

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**FAKTÖR VII PROMOTOR BÖLGE POLİMORFİZİMLERİNİN
ATEROSKEROZLU HASTALARDA HAPLOTİP
GRUPLANDIRILMASIYLA TROMBOZ OLUŞUMUNDA ROLÜNÜN
ARAŞTIRILMASI**

Özge CUMAOĞULLARI

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

2009-ANKARA

KABUL ONAY

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

Başkan : Prof. Dr. Nejat AKAR

imza :

Üye :

imza :

Üye :

imza :.

Üye :

imza :.

Üye:

imza :

Prof. Dr. Asuman KARAKAYA
Enstitü Müdürü

FVII Promotor Bölge Polimorfizmlerinin Aterosklerozlu Hastalarda Haplotip Gruplandırılmasıyla Tromboz Oluşumunda Rolünün Araştırılması

ÖZET

Koagülasyon faktörü VII (FVII), K vitamini bağımlı zimojen olan bir serin proteazdır, kan damarı hasarlanması ile doku faktörü ile etkileşime girerek trombozun başlatılmasında önemli rolü bulunmaktadır. Son çalışmalara göre bazı FVII genindeki polimorfik markörler ve FVII plazma düzeyi ile ilişkili olduğuna dair kanıtlar belirlenmiştir. FVII plazma düzeyinin çevresel ve genetik faktörler ile etkilenmektedir. Promotorda bulunan bazı polimorfizimlerin daha önce yapılan çalışmalara göre FVII plazma düzeyinin artış veya azalması ile ilişkili olarak bulunmuştur. Bazı çalışmalarda değişen FVII düzeyinin Koroner arter hastalığına(KAH) sebep olduğu veya risk getirdiği rapor edilmiş olmasına rağmen bir diğer çalışmalarda etkili olmadığı belirlenmiştir. Genetik faktörlerden biri olan -323ins10bç polimorfizmi, FVII düzeyinin azalması ile ilişkili olduğu bilinmekte ve KAH'na karşı koruyucu olabileceği öne sürülmüştür. Bu polimorfizm beyazlarda -401G/T polimorfizimi ile tam allelik bağlantı olduğu bilinmektedir. -402 G/A polimorfizimi zıt etkili ile ilişkilidir, ancak klinik olarak çok iyi incelenmemiştir. Aynı zamanda FVII polimorfizimi etnik köken tarafından etkilenmektedir.

Bu çalışmada hedefimiz FVII gen polimorfizimlerinin KAH üzerine Türk populasyonunda etkisinin değerlendirilmesi ve ilişkili haplotiplerin belirlenmesidir.

FVII geni üç polimorfizimi 101 sağlıklı kontrol ve 224 koroner arter hastası çalışılmıştır. Bu üç *FVII* geni polimorfizimi analizi PCR – SSCP ve DNA dizileme teknolojisi ile yapılmıştır.

Türk populasyonunda yeni bir haplotip belirledik. -323ins10bç, -401G/T, -402G/A promotor polimorfizimleri koroner olayların başlangıcı ile ilişkili olduğu bulunmamıştır. -323ins10bç allel frekansının Kuzey Avrupa, İtalyanlar, Etiyopyalılar ve Hintliler ile benzer bulunmuştur. -401G/T allel frekansı İtalyan ve Etiyopyalılar ile benzerdir. -402G/A allel frekansı İtalyanlar ve Etiyopyalılar ile benzer olarak belirlenmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada üç polimorfizm ve ilişkili haplotiplerin KAH riski ile ilişkili olmadığı belirlenmiş, bunların frekanslarının komşu bölgeler ile benzer olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: FVII promotor, Ateroskleroz, -323ins/w-, -401G/T, -402G/A, TNP

The Role of FVII Promoter with Haplotype Alteration in Atherosclerosis Patients and Effect on the Pathophysiology of Thrombosis

ABSTRACT

Coagulation factor VII (FVII), a vitamin K-dependent zymogen of a serin protease, plays an important role in initiating thrombosis through the interaction with tissue factor at a site of blood vessel injury. Recent studies have provided evidence for association between common polymorphic markers in the *FVII* gene and plasma FVII levels. FVII plasma levels are influenced by environmental and genetic factors. Several polymorphisms in the promoter associated with decrease or increase of FVII plasma levels have been previously identified. Some studies have reported altered plasma FVII levels in groups with manifest or risk of coronary arterial disease (CAD), whereas other did not. One of the genetic factor is the -323ins10bp polymorphism, known to be associated with low FVII levels and has suggest to protect against CAD. This polymorphism is in complete allelic association with -401G/T polymorphism in Caucasians. The -402 G/A promoter polymorphism, that has been associated opposite effect, is clinically less well studied. Also the effect of the three FVII polymorphisms are ethnicity-dependent.

In this study we aimed to evaluate the effect of three *FVII* gene polymorphisms on the risk of CAD in Turkish population and find out the related haplotypes.

Three polymorphisms of the *FVII* gene were studied in 101 healthy control and 224 patient with coronary arterial disease. These polymorphisms of the *FVII* gene were studied using PCR - SSCP and DNA sequencing technologies.

In Turkish population we identified a new haplotype. The promoter polymorphisms, -323ins10bp, -401G/T, -402G/A, were not found to be associated with a risk of an initial coronary event. -323ins10bp allele frequency was similar to North European, Italians, Ethiopians and Indians. -401G/T allele frequency was found similar to Italians and Ethiopians. -402G/A allele frequency was find similar to Italians and Ethiopians. Thus the three polymorphisms and related haplotypes studied in this dissertation was found not to be associated with CAD risk and that their frequency were found to be similar to the surrounding geography.

Key words: FVII promoter, Atherosclerosis, -323ins/w-, -401G/T, -402G/A, SNP

ÖNSÖZ

Yüksek Lisans eğitimine başlarken mülakattan itibaren bana yön gösteren, benden bilgisini esirgemeyen ve bundan sonra da destek ve yardımına her zaman ihtiyaç duyacağım danışman hocam Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR'a; çalışmalarım sırasından bana maddi destek sağlayan K.K.T.C. Milli Eğitim Bakanlığına; benden yardım ve tecrübelerini esirgemeyen Doç. Dr. Mustafa TEKİN'e; bu çalışmanın gerçekleşmesi sırasında örneklerin toplanıp bize iletilmesinde yardımcı olan Doç. Dr. A. Rüçhan AKAR ve Uzm. Dr. Serkan DURDU'ya, ilgi ve sevgisini her zaman hissettiren yardımlarını esirgemeyen Uzman Bio. Ece AKAR'a; tez çalışmalarım ve tez yazımı sırasında her türlü yardım ve bilgisini esirgemeyen Uzman Bio. Ayşenur ÖZTÜRK ve Bio. Dr. Erkan YILMAZ'a; çalışmalarım sırasında çıkan olumsuzluklara karşı her zaman bana yardımcı ve destek olan, bilgisini esirgemeyen, Bio. Yonca EĞİN, Tek. Kadir SİPAHİ'ye; tez çalışmamı gerçekleştirirken birçok yerde bulamayacağım ortamı sağlayan, gerektiğinde desteklerini esirgemeyen, güzel anılar edindiğim, sevgili çalışma arkadaşlarım Bio. Zehra VELİ, Tek. Çiğdem ASLAN, Uzman Bio. Didem TORUN, Bio. Afife KARABIYIK, Bio. Emel USLU, Bio. Esin GÜNGÖR, Bio. Dr. İdil ASLAN, Uzman Bio. Duygu DUMAN, Uzman Bio. Aslı SIRMACI, Uzman Bio. F. Başak CENGİZ, Bio. Zafer ERİK, Bio. Duygu SANLIDİLEK, Bio. Emre KIZIL, Bio. Dilara KORKMAZ ve ismini saymadığım tüm Pediatrik Moleküler Genetik Ailesine, bu güne kadar özellikle biyoloji alanında ufkumu genişletip hayata farklı bakmamı sağlayan eğitimimde emeği olan tüm hocalarıma çok teşekkür ederim. Eğitimim sırasında sonuna kadar bana güvenen, destek olan, sevgi ve ilgisini uzakta olmalarına rağmen hissettiren, maddi ve özellikle manevi olarak bana destek olduklarını her zaman bildiğim, emeklerini asla ödeyemeceğim değerli aileme çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>SAYFA NO</u>
KABUL VE ONAY	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
DİZİLERİN LİSTESİ	x
SİMGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Koagülasyon Sistemi	3
2.1.1. Ekstrinsik Mekanizma	4
2.1.2. İntrinsik Mekanizma	5
2.2. Ateroskleroz	6
2.2.1. Hüresel ve moleküler iletişim (interaksiyon)	8
2.2.2. Lezyonun başlaması	9
2.2.3. İnflamasyon	9
2.2.4. Köpük hücre oluşumu	10
2.2.5. Fibröz Plak Oluşumu	11
2.2.6. Gelişmiş Lezyonlar ve Tromboz	12
2.2.7. Ateroskleroz oluşumunu etkileyen faktörler	14
2.3. Faktör VII	15
2.3.1. Genel Bilgiler	15
2.3.2. Faktör VII'nin aktivasyonu ve çalışması	18
2.3.3. Faktör VII Mutasyonları	20
2.3.4. Faktör VII Düzeyini Etkileyen Etmenler	21
2.3.5. FVII Promotor Bölgesi Polimorfizmleri	21
2.4. Tek Nokta Polimorfizmleri ve Haplotiplendirme	24
2.5. Moleküler Teknikler	27
2.5.1. Çözelti ve Solusyonlar	27
2.5.2. DNA İzolasyonu	27
2.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	27
2.5.4. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polimorphism- SSCP)	30
2.5.5. DNA Dizi Analizi	31
3. MATERYAL VE YÖNTEM	34
3.1. Yöntemler	34
3.1.1. DNA İzolasyonu	34
3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	36
3.1.2.1. FVII Promotor Gen Bölgesi Polimorfizmlerinin Belirlenmesi	36
3.1.2.2. FVII Gen Değişimlerinin İncelenmesinde PCR Koşulları	36
3.1.2.3. FVII Promotor Bölgesinin Amplifikasyonu	37

3.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi.....	38
3.1.4. SSCP Jeli için Poliakrilamid Jel Hazırlanması.....	39
3.1.5. SSCP Jeli için Gümüş Boyama	41
3.1.6. PCR Örneklerinin Temizlenmesi (Pürifikasyon)	42
3.1.7. DNA Dizi Analizi.....	42
3.2. Araştırma Bulguları.....	43
3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları.....	43
3.2.2. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polimorphism- SSCP) Bulguları.....	44
3.2.3. DNA Dizi Analizi Bulguları.....	45
3.2.4. İstatistiksel Sonuçlar.....	49
4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	51
KAYNAKLAR	54
ÖZGEÇMİŞ	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

SAYFA NO

Çizelge 3.1. Haplotip Analizi	49
Çizelge 3.2. -323 polimorfizmi için genotip dağılımı ve haplotip analizi.....	49
Çizelge 3.3. -401 polimorfizmi için genotip dağılımı ve haplotip analizi.....	50
Çizelge 3.4. -402 polimorfizmi için genotip dağılımı ve haplotip analizi.....	50
Çizelge 3.5. Diğer populasyonlardaki genotip dağılımı ve allel frekansı	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1.	Fibrin oluşumunda intrinsik ve ekstrinsik yollar	4
Şekil 2.2.	Normal arter yapısı.....	7
Şekil 2.3.	Aterosklerotik plak gelişim evreleri	8
Şekil 2.4.	İnflamasyon	10
Şekil 2.5.	Köpük hücre olumu	11
Şekil 2.6.	Fibröz plak oluşumu	12
Şekil 2.7.	Kompleks lezyon ve tromboz.....	13
Şekil 2.8.	Kromozom 13.....	15
Şekil 2.9.	Faktör VII protein topolojisi.....	16
Şekil 2.10.	Faktör VII-Doku Faktörü protein kompleksi.....	17
Şekil 2.11.	Faktör VII aktivasyonu.....	18
Şekil 2.12.	İki atasal kromozomun sonraki nesillere geçişi.....	24
Şekil 2.13.	İki kromozomun SNP bölgesi, A ve G alleleri gösterilmekte.....	25
Şekil 2.14.	SNP içeren kromozom bölgesi gösterilmiştir.....	26
Şekil 3.1.	Faktör VII promotor bölge SSCP ve DNA dizi analizi primeri amplifikasyon bölgesi.....	36
Şekil 3.2.	Faktör VII geni promotor bölgesi SSCP yöntemi için kullanılan primerlerin PCR ürünleri.....	44
Şekil 3.3.	Faktör VII geni promotor bölgesi DNA dizi analizi için kullanılan primerlerin PCR ürünleri.....	44
Şekil 3.4.a.	SSCP tekniği sonrasında band profili 1 ve 2 olarak isimlendirilmiş örneklerin poliakrilamid jel görüntüsü	45
Şekil 3.4.b.	SSCP tekniği sonrasında band profili 3 olarak isimlendirilmiş örneklerin poliakrilamid jel görüntüsü	45
Şekil 3.5.a.	SSCP tekniği sonrasında band profili 4 ve 5 olarak isimlendirilmiş örneklerin poliakrilamid jel görüntüsü	45
Şekil 3.5.b.	SSCP tekniği sonrasında band profili 6 olarak isimlendirilmiş örneklerin poliakrilamid jel görüntüsü	45
Şekil 3.6.	SSCP tekniği sonrasında bant profili I olarak isimlendirilen örneğin Forward primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.....	46
Şekil 3.7.	SSCP tekniği sonrasında bant profili II olarak isimlendirilen örneğin Reverse primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler	46
Şekil 3.8.	SSCP tekniği sonrasında bant profili III olarak isimlendirilen örneğin Forward primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.....	47
Şekil 3.9.	SSCP tekniği sonrasında bant profili IV olarak isimlendirilen örneğin Forward primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.....	47
Şekil 3.10.	SSCP tekniği sonrasında bant profili V olarak isimlendirilen örneğin Forward primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.....	48
Şekil 3.11.	SSCP tekniği sonrasında bant profili VI olarak isimlendirilen örneğin Forward primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.....	48

DİZİLERİN LİSTESİ

Sayfa No:

Dizi 2.1	<i>FVII</i> geni Promotor bölgesi SSCP için kullanılan primerler ile çoğaltılmış dizi	38
Dizi 2.2	<i>FVII</i> geni Promotor bölgesi DNA dizi analizi için kullanılan primerler ile çoğaltılmış dizi	38

SİMGELER DİZİNİ

°C	Santigrat derece
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
ACE	Angiotensin Konvertin Enzim
A	Adenin
apoB	Apolipoprotein B
apoE	Apolipoprotein E
bç	Baz çifti
CD40	TNF alfa süper ailesi üyesi
C	Sitozin
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitidin trifosfat
dGTP	Deoksigüanozin trifosfat
dNTP	Deoksinükleotit trifosfat
dTTP	Deoksitimidin trifosfat
DMSO	Dimetil sülfoksit
EGF-2	Epidermal Büyüme Faktörü II
FI	Fibrinojen
FII	Protrombin
FIII	Tromboplastin
FIV	Kalsiyum
FV	Proakselerin
FVII	Faktör VII
FVIIa	Aktif Faktör VII
FVIII	Faktör VIII, Antihemofilik Faktör
FVIIIa	Aktif Faktör VIII
FIX	Faktör IX
FIXa	Aktif Faktör IX
FX	Faktör X
FXa	Aktif Faktör X
FXI	Plazma tromboplastin komponenti
FXII	Hageman Faktör
FXIII	Fibrin stabilize edici faktör
g	Gram
G	Guanin
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HNF4	Hepatik nükleer faktör 4
IFN-γ	İnterferon gamma
ins	İnsersiyon
kDa	Kilo dalton
kb	Kilobaz
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein

lip(a)	Lipoprotein(a)
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MCSF	Makrofaj koloni uyarıcı faktör
M	Molar
mM	Milimolar
ml	Mililitre
mg	Miligram
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
NO	Nitrik oksik
MI	Myokard enfaktüs
PARs	Proteaz aktive eden reseptör
PA	Plazminojen Aktivatör
p	Kromozomun kısa kolu
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
pmol	Pikomol
s	Saniye
SNP	Tek nokta polimorfizmi
SSCP	Tek iplikçikli uygunluk polimorfizmi
TE	Tris EDTA
TBE	Tris, Borik asit, EDT
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilen-etilendiamin
TFA	Doku Faktörü
TF	Doku Faktörü
T	Timin
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hemostaz, kan kaybının önlenmesi anlamına gelir. Bir damar zedelendiği ya da yırtıldığında hemostazı sağlayan mekanizmalardan biri koagülasyon mekanizmasıyla pıhtı oluşumudur. Koagülasyon mekanizması ekstrinsik ve intrinsik yol olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Koagülasyon Faktör VII ekstrinsik yolda görev almaktadır. Ekstrinsik yolun aktivasyonu travmatize dokudan salınan doku faktörünün koagülasyon faktörü VII'ye bağlanarak K vitamini ve prekallikrein varlığında kompleks oluşturması ile gerçekleşir. Faktör VII aktivasyonu ile koagülasyon kaskadının devamı sağlanır ve Faktör IX, Faktör IXa, Faktör X Faktör Xa'ya aktive olarak pıhtı oluşumu için reaksiyonlar başlatılmış olur (Rao vd 1988, Hoffman vd 1995). FVII aktivasyonu ile hem intrinsik hem de ekstrinsik yolda pıhtı oluşumunda önemli olan elemanlar aktive olarak FVII-TF kompleksi pıhtılaşmada anahtar rol oynar.

Ateroskleroz karmaşık bir hastalıktır ve lipitlerin, fibröz elemanların geniş damar içinde birikmesi ile oluşur. Epidemiyolojik çalışmalar, aterosklerozun gelişiminde çevresel ve genetik etmenleri olduğu belirlenmiştir. Hücreler olaylar ve moleküler interaksyonları içeren olaylar hastalığın karmaşık olmasından dolayı belirlenip engellenememiştir (Lusis 2000). Koroner arter hastalığı aterosklerozun önemli bir belirtisidir (Kumar 2003). Çeşitli nedenler ile damar içinde plaklar oluşur ve artarak kalsifikasyon, lümenal yüzeyde ülserasyon ve küçük damarlarda kanama ile media içine büyüyerek karmaşık hale gelebilir. Gelişmiş lezyonlar kan damarını durduracak şekilde büyüebilir ve trombus veya kan pıhtısı olmasına neden olarak en önemli akut klinik komplikasyonlardan MI (miyokard enfarktüsü) veya strok (inme) ile sonuçlanır (Lusis 2000).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 1990 yılında ölüm ve engelli kalma nedenleri arasında 5. sırada yer alan kardiyovasküler hastalıkların 2030 yılına göre bir hesaplama yapıldığında günümüzde olduğu gibi 1. sırada yer alacağı ve yılda 17.4 milyon olan ölüm sayısının 23.4 milyon kişiye çıkacağı öngörülmektedir (Anonim 2008).

Koagülasyon Faktörü (FVII), ekstrinsik yolda kan pıhtılaşmasında görevli vitamin K bağımlı, kanda zimojen halde bulunan serin proteazdır (UniProt/Swiss-Prot). *FVII* geni 13. kromozomun uzun kolunda 3.4'de lokalizedir (Gilgenkrantz vd 1982, Gilgenkrantz vd 1986). Karaciğerde sentezlenir ve doku faktörü, proteaz aktive eden reseptör (PARs) ile

birlikte hücrel yüzeyde sinyal iletimi ile ilişkilidir. FVII-doku faktörü kompleksinin hücrel işlevleri yönettiği belirlenmiştir. İnflamasyon, ateroskleroz, doku tamiri, tümör büyümesi, metastaz gibi olaylar içinde işlevi olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Petersen vd 2008).

Yapılan çalışmalarda FVII promotor bölgesinde belirlenmiş polimorfizmlerin FVII düzeyini etkileyebildiği ve koroner arter hastalığına neden olabileceği gösterilmiştir. Bu polimorfizmler -3216C/T, -2987C/A, -670C/A,-668A/C, -630GA, -628A/G, -402G/A, -401G/T, -3230/10bçins, -122T/C (Bernardi vd 1994, Pollak vd 1995, Hooft 1996, Di Castelnovo vd 2000, Girelli vd 2000, Kudaravalli vd 2002, Sabater vd 2006) olarak sıralanabilir.

Çalışmamızda *FVII* geninin promotor bölgesinde bulunan ve daha önce yapılan çalışmalarda ateroskleroz sonrası gelişebilecek hastalıklar ile ilişkilendirilmiş polimorfizmlerden -323ins10bç, -401G/T, -402G/A, bölgeleri içine alınarak promotor bölge taraması, koroner arter hastalarında bu polimorfizmlerinin sıklığının belirlenmesi, yeni polimorfizmlerin tanımlanması ve bunların kardiyovasküler hastalıklar ile ilişkisinin ortaya konulması olarak amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 KOAGÜLASYON SİSTEMİ

Hemostaz, kan kaybının önlenmesi anlamına gelir. Bir damar zedelendiği ya da yırtıldığında çeşitli mekanizmalar hemostazı sağlar. Bu mekanizmalar; 1.Damar spazmı 2. Trombosit tıkaçı oluşumu 3. Koagülasyon mekanizmasıyla pıhtı oluşumu, 4. Fibröz dokunun pıhtı içine büyümesiyle damardaki deliğin kalıcı olarak kapatılmasıdır.

Hemostazın üçüncü mekanizması pıhtı oluşumudur. Damar duvarı ağır biçimde hasarlanmış ise 15-20 saniye içinde pıhtı oluşmaya başlar. Hasarlanma hafifse, pıhtılaşma 1-2 dakika içinde ortaya çıkar. Hasarlanan damar duvarı ve trombositlerden kaynaklanan aktivatör maddeler ve hasarlanan damar duvarına yapışan kan proteinleri pıhtılaşma sürecini başlatır.

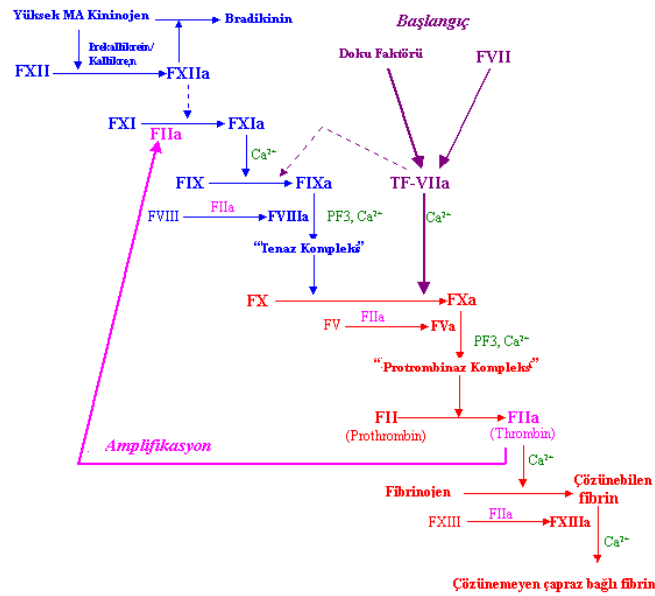
Damarın yırtılmasından 3-6 dakika sonra, eğer damarda delik çok geniş değilse, açıklığın tümü ya da damarın yırtılan ucu pıhtı ile dolar. 20 dakika ya da 1 saat sonra, pıhtı büzüşür, bu damarı daha çok kapatır.

Kan ve dokularda kan pıhtısını etkileyen 50'den fazla önemli madde bulunmuştur. Bunların bazıları pıhtılaşmayı sağlar, bunlara prokoagülan denir. Diğerleri pıhtılaşmayı inhibe ederler, bunlara ise antikoagülan denmektedir. Kanın pıhtılaşp pıhtılaşmaması bu iki grup madde arasındaki dengeye bağlıdır. Normalde antikoagülanlar baskındır ve kan pıhtılaşmaz. Ama bir damar zedelendiğinde hasarlanan alandaki prokoagülanlar aktive olarak antikoagülanlara baskın hale gelirler ve pıhtı oluşur.

Pıhtılaşmanın başlaması için çeşitli mekanizmalar gereklidir. Bu mekanizmalar, damar duvarı ve komşu dokuların veya kanın travmaya uğraması ya da kanın hasarlanmış endotelial hücreleriyle veya kan damarı endoteli dışındaki kolajen ve diğer doku elemanlarıyla teması sonucu aktive olurlar. Mekanizmanın başlaması için protrombin aktivatörü oluşmalıdır.

Protrombin aktivatörü, gerçekte birbirleriyle sürekli etkileşim halinde olan iki yolla oluşur. 1. Damar duvarı ve çevresindeki dokuların travmaya uğramasıyla başlayan *ekstrinsik yol* ve 2. Kanın kendi içinde başlayan *intrinsik yol* (Şekil 2.1).

1. Her iki yolda da, bir seri farklı plazma proteinleri ve özellikle beta globinler önemli rol oynar. Kan pıhtılaşma faktörleri proteolitik enzimlerin inaktif formlarıdır ve bunların çoğu kanda zimojen halde bulunurlar (Guyton 1996).
2. Koagülasyon faktörü, Faktör VII (FVII) K vitamini bağımlı serin proteazdır ve kan pıhtılaşmasında ekstrinsik yolda görev almaktadır. Bu nedenle özellikle ekstrinsik yol ele alınacaktır (Hoofit vd 1999). Pıhtılaşmada pozitif feedback söz konusudur. Kan pıhtısı gelişmeye başlar başlamaz kana yayılır ve kısır döngü oluşarak pıhtılaşıkça daha çok pıhtılaşma gerçekleşir. Trombinin fibrinojen yanında, diğer faktörlere de proteolitik etkisi vardır. Trombin artıkça pıhtı da artar (Guyton 1996).



Şekil 2.1. Fibrin oluşumunda intrinsik ve ekstrinsik yollar

Koagülasyon kaskadı ilk kez 1904 yılında öne sürülmüş, 1964 yılında Macfarlane tarafından ise klasik koagülasyon kaskadı belirlenmiştir (Macfarlane 1964). Bu model uzun yıllar kullanılmıştır. Ancak *in vivo* ortamda koagülasyon elemanları etkileşimlerini çok iyi açıklamadığından dolayı 2001 yılında Hoffman tarafından “hücre odaklı model” öne sürülmüş ve kullanılmaya başlanmıştır (Hoffman 2001)

2.1.1. Ekstrinsik Mekanizma

Travmatize dokudan transmembran hücre yüzey glikoproteini olan (Eilertsen vd 2004) *doku* faktörü veya doku tromboplastini denen çeşitli faktörler salınır (Guyton 1996). Ekstrinsik yolun aktivasyonu endotel hasarı, sistemik (sepsis veya endotoksomi) veya

bölgesel proinflatuvar aktivasyonu ile, hücreler doku faktörünü damara salgılatması sonucunda, kanda bulunan yüksek bağlanma afinitesi olan koagülasyon faktörü VII'ye bağlanarak K vitamini ve prekallikrein varlığında aktif hale getirir. Ekstrinsik yolun başlamasını sağlar. FVIIa doku faktörü kompleksi, K vitamini bağımlı Faktör IX (FIX) ve Faktör X'u (FX) aktive ederler. Çok az miktardaki aktif FX (FXa) trombositleri aktive eden trombini oluşturur (Eilertsen vd, 2004). Trombositlerin yüzeyinde anyonik fosfolipitler oluşur. Bunlar da Faktör V ve Faktör VIII için prokofaktördür. Aktif FX hemen doku faktörünün bir parçası olan doku fosfolipitlerle birlikte kalsiyum iyonu varlığında FV ile birleşerek protrombin aktivatörü deneni kompleksi oluşturur. Birkaç saniye içinde bu protrombini, trombine parçalar. Trombin fibrinojenden fibrini oluşturur. Oluşan fibrinojen monomerleri kalsiyum iyonu varlığında fibrin iplikçiklerini oluşturur. Fibrin monomerleri arasında kovalent bağlar bulunmaktadır. Fibrin iplikçikleri trombositlerden salınan fibrin stabilize edici faktör ile (FXIII) çok sayıda çapraz bağlar yaparak fibrin iplikçiklerinin güçlenmesini sağlar. Trombin aynı zamanda FXIII'ün aktivasyonunu da sağlar (Guyton 1996). Aktif FVIII serin proteaz ile birleşerek fosfolipid yüzeyde intrinsik mekanizma için FIX'u aktive eder. Bu kompleks FVIIa-doku faktörü kompleksine göre FX daha fazla bulunur. Aktif FX , FV protrombin, membran yüzeyindeki protrombinaz kompleks için primer aktivatördür. Trombinin artması ile, koagülasyonda FXI artar, trombus, FV, FVIII aktivasyonu sağlanır. Bu hızlı şekilde trombin oluşumu fibrinojen ve FXIII ile çözülmeyen çapraz fibrin oluşumu sağlanır (Eilertsen vd 2004).

2.1.2. İntrensik Mekanizma

Kanın kendisinin travmaya uğraması veya kanın travmatize bir damar duvarındaki kolajenle teması sonucu başlar. Kanın travmaya uğraması, Faktör XII ve trombositlerin aktivasyonuna neden olur. Aktif FXII, proteolitik enzimdir ve trombosit fosfolipitlerini ortama salar. Kininojen ve yüksek moleküler ağırlıklı kininojen ile Faktör XII ve Faktör XI aktive eder. Faktör VII'nin rolü, aktif FIX ve FVIII, trombosit fosfolipitleri, travmatize trombositlerden salınan Doku Faktörü (FIII) ile etki göstererek FX'u aktive ederler. Aktif Faktör X, Faktör V ve trombosit veya doku fosfolipidleriyle birleşerek protrombin aktivatörü kompleksi oluşur. Bundan sonra protrombinden trombine dönüşüm olur. Pıhtılaşma işleminin son basamakları harekete geçmiş olur (Guyton 1996).

2.2. Ateroskleroz

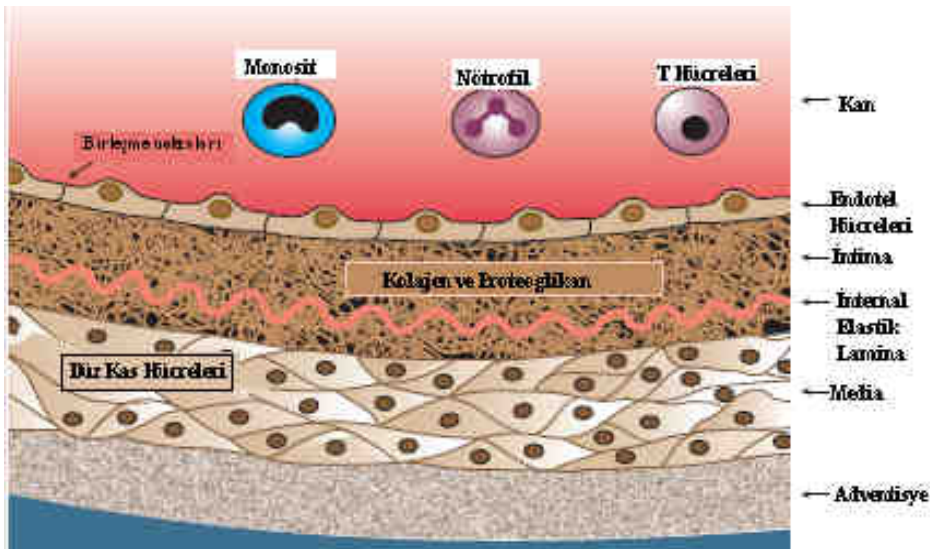
Arteriyoskleroz'un -kelime anlamı damarların sertleşmesi- arteriyel duvarların kalınlaşması ve damarların elastikiyetlerinin kaybı için kullanılan bir terimdir.

Üç formda oluşur. 1. En sık gözlenen şekli olan *Aterosklerozdur*. 2. Daha az klinik öneme sahip Mönckeberg medial kalsifik sklerozdur. 50 yaş üstü kişilerde müküler arterlerde kalsifik birikimler ile karakterizedir. 3. Küçük arterler ve arteriollerin hastalığı arteriosklerozdur.

Ateroskleroz, ateromlar veya fibröz yağlı plaklar (fibrofatty) denen damar lümenine doğru çıkıntı yapan ve lümeni tıkayan alttaki media tabakasını zayıflatan ve ciddi komplikasyonlar gösterebilen intimal lezyonlar ile karakterizedir. Koroner arter hastalığı aterosklerozun önemli bir belirtisi olduğundan ateroskleroz üzerine epidemiyolojik veriler büyük oranda iskemik kalp hastalığına bağlı ölüm oranları ile ifade edilir. Ateroskleroz öncelikle elastik arterler, büyük ve orta çaplı müküler arterleri etkiler. Semptomatik aterosklerotik hastalık en sık kalp, beyin, alt ekstremiteler ve böbrekleri besleyen arterleri tutar. Myokard enfarktüsü (kalp krizi), serebral enfarktüs (felç), aort anevrizmaları ve periferik damar hastalığı aterosklerozun major hastalığıdır (Kumar 2003).

Batı toplumunda, ölümlerin %50'sini oluşturmaktadır (Lusis 2000). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 1990 yılında ölüm ve engelli kalma nedenleri arasında 5. sırada yer alan kardiyovasküler hastalıkların 2030 yılına göre bir hesaplama yapıldığında günümüzde olduğu gibi 1. sırada yer alacağı ve yılda 17.4 milyon olan ölüm sayısının 23.4 milyon kişiye çıkacağı öngörülmektedir (Anonim 2008). Epidemiyolojik çalışmalar, aterosklerozun çevresel ve genetik etmenleri olduğunu belirlemiştir. Hücreler ve moleküler etkileşimleri içeren olayların belirlenmesi hastalığın karmaşık olmasından dolayı açıklanıp engellenememiştir. Son on yılda, bilimdeki gelişmeler, teknolojik yenilikler, genetik olarak modifiye edilmiş fareler sayesinde kolesterol metabolizmasını değiştiren moleküler mekanizmalar ve aterosklerotik plağın oluşması için risk faktörleri daha iyi anlaşılmıştır. Böylece aterosklerozun basit olarak yaşlanma nedeni ile konjenital bozukluk olmadığı, ancak kronik inflamatuvar durumların plak yırtılması ile akut klinik duruma dönüşüp ve tromboz oluşabileceği bilinmektedir.

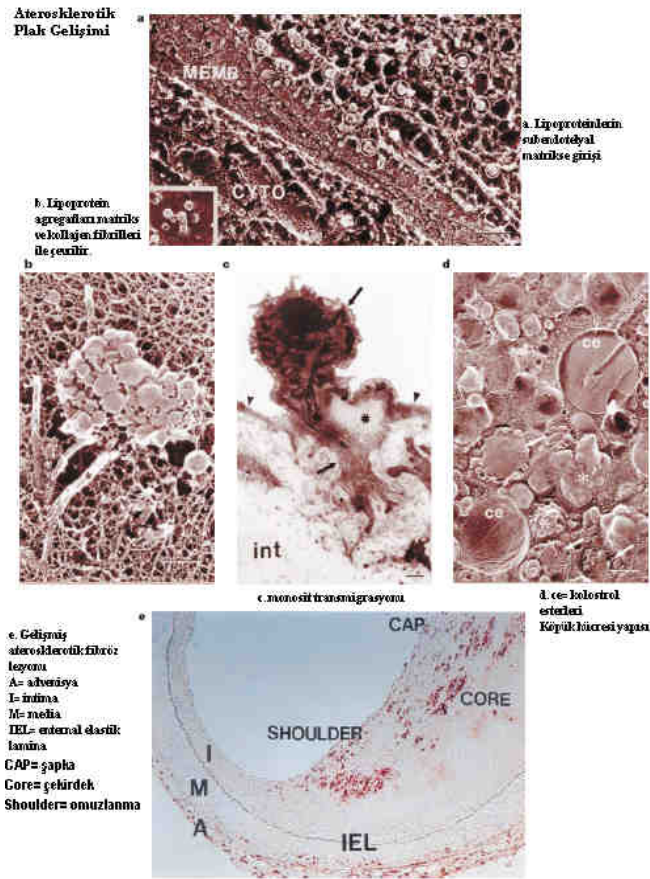
Ateroskleroz karmaşık bir hastalıktır, lipitlerin ve fibröz elemanların geniş damar içinde birikmesi ile oluşur. Normal arterlerin anatomisi Şekil 2.2’de verilmiştir. Aterosklerozun erken lezyonu, kolesterol tıkalı makrofajların subendotelde birikmesi ile olur ve bunlara köpük hücresi denir. İnsanda, bazı yağlı çizgilenmeler kişinin ilk on yılında gözlenebilir. İkinci on yılda koroner arterlerde, üçüncü veya dördüncü onyılıda ise serebral arterlerde yağlı çizgilenmeler oluşur. Arterlerde riskli olan lezyon noktaları bulunmaktadır. Yağlı çizgilenmeler bulunması klinik olarak önemli değildir, ama daha gelişmiş lezyona yol açan lipitçe zengin nekrotik çöküntülerin ve düz kas birikmesinin öncüsüdürler. Bazı ‘fibröz lezyonlar’ tipik olarak fibröz kep’e (Kumar 2003) sahiptirler ve bunlarda düz kas hücreleri, ekstraselüler matrikste bulunur, lipitçe zengin nekrotik çekirdek ile kapanırlar. Plaklar artarak kalsifikasyon, damar duvarı media içine doğru büyüme, lümenal yüzeyde ülserasyon ve küçük damarlarda kanama ile karmaşık hale gelebilir. Aynı zamanda gelişmiş lezyonlar kan damarını durduracak şekilde büyüyebilir, trombus veya kan pıhtısı olmasına neden olacak en önemli akut klinik komplikasyonlardan miyokard enfarktüs (MI) veya inme ile sonuçlanır. Genelde, tromboz lezyonun yırtılması veya erozyonu ile bağlantılıdır (Lusis 2000). Aterosklerotik plak oluşumu çeşitli aşamalar ile gerçekleşir.



Şekil 2.2. Normal arter yapısı (Lusis 2000)

2.2.1. Hüresel ve Moleküler İletişim (İnteraksiyon)

Patolojik çalışmalar, aterogenez sırasında damarda bir seri değişiklik olduğunu (Şekil 2.3) ve kan kökenli inflamatuvar hücrelerin monosit/makrofajların önemli anahtar rol oynadıklarını göstermektedir. Vasküler hücreler ile yapılan doku kültürü çalışmaları, ve makrojaj/monositler ile yapılan çalışmalardan öngörülerek, hastalığın başlaması ve tamamlanması için olası birçok yolun olduğu öne sürülmektedir. Kan damarında inflamatuvar cevap verilirken endotelin önemli rol oynadığı yönünde kanıtlar vardır ve intimadaki oksidatif LDL (modifiye)'nin birikmesi monosit birikmesine ve köpük hücre oluşumuna yol açtığı öne sürülmüştür. Son on yılda, aterogenezin moleküler mekanizmasının belirlenmesi için transgenik fareler veya gen hedefli fareler kullanılmıştır (Smithies vd 1995). *In vivo* olarak öngörünün test edilmesi için olanak sağlamıştır. Hayvan deneyleri insan ile şartları benzer olduğu ve lezyon yırtılması olmadan trombozu görülebildiği için güvenilirdir.



Şekil 2.3. Aterosklerotik plak gelişim evreleri (Lusis 2000)

2.2.2. Lezyonun Başlaması

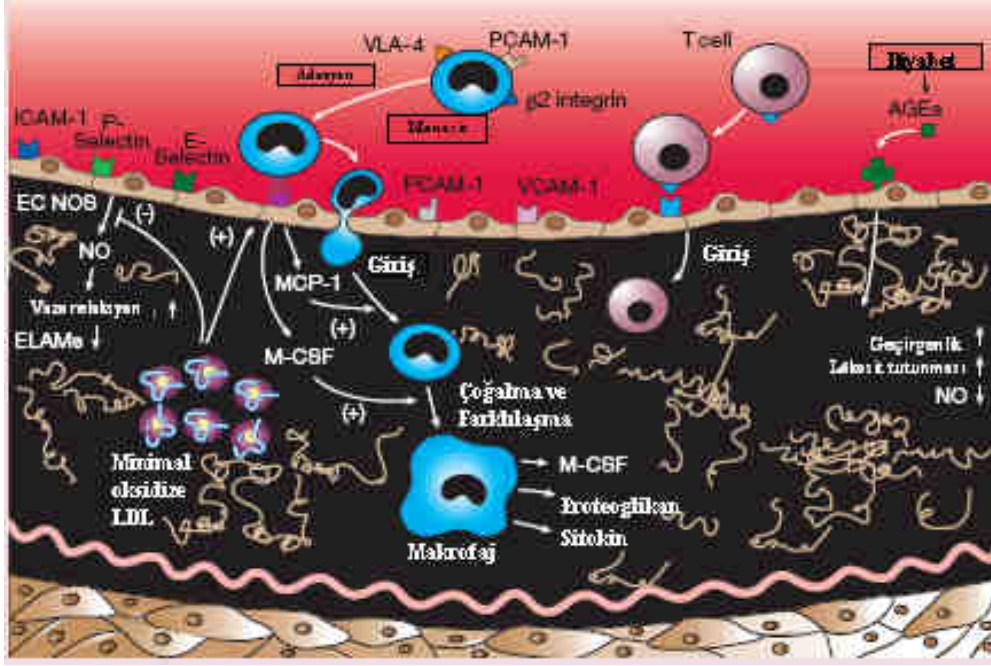
Aterosklerozun ilk başlangıcı subendotelyal matrikste LDL birikimidir. Kanda LDL arttıkça birikim de artar. Lezyon formasyonu için tercih edilen kısımlarda LDL birikimi ve taşınımı artar. LDL endotel hücreleri kavşak noktalarında pasif difüzyona uğrar ve LDL yapısında bulunan apolipoprotein B (apoB) ve matriks proteoglikanlar damar duvarına tutunma ve etkileşimde olduğu bilinmektedir (Boren vd 1998). Ek olarak, diğer apo-B içeren lipoproteinler lipoprotein (a) [lip(a)] olarak isimlendirilirler, artıkları intimada birikip ateroskleroza yöneltebilirler. Lip (a) LDL'ye benzer ancak polipeptid ucunda ek olarak apolipoprotein (a) bulunur. Bu apo-B ile disülfid köprü oluşturur. Bu da aterogenez fibrinoliz ve düz kas hücrelerinin etkisine bağlıdır (Grainger vd 1994).

Normal LDL makrofajlar tarafından köpük hücresi oluşturmak için alınmazlar. Bu nedenle LDL'nin damar duvarında modifiye olması gerekir (Goldstein vd 1979). Bu oksidasyon, lipoliz, proteoliz, çökme ile olur ve inflamatuvar köpük hücre oluşmasına yol açılır. HDL ateroskleroza karşı korumayı sağlar. Koruyucu etkisinin en önemli mekanizması, çevresel dokulardaki fazla kolesterolün uzaklaştırılması yönündedir. Ama ek olarak, HDL aynı zamanda, lipoprotein oksidasyonunu inhibe ederek de koruyucu etki yapar (Hegele vd 1999, Shih vd 2000).

2.2.3. İnflamasyon

Ateroskleroz, monosit ve lenfositlerin toplanması ile karakterizedir ama nötrofiller damar duvarında toplanmazlar (Şekil 2.4). Bu olayı uyaran, minimal okside LDL'nin birikmesidir. Bu da endotel hücrelerinin adezyon molekülleri, makrofaj koloni uyarıcı faktör (MCSF), büyüme faktörleri gibi pro-inflamatuvar molekülleri oluşturmasını uyarır (Watson vd 1997). Oksidize LDL nitrik oksit(NO) oluşumunu inhibe eder. Nitrik oksitin çoklu anti-aterogjenik aktivitesi vardır, damar gevşemesi gibi olayları sağlayan kimyasal araçtır. Endotelinde NO oluşturma eksikliği olan farede aterosklerozun artırıldığı gösterilmiştir (Knowles vd 2000). Ek olarak oksidize LDL, hemodinamik güçler, homosistein düzeyi, cinsiyet hormonları, ve enfeksiyon gibi diğer faktörler de inflamasyona neden olur. Diyabette endotel reseptörü ile bağlanan gelişmiş son ürünlerin glikasyonu sağlanarak inflamasyona katkıda bulunulur (Hofmann vd 1999). Monosit ve T

hücrelerinin endotele adezyonu, bu hücrelerde integrin VLA-4 (integrin $\alpha 4 \beta 1$) tarafından sağlanır, ve bu endoteldeki VCAM-1 (vasküler hücre adezyon molekülü I) ve fibronektinin geninin farklı mRNA ürünlerinden CS-1 ile etkileşirler. *In vivo* ve *in vitro* çalışmalarda, bu etkileşimlerin aterosklerozda rolü olduğu öne sürülmüştür (Shih vd 1998). Bir tür sitokin olan MCS-F, makrofajın çoğalması ve farklılaşmasını uyarır (Smith vd 1995).

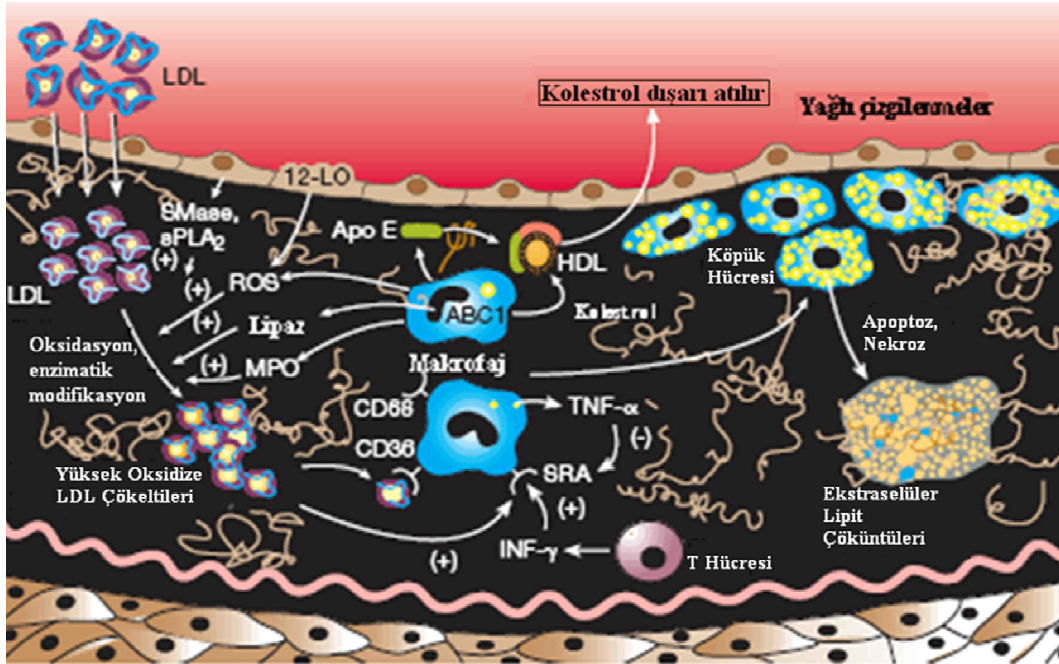


Şekil 2.4. İnflamasyon (Lusis 2000)

2.2.4 Köpük Hücre Oluşumu

LDL'nin makrofajlar tarafından yeterince hızlı alınıp köpük hücresi oluşturması için yüksek oksidasyon ile farklılaştırılması gerekir (Şekil 2.5). Bu farklılaştırma muhtemelen makrofaj ve endotel hücrelerde bulunan reaktif oksijen türevleri ile sağlanır. Aynı zamanda miyeloperoksidaz, sfingomiyolinaz, sekretuar fosfolipaz, insanda aterosklerotik lezyonda bulunanlar gibi birçok enzim görev almaktadır (Podrez vd 2000). Yüksek okside olmuş LDL molekülleri makrofajlar tarafından çok hızlı bir şekilde alınırlar, bu köpük hücre formasyonuna yol açar. Bu oluşum çok farklı ligandları tanıyan reseptörlerce sağlanır. 2 scavenger reseptörü SR-A ve CD36 birincil olarak önemli gözükmemektedir ve bu reseptörleri eksik olan farede yapılan çalışmalarda aterosklerotik lezyonlarda çok az azalma görülmüştür (Suzuki vd 1997, Febbraio vd 2000). Makrofaj aktivasyonu ile apo-E

salgılanır ve bu olay kolesterolün HDL ile dışarı akmasını sağlar. Böylece makrofajdan köpük hücrelerine dönüşüm inhibe edilir (Fazio vd 1997).



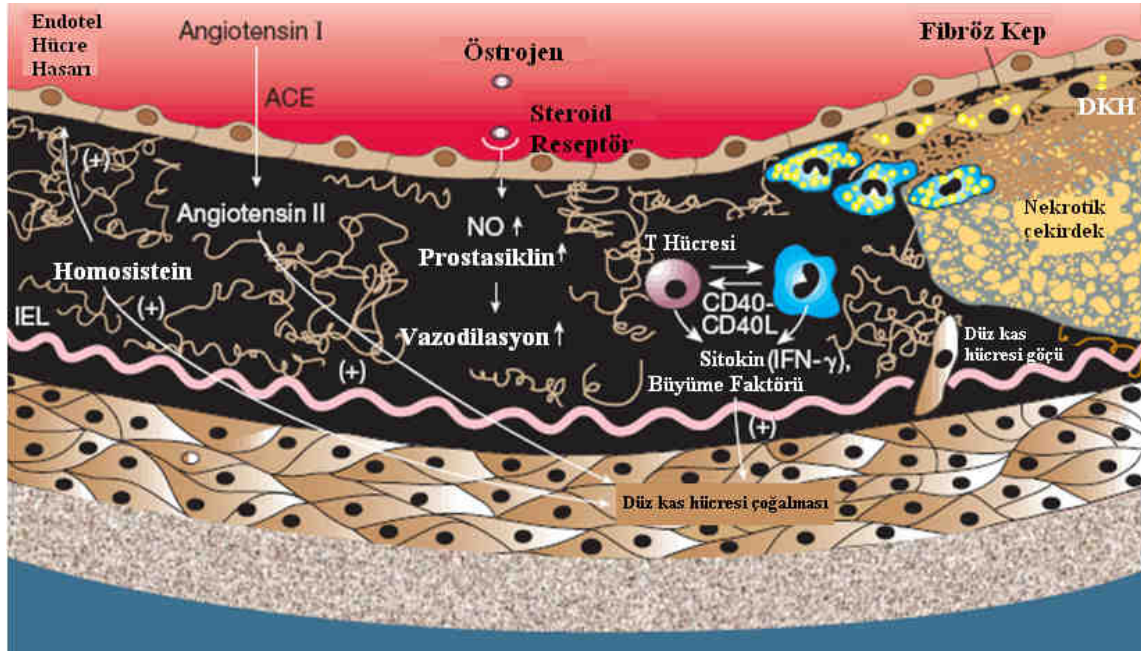
Şekil 2.5. Köpük hücre oluşumu (Lusis 2000)

2.2.5 Fibröz Plak Oluşumu

Fibröz plaklar karakteristik olarak ekstraselüler lipid kütleleri (bunların çoğu kolesterol ve esterleridir) düz kas hücresi ve ekstraselüler matriks birikmesi büyümesi şeklindedir (Şekil 2.6). Sitokin ve büyüme faktörleri makrofaj ve T hücresi tarafından salgılanır ve bunlar düz kas hücresi göçü, çoğalması, ekstraselüler matriks üretimi için önemlidirler. Son çalışmalara göre, CD40 ve ligandı CD40L (CD150) etkileşiminin, gelişmiş lezyonun oluşumunda önemli katkısı olduğu gösterilmiştir (Schönbeck vd 2000).

Fibröz lezyonun gelişmesi için gereken bazı faktörler, artmış homosistein düzeyi, hipertansiyon ve hormonlardır. Yüksek homosistein düzeyi endotel hücre hasarı ve damarsal düz kas hücresi artışına neden olur (Gerhard vd 1999). Aterosklerozda kan basıncı artışının renin-angiotensin yolunun uyarılması ile sağlandığı düşünülmektedir (Negoro vd 1995). Östrojenin anti-aterogenik özelliği vardır, plazma lipoprotein düzeyini etkiler, prostasiklin ve nitrik oksit (NO) üretimini uyarır (Nathan vd 1997).

Sitomegalovirüs enfeksiyonunun ateroskleroz ve arteriyel restenoz ile bağlantılı olduğu gösterilmiştir (Gupta vd 1997).



Şekil 2.6. Fibröz plak oluşumu (Lusis 2000)

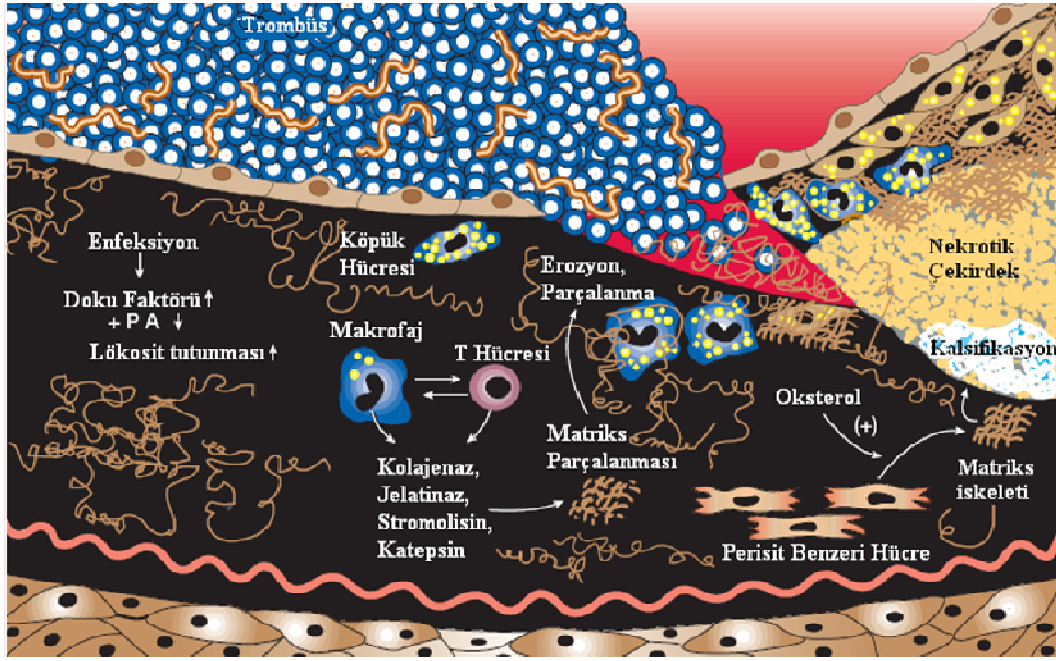
2.2.6 Gelişmiş Lezyonlar ve Tromboz

Patolojik çalışmalara göre, akut koroner olgularda trombüs gelişiminde, plakların bileşimi ve hasara açık olması damar daralmasından daha çok etkilidir (Şekil 2.7). Hasara açık plakların, genel olarak ince fibröz kepi vardır ve burada artan inflamatuvar hücre sayısı gözlenir (Lusis 2000). Fibröz kepin devamını sağlayan, matriks ürünleri, parçalanma ürünleri, her iki olayı da etkileyen inflamatuvar hücre ürünleridir. Örneğin; T hücreleri IFN- γ üretir, bu sitokin düz kas hücrelerinin matriks üretimini inhibe eder ve makrofaj ise ekstraselüler matriksi parçalayan farklı proteazlar salgılar (Libby vd 1999).

Aterosklerotik lezyon stabilizasyonu, kalsifikasyon, neovaskülarizasyon ile sağlanır, gelişmiş plaklarda benzer özellikler gözlenir. İntimal kalsifikasyon, perisit benzeri hücreler matriks iskeletini sentezler ve ardından kalsifikasyon kemik benzeri yapı şeklinde oluşur. Bu olay oksijen ile farklılaşmış kolesterol olan oksterol ve sitokinlerce düzenlenir (Watson

vd 1994). İnflamatuvar hücrelerinin kanala girişi mediandan başlayarak küçük damarların büyümesi ile sağlanır (Moultan vd 1999).

Lezyon çekirdeğinin trombogenik aktivitesi, koagülasyon sisteminin anahtar molekülleri olan proteinlerin, doku faktörü bulunmasına bağlıdır. Endotel hücreden doku faktörü salınımı ve makrofajlarda artmış okside LDL, enfeksiyon veya ligasyon ile endotel hücre yüzeyindeki CD40'ın inflamatuvar hücredeki CD40L bağlanması ile sağlanır (Schonbeck vd 2000).



Şekil 2.7. Kompleks lezyon ve tromboz (Lusis 2000)

Lüminal yüzeyde parçalanma, erozyon, ülserasyon, trombüs oluşumu uyarı ya da artıkların kan akımına boşalması lezyon içeriklerinden oluşan kolesterol embolilerine yol açar. Özellikle koroner arterlerde plağı veya plağı besleyen ince duvarlı kapillerlerin rüptürü ile başlayan plak içine hemoraji olabilir. Oluşan hematoma plağı genişletilebilir ya da plak rüptürüne yol açabilir. Çatlaklı lezyonlar üzerinde trombüs ve plak büyümesi gözlenir, bu da elastik dokuda fonksiyon kaybına neden olur (Kumar 2003).

2.2.7. Ateroskleroz Oluşumunu Etkileyen Faktörler

Ateroskleroz oluşumunda çevresel ve genetik faktörler etkilidir. Yaş önemli bir etkidir. Yaş ilerledikçe ateroskleroz gelişme riski artmaktadır. 40-50 yaş arası miyokard enfarktüsü görünme sıklığı 5 kat artmaktadır. Diğer faktörlerin eşit olması ile birlikte erkekler kadınlardan daha fazla ateroskleroz geçirme eğilimindedirler. Miyokard enfarktüsü ve aterosklerozun diğer komplikasyonları premenopozal kadınlarda, hiperlipidemi ya da ciddi hipertansiyon nedeni ile yatkınlık yoksa nadirdir.

Hiperlipidemi ateroskleroz için risk faktörüdür. Sigara ise erkeklerde iyi bilinen risk faktörüdür ve son zamanlarda aterosklerozun kadınlarda göreceli artışından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Diabetes mellitus hiperkolesterolemiye yol açar ve ateroskleroza yatkınlığı belirgin olarak arttırır. Obezite, hareketsizlik, stress, menopoz sonrası östrojen eksikliği, fazla karbonhidrat alımı, Lipoprotein (a), hidrojenize yağ alımı, Klamidia pnemonia infeksiyonu daha az önemli belirsiz, ölçülemeyen risk faktörleridir. Kişide birden fazla risk faktörünün bulunması ateroskleroz sonrası gelişebilecek klinik durumu ciddileştirebilir (Kumar 2003).

Aynı zamanda, çeşitli genetik risk faktörleri de ateroskleroza yatkınlığı artırmaktadır. LDL, VLDL, HDL, lipoprotein, koagülasyon sistemi faktörleri düzeyini belirleyen genlerdeki değişimler, homosistein, kan basıncı ile ilgili genlerdeki değişimler bu risk faktörleri içinde sayılabilir (Mehrabian vd 1998, Lusic 2000). Kardiyovasküler hastalıkların gelişiminde belirli genler ve çevresel etmenler bulunması yanında henüz etkileri tam olarak kanıtlanamamış polimorfizmler de bilinmektedir. Ateroskleroz sonrası kardiyovasküler hastalıklar geliştiğinden dolayı bu genetik varyasyonları, ateroskleroz gelişiminde etkili olabileceği düşünülmektedir. Multifaktoriyel inme oluşumuna belirlenmiş genetik polimorfizmler içinde *Faktör VII* gen değişimleri de yer almıştır (Bersano vd 2008).

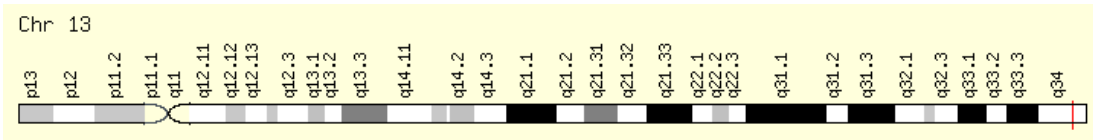
Son on yılda, kardiyovasküler hastalıklar ve miyokard enfarktüsü oluşumunda değişik polimorfizmler incelenmiş ve elde edilen sonuçlarla bir noktaya varılamamıştır. Bunun nedeni, kardiyovasküler hastalıkların bir çok faktör ve basamaktan oluşması, çok farklı biyokimyasal yol ve farklı genlerin yönettiği ara fenotiplere sahip olmasıdır. Diğer bir

neden ise araştırmalarda çok heterojen grupların oluşturulmasıdır. Çok iyi bilinen risk faktörleri yanında daha belirlenememiş etkenler de bulunmaktadır (Martinelli vd 2008).

2.2.Faktör VII

2.2.1. Genel Bilgiler

FVII ekstrinsik yolda kan pıhtılaşmasında görevli kanda zimojen halde bulunan tripsin benzeri serin proteazdır (EC 3.4.21.21) (UniProt/Swiss-Prot). *FVII* geni 13. kromozomun uzun kolunda 3.4'de lokalizedir (Gilgenkrantz vd 1982, Gilgenkrantz vd, 1986) (şekil 2.8). *FVII* geninin toplam uzunluğu, 12.8 kb dır. Bu gen koagülasyon Faktör VII genini kodlar ve FVII vitamin K bağımlı zimojendir (O'Hara vd 1987).



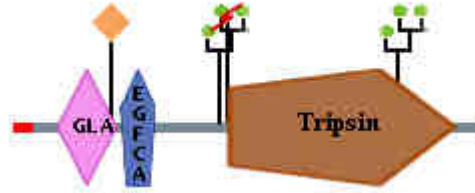
şekil 2.8. Kromozom 13 (GeneCards)

Koagülasyon faktör VIIa ve pıhtılaşma kaskadındaki diğer enzimler örneğin, faktör Xa ve trombin tripsin benzeri serin proteaz (Zur vd 1981, Ratnoff vd 1973) ailesindedirler. Diğer K vitamini bağımlı proteinler gibi iyi korunmuştur. FVIIa organizasyonunda N-terminal membran bağlama γ - karboksiglutamik asit (Gla) içeren domain, 2 epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri yapı ve C terminal serin proteaz domaini vardır (şekil 2.9). Olgun proteinin moleküler ağırlığı 50kDa boyutundadır ve 406 aminoasitten oluşmaktadır. FVII yapısal ve fonksiyonel olarak FIX, FX, protrombin ve protein C ile benzerdir (MIM no: 176860).

Enzimin aktif formu, 152 rezidüden oluşan hafif zincir, 254 rezidüden oluşan ağır zincirden oluşmaktadır ve -Arg-152-Ile-153 bölgesindeki peptit bağı yarılması ile bu sağlanır ve bunlar disülfid bağlar ile birbirlerine bağlıdırlar (Pike 1999).

Post translasyonel modifikasyonda N-terminal ucunda glutamik asitin γ -karboksilasyonu için K vitaminine ihtiyaçı vardır. Bu yapısal element Gla domaini olarak isimlendirilir. Bu modifikasyon sonrasında oluşan negatif yüklü alan konformasyonel uyarımlı olarak

Kalsiyum iyonu ile bağ yaparak membrana bağlanmasını mümkün kılar. Membran interaksyonu bu proteinlerin fonksiyonlarını yerine getirmeleri için önem arz etmektedir. FVII, FIX, FX ve PC aynı zamanda dört farklı domain bakımından da homologturlar ve gen duplikasyonu ile oluştuğu öne sürülmektedir. FVII'de terminal uçta bulunan Gla domaini 10 γ -karboksile olmuş glutamik asit rezidüsü vardır ve C-terminal uçta helikal şekilde bulunan amfoterik özellikte serin proteaz domaini olan iki homolog bölge epidermal büyüme faktörü benzeri domaini (EGF1-2)His193, Asp243, Ser344 üçlü katalitik rezidü içerirler (McVey vd 2001).



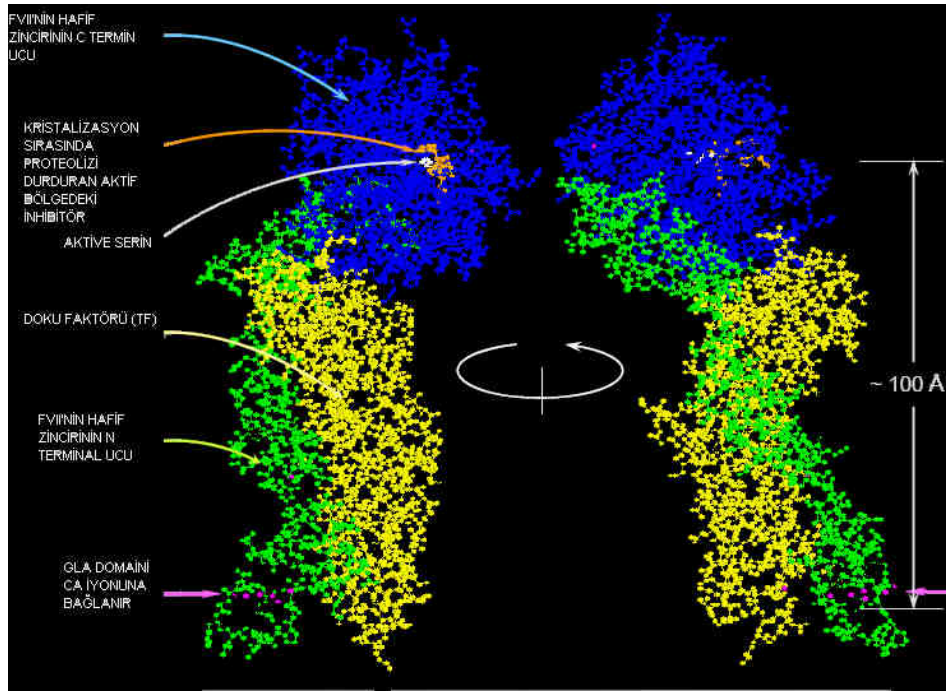
Şekil 2.9. Faktör VII protein topolojisi (Human Protein Reference Database)

FVII ilk olarak pre-pro öncü dizi şeklinde 38 aminoasit olarak sentezlenir ve hidrofobik translokasyon sinyal peptit dizisi içerir. Pro-öncü dizisi çok iyi korunmuş gamma-karboksilasyon rezidüyü içerir. 2. ekzon propeptit ve Gla (gamma karboksi-glutamik asit) domainini kodlar. Gla domaininin ardından 3. ekzondan kodlanan heliks şeklindeki aromatik boru gelir. 4 ve 5. ekzon birinci ve ikinci epidermal büyüme faktörü benzeri domaini kodlar. Ekzon 6'dan 8'e kadar ise aktivasyon ve serin proteaz katalitik domain için gerekli bilgi bulunmaktadır (Wuff 2000).

TF FVIIa katalitik aktivitesi, tam olarak belirlenmemiştir. Tripsin benzeri serin proteaz zimojenleri proteaz domaini çekirdeğinde sınırlı proteolitik kırılma ile yeni N-terminal oluşur, aktif bölge ile bitişik olan aspartat içeren zincir etkileşir (Bode vd 1976). Bu etkileşim enzim-substrat bağlanma bölgesinde uyumu sağlar. FVIIa N-terminal girişi olmaz veya TF yokluğunda sadece bir bölgesi burayı işgal eder (Higashi vd 1994, 1996). TF sabitlemek amacı ile giriş yaparak ve bu da proteaz aktiviteyi sağladığı

düşünülmektedir. Kristal yapıda N-terminal bölgeye girişin aktif bölgede FVIIa'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (Kembal vd 1999, Pike 1999).

TF-FVIIa etkileşimi sırasında zimojen formdaki FVII'nin proteaz domaininde bulunan TF bağlanma bölgesinde bulunan Glu-154 noktasında hidrojen bağı kopar ve val21 cyc22 rezidüleri uzaklaşarak enerji elde edilir. β tabakasında B2 bölgesinde C terminal ucunda TF bağlanma bölgesi oluşarak Glu-154 noktası N terminale doğru kayar. TF enzim benzeri bağlanma bölgesine bağlanır. Enzim benzeri bağlanma bölgesi B2 ipliğinde 3 rezidünün çıkıp yeniden katılması ile sağlanır. Yeniden katıldıktan sonra Glu-154 hidrojen bağları kopar ve Ile16 noktasından yeniden giriş sağlanır. Enerji gereksinimi sağlanması tam olarak bilinmemekle birlikte TF'nün FVIIa'ya afinitesinin FVII'a göre on kat fazla olduğu belirlenmiştir. Zimojen konformasyonunda TF bağlanma bölgesindeki enerji gereksinimi 1kcal/mole veya daha azdır (Eigenbrot 2002) (Şekil 2.10).



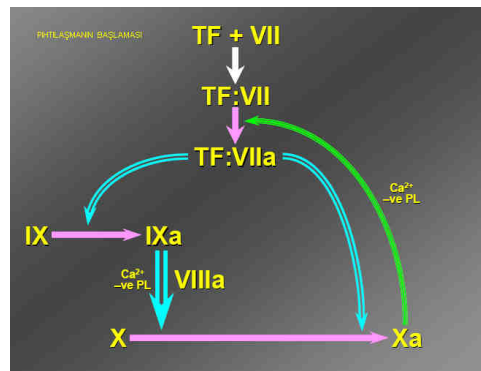
Şekil 2.10. Faktör VII-Doku Faktörü protein kompleksi (Jesty, 2007)

Karaciğerde sentezlenir ve plazmada inaktif glikolipoprotein şeklindedir (Zur vd 1981, Ratnoff vd 1973). Hemostaz için çok önemlidir. Çoğu ökaryotik promotör bölgesine zıt olarak K vitamini bağımlı proteinlerin TATA kutusu bulunmamaktadır. Ek olarak, proksimal bölgede benzer görev yapan karaciğer transkripsiyon faktörü “hepatik nükleer faktör 4” (HNF4) bağlanma bölgesi ACTTTG dizisi bulunmaktadır (Pollak vd

1998). Aynı zamanda promotör bölgede Sp1 bağlanma bölgesi de vardır ve bu bölgeler mutasyona uğratıldığında FVII eksikliği gözlenir (Carew vd 1998). FVII eksikliği ilk kez Alexander ve arkadaşları tarafından 1951 yılında otozomal resesif kanama bozukluğu hastalığı olarak isimlendirilmiş ve 500.000’de bir gözlenen bir hastalıktır (Ragni vd 1981, Triplett vd 1985) . FVIIa doku faktörü ve proteaz aktive eden reseptör (PARs) ile birlikte hücreyel yüzeyde sinyal iletimi ile ilişkilidir. FVII-doku faktörü kompleksinin hücreyel işlevleri yönettiği belirlenmiştir. İnflamasyon, ateroskleroz, doku tamiri, tümör büyümesi, metastaz gibi olaylar içinde işlevi olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Petersen vd 2008).

2.3.2. Faktör VII’nin Aktivasyonu ve Çalışması

Faktör VII, FaktörXa, Faktör XIIa veya trombin gibi koagülasyon sistemi elemanları ile minör proteoliz ile Ca^{+2} varlığında aktif hale dönüşür (Bom vd 1990). Doku faktörü kanda bulunan FVII ile kompleks oluşturur. FVII-doku faktörü kompleksinin proteolitik aktivitesi yoktur. Bunun meydana gelebilmesi için, FXa pozitif feedback reaksiyonu ile katalizler ve aktif FVII-doku faktörü kompleksi oluşur. Bu kompleks zimojen halde bulunan FIX ve X’u aktive ederler. Burada enzim FVIIa, kofaktör ise doku faktörüdür (Rao vd 1986). FIX’un aktivasyonu ile doku faktörü FX’u direkt ve FVIII aracılığı ile 2 farklı yol ile aktive eder(Jesty 2008). FVII mRNAsı birçok bölgeden poliadeniledir. Doku Faktörü(Faktör III) ve kalsiyum iyonu varlığında, Faktör VII aktive olur ardından da koagülasyon kaskadı ile Faktör IX, Faktör IXa, ve/veya FaktörX Faktör Xa’ya aktive olur (Rao vd 1988, Hoffman vd 1995) (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. Faktör VII aktivasyonu (Jesty, 2007)

Faktör VII aktivasyonu ile katalitik domaini içeren ağır zincir (254 rezidü) ve 2-EGF benzeri domain içeren hafif zincir (152 rezidü) oluşur, 2 zincir disülfit bağ ile birbirlerine bağlanırlar (UniProtKB). Her 2 zincir de 1 gen tarafından kodlanır (Hagen vd 1986). Aktivasyona moleküler düzeyde bakacak olursak;

Arg-152-Ile-153 bölgesindeki peptit bağı yarılması ile aktivasyon sağlanır (Murshudov vd 1997, Brunger vd 1993) Sonrasında, tripsin numaralandırılarak EGF-2 ve proteaz domaini oturtulur. Katalitik aktivitede, bu internal peptit bağı yarığı, tripsin benzeri aktivite göstererek olgunlaşmayı kolaylaştırır. FVIIa'da farklı olarak, yarıma sonrasında zimojen halde bulunur, protein kofaktörü olan doku faktörü ile iletişime girince etkili bir kataliz olur (Khan vd 1998). Koagülasyon kaskadının durgun olduğu durumda doku faktörü ligandından ayrılır. İki protein, hasar yerinde kompleks haline gelerek, ekstravasküler doku faktörü kana verilir (Davie vd 1991). FVIIa otokatalitik olarak koagülasyon kaskadını başlatır ve FIX ve X'u aktive eder. Allosterik düzenleme ile, doku faktörü FVIIa'ya bağlanır. Substrat ve FVIIa'nın aktif bölgesi membran yüzeyine uygun mesafede kesilebilir bağ ile hizalanır (McCallum vd 1996).

FVIIa'nın kristal yapısı, doku faktörünün ekstraselüler bölgesi ile kompleks yapar. Bu da iki molekül arasında geniş bir arabirim oluşturur, FVIIa'nın dört domainini de kuşatır, bunun içinde hafif zincir ve doku faktörünün ekstraselüler domaini vardır (Persson vd 1997, Banner vd 1996, Zhang vd 1999). Hafif zincir bağlanmak için gerekli enerjinin büyük kısmını sağlar. Domain içi yapısal değişiklikler, proteaz domaini ile sınırlandırılarak (Freskgård vd 1996) FVIIa aktivitesinde allosterik artışlara yol açar. Doğru moleküller -doku faktörü gibi- bu mekanizmayı tetikler. Deneysel veriler, doku faktörü bağlanma noktasında, konformasyonel bağlantılar olduğunu göstermiştir. Aktif bölge, yarık şeklindedir. FVIIa'nın proteaz domaininde, makromolekül substratlar ikincil bağlanma bölgesine (ekzosit) bağlanırlar (Ruf vd 1998). Doku faktörü bağımlı FVIIa aktivitesi, FVIIa oluşumunu artırır, ancak kanda bu işlevi yapan başka mekanizmalar daha bulunmaktadır. FVIIa sinyal iletimi ve metastazda da geniş alanda işlev göstermektedir (Poulsen vd 1998).

Alternatif karılma ile bu genin 2 transkript ürünü oluşabilir (O'Hara vd 1987). Bunlardan biri 9 diğeri 8 ekzon kodlamaktadır (2155 EntrezGene).

Damar hasarı, doku faktörünün aktif olmasını sağlar, bu da FVII'yi uyarır. Doku faktörü veya TFA (TF) olarak da bilinir. Bu reaksiyon kan pıhtılaşması için birincil olaydır. Doku faktörü-aktif FVII kompleksi, Faktör IX, X ve otokatalitik olarak faktör VII'yi aktive eder. Faktör VIIa/doku faktörü kompleksi, doku faktörü uyarımlı faktör VIIa aktivitesinin artırılması sonunda mekanizmanın başlamasını sağlar (Pike vd 1999).

2.3.3. Faktör VII Mutasyonları

FVII temelli yapısal ve fonksiyonel araştırmalar, polimorfizmler ve mutasyonlar nedeni ile farklılıklar olduğu ve bunların bazılarının FVII eksikliğine neden olduğu belirlenmiştir. FVII eksikliğine yol açan 30 farklı tek nokta değişimi, 4 kısa delesyon belirlenmiştir (227500 OMIM). Belirlenmiş birçok doku yapısı değişikliğinin FVII eksikliğinden olduğu gösterilmiştir (Tamary vd 1996). Kalıtsal FVII eksikliği otozomal resesif olarak kalıtılır ve genel populasyonda 500,000'de 1 olarak gözlenir (Wuff vd 2000). Bu faktörün eksikliği pıhtılaşma bozukluğuna yol açar (2155 EntrezGene).

87 farklı bağımsız mutasyonun faktör VII aktivitesini azalttığı veya artırdığı belirlenmiştir (Wuff vd 2000). Sık bulunan mutasyonlara örnek olarak yanlış anlam mutasyonu A294V, ve ikili mutasyon A294V/11128delC verilebilir (Arbini vd 1994). Bu mutasyon 8. Ekzonda genin karboksil ile sonlanan ucunda bulunur ve FVII eksikliği yapan en sık gözlenen mutasyonlardır. A294V ve ikili mutasyonu Polonyalı ve İtalyan hastalar arasında yaygın olarak belirlenmiştir. Avrupa toplumunda bu FVII mutasyonu sık gözlenmektedir (Arbini vd 1994 Bernardi vd 1994).

FVII mutasyonu 238 olguda veritabanı oluşturulmuştur. Tamamen faktör VII eksikliği genelde yaşam ile bağdaşmamaktadır ve doğan olgular, doğumdan kısa süre sonra kanama nedeni ile kaybedilmiştir. Bir çok olguda, Faktör VII eksikliği semptomsuz veya klinik fenotipi belirlenmemiş şekilde karşımıza çıkmaktadır. Genel olarak, homozigot mutasyonlarda fenotipe yansıma gözlenmiştir. Bu olgularda genelde, normal aktivitenin %2 altında gözlenmiştir,ki bu da orta düzeyde kanama bozukluğuna yol açmaktadır (McVey vd 2001).

2.3.4. Faktör VII Düzeyini Etkileyen Etmenler

Östrojenik faktörler bulunduğunda FVII transkripsiyonunda azalma görülmüştür. Promotor bölge polimorfik haplotipleri bağımsız olarak etki yapmaktadır (Di Bitondo vd 2002). FVII düzeyi hormonal, besinsel değişime göre de değişmektedir. Örneğin düşük glukoz düzeyinde FVII ekspresyonunun arttığı (Jackson vd 2007), östrojen hormonu varlığında ise FVII düzeyinin azaldığı belirlenmiştir (Bitondo vd 2002).

İnsülin bağımsız Diyabetes Mellitus artan doku faktörü düzeyi ile ilişkilidir. Bu da FVII düzeyini artırmaktadır. Aynı zamanda tip II diyabet artan ateroskleroz riski nedeni ile yüksek oranda arterial trombotik komplikasyonlara da neden olmaktadır. Hemostatik ve fibrinolitik mekanizma diyabetik komplikasyonlarda rol alabilmektedir. Doku faktörü-FVIIa kompleksinin hiperkolestromik diyabetik hastalarda normal kolesterol düzeyi olan diyabetik hasta grubuna göre yüksek olduğu aynı zamanda normolipidemik hastaların kontrol grubuna göre de yüksek olduğu gözlenmiştir (El-Ghoroury vd 2008, Boden vd 2007). 1986'da yapılan çalışmada, FVII koagülasyon aktivitesinin iskemik kalp hastalıkları riskinin artışı ile ilişkili olduğu belirlenmiştir (Meade vd 1986). FVII düzeyi aynı zamanda, yaş (Balleisen vd 1985, Kario vd 1994), kolesterol, trigliserid düzeyi (Hoffman vd 1992), diyet ile alınan doymuş yağ miktarı (Mitropoulos vd 1994), menopoz (Kario vd 1994, Scarabin vd 1990), doğum kontrol hapları (Bonnar vd 1987), vücut kitle endeksi (Folsom A.R vd 1992), erkeklerde testosteron düzeyi (Bonithon vd 1988) ve 8. ekzonda bulunan polimorfizm ile değişebilmektedir (Green vd 1991).

2.3.5. FVII Promotor Bölgesi Polimorfizmleri

FVII geninde farklı polimorfizmler belirlenmiştir. Polimorfizmlere göre tromboz riski artabilmektedir. Bazı araştırmalar, bu polimorfizmlerin kişide bulunması veya bulunmamasına göre MI veya inmeye yakalanma riskinin etkilenebileceğini göstermektedir (Hooft vd 1999). Bunlardan promotor bölgede olan polimorfizmler -3216C/T, -2987C/A, -670C/A,-668A/C, -630GA, -628A/G, -402G/A, -401G/T, -323

0/10bçins, -122T/C (Bernardi vd 1994, Pollak vd 1995, Hooft vd 1996, Di Castelnuovo vd 2000, Girelli vd 2000, Kudaravalli vd 2002) olarak sıralanabilir (Sabater vd 2006).

Yapılan çalışmalarda bunlardan -3230/10bçins -401G/T, -402G/A, polimorfizmlerinin FVII düzeyini değiştirerek ateroskleroz sonrası oluşabilecek komplikasyonlara yol açabildiği veya koruyucu etkilerinin olduğu belirlenmiştir (Martinelli vd 2008). FVII düzeyi ile ilişkilendirilmiş polimorfizmlerden bazıları -402G/A, -401G/T, -3230/10bçins, -122T/C, R353Q olarak sıralanabilir. Bu polimorfizmlerden -401G/T, -3230/10bçins, -122T/C arasında güçlü bağlantı vardır (Bernardi vd 1994, Pollak vd 1995) ve bu polimorfizmleri taşıyan sağlıklı bireylerde FVII plazma düzeyinin %40 oranında düşük olduğu gözlenmiştir. Aynı zamanda -402G/A ile -670C/A polimorfizmleri arasında güçlü bağlantı varlığı yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir (Folsom vd 2007). Tek nükleotit polimorfizmleri olan -401G/T, -402G/A translasyonun başlama noktası ile ilişkilidir. -402G/A FVII düzeyinin artmasıyla ilişkilendirilmiş minör alleldir. -401 ve -402 allelleri transkripsiyon bağlanma bölgesini etkiledikleri düşünülmektedir (Hahn vd 2004). -401G/T -402G/A polimorfizmlerinin spesifik Nükleer faktör bağlanma noktası olabilecekleri düşünülmektedir. Aynı zamanda -402A allelinin -401Tye göre popülasyonda 3 kat daha sık gözlenmektedir (Hooft vd 1999). -402GA 60 yaş altı iskemik inme hastaları ile ilişkili olduğu bulunmuştur (Bersano vd 2008).

-323ins10bç (CCTATATCCT) alleli taşıyan kişilerde FVII koagulant aktivite “FVII:C” nin %20 azaldığı gözlenmiştir (Hahn vd 2004). Bunun da miyokard infartüsü geçirme riskini azalttığı düşünülmektedir. -402A allelinin -323ins10bç zıt olarak, erkeklerde önemli ölçüde FVII düzeyinin artmasında rol aldığı ve bu alleli taşıyan bireylerde MI riskini artırdığı gözlenmiştir. Promotor polimorfizmde birleşik heterozigotluk ile etki gözlenmektedir. Ancak bu tek başına yeterli değildir (Bozzini vd 2004). Farklı çalışmalarda ise -323ins10bç allelinin kardiyovasküler hastalık gelişiminde etkili olmadığı gösterilmiştir (Quek vd 2006, Lievers vd 2000, Mtiraoui vd 2005).

Hücre kültürü çalışmalarında -2989C/A -402G/A, -401G/T, -3230/10bçins, -122T/C gen bölgelerinin FVII düzeyine etkisi bakılarak -32310bç ins dominant olduğu gösterilmiştir

-122T/C FVII düzeyini azaltıcı, -2989A tek başına bulunduğunda FVII düzeyini artırıcı, -402A allelinin ise FVII düzeyini artırıcı etki gösterdiği belirlenmiştir (Sabater vd 2007).

Yapılan araştırmada üç *FVII* geni polimorfiziminden ikisi, 5' uçta bulunan -323ins10bç (CCTATATCCT) ve R353Q FVII aktivitesini etkileyerek koroner arter hastalarında MI riskini azalttığı gösterilmiştir. 444 hastada ve 133 normal koroner arteri olan kontrol kullanılmıştır. Allel A1 10bç'lik insersiyon yokluğu, A2 ise insersiyonlu alleller olarak isimlendirilmiştir. A2A2 genotipindeki hastalarda %66 oranında faktör VII aktivitesinde azalma belirlenmiştir. R353Q polimorfizimi Q alleli homozigot olarak taşıyan hastalarda %72 oranında faktör VII aktivasyonunda azalma olduğu gösterilmiştir. A2 ve Q alleli arasında bağlantı olduğu bulunmuştur. A2 ve Q allelleri bakımından homozigotlar heterozigotlara göre MI yakalanma riskinin azaldığı gözlenmiştir. MI hastaları arasından A1A2 veya RQ genotipi için odd ratio 0.47 olarak hesaplanmıştır (Girelli vd 2000).

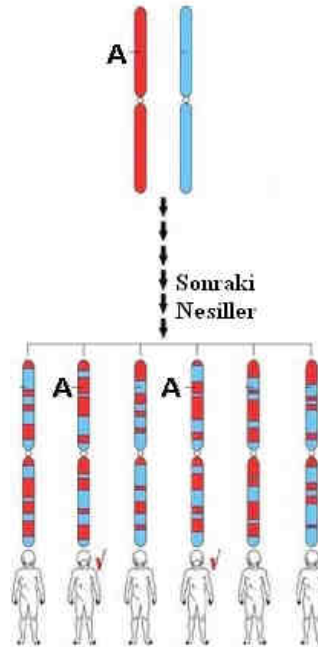
Başka bir çalışmada, -32ins10bç (CCTATATCCT) alleli taşıyan kişilerde FVII %33 oranında arttığı gözlenmiştir (Pollak vd 1995). Aynı zamanda bu polimorfizminin allel frekansı etnik kökene göre değişebilmektedir (Quek vd 2006, Koichi vd 2006). Düzenli spor ile değişen plazma lipoproteinlerinin FVII düzeyi ile ilişkisi bulunmamış ve -401GT, -402GA, -323ins10bç haplotip oluşumu cinsiyetler arasında farklı olarak gözlenmemiştir (Ghiu vd 2004). İskemik serebrovasküler hastalıklarda ve karotid stenozunda -401G/A değişiminin etkin olduğu, -402G/A değişiminin ise FVII düzeyini artırıcı yönde etkilediği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Lindman vd 2004, Kostukas vd 2008). Farklı çalışmalara göre ise -323ins10bç, -402G/A, -401G/A polimorfizmlerin FVII ifadenmesinin değişiminde, kardiyovasküler hastalık gelişiminde etkili olmadığı yönündedir (Lievers vd 2000, Campo vd 2006, Greisenegger vd 2007). Farklı transkripsiyon faktörlerinin aynı veya benzer bağlanma noktaları olabilmektedir. epistatik ve pleiotropik etkileşimler düzenleyici mutasyonlar içinde bu şekilde etkili olabilir. İki dominant polimorfizm bir arada bulunduğunda sadece biri baskın olabilir veya farklı polimorfizmlerin bulunmasına göre farklı fenotip ortaya çıkabilir. Cis düzenleyici polimorfizmlerin insan evriminde etkili olduğu öne sürülmektedir. FVII promotor bölge polimorfizmlerinin de evrimsel açıdan önemi gösterilmiştir. -402A allelinin transkripsiyonunu artırdığından kalp hastalıklarına yakalanma riskini arttırdığı düşünülmektedir. Ancak günümüzde insan sağlığı açısından dezavantajlı olarak düşünülen alleller, geçmişten günümüze pozitif seçim ile gelmiştir. Bilindiği üzere 1900 yıllarından

önce kalp hastalıkları toplumun sağlığını tehdit etmemekteydi. Ancak FVII düzeyinin belirlenmesinde çok farklı bölgeler etkili olduğu bilinmektedir. FVII ifadenmesinin farklı dokularda farklı etkileri olduğu tahmin edilmektedir (Hahn vd 2004).

2.4. Tek Nokta Polimorfizmleri ve Haplotip Oluşumu

Cinsiyet hücreleri dışında, kromozomlar çift halde bulunurlar. Her kromozomun biri kişinin babasından, diğeri ise kişinin annesinden kalıtılır. Ancak kromozomlar, sonraki nesile geçerken aynı kopya ile geçmezler. Sperm ve yumurta hücresi oluşurken, kromozom çiftleri rekombinasyona uğrar. Kromozomların her birinin bir parçası değişime uğrar. Sonuçta, hibrit kromozomlar oluşur ve içerdikleri parçalar farklı bireylere aittir. Bu hibrit kromozomlar sonraki nesile geçer.

Tekrar eden rekombinasyon olayı ile, atasal kromozom parçaları sonraki nesillere aktarılabilir. Atasal DNA parçaları farklı kişilerde farklı bölgeler olmak üzere bulunabilir. Sonraki nesillere geçen bu bölgeler atasal kromozomların rekombinasyon ile dağılmamış parçalarıdır. Bu bölgeler, genetikçilere hastalık veya ilaçların araştırılmasına imkan tanımaktadır.



Şekil 2.12. İki atasal kromozomun sonraki nesillere geçişi (HapMap)

Çoğu sık gözlenen hastalıklar ör: diyabet, kanser, strok, kalp hastalıkları, depresyon, astım vb. çevresel etmenler ve birçok gen tarafından etkilenmektedir. Aynı zamanda, biribiri ile bağımsız iki kişinin DNA dizisi, %99.9 aynıdır. Geriye kalan %0.1 önemlidir çünkü, bu kısım kişiler arasında çeşitli hastalıklara karşı risk veya ilaçlara karşı direnç farkını etkiler. DNA dizi farklarının bulunması ile, bazı sık gözlenen genetik hastalıkların kompleks nedenlerinin ortaya çıkarılmasına fırsat sağlayacaktır (HapMap).

Genomun bir bölümünün DNA dizilemesi yapılması ile, ortaya çıkan tek bazlık farklılıklara “tek nokta polimorfizmi”(SNP - Single Nucleotide Polymorphisms) denilmektedir. Örneğin bazı kişilerde kromozomlarında belli bir bölgede A var iken bazılarında ise bu bölgede G vardır. Bunların her birine allel denir.



Şekil 2.13. İki kromozomun SNP bölgesi, A ve G allelleri gösterilmekte (HapMap)

Polimorfizmler, tıpkı mutasyonlar gibi bazı DNA bölgelerinde eksilme veya artma, minisatellit ve mikrosatellit tekrarlarından farklılıklar, rekombinasyonlar, gen duplikasyonu ve gen kaybı şeklinde görülse de en çok “tek nükleotit polimorfizmleri” şeklinde görülür.

DNA düzeyindeki bu genetik değişkenlikler kodlayıcı bölgede yaklaşık 500 ile 1000 nükleotitte bir görülürken, kodlayıcı olmayan bölgelerde 300-500 nükleotitte bir görülmektedir (Ekmekçi 2006).

İnsan popülasyonunda yaklaşık 10 milyon SNP bulunmaktadır. Ender görülen SNP allelleri frekansı en az %1 oranındadır. SNP allellerinin birbirlerine yakın olmaları birlikte kalıtılmalarına neden olur. Kromozom üzerinde birlikte kalıtılan SNP allelleri topluluğuna “haplotip” denir. Çoğu kromozom bölgesinde sadece birkaç tane haplotip bulunur (herbirinin frekansı en az %5) kişiden kişiye bu bölgelerde farklılıklar yer almaktadır. Kromozom bölgesi SNP içerebilir, ancak genetik farklılık hakkında bilgi verebilecek sadece birkaç işaretlenmiş SNP bölgesi bulunmaktadır (HapMap).

..A..C..A..T..G..T..
..A..C..C..G..C..T..
..G..T..C..G..G..A..

Şekil 2.14. SNP içeren kromozom bölgesi gösterilmiştir. Üç haplotip görülmektedir. Renkli iki SNP üç haplotipin belirlenmesini sağlar. Örneğin, eğer kromozom alleli bu işaretlenmiş SNP'lerden A ve T'yi içerirse bu birinci haplotip olarak isimlendirilebilir (HapMap)

Genetik polimorfizm çalışmaları hastalıklar için risk altındaki kişilerin belirlenmesi ve ilaç tedavisi için yeni hedeflerin önerilmesi ümit verici olabilir (Ekmekçi 2006).

SNP kullanılmasıdaki etkiyi artıracak diğer bir yöntemde haplotip belirlenmesidir. Yakın zamanda yapılan çalışmalar genomun büyük çoğunluğunun haplotip blokları şeklinde olduğunu göstermektedir. Yalnızca birkaç SNP bu haplotip bloklarının işaretlenmesinde ve bir hastalıkla ilişkili olup olmadığının belirlenmesinde yeterli olacaktır. Geniş bloklar birçok gen içerebilir; daha küçük bloklar ise sadece bir geni tanımlayabilir. Bu da hastalığı anlamamız için daha kullanışlı olabilir. Bir hastalık birden fazla gen tarafından etkileniyorsa; haplotiplerden elde edilecek bilgi SNPlerden bir seferde elde edilecekten daha fazla olabilir. Asosiyasyonlar tek SNP den ziyade haplotip çalışmalarıyla daha iyi yapılır. Belirli bir haplotip alt yapısı üzerinde mutasyon meydana gelir ve yakınındaki SNPlerle, rekombinasyon veya geri mutasyonla bu birliktelik kopana dek, ilişkilendirilme sürdürülebilir (http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_snp.pdf).

Haplotiplendirme Projesi HapMap, insanlar arasındaki genetik farklılıkların dağılımını göstermek için yapılmaktadır. SNP'ler ile bağlantılı olduğu düşünülen kromozom bölgelerini, haplotip bölgelerini ve SNPler tarafından işaretlenmiş olanları içermektedir. Aynı zamanda, SNPler bakımından az olan kromozom bölgeleri de incelemektedir.

Araştırmacılar, hastalıkları etkileyen genleri örneğin; diyabet, bir grup hastalığı olan ve olmayan kişi ile kıyaslayarak ortaya çıkarmaya çalışmaktadır. İki grup arasında kromozom üzerindeki haplotip frekansı farkı hastalığı etkileyebilecek genler olabilir. Teorik olarak, araştırmacılar bu bölgelerde 10 milyon SNP'i genotiplendirmelidir. Ancak bunu yapmak için kullanılan metot pahalıdır. HapMap ile, ve 10 milyon SNP arasından 200.000 ile 1 milyon arası işaretlenmiş SNP tanımlanmıştır. Bu büyük azaltma araştırmaların uygulanabilir olması için yapılmıştır.

2.5. Moleküler Teknikler

2.5.1. Çözelti ve Solüsyonlar

Bu çalışmada, genomik DNA'yı izole ederken, kırmızı kan hücrelerini parçalamak amacıyla RBC (Red Blood Cell) Lizis solüsyonu, protein fazlalığını uzaklaştırmak amacıyla Fenol-Kloroform çözeltisi kullanılır. Elde edilen genomik DNA Tris-EDTA(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA) içinde çözündürülür. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ürünlerini görmek için agaroz jel yapımında TBE (Tris-Boric Asit- EDTA) kullanılmıştır. SSCP jel hazırlanmasında 49:1 oranında %40'luk Akrilamid-Bisakrilamid çözeltisi, %10APS (Amonyum PerSülfat) solüsyonu, TEMED solüsyonu ayrıca SSCP jellerini boyamak amacıyla %0.1'lik oranında Gümüş Nitrat solüsyonu kullanılmıştır. Bantları görünür hale getirmek amacıyla %10'luk Sodyum Hidroksit (NaOH) çözeltisi, reaksiyonu durdurmak amacıyla, %0,75'lik Sodyum Bikarbonat solüsyonu kullanılmıştır.

2.5.2.DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu klasik proteinaz K, fenol-kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Protein ve fazlalıklar fenol-kloroform ile çöktürülmüş, DNA Tris-EDTA solüsyonunda çözündürülmüştür.

2.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, belli bölgeye özgün olarak *in vitro* klonlama yöntemidir. 1984'de Kary Mullis'in geliştirdiği bu yöntem, günümüzde tıbbi ve biyolojik çalışmalarda araştırma laboratuvarlarında sık kullanılan vazgeçilmez bir teknik haline gelmiştir (Saiki vd 1985). Bu yöntem dizileme için DNA klonlaması, DNA temelli filogenetik analiz, genetik parmak izi ile tanımlama, enfeksiyon hastalıklarının belirlenmesi ve tedavisinde kullanılmaktadır. 1993'de Mullis Nobel Kimya Ödülüne layık görülmüştür (Mullis 1993).

PCR adı, döngünün anahtar elementlerinden biri olan DNA polimeraz'dan türetilmiştir. DNA polimeraz, invitro enzimatik replikasyon ile DNA'nın bir parçasını çoğaltmak için kullanılır. PCR olayında, DNA kalıp olarak kullanılarak çoğaltılır. Bu olay zincir reaksiyonu ile tekrarlanır ve DNA kalıbı katsayısal olarak çoğaltılır. PCR ile, DNA kalıbından birçok kopya elde ederek, milyonlarca aynı kopyadan elde edilir. PCR'da hedef DNA iplik tek bir gen, genin bir kısmı veya kodlanmayan dizi olabilir. Çoğu PCR metodunda, 10 kilobaz çifti boyutuna kadar çoğaltma yapılabilir. Bazı teknikler ile, 40kb boyutuna kadar çoğaltma yapılabilir (Cheng vd 1994)

Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin 2 ucuna özgü, bu bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı, bir çift sentetik oligonükleotit (18-20 baz uzunluğunda) kullanılarak, bu 2 primer ile sınırlandırılan genin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanır (Akar 1999).

PCR için gereken temel element ve solüsyonlar;

- Amplifikasyon için kullanılan hedef DNA bölgesini içeren DNA kalıbı
- 2 primer; bunlar hedef DNA bölgesinin 5' ve 3' ucuna uygundur.
- 70°C'ye uygun Taq polimeraz veya farklı bir polimeraz
- Deoksiniükleotit trifosfat(A, C, T, G) DNA polimeraz bunları kullanarak yeni DNA ipliği oluşturur.
- Tampon solüsyonu; optimum aktivite için kimyasal ortamın uygunluğunu sağlar ve DNA polimeraz için sabit ortam sağlar (Sambrook 2001).
- İki iyonlu katyonlar; magnezyum, manganez iyonları, genelde Mg^{+2} kullanılır ama Mn^{+2} de PCR kaynaklı mutagenizi sağlamak amacıyla kullanılır. Yüksek Mn^{+2} konsantrasyonu DNA sentezinin hata yapma riskini artırır (Pavlov 2004).
- Tek iyonlu katyonlar; potasyum iyonu

olarak sıralanabilir.

PCR, reaksiyonu DNA'nın iki zincirinin yüksek ısı ile birbirinden ayrılmasını (denatürasyon), daha sonra sentetik oligonükleotitlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (hibridizasyonu), sonra zincirin uzamasını (polimerizasyon-çift iplikli DNA'ların sentezi) ve bu siklusların belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım (denatürasyon/primer bağlanması/DNA sentezi) bir PCR siklusunu oluşturur. Çoğaltılacak ürün miktarı bu

siklusun 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 adım farklı ısılarda gerçekleştirilir (sırasıyla 94-98°C, 37-65°C, 72°C). PCR tekniği tek veya çift iplikli DNA'yı; RNA'ya hedef olarak kullanılır. Günümüzde bu işlem ısı dönüştürücüsü (thermocyclers) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklık koşulları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilmektedir (Akar 1999, Klug 2000).

PCR reaksiyonunda ilk aşamada çoğaltılacak olan çift zincirli DNA 90-95° C de yaklaşık 5 dakika ısıtılmak suretiyle denatüre olur ve tek zincirli hale getirilir. İkinci adımda sıcaklık 50-70°C arasında bir değere düşürülerek (bağlanma sıcaklığı) primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır. 15-30 nükleotid uzunluğunda olan yapay oligonükleotitlerden oluşan bu primerler; çoğaltılacak DNA'nın sınırlandırılması için başlangıç noktası ve bitiş noktası olarak görev yaparlar. Üçüncü aşama olan DNA sentezi aşaması ise 70-75°C sıcaklıkları arasında gerçekleşir. DNA polimeraz enzimi, nükleotitleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Klug 2000).

PCR için gerekli elementlerden oligoprimler, hedef bölgeye özgün olacak şekilde dizayn edilir. 18-25 baz uzunluğundaki primerlerin baz dizilimi ve kompozisyonu rastgele olmalı, %45-55 oranında G/C'den oluşmalıdır. Uygun bir primer çifti için, iki primer arasındaki kompozisyonu 100-600 bç kadar olmalıdır. Aynı zamanda, primerlerin kendisinin ve/veya antisense primeri komplementer olmamalıdır. Oligoprimlerin DNA'ya bağlanma sıcaklığı kabaca T_m (erime sıcaklığı): $4(GC)+2(AT)$ formülüyle hesaplanır. Bu değer oligonükleotitlerin nükleotit konsantrasyonlarına bağlı olarak değişmekte olup, hesaplanan uygun sıcaklık değeri PCR spesifikliğini artırmaktadır (Akar 1999).

PCR için gereken temel elementlerden biri DNA polimerazdır. PCR'da standart DNA polimeraz kullanılabilir ancak yüksek sıcaklık, enzimi inaktive edeceğinden her döngüde başka polimeraz eklenmelidir. Bunu gidermek amacıyla, ısıya dayanıklı DNA polimeraz *Thermus aquaticus*'un DNA polimerazı kullanılmaya başlanmıştır. Taq polimeraz sayesinde, her döngüde yeni DNA polimeraz eklemeye gerek kalmaksızın reaksiyonlar devam edebilmektedir (Desmon, Cambridge Genetic Engineering 2008).

PCR' dan iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlı olarak değişir. Taq DNA polimerazın iyi çalışabilmesi için en etkin olduğu pH'ın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerdendir. Bu amaçla reaksiyonlarda son konsantrasyon 10mM olacak şekilde Tris.HCl pH:8.4 tampon olarak kullanılmaktadır. PCR karışımında 50-60mM düzeyinde potasyum ve 100 µg/ml jelatin bulunmasının çoğalmayı önemli miktarda artırdığı saptanmıştır.

Kullanılacak deoksinükleotit trifosfatların (dNTP); son konsantrasyonları 2mM olacak şekilde ayarlanmalıdır. Reaksiyon sırasında, ortamda dTTP, dCTP, dATP, dGTP'lerin bulunması gereklidir. Kullanılacak her bir dNTP konsantrasyonunun doğru ürün elde edilmesi açısından önemlidir. dNTP'nin az miktarda kullanımı, oluşan PCR ürününün miktarının azalmasına, fazla miktarda kullanımı yanlış oligonükleotid eşleşmesi sonucu hedef DNA dışındaki bölgelerin çoğalmasına neden olur.

Magnezyum (Mg) +2 değerlikli olup DNA polimeraz'ın çalışmasını sağlayan en önemli faktördür. Sahip olduğu pozitif yük sayesinde negatif yüklü DNA molekülleri arasına girerek oligonükleotidlerin DNA moleküllerine bağlanmasını kolaylaştırır. DNA, dNTP ve proteinlerin tümü magnezyum(Mg) iyonlarına bağlandığı için her PCR reaksiyonunda Mg konsantrasyonu ampirik olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg miktarı Taq DNA polimeraz enziminin spesifikliğini azaltırken, az miktarda olması enzim aktivitesini düşürür ve enzim inaktivasyonunayol açar (Akar 1999).

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

Tek iplikli konformasyon polimorfizmi analizi, tek iplikli DNA'nın belirlenmesinde avantajlı olarak kullanılmaktadır. İlk kez 1989'da kullanılmış ve dizideki genetik farklılığın belirlenmesinde, kullanışlı, ucuz hassas bir yöntem olduğu gösterilmiştir (Sunnucks vd 2000).

SSCP analizi, denatüre edici olmayan şartlar altında tek zincir DNA molekülündeki tek veya çoklu nükleotid değişikliklerinin, elektroforetik mobilitayı değiştirme etkisine

dayanarak mutasyonları saptayabilen bir uygulamadır. En büyük avantajı, kısa sürede çok sayıda örnekte, mutasyon taranmasını mümkün kılmasıdır.

Aynı boyuttaki tek iplikli DNA, kendilerindeki değişiklere bağılı olarak non-denatüre jelde farklı pozisyonda yürürler. Komplementer iplikçikler ve tek baz değişikliği gösteren DNA parçaları ise değişik migrasyon gösterir. Tek iplikçikli DNA'nın farklı bantlar göstermesi mutasyona işaret etmektedir. Bu yöntem ile nükleotit dizisinde mutasyon ya da polimorfizm sonucu oluşan tek baz değişikliklerini, delesyon ve insersiyonları belirlenebilmektedir (Akar 1999).

SSCP mutasyon taraması yönteminde, mutasyon taranacak DNA bölgesi önce PCR yöntemi ile çoğaltılır. Çoğaltılacak bölgenin baz içeriğine göre gelişmiş bir formül ($T_s = [80 \times C(A+1)] / \{2,17 + [C/(A+1)]\}$) kullanılarak bir sıcaklık hesabı yapılır. PCR ürününün spesifikliğini artırmak belli oranda oligonükleotid ve formamid içeren yükleme boyası ile karıştırılır ve yüksek ısıda (99°C) tek zincirli hale getirilip, dikey elektroforez jeline yüklenir. Poliakrilamid hesaplanan sıcaklık değerinde belirli bir voltajda, belirli bir süre yürütülür. Göç hızlarına, elde edilen bant profillerine göre değerlendirilir. Baz dizisi farklı olan DNA parçacığı, normal DNA parçacığına göre farklı bant profili gösterir.

DNA dizisi uzunluğu, SSCP analizini etkilemektedir. Optimal sonuç için, DNA iplikçığı 150-300 bp arasında olmalıdır. Optimal koşullarda yaklaşık %80-90 değişiklikler SSCP'de belirlenebilmektedir (Wagner 2002). Dizinin uzunluğu arttıkça mutasyonları yakalama şansı azalır (Akar 1999).

2.5.5. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi ya da "Sequencing" DNA'nın nükleotit dizilerinin saptanması anlamına gelmektedir. İlk dizi analizi 1960'ların başlarında küçük tRNA'lar ile başlamıştır. Nükleotit dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik geliştirilmiştir. Bunlar Maxam-Gilbert kimyasal değredasyon yöntemi ve Sanger dideoksi enzimatik yöntemidir. Her iki yöntemde dizi analizi yapılacak DNA'nın hazırlanması, reaksiyonlar ve yüksek voltaj ile elektroforezi olmak üzere üç ana aşaması bulunmaktadır (Akar 1999).

1976-1977 yıllarında, Allan Maxam ve Walter Gilbert kimyasal degradesyon yöntemi olarak isimlendirilen bu yöntemi, DNA'nın kimyasal modifikasyonu ve özgün bölgelerden kesilmesi şeklinde geliştirmişlerdir (Saiki vd 1985). Sanger ve Coulson'dan iki yıl sonar Maxam-Gilbert kendi kimyasal dizileme yöntemlerini yayınlamışlardır (Sanger and Coulson 1975). Sanger metodu, tek iplikli DNA'nın klonlanmasını gerektirirken bu yöntem direkt saflaştırılmış DNA kullandığı için hızlıca popüler olmuştur. Maxam-Gilbert dizileme yöntemi, daha sonar teknik olarak karmaşık olması, standart kitlere, riskli kimyasallara gereksinim duyması nedeni ile gözden düşmüştür.

Maxam-Gilbert yönteminde; DNA parçası ucundan P^{32} ile işaretlenir. Bu işaretlenen DNA parçası dört örnek olarak bölünür. Her bir örneğe DNA'daki bazlardan birisini tahrip edecek şekilde bir kimyasal madde eklenir. Daha sonra piperidin kullanarak hasarlanmış nükleotitlerin bulunduğu yerlerden DNA yapısı fosfodiester bağlardan kırılır. Böylece P^{32} ile işaretlenmiş kısıklı uzunlu parçalar elde edilmiş olur. Daha sonra da elektroforez ve otoradyografi ile sonuç alınır (Akar 1999).

Dideoksi yada zincir sonlanma reaksiyonu olarak bilinen Fred Sanger ve arkadaşlarının geliştirdiği ikinci yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan bir DNA zinciri sentezi gerçekleşmektedir. Dizisi saptanacak DNA zinciri yeni sentezlenecek DNA zinciri için kalıp olarak kullanılır (Sanger 2004).

Sanger DNA dizi analizi yöntemi; asimetrik amplifikasyon ile elde edilmiş tek iplikli DNA, DNA polimeraz enzimi ile ddNTP ve biri radyoaktif olarak işaretlemiş dNTP kullanılır. Ortama radyoaktif P^{32} , S^{35} veya P^{53} eklenir. İşaretleme primerlere yapılabildiği gibi ortama eklenen dNTP'lerden birisinin radyoaktif olması yeterlidir. Burada önemli nokta dideoksinükleotitlerin eklenmesidir. 2'3'Dideoksinükleosidtrifosfat'ların klasik dNTP'lerden farklılığı deoksiribozun 3' noktasında hidroksil grubunun bulunmamasıdır. Sentezlenen DNA zincirine, DNA polimerazlar aracılığı ile bağlanabilirler. Bu bağlanma 5'trifosfat grupları aracılığı ile olur. 3' hidroksil grubunun olmaması nedeni ile ardından gelen dNTP'ler ile fosfodiester bağın oluşması engellenir. Doğal olarak DNA zincirinin daha fazla uzaması imkansız hale gelir. ddNTP ile klasik dört dNTP, bir reaksiyon karışımının içine konduğunda DNA zincir uzaması için aralarında yarışma olur. Seyrek fakat spesifik sonlanmalar oluşur. Bu reaksiyon sonucunda primer sonunda başlayıp, prematüre sonlanmalar olduğu bölgeler kadar uzunluktaki DNA parçaları ortaya çıkar.

Dört farklı enzimatik reaksiyonda dört farklı ddNTP kullanılarak birer reaksiyon elde edilir. Elektroforez PCR ile gerçekleştirilebilir hale gelmiştir (Akar 1999).

Günümüzde dizi analizi için otomatik DNA dizi analizi cihazları, radyoaktif izotoplar yerine floresan boyalar kullanılmaktadır (Klug 2000). Sistem üzerine lazer ışığı ile farklı özellikteki floresan boyalar algılanır, her nükleotit için ayrı renkteki dalgalar oluşturularak nükleotit dizisi belirlenir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı, Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. 101 sağlıklı birey kontrol grubu, Kardiyovasküler Cerrahi Ana Bilim Dalı hastalarından oluşturulan 223 birey çalışma grubu olarak belirlenmiştir. Çalışmaya katılan tüm bireylerin çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onam formu alınmıştır.

3.1. Yöntemler

3.1.1. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu klasik fenol/kloroform yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Öncelikle bireylerden alınan 9 ml kan, 1ml 0.5 M Etilendiaminetetraasetik asit (EDTA) (Scharlau, İspanya) bulunan polietilen tüpler içine alınarak karışması sağlanır. EDTA Mg^{+2} tutucusu ve kuvvetli bir DNAaz inhibitörüdür. Alınan kan örneği 50 ml falkon tüpüne geçirilir, üzerine 25 ml RBS(Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya), 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya), 0.5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] ilave edilir. Örnekler çalkalandıktan sonra 20 dk buzda bekletilir. Daha sonra $+4^{\circ}C$ 'de 4000 rpm'de 15 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edilir. Süpernatatın bir kısmı dökülür üzerine yeniden RBS lizis solüsyonu toplam hacim 35 ml olacak şekilde ilave edilir. Bu işlem tüm eritrositler uzaklaştırılıp, lökositler çöktürülünceye kadar devam edilir. Falkon tüp dip kısmında lökosit kümesi gözle görülecek şekilde oluştuktan ve eritrositler giderildikten sonra 1000 ml RBS lizis solüsyonu eklenerek vortekslenir ve iyice karışması sağlanır. Bu karışımdan 800 ml $-20^{\circ}C$ 'de stok olarak saklanmak üzere ependorfa alınır. 200 ml ise ayrı bir ependorf tüpe alınarak DNA izolasyonunun diğer aşamalarına geçilir.

Geriye kalan 200 μL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 $\mu g/ml$ 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 (Mommert, Almanya) bekletilir.

DNA izolasyonunun ikinci gününde, proteinlerin DNA'dan uzaklaştırılması amacıyla 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzooamilalkol (Merck, Almanya)] eklenerek 10 dk çalkalanır. 20 dk +4°C'de buz içerisinde bekletildikten sonra +4°C'de 4000 rpm'de santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı aradaki katman alınmayacak şekilde mikropipetle farklı bir ependorf tüpe alınır. Bu kısma, toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin iki katı kadar da soğuk %95'lik Alkol (Tekel, Türkiye) eklenir. Ependorf tüp ters düz edilerek DNA görünür hale getirilir ve -20°C'de bir gece bekletilir.

DNA izolasyonunun üçüncü gününde, yüksek moleküler ağırlıklı DNA deproteinizasyon çözeltilerinden ve hücre parçalanmasından sonra oluşan nükleotit, aminoasit, düşük molekül ağırlıklı kirliliklerden uzaklaştırma işlemi yapılır. Bunun için de, +4°C'de bekletilmiş DNA-alkol karışımı, +4°C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir ve alkol DNA ependorftan düşmeyecek şekilde dökülür. Süpernatant kısım döküldükten sonra 500 ml %70'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenir ve +4°C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonunda alkol yine dikkatli bir şekilde dökülür ve tüpler kuruma kağıdı üzerinde kapakları açık şekilde bir gece boyunca kurumaya bırakılır.

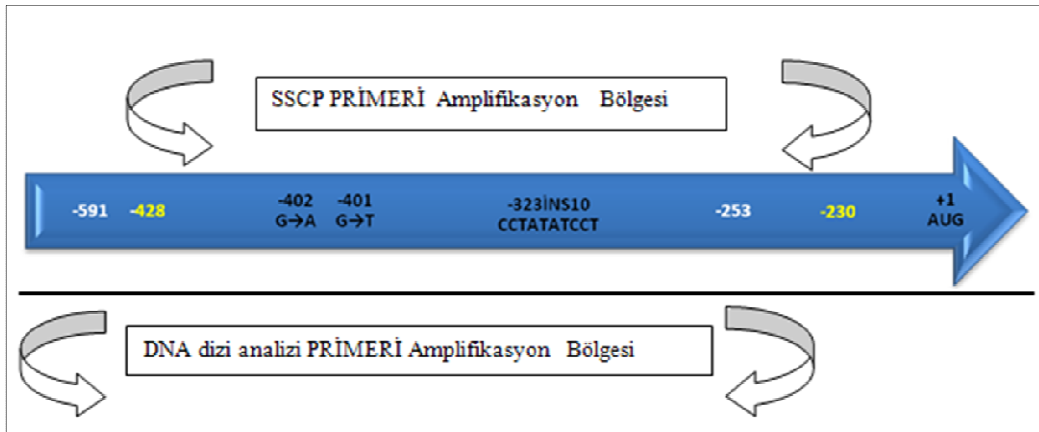
Son olarak, ertesi gün alkolü buharlaşmış ependorf tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözünmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4°C'de veya +20°C'de saklanır.

3.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Bu çalışmada PCR tekniği kullanılarak, *FVII* promotor gen bölgesinde -3230/10bçins, -401G/T, -402G/A polimorfizmlerini içine alacak şekilde SSCP tekniği ve DNA sekans analizi için 2 farklı primer çifti ile bölge çoğaltılmıştır.

3.1.2.1. *FVII* Promotor Gen Bölgesi Polimorfizmlerinin Belirlenmesi

FVII promotor gen değişimleri incelenmesinde daha önce yapılan çalışmalarda da *FVII* gen ekspresyonunu etkileyebileceği şüphelendiğinden promotor bölgesindeki olası üç polimorfizm seçilmiştir. Bunlar promotor bölgede bulunan -402, -401 ve -323 polimorfizmlerdir. Bu bölgeleri içine alacak şekilde DNA dizi analizi ve Tek İplikçikli Uygun Polimorfizmi (SSCP) analizinde kullanılmak amacıyla ayrı bir primerler tasarılanarak PCR'lar yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Faktör VII promotor bölge SSCP ve DNA dizi analizi primeri amplifikasyon bölgesi

3.1.2.2. *FVII* Gen Değişimlerinin İncelenmesinde PCR Koşulları

FVII gen değişimlerinin belirlenmesinde kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için yapılan karışımda toplam hacim 50µl olacak şekilde 5 µl (NH₄)SO₂ içeren 10X Taq tampon çözeltisi [750mM Tris-HCl(pH:8.8), 200mM (NH₄)SO₂, 0.1 (v/v) Tween 20, (Fermentas ABD)], 3µl 25mM MgCl₂ (Fermentas, ABD), 2µl dNTP (Metabion, ABD), 2µl

Forward ve Reverse Primer [0.2µmol, son yoğunluk: 10pmol/µl(Metabion, ABD)], 0.2 µl Taq DNA polimeraz (Fermentas, ABD), 25-50ng DNA kullanılmıştır. Ayrıca SSCP PCR için, 5µl DMSO [Dimetil sülfoksit, min %99.5, (Riedel-de-Haen, Almanya)], DNA dizi analizi için yapılan PCR'a 5µl Betain [5 M, (Sigma, ABD)] eklenmiştir. Son hacim 50µl'ye tamamlanmıştır.

3.1.2.3 FVII Promotor Bölgesinin Amplifikasyonu

Her iki primer için de aynı PCR sıcaklıkları uygulanmıştır.

FVII geni Promotor bölgesi DNA dizi analizi için kullanılan primerler;

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

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

FVII geni Promotor bölgesi SSCP için kullanılan primerler;

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

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

PCR elementleri yukarıda belirtilen oranlarda kullanılmış, son hacim 50 µl olacak şekilde hesaplanmıştır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu sıcaklık şartları;

Kapak sıcaklığı 105°C ayarlanmıştır. 95°C 5 dakika, 34 döngü 94°C'de 1 dakika, 60°C 1 dakika, 72°C'de 1 dakika, 72°C 7 dakika şeklinde gerçekleştirilmiştir (ThermalCycle, Biometra, Almanya). PCR sonrasında DNA dizi analizinde kullanılan primer çifti ile 374 bp uzunluğunda oligonükleotid ürünler elde edilmiştir. SSCP yönteminde kullanılan primerler ile 214 bp uzunluğunda oligonükleotid ürünler elde edilmiştir. PCR ürünleri %2'lik agaroz jele Brom Fenol Mavis (Merck, Almanya) ile birlikte 5µl örnek alınarak yüklenmiştir.

```
GGCCTGGTCTGGAGGCTCTCTCAAATATTTACATCCACACCCCAAGATA  
CAGTCTTGAGATTTGACTCGCATGATTGCTATGGGACAAGTTTTTCATC  
TGCAGTTTAAATCTGTTTCCCAACTTACATTAGGGGTTTGAATTCTA  
GATCGTATTTGAAGTGTGGTGCCACACACACCTTAACACCTGCACCGC  
TGGCAACAAAACCGTCCGCTC
```

Dizi 2.1. *FVII geni* Promotor bölgesi SSCP için kullanılan primerler ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir. (Enterez Gene ID: 2155)

```
GTAAGATGTGGACCGCTGGAGAATGGGGGTGCTGCCTGCAGTCAA  
ACGGAGTGGGGGTGCCAGCTCAGGGCCAGAATGATCCTATTCCCG  
GCACTTCTCAGTGAGGCTCTGTGGCTCACCTAAGAAACCAGCCTCCCT  
TGCAGGCAACGGCCTAGCTGGCCTGGTCTGGAGGCTCTCTTCAAATA  
TTTACATCCACACCCAAGATACAGTCTTGAGATTTGACTCGCATGATTG  
CTATGGGACAAGTTTTCATCTGCAGTTTAAATCTGTTTCCCAACTTACA  
TTAGGGGTTTGAATTCTAGATCGTATTTGAAGTGTGGTGCCACACA  
CACCTTAACACCTGCACGCTGGCAACAAAACCGTCCGCTCTG
```

Dizi 2.2. *FVII geni* Promotor bölgesi DNA dizi analizi için kullanılan primerler ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir. (Enterez Gene ID: 2155)

3.1.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Bu çalışmada PCR ürünleri, %2'lik agaroz (Bio Basic Inc, USA) jel'e BBF takip boyası ile yüklenerek sonuçlar alınmıştır. Bunun için 2 g agaroz toplam hacim 100 ml olacak şekilde TBE 1X (Tris-Borik asit- EDTA) ilave edilir, ve mikrodalga fırında, (Beko MD 1300, Türkiye) ısıtılarak agarın tampon içinde homojen bir şekilde erimesi sağlanır.

Jel yapımı için kullanılan TBE 5X tampon solüsyonu hazırlanması için 54 g Tris (Amresco, ABD), 27.5 g Borik Asit (AppliChem, Almanya), 20 ml 0.5 M pH:8 EDTA (AppliChem, Almanya) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır. Elektronik karıştırıcıda (Dathan Scientific, Almanya) homojen berrak bir görünüm alana kadar miknatis yardımı ile karıştırılır. TBE 1X tampon solüsyonu ise 1:4 oranında sulandırılarak yapılır

Birçok solüsyonda reaksiyonları hızlandırmak amacıyla kullanılan EDTA 186.1 g tartılır ve üzerine 800 ml distile su eklenerek oluşturulur. pH'18 olana kadar NaOH pelleti eklenerek sağlanır. Artı 4°C'de saklanır.

Homojen şekilde eriyip berrak bir görünüm alan tampon-agar karışımına %5'lik stok solüsyonundan 3 µl Etidium Bromid (Sigma, ABD) eklenir. Karıştırılarak tarakları yerleştirilmiş jel tabağına (Thermo Midicell, ABD) dökülür. Agaroz jelin donması için yaklaşık yarım saat beklenir.

Donan jelin tarakları çıkartıldıktan sonra, jel tabağı ile birlikte elektroforez tankına (Thermo maxicell, Primo, ABD) yerleştirilir. PCR örneklerinden 5 µl alınarak, 1.5µl Brom Fenol Mavisini (BBF, Merck, Almanya) ile homojen hale getirilerek, agaroz jele yüklenir. Polimeraz zincir reaksiyonu sırasında amplifikasyonun doğru gerçekleştiğini anlayabilmek amacı ile agaroz jele 1.5µl standart boyları belirlenmiş olan markör (ΦX134 DNA HaeIII BioLabs, ABD) yüklenir ve 80 V akımda 20-25 dk yürütülür. UltraViyole (UV) ışık (Spectroline, ABD) altında Etidium Bromid ışığa verdiğiinden oluşan PCR ürünü bantları görünür hale getirilir. Markör yardımı ile PCR ürününün boyutu belirlenerek primerler ile çoğaltılmış bölge kontrol edilir. Sonuçlar UV ışık altında incelenerek fotoğraflanır (Olimpus, Camedia, 7.1 mp).

3.1.4. SSCP Jeli için Poliakrilamid Jel Hazırlanması

Yüzde 8'lik poliakrilamid jelin hazırlanması için %40'luk 49:1 oranında Akrlamid-Bisakrilamid solüsyonu kullanılmıştır. Bu solüsyon hazırlanırken, 196 g Akrlamid (Merck, Almanya), 4 g N,N, Metilen-Bis-Akrlamid (Sigma, Almanya) 200 ml distile suda 37°C'de karıştırılarak çözündürülür. Bu sırada çözeltinin ışık almaması sağlanır. İyice berrak bir çözelti oluşturulduktan sonra distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır ve +4°C'de saklanır.

Polimerizasyonu sağlamak amacı ile kullanılan Amonyum Per Sülfat (APS, AppliChem, Almanya) %10'luk kullanılır. %10'luk APS hazırlanırken 0.3 g APS 3ml distile su kullanılır. %10'luk APS her kullanımda yeniden hazırlanmalıdır.

Akrilamid monomerlerinin polimerleşme reaksiyonunu katalizleyen TEMED (Tetra Etilen Metilen Diamin, Schlarlau, İspanya) hazır olarak bulunur ve +4°C’de saklanır.

Elektroforez Aparatının Hazırlanması:

Kullanılacak 22x21.5, 22.5x21.5 cm boyutundaki biri diğerine göre daha uzun olan camlar alkol ile iyice silinir ve üzerinde toz vb. yabancı madde kalmaması sağlanır. Kullanılacak uygun spacer ve taraklar da alkol ile temizlenir. Spacerler alkol buharlaştıktan sonra 2 cam arasına yerleştirilerek klempler ile sıkıştırılır. Oluşturulan aralık spacerlere göre 1-1.5 cm arasında değişim gösterebilir. Akrilamid-Bisakrilamid jel hazırlandıktan sonra polimerleşmeden vertikal olarak yerleştirilmiş camlar arasına dökülür ve uygun taraklar kullanılarak, taraklar takılır. 20-30 dk sonra polimerleşme gerçekleşir. Taraklar buldukları yerden, ıslatıldıktan sonra çıkartılır. Oluşturulan kuyucuklar kontrol edilerek, kuyu içinde partikül veya jel parçacığı kalmamasına dikkat edilir. Bunun için kuyucuklar distile su ile bir enjektör yardımı ile yıkanır.

%8’lik Poliakrilamid Jelin Hazırlanması:

Bu çalışmada kullanılan %8’lik jel hazırlanırken %40’lık 49:1 Akrilamid- Bisakrilamid solüsyonundan 28 ml, TBE 5X tampon çözeltisinden 28 ml, 600µl, %10’luk APS (Schlarlau, İspanya) ve toplam hacim 70 ml olacak şekilde distile su ilave edilerek manyetik karıştırıcıda mıknatıs yardımı ile karıştırılır. Daha sonra 40µL TEMED ilave edilerek karıştırılır ve polimerizasyon gerçekleşmeden önce daha önceden hazırlanmış elektroforez aparatında vertikal duran 2 cam arasına dökülerek yükleme yapılacak kuyuları oluşturmak üzere uygun taraklar yerleştirilir. Jelin polimerleşmesi beklenir.

Jelin polimerleşmesinden sonra taraklar düzgün bir şekilde çıkartılır. Poliakrilamid jel, tanka yerleştirildikten sonra üzerine TBE 1X tampon solüsyonu dökülerek yüklemeye hazır hale getirilir. PCR örneklerine spesifikliğı artırma amacıyla belli bir oranda denatüre edici yükleme boyası eklenir. Yükleme boyası toplam hacminde %95 Formamid (Schlarlau, İspanya), 20 mM EDTA, %0.05 Xyelene Cyanol (Schlarlau, İspanya), %0.05 Brom Fenol Mavisi içermektedir. 40 µl PCR ürününe 10µl yükleme boyası ilave edilerek karıştırılır. PCR ürünleri 99°C’de 7 dk denatüre edildikten sonra buz içerisine alınır ve hızlıca jeldeki kuyucuklara yüklenir.

PCR ürünlerinden, daha önceden agaroz jelde vermiş oldukları bant yoğunluğuna göre 6-15 µl alınarak vertikal halde tanka yerleştirilmiş olan poliakrilamid jele yüklenir. Poliakrilamid jel +4°C'de 130 Volt akım eşliğinde 10-12 saat yürütülür. Bantlar gümüş boyama tekniği ile boyanarak görünür hale getirilir.

3.1.5. SSCP Jeli için Gümüş Boyama

Poliakrilamid jel'de bantları görünür hale getirmek için kullanılan gümüş boyama işlemi üç aşamadan oluşmaktadır.

İlk aşamada, %0.1'lik gümüş nitrat çözeltisi kullanılır. Gümüş nitrat, %1'lik gümüş nitrat çözeltisinden seyreltilerek kullanılır. Stok olarak kullanılan %1'lik gümüş nitrat çözeltisi, 5 g gümüş nitrat (Scharlau, İspanya) tartılıp 500 ml distile su eklenerek oluşturulur. Bu çözelti homojen ve berrak hale gelene kadar manyetik karıştırıcıda mıknatıs yardımı ile karıştırılır. Oda sıcaklığında, karanlık bir ortamda, koyu renkli şişede saklanır. Jel boyanırken, %0.1'lik gümüş nitrat 3 dk muamele edilir. Bu aşama poliakrilamid jeldeki bantların gümüş ile boyanması amacıyla yapılmaktadır. %0.1'lik gümüş nitrat çözelti 4 kez kullanılabilir ve karanlık ortamda oda sıcaklığında saklanmalıdır.

İkinci aşamada, %1.5'luk sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisine 2.4 ml Formaldehit ilave edilerek oluşturulan çözelti bantlar görünür hale gelene kadar poliakrilamid jel ile muamele edilir. %1.5 NaOH çözeltisi %15'lik NaOH çözeltisinden seyreltilerek oluşturulur. %15'lik NaOH çözeltisi 150 g katı NaOH (Schlarlau, İspanya)'in distile su ile 1000 ml'ye tamamlanması ile oluşturulur. Sadece bir kez kullanım içindir.

Son aşamada reaksiyonu durdurmak amacı ile yapılır. Bu aşamada, %0.75'lik sodyum bikarbonat (Na₂CO₃) çözeltisine Formaldehit eklenerek 3. aşamda kullanılan solüsyon hazırlanır. Birden fazla kullanılabilir. %0.75'lik Na₂CO₃ solüsyonu %7,5'lik Na₂CO₃ çözeltisinin 1000 ml'ye tamamlanması ile oluşturulur.

Son olarak boyanıp bantları görünür hale getirilen poliakrilamid jel kağıt ile kurulandıktan sonra, iki asetat kağıdı arasında hava almayacak şekilde, karanlık bir ortamda saklanır.

3.1.6. PCR Örneklerinin Temizlenmesi (Pürifikasyon)

FVII geninde belirlenen bölge SSCP (Single Strand Conformation Polimorphism) primeri ile çoğaltılıp, SSCP tekniği ile poliakrilamid jelde farklı bant profili gösteren örnekler seçilmiştir. DNA dizi analizi yapmak amacıyla PCR ürünleri PCR pürifikasyon kiti (Agencourt, Ampure, Beckman Coulter, ABD) ile fazla primer, dNTP uzaklaştırılır. Maksimum 50µl PCR ürünü alınarak pürifikasyon işlemi yapılmıştır. İşlem pürifikasyon kitinin 96 kuyulu özel plaka'inde yapılır. Alınan PCR ürününün 1.8 katı AgenCourt Clean solüsyonundan PCR ürününe eklenir ve karışması sağlanır. Plaka 3 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine yerleştirilir. 10dk bekletilir. Süre sonrasında solüsyon içinde bulunan mıknatıs özelliğindeki manyetik topların PCR ürünü ile birlikte plaka'e yapıştığı gözlenir. Oluşan kahverengi alan dışında kalan kısım mikropipet yardımı ile uzaklaştırılır. 200 µl %70'lik etanol eklenir, 30 s sonra alkol alınır. Bu işlem iki kere tekrar edilir. Oda sıcaklığında manyetik plaka üzerinde alkolün buharlaşması sağlanır. Kuruma sağlandıktan sonra 40 µl bidistile su ile sulandırılır. Değişik bant profili veren her bir örnek için bu işlem yapılır. %2'lik jelde sonuçlar incelenir. Bant yoğunluğuna göre DNA dizi analizinde kullanılacak PCR ürünü belirlenir.

3.1.7. DNA Dizi Analizi

Poliakrilamid jelde farklı bant profili gösteren örneklerin PCR ürünleri pürifikasyon kiti ile temizlendikten sonra DNA dizi analizi işlemi için uygun hale getirilmiş olur. DNA dizi analizi kapiller sistenli otomatik sekans cihazı (CEQ800XL, Beckman Coulter, ABD) ile 0.2 ml'lik kuyuları bulunan 96 örneklilik plaka'de yapılmıştır. Her bir örnek için, 8µl premiks (2 µl 10X reaksiyon tamponu, 1 µl dNTP karışımı, 2 µl ddUTP, 2 µl ddGTP, 2 µl ddCTP, 2 µl ddATP, 1 µL polimeraz enzimi), bant yoğunluğuna göre 1-10 µl miktarda PCR ürünü, 20 pmol primer ve en üste mineral yağ konularak dideoksinükleotitler ile rastgele sonlanma işlemi "cycle sequence" sağlanmıştır (Sanger, 2004). Bunun için örnekler 95°C'de ilk denatürasyon, 30 döngü 94°C'de 20 s denatürasyon ve 60°C'de 4 dk'lık uzama evresi 96 örneklilik Biometra (Almanya) termal cycle cihazında gerçekleştirildi.

"Cycle sequencing" işlemi bittikten sonra reaksiyon sonlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. Bunun için her bir kuyucuğun dibine 1.5 M C₂H₃O₂Na, 50mM EDTA, 20mg/ml'lik

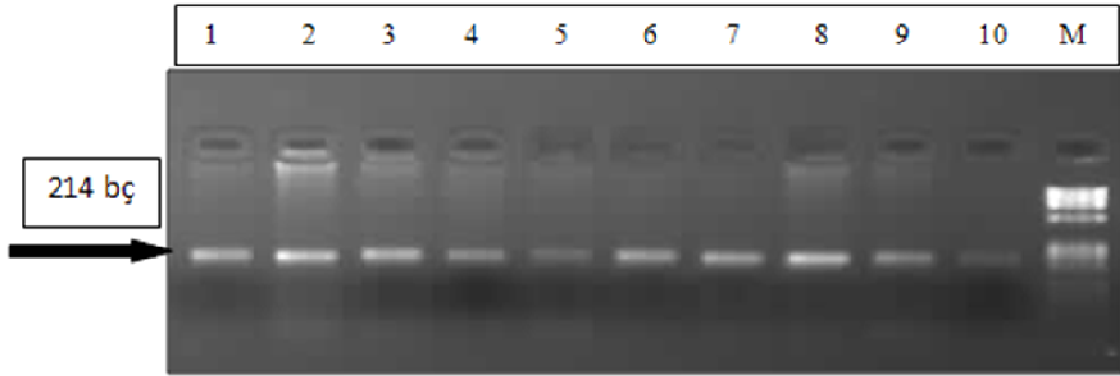
Glikojen (Beckman Coulter, ABD) eklenerek kuyucuk içindeki reaksiyonun sonlanması sağlanır. Örneklerin üzerine 60 µL %95'lik soğuk etanol eklenerek +4°C'de 4000 rpm'de 30 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edilir. Üstteki kısım dökülerek 200 µl %70'lik etanol eklenip 15 dk santrifüj edilir. Bu iki kez tekrarlanır. Daha sonra santrifüj 300 rpm'e gelecek kadar örneklerin bulunduğu plaka santrifüj edilir. Plaka liyofilizatör (Thermo, DNA 120 SpeedVac Concentrator, ABD) içinde yüksek basınç altında kurumaya bırakılır. Kuruyan örnekler üzerine 25 µl formamid eklenir. Bu solüsyon DNA ipliklerinin birbirinden ayrı tutulmasını sağlar. Her bir kuyucuk mineral yağ ile kapatılır ve DNA dizi analizi cihazına yerleştirilir. Mikrokapillerden geçen örnekler, bant sonlanmalarına ve PCR ürünü sonundaki ışığa veren dideoksinükleotitlere göre sensör tarafından algılanır. Çoğaltılmış bölgedeki her iki DNA ipliğinin dizi analizi, farklı renkteki dalgalar şeklinde gösterilip elde edilen sonuçlar CEQ Sequencing Software ile analiz edilmiştir.

3.2.Araştırma Bulguları

Bu çalışmada *FVII* geninin promotor bölgesinde 3 farklı polimorfizmi içeren gen bölgesi çoğaltılmış ve 3 farklı polimorfizminin (-32310bçins, -401G/T, -402G/A) Türk toplumunda koroner arter hastalarında sıklığına bakılmıştır. Bu amaçla SSCP tekniği kullanılarak 6 farklı haplotip belirlenmiş ve yeni haplotip araştırılmıştır.

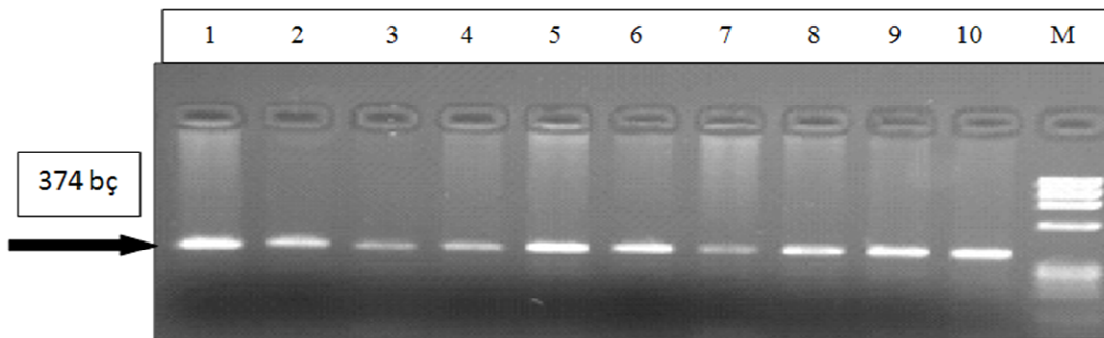
3.2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

SSCP yöntemi için çoğaltılmış bölge 214 bç boyutundadır (Şekil 3.2). Bu bölge, belirtilen primerler ile çoğaltılarak %2'lik jele 5 µL yüklenerek 80 V'da 15 dk yürütülmüştür.



Şekil 3.2. *FVII* geni promotor bölgesi SSCP yöntemi için kullanılan primerin PCR ürünlerinin %2'lik jeldeki görüntüsü. Son örnek markör (Φ X174 DNA Hae III)

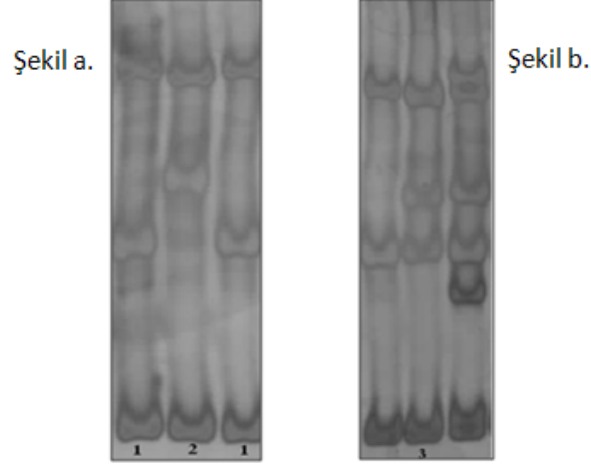
DNA dizi analizi için çoğaltılmış bölge 314 bç boyutundadır (Şekil 3.3). Bu bölge, belirtilen primerler ile çoğaltılarak %2'lik jele 5 µL yüklenerek 80 V'da 15 dk yürütülmüştür.



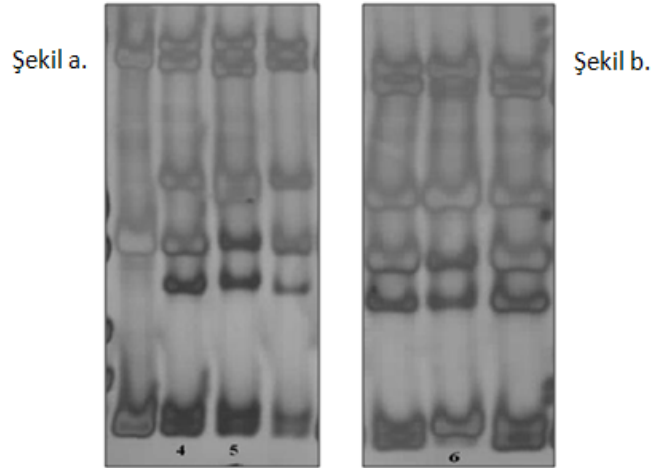
Şekil 3.3. *FVII* geni promotor bölgesi DNA dizi analizi için kullanılan primerin PCR ürünlerinin %2'lik jeldeli görüntüsü. Son örnek markör(Φ X174 DNA Hae III)

3.2.2. Tek İplikçikli Uygunluk Polimorfizmi (Single Strand Conformation Polimorphism- SSCP) Bulguları

214 bç boyutundaki çoğaltılan bölgede 6 farklı bant profili belirlenmiştir. Bant profilleri aşağıda gösterilmiştir (Şekil 3.4, Şekil 3.5).



Şekil 3.4.a. SSCP tekniği sonrasında bant profili 1 ve 2 olarak isimlendirilmiş örneklerin poliakrilamid jel görüntüsü, **b.** bant profili 3 olarak isimlendirilmiş örneğin poliakrilamid jel görüntüsü.



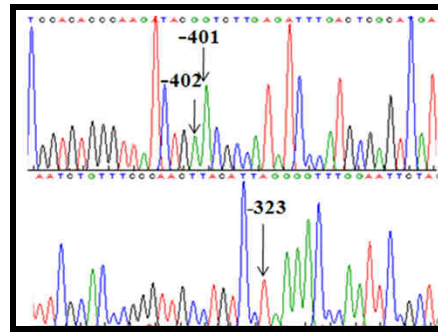
Şekil 3.5.a. SSCP tekniği sonrasında bant profili 4 ve 5 olarak isimlendirilmiş örneklerin poliakrilamid jel görüntüsü, **b.** bant profili 6 olarak isimlendirilmiş örneğin poliakrilamid jel görüntüsü.

3.2.3. DNA Dizi Analizi Bulguları

FVII geninde belirlenen bölge SSCP (Single Strand Conformation Polimorphism) primeri ile çoğaltılıp, SSCP tekniği ile poliamkrilamid jelde farklı bant profili gösteren örnekler seçilerek bu kez daha geniş bir bölgeyi çoğaltan DNA dizi analizi primerleri kullanılarak PCR yapılmıştır. PCR ürünlerine DNA dizi analizi yapılmış ve sonuçlar elde edilmiştir.

DNA dizi analizi sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 3.6, Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11)

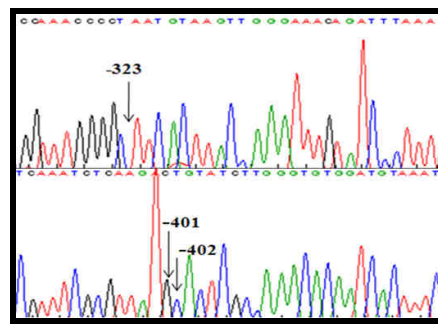
Bant Profili I, -402GG -401GG -323w/w



Şekil 3.6. SSCP tekniği sonrasında bant profili I olarak isimlendirilen örneğin Forward primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.

-402, -401 ve -323 noktalarında majör allel homozigot olarak belirlenmiştir.

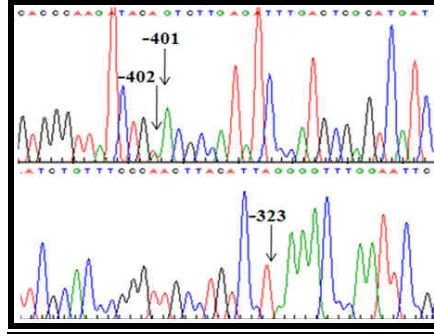
Bant Profili II, -402AA -401GG -323w/w



Şekil 3.7. SSCP tekniği sonrasında bant profili II olarak isimlendirilen örneğin Reverse primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.

-402 noktasında minör allel homozigot, -401 ve -323 noktalarında majör allel homozigot olarak belirlenmiştir.

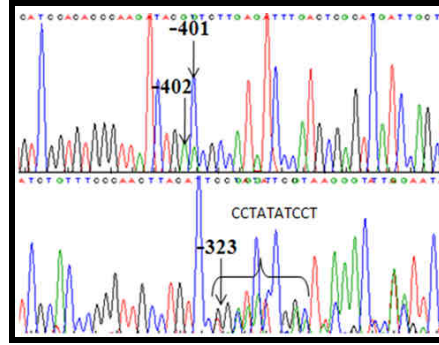
Bant Profili III, -402GA -401GG -323w/w



Şekil 3.8. SSCP tekniği sonrasında bant profili III olarak isimlendirilen örneğin Forward primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.

-402 noktasında minör allel heterozigot, -401 ve -323 noktalarında majör allel homozigot olarak belirlenmiştir.

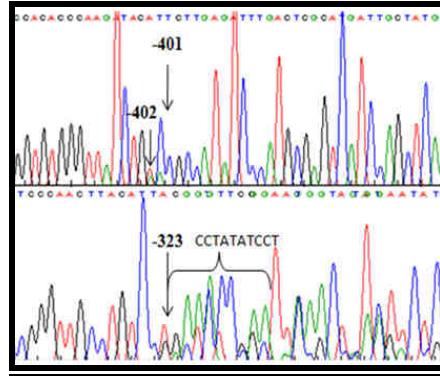
Bant Profili IV, -402GG -401GT -323w/10bcıns



Şekil 3.9. SSCP tekniği sonrasında bant profili IV olarak isimlendirilen örneğin Forward primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.

-402 noktasında majör allel homozigot, -401 ve -323 noktalarında minör allel heterozigot olarak belirlenmiştir.

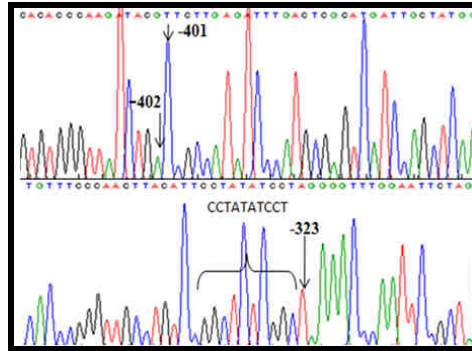
Bant Profili V, -402GA -401GT -323w/10bçins



Şekil 3.10. SSCP tekniği sonrasında bant profili V olarak isimlendirilen örneğin Forward primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.

- 402, -401 ve -323 noktalarında minör allel heterozigot olarak belirlenmiştir.

Bant Profili VI, -402GG -401TT -32310bç ins/10bçins



Şekil 3.11. SSCP tekniği sonrasında bant profili VI olarak isimlendirilen örneğin Forward primer ile DNA dizi analizi sonrasında elde edilen veriler.

-402 noktasında majör allel homozigot, -401 ve -323 noktalarında minör allel homozigot olarak bulunduğu belirlenmiştir

3.2.4. İstatistiksel Sonuçlar

Elde edilen veriler sonrasında odds ratio ve Chi kare testleri uygulanarak veriler istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Çizelge 3.1, Çizelge 3.2, Çizelge 3.3, Çizelge 3.4). Bu veriler aşağıda gösterilmiştir:

Çizelge 3.1. Haplotip Analizi

Bant Profili	Kontrol n (%)	Koroner arter hastaları n (%)	p	OR
I	43 (42.6)	101 (45.29)	-	1
II	2 (1.98)	3 (1.34)	0.98	0.64 (0.10-3.96)
III	19 (18.8)	33 (14.79)	0.62	0.74 (0.3-1.44)
IV	31 (30.69)	73 (32.73)	0.99	1.00 (0.58-1.74)
V	1 (0.99)	6 (2.69)	0.65	2.55 (0.29-21.86)
VI	5 (4.45)	8 (3.58)	0.74	0.68 (0.21-2.20)

Haplotip analizi sonrasında, koroner arter hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında p ve odds ratio değerleri bakımından anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Çizelge 3.2. -323 Polimorfizmi için Genotip Dağılımı ve Allel Frekansı

-32310bçins	Kontrol n (%)	Koroner arter hastaları n (%)	p	OR
w/w	64 (63.36)	137 (61.16)	-	1
10bçins/w	32 (31.68)	79 (35.26)	0.58	1.15 0.69-1.91
10bçins/10bçins	5 (4.95)	8 (3.57)	0.84	0.74 0.23-2.37
w	160 (79.21)	353 (78.79)	-	1
10bçins	42 (20.79)	95 (21.20)	0.90	1.02 0.68-1.54

-323 polimorfizmi için genotip dağılımı ve allel frekansı verileri koroner arter hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında p ve odds ratio değerleri bakımından anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Çizelge 3.3.-401 Polimorfizmi için Genotip Dağılımı ve Allel Frekansı

-401G/T	Kontrol n (%)	Koroner arter hastaları n (%)	p	OR
GG	64 (63.36)	137 (61.2)	-	1
GT	32 (31.6)	79 (35.3)	0.58	1.15 (0.69-1.91)
TT	5 (4.9)	8 (3.5)	0.84	0.74 (0.23-2.37)
G	160 (79.2)	353 (78.8)	-	1
T	42 (20.8)	95 (21.2)	0.90	1.02 (0.68-1.54)

-401 polimorfizmi için genotip dağılımı ve allel frekansı verileri koroner arter hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında p ve odds ratio değerleri bakımından anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

Çizelge 3. 4. -402 Polimorfizmi için Genotip Dağılımı ve Allel Frekansı

- 402G/A	Kontrol n (%)	Koroner arter hastaları n (%)	p	OR
GG	79 (78.2)	182 (81.2)	-	1
GA	20 (19.8)	39 (17.4)	0.59	0.84 (0.46-1.54)
AA	2 (1.9)	3 (1.3)	0.98	0.65 (1.10-3.97)
G	178 (88.1)	403 (89.9)	-	1
A	24 (11.9)	45 (10.0)	0.51	0.82 (0.49-1.40)

-402 polimorfizmi için genotip dağılımı ve allel frekansı verileri koroner arter hastaları ile kontrol grubu karşılaştırıldığında p ve odds ratio değerleri bakımından anlamlı bir sonuç elde edilememiştir.

4. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

FVII 5'promotor gen bölgesinde cis elementlerin, genin ifadenmesinde etkili olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bu polimorfizmlerden -323, -401, -402 lokalizasyonlarındaki polimorfizmlerin kişide Faktör VII ifadenmesini azaltıcı ve artırıcı yönde etkili olabileceğini düşündüren çalışmalar yapılmıştır.

Faktör VII ifadenmesinin fazla olması kalp krizinden ölüm riskini artırdığı belirlenmiştir (Meade vd 1986, Heinrich vd 1994, Redondo vd 1999, Girelli vd 2000) Genetik çalışmalara göre *FVII* promotor bölgede bulunan polimorfizmlerin sağlıklı erişkinlerde ifadenmenin değişmesinde %40 etkili olduğu belirlenmiştir (Marchetti vd 1993, Bernard vd 1996, Humphries vd 1996, Pollak vd 1996, Hooft vd 1999).

Bu polimorfizmler arasında bağlantı bulunması ve epistatik etkileşimlerin olması etkilerinin açıklığa kavuşturulmasına engel olmuştur (Bernardi vd 1996, Pollak vd 1996, Hooft vd 1999, Di Castelnuovo vd 2000, Girelli vd 2000, Kudaravalli vd 2002).

-401G/T değişiminin ve -323w/ins10bç polimorfizmleri ile bağlı olduğu ve birlikte kalıtıldığı daha önce yapılan çalışmalarda da gösterilmiştir (Hooft 1999, Lievers 1999, Ghiu 2004, Bernardi vd 1996, Humphries vd 1996, Girelli). -323ins 10bç allelinin *FVII* ifadenmesini azaltıcı yönde etkilediğinden tromboz oluşturma ve koroner arter hastalıklarına yakalanma riskinin azaldığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir (Sacchi vd 1996, Di Castelnuova vd 2000, Peyvandi vd 2000, Pegorarovd vd 2005). Danimarka'da yapılan bir çalışmaya göre -323ins allelini taşıyan bireylerin ateroskleroz, iskemik kalp hastalıklarına yakalanma riskinin arttığı gösterilmiştir (Doggen vd 1998, Lievers vd 1999). İsviçre'de yapılan bir çalışmada Karotid stenozunda -402A alleli daha yüksek sıklıkta bulunmuştur. Farklı çalışmalara göre ise bu polimorfizmlerin *FVII* ifadenmesinin değişiminde, kardiyovasküler hastalıklara karşı korunmasında etkili olmadığı yönündedir (Lievers vd 2000, Campo vd 2006, Greisenegger vd 2007).

-402G/A değişiminin, diğer iki polimorfizmden farklı olarak kalıtıldığı ve *FVII* ifadenmesini artırıcı yönde etkilediği gösterilmiştir (Hooft vd 1999, Campo vd 2006). -402A allelinin *FVII* ifadenmesini artırıcı etki yaparak tromboz oluşumu ve

kardiyovasküler hastalıklara yakalanma riskini artırıcı olabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak bu polimorfizmin hastalığa yatkınlık oluşturmada etkili olmadığını gösteren çalışmalar da bulunmaktadır. İtalya’da -402A allelinin koroner arter hastalarında daha sık bulunduğu MI riskini artırdığı belirlenmiştir (Martinelli vd 2008).

Bu üç polimorfizminin koroner arter hastalıklarına karşı koruyucu olduğu veya risk oluşturabileceği yönünde birbiri ile çakışan çalışmalar bulunmaktadır. Hücre kültürü çalışmalarında, bu üç polimorfizmden -323ins allelinin diğer minör allelere göre daha baskın olduğu ve FVII ifadelenmesini azalttığı gösterilmiştir (Sabater vd 2007). -402A allelinin FVII ifadelenmesini önemli derecede artırdığı Sabater vd (2007) göre belirlenmiştir.

Bu üç polimorfizm sıklığının etnik kökene göre değişebilmekte, farklı haplotipler bulunabilmektedir.-323ins allelinin Hintli yeni doğanda allel frekansı 0.23, Çinlilerde 0.03, Malezyyalılarda 0.06 olarak bulunmuştur (Quek vd 2006). Kuzey Avrupa’da 0.117 (Humphries vd 1996), Güney Avrupa’da ise 0.247 (Bernardi vd 1996) gibi farklı rakamlar elde edilmiştir. Bu çalışmalarda koroner arter hastalığı ile ilişkili olarak bulunmamıştır. Norveçliler ile yapılan bir çalışmada ise -401T allelinin frekansı 0.12, -402A allelinin frekansı ise 0.29 olarak belirlenmiştir (Lindman vd 2005).

Çalışmamızda, FVII promotor bölgesindeki üç polimorfizm Türk toplumunda, koroner arter hastalarında ve sağlıklı bireylerde araştırılarak haplotiplendirme yapılmıştır. Buna göre, Türk toplumunda bu üç polimorfizm bakımında 6 farklı haplotip belirlenmiştir. Bunlardan haplotip V, tüm polimorfizmler bakımında heterozigot kalıtılmakta ve ilk kez belirlenmiştir. -323w/ins10bç, -401G/T, -402G/A polimorfizmleri koroner arter hastaları ve sağlıklı bireyler ile kıyaslandığında anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Üç polimorfizminin koroner arter hastalığı oluşumunda risk getirmediği belirlenmiştir. -323ins10bç, -401T, -402A minör allel frekansı bakımından sağlıklı ve koroner arter hastalarında fark gözlenmemiştir.

Çalışmamızda elde edilen verilere göre, -323ins10bç allel frekansının Güney Avrupa (Bernardi vd 1996), İtalyan (Hahn vd 2004), Etiyopya (Hahn vd 2004) ve Hint popülasyonu ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir (Quek vd 2006).-402A allel frekansının Etiyopya ve İtalyan popülasyonu ile benzer olduğu, -401G allelinin Etiyopya Hint ve

İtalyan popülasyonu ile benzer olduğu gözlenmiştir (Hahn vd 2004). İtalyan (Campo vd 2006, Martinelli 2008) popülasyonunda -323 ve -402 genotip frekansı ile Türk popülasyonu genotip frekansı verilerinin yakın değerler olduğu belirlenmiştir (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Diğer Popülasyonlardaki Genotip Dağılımı ve Allel Frekansı

	İtalya (Campo vd 2006)	İtalya (Hahn vd 2004)	İtalya (Martinelli vd 2008)	Etiyopya (Hahn vd 2004)	Hindista n (Hahn vd 2004)
-323 w/w	%66	-	%63.7	-	-
-32310bçins/w	%31	-	%31.3	-	-
-32310bçins/32310bçins	%3	-	%5	-	-
-323 w	-	%76	-	%75	%79
-401GG	-	-	-	-	-
-401GT	-	-	-	-	-
-401TT	-	-	-	-	-
-401G	-	%75	-	%74	%70
-402GG	%65	-	%73.1	-	-
-402GA	%32	-	%23.1	-	-
-402AA	%3	-	%3.8	-	-
-402A		%14	-	%10	-

Sonuç olarak -402, -401, -323 noktalarındaki *FVII* geni promotor bölge polimorfizmlerinin koroner arter hastaları ve kontrol bireyler ile karşılaştırıldığında anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Bu polimorfizmlerin sıklıkları ilk kez Türk toplumunda belirlenmiş ve bu bakımdan bazı toplumlara benzerlik gösterdiği ortaya çıkarılmıştır. Yine bu çalışmada üç polimorfizim bakımından yeni bir haplotip belirlenmiştir. Aynı zamanda sonuçların farmakogenetik çalışmalarda değerlendirilebileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışma, hasta sayısı artırılıp *FVII* gen ifadenme düzeyleri ile karşılaştırılarak geliştirilebilir ve daha anlamlı sonuçlar elde edilebilir.

KAYNAKLAR

- Akar N.1999.Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş (Genişletilmiş ikinci baskı). Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi An Tıp A.Ş Yayınları.Ankara.Türkiye.
- Aldon J. Lusic. 2000.Atherosclerosis. Nature,407;233-241.ABD.
- Arbini, A. A.; Bodkin, D.; Lopaciuk, S.; Bauer, K. A.1994.Molecular analysis of Polish patients with factor VII deficiency. Blood 84: 2214-2220.ABD.
- Balleisen, L., Bailey, J., Epping, P.H., Schulte, H., van de Loo, J.1985.Epidemiological study on factor VII, factor VIII and fibrinogen in an industrial population: I. Baseline data on the relation to age, gender, body-weight, smoking, alcohol, pill-using, and menopause. Thromb Haemost. 30;54(2):475-9.
- Banner, D. W., D'Arcy, A., Che`ne, C., Winkler, F. K., Guha, A.,Konigsberg, W. H., Nemerson, Y. & Kirchhofer, D.1996. The crystal structure of the complex of blood coagulation factor VIIa with soluble tissue factor. Nature; 380, 41–46.İsviçre.
- Bernardi, F.; Castaman, G.; Redaelli, R.; Pinotti, M.; Lunghi, B.; Rodeghiero, F.; Marchetti, G.1994. Topologically equivalent mutations causing dysfunctional coagulation factors VII (294Ala-->Val) and X (334Ser-->Pro). Hum. Molec. Genet. 3: 1175-1177.İtalya.
- Bernardi, F., Marchetti, G., Pinotti, M., Arcieri, P., Baroncini, C., Papacchini, M., Zeponi, E., Ursicino, N., Chiarotti, F., Mariani, G.1996.Factor VII gene polymorphisms contribute about one third of the factor VII level variation in plasma.Arterioscler Thromb Vasc Biol;16(1):72-6.İtalya.
- Bersano, A., Ballabio, E., Bresolin, N., Candelise, L.2008. Genetic Polimorphisms for the study of Multifactorial Stroke, Hum Mutat. 29(6):776-95. İtalya.
- Bode W., Fehllhammer H., Huber R.1976. Crystal structure of bovine trypsinogen at 1-8 Å resolution. I. Data collection, application of patterson search techniques and preliminary structural interpretation.Jmol Biol 106:325-335.Almanya.
- Bom, V.J., Reinalda-Poot, J.H., Cupers,R., Bertina, R.M.1990.Extrinsic activation of human blood coagulation factors IX and X. Thromb Haemost 63:224.Danimarka
- Bonnar, J.1987.Coagulation effects of oral contraception. Am J Obstet Gynecol;157(4 Pt 2):1042-8.İrlanda.
- Bonithon-Kopp ,C., Scarabin, P.Y., Bara, L., Castanier, M., Jacqueson, A, Roger, M.R.1988. relationship between sex hormones and haemostatic factors in healthy middle-aged men.Atherosclerosis;71(1):71-6.Fransa.

- Borén, J., Olin, K., Lee, I., Chait, A., Wight, T.N., Innerarity T.L.1998. Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J. Clin. Invest.* 101, 2658–2664.ABD.
- Bozzini, C., Girelli, D., Bernardi, F., Ferraresi, P., Olivieri, O., Pinotti, M., Martinelli, N., Manzato, F., Friso, S., Villa, G., Pizzolo, F., Beltrame, F., Corrocher, R. 2004.Influence of polymorphisms in the factor VII gene promoter on activated factor VII levels and on the risk of myocardial infarction in advanced coronary atherosclerosis. *Thromb Haemost*;92(3):541-9.İtalya.
- Bruunger, A.1993. X-PLOR, A System for x-ray Crystallographyand NMR.Yale Univ. Press, New Haven Version 3.1.ABD.
- Campo G., Valgimigli M., Ferraresi P., Malagutti P., Baroni M., Arcozzi C., Gemmati D., Percoco G., Parrinello G., Ferrari R., Bernardi F.2006.Tissue factor and coagulation factor VII levels during acute myocardial infarction: association with genotype and adverse events. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26(12):2800-6.İtalya.
- Carew, J.A., Pollak, E.S., High, K.A., Bauer, K.A.1998.Severe factor VII deficiency due to a mutation disrupting an Sp1 binding site in the factor VII promoter. *Blood*, 92, 1639–1645.ABD
- Cheng, S., Fockle,r C., Barnes, W.M., Higuchi, R .1994.Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 91: 5695–5699.ABD.
- Davie, E. W., Fujikawa, K. & Kisiel, W.1991. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation..*Biochemistry* 30,10363–10370.ABD.
- Desmond ,S. T.2008. An Introduction to Genetic EngineeringNicholl University of the West of Scotland, Paisley, Cambridge University Press.İngiltere.
- Di Bitondo, R., Hall, A.J., Peake, I.R., Iacoviello, L., Winship, P.R.2002.Oestrogenic repression of human coagulation factor FVII expression mediated through an oestrogen response element sequence motif in the promoter region. *Hum Mol Genet.*,11(7):723-31.İngiltere.
- Doggen, C.J., Manger, C. V., Bertina, R.M., Reitsma, P.H., Vandenbroucke, J.P, Rosendaal, F.R.1998. A genetic propensity to high factor VII is not associated with the risk of myocardial infarction in men. Department of Clinical Epidemiology, Leiden University Medical Center. *Thromb Haemost*80(2):281-5.Hollanda.
- Eilertsen, K.E., Østerud, B.2004. Tissue Factor:Patho-Physiology and Cellular Biology, *Blood Coagul Fibrinolysis.* 15(7):521-38. ABD.
- Eigenbrot, C.2002. Structure, Function and Actiavation of Coagulation Factor VII. *Current Protein and Peptide Science.* (3):287-289. ABD.

Ekmekçi, A.2006.Gen Genetik değişim ve Hastalıklar.Gazi Kitabevi, syf155. Ankara.

El-Ghoroury E.A., El-Din H.G., Abdel-Kader M., Ragab S. 2008.Study of factor VII , tissue factor pathway inhibitor and monocyte tissue factor in noninsulin-dependent diabetes mellitus. Blood Coagul Fibrinolysis, 19(1):7-13.Mısır.

EntrezGenesummary

Fazio, S., Babaev, V.R., Murray, A.B., Hasty, A.H., Carter, K.J., Gleaves, L.A., Atkinson, J.B., Linton, M.F. 1997.Increased atherogenesis in mice reconstituted with apolipoprotein E null macrophages. Proc. Natl Acad. Sci. 94, 4647–4652.ABD.

Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L, Hoff, H.F., Sharma, K., Silverstei, R.L.2000.Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerosis lesion development in mice. J. Clin. Invest. 105, 1049–1056.ABD

Folsom, A.R., Conlan ,M.G., Davis, C.E., Wu, K.K.1992.Relations between hemostasis variables and cardiovascular risk factors in middle-aged adults. Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Investigators Ann Epidemiol; 2(4):481-94.ABD.

Folsom, A.R., Cushman, M., Heckbert, S.R., Ohira, T., RasmussenTorvik, L., Tsai, M.Y.2007. Factor VII coagulant activity, FVII -670A/C, -402G/A polimorphisms and risk of venous embolism. J Thromb Haemost;5(8):1674-8.ABD.

Freskgård, P.-O., Olsen, O. H. & Persson, E.1996. Structural changes in factor VIIa induced by Ca²⁺ and tissue factor studied using circular dichroism spectroscopy. Protein Sci.5, 1531–1540.Danimarka.

Gene Cards www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?id=3544&id_type=hgnc&search=3544

Gerhard, G. T. & Duell, P. B.1999.Homocysteine and atherosclerosis. Curr. Opin. Lipidol. 10, 417–429.ABD.

Ghiu, I.A., Ferrell, R.E., Kulaputana, O., Phares, D.A., Hagberg, J.M.2004.Selected genetic polymorphisms and plasma coagulation facto VII changes with exercise training. J Appl Physiol;96(3):985-90.ABD.

Gilgenkrantz, S., Briquel, M.-E., Andre, E., Alexandre, P., Jalbert, P., Le Marec, B., Pouzol, P., Pommereuil, M. 1986.Structural genes of coagulation factors VII and X located on 13q34. Ann. Genet. 29: 32-35

Girelli, D., Russo, C., Ferraresi, P., Olivieri, O., Pinotti, M., Friso, S., Manzato, F., Mazzucco, A., Bernardi, F., Corrocher, R.2000. Polymorphisms in the factor VII gene and the risk of myocardial infarction in patients with coronary artery disease.N Engl J Med.14;343(11):774-80.İtalya.

- Goldstein, J. L., Ho, Y. K., Basu, S. K. & Brown, M. S. 1979. Binding sites on macrophages that mediate uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl Acad. Sci.* 76, 333–337. ABD.
- Grainger, D. J., Kemp, P. R., Liu, A. C., Lawn, R. M., Metcalfe, J. C. 1994. Activation of transforming growth factor- β is inhibited in transgenic apolipoprotein(a) mice. *Nature* 370, 460–462. İngiltere.
- Green, F., Kelleher, C., Wilkes, H., Temple, A., Meade, T., Humphries, S. 1991. A common genetic polymorphism associated with lower coagulation factor VII levels in healthy individuals *Arterioscler Thromb*; 11(3):540-6. İngiltere.
- Greisenegger S., Weber M., Funk M., Endler G., Lang W., Ferrari J., Lalouschek W., Mannhalter C. 2007. Polymorphisms in the coagulation factor VII gene and risk of primary intracerebral hemorrhage. *Eur J Neurol*. 4(10):1098-101. Avusturya.
- Gupta, S., Pablo, A.M., Jiang, X., Wang, N., Tall, A.R., Schindler, C. 1997. IFN- γ potentiates atherosclerosis in apoE knock-out mice. *J. Clin. Invest.* 99, 2752–2761. ABD.
- Guyton, Hall. 1996. *Tıbbi Fizyoloji*. Misisipi Üniversitesi, syf 473-463. ABD.
- Hagen, F. S.; Gray, C. L.; O'Hara, P.; Grant, F. J.; Saari, G. C.; Woodbury, R. G.; Hart, C. E.; Insley, M.; Kisiel, W.; Kurachi, K.; Davie, E. W. 1986. Characterization of a cDNA coding for human factor VII. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 83;2412-2416. ABD.
- Hahn, M.W., Rockman, M.V., Soranzo, N., Goldstein, D.B., Wray, G.A. 2004. Population genetic and phylogenetic evidence for positive selection on regulatory mutation at the factor VII locus in human. *Genetics*. 167(2):867-77. ABD.
- HapMap, www.hapmap.org
- Hegele, R. A. Paraoxonase—genes and disease. 1999. *Ann. Med.* 31, 217–224. Kanada.
- Higashi S., Nishimura H., Aita K., Iwanaga S. 1994. Identification of regions of bovine factor VII essential for binding to tissue factor. *J Biol Chem*. 269(29):18891-8. Japonya.
- Human Protein Reference Database www.hprd.org/summary?protein=01965&isoform_id=01965_1&isoform_name=Isoform_1
- Hofmann, M.A., Drury, S., Fu, C., Qu, W., Taguchi, A., Lu, Y., Avila, C., Kambham, N., Bierhaus, A., Nawroth, P., Neurath, M.F., Slattey, T., Beach, D., McClary, J., Nagashima, M., Morser, J., Stern, D., Schmidt, A.M. 1999. RAGE mediates a novel proinflammatory axis: a central surface receptor for S100/calgranulin polypeptides. *Cell* 97, 889–901, ABD.
- Hoffman, C.J., Miller, R.H., Hultin, M.B. 1992. Correlation of factor VII activity and antigen with cholesterol and triglycerides in healthy young adults. *Arterioscler Thromb*; 12(3):267-70. ABD.

- Hoffman, M., Monroe, D.M., Oliver, J.A., Roberts, H.R. Factors IX and Xa play distinct roles in tissue factor- dependent initiation of coagulation. *Blood*. 1;86(5):1794-801.ABD.
- Hoffman, M., Monroe, D.M.2001. A cell-based model of hemostasis. *Thromb Haemost.*;85(6):958-65.ABD.
- Ito, K., Goto, K., Sugiura, T., Muramatsu, K., Ando, T., Maniwa, H., Yokoyama, T., Sugiyama, K., Togari, H. 2006. Polymorphisms of the factor VII gene associated with low activities of vitamin K dependent coagulation factors in one month old infants. *Tohoku J Exp Med*;211(1):1-8.Japonya.
- Jackson, AA., Cronin, K.R., Zachariah, R., Carew, J.A., 2007, CCAAT/Enhancer binding protein β participates in insulin responsive expression of the factor VII gene, *J Biol Chem.*, 282(43):31156-65.ABD.
- Jesty J. 2007. Blood Coagulation review. Oxford University.ABD.
- Kario, K., Miyata, T., Sakata, T., Matsuo, T., Kato, H.1994. Fluorogenic assay of activated factor VII. Plasma factor VIIa levels in relation to arterial cardiovascular diseases in Japanese. *Arterioscler Thromb*;14(2):265-74.Japonya.
- Karry Mullis Nobel Lecture, 1993.
- Kemball-Cook G., Johnson D.J., Tuddenham E.G., Harlos K.1999. Crystal structure of active site-inhibited human coagulation factor VIIa (des-Gla). *J Struct Biol*.127(3):213-23.İngiltere.
- Khan, A. R. & James, M. N. G.1998. Molecular mechanisms for the conversion of zymogens to active proteolytic enzymes. *Protein Sci.* 7, 815–836. ABD
- Kumar and Cotran.2003. Temel Patoloji.syf328-327.
- Klug, Ws., Cummings, Mr.2000. Genetik Kavramlar, 6. Baskı. Prentice Hall, (Türkçe Çeviri: Prof. Dr. Cihan Öner, Ankara).ABD.
- Knowles, J.W., Reddick, R.L., Jennette, J.C., Shesely, E.G., Smithies, O., Maeda, N.2000. Enhanced atherosclerosis and kidney dysfunction in eNOS(-/-) apoE(-/-) mice are ameliorated by enalapril treatment. *J. Clin. Invest.* 105, 451–458.ABD.
- Kostulas, K., Brophy, V.H., Moraitis, K., Manolescu, A., Kostulas, V., Gretarsdottir, S., Cheng, S., Hillert, J.2008. Genetic profile of ischemic cerebrovascular disease and carotid stenosis. *Acta Neurol Scand*;118(3):146-52.İsveç.
- Kudaravalli, R., Tidd, T., Pinotti, M., Ratti, A., Santacrose, R., Margaglione, M., Dallapiccola, B., Bernardi, F., Fortina, P., Devoto, M., Pollak, E.S.2002 Polymorphic changes in the 5' flanking region of factor VII have a combined effect on promoter strength. *Thromb Haemost.*88(5):763-7.ABD.

- Levy, O.E., Semple, J.E., Lim, M.L., Reiner, J., Rote, W.E., Dempsey, E., Richard, B.M., Zhang, E., Tulinsky, A., Ripka, W.C., Nutt, R.F. 1999. Potent and selective thrombin inhibitors incorporating the constrained arginine mimic 1-3-piperidyl(N-guanidino)alanine at P1. *J. Mol. Biol.* 285,2089–2104.ABD.
- Libby, P. 1999. Changing concepts of atherogenesis. *J. Intern. Med.* 247, 349–358.ABD.
- Lievers K.J., Mennen L.I., Rattink A.P., Zwinderman A.H., Jukema J.W., Schouten E.G., de Maat MP. 2000. The -323Ins10 polymorphism for factor VII is not associated with coronary atherosclerosis in symptomatic men. The REGRESS study group. *Thromb Res.* 1;97(5):275-80. Danimarka.
- Lindman, A.S., Pedersen, J.I., Hjerkin, E.M., Veierød, M.B., Kavlie, A., Arnesen, H., Seljeflot I. 2004. The influence of the -401G/T, -402G/A polymorphisms of coagulation FVII promoter on plasma levels FVII. *Thromb Res.* 116(4):313-20. Norveç.
- Lusis, A. J., Weinreb, A. & Drake, T. A. 1998. *Textbook of Cardiovascular Medicine*. Philadelphia 2389–2413.ABD.
- Macfarlane R. 1964. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its function as a biochemical amplifier. *Nature.* 2;202:498-9.ABD.
- Martinelli, N., Trabetti, E., Pinotti, M., Olivieri, O., Sandri, M., Friso, S., Pizzolo, F., Bozzini, C., Caruso, P.P., Cavallari, U., Cheng, S., Pignatti, P.F., Bernardi, F., Corrocher R., Girelli, D. 2008. Combined effect of hemostatic gene polymorphisms and risk of myocardial infarction in patient with advanced coronary atherosclerosis, *PLoS ONE*, 3(2):e1523. İtalya.
- McVey, J. H., Boswell, E., Mumford, A. D., Kemball C. G., Tuddenham, E. G. D. 2001. Factor VII deficiency and the FVII mutation database. *Hum. Mutat.* 17: 3-17, 2001. İngiltere.
- McCallum, C. D., Hapak, R. C., Neuenschwander, P. F., Morrissey, J. H. & Johnson, A. E. 1996. The location of the active site of blood coagulation factor VIIa above the membrane surface and its reorientation upon association with tissue factor. A fluorescence energy transfer study *J. Biol. Chem.* 271,28168–28175. ABD.
- Meade, T.W., Mellows, S., Brozovic M., Miller, G.J., Chakrabarti, R.R., North, W.R., Haines, A.P., Stirling, Y., Imeson, J.D., Thompson, S.G. 1986. Haemostatic function and ischaemic heart disease: principal results of the Northwick Park Heart Study. *Sep 6;2(8506):533-7 Lancet.* ABD.
- Mehrabian, M., Wen P.Z, Fisler J, Davis, RC., Lusis A.J. 1998. Genetic loci controlling body fat, lipoprotein metabolism, and insulin levels in a multifactorial mouse model. *J. Clin. Invest.* 101, 2485–2496.ABD.
- Mitropoulos, K.A., Miller, G.J., Martin, J.C., Reeves, B.E., Cooper, J. 1994. Dietary fat induces changes in factor VII coagulant activity through effects on plasma free stearic acid concentration. *Arterioscler Thromb.* 14(2):214-22. İngiltere.

- Murshudov ,G.N., Vagin, A.A., Dodson,E.J.Acta Crystallogr D Biol Crystallogr .1997.Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method.53(Pt 3):240-55.İngiltere.
- Moultan, K. S., Folkman, J.1999. In Molecular Basis of Cardiovascular Disease (ed. Chien, K. R.) 393–410.Philadelphia.
- Negoro, N, Kanayama, Y, Haraguchi, M, Umetani, N, Nishimura, M, Konishi, Y, Iwai, J, Okamura, M, Inoue, T, Takeda, T.1995. Blood pressure regulates plakalet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo.An autocrine mechanism promoting hypertensive vascularhypertrophy. J. Clin. Invest. 95, 1140–1150.Japonya.
- O'Hara, P. J.; Grant, F. J.; Haldeman, B. A.; Gray, C. L.; Insley, M. Y.; Hagen, F. S.; Murray, M. J. : Nucleotide sequence of the gene coding for human factor VII, a vitamin K-dependent protein participating in blood coagulation. Proc. Nat. Acad. Sci. 84: 5158-5162, 1987.ABD.
- Onat A. Erişkinlerde kalp hastalıkları prevelansı, yeni koroner olaylar ve kalpten ölüm sıklığı, 2000.16-23
- Pavlov, A.R., Pavlova ,N.V., Kozyavkin, S.A., Slesarev, A.I.2004.Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. Trends Biotechnol. 22: 253–260.
- Persson, E. 1997. Characterization of the interaction between the light chain of factor VIIa and tissue factor. FEBS Lett. 413, 359–363.Danimarka.
- Petersen, L., 2008. Microarray studies of Factor VIIa- activated cancer cells. Thromb Res.,122 Suppl 1:S11-3.Danimarka.
- Pfeiffer, R.A., Ott, R., Gilgenkrantz, S., Alexandre, P.1982.Deficiency of coagulation factors VII and X associated with deletion of a chromosome 13 (q34): evidence from two cases with 46,XY,t(13;Y)(q11;q34). Hum. Genet. 62: 358-360.ABD.
- Pike, A. C. W.; Brzozowski, A. M.; Roberts, S. M.; Olsen, O. H.; Persson, E.1999. Structure of human factor VIIa and its implications for the triggering of blood coagulation. Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 8925-8930.İngiltere.
- Podrez, E.A., Febbraio, M., Sheibani, N., Schmitt, D., Silverstein, R.L., Hajjar, D.P., Cohen, P.A., Frazier, W.A., Hoff H.F., Hazen S.L.2000.Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. J. Clin. Invest. 105, 1095–1108.ABD.
- Pollak, E. S., Hung H. L., Godin W., Overton G.C., an. High K.A. 1996. Functional characterisation of human Factor VII 5'flanking region. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 271, No. 3, Issue of January 19, pp. 1738–1747.ABD.

- Poulsen, L. K., Jacobsen, N., Sørensen, B. B., Bergenheim, N. C. H., Kelly, J. D., Foster, D. C., Thastrup, O., Ezban, M. & Petersen, L. C. 1998. Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J. Biol. Chem.* 273, 6228–6232. Danimarka.
- Quek, S.C., Low, P.S., Saha, N., Heng, C.K. 2006. The effect of three factor VII polymorphisms on factor VII coagulant levels in healthy Singaporean Chinese, Malay and Indian newborns. *Ann Hum Genet.*; 70(Pt 6):951-7. Çin.
- Ragni, M.V., Lewis, J.H., Spero, J.A., Hasiba, U. 1981. Factor VII deficiency. *Am J Hematol* 10:79.
- Ratnoff, O. D., Bennett, B. 1973. The genetics of hereditary disorders of blood coagulation. *Science* 179: 1291-1298.
- Rao LV, Rapaport SI. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988. Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. *Proc Natl Acad.*; 85(18):6687-91. ABD.
- Rao, L.V., Rapaport, S.I., Bajaj, S.P. 1986. Activation of human factor VII in the initiation of tissue factor-dependent coagulation. *Blood*; 68(3):685-91. ABD.
- Ruf, W. & Dickinson, C. D. 1998. Allosteric regulation of the cofactor-dependent serine protease coagulation factor VIIa. *Trends Cardiovasc. Med.* 8, 350–356. ABD.
- Sabater L., M., Chillón, M., Howard, T.E., Gil, E., Almasy, L., Blangero, J., Fontcuberta, J., Soria, J.M. 2007. Functional analysis of genetic variability in the F7 gene promoter. *Atherosclerosis*; 195(2):262-8. İspanya.
- Sabater, L. M., Almasy, L., Martínez, M. E., Martínez, S. E., Souto, R., Blangero, J., Souto, J., Fontcuberta, J., Soria, J.M. 2006. Genetic architecture of FVII gene in a Spanish population: complex diseases and functional assays. *Clin Genet* (69); 420–428. İspanya.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230 (4732): 1350–4.
- Sambrook, J, Russel, D.W.. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3rd ed. Ed) Cold Spring Harbor Laboratory Press ISBN 0-87969-576-5. Chapter 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction. ABD
- Sanger, F., Coulson, A. R. 1975. *J. Mol. Biol.* 94, 441-448. ABD.
- Scarabin P.Y., Bonithon-Kopp C., Bara L., Malmejac A., Guize L., Samama M. 1990. Factor VII activation and menopausal status. *Thromb Res*; 57(2):227-34. Fransa.
- Schönbeck, U., Mach, F., Sukhova, G.K., Herman, M., Graber, P., Kehry, MR, Libby, P. 2000. CD40 ligation induces tissue factor expression in human vascular smooth muscle cells. *Am. J. Pathol.* 156, 7–14 .ABD.

Schönbeck, U., Sukhova, G. K., Shimizu, K., Mach, F. & Libby, P.2000. Inhibition of CD40 signaling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 97, 7458–7463.ABD.

Shih, P.T., Brennan, M.L., Vora, D.K., Territo, M.C., Strahl, D, Elices, M.J., Lusis, A.J., Berliner ,J.A.1998. Blocking very late antigen-4 integrin decreases leukocyte entry and fatty streak formation in mice fed an atherogenic diet. *Circ. Res.* 84, 345–351.ABD.

Shih, D.M., Xia, Y.R., Wang, X.P., Miller, E., Castellani, L.W., Subbanagounder,G., Cheroutre, H., Faull ,K.F., Berliner, J.A., Witztum, J.L., Lusis, A.J.2000. Combined serum paraoxonase knockout/apolipoprotein E knockout mice exhibit increased lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *J. Biol. Chem.* 276, 17527–17535.ABD.

Smithies, O., Maeda, N.1995.Gene targeting approaches to complex diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc. Natl Acad. Sci* 92, 5266–5272.ABD.

Smith, J.D., Trogan, E., Ginsberg, M., Grigaux, C., Tian, J., Miyata, M.1995.Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc. Natl Acad. Sci.*92, 8264–8268.ABD.

Suzuki, H., Kurihara, Y., Takeya, M., Kamada, N., Kataoka, M., Jishage, K., Ueda, O., Sakaguchi, H., Higashi, T., Suzuki ,T., Takashima, Y., Kawabe, Y., Cynshi, O., Wada, Y., Honda, M., Kurihara, H., Aburatani, H., Doi, T., Matsumoto, A., Azuma, S., Noda, T., Toyoda, Y., Itakura ,H., Yazaki, Y., Kodama, T.1997. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386, 292–296.Japonya.

Tamary, H.; Fromovich, Y.; Shalmon, L.; Reich, Z.; Dym, O.; Lanir, N.; Brenner, B.; Paz, M.; Luder, A. S.; Blau, O.; Korostishevsky, M.; Zaizov, R.; Seligsohn, U. 1996. Ala244val is a common, probably ancient mutation causing factor VII deficiency in Moroccan and Iranian Jews. *Thromb. Haemost.*; (76); 283-291.İsrail.

Triplett, D.A., Brandt, J.T., McGann Batard, M.A., Schaeffer Dixon, J.L.,Fair, D.S.1985.Hereditary factor VII deficiency: Heterogeneity defined by combined functional and immunochemical analysis. *Blood* 66:1284.

UniProt/Swiss-Prot http://www.uniprot.org/uniprot/P08709#section_comments

Van 't Hooft, FM, Silveira, A, Tornvall, P, Iliadou, A, Ehrenborg, E, Eriksson, P, Hamsten, A.1999.Two common polymorphisms in the promoter region of the coagulation factor VII gene determining plasma factor VII activity and mass concentration. *Blood*, 15;93(10):3432-41.İsveç.

Watson, K.E., Boström, K., Ravindranath, R., Lam, T., Norton, B., Deme,r L.L.1994.TGF- β 1 and 25-hydroxycholesterol stimulate osteoblast-like vascular cells to calcify. *J. Clin. Invest.* 93, 2106–2113.ABD.

Watson, A.D., Leitinger,N., Navab, M., Faull, K.F., Hörkkö, S., Witztum, J.L., Palinski ,W., Schwenke ,D., Salomon, R.G, Sha, W., Subbanagounder, G., Fogelman ,A.M.,

Berliner, J.A.1997.Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo. J. Biol. Chem. 272, 13597–13607.ABD.

World Health Statistics 2008, (<http://www.who.int/statistics>)

Wulff, K., Herrmann, F.H. 2000.Twenty two novel mutation of the factor FVII gene in Factor VII deficiency, Circulating tissue factor procoagulant activity and trombin generation in patients with type 2 diabetes: Effects of insulin and glucose, Hum Mutat.15(6):489-96.Almanya.

http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_snp.pdf

Zur, M.; Nemerson, Y, A. L,Thomas, D. P.1981.Tissue factor pathways of blood coagulation.In: Bloom.Haemostasis and thrombosis. Edinburgh,Churchill Livingstone,. Pp. 124-139. İngiltere.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özge CUMAOĞULLARI

Doğum Yeri : G.Mağusa / KKTC

Doğum Tarihi : 04 /09 /1984

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

2002-2006 - Çukurova Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü

1998-2001 - Gazimağusa Türk Maarif Koleji

Staj

2005-2006 - Çukurova Üniversitesi , Sitogenetik Laboratuvarı, Adana

2005 - Dr. Burhan Nalbantoğlu Devlet Hastahanesi Laboratuvarları, Lefkoşa, KKTC

2004-2005 - Çukurova Üniversitesi , Biyokimya Laboratuvarı, Adana

2003 - Mağusa Devlet Hastahanesi Laboratuvarı, Mağusa, KKTC

Katıldığı Kongreler

8-11 Ekim 2008 - 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, Çesme

5-8 Ekim 2005 - XII. Ulusal Öğrenci Kongresi, Isparta

4-9 Ekim 2004 - XI. Ulusal Öğrenci Kongresi, Aydın

Sözlü Sunumlar

Ö. Cumaogulları, Faktör VII Promotor Bölge Polimorfizimlerinin Aterosklerozlu Hastalarda Haplotip Gruplandırılmasıyla Tromboz Oluşumunda Rolünün Araştırılması Öğrenci Seminerleri, Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara, 2008

Ö. Cumaogulları Talasemia Hastalığı, Öğrenci Sunumları, Çukurova Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Adana, 2006

Ö. Cumaoğulları **Limulus polyphemus** ve **Biyoteknolojide Kullanılması**, XII. Ulusal Öğrenci Kongresi, Isparta, Ekim 2003

Poster Sunumları

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

Ödüller

Genç Katılımcı Ödülü, 34. Ulusal Hematoloji Kongresi, Çesme