıyanlara oranla daha yüksektir. 4678CC genotip sıklığı sağlıklı kişilerde VTE'li hastalardan daha yüksektir. Yani, 4678CC genotipi VTE'ye karşı 3 kat daha koruyucudur. VTE riski ile c.4678G>C polimorfizminin ilişkisini açıklayan moleküler mekanizma henüz tanımlanamamıştır. A1 haplotipinin kendi kendine APC seviyelerini arttırmaya neden olup olmadığını ya da *EPCR* geninin bu haplotipindeki 4678C ile bağlantılı diğer varyasyonlardan dolayı mı olup olmadığı bilinmemektedir. Fonksiyonel transkripsiyon bağlama bölgeleri genelde genin promotor bölgesinde lokalize olur ancak, 3'UTR'da olduğu örnekler de vardır. Alternatif olarak, 4678C alleli artan mRNA stabilitesi ve protein ekspresyonuyla da ilişkilendirilebilir (Medina, Navarro et al. 2005).

Medina ve ark. (4) A3 haplotipinin ve 3'UTR daki polimorfizmin FVL'li hastalardaki tromboz sıklığındaki katkısını analiz etmiştir ve A3 haplotipinin etkisi olmadığını gözlemlemiştir, ancak 4678CC genotipi ile tromboz oluşumu arasında azalan bir sıklık gözlemlemiştir. Belki bu gözlemin temeli, *EPCR* ekspresyon seviyelerini arttırabilen bu *EPCR* mRNA'sının kuvvetli stabilitesi üzerine oturabilir.

EPCR genindeki varyasyonların sEPCR seviyeleriyle ilişkilerinin incelenmesi ve bu ilişkinin tromboz için bir risk faktörü olup olmadığının araştırılması amaçlanan solubl EPCR seviyeleri 50 ng/μl'den düşük ve 130 ng/μl'den yüksek 169 bireyin tarandığı çalışmamızda; 3'UTR'da c.4678C>G değişimine rastlanmıştır. Bu değişimin yüksek sEPCR seviyesine sahip bireylerde tromboz riski üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu etkinin sEPCR seviyesi üzerinde etkili olduğu ortaya konan A3 Haplotipinden kaynaklanıp kaynaklanmadığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu etkinin tam olarak açıklanabilmesi için, gelecekteki çalışmalarda *EPCR* geninin 3'UTR'ındaki bu haplotipindeki bağlantılı diğer varyasyonların da araştırılması önerilmiştir.

Sonuç olarak,

EPCR haplotipleri ve tromboz riski arasında henüz güçlü bir ilişki bulunmasa da, PC ve sEPCR seviyesi arasında bir bağlantı vardır (Ulu, Gunal et al. 2007).

EPCR genine ait 4 ekzonun Türk popülasyonunda solubl EPCR seviyeleri 50 ng/μl'den düşük ve 130 ng/μl'den yüksek bireyler için tarandığı bu çalışmada;

1. 5'UTR'ı ve sinyal peptidi kodlayan 1. ekzonda ve ekstraselüler bölgeyi kodlayan 2. ve 3. ekzonlarda herhangi bir mutasyon ya da polimorfizm saptanamamıştır.
2. 2. intronda c.3998C>T değişimi saptanmıştır. Bu değişim tromboz açısından risk faktörü olması bakımından anlamlı bulunmamıştır.
3. 3'UTR'da c.4678C>G değişimi (A1 Haplotipi) saptanmış olup, bu polimorfizmin trombozlu olgular, Behçet ve İnme hastaları üzerindeki etkisi tanımlanmıştır.
4. 3'UTR'ın RNA stabilitesi üzerindeki rolü düşünülecek olursa, 3'UTR'da belirlediğimiz bu polimorfizm tromboz açısından önem taşıyabilir.

KAYNAKLAR

Akar, N. (1999). Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş

Akar, N., R. Gokdemir, et al. (2002). "Endothelial cell protein C receptor (EPCR) gene exon III, 23 bp insertion mutation in the Turkish pediatric thrombotic patients." Thromb Haemost 88(6): 1068-9.

Anzola, G. P., M. Magoni, et al. (1993). "Early prognostic factors in ischemic stroke. The role of protein C and protein S." Stroke 24(10): 1496-500.

Dahlback, B. (1995). "New molecular insights into the genetics of thrombophilia. Resistance to activated protein C caused by Arg506 to Gln mutation in factor V as a pathogenic risk factor for venous thrombosis." Thromb Haemost 74(1): 139-48.

Dahlback, B. (2005). "Blood coagulation and its regulation by anticoagulant pathways: genetic pathogenesis of bleeding and thrombotic diseases." J Intern Med 257(3): 209-23.

Dahlback, B. and B. O. Villoutreix (2005). "Regulation of blood coagulation by the protein C anticoagulant pathway: novel insights into structure-function relationships and molecular recognition." Arterioscler Thromb Vasc Biol 25(7): 1311-20.

Esmon, C. T. (1989). "The roles of protein C and thrombomodulin in the regulation of blood coagulation." J Biol Chem 264(9): 4743-6.

Esmon, C. T. (1992). "The protein C anticoagulant pathway." Arterioscler Thromb 12(2): 135-45.

Esmon, C. T. (2000). "The endothelial cell protein C receptor." Thromb Haemost 83(5): 639-43.

Esmon, C. T. (2001). "Protein C anticoagulant pathway and its role in controlling microvascular thrombosis and inflammation." Crit Care Med 29(7 Suppl): S48-51; discussion 51-2.

Esmon, C. T. (2003). "The protein C pathway." Chest 124(3 Suppl): 26S-32S.

Esmon, C. T. (2004). "Interactions between the innate immune and blood coagulation systems." Trends Immunol 25(10): 536-42.

Esmon, C. T. (2004). "Structure and functions of the endothelial cell protein C receptor." Crit Care Med 32(5 Suppl): S298-301.

Esmon, C. T. (2006). "The endothelial protein C receptor." Curr Opin Hematol 13(5): 382-5.

Esmon, C. T. (2006). "Inflammation and the activated protein C anticoagulant pathway." Semin Thromb Hemost 32 Suppl 1: 49-60.

Esmon, C. T. and W. G. Owen (1981). "Identification of an endothelial cell cofactor for thrombin-catalyzed activation of protein C." Proc Natl Acad Sci U S A 78(4): 2249-52.

España F, M. P., Mira Y, Estelles A, Vaya A, Villa P, Royo M, Aznar J, Bertina RM. (2001). "A new polymorphism in the 3'UTR region of the endothelial protein C receptor associated with increased levels of circulating activated protein c and decreased risk of venous thrombosis." Thromb Haemost. Abstract OC885(1 (Suppl. 1)).

Franchi, F., E. Biguzzi, et al. (2001). "Mutations in the thrombomodulin and endothelial protein C receptor genes in women with late fetal loss." Br J Haematol 114(3): 641-6.

Fuentes-Prior, P., Y. Iwanaga, et al. (2000). "Structural basis for the anticoagulant activity of the thrombin-thrombomodulin complex." Nature 404(6777): 518-25.

Fukudome, K. and C. T. Esmon (1994). "Identification, cloning, and regulation of a novel endothelial cell protein C/activated protein C receptor." J Biol Chem 269(42): 26486-91.

Galligan, L., C. Powell, et al. (2002). "The G7763C endothelial protein C receptor (EPCR) gene mutation: prevalence and association with DVT in the Irish population." Thromb Haemost 88(1): 163-5.

Greenfield, L. (1994). "Venous and lymphatic disease." Principles of surgery 6:9891014.

Gu, J. M., Y. Katsuura, et al. (2000). "Endotoxin and thrombin elevate rodent endothelial cell protein C receptor mRNA levels and increase receptor shedding in vivo." Blood 95(5): 1687-93.

Hart, R. G. and M. C. Kanter (1990). "Hematologic disorders and ischemic stroke. A selective review." Stroke 21(8): 1111-21.

Hayashi, T., H. Nakamura, et al. (1999). "Organization and chromosomal localization of the human endothelial protein C receptor gene." Gene 238(2): 367-73.

Kayaalp O., Tıbbi Farmakoloji, Cilt 2, 5. baskı s.1353-1421, Koagulasyon ve hemostaz, 1990

Kohler, J., J. Kasper, et al. (1990). "Ischemic stroke due to protein C deficiency." Stroke 21(7): 1077-80.

Kumar, V., R. S. Cotran, et al. (2003). Robbins basic pathology. Philadelphia, Saunders.

Kurosawa, S., D. J. Stearns-Kurosawa, et al. (1997). "Identification of functional endothelial protein C receptor in human plasma." J Clin Invest 100(2): 411-8.

Liaw, P. C., P. F. Neuenschwander, et al. (2000). "Mechanisms by which soluble endothelial cell protein C receptor modulates protein C and activated protein C function." J Biol Chem 275(8): 5447-52.

Mann, K. G. (1999). "Biochemistry and physiology of blood coagulation." Thromb Haemost 82(2): 165-74.

Margarethe, G. (2008). "Soluble protein C receptor: why?" Blood 111.

Medina, P., S. Navarro, et al. (2005). "Influence of the 4600A/G and 4678G/C polymorphisms in the endothelial protein C receptor (EPCR) gene on the risk of venous thromboembolism in carriers of factor V Leiden." Thromb Haemost 94(2): 389-94.

Mosnier, L. O., B. V. Zlokovic, et al. (2007). "The cytoprotective protein C pathway." Blood 109(8): 3161-72.

OMIM-600646.

Öner, C. (2000). "Genetik Kavramlar." 6. Baskı.

Paient, G. (1998). "DVT prophylaxis after total joint arthroplasty." Medscape Orthopaedics and Sports Medicine 2: 67.

Qu, D., Y. Wang, et al. (2006). "The Ser219-->Gly dimorphism of the endothelial protein C receptor contributes to the higher soluble protein levels observed in individuals with the A3 haplotype." J Thromb Haemost 4(1): 229-35.

Riewald, M., R. J. Petrovan, et al. (2002). "Activation of endothelial cell protease activated receptor 1 by the protein C pathway." Science 296(5574): 1880-2.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, et al. (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science 239(4839): 487-91.

Sambrano, G. R., E. J. Weiss, et al. (2001). "Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis." Nature 413(6851): 74-8.

Sambrook, J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989). Molecular Cloning. A Laboratory Manual.(2nd Ed.). ISBN 0-87969-309-6

Sanger, F. (2004). "Determination of nucleotide sequences in DNA." Biosci Rep 24(4-5): 237-53.

Saposnik, B., J. L. Reny, et al. (2004). "A haplotype of the EPCR gene is associated with increased plasma levels of sEPCR and is a candidate risk factor for thrombosis." Blood 103(4): 1311-8.

Simmonds, R. E. and D. A. Lane (1999). "Structural and functional implications of the intron/exon organization of the human endothelial cell protein C/activated protein C receptor (EPCR) gene: comparison with the structure of CD1/major histocompatibility complex alpha1 and alpha2 domains." Blood 94(2): 632-41.

Sipahi, T., H. Pöcan, et al. (2006). "Effect of various genetic polymorphisms on the incidence and outcome of severe sepsis." Clin Appl Thromb Hemost 12(1): 47-54.

Stearns-Kurosawa, D. J., K. Swindle, et al. (2002). "Plasma levels of endothelial protein C receptor respond to anticoagulant treatment." Blood 99(2): 526-30.

Strachan Tom., R. A. P. (1999). "Human Molecular Genetics 2."

Taylor, F. B., Jr., G. T. Peer, et al. (2001). "Endothelial cell protein C receptor plays an important role in protein C activation in vivo." Blood 97(6): 1685-8.

Temizkan, G., Yılmaz S., Öztürk M., Arı Ş., Ertan H., Olgun A., and A. N. Sarıkaya A.T. (1999). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler.

Uitte de Willige, S., V. Van Marion, et al. (2004). "Haplotypes of the EPCR gene, plasma sEPCR levels and the risk of deep venous thrombosis." J Thromb Haemost 2(8): 1305-10.

Ulu, A., D. Gunal, et al. (2007). "EPCR gene A3 haplotype and elevated soluble endothelial protein C receptor (sEPCR) levels in Turkish pediatric stroke patients." Thromb Res 120(1): 47-52.

Van Kooten, F., G. Ciabattoni, et al. (1994). "Evidence for episodic platelet activation in acute ischemic stroke." Stroke 25(2): 278-81.

Weitz, J. I. (1997). "Low-molecular-weight heparins." N Engl J Med 337(10): 688-98.

Weksler, B. B. (1995). "Hematologic disorders and ischemic stroke." Curr Opin Neurol 8(1): 38-44.

Xu, J., D. Qu, et al. (2000). "Metalloproteolytic release of endothelial cell protein C receptor." J Biol Chem 275(8): 6038-44.

Yalcindag, F. N., F. Batioglu, et al. (2008). "Soluble endothelial protein C receptor levels in Behcet patients with and without ocular involvement." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 246(11): 1603-1608.

Ye, X., K. Fukudome, et al. (1999). "The endothelial cell protein C receptor (EPCR) functions as a primary receptor for protein C activation on endothelial cells in arteries, veins, and capillaries." Biochem Biophys Res Commun 259(3): 671-7.

Zecchina, G., S. Bosio, et al. (2002). "Epcr 23 bp insertion in a patient with severe progressive arterial disease: a dominant loss of function mutant in conditions of increased APC request?" Br J Haematol 119(3): 881-2.

<http://lokman.cu.edu.tr/anestezi/anestezinot/yogun.htm>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

ÖZGEÇMİŞ

Ocak 2009

Kişisel Bilgiler;

Adı Soyadı : Afife Karabıyık
Doğum Yeri : ANKARA
Doğum Tarihi : 06 / 12/ 1983
Yabancı Dili : İngilizce
İletişim Adresi : Suadiye cad. 38 / 3 Yenimahalle / ANKARA
Tel : 0312 3447107
e-mail : afifekrbyk@gmail.com

Eğitim Bilgileri;

Lise : Yahya Kemal Beyatlı Lisesi (1997-2001)
Lisans : Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü (2002-2006)

Bilimsel Çalışmaları;

Posterler :

Endotelial Protein C Reseptör 3'UTR 919C>G değişiminin plazma solubl EPCR düzeylerine etkisi. 34. Ulusal Hematoloji Kongresi. 8-11 Ekim 2008, İzmir. P86.

Ödüller :

34. Ulusal Hematoloji Kongresi. 8-11 Ekim 2008, İzmir. Genç Katılımcı Ödülü.