

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**NOKTA MUTASYONLARININ SAPTANMASINDA YÜKSEK
ÇÖZÜNÜRLÜKLÜ ERİME TEKNİĞİNİN VERİM VE
HASSASİYETİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hülya SÜMER

Danışman Öğretim Üyesi

Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ

ANKARA

2008

Nokta Mutasyonlarının Saptanmasında Yüksek Çözünürlüklü Erime Tekniğinin Verim ve Hassasiyetinin Değerlendirilmesi

ÖZET

Mutasyon DNA dizisinde meydana gelen kalıcı değişimdir. DNA'daki sekans varyasyonlarının saptanması hem kalıtsal hem de genetik hastalıkların teşhisinde büyük önem taşır. Mutasyonların tarama ve saptanması amacıyla birçok yöntem geliştirilmiştir. Bunlardan biri de HRM'dir (Yüksek Çözünürlüklü Erime). HRM, amplifiye edilen DNA örneklerinin sıcaklık artışıyla birlikte çift zincirli DNA'dan tek zincirli DNA'ya dönüşümündeki ayrılma davranışının karakterize edilmesi esasına dayanır. Mutasyon tarama ve saptanmasında en güvenilir tekniklerden biri olarak öne çıkan DHPLC ise HRM'ye benzer şekilde amplifiye edilmiş DNA fragmentinin erime profilinin olası bir mutasyon varlığında değişimini kromatografik olarak tespit etmektedir.

Bu çalışmada HRM ve DHPLC'nin nokta mutasyonlarını saptamadaki verim ve hassasiyeti değerlendirilmiştir. Bu amaçla MEFV (E148Q, M680I, M694V, V726A), Faktör V (1691G>A) ve Protrombin (20210G>A) genleri ile çalışılmıştır.

Çalışmamız HRM'nin nokta mutasyonlarının tespitinde en az DHPLC kadar hassas ve güvenilir bir yöntem olmasının yanı sıra işlem hacmi, süre ve maliyet açısından da DHPLC'den daha verimli olduğunu ortaya koymuştur.

Anahtar kelimeler: Genetik Hastalıklar, Nokta mutasyonu, HRM (Yüksek Çözünürlüklü Erime Tekniği), DHPLC (Denatüre Edici Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)

The evaluation of High Resolution Melting Technique in the Detection of Point Mutations

ABSTRACT

Mutations are defined as permanent changes in DNA sequence. The detection of sequence variation in DNA is very important in the diagnosis of both genetic and hereditary diseases. Multiple methods have been developed for mutation detection. One of them is HRM (High Resolution Melting). HRM is based on the characterization of DNA samples based on their melting profile through their transition from double strand DNA to single strand DNA.

DHPLC, one of the most reliable techniques in the detection of point mutations, detects changes in melting profile of amplified DNA fragment in the presence of a heterozygote.

In this study, we evaluated the efficiency and sensitivity of HRM and DHPLC in the detection of point mutations. For this purpose, we studied with MEFV (E148Q, M680I, M694V, V726A) Factor V (1691G>A) and Prothrombin (20210G>A) genes.

Our study showed that HRM is as sensitive and reliable as DHPLC in the detection of point mutations, also HRM was found to be more efficient than DHPLC in terms of throughput, time and cost.

Key words: Genetic diseases, Point mutation, HRM (High Resolution Melting Technique), DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgisini, tecrübesini ve desteğini esirgemedi yanımıda olan ve yol gösteren değerli danışmanım Sayın Doç. Dr. Hilal ÖZDAĞ'a,

Yüksek lisans eğitimimde maddi destek sağlayan Tübitak Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı'na,

Tez çalışmamı destekleyen Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'ne,

Tez çalışmasında kullandığım materyalleri sağladıkları için başta Sayın Prof. Dr. Nejat AKAR olmak üzere Ankara Üniversitesi Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı çalışanlarına,

DNA dizi analizi çalışmalarında büyük bir özveriyle yardımcı olan Uzm. Bio. Nilgün TEKİN'e,

DHPLC analizi çalışmalarında bilgi ve tecrübesini paylaşan Uzm. Bio. Buket DEMİR'e,

Tez yazım aşamasındaki yardımları ve tavsiyeleri için Dr. Yeşim ALAKOÇ'a,

Tez yazımında sabırla ve büyük bir özveriyle destek olan Bio. Emre AKPINAR'a ve Bio. Zafer YILMAZ'a,

Tez çalışmalarımı gerçekleştirdiğim Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı personeline ve genombilim grubundaki çalışma arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca beni her konuda destekledikleri ve her zaman yanımda oldukları için değerli aileme ve özellikle **ANNEM'e** sonsuz teşekkür ederim.

Hülya SÜMER

Eylül,2008

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	3
2.1. Mutasyon ve Genetik Hastalıklar	3
2.2. Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF)	3
2.2.1. Ailesel Akdeniz Ateşi ile İlişkilendirilen Gen Mutasyonları	3
2.3. Tromboz	4
2.3.1 Tromboz Nedenleri	4
2.3.1.1. Edinsel tromboz nedenleri	4
2.3.1.2. Kalıtsal tromboz nedenleri	5
2.4. Mutasyon Tarama Yöntemleri	7
2.4.1. Direkt Mutasyon Tarama Yöntemleri	7
2.4.1.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	7
2.4.1.2. ASA (Allele Specific Amplification-ARMS-Amplification Refractory Mutation System)	8
2.4.1.3. Primer Uzaması (Primer Extension, SNaPshot)	9
2.4.1.4. DNA Dizi Analizi	11
2.4.2. İndirekt Mutasyon Tarama Yöntemleri	13
2.4.2.1. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)	13
2.4.2.2. Heterodupleks Analizi (Heteroduplex Analysis - HA)	14
2.4.2.3. TGCE (Temperature Gradient Capillary Electrophoresis)	15
2.4.2.4. DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)	16
2.4.2.5. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting – HRM)	18
2.4.2.5.1. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi'nin Gücü	21
2.4.2.5.2. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi'ni Etkileyen Faktörler	21
2.4.2.5.3. DNA denatürasyonu	22

2.4.2.5.4. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar	22
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3.1. Materyal	26
3.2. Yöntem	26
3.2.1. Örneklerin Elde Edilmesi	26
3.2.2. Fenol -Kloroform-İzoamilalkol Yöntemi ile DNA İzolasyonu	26
3.3. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi	28
3.4. DNA Konsantrasyonunun Ayarlanması	28
3.5. Agaroz Jel Elektroforezi	28
3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	29
3.6.1. Primer Tasarımı	29
3.6.2. Primer Optimizasyonu	30
3.7. HRM	32
3.8. DHPLC	35
3.9. DNA Dizi Analizi	36
3.9.1. Pürifikasyon	36
3.9.2. Etanol Presipitasyonu	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	39
4.1. DNA İzolasyonu	39
4.2. PCR	39
4.3. Mutasyon Analizi Sonuçları	42
4.3.1. Faktör V Leiden Mutasyon Analizi Sonuçları	42
4.3.2. Faktör II (Protrombin) Mutasyon Analizi Sonuçları	44
4.3.3. MEFV Mutasyon Analizi Sonuçları	47
4.4. Dizi Analizi	54
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	57
5.1. Faktör V Leiden 1691G>A	57
5.2. Faktör II (Protrombin) 20210G>A	58
5.3. MEFV	58
KAYNAKLAR	65
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. MEFV geninin lokalizasyonu	4
Şekil 2.2. Venöz tromboza artmış yatkınlığın mekanizmaları	6
Şekil 2.3. Restriksiyon kesimi ve jel görüntüsü	8
Şekil 2.4. ASA aşamaları	9
Şekil 2.5. Primer uzaması yöntemiyle mutasyonun gösterilmesi	10
Şekil 2.6. DNA dizi analizi prosesi	12
Şekil 2.7. Dizi analizi sonucunda elde edilen elektroferogram	12
Şekil 2.8. SSCP prosesi	14
Şekil 2.9. Heterodupleks analizi	15
Şekil 2.10. Heterodupleks örneğe ait kromatogram	16
Şekil 2.11. DHPLC erime eğrisi	17
Şekil 2.12. Heterodupleks form oluşumu	17
Şekil 2.13. DHPLC analizine ait kromatogram	18
Şekil 2.14. Erime eğrisi	19
Şekil 3.1. Faktör V geni DHPLC analizi 57.6°C (1) ve 59.1°C (2) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.	35
Şekil 3.2. Faktör II geni DHPLC analizi 58.6°C (1) ve 59.8°C (2) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.	35
Şekil 3.3. MEFV geni 2.ekzon DHPLC analizi 64.8°C (1) ve 68.5°C (2) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.	36
Şekil 3.4. MEFV geni 10.ekzon DHPLC analizi 59.3°C (1) ve 60.9°C (2) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.	36
Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforezi, 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas SM0321) 2-3: Fenol-kloroform yöntemiyle izole edilen genomik DNA	39
Şekil 4.2. Agaroz jel elektroforezi, 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas SM0321), 2-3: Faktör V Leiden genine ait 218 bç'lik PCR ürünü	40
Şekil 4.3. Agaroz jel elektroforezi, 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas SM0321), 2-3: Faktör II (Protrombin) genine ait 197 bç'lik PCR ürünü	40
Şekil 4.4. Agaroz jel elektroforezi, 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas SM0321), 2-3: MEFV geni 2. ekzona ait 148 bç'lik PCR ürünü	41
Şekil 4.5. Agaroz jel elektroforezi, 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas	41

SM0321), 2-3: MEFV geni 10. ekzona ait 244 bç'lik PCR ürünü	
Şekil 4.6. A: FV örnekleri HRM analizi, B: FV örnekleri DHPLC analizi	43
Şekil 4.7. A: FII örnekleri HRM analizi, B: FII örnekleri DHPLC analizi	45
Şekil 4.8. A: FII örnekleri HRM analizi, B: FII örnekleri DHPLC analizi	46
Şekil 4.9. A: MEFV (E148Q) örnekleri HRM analizi, B: MEFV(E148Q) örnekleri DHPLC analizi	49
Şekil 4.10. A: MEFV (M680I) örnekleri HRM analizi, B: MEFV (M680I) örnekleri DHPLC analizi	50
Şekil 4.11. A: MEFV (M694V) örnekleri HRM analizi, B: MEFV (M694V) örnekleri DHPLC analizi	51
Şekil 4.12. A: MEFV (V726A) örnekleri HRM analizi, B: MEFV (V726A) örnekleri DHPLC analizi	52
Şekil 4.13. A: MEFV (Bileşik Heterozigot) örnekleri HRM analizi, B: MEFV (Bileşik Heterozigot) örnekleri DHPLC analizi	53
Şekil 4.14. Protrombin geni FII6 örneğine ait DNA dizi analizi (20210G>A mutasyonu)	54
Şekil 4.15. Protrombin geni FII8 örneğine ait DNA dizi analizi	54
Şekil 4.16. Protrombin geni FII11 örneğine ait DNA dizi analizi (20210G>A mutasyonu)	55
Şekil 4.17. Protrombin geni FII13 örneğine ait DNA dizi analizi	55
Şekil 4.18. Protrombin geni FII15 örneğine ait DNA dizi analizi (20210G>A mutasyonu)	56
Şekil 4.19. Heterodupleks form oluşturulan FII örneklerinin HRM analizi	60
Şekil 4.20. DHPLC analizi	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Faktör V genine ait örnekler	24
Çizelge 3.2. Faktör II (Protrombin) genine ait örnekler	24
Çizelge 3.3. MEFV genine ait örnekler	25
Çizelge 3.4. Primerler	29
Çizelge 3.5. PCR protokolü	30
Çizelge 3.6. MEFV (10.ekzon), Faktör II ve Faktör V genleri için reaksiyon koşulları	31
Çizelge 3.7. MEFV 2.ekzon için reaksiyon koşulları	31
Çizelge 3.8. Primerler için belirlenen bağlanma sıcaklıkları	32
Çizelge 3.9. Yüksek çözünürlüklü erime analizi reaksiyon bileşenleri	32
Çizelge 3.10. MEFV (10.ekzon), Faktör V ve Faktör II için HRM reaksiyon bileşenleri	33
Çizelge 3.11. MEFV 2.ekzon için HRM reaksiyon bileşenleri	33
Çizelge 3.12. HRM protokolü	34
Çizelge 3.13. DNA dizi analizi için sekans reaksiyonu protokolü	37
Çizelge 4.1. HRM analizi sonucunda erime profilleri farklılık gösteren örneklerin DNA dizi analizi sonuçları	56

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
APC	Aktive Protein C
ASA	Allele Specific Amplification
C	Sitozin
dATP	2'-deoksiadenozin 5'-Trifosfat
dCTP	2'-deoksisitidin 5'- Trifosfat
ddNTP	Dideoksinükleotid trifosfat
dGTP	2'-deoksiguanozin 5'- Trifosfat
dTTP	2'-deoksitimidin 5'- Trifosfat
DHPLC	Denaturing High Performance Liquid Chromatography
F primer	Forward primer
FMF	Familial Mediterranean Fever
G	Guanin
HA	Heteroduplex Analysis
HRM	High Resolution Melting
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
ng	Nanogram
PCR	Polymerase Chain Reaction
R Primer	Reverse Primer
RBC	Red Blood Cell
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
T	Timin
TGCE	Temperature Gradient Capillary Electrophoresis
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ

Hücre fizyolojisi ve metabolizmasının kontrol ve düzenlenmesinde “beyni”, genler/genom oluşturmaktadır. Hücre çekirdeği ve mitokondride yer alan DNA organizmanın total genomunu oluşturmaktadır. 1990’da başlatılan insan genom projesinde o yıllarda insan genomunda 100.000’e yakın genin varlığı öngörülmekteydi. Anılan projenin ilerleyen yıllarında elde edilen bilgilerin ışığında bugün itibariyle insan genomunda yaklaşık 25.000 gen bulunduğu tahmin edilmektedir (J. Craig Venter 2001).

DNA dizisinde meydana gelen kalıtsal değişikliklere mutasyon denir (Klug, Cummings et al. 2006). Hastalıklarla ilişkilendirilmiş genlerde ilgili genlerin fonksiyonlarını yerine getirmelerini engelleyen yapısal değişiklikler/mutasyonlar bulunur. Bugüne dek insan hastalıkları ile ilişkilendirilmiş birçok mutasyon tanımlanmıştır (Cotton and Horaitis 2002), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>).

Genetik hastalıkların moleküler tanısı ve tedavisi için hastalıkla ilişkilendirilmiş gendeki mutasyonların belirlenmesi önemlidir. Mutasyon saptanmasında kullanılan pek çok yöntem vardır. Mutasyon taranmasında kullanılan yöntemler indirekt ve direkt analiz yöntemleri olarak ayrılabilir. İndirekt mutasyon analiz yöntemleri DNA dizisindeki değişikliklerin analiz edilen DNA fragmentlerinin konformasyonuna olan olası etkilerinin saptanmasını mümkün kılar. İndirekt mutasyon analiz yöntemlerine SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism), HA (Heteroduplex Analysis), TGCE (Temperature Gradient Capillary Electrophoresis), DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) ve HRM (High Resolution Melting) örnek verilebilir. DNA dizisindeki spesifik değişiklikleri saptayan direkt mutasyon analiz yöntemlerine ise RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), ASA (Allele Specific Amplification), Primer Uzaması (Primer Extension, SNaPshot) ve DNA Dizi Analizi (DNA Sequencing) örnek verilebilir.

Bu çalışmada indirekt mutasyon analiz tekniklerine eş zamanlı PCR cihazlarının geliştirilmesi ile eklenen yüksek çözünürlüklü erime analizinin, nokta mutasyonlarının saptanmasında işlevlik, hassasiyet, güvenilirlik ve tekrarlanabilirlik kriterinin DHPLC ile kıyaslanarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla Ailesel Akdeniz Ateşine (Familial Mediterranean Fever, FMF) neden olduğu saptanmış MEFV genindeki mutasyonlarla, tromboz ile ilişkilendirilmiş olan Protrombin (Faktör II) ve Faktör V genlerindeki mutasyonlar HRM ve DHPLC teknikleri ile incelenerek anılan yöntemler işlerlik, hassasiyet ve güvenilirlik (yanlış pozitif/yanlış negatif) bakımından karşılaştırılmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Mutasyon ve Genetik Hastalıklar

Mutasyonlar; tek bir bazın değişimi, bir veya birden çok bazın delesyonu veya insersiyonu şeklinde olabileceği gibi kromozom yapısındaki büyük değişimler (duplikasyon, insersiyon, inversiyon, translokasyon vb.) şeklinde de olabilir. Mutasyon tipleri ve etkileri çeşitlilik gösterdiği için mutasyonları değişik şekillerde sınıflandırmak mümkündür. Mutasyonlar hem somatik hücrelerde hem de eşey hücrelerinde oluşabilmektedir. Eşey hücrelerindeki mutasyonlar genetik çeşitliliğin, evrimin ve genetik hastalıkların temelini oluşturmaktadır. Somatik hücrelerde meydana gelen mutasyonlar ise lokalize hücre ölümlerine, hücreSEL fonksiyon değişimlerine ve tümörlere neden olabilmektedir (Klug, Cummings et al. 2006).

2.2. Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF)

FMF, tekrarlayan kısa süreli ateş ile birlikte karın, göğüs ve eklem ağrıları, eritem benzeri deri lezyonları ile karakterizedir (Eldad Ben-Chetrit 1998). Hastalar ateş ve ağrı atakları geçirirler. Atakların süresi ve tipi mutasyon, etnik köken ve kolęisin kullanımına olduğu kadar yaşa ve cinsiyete göre de farklılık göstermektedir. Vücutta amiloid birikimi en önemli komplikasyondur (Livhen A 1997) (Akar N 1999).

Yaygın olarak ölkemizi içine alan kuşakta gözlenir. Türklerde, Ermenilerde, Arap ve Yahudilerde görölme sıklığı diğer toplumlara oranla daha fazladır (Gershoni-Baruch R 2001). Çalışmalar toplumumuz için hastalık taşıyıcılığı oranını %20 olarak göstermektedir.

2.2.1. Ailesel Akdeniz Ateşi ile İlişkilendirilen Gen Mutasyonları

Ailesel Akdeniz ateşine neden olan MEFV geni 1997 yılında klonlanmıştır (Consortium 1997). MEFV geni 16. kromozomun kısa kolunda (16.p13.3) lokalizedir (şekil 2.1.) ve 781 aminoasitli pirin proteinini kodlamaktadır. Pirin proteininin FMF atakları sırasında inflamasyon bölgesinde nötrofillerin aktivitesi ve inflamasyonun inhibe edilmesinde rol aldığı belirtilmektedir. Pirin apoptozis ve inflamasyonun regölasyonundan sorumlu olan proteinler grubunda yer almaktadır (Lidar and Livneh 2007). On ekzondan oluşan gende bugüne dek hastalıkla ilişkilendirilmiş 30 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Bu kapsamda en sık görölenler M680I, M694V, V726A ve E148Q mutasyonlarıdır (Akar N 2000). Türk

populasyonunda yapılan çalışmalarda M694V %51, M680I %14, V726A mutasyonu ise %9 oranında saptanmıştır (Bakkaloğlu 2003).



şekil 2.1. MEFV geninin lokalizasyonu (<http://www.genecards.org>)

2.3. Tromboz

Bir arterde veya vende damarın bir kısmını ya da tümünü tıkayacak şekilde meydana gelen istenmeyen pıhtılara tromboz denir. Tromboz oluşum yerine göre arteriyel ve venöz tromboz olmak üzere ikiye ayrılır. Tromboz multifaktöriyel bir hastalıktır (Bengt Zöller, Frutos et al. 1999).

2.3.1. Tromboz Nedenleri

2.3.1.1. Edinsel tromboz nedenleri

Arteriyel Tromboz Nedenleri

- İleri yaş
- Ateroskleroz
- Sigara kullanımı
- Hipertansiyon
- Diabetes mellitus
- Antifosfolipid Sendromu
- Oral kontraseptif kullanımı

Venöz Tromboz Nedenleri

- İleri yaş
- Travma
- İmmobilizasyon

- x Gebelik
- x Malignite

2.3.1.2. Kalıtsal tromboz nedenleri

a) Antitrombin III (AT III) eksikliği

Antitrombin koagülasyon sistemindeki birçok enzimi inaktive eden bir glikoproteindir (<http://tr.wikipedia.org>). Tromboz hastalarında gösterilen ilk genetik bozukluk olan antitrombin eksikliği venöz tromboz hastalarında %1-2'sinde görülen nadir genetik defektlerden biridir (Egeberg 1965).

b) Protein C eksikliği, Protein S eksikliği

Protein C karaciğerde hepatositler tarafından üretilen bir serin proteaz olup dolaylı olarak inaktif formda bulunur. Protein C aktivasyonunda oluşan trombin endotel yüzey proteini trombomodulinle (TM) birleşerek antikoagulan yapıları olan bir kompleks oluşturur. Oluşan bu kompleks protein C'yi aktif forma dönüştürür (Chak, Wallace et al. 2001). Protein S, protein C'nin FVa ve FVIIIa'ya inaktivasyonunda kofaktör rolü oynayan bir plazma glikoproteindir. Protein C ve Protein S eksikliklerinin tanımlanması ailesel tromboz hastalarında %5-10'nunda genetik nedenleri düşündürmektedir (Rosendaal 1999).

c) FVIII (Antihemofilik faktör) yüksekliği

Önemli tromboz faktörlerinden biri olan FVIII'in plazmadaki düzeyi pek çok genetik faktörden kontrol edilmekte ve edinsel olarak artabilmektedir. Venöz tromboz hastalarında sağlıklı kişilerle karşılaştırıldığında FVIII düzeyinin yüksek olduğu görülmektedir (Koster T 1995).

d) Protrombin (Factor II - F2) 20210 G>A mutasyonu

Protrombin karaciğerde sentezlenen plazma proteinlerinden biridir. Faktör II geninde tanımlanan 20210. pozisyondaki guanin'nin adenin'e değişim mutasyonu venöz tromboz için en yaygın ikinci risk faktörüdür (Poort SR 1996). Mutasyon genin 3'UTR (untranslated region) bölgesinde olduğu için protrombin molekülünün aminoasit dizisinde herhangi bir değişikliğe neden olmamaktadır. Mutasyon plazma protrombin düzeyini artırır ve tromboz eğilimine neden olur. Yapılan klinik çalışmalar gendeki mevcut mutasyonun venöz tromboz riskini üç kat arttırdığını göstermiştir (Rosendaal FR 1998). Toplumumuzda mutasyonun görülme sıklığı %2,7 olarak belirtilmektedir (Akar et al. 1998).

2.4. Mutasyon Tarama Yöntemleri

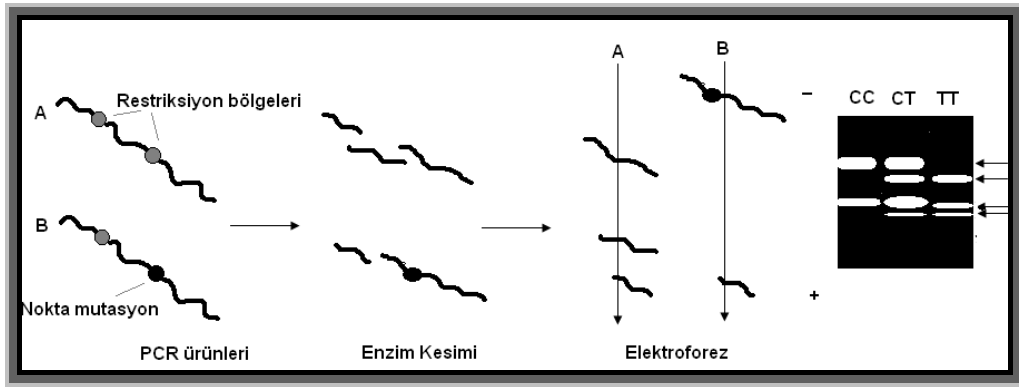
2.4.1. Direkt Mutasyon Tarama Yöntemleri

2.4.1.1. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm analizi restriksiyon endonükleazların çift zincirli DNA'yı spesifik tanıma bölgelerinden kesmesi temeline dayanmaktadır. Her bir restriksiyon endonükleaz spesifik palindromik kısa DNA dizisini tanır ve keser. Mutasyon tarama amacıyla yapılan RFLP analizlerinde, incelenen mutasyon noktasını içine alan kesim noktasına sahip restriksiyon enzimleri ile kesilen PCR fragmentleri jel elektroforezi ile fragment büyüklüklerine göre ayrılırlar (Pourzand and Cerutti 1993). DNA dizisinde meydana gelen substitusyon, delesyon, insersiyon gibi değişimler var olan restriksiyon enzim kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir enzim kesim noktası oluşturabilir. Böylece kesim sonucu oluşan fragment sayısını değiştirirler. Kesim sonucu oluşan bantlar agaroz jelde yürütüldüğü zaman elde edilen bant profiline bakılarak mutasyon taşıyıp taşımadığı söylenebilmektedir (Dahlback B. 1993). RFLP yalnızca mutasyon analizlerinde değil bağlantı analizlerinde de kullanılmıştır.

Genomda kodlama yapan ve yapmayan bölgelerde restriksiyon enzim tanıma bölgelerinin dağılımı insanlar arasında farklıdır. Bu farklılıklar doğal genomik çeşitliliği yansıtır ve genellikle fenotipik bir sonucu olmayan RFLP'leri oluşturur. Genetik hastalıkla ilişkilendirilen aday gendeki RFLP'ler, etkilenmiş bireyler ve kontroller arasındaki allel

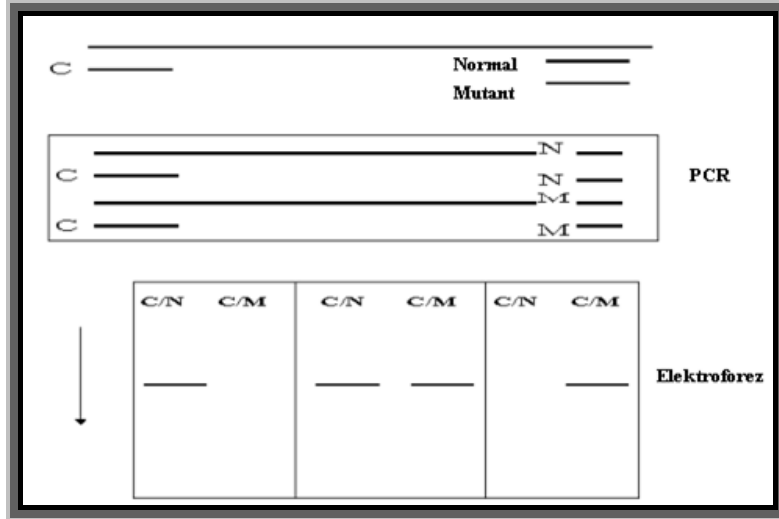
frekansları dikkate alınarak ilgili mutasyon ve genin hastalıkla ilişkisini ortaya koymada oldukça kullanışlı bilgi vermektedir (tip.kou.edu.tr/docs/tibbi_biyoloji/laboratuvarII.doc). Mikrosatellitlere göre daha düşük olan polimorfizmleri ve TNP'lere (tekli nükleotid polimorfizmi) göre çok daha düşük olan rezolüsyonları gereği RFLP günümüzde daha çok mutasyon taramalarında tercih edilen bir yöntem olarak karşımıza çıkmaktadır. RFLP uygulaması kolay bir yöntem olmakla birlikte ayırım gücü çok yüksek değildir. Her mutasyon RE kesim noktası oluşturmayacağı veya yok etmeyeceği için tüm mutasyonların bu teknikle belirlenmesi mümkün değildir.



Şekil 2.3. Restriksiyon kesimi ve jel görüntüsü
(tip.kou.edu.tr/docs/tibbi_biyoloji/laboratuvarII.doc)

2.4.1.2. ASA (Allele Specific Amplification-ARMS-Amplification Refractory Mutation System)

Nokta mutasyonlarının saptanması için geliştirilen bir tekniktir. Tasarlanan PCR primerlerinden birinin 3' nükleotidinin mutasyona özgün olması esasına dayanır. Değişen nükleotide uygun olarak tasarlanan primerlerin 3' ucundaki nükleotid birinde mutant diğerinde yabancı tip allele özgüdür. Allel spesifik amplifikasyon yönteminde 3 adet primer tasarlanır. Bu primerlerden biri ortak amplifikasyon primeri iken diğeri yukarıda anlatıldığı üzere 3' nükleotidi mutasyon noktasına özgün mutant ya da yabancı tip primerdir. Bir örneğin ilgilenilen mutasyon için analizi iki ayrı PCR yapılmasını gerektirir. (1.ortak primer + yabancı tip primer; 2. Ortak primer + mutant primer). 3' uçtaki nükleotid mutant ya da yabancı tipteki baz diziliminden hangisine uyumluysa onun amplifikasyonu gerçekleşecek ve böylece nokta mutasyonlarının tespiti mümkün olacaktır (Takeda 1993). Primerin 3' ucundaki tek uyumsuz bazın PCR'ı engellemesi optimizasyonu zorlaştırır. PCR'ın iyi bir şekilde optimize edilmesi gerekir.



Şekil 2.4. ASA aşamaları

2.4.1.3. Primer Uzaması (Primer Extension, SNaPshot)

Tekli nükleotid polimorfizmlerini (SNP) ve nokta mutasyonlarını belirlemede kullanılan bir yöntemdir. Tek bazlık dizi analiz reaksiyonu olarak tanımlanabilir. Tasarlanan primer mutasyon olan bazın bir öncesine denk gelecek şekilde sentezlenir. Farklı boyutlarda primer tasarlanması ile (20, 30, 40 bp) bir reaksiyonda birden fazla tekli nükleotid polimorfizminin tanımlanmasına imkan tanır. Enzim, tampon çözelti, primer ve dört adet farklı floresan boya ile işaretlenmiş ddNTP ile reaksiyon kurulur. Reaksiyon boyunca kalıp DNA'daki bazın eşleniği olan baz eklenir pikin rengine göre hangi örneğin hangi allel olduğu belirlenir. Bu teknik kapiller elektroforez sistemine dayalı otomatik genetik analiz cihazlarına (DNA dizi analizi sistemleri) ihtiyaç gösterir.



Reaksiyon karışımı (enzim, tampon)	İşaretili ddNTP ddATP ddCTP ddGTP ddTTP
A alleli için uzama ürünü	→ ddT
G alleli için uzama ürünü	→ ddC
Heterozigot P: Primer A:A alleli için pik G:G alleli için pik	

Şekil 2.5. Primer uzaması yöntemiyle mutasyonun gösterilmesi (<http://nar.oxfordjournals.org>)

2.4.1.4. DNA Dizi Analizi

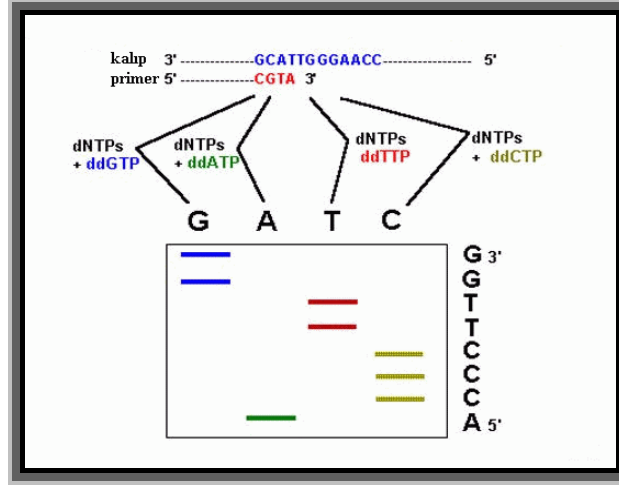
1970'lerde dizi analizi için geliştirilen yöntemlerden biri olan Allan Maxam ve Walter Gilbert'in kimyasal yöntemi DNA'nın belirli bazlardan kırılması esasına dayanmaktadır. Bu yöntemde, çift zincirli DNA tek zincirli hale getirilir. Dizisi saptanacak olan zincir 5' ucundan, polinükleotid kinaz enzimi kullanılarak elektroforez sonrası DNA fragmentinin tanınmasını sağlayan radyoaktif ³²P ile işaretlenir. Sonrasında ise dört ayrı tüpteki DNA örneğine zincirin belirli nükleotidlerden kırılmasını sağlayan kısa süreli bir kimyasal reaksiyon uygulanır. Farklı pozisyondaki hedef nükleotidlerden kırılmış 5' ucu işaretli değişik uzunlukta moleküller elde edilir. Elektroforezde yürütülen moleküller elektriksel alanın etkisiyle en kısa olan parçacık en önde olacak şekilde hareket eder. Elektroforez sonrasında otoradyografi uygulanarak görüntülenen bantlar aşağıdan yukarıya okunur ve baz dizisi belirlenmiş olur.

Fred Sanger'in geliştirdiği ve günümüzde halen kullanılmakta olan enzimatik yöntemde ise belirli bir bazda sonlanan DNA sentezi gerçekleştirilmektedir. Dideoksi zincir sonlanma reaksiyonunda kalıp DNA, DNA polimeraz, deoksinükleotid trifosfat ve dideoksinükleotid trifosfatların varlığında dizi analiz reaksiyonu gerçekleşir. Reaksiyon her bir dideoksinükleotid trifosfatın zincire katıldığı noktada sonlanır. İlk nesil Sanger reaksiyonu radyoaktif işaretlemeyi kullandığı, PCR'ın dolayısıyla döngüsel sekanslamamanın nimetlerinden faydalanamadığı için uzun zaman ve iş gücü gerektirmesi nedeniyle geniş ölçekli DNA dizileme çalışmalarında kullanımı mümkün olmamıştır.

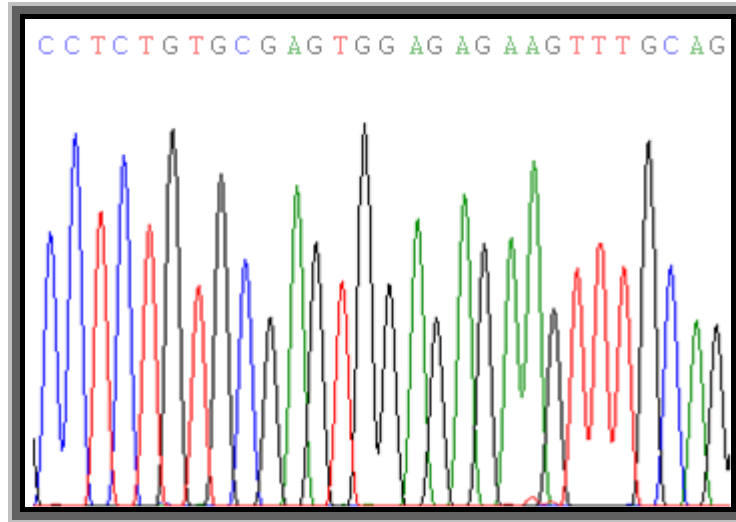
Otomatik DNA dizi analiz sistemlerinin ve PCR temelli döngüsel sekanslama reaksiyonunun geliştirilmesi ile sekans analizlerinin hızında ciddi bir ivme oluşmuştur. Analiz için önce farklı renkte floresan boyayla işaretlenmiş olan dört farklı ddNTP (dideoksinükleotid trifosfat), dört farklı dNTP (deoksinükleotid trifosfat), hedef bölgeye özgül primer ve DNA polimeraz kullanılarak reaksiyon kurulur (Klug, Cummings et al. 2006). Reaksiyon ürünü lazer dedektörüne sahip bir kapiller elektroforez sisteminde yürütülerek analiz edilir.

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, sabit bilgisayarda yüklü programlar ve bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jel matriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan

floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir dedektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir (Sambrook J 1989).



Şekil 2.6. DNA dizi analizi prosesi (www.med.unibs.it/~marchesi/pcr.gif)



Şekil 2.7. Dizi analizi sonucunda elde edilen elektroferogram (<http://www.sars.no/facilities/sequencing.php>)

2.4.2. İndirekt Mutasyon Tarama Yöntemleri

İlgilenilen fragmentte bulunan olası nükleotid değişimlerinin PCR fragmentinin konformasyonuna olabilecek etkilerinin tespitine yönelik yöntemlerdir.

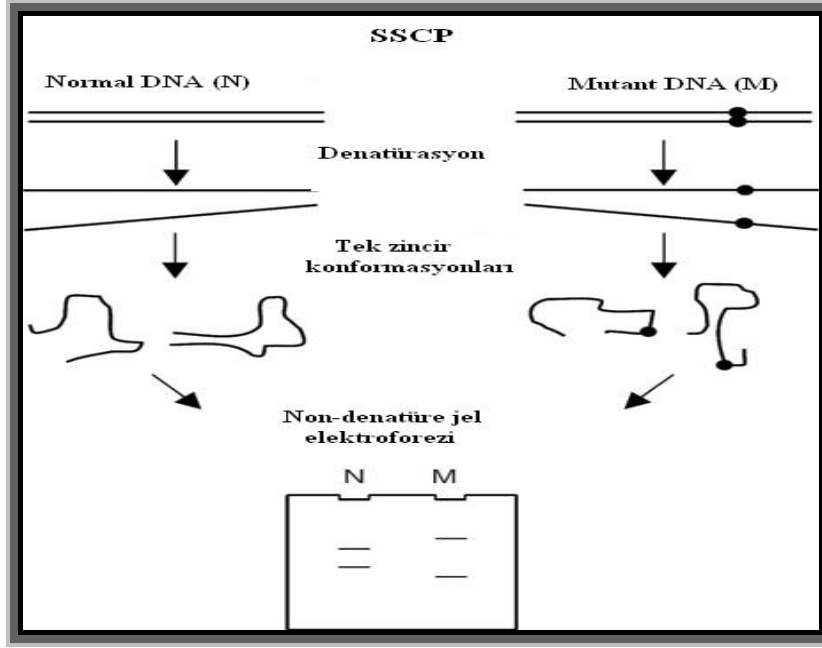
2.4.2.1. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism)

Tek zincir konformasyon polimorfizmi; ilgilenilen fragmentin PCR ile amplifikasyonunu, çift zincirli PCR ürününün sıcaklık ve formamidle denatürasyonunu ve denatüre olmayan (nativ) poliakrilamid jel elektroforezini içermektedir. Elektroforez süresince tek zincirli DNA baz dizisine bağlı olarak belirli bir konformasyon almaktadır (Nataraj, Olivos-Glander et al. 1999).

Bir baz değişimi tek zincirli DNA'nın ikincil yapısında değişikliğe neden olur ve nondenatüre koşullar altında elektroforetik hareketini değiştirir (Tawata, Aida et al. 2000). Elektroforez sonrası baz dizisi farklı olan DNA normal DNA'ya göre bant kayması gösterir.

Mutasyonu saptama oranı 200 baz çiftinden küçük fragmentlerde %90 iken daha büyük fragmentlerde DNA dizisine bağlı olarak bu oran düşmektedir. Tek zincir konformasyon analizi kolayca uygulanabilen, ekonomik ve hızlı bir yöntemdir. Onkogenlerdeki, tümör supressör genlerdeki ve genetik hastalıklardan sorumlu genlerdeki mutasyonların belirlenmesinde kullanılmıştır (Tomita and Oto 2004).

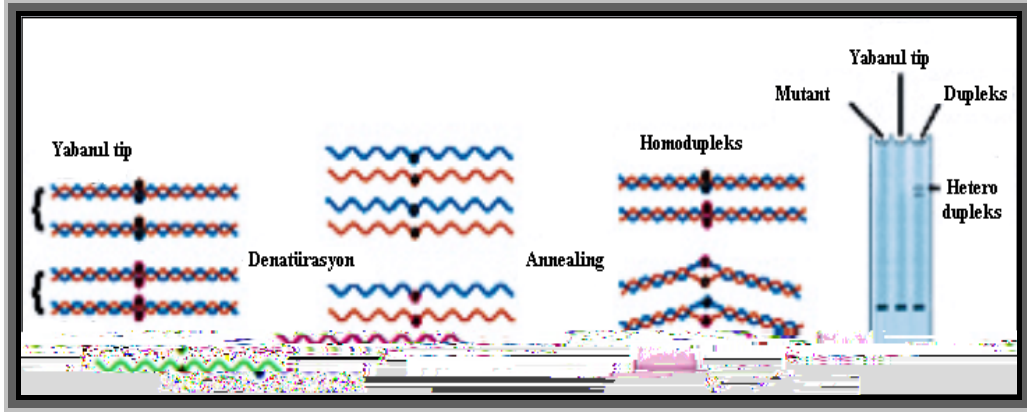
Teknik poliakrilamid jel elektroforezinde radyoaktif saptama veya gümüş boyama ile gerçekleştirilebileceği gibi kapiller elektroforezde floresan görüntüleme ile de gerçekleştirilebilir.



Şekil 2.8. SSCP prosesi (www.nature.com)

2.4.2.2. Heterodupleks Analizi (Heteroduplex Analysis - HA)

Komplementer zincirindeki eşlenik bazı hatalı olan bir dupleks DNA'nın nativ jeldeki konformasyonu prensibine dayanır. Yanlış eşleşmiş DNA dupleksi ya da heterodupleksi homoduplekse göre değişmiş bir elektroforetik mobiliteye sahiptir. Yanlış eşleşme elektroforez boyunca DNA'nın hareketini yavaşlatmaktadır. DNA örneği belirli bir allel için heterozigot değilse heterodupleks analizi öncesinde mutant allel yabancı tip allel ile karıştırılarak heterodupleks form oluşturulmalıdır. Tümör biyopsisi gibi heterojen DNA örneklerinde hem yabancı tip hem de mutant allel PCR ile amplifiye edilerek post-PCR bağlanma aşamasıyla heterodupleks form oluşturulur (Nataraj, Olivos-Glander et al. 1999). Teknik delesyon, insersiyon tipi mutasyonların tespitinde % 100'e varan başarı gösterirken nokta mutasyonlarının tespitinde hassasiyeti %80-85 olarak bildirilmiştir (Kozlowski, Olejniczak et al. 2005).

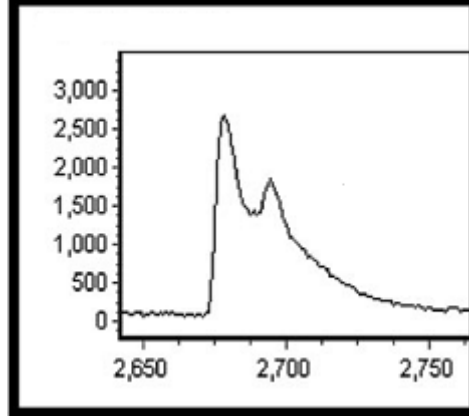


Şekil 2.9. Heterodupleks analizi (<http://nationaldiagnostics.com>)

2.4.2.3. TGCE (Temperature Gradient Capillary Electrophoresis)

Sıcaklıkla birlikte DNA'nın yapısında meydana gelen değişimin DNA'nın jel üzerindeki hareketine olan etkisinin incelenmesi temeline dayanmaktadır. Başlangıçta çift zincirli olan DNA belirli bir sıcaklıkta denatüre olmaya başlar ve konformasyonu değişir. Bu değişim çift zincirli DNA'ya nispeten hareketinin yavaşlamasına neden olur. Az miktarda DNA örneği kullanılarak kısa sürede gerçekleştirilen yüksek işlem hacimli, hassas bir tekniktir (Li Q 2002).

Sıcaklık gradient kapiller elektroforez tekniği heteroduplekslerin homodupleks DNA moleküllerinden ayrılmasında, tekli nükleotid polimorfizmlerinin, küçük insersiyon-delesyonların ve basit dizi tekrarlarının tespitinde kullanılabilir (Hsia AP 2005). Teknik bu amaçla geliştirilmiş kapiller elektroforez sistemlerinin kullanımını gerektirir. Mutasyon saptamadaki hassasiyetinin DHPLC'ye yakın olduğu ifade edilmektedir.



Şekil 2.10. Heterodupleks örneğe ait kromatogram (Willie Girald-Rosa 2005)

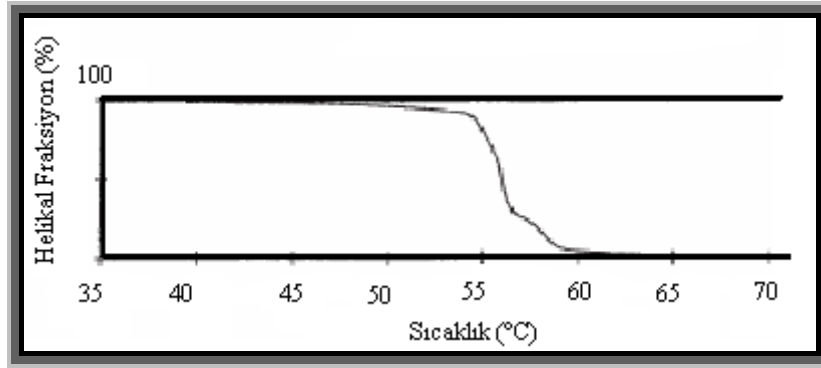
2.4.2.4. DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography)

Denatüre edici yüksek performans sıvı kromatografisi belirli sıcaklık koşullarında heterodupleks DNA'ların homodupleks DNA'lardan ayrılması esasına dayanan analiz yöntemlerinden biridir (Oefner 2001). DHPLC için üretilmiş olan sistem durağan ve mobil olmak üzere iki fazdan oluşmaktadır. Durağan faz, alkile edilmiş nonporöz polistirendivinil benzen ile paketlenmiş DNA seperasyon kolonununun içerir. Mobil faz ise asetonitril (ACN)-organik solvent ve DNA'nın durağan faz ile etkileşimini sağlayan trietilamonyum asetat'tan (TEAA) oluşur. Alkali durağan faz elektriksel olarak nötral ve hidrofobiktir. DNA yapısındaki fosfat gruplarından dolayı negatif yüklü olduğu için kendiliğinden kolona adsorbe olamaz. TEAA'daki pozitif yüklü amonyum iyonları DNA'daki fosfat gruplarıyla, TEAA molekülündeki alkil zincirleri ise kolonun hidrofobik yüzeyiyle etkileşime girer. Böylece DNA kolona tutunmuş olur. Artan konsantrasyondaki organik solvent ve asetonitril ile birlikte DNA kolondan elüe olur. Asetonitril alkil zincirleri ile durağan faz arasındaki hidrofobik etkileşimi indirgemektedir. DNA fragmentlerinin elüsyonu 254 nm'deki UV absorbansı ile belirlenmektedir.

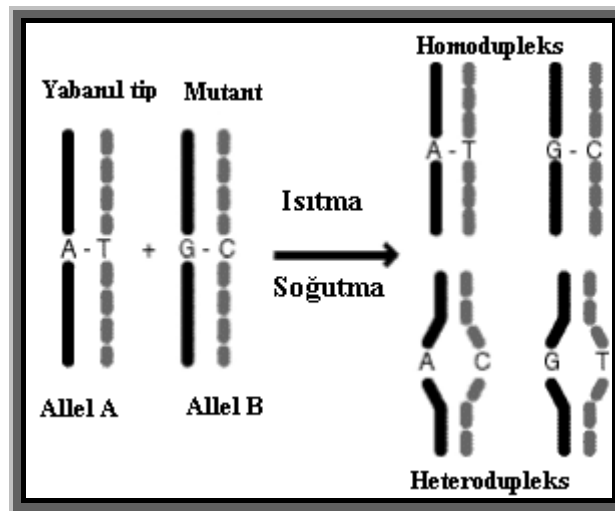
Çift zincirli DNA'nın kolonda kalma süresi (retention time) kolon sıcaklığına bağlı olarak değişir. 50°C'nin altındaki sıcaklıklarda kolondan elüe olma dsDNA'nın uzunluğuna bağlıyken bu değer üstündeki sıcaklıklarda DNA'nın baz içeriğine bağlıdır. Belirlenmiş kolon sıcaklıklarında sistemden önce heterodupleksler daha sonra homodupleksler elüe olmaktadır. Heterodupleks form tam eşlenik olmayan DNA ipliklerinin eşleşmesi sonucu oluştuğu için bağlanma gevşektir. Heterodupleksler termal olarak homoduplekslerden daha kararsızdır bu yüzden erime ısıları daha düşüktür (Theru A. Sivakumaran 2003).

Başarılı bir mutasyon taraması için DHPLC analizinden önce yabancı tip allel ile mutant allele ait PCR ürünleri 1:1 oranında karıştırılarak denatürasyon-renatürasyon protokolü uygulanır. Böylece hem homodupleks hem de heterodupleks form oluşur.

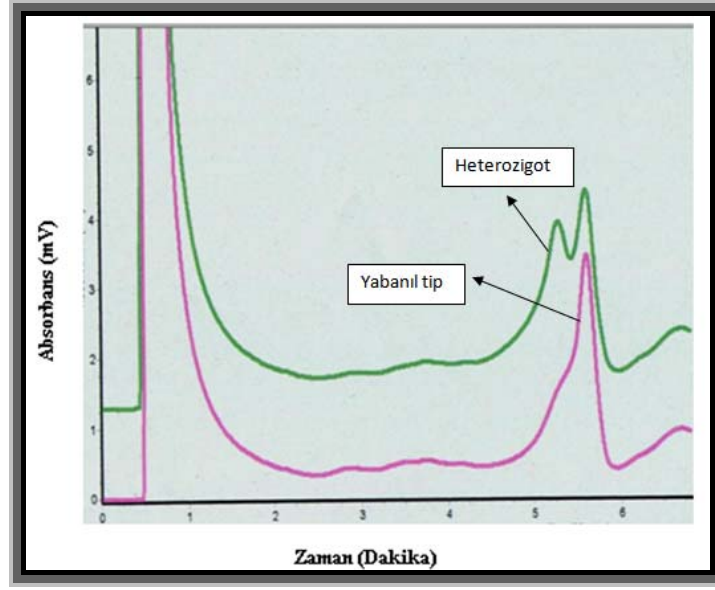
Mutasyon saptanmasında DHPLC'nin hassasiyetini etkileyen en önemli parametre sıcaklıktır (Wenzhong Xiao 2001). Her bir DNA fragmenti farklı bir baz kompozisyonuna sahip olduğu için fragmentin erimesi birkaç farklı sıcaklık gerektirebilir. Örnekler cihaza yüklenmeden önce melting domain analizi yapılarak örneklerin hangi sıcaklıklarda yürütülmesi gerektiği belirlenir. DHPLC'nin mutasyonları belirlemedeki hassasiyet ve özgüllüğünün oldukça yüksek olduğu yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (<http://insertion.stanford.edu/pub.html>).



Şekil 2.11. DHPLC erime eğrisi
(http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_dhplc.pdf)



Şekil 2.12. Heterodupleks form oluşumu (M. Roxane Bonner 1999)



Şekil 2.13. DHPLC analizine ait kromatogram
(http://www.ao-careggi.toscana.it/citogenetica/Genetica%20Molecolare_it.htm)

2.4.2.5. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi (High Resolution Melting – HRM)

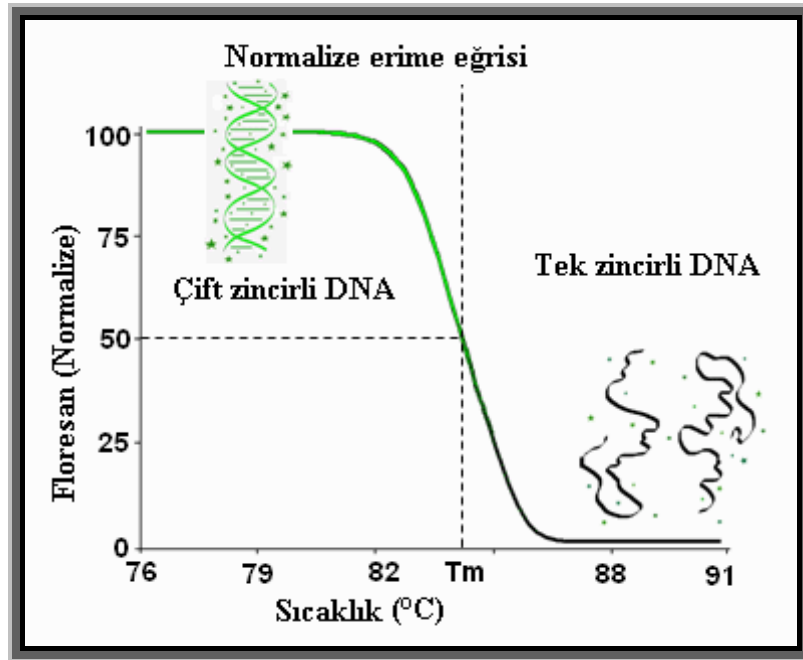
Real-time PCR (eş zamanlı PCR) başlangıç miktarına göre oluşan son PCR ürününün kantifikasyonu için kullanılan özgün, hassas ve kolay bir yöntemdir. Reaksiyon karışımında kullanılan floresan özellikteki boyalar ya da propların oluşturdukları sinyaller sayesinde çift zincirli DNA oluşumu eş zamanlı olarak görülmektedir. Yüksek çözünürlüklü erime tekniği de real-time PCR'ın kullanıma girmesiyle 1997'de geliştirilen bir yöntemdir (Ririe KM 1997).

Yüksek çözünürlüklü erime analizinde öncelikle çift zincirli DNA'ya bağlanma özelliği olan floresan boya varlığında hedef DNA bölgesi özgül primerler kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Kullanılan floresan boya sadece çift zincirli DNA'ya bağlanarak ışığa vermekte tek zincirli DNA ile etkileşim göstermemektedir. Floresan özellikteki boya ile hem amplifikasyon sırasında DNA konsantrasyonundaki artış hem de HRM analiziyle DNA'nın erimesi görüntülenmektedir. Amplifikasyon basamağından sonra gerçekleşen erime analizinde başlangıçta floresan ışığa yüksektir. Sıcaklığın artmasıyla çift zincirli DNA'ya satüre olmuş floresan boya ortamdaki solüsyona geçeceği için floresan şiddetinde azalma görülecektir. Belirli DNA örneği için gözlenen erime profili karakteristiktir.

Bir PCR ürününün termal stabilitesi baz dizisi tarafından belirlenir. PCR ürünlerinin erime sıcaklığı GC içeriğine, diziye ve amplicon uzunluğuna bağlı olarak değişmektedir (Ririe 1997). PCR ürününün dizisinde herhangi bir değişiklik olduğu zaman dupleks kararlılığı da değişir. Bu da farklı bir erime davranışına neden olur. Homozigot DNA örneğindeki değişiklik genellikle erime sıcaklığında (T_m) bir değişim olarak gözlenirken heterozigot DNA örneklerindeki değişimler ise erime eğrilerinde farklı bir profil oluşturarak kendini gösterir (Palais 2005).

Heterozigot DNA örneklerinde PCR sonrasında iki homodupleks ve iki heterodupleks olmak üzere dört farklı dupleks oluşmaktadır. Bununla birlikte yabancı tip veya homozigot mutant DNA örnekleri ise tek bir homodupleks içermektedir. Her dupleks kendine özgü bir erime davranışı göstermektedir. HRM analiziyle bu erime eğrisi sıcaklığa bağlı floresan şiddetindeki değişim grafiği şeklinde oluşturulmaktadır (Montgomery, Wittwer et al. 2007).

Homozigot DNA örnekleri keskin ve simetrik erime eğrileri oluştururken, heterozigot örnekler homodupleks ve heteroduplekslerin varlığına bağlı olarak kademeli ve kompleks eğriler oluştururlar (Wittwer, Reed et al. 2003).



Şekil 2.14. Erime eğrisi (<http://www.path.utah.edu/news/hi-res-dna-melting-analysis>)

Yüksek çözünürlüklü erime analizi birçok uygulamada kullanılabilir.

- Aday yatkınlık genlerinin tanımlanmasında
- Assosiyasyon çalışmalarında (Kontrol ve hastaların karşılaştırılması)
- Populasyon veya alt grupta allel yaygınlığının belirlenmesinde
- Heterozigotluk kaybının taranmasında
- DNA parmakizi analizlerinde
- DNA haritalamada
- Haplotip bloklarının karakterizasyonunda
- Tür tanımlanmasında
- DNA metilasyon analizlerinde
- HLA tiplerede
- Mutasyon taramada
- Somatik mutasyonların oranlarının belirlenmesinde

Yüksek çözünürlüklü erime analizi maliyet açısından ucuz, kolay uygulanabilen, yüksek işlem hacimli bir tekniktir. PCR sonrasında ek bir işleme gerek olmadığı için kapalı tüp sistemi olarak adlandırılmaktadır. HRM'nin kapalı tüp sistemi olması onu SSCP, HA, DHPLC, TGCE gibi gen tarama metodlarından ayırmaktadır. Bu metodlarda PCR ürünlerinin jel veya matris sisteminde ayrılması ve heteroduplekslerin belirlenmesi gerekmektedir. Buna karşın kapalı tüp sistemlerinde PCR sonrası oluşabilecek kontaminasyonun engellenmiş olmasıyla birlikte, analiz süresi de diğer sistemlere göre önemli ölçüde azalmaktadır (Montgomery, Wittwer et al. 2007). PCR sonrası erime eğrilerinin elde edilmesi ve analiz ~ 2 dakikada yapılmaktadır (Liew, Pryor et al. 2004).

Önceki DNA erime analizlerinin uzantısı niteliğinde olan yüksek çözünürlüklü erime analizi diğer metodlardan daha yüksek optik ve termal duyarlılıkta floresan sinyalleri toplayarak yeni uygulama olanakları oluşturmaktadır (Corbett 2006).Yapılan araştırmalar ve yayınlar HRM analizinin diğer mevcut ön tarama teknikleriyle karşılaştırıldığında mutasyon taramada hassas bir yöntem olduğunu vurgulamaktadır (Reed and Wittwer 2004).

2.4.2.5.1. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi'nin Gücü

Yüksek çözünürlüklü erime analizinin gücü;

- Cihazın çözünürlüğüne (Herrmann and Voelkerding 2006)
- Çift zincire bağlanan floresan özellikteki DNA boyasına (Wittwer, Reed et al. 2003)
- PCR ürününün saflığına bağlıdır (Montgomery, Wittwer et al. 2007).

Yüksek çözünürlüklü erime cihazlarının ve çift zincirli DNA'ya bağlanan yeni jenerasyon boyaların geliştirilmesi HRM analizinin yüksek işlem hacimli ve kullanışlı bir mutasyon tarama tekniği olarak tanımlanmasını mümkün kılmıştır. HRM analizi için geliştirilen mevcut sistemler ve floresan boyalar çeşitli çalışmalarla kıyaslanmıştır (Herrmann and Voelkerding 2006). HRM analizinde kullanılan 3. jenerasyon floresan boyalardan bazıları:

- LC Green (Idaho Technologies, Salt Lake City UT)
- Eva Green (Bioticum Inc, Hayward, CA)
- SYTO 9 (Invitrogen Corp. Calrsbad, CA)

Mevcut boyalar amplifikasyon reaksiyonunda düşük düzeyde inhibisyona neden olurlar. Çift zincirli DNA'ya saturasyonun fazla olması amacıyla yüksek konsantrasyonlarda kullanılabilirler.

2.4.2.5.2. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi'ni Etkileyen Faktörler

1. Analiz edilecek DNA fragmentlerinin büyüklüğü

Örneğin; tez bir bazın değişimi 100 bp büyüklüğündeki bir ampikonun erime eğrisini 500 bp büyüklüğündeki bir ampikonun erime eğrisinden daha fazla etkileyecektir. PCR ürününün 200 bp'den az olması optimal sonuçlar almak için oldukça uygundur. 400 bp'den daha küçük ürünlerde ise yüksek doğrulukta sonuç elde edilir. 1000 bp büyüklüğündeki PCR ürünlerinde genotipleme ve tarama mümkündür (Jesse Montgomery 2007).

2. Saf PCR ürününün elde edilmesi

PCR sırasında primer-dimer veya non-spesifik bantların oluşumu erime analizi sonrası sonuçların yorumlarını zorlaştırmaktadır (Corbett 2006). Bu nedenle PCR optimizasyonu yapılarak spesifik PCR ürünü elde edilmesine özen gösterilmelidir. Aynı şekilde primer çiftlerinin dimer oluşturmamasına dikkat edilmelidir.

3. DNA örnekleri arasındaki homojenlik

Kalıp olarak kullanılacak DNA örneklerinin aynı koşullarda izole edilmesi gerekmektedir. DNA izolasyonu fenol-kloroform yöntemiyle veya kitle yapılabilir. DNA örneklerinin konsantrasyonları ve çözüldükleri tamponun da aynı olması gerekmektedir. Aksi halde farklılıklar erime profilini etkileyecektir.

2.4.2.5.3. DNA denatürasyonu

DNA çift zincirinin birbirinden tamamen ayrılmasına denatürasyon denir. Çift zincirli DNA fiziksel ya da kimyasal yolla hidrojen bağlarının kırılmasıyla denatüre olmaktadır (Alberts B. 2002). 260 nm’de tek zincirli DNA’nın UV absorpsiyonu çift zincirli DNA’dan fazladır. Bu artış “Hiperkromik kayma” olarak adlandırılır. Isı sonucu oluşan denatürasyon “erime” (melting) olarak da adlandırılabilir. G=C baz çifti, A=T’den daha fazla hidrojen bağı içerdiği için ısıya karşı daha dayanıklıdır. DNA’nın 260 nm’deki sıcaklığa bağlı absorpsiyonu (OD₂₆₀) grafiğe geçirilirse erime profili elde edilir. Bu erime eğrisinin orta noktasına “erime sıcaklığı” (T_m) denir. Erime sıcaklığı DNA’nın %50’sinin birbirinden ayrılması için gerekli olan sıcaklık derecesini ifade etmektedir (Klug, Cummings et al. 2006).

2.4.2.5.4. Yüksek Çözünürlüklü Erime Analizi Kullanılarak Yapılan Çalışmalar

HRM analizi ile bugüne dek yapılmış olan birçok araştırma bulunmaktadır. Bunlardan bazılarından bahsetmek tekniğin hassasiyetini vurgulama çerçevesinde önemlidir. BRCA1 geninde 185delAG (2.ekzon), 5382insC (20.ekzon), 5331G>A (20.ekzon) ve BRCA2 geninde 6174delT mutasyonları taranmış ve %100 hassasiyetle tüm mutasyonların saptandığı gösterilmiştir (Takano, Mitchell et al. 2008).

RET protoonkogeninde (ekzon 10,11,13,14,15,16) yapılan çalışmayla tüm dizi varyasyonlarının homozigot yabancı tip örneklerden %100 doğrulukta ayrıldığı gösterilmiştir. Heterozigot örneklerin ayrımının yanında bazı dizi varyasyonlarının da birbirinden ayrılmasının mümkün olduğu söylenmiştir (Margraf, Mao et al. 2006).

FGFR3 geninde 1138G>A mutasyonunun genotiplemesi 40 hastada çalışılmış ve tümünde mutasyonun varlığı gösterilmiş bu doğrultuda HRM analizinin hızlı, kolay ve hassas bir yöntem olduğu vurgulanmıştır (Hung, Lee et al. 2008).

HRM analizi F5, F2, MTHFR varyantlarının belirlenmesinde (Seipp, Pattison et al. 2008). Faktör VIII genindeki tek baz çiftlik substitusyon mutasyonlarının (Laurie, Smith et al. 2007), c-KIT, BRAF (Willmore-Payne, Holden et al. 2005), KRAS (Krypuy, Newnham et al. 2006) genlerindeki somatik mutasyonların, GJB1 (Kennerson, Warburton et al. 2007) ve CFTR (Montgomery, Wittwer et al. 2007) genlerindeki germline mutasyonlarının saptanmasında kullanılmıştır.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalından FMF hastalarına ait DNA örnekleri, Protrombin 20210G>A mutasyonu taşıyan DNA örnekleri ve Faktör V Leiden 1691G>A mutasyonu taşıyan kan örnekleri alınarak çalışmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 3.1. Faktör V genine ait örnekler

Faktör V	Genotip
FV1	G/G yabanıl tip
FV2	G/G yabanıl tip
FV3	G/A Heterozigot
FV4	G/A Heterozigot
FV5	G/A Heterozigot
FV6	G/A Heterozigot
FV7	A/A Homozigot
FV8	A/A Homozigot

Çizelge 3.2. Faktör II (Protrombin) genine ait örnekler

Faktör II (Protrombin)	Genotip
FII1	Yabanıl tip
FII2	Heterozigot (G/A)
FII3	Heterozigot (G/A)
FII4	Yabanıl tip
FII5	Homozigot (A/A)
FII6	Heterozigot (G/A)
FII7	Yabanıl tip
FII8	Homozigot (A/A)

FII9	Heterozigot (G/A)
FII10	Yabanıl tip
FII11	Heterozigot (G/A)
FII12	Homozigot (A/A)
FII13	Homozigot (A/A)
FII14	Yabanıl tip
FII15	Yabanıl tip
FII16	Heterozigot (G/A)

Çizelge 3.3. MEFV genine ait örnekler

MEFV	Genotip
MEFV1	Yabanıl tip
MEFV2	Yabanıl tip
MEFV3	Heterozigot (680/-)
MEFV4	Heterozigot (680/-)
MEFV5	Yabanıl tip
MEFV6	Heterozigot (680/-)
MEFV7	Heterozigot (726/-)
MEFV8	Heterozigot (726/-)
MEFV9	Heterozigot (726/-)
MEFV10	Heterozigot (694/-)
MEFV11	Heterozigot (694/-)
MEFV12	Heterozigot (694/-)
MEFV13	Homozigot (694/694)
MEFV14	Homozigot (694/694)
MEFV15	Heterozigot (680/- 694/-)
MEFV16	Heterozigot (680/- 694/-)

MEFV17	Heterozigot (680/- 726/-)
MEFV18	Heterozigot (694/- 726/-)
MEFV19	Heterozigot (148/-)
MEFV20	Heterozigot (148/-)
MEFV21	Heterozigot (148/-)

3.2. Yöntem

3.2.1. Örneklerin Elde Edilmesi

3.2.2. Fenol -Kloroform-İzoamilalkol Yöntemi ile DNA İzolasyonu

DNA izolasyonunda kullanılacak solüsyonlar hazırlanmıştır.

1. RBC Lizis Solüsyonu (Red Blood Cell Lysis Solution)

12 g NH₄Cl (Amonyum Klorit) (Sigma A9434)

1,2 g Na₂CO₃ (Sodyum Karbonat) (Sigma S7795)

200 µl 0,5 M pH:8,0 EDTA (Etilen -Diamin-Tetra Asetikasit) (Sigma E5134)

Az miktar suda çözülerek son hacim distile su ile 1000 ml'ye tamamlanır.

2. Sodyum Tris EDTA (STE)

0,1 M NaCl (S5886)

10 mM TrisHCl pH:8,0 (Sigma T5941)

1 mM EDTA pH:8,0 (Sigma E5134)

%10'lük Sodyum Dodecyl Sülfat (SDS)

100 g SDS (Scharlau SD0010) alınıp 900 ml distile suda 68°C'ye ayarlanmış su banyosunda (Lab-Line Aquabath) eritilir ve toplam hacim 1000 ml'ye tamamlanır. HCl (Riedel-de Haen 07102) ile pH metrede (CRISON pH meter Basic 20) pH:7,2'ye ayarlanır. 0,2 µm çaplı filtreden (Sartorius Minisart) geçirilerek steril edilir.

3. Sodyum Asetat

408,1 g Sodyum Asetat (Sigma S2889) 800 ml distile suya ilave edilerek manyetik karıştırıcı (Daihan Scientific) yardımıyla çözülür. Asetik asitle pH:7,0'a ayarlanarak son hacim 1000 ml'ye tamamlanarak otoklavlanır (Hirayama Hiclave HVA-110).

Kan hacminin 2,5 katı kadar RBC lizis solüsyonu eklenerek çalkalanır ve 20 dakika buzda bekletilir. 4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj (Hettich Mikro 22 R) edilir. Süpernatant alınır ve dipte lökosit tabakası elde edilene kadar işlem tekrarlanır. Pelet elde edilince üstteki sıvı yavaşça dökülür. 1000 µl RBC lizis solüsyonu eklenerek vortekslenir (Lms Vtx-3000L). 200 µl örnek tüpe alınır üzerine 500 µl STE, 30 µl %10'luk SDS ve 20 µl Proteinaz K (600 u/ml, 200 mg/ml, Fermentas EO0491) ilave edilir. Tüpün ağzı parafilm ile kapatılarak 56°C'ye ayarlanan su banyosunda bir gece inkübasyona bırakılır. Ertesi gün su banyosundan alınan tüpe 25:24:1 oranındaki Fenol:Kloroform:İzoamilalkol (Fluka 77617) karışımından 750 µl ilave edilir. Fenol:Kloroform:İzoamilalkol karışımı kullanılmadan önce çalkalanmalıdır. Tüpün ağzı kapatılıp parafilmle edilir. Beyaz renk alıncaya kadar vorteks yardımıyla karıştırılır. 20 dakika buzda bekletilir ve 4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir. Pipet ile tüpün yüzeyinde oluşan faz alınarak başka bir tüpe konur. Temiz tüpe alınan süpernatant üzerine 750 µl kloroform eklenir ve vortekslenir. 20 dakika buzda bekletildikten sonra 4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir. Tüpün yüzeyinde oluşan faz pipet yardımıyla alınarak temiz bir tüpe aktarılır üzerine 1500 µl % 95'lik etanol (AppliChem A4230) ve 75 µl Sodyum Asetat eklenir. DNA beyaz yumak şeklinde görünür hale gelinceye kadar tüp yavaşça alt üst edilir. Tüpler -20°C'de bir gece bekletilir. Ertesi gün -20°C'den alınan tüp 4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Tüpteki alkol dikkatlice dökülür ve 500 µl %70'lik soğuk etanol eklenir. 4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilir. DNA kaybedilmeden alkol uzaklaştırılır. Tüpün ağzı açık bırakılarak alkolün iyice uçması sağlanır. Kurutma işleminden sonra DNA üzerine 100 µl distile su veya TE tampon eklenir. Tüpün ağzı parafilmle edilerek 37°C'de su banyosunda bir gece bekletilir. Daha sonra kullanılmak üzere DNA 4°C'de saklanır.

3.3. DNA'nın Spektrofotometrik Analizi

DNA örneklerinin saflığı ve konsantrasyonunun belirlenmesi için spektrofotometre (NanoDrop ND 1000) kullanılarak ölçüm yapıldı. 260 nm DNA'nın, 280 proteinin ve 230 ise fenolün maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyudur. DNA'nın saflığı değerlendirilirken A260/A280 ve A260/A230 oranlarına bakılmaktadır. 260/280 oranının ~1,8 ve A260/ A230 oranının ise 1,8-2,2 olması DNA'nın saf olduğunu göstermektedir. Protein, fenol veya diğer kontaminantların varlığı durumunda oranlar düşük çıkmaktadır (Nanodrop ND-1000 2004).

3.4. DNA Konsantrasyonunun Ayarlanması

Konsantrasyonları belirlenen DNA örnekleri 50 ng/μl olacak şekilde deiyonize su (ddH₂O) ile sulandırıldı.

3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

1. 5xTBE (Tris-HCl, Borik asit, EDTA)

54 g Trisma Base (Sigma T6066), 27,5 g Borik asit (Sigma B6768) ve 20 ml 0,5 M EDTA (Sigma E5134) deiyonize suyla (ddH₂O) 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

2. Ethidium Bromide (10 mg/ml)

Etidyum bromid (Scharlau ET0109) son konsantrasyon 10 mg/ml olacak şekilde sulandırıldı.

3. DNA Ladder (Fermentas Gene Ruler 100 bp DNA Ladder Plus)

DNA Ladder'a 166 μl 6x Loading Dye (Fermentas 0611) ve 734 μl distile su eklenerek vortekslendi.

4. %1'lik Agaroz Jel

Agaroz (Sigma A 5093-500G) 1 g/100 ml (%1) olacak şekilde hassas terazide (Shimadzu BX320H) tartıldı. Üzerine 1x TBE (Trisma Base EDTA) ilave edildi. 1xTBE solüsyonu stok olarak 5xTBE solüsyonundan su ile 1/5 oranında seyreltilerek hazırlandı. Agaroz

istenilen yüzdede hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Vestel, Türkiye) zlmesi sağlandı. eker ocak altında üzerine 5 µl Etidyum bromid ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra jel tablasına dökülerek donması için 20-30 dakika bekletildi.

%1'lik agaroz jel elektroforez tankına yerleştirildi. 2 µl DNA, 4 µl 6x Loading Dye ile karıştırılarak jele yüklendi. Örnekler 100 voltta 30 dakika yürütüldü. UV görüntüleme sistemi (Syngene Gene Genius Bio Imaging System) kullanılarak görüntülendi ve termal yazıcı (SonyUP-D895) ile çıktı alındı.

3.6. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.6.1. Primer Tasarımı

Primerler, Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000) programı kullanılarak tasarlandı.

Çizelge 3.4. Primerler

Gen	Primer	Amplikon Uzunluğu
MEFV (2.ekzon)	F: AGCCTGAAGACTCCAGACC R: AGGCCTTCTCTCTGCGTT	148 b
MEFV (10.ekzon)	F: TGGGAGCCTGCAAGACATC R: AAAGAGCAGCTGGCGAATG	244 b
Faktör V	F: CAGAAAATGATGCCCAGTGC R: GCCCCATTATTTAGCCAGGA	218 b
Faktör II (Protrombin)	F: TTCCGCCTGAAGAAGTGGA R: TCCTGAGCCCAGAGAGCTG	197 b

3.6.2. Primer Optimizasyonu

Primer çiftleri için uygun bağlanma sıcaklığını belirlemek amacıyla 50°C, 55°C ve 60°C’de 1, 1,5 ve 2 mM MgCl₂ konsantrasyonlarında PCR kuruldu.

Çizelge 3.5. PCR protokolü

Reaktif	1M MgCl ₂	1,5 M MgCl ₂	2 M MgCl ₂
10x Taq DNA polimeraz tampon (NH ₄) ₂ SO ₄ (Fermentas)	2,5 µl	2,5 µl	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM) (Fermentas R0971)	1 µl	1,5 µl	2 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
F primer (10 pmol/µl) (Metabion)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
R primer (10 pmol/µl) (Metabion)	0,5 µl	0,5 µl	0,5 µl
Taq DNA polimeraz (5U/µl, (Fermentas EP402)	0,2 µl	0,2 µl	0,2 µl
DNA (50 ng/µl)	2 µl	2 µl	2 µl
Distile su	17,8 µl	17,3 µl	16,8 µl
Toplam hacim	25 µl	25 µl	25 µl

dNTP hazırlanması

dATP (Fermentas R0145), dGTP (Fermentas R0165), dCTP (Fermentas R0155), dTTP (Fermentas R0175) stokların (100 mM,10 µmol) her birinden 5 µl alınarak son hacim deiyonize su ile 50 µl’ye tamamlandı.

PCR Koşulları

95°C’de 5 dk
95°C’de 30 sn
50-55-60°C’de 30 sn
72°C’de 30 sn
72°C’de 5 dk

} 30 döngü

Belirtilen koşullarda primer çiftleri için polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. PCR ürünleri %2'lik agaroz jelde 120 voltta 30 dakika yürütülerek UV görüntüleme sistemiyle görüntüldü. Sonuçlar değerlendirilerek her bir primer için en uygun olan MgCl₂ konsantrasyonu ve bağlanma sıcaklığı belirlendi.

Çizelge 3.6. MEFV (10.ekzon), Faktör II ve Faktör V genleri için reaksiyon koşulları

Reaktif	Miktar
10x Taq Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
F primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
R primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Taq DNA polimeraz	0,2 µl
DNA (50 ng/µl)	2 µl
Distile su	17,8 µl
Toplam hacim	25 µl

Çizelge 3.7. MEFV geni 2.ekzon için reaksiyon koşulları

Reaktif	Miktar
10x Taq Buffer (NH ₄) ₂ SO ₄	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,2 µl
dNTP (10 mM)	0,5 µl
F primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
R primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Taq DNA polimeraz	0,4 µl
DMSO (%5)	1,25 µl
DNA (50 ng/µl)	2 µl
Distile su	16,15 µl
Toplam hacim	25 µl

Çizelge 3.8. Primerler için belirlenen bağlanma sıcaklıkları

Gen	Bağlanma Sıcaklıkları
MEFV geni (2.ekzon)	55°C
MEFV geni (10.ekzon)	62°C
Faktör V	50°C
Faktör II (Protrombin)	50°C

3.7. HRM

HRM analizinde kullanılacak kalıp DNA'lar 20 ng/μl olacak şekilde sulandırıldı.

Her bir gen için Çizelge 3.9.'da belirtilen koşullarda reaksiyon karışımı hazırlandı. 96'lık platelere yükleme yapılarak kalıp DNA ilave edildi. Plate seal (LightCycler 480 Sealing Foil) ile kapatıldı. 1500 g'de 2 dakika santrifüj (Allegra® X-15R Centrifuge, Beckman Coulter) edildikten sonra plate HRM analizinin yapıldığı cihaza (LightCycler 480-Roche) yerleştirilerek Çizelge 3.12.'de belirtilen koşullarda reaksiyon gerçekleştirildi.

Çizelge 3.9. Yüksek çözünürlüklü erime analizi reaksiyon bileşenleri

Reaktif	Miktar
1x Master Mix	10 μl
25 mM MgCl ₂	Değişken
F Primer (10 pmol/μl)	0,5 μl
R Primer (10 pmol/μl)	0,5 μl
Genomik DNA (5-30 ng)	1 μl
Distile su	Değişken
Toplam	20 μl

Çizelge 3.10. MEFV (10.ekzon), Faktör V ve Faktör II genleri için HRM reaksiyon bileşenleri

Reaktif	Miktar
1x Master Mix	10 µl
2 mM MgCl ₂	1,6 µl
F Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
R Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Genomik DNA (20 ng/ µl)	1 µl
Distile su	6,4 µl
Toplam	20 µl

Çizelge 3.11. MEFV geni 2.ekzon için HRM reaksiyon bileşenleri

Reaktif	Miktar
1x Master Mix	10 µl
1,5 mM MgCl ₂	1,2 µl
F Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
R Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
%5 DMSO	1,25 µl
Genomik DNA (20 ng/ µl)	1 µl
Distile su	6,4 µl
Toplam	20 µl

Çizelge 3.12. HRM protokolü

Program İsmi	Döngü Sayısı	Analiz Modu
Pre-inkübasyon	1	-
Amplifikasyon	40	Kantifikasyon
HRM	1	Erime eğrisi
Soğuma	1	-

Pre-inkübasyon: 95°C 10 dk

Amplifikasyon: 95°C 10 sn

FV geni için 50°C 30 sn

FII geni için 55°C 30 sn

MEFV geni 2.ekzon için 55°C 30 sn

MEFV geni 10.ekzon için 62°C 30 sn

72°C 30 sn

} 40 döngü

HRM: 95°C 1 dk

40°C 1 dk

75°C 1sn

95°C sürekli → 75-95°C arası her derecede 25 ölçüm

yapılmaktadır. Bu aralık ampikonun Tm derecesine göre değiştirilebilir.

LightCycler480 “Gene-Scanning” (Gen tarama) modülü kullanılarak yazılım programlarıyla birlikte üç basamaklı bir analiz yapılmıştır. Bu basamaklar

1. Normalization (Normalizasyon) (%100 floresandan %0 floresana)

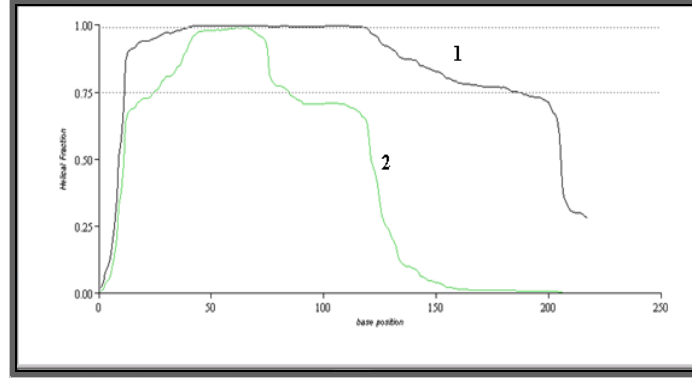
2. Temperature - shifting (Sıcaklık düzenleme)

3. Autogroup function (Otomatik gruplama)

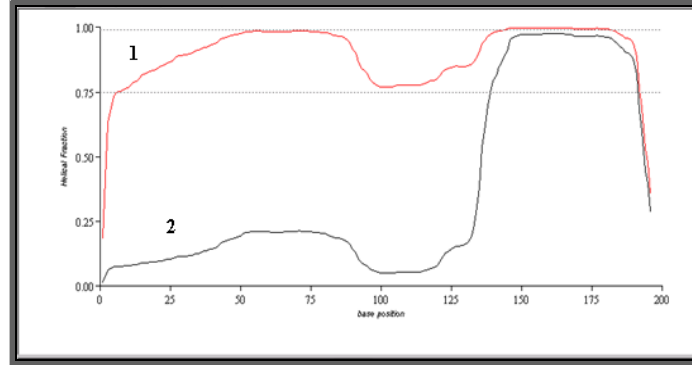
Analiz sonucunda elde edilen erime eğrilerindeki farklılıklar kıyaslanarak yorum yapılmıştır.

3.8. DHPLC

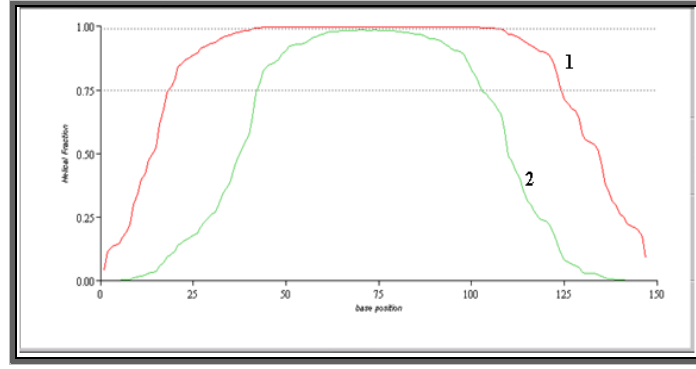
Yabancıl tip (wild-type) ve homozigot mutant olduğu bilinen DNA örnekleri 1:1 oranında karıştırılarak optimize edilen koşullarda polimeraz zincir reaksiyonu yapıldı. 95°C 5 dk, 93°C 1 dk ve her döngüde 2°C azalacak şekilde 27 döngü, 40°C 1 dk denatürasyon-renatürasyon aşamasından sonra örnekler analiz edilmek üzere DHPLC'ye (Transgenomic Wave-MD) yüklendi.



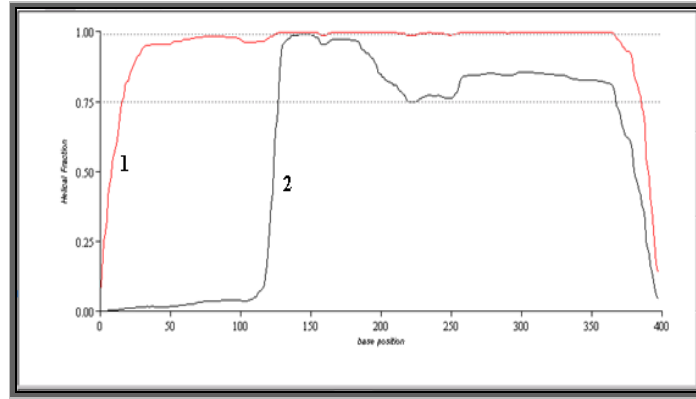
Şekil 3.1. Faktör V geni DHPLC analizi 57.6°C (1) ve 59.1°C (2) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.2. Faktör II geni DHPLC analizi 58.6°C (1) ve 59.8°C (2) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. MEFV geni 2.ekzon DHPLC analizi 64.8°C (1) ve 68.5°C (2) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.4. MEFV geni 10.ekzon DHPLC analizi 59.3°C (1) ve 60.9°C (2) olmak üzere iki farklı sıcaklıkta gerçekleştirilmiştir.

3.9. DNA Dizi Analizi

3.9.1. Pürifikasyon

Tüm genler için optimize edilen koşullarda polimeraz zincir reaksiyonu yapılarak hedef bölgeler amplifiye edildi. PCR ürünleri Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega A9282) pürifikasyon kiti kullanılarak pürifiye edildi.

PCR ürünlerinin hacimleri ölçüldü. Üzerlerine 1:1 oranında Membrane Binding Solution (Promega A9303) eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Kolonlar (Promega A129B) temiz tüplere takıldı ve üzerlerine PCR ürünleri yüklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildikten sonra 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonun altında kalan kısım uzaklaştırıldı. Kolonlara 700 µl Membrane Wash Solution (Promega A929C) eklenerek

14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonun altında kalan kısım uzaklaştırıldı. Kolonlara 500 µl Membrane Wash Solution eklenerek 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Kolonun altında kalan kısım uzaklaştırıldıktan sonra 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonlar temiz tüplere takılarak örnek isimleri yazıldı. 25 µl nükleazsız su kolon membranına değmeyecek şekilde membranın ortasına bırakıldı. Oda sıcaklığında 1 dakika bekletildi ve 14000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolonlar atıldı ve örnekler kullanılacağı zamana kadar -20°C'de saklandı.

Pürifikasyon işleminden sonra örnekler %2'lik agaroz jelde 120 Voltta 30 dakika yürütüldü ve UV görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

Çizelge 3.13. DNA dizi analizi için sekans reaksiyonu protokolü

Reaktif	Miktar
Genome Lab DTCS Quick Start Mix (S707019)	4 µl
Primer (1,6 pmol/ µl)	1 µl
Betain (5M)	2 µl
DNA	3 µl
Toplam hacim	10 µl

PCR Koşulları

96°C'de 20 sn
50°C'de 20 sn
60°C'de 4 dk

} 30 döngü

3.9.2. Etanol Presipitasyonu

PCR ürünleri kısa süre santrifüj edilerek 1,5'luk tüplere alındı. 2,5 µl 125 mM EDTA ve 30 µl %100'lük soğuk EtOH (etanol) eklenerek santrifüj edildi. 15 dakika buzda bekletildi. 4°C'de 14000 rpm'de 30 dakika santifüj edildi. Etanol uzaklaştırıldı. 30 µl %70'lik soğuk etanol eklendi. 5 dakika buzda bekletildikten sonra 4°C'de 14000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Etanol uzaklaştırıldı. Havlu kağıt üzerine tüpler kapağı açık olacak şekilde

ters çevrilerek alkolün uçması sağlandı. Örneklerin üzerine 20 µl formamid (Amersham Biosciences 324838) eklenerek örnekler Beckman Sample Plate'e konuldu. Örneklerin üzerine 1 damla mineral yağ (Beckman Coulter S505019) damlatıldı ve plate sekans cihazına (Beckman Coulter CEQ8000 Genetic Analysis System) yüklendi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. DNA İzolasyonu

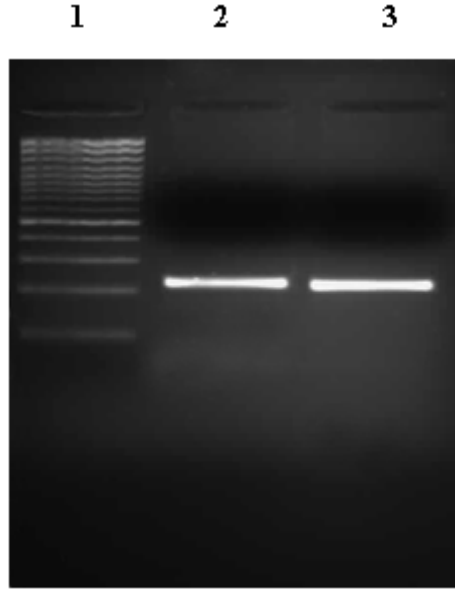
Fenol- kloroform yöntemiyle izole edilen DNA örneklerine ait temsili agaroz jel görüntüsü Şekil 4.1.'de verilmiştir.



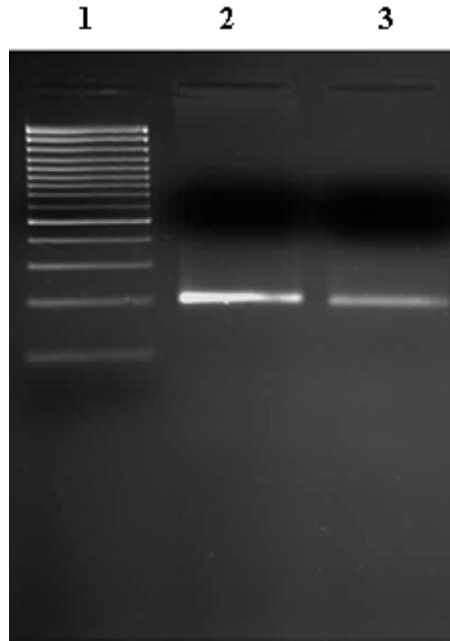
Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforezi, 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas SM0321) 2-3: Fenol-kloroform yöntemiyle izole edilen genomik DNA

4.2. PCR

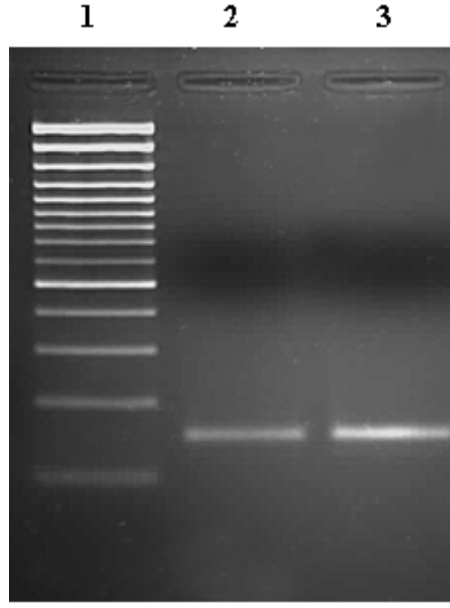
Bu tez çalışması kapsamında analiz edilen Faktör V, Faktör II (Protrombin) ve MEFV (2.ekzon, 10.ekzon) genlerine ait PCR sonuçlarının agaroz jel elektroforez görüntüleri sırasıyla Şekil 4.2., 4.3., 4.4. ve 4.5.'te verilmiştir.



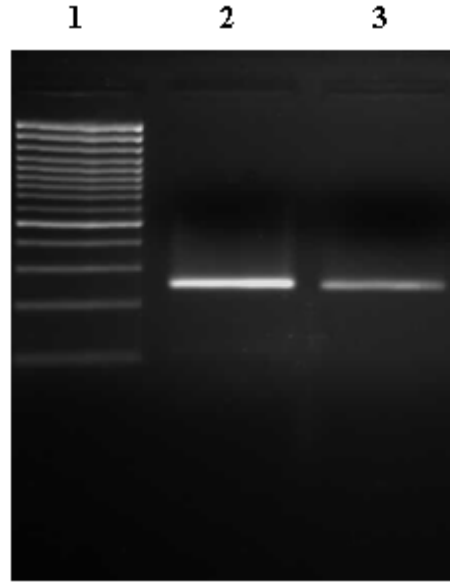
Şekil 4.2. Agaroz jel elektroforezi, 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas SM0321), 2-3: Faktör V genine ait 218 bç'lik PCR ürünü



Şekil 4.3. Agaroz jel elektroforezi, 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas SM0321), 2-3: Faktör II (Protrombin) genine ait 197 bç'lik PCR ürünü



Şekil 4.4. Agaroz jel elektroforezi, 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas SM0321), 2-3: MEFV geni 2.ekzona ait 148 bç'lik PCR ürünü



Şekil 4.5. Agaroz jel elektroforezi, 1: 100 bç moleküler ağırlık belirteci (Fermentas SM0321), 2-3: MEFV geni 10.ekzona ait 244 bç'lik PCR ürünü

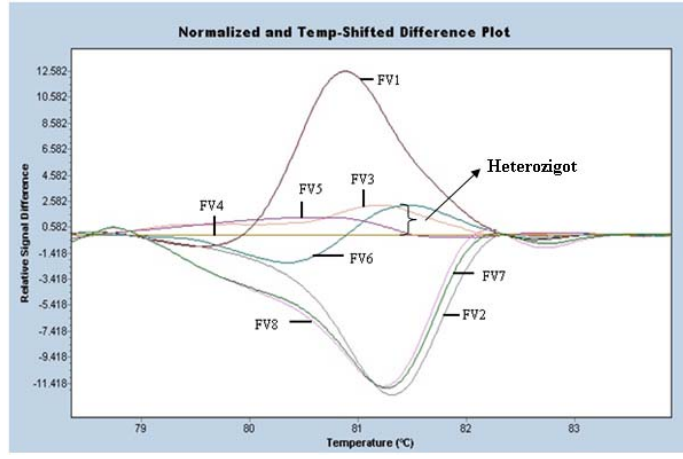
4.3. Mutasyon Analizi Sonuçları

Üzerinde çalışılan tüm örneklerin mutasyon analizleri HRM ve DHPLC ile gerçekleştirilmiştir.

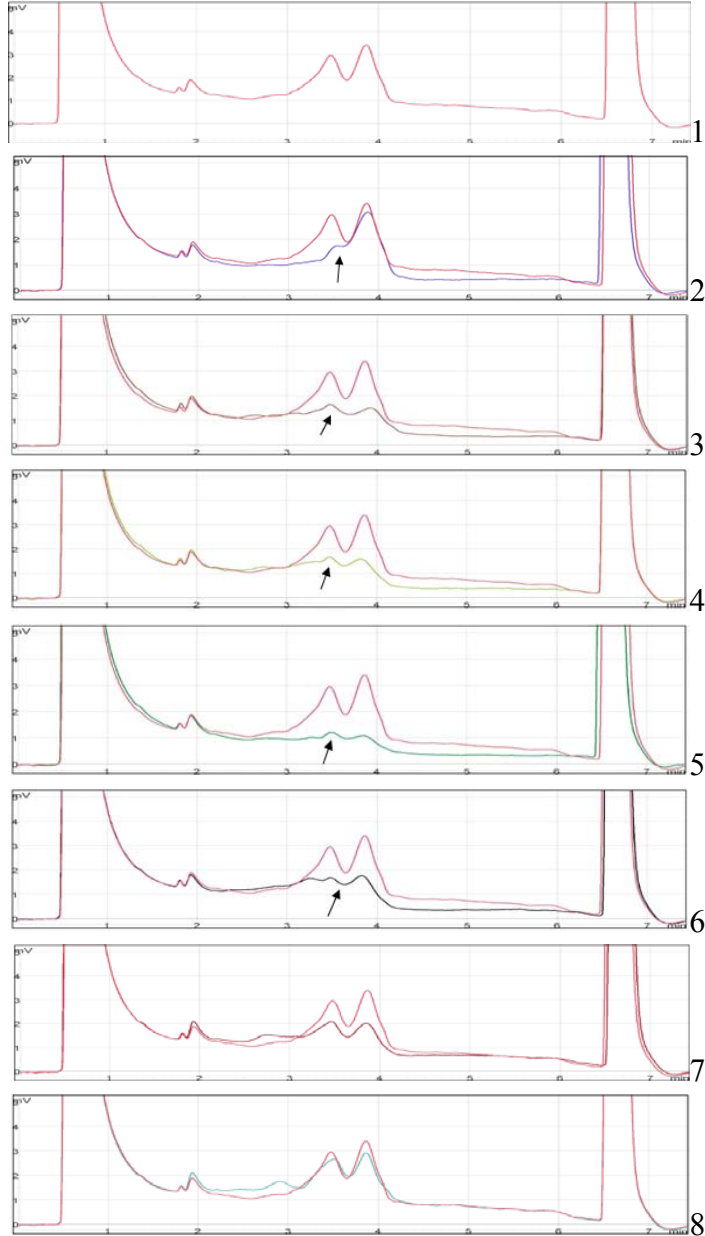
4.3.1. Faktör V Leiden Mutasyon Analizi Sonuçları

Tez çalışmasında Faktör V geninde 1691G>A mutasyonunun saptanmasında HRM ve DHPLC'nin etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla 8 örnekle çalışılmıştır. Genotipi real-time PCR ile önceden belirlenmiş olan bu örneklerden heterozigot olanlar HRM analizi sonucunda homozigot olanlardan farklı bir erime profili göstermiştir. Genotipi yabancı tip olarak belirtilen örneklerden biri (Örnek FV2-Şekil 4.6.A) homozigot mutant örneklerle aynı profili vermiştir. Hem bu örneğin hem de homozigot mutant olarak belirtilen örneklerden FV7'nin DNA dizi analizi yapılmıştır.

Aynı örneklerin mutasyon taraması DHPLC ile gerçekleştirilmiş, heterozigot örneklere ait kromatogram yabancı tip örneğe ait kromatogramla karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık olduğu görülmüştür. Ancak yabancı tip örnek DNA'sı ile 1:1 oranında karıştırılarak heterodupleks yapı oluşturulan homozigot örneklerin kromatogramları yabancı tip örneğe ait kromatograma benzerdir (Şekil 4.6.B).



A



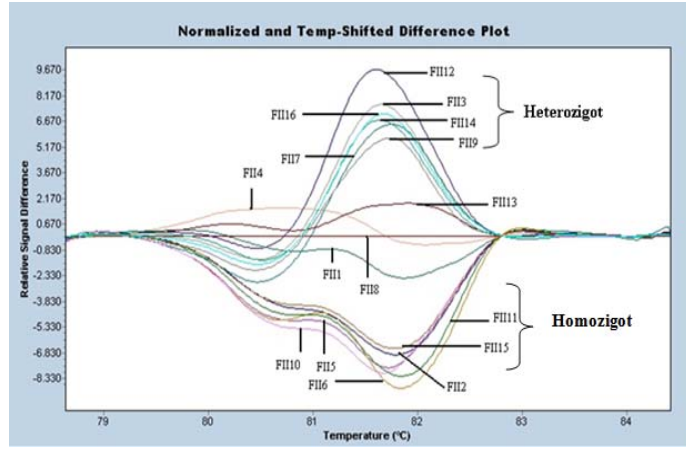
B

Şekil 4.6. A: FV örnekleri HRM analizi, **B:** FV örnekleri DHPLC analizi
 Örnek Genotipleri: 1.Yabani tip (FV1), 2.Yabani tip (FV2), 3.Heterozigot (FV3),
 4.Heterozigot (FV4) 5.Heterozigot (FV5), 6.Heterozigot (FV6), 7.Homozigot (FV7),
 8.Homozigot (FV8)

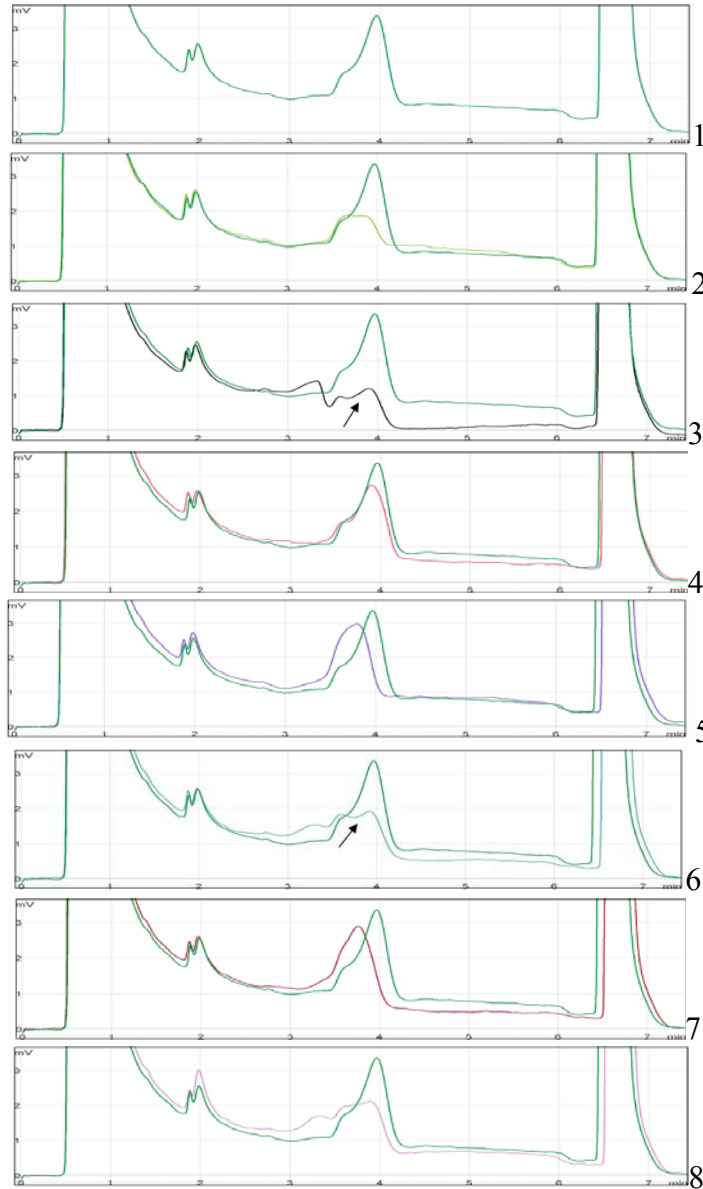
4.3.2. Faktör II (Protrombin) Mutasyon Analizi Sonuçları

Faktör II geni 20210G>A mutasyonunun HRM ve DHPLC ile değerlendirilmesi için 16 örnekle çalışılmıştır. HRM analizi sonucunda örnekler arasında net bir ayırım olmakla birlikte yabancı tip, heterozigot ve homozigot örnekler genotipleriyle korole bir ayırım göstermemiştir (Şekil 4.7.A). HRM analizinde görülen bu ayırım dikkate alınarak RFLP ile belirlenen genotiplerde bir hata olabileceği düşünülmüş ve örneklerin DNA dizi analizi yapılmıştır.

Heterozigot örneklere ait kromatogramlar yabancı tip örneğe ait kromatogramla karşılaştırıldığında bazı heterozigotlar yabancı tipten ayrılmış bazıları ise yabancı tipte aynı profili vermiştir. DHPLC analizi heterozigot örnekleri saptamada istikrarlı bir başarı göstermemiştir.

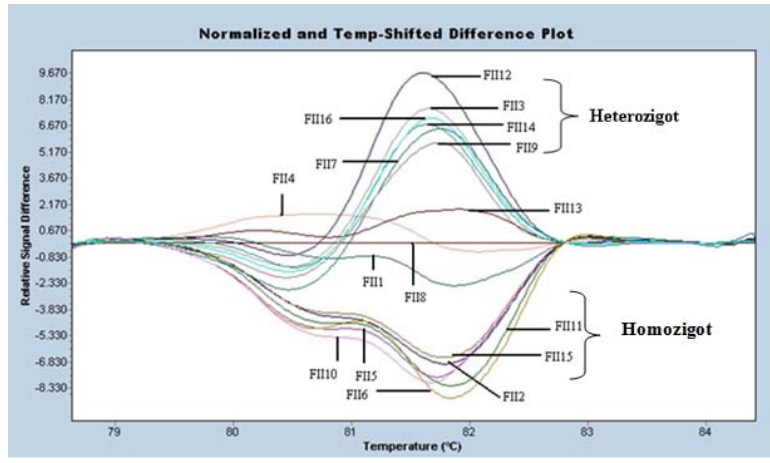


A

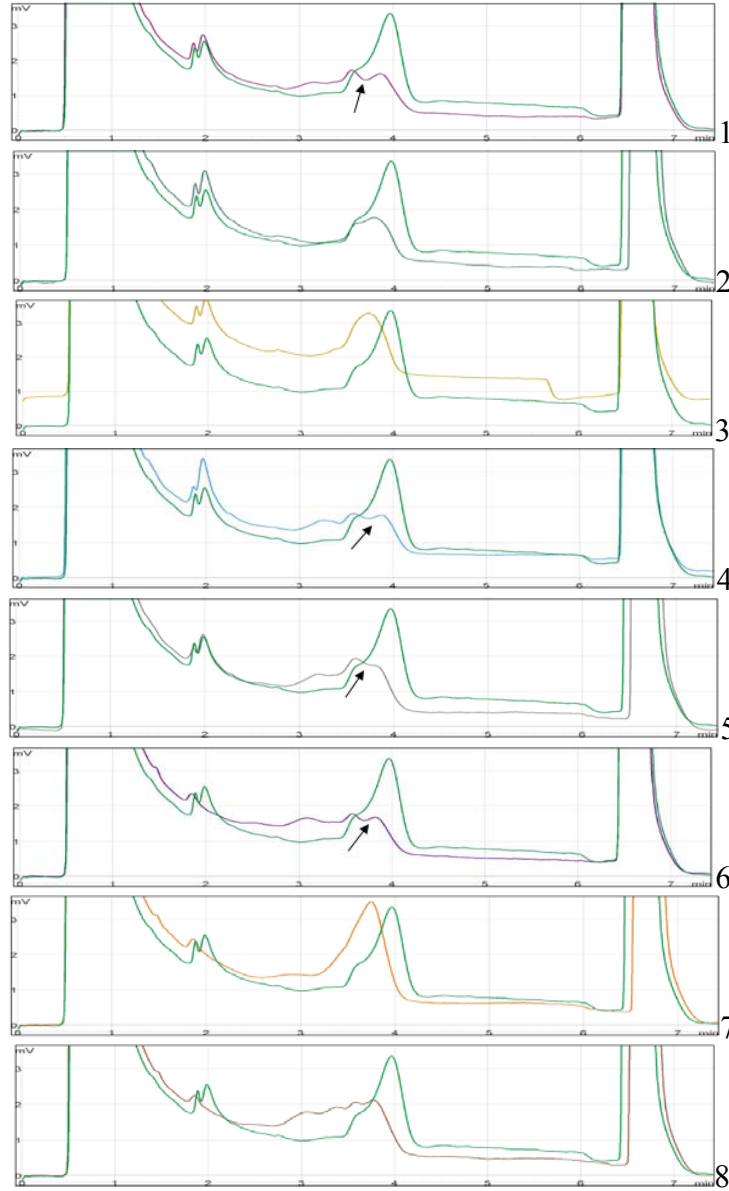


B

Şekil 4.7. A: FII örnekleri HRM analizi, **B:** FII örnekleri DHPLC analizi
 Örnek Genotipleri: 1.Yabanıl tip (FII1), 2.Heterozigot (FII2), 3.Heterozigot (FII3),
 4.Yabanıl tip (FII4) 5.Homozigot (FII5), 6.Heterozigot (FII6), 7.Yabanıl tip (FII7),
 8.Homozigot (FII8)



A



B

Şekil 4.8. A: FII örnekleri HRM analizi, **B:** FII örnekleri DHPLC analizi
 Örnek Genotipleri: 1.Heterozigot (FII9), 2.Yabanıl tip (FII10), 3.Heterozigot (FII11),
 4.Homozigot (FII12), 5.Homozigot (FII13), 6.Yabanıl tip (FII14), 7.Yabanıl tip
 (FII15), 8.Heterozigot (FII16)

4.3.3. MEFV Mutasyon Analizi Sonuçları

HRM ve DHPLC tekniklerinin karşılaştırılması ve değerlendirilmesi için çalışılan bir diğer gen olan MEFV’de iki ayrı ekzonda yer alan mutasyonlar incelenmiştir. Bu kapsamda MEFV geni 2.ekzondaki E148Q mutasyonu ile 10.ekzondaki M680I, M694V ve V726A mutasyonlarının saptanması amacıyla genotipleri önceden DNA dizi analiziyle belirlenmiş olan 21 örnekle çalışılmıştır.

E148Q mutasyonu

E148Q mutasyonu taşıyan 3 heterozigot örneğin HRM analizi sonucunda oluşturdukları erime eğrileri yabanıl tip örnekten farklı bir profil göstermiştir. Aynı örneklerin DHPLC analizinde ise örnekler yabanıl tip örneğe ait kromatogramla karşılaştırıldığında heterozigot olan iki örnek yabanıl tipten farklıyken (Şekil 4.9.B.2-4) heterozigot olan bir diğer örneğin yabanıl tipte aynı profili gösterdiği tespit edilmiştir (Şekil 4.9.B.3).

M680I mutasyonu

HRM analizi sonucunda M680I mutasyonu taşıyan heterozigot örneklerin erime eğrisi yabanıl tip örneğin erime eğrisinden farklıdır. M680I örneklerinin DHPLC analizinde heterozigot örneklerin kromatogramları yabanıl tip örneğin kromatogramıyla kıyaslandığında farklılık görülmüş ancak yabanıl tip DNA ile karıştırılarak heterodupleks yapı oluşturulan homozigot mutant örneklerin ayrımı mümkün olmamıştır.

M694V mutasyonu

HRM analizi sonucunda M694V mutasyonu taşıyan heterozigot ve homozigot mutant örneklerin erime eğrileri yabanıl tip örnekle kıyaslandığında farklıdır (Şekil 4.11.A) Aynı örnekler DHPLC’de analiz edildiğinde ise heterozigot örneklere ait kromatogramların yabanıl tipten belirgin bir farklılık göstermediği görülmüştür (Şekil 4.11.B).

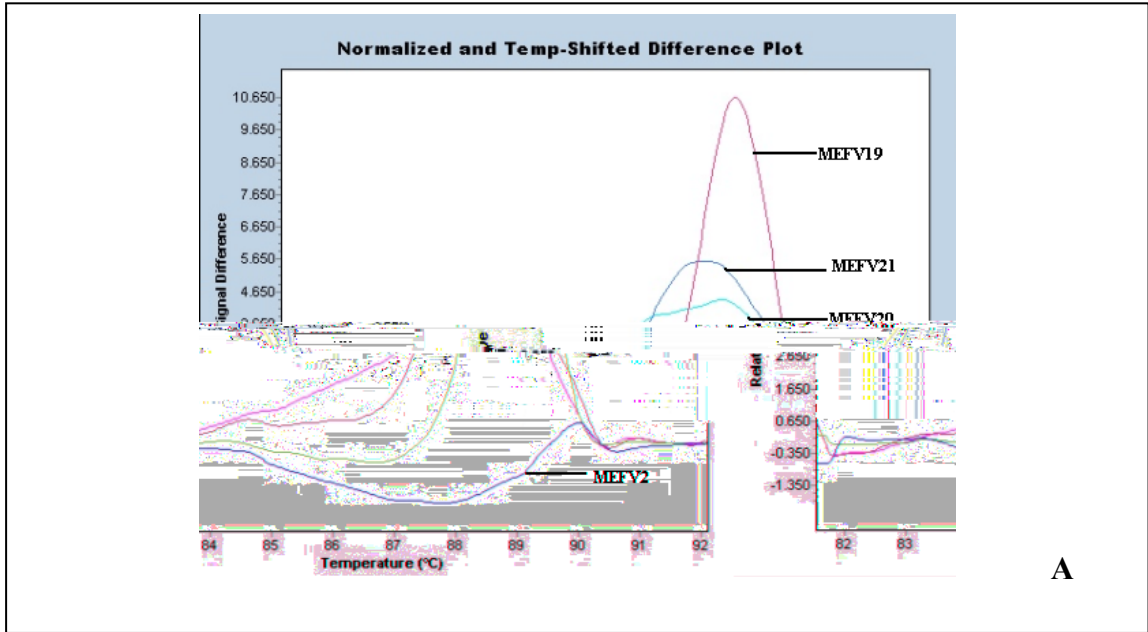
V726A mutasyonu

V726A mutasyonu taşıyan heterozigot örneklerin tamamı HRM analizinde yabanıl tipten farklı bir erime profili gösterirken (Şekil 4.12.A) aynı örneklerin DHPLC kromatogramları yabanıl tipte kıyaslandığında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil4.12.B).

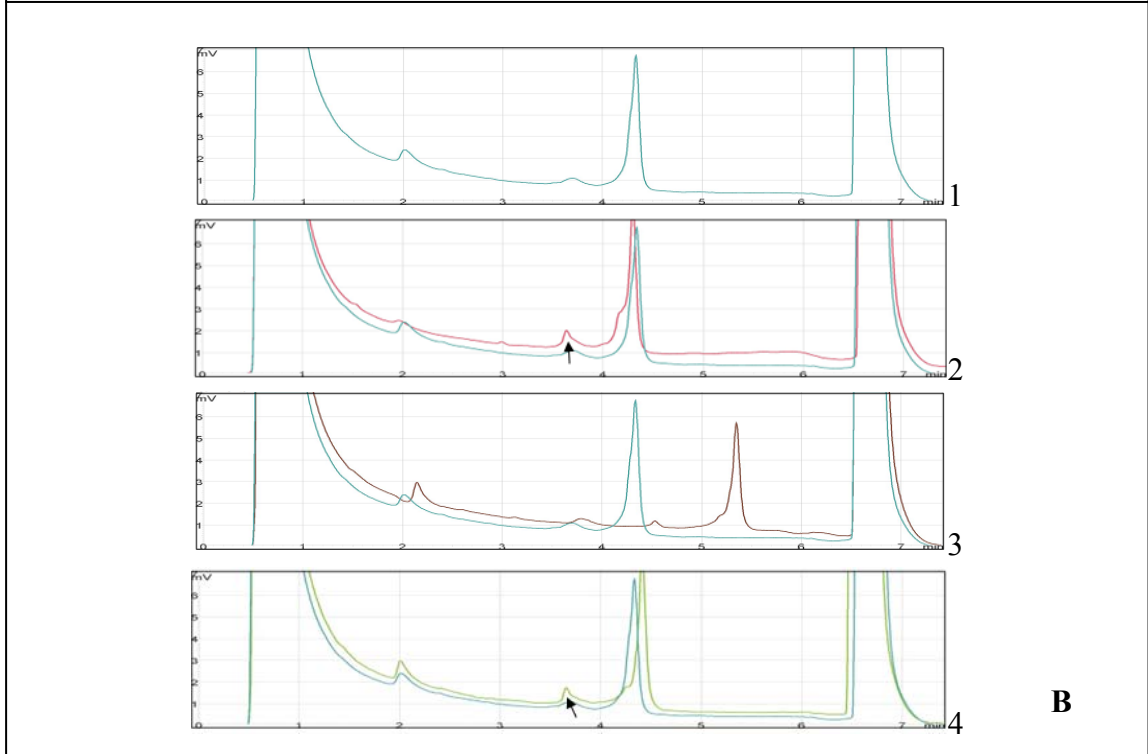
Bileşik Heterozigot (Compound Heterozigot)

680/- 694/- mutasyonu taşıyan iki örnek HRM analizinde yabancı tipten farklı, birbirine çok benzer bir erime eğrisi oluşturmuştur (Şekil 4.13.A). Aynı örneklerin DHPLC analizinde elde edilen kromatogramlar yabancı tip örneğe ait kromatogramdan farklıdır (Şekil 4.13.B.2-3).

680/- 726/-, 694/- 726/- mutasyonu taşıyan örneklerin HRM analizi sonucunda elde edilen erime eğrileri birbirinden ve yabancı tip örneğe ait erime eğrisinden farklıdır. Aynı örneklerin DHPLC kromatogramları ise yabancı tipten kıyaslandığında belirgin bir farklılık görülmemiştir.

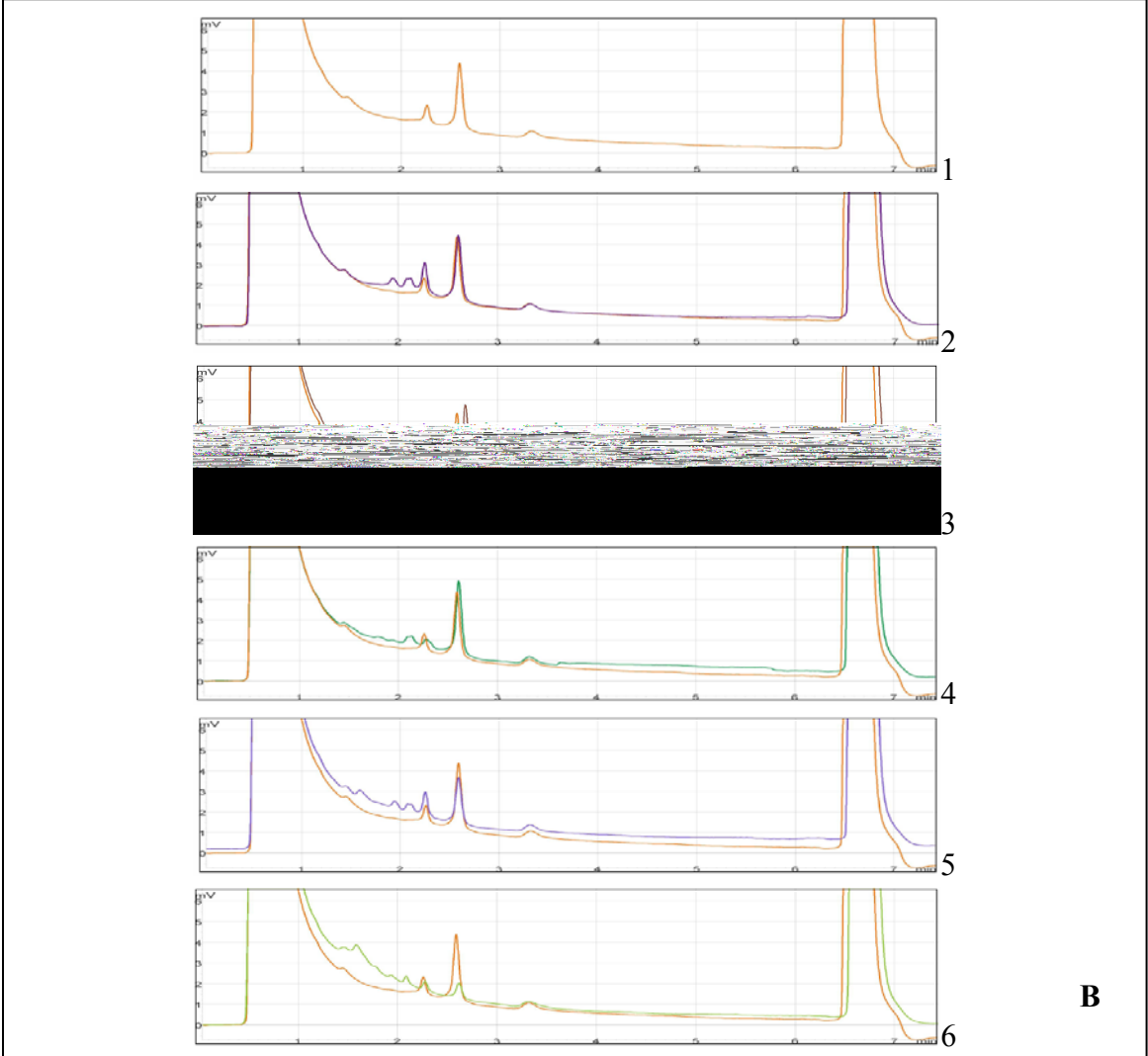
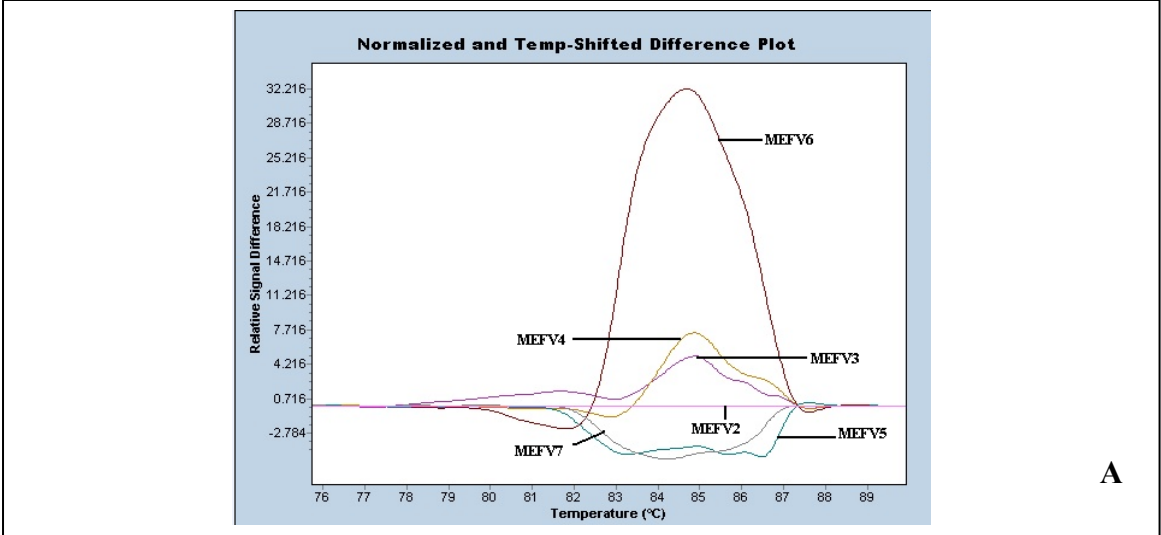


A



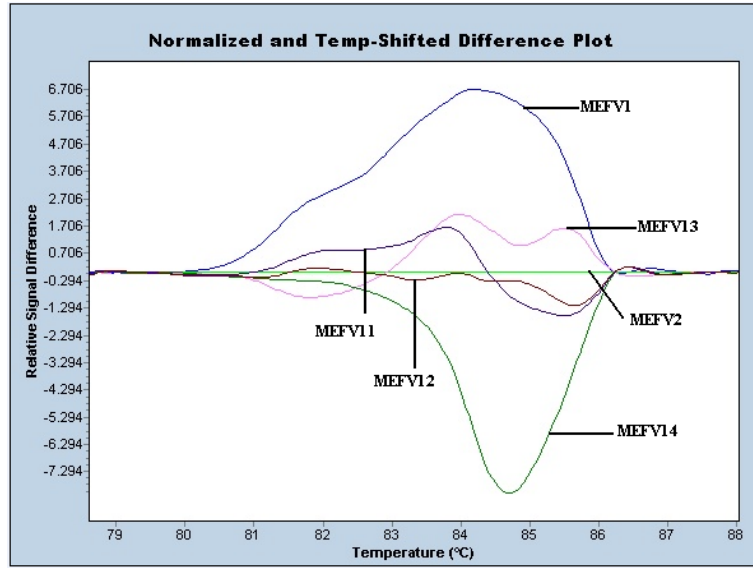
B

Şekil 4.9. A: MEFV(E148Q) örnekleri HRM analizi, **B:** MEFV(E148Q) örnekleri DHPLC analizi
 Örnek genotipleri: 1.Yabancıl tip (MEFV2), 2.Heterozigot (MEFV19), 3.Heterozigot (MEFV20), 4.Heterozigot (MEFV21)

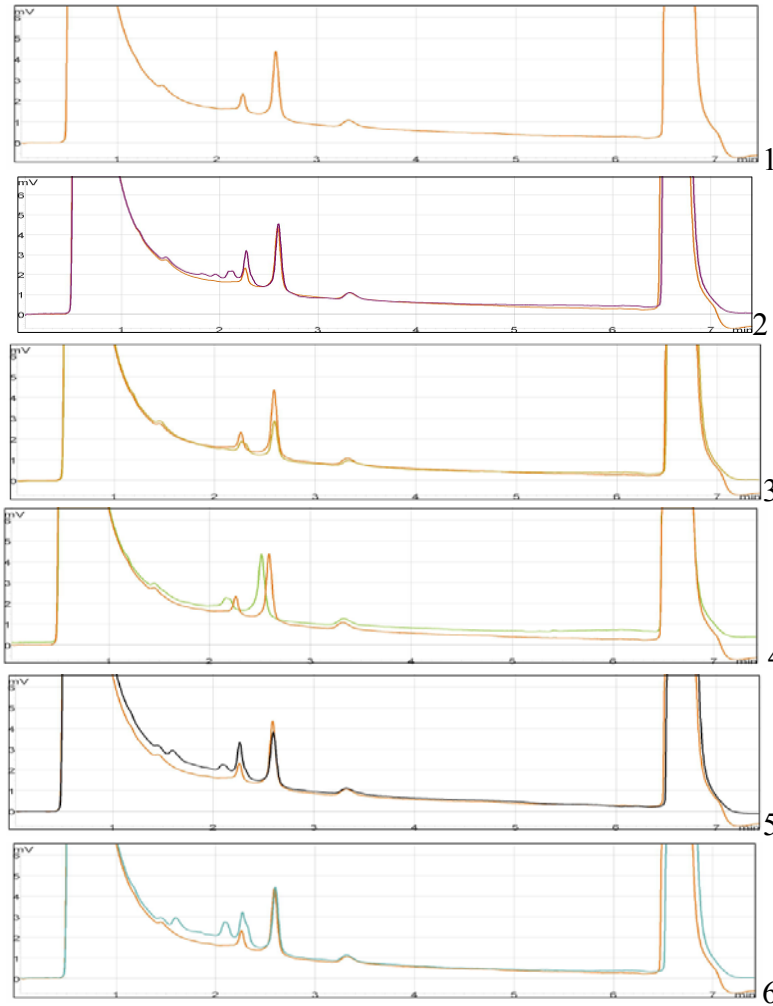


Şekil 4.10. A: MEFV (M680I) örnekleri HRM analizi, **B:** MEFV (M680I) örnekleri DHPLC analizi

Örnek Genotipleri: 1.Yabancı tip (MEFV2), 2.Heterozigot (MEFV3), 3.Heterozigot (MEFV4), 4.Yabancı tip (MEFV5), 5.Heterozigot (MEFV6), 6. Homozigot (MEFV7)

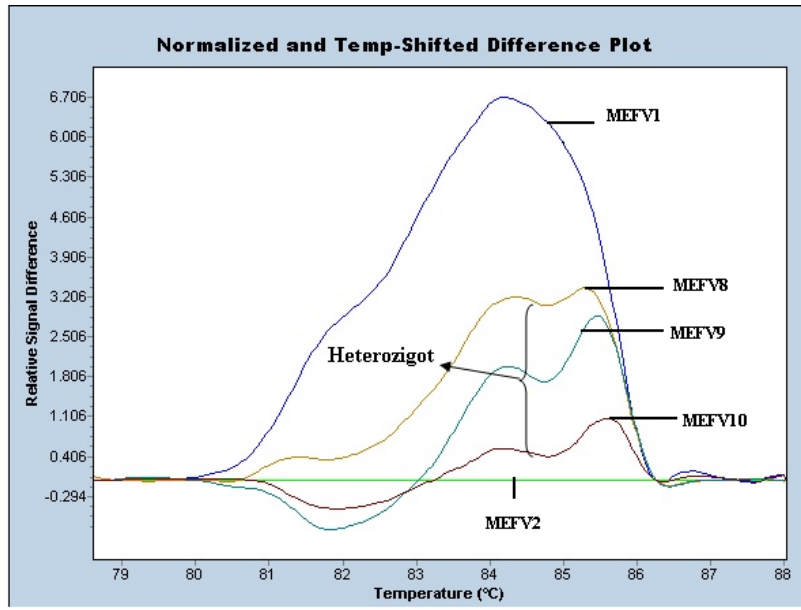


A

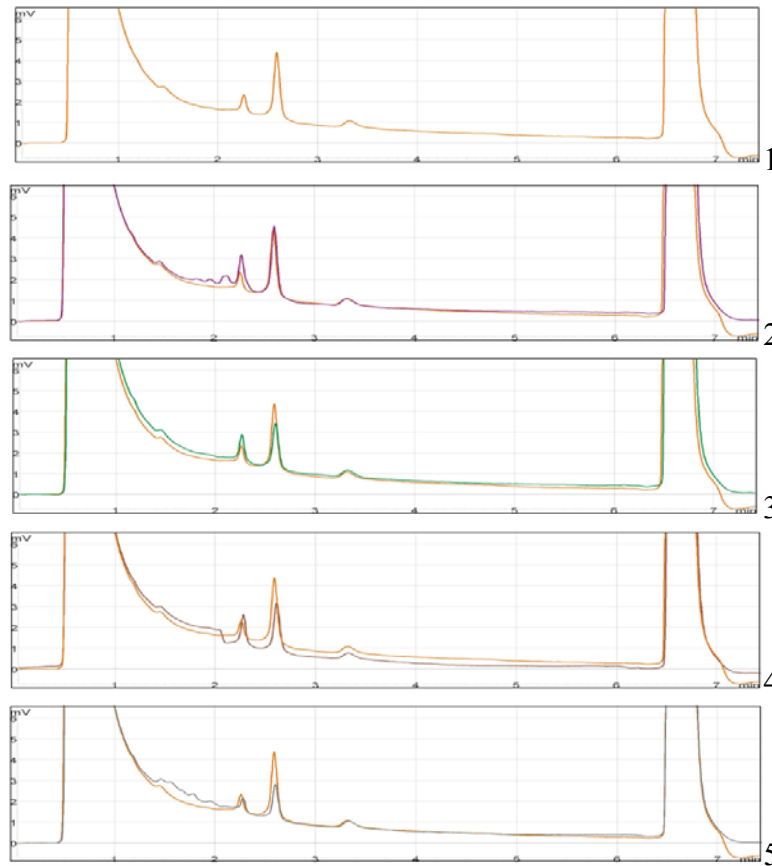


B

Şekil 4.11. A: MEFV (M694V) örnekleri HRM analizi, **B:** MEFV (M694V) örnekleri DHPLC analizi
 Örnek Genotipleri: 1.Yabancı tip (MEFV2), 2.Yabancı tip (MEFV1), 3. Heterozigot (MEFV11), 4.Heterozigot (MEFV12), 5.Homozigot (MEFV13), 6.Homozigot (MEFV14)



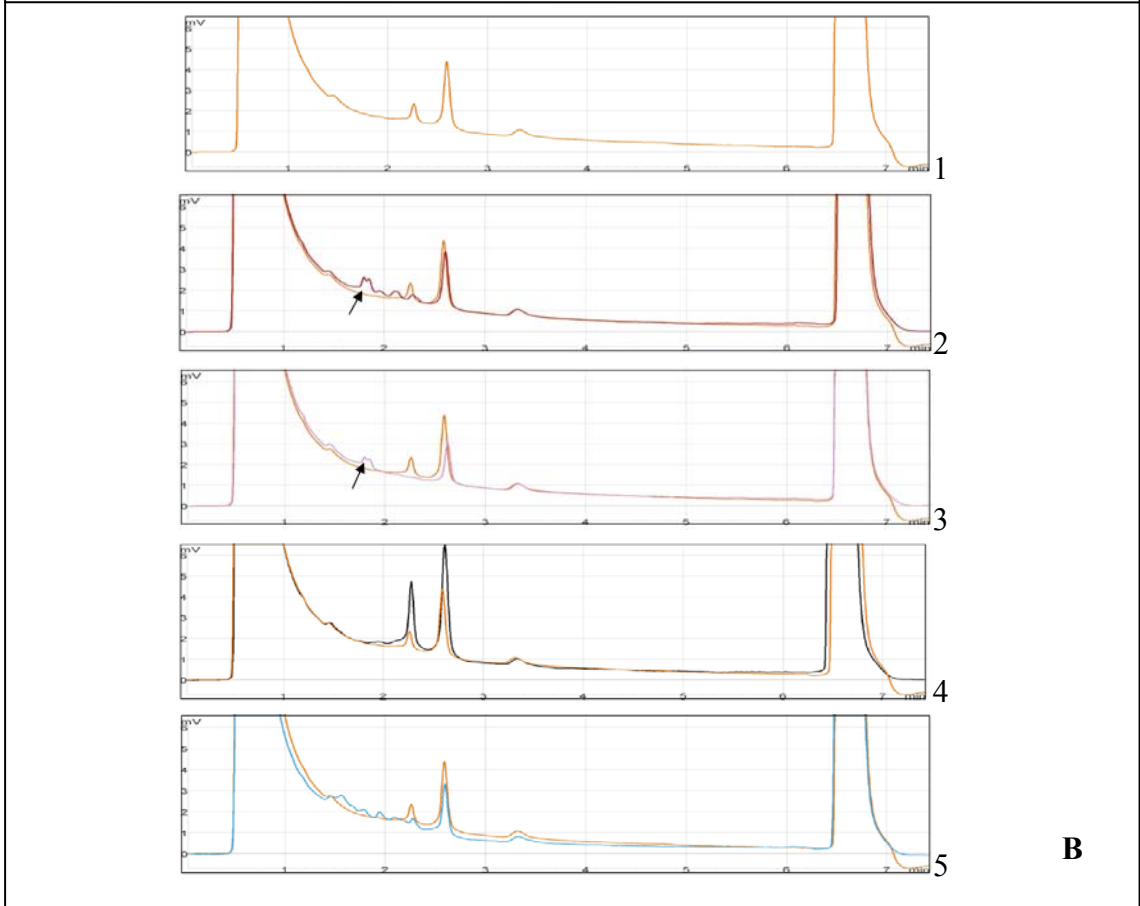
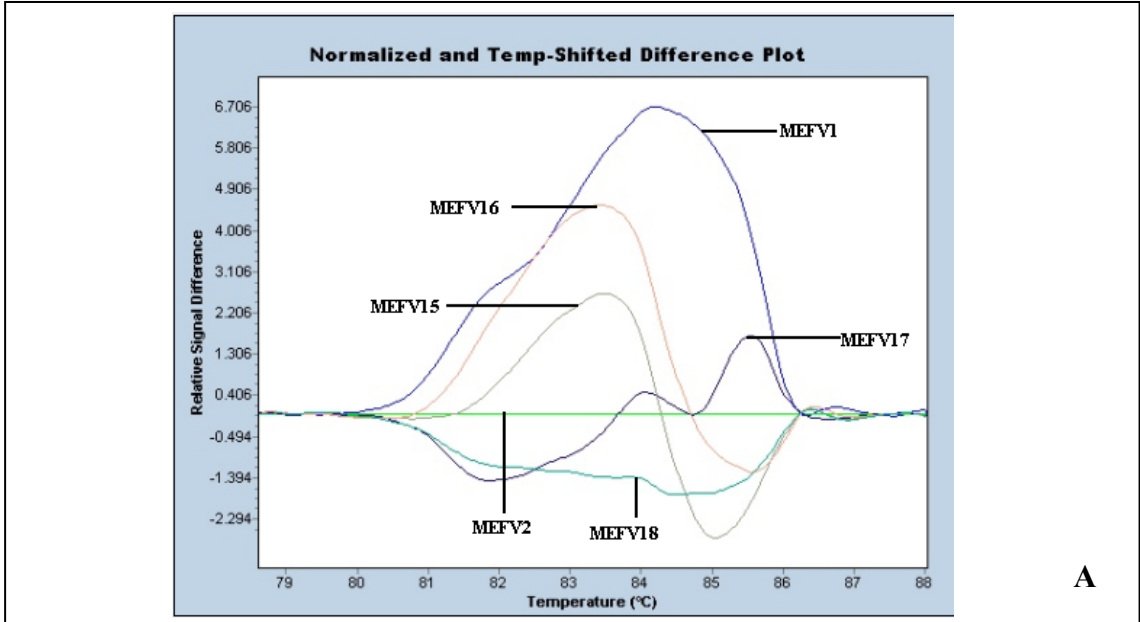
A



B

Şekil 4.12. A: MEFV (V726A) örnekleri HRM analizi, **B:** MEFV (V726A) örnekleri DHPLC analizi

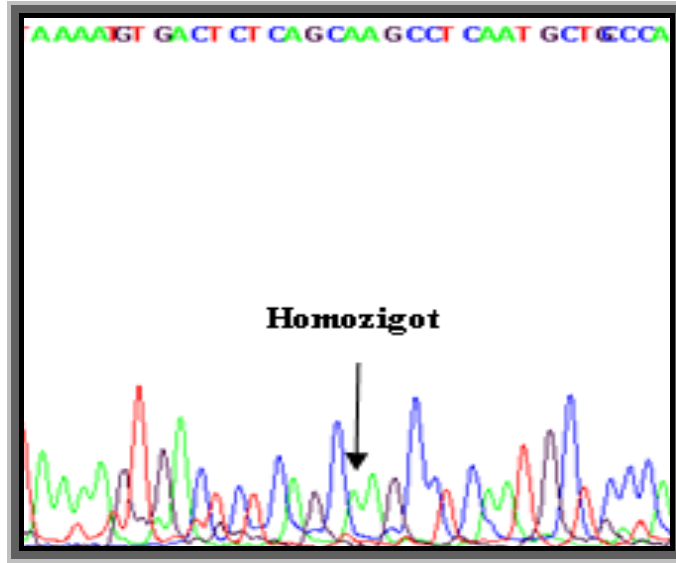
Örnek Genotipleri: 1.Yabancıl tip (MEFV2), 2.Yabancıl tip (MEFV1), 3.Heterozigot (MEFV8), 4.Heterozigot (MEFV9), 5.Heterozigot (MEFV10)



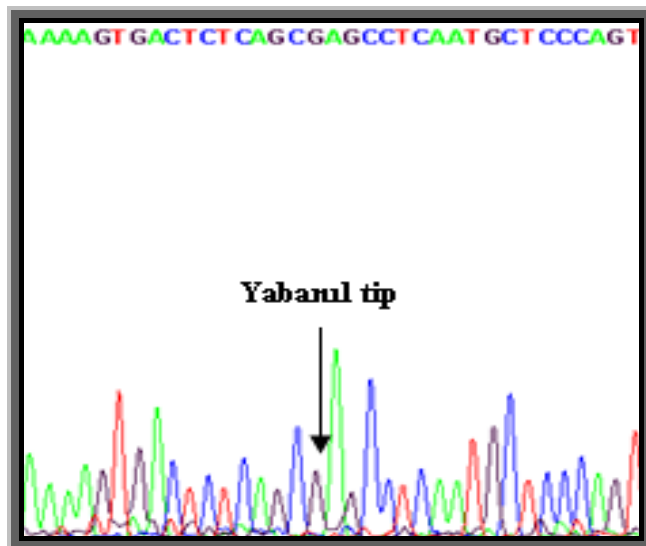
Şekil 4.13. A: MEFV (Bileşik Heterozigot) örnekleri HRM analizi, **B:** MEFV (Bileşik Heterozigot) örnekleri DHPLC analizi
 Örnek Genotipleri: 1.Yabanıl tip (MEFV2), 2.680/- 694/- (MEFV15), 3. 680/- 694/- (MEFV16), 4.680/- 726/- (MEFV17), 5.694/- 726/- (MEFV18)

4.4. Dizi Analizi

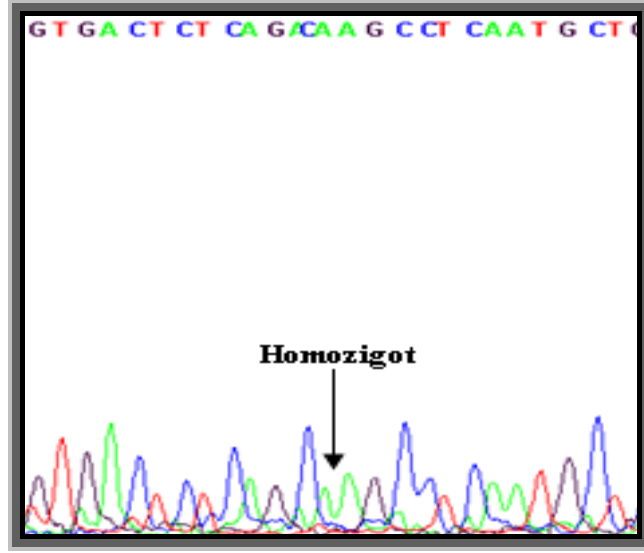
Protrombin genine ait örneklerin HRM analizinde üç temel grup oluşmuştur. Örnek erime profillerinin oluşturduğu bu istikrarlı erime görüntüleri örneklerin önceden RFLP ile belirlenmiş genotipleri ile korelasyon göstermemiştir. Bu uyumsuzluğu çözmek amacıyla yapılan DNA dizi analizi sonucunda ortaya çıkan genotip farklılıklarından bazıları Şekil 4.14.,4.15.,4.16.,4.17. ve 4.18’de verilmiştir.



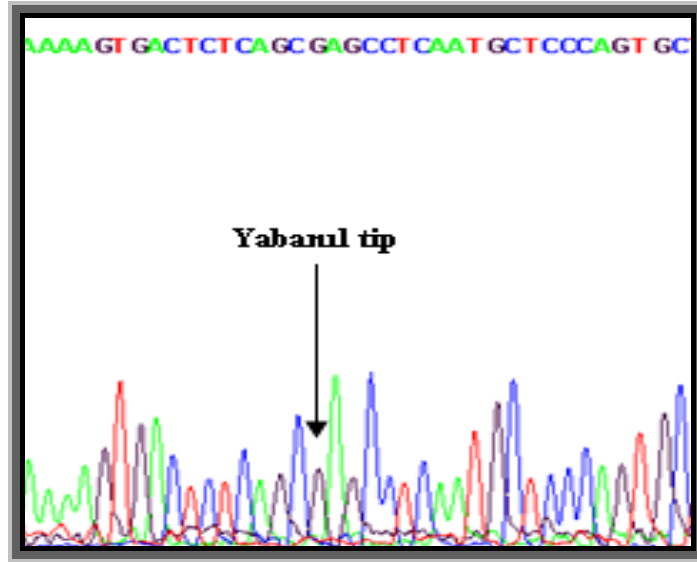
Şekil 4.14. Protrombin geni FII6 örneğine ait DNA dizi analizi (20210G>A mutasyonu)



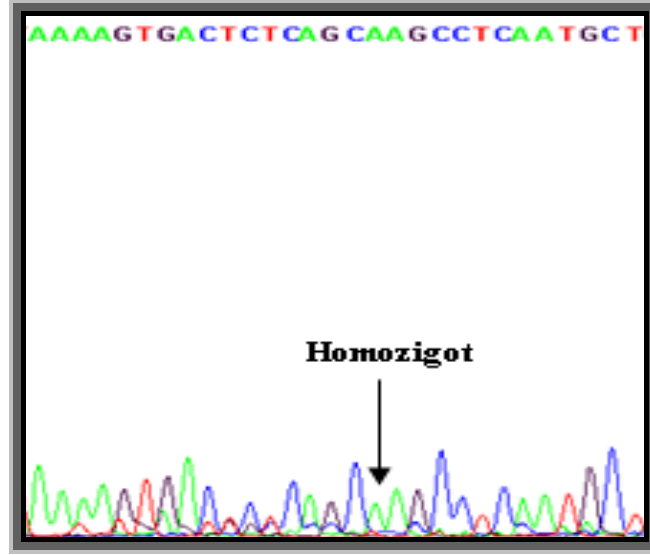
Şekil 4.15. Protrombin geni FII8 örneğine ait DNA dizi analizi



Şekil 4.16. Protrombin geni FII11 örneğine ait DNA dizi analizi (20210G>A mutasyonu)



Şekil 4.17. Protrombin geni FII13 örneğine ait DNA dizi analizi



Şekil 4.18. Protrombin geni FII15 örneğine ait DNA dizi analizi (20210G>A mutasyonu)

Çizelge 4.1. HRM analizi sonucunda erime profilleri farklılık gösteren örneklerin DNA dizi analizi sonuçları

Örnek	Genotip (belirtilen)	Dizi analizi sonucu
FII2	Heterozigot	Homozigot
FII6	Heterozigot	Homozigot
FII7	Yabancı tip	Heterozigot
FII8	Homozigot	Yabancı tip
FII10	Yabancı tip	Heterozigot
FII11	Heterozigot	Homozigot
FII12	Homozigot	Heterozigot
FII13	Homozigot	Yabancı tip
FII14	Yabancı tip	Heterozigot
FII15	Yabancı tip	Homozigot

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Mutasyon tarama ve tespiti, klinik teşhislerde ve klinik deneylerde olduğu kadar fonksiyonel genombilimde de genlerin yapı ve işlevlerine dair önemli bilgiler veren temel uygulamalar arasında en ön plana çıkmaktadır. Hem genetik hastalığa neden olan yeni mutasyonların saptanması hem de tanımlanmış mutasyonların taranması için geliştirilmiş birçok moleküler analiz yöntemi bulunmaktadır. Bu yöntemlere SSCP, RFLP, DNA dizi analizi, ASA, HA, TGCE, DHPLC örnek verilebilir. Bu yöntemlerin kendi içinde hassasiyet, çalışma süresi ve maliyet açısından avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin; yaygın olarak kullanılan SSCP analizi ekonomik, kolay bir yöntem olmakla birlikte hassasiyeti düşüktür (%60-%90) (Cotton 1993). DNA dizi analizi mutasyon taramasında altın standart olarak kabul edilen hassasiyeti oldukça yüksek bir yöntem olmasına rağmen maliyetlidir ve çok aşamalı bir prosedür gerektirmektedir. Bu tez çalışmasında ön tarama yöntemleri arasında hassasiyeti bakımından en çok öne çıkan teknik olan DHPLC ile buna alternatif olarak gösterilen yüksek çözünürlüklü erime tekniği kullanılarak mevcut iki sistemin nokta mutasyonlarını saptamadaki hassasiyet ve işlerliliği karşılaştırılmış, maliyet ve işlem hacmi açısından değerlendirilmesi yapılmıştır.

5.1. Faktör V Leiden 1691G>A

Tez çalışmasında Faktör V geninde 1691G>A mutasyonunun saptanması amacıyla çalışılan örneklerden heterozigot olanlar homozigot mutant ve yabanıl tip genotipe sahip olan örneklerden belirgin şekilde farklı bir erime eğrisi oluşturmuştur. Genotipi yabanıl tip olarak belirtilen örnek FV2'nin ve homozigot mutant olarak belirtilen örnek FV7'nin DNA dizi analizi sonucunda belirtilen genotiplerde oldukları doğrulanmıştır. Bu durumda HRM analizinin Faktör V genindeki nokta mutasyonu için sadece heterozigotları homozigotlardan başarılı bir şekilde ayırabildiği söylenebilir.

Aynı örneklerin DHPLC ile gerçekleştirilen mutasyon analizi sonucunda ise heterozigot örnekler için ait kromatogram yabanıl tip örneğe ait kromatogramla karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık görülürken yabanıl tip örnekle 1:1 oranında DNA seviyesinde karıştırılarak heterodupleks yapı oluşturulan homozigot mutant örneklerin kromatogramları heterozigot örnekler gibi bir profil göstermemiştir (Şekil 4.6.B).

5.2. Faktör II (Protrombin) 20210G>A

Faktör II geni 20210G>A mutasyonu için çalışılan örneklerin HRM analizi sonucunda birbirinden farklı üç net erime profili oluşmuş ancak erime profilleri ve belirtilen genotipler arasında bir korelasyon saptanamamıştır. Oluşan bu net ayırım dikkate alınarak belirtilen genotiplerde bir hata olabileceği düşünülmüş ve örneklerin DNA dizi analizi yapılmıştır. Dizi analizi neticesinde örneklerin RFLP ile belirlenen genotiplerden farklı olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 4.1) Bu durum HRM analizinin mevcut mutasyon için heterozigotları yabancı tip ve homozigot mutantlardan yüksek hassasiyet ve doğrulukla ayırdığını göstermiştir.

Protrombin örnekleriyle DHPLC'de yapılan mutasyon analizi sonucunda heterozigot örnekler için ait kromatogram yabancı tip örneğe ait kromatogramla karşılaştırıldığında bazı heterozigotlar yabancı tipten farklı bir profil gösterirken bazı örnekler ise yabancı tipe çok benzer profil göstermiştir. Elde edilen sonuçlara göre sistemin heterozigot örnekleri saptamada istrarlı bir başarı göstermediği söylenebilir.

5.3. MEFV

MEFV geni 2.ekzondaki E148Q mutasyonu ile 10.ekzondaki M680I, M694V ve V726A mutasyonlarının HRM ve DHPLC ile saptanması amaçlanmıştır.

E148Q mutasyonu

E148Q mutasyonu taşıyan heterozigot örneklerin HRM analizi sonucunda oluşturdukları erime eğrileri yabancı tip örnekten farklı bir profil göstermiştir. Aynı örneklerin DHPLC analizinde ise heterozigot olan iki örnek yabancı tip örneğe ait kromatogramla karşılaştırıldığında kromatogramlar yabancı tipten farklılık gösterirken (Şekil 4.9.B.2-4) heterozigot olan bir diğer örnek yabancı tipten aynı kromatograma sahiptir (Şekil 4.9.3).

M680I mutasyonu

HRM analizinde heterozigot örnekler yabancı tip ve homozigot mutant genotipe sahip örneklerden ayrılan, birbirlerine benzer eğriler oluşturmuşlardır (Şekil 4.10.A).

Aynı örnekler DHPLC ile analiz edildiğinde ise heterozigot örneklerin kromatogramları yabancı tip örneğe ait kromatogramdan farklılık göstermiştir (Şekil 4.10.B). Ancak yabancı

tiple 1:1 oranında karıştırılarak heterodupleks yapı oluşturulan homozigot mutant örneğin (MEFV7) ayrımı mümkün olmamıştır. Heterozigot örneklerin kromatogram görüntüleri yabancı tiple karşılaştırıldığında belirgin bir farklılık gözlenebildiği için benzer şekilde heterodupleks yapı oluşturulan örneklerin de aynı hassasiyette belirlenebilmesi beklenmektedir. DHPLC'nin oluşturulan heterodupleks yapıyı yakalayamaması denatürasyon-renatürasyon aşamasında heterodupleks oluşumunun tam anlamıyla başarılı bir şekilde gerçekleşmemesinden kaynaklanmış olabilir.

M694V mutasyonu

HRM analizi sonucunda M694V mutasyonu taşıyan heterozigot ve homozigot mutant örneklerin erime eğrileri yabancı tip örneğin erime eğrisinden farklıdır (Şekil 4.11.A). Aynı örnekler DHPLC'de analiz edildiğinde ise heterozigot örneklerin kromatogramları yabancı tipten belirgin bir farklılık göstermemiştir (Şekil 4.11.B). Yüksek çözünürlüklü erime analizi M694V mutasyonunu başarı ile saptarken DHPLC bu mutasyonu saptamada başarılı olamamıştır.

V726A mutasyonu

Mutasyon taşıyan heterozigot örneklerin tamamı HRM analizinde yabancı tipten farklı bir erime profili gösterirken (Şekil 4.12.A) aynı örneklerin DHPLC kromatogramları yabancı tiple kıyaslandığında belirgin bir farklılık gözlenmemiştir (Şekil 4.12.B). HRM analizi V726A mutasyonunu saptamada başarılı olurken DHPLC analizinden aynı sonuç alınamamıştır. Bu anlamda mevcut mutasyon için HRM'nin verim ve hassasiyetinin daha yüksek olduğu söylenebilir.

Bileşik Heterozigot (Compound Heterozigot)

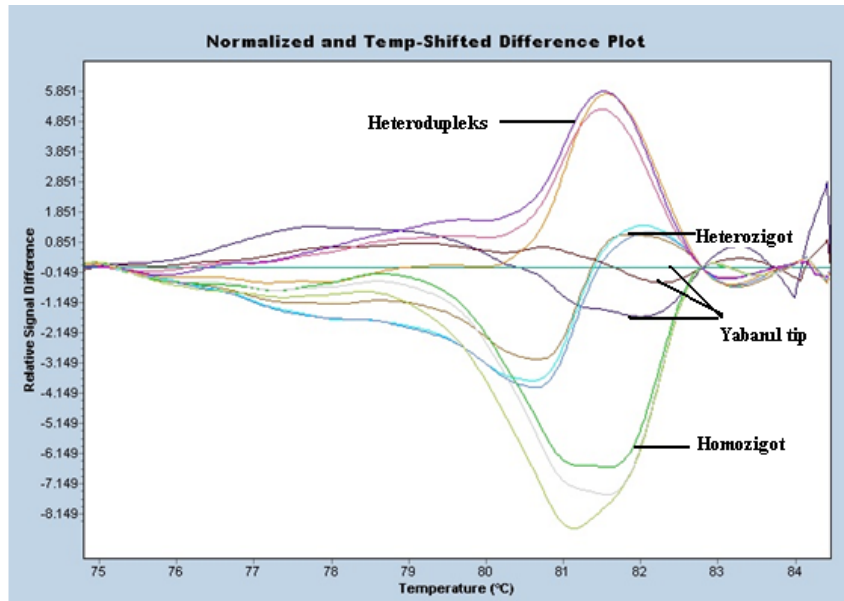
680/- 694/- mutasyonu taşıyan iki bileşik heterozigot örnek hem HRM analizinde hem de DHPLC'de belirlenebilmiştir (Şekil 4.13.A, Şekil 4.13.B.2-3).

680/- 726/-, 694/- 726/- mutasyonu taşıyan örnekler ise HRM analizinde saptanabilirken aynı örneklerin DHPLC kromatogramları yabancı tip örneğin kromatogramıyla kıyaslandığında belirgin bir farklılık görülmemiştir.

Homozigot Mutasyonların Tespitinde HRM ve DHPLC

Homozigot mutant örneklerin erime profilinde çok büyük farklılıklar gözlenmemektedir. Bu nedende özellikle DHPLC tekniğinde mutasyon taramasına tabi tutulan örneklerin DNA'ları yabancı tip örnek DNA'sı ile karıştırılarak analiz edilir. Tez çalışmada da bu prensip DHPLC için uygulanmış ancak HRM için uygulanmamıştır.

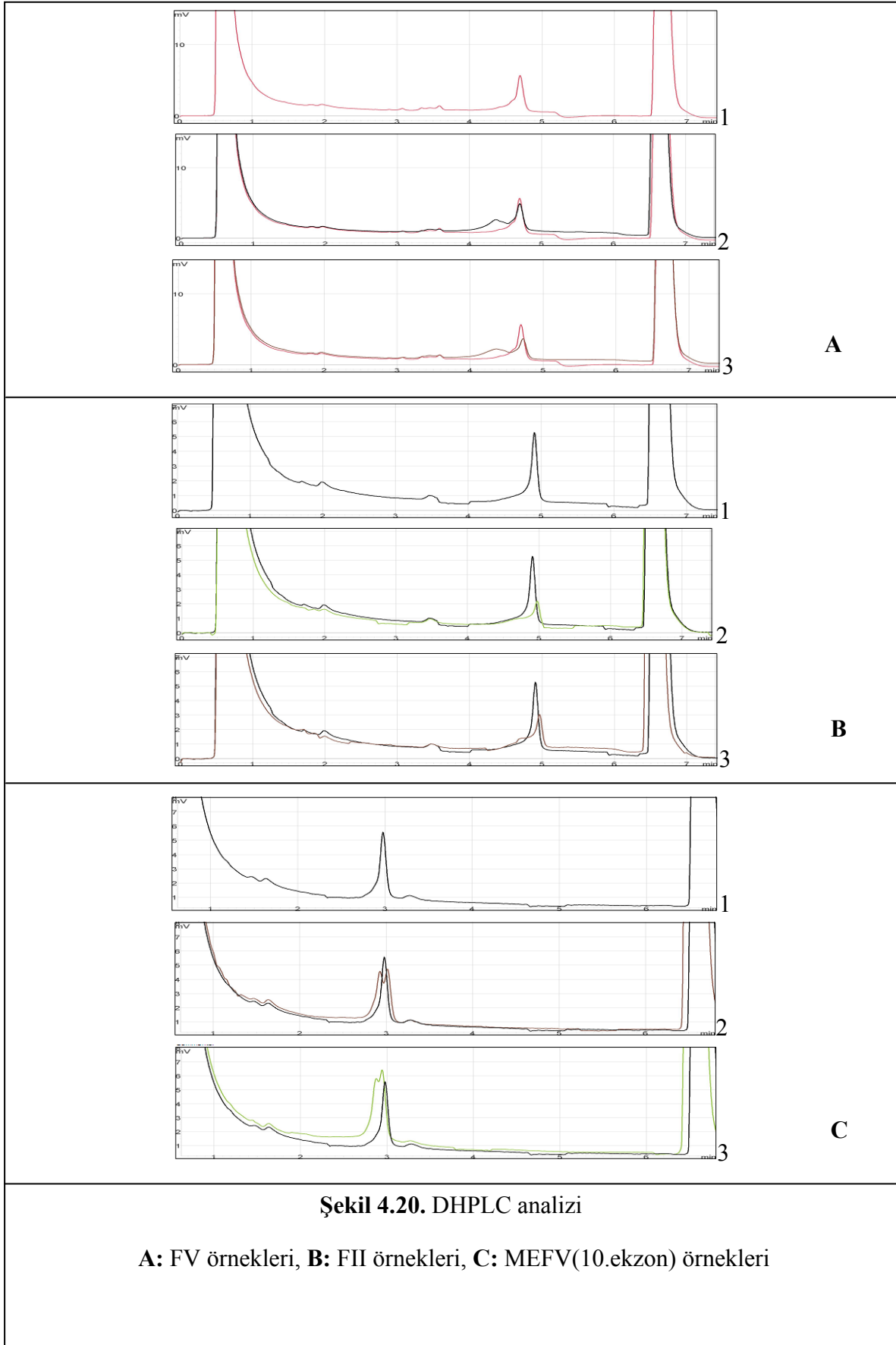
Bu sonuçlar üzerine benzer bir yaklaşımın HRM üzerine etkisi değerlendirmek üzere yabancı tip örnekle homozigot mutant örnek DNA'ları (Faktör II geni) karıştırılarak heterodupleks yapı oluşturulmuş ve bu şekilde HRM analizi yapılarak tekniğin hassasiyeti incelenmiştir. Analiz sonucunda heterodupleks form oluşturulan örneklerin orijinal heterozigotlarla benzer bir erime eğrisi oluşturduğu görülmüştür. Aynı zamanda bu denemede homozigot mutant, yabancı tip ve heterozigotların birbirinden net bir şekilde ayrılması tekniğin hassasiyetinin yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 4.19.)



Şekil 4.19. Heterodupleks form oluşturulan FII örneklerinin HRM analizi

Bu uygulamaya rağmen DHPLC'de homozigot mutasyonun saptanamamış olması karıştırılan DNA'ların aynı verimle amplifiye olmamasına bağlanabilir. DNA kalitesinin PCR verimine etkisi bilinmektedir (Furrer, Candrian et al. 1990). Bu olasılığı değerlendirmek üzere yabancı tip ve homozigot mutant örneklerin DNA'larını (MEFV, Faktör V ve Faktör II genleri) karıştırmak yerine PCR ürünleri karıştırılarak heterodupleks yapı oluşturulmuş ve DHPLC analizi gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda

heteroduplekslerin kromatogramları yabancı tipte karşılaştırıldığında MEFV geni örneklerine ait kromatogramlar yabancı tipten farklılık gösterirken Faktör V ve Faktör II örnekleri farklılık göstermemiştir. Bu şekilde heterodupleks yapı oluşumu MEFV genine ait örneklerde daha başarılı olmuştur.



Mutasyon ve tek nükleotid polimorfizmi gibi bilinmeyen baz değişimlerinin saptanmasında kullanılan metodların hassasiyet ve özgülüğü üzerine yapılan bir çalışmada amplikonun GC içeriğinin ve büyüklüğünün, gerçekleşen nükleotid değişimi ve bunun dizideki lokasyonunun, kullanılan tekniğin mevcut mutasyonu saptama ve taramadaki hassasiyetini ve özgülüğünü etkilediği gösterilmiştir (Highsmith WE Jr 1999). Yapılan bu çalışmada SSCP, HA gibi yöntemler kullanılmıştır. Bizim alışmamızda kullandığımız DHPLC de heterodupleks analiziyle aynı prensibe dayanan bir teknik olduğu için sözü edilen etkilerin geçerli olduğu söylenebilir. MEFV geni 10.ekzonda bulunan mutasyonların taranmasında tek bir primer kullanılmış olduğu için amplikonun GC içeriği ve boyutu bu mutasyonların belirlenmesinde etkili değildir. Ancak, mutasyonların dizi içerişindeki konumlarının farklı olması bu ekzondaki M694V ve V726A mutasyonunun DHPLC ile saptanamamasının nedeni olabilir.

Mutasyon taraması sonucunda incelenen bazı örneklerde beklenen profillerin gözlenememesi cihazın hassasiyetinden kaynaklanmış olabilir. BRCA1/2 mutasyonlarının taranmasında iki farklı HRM platformu kullanılmış ve sistemlerden alınan sonuçlar karşılaştırılmıştır (De Leeneer, Coene et al. 2008). LightCycler480'de başlangıçta 97 heterozigot örneğin 92'si belirlenebilirken 0,3 olan hassasiyet ayarı 0,5'e arttırıldığında tamamı belirlenebilmiştir. Tez alışmasında HRM analizinde LightCycler480 (Roche) real-time PCR cihazı kullanıldığı için benzer bir uygulamayı denememize rağmen sonuçlarda net bir değişim gözlenmemiştir.

Yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada HRM analizinin hassasiyet ve özgülüğünün tarama metodlarından geçerli bir altın standart yöntem olarak kabul edilen DHPLC'den daha iyi olduğu gösterilmiştir (Chou, Lyon et al. 2005). Bizim alışmamızda da mevcut mutasyonların belirlenmesinde HRM analizinin hassasiyetinin DHPLC'den daha iyi olduğu görülmüştür. DHPLC tekniğinde analiz edilecek hedef bölgenin amplifikasyonu gerçekleştirilip PCR ürünleri agaroz jel elektroforeziyle görüntülenmekte daha sonra sistemde analiz gerçekleştirilmektedir. Aynı zamanda incelenen fragmentin baz dizisine bağlı olarak en az 2 farklı sıcaklıkta yürütülmesi gerekebilir. Her bir örneğin injeksiyonu tek tek yapılmakta ve 7 dakika sürmektedir. Bu nedenlerle DHPLC analizi uzun zaman almaktadır (96 örneğin analizi 22,5 saat). HRM analizinde ise 96'lık veya 384'lük plateler kullanıldığı için işlem hacmi DHPLC'den daha yüksektir. Analiz tüm örneklere aynı anda uygulandığı için DHPLC'ye göre çok daha kısa sürede sonuç alınmaktadır (1,5 saat). HRM

analizi başta DHPLC olmak üzere diğer tarama teknikleriyle karşılaştırıldığında dikkate değer bir zaman ve maliyet avantajı taşımaktadır. HRM'nin maliyeti DHPLC'ye göre dört kat daha azdır.

HRM analizi geniş ölçekli populasyon tarama çalışmalarında bilinen ya da şüpheli mutasyonların karakteristiğinin anlaşılmasında kullanılabilir. Her bir mutasyon karakteristik bir erime profiline neden olduğu için sadece kontrol (yabanıl tip) kullanılarak tanımlama yapmak mümkündür. Ancak farklı mutasyonların aynı profili gösterebileceği durumlar olabileceği için klinik teşhislerde HRM sonucunda mutasyon pozitif görülen hastalarda sekans yapılarak sonuçlar doğrulanmalıdır. Bu anlamda dizi analizi maliyetli bir yöntem olduğu için HRM analizi ön tarama yapmak amacıyla öncelikli olarak tercih edilmesi gereken bir teknik olarak öne çıkmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Akar N, Mısıroğlu M, Yalçinkaya F, Akar E, Çakar N, Tümer N, Akçakus M, Tastan H, Matzner Y (2000). "MEFV mutations in Turkish patients suffering from familial mediterranean fever." *Human Mutation* 15: 118-119.
2. Akar N, Y. F., Akar E, Çakar N. (1999). "MEFV Mutation Analysis in Turkish FMF Patients with amyloidosis. ." *Amyloid* 6(4):301-302.
3. Akar N, Mısırlıoğlu M, Akar E, et al. Prothrombin gene 20210 G-A mutation in the Turkish population. *Am J Hematol* 1998;58:249.
4. Akar N, Akar E, Dalgın G, et al. Frequency of factor V 1691 G-A mutation in Turkish population. *Thromb Haemost* 1997;78:1527-8.
5. Alberts B., J. A., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Walter P., Ed. (2002). *Molecular Biology of the Cell*.
6. Bakkaloğlu, A. (2003). "Familial Mediterranean Fever" *Pediatr Nephrology* 18:853-9.
7. Bengt Zöller, P. G. D. Frutos, et al. (1999). "Trombophilia as a multigenic disease." *Haematologica* 84: 59-70.
8. Bertina, R. M., B. P. Koeleman, et al. (1994). "Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C." *Nature* 369(6475): 64-7.
9. Chak, M., G. R. Wallace, et al. (2001). "Thrombophilia: genetic polymorphisms and their association with retinal vascular occlusive disease." *Br J Ophthalmol* 85(7): 883-6.
10. Chou, L. S., E. Lyon, et al. (2005). "A comparison of high-resolution melting analysis with denaturing high-performance liquid chromatography for mutation scanning: cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene as a model." *Am J Clin Pathol* 124(3): 330-8.
11. Consortium, T. F. F. (1997). " A candidate gene for familial Mediterranean fever." *Nat Genet* 17:25–31.
12. Corbett Life Science. (Eylül 2006). High resolution melt assay design and analysis Avustralya: Corbett Research.
13. Cotton, R. G. (1993). "Current methods of mutation detection." *Mutat Res* 285(1): 125-44.
14. Cotton R. G. and O. Horaitis (2002). "The HUGO Mutation Database Initiative. Human Genome Organization." *Pharmacogenomics J* 2(1): 16-9.

15. Dahlback B., C. M., Svensson PJ (1993). " Familial thrombophilia due to a previously unrecognized mechanism characterized by poor anticoagulant response to activated protein C " *Proc Natl Acad SciUSA* 90: 1004-1008, 1993.
16. De Leeneer, K., I. Coene, et al. (2008). "Rapid and sensitive detection of BRCA1/2 mutations in a diagnostic setting: Comparison of two High-Resolution Melting Platforms." *Clin Chem*.
17. Egeberg, O. (1965). "On the natural blood coagulation system. Investigations of inhibitor factors based on antithrombin deficient blood." *Thromb Diath Haemorrh* . 14: 473-89.
18. Eldad Ben-Chetrit, M. L. (1998). "Familial Mediterranean fever." *Lancet* 351: 659–64.
19. Furrer, B., U. Candrian, et al. (1990). "Improving PCR efficiency." *Nature* 346(6282): 324. Gershoni-Baruch R, S. M., Leah K, Badarnah K, Brik R. (2001). "Familial Mediterranean fever: prevalence, penetrance and genetic drift." *Eur J Hum Genet* 9:3-7.
20. Herrmann, M. G., Durtschi, J.D., Bromley, L.K., Wittwer, C.T. ve and K. V. Voelkerding (2006). "Amplicon DNA melting analysis for mutation scanning and genotyping: cross-platform comparison of instruments and dyes." *Clinical Chemistry*, 52, 494-503.
21. Highsmith WE Jr, J. Q., Nataraj AJ, O'Connor JM, Burland VD, Baubonis WR, Curtis FP, Kusukawa N, Garner MM. (1999). "Use of a DNA toolbox for the characterization of mutation scanning methods. I: construction of the toolbox and evaluation of heteroduplex analysis." *Electrophoresis*. Jun;20(6):1186-94.)
22. Hsia AP, W. T., Chen HD, Liu Z, Yandea-Nelson MD, Wei Y, Guo L, Schnable PS (2005). " Temperature gradient capillary electrophoresis (TGCE)—a tool for the high-throughput discovery and mapping of SNPs and IDPs." *Theoretical and Applied Genetics* Jul;111(2):218-25.
23. Hung, C. C., C. N. Lee, et al. (2008). "Genotyping of the G1138A mutation of the FGFR3 gene in patients with achondroplasia using high-resolution melting analysis." *Clin Biochem* 41(3): 162-6.
24. J. Craig Venter, e. a. (2001). "The Sequence of the Human Genome." *Science* 291, 1304
25. Jesse Montgomery, C. T. W., Robert Palais & Luming Zhou (2007). "Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution melting analysis." *Nature Protocols* 2.1.
26. Kennerson, M. L., T. Warburton, et al. (2007). "Mutation scanning the GJB1 gene with high-resolution melting analysis: implications for mutation scanning of genes for Charcot-Marie-Tooth disease." *Clin Chem* 53(2): 349-52.

27. Klug, W. S., M. R. Cummings, et al. (2006). Concepts of Genetics.
28. Koster T, B. A., Briet E, Vandenbrouke JP, Rosendaal FR: (1995). "Role of clotting factor VIII in effect of von Willebrand factor on occurrence of deep venous thrombosis. ." Lancet 345:152,.
29. Kozłowski, P., M. Olejniczak, et al. (2005). "Rapid heteroduplex analysis by capillary electrophoresis." Clin Chim Acta 353(1-2): 209-14.
30. Krypuy, M., G. M. Newnham, et al. (2006). "High resolution melting analysis for the rapid and sensitive detection of mutations in clinical samples: KRAS codon 12 and 13 mutations in non-small cell lung cancer." BMC Cancer 6: 295.
31. Laurie, A. D., M. P. Smith, et al. (2007). "Detection of factor VIII gene mutations by high-resolution melting analysis." Clin Chem 53(12): 2211-4.
32. Li Q, L. Z., Monroe H, Culiati CT (2002). " Integrated platform for detection of DNA sequence variants using capillary array electrophoresis" Electrophoresis;23:1499–511.
33. Lidar, M. and A. Livneh (2007). "Familial Mediterranean fever: clinical, molecular and management advancements." Neth J Med 65(9): 318-24.
34. Liew, M., R. Pryor, et al. (2004). "Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons." Clin Chem 50(7): 1156-64.
35. Livhen A, L. P., Zemer Det al (1997). "Criteria for the diagnosis of familial Mediterranean fever. ." Arthritis Rheum 40: 1879-1885.
36. M Greaves , F. P. (1999). "Pathogenesis of thrombosis: antitrombotic therapy: Postgraduate haemathology Ed: AV Hoffbrand et al, fourth edition, Butterworth-Heinemann." 653-674.
37. M. Roxane Bonner, L. W. B. (1999). "Considerations in adding mutation detection services to a sequencing core facility."
38. Margraf, R. L., R. Mao, et al. (2006). "Mutation scanning of the RET protooncogene using high-resolution melting analysis." Clin Chem 52(1): 138-41.
39. Montgomery, J., C. T. Wittwer, et al. (2007). "Scanning the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene using high-resolution DNA melting analysis." Clin Chem 53(11): 1891-8.
40. Montgomery, J., C. T. Wittwer, et al. (2007). "Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis." Nat Protoc 2(1): 59-66.
41. Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer, V3.0.1 Users manual, 2004

42. Nataraj, A. J., I. Olivos-Glander, et al. (1999). "Single-strand conformation polymorphism and heteroduplex analysis for gel-based mutation detection." *Electrophoresis* 20(6): 1177-85.
43. Oefner, W. X. a. P. J. (2001). "Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review" *Human Mutation* 17:439-474.
44. Palais, R., Liew, M.A. ve Wittwer, C.T. (2005). "Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping." *Analytical Biochemistry*, 346, 167-175.
45. Poort SR, R. F., Reitsma PH, Bertina RM. (1996). "A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis." *Blood*. Nov 15;88(10):3698-703.
46. Pourzand, C. and P. Cerutti (1993). "Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR." *Mutat Res* 288(1): 113-21.
47. Reed, G. H. and C. T. Wittwer (2004). "Sensitivity and specificity of single-nucleotide polymorphism scanning by high-resolution melting analysis." *Clin Chem* 50(10): 1748-54.
48. Ririe, K. M., Rasmussen, R.P. ve Wittwer, C.T. (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." *Analytical Biochemistry*, 245, 154-160.
49. Ririe KM, R. R., Wittwer CT (1997). "Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction." *Anal Biochem* 245(2): 154-60.
50. Rosendaal, F. R. (1999). "Venous thrombosis: a multicausal disease" *The Lancet* Vol: 353
51. Rosendaal FR, D. C., Zivelin A, Arruda VR, Aiach M, Siscovick DS, Hillarp A, Watzke HH, Bernardi F, Cumming AM, Preston FE, Reitsma PH. (1998). "Geographic distribution of the 20210 G to A prothrombin variant." *Thromb Haemost.* 1998 Apr;79(4):706-8.
52. Rozen, S. and H. Skaletsky (2000). "Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers." *Methods Mol Biol* 132: 365-86.
53. Sambrook J, F. E., Maniatis T. , Ed. (1989). *Molecular Cloning*
54. Seipp, M. T., D. Pattison, et al. (2008). "Quadruplex genotyping of F5, F2, and MTHFR variants in a single closed tube by high-resolution amplicon melting." *Clin Chem* 54(1): 108-15.

55. Takano, E. A., G. Mitchell, et al. (2008). "Rapid detection of carriers with BRCA1 and BRCA2 mutations using high resolution melting analysis." *BMC Cancer* 8: 59.
56. Takeda, S., Ichii, S. and Nakamura, Y. (1993). "Detection of K-ras mutations in sputum by mutant allele specific amplification (MASA)." *Human Mutation* 2, p. 112.
57. Tawata, M., K. Aida, et al. (2000). "Screening for genetic mutations. A review." *Comb Chem High Throughput Screen* 3(1): 1-9.
58. Theru A. Sivakumaran, K. K., Peter J. Oefner (2003). "Denaturing high performance liquid chromatography in the molecular diagnosis of genetic disorders." *Current Science*, Vol. 84.
59. Tomita, N. and M. Oto (2004). "Molecular genetic diagnosis of familial tumors." *Int J Clin Oncol* 9(4): 246-56.
60. United Kingdom, National Genetics Reference Laboratory (Wessex).
61. Wenzhong Xiao, P. J. O. (2001). "Denaturing High-Performance Liquid Chromatography: A Review." *Human Mutation* 17: 439-474
62. Willie Girald-Rosa, R. A. V., Amy C. Musiek, James E. Sligh (2005). "High-Throughput Mitochondrial Genome Screening Method for Nonmelanoma Skin Cancer Using Multiplexed Temperature Gradient Capillary Electrophoresis." *Clinical Chemistry* 51: 2 305–311.
63. Willmore-Payne, C., J. A. Holden, et al. (2005). "Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis." *Hum Pathol* 36(5): 486-93.
64. Wittwer, C. T., G. H. Reed, et al. (2003). "High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen." *Clin Chem* 49(6 Pt 1): 853-60.
65. White, H. ve Potts, G. (2006). Mutation scanning by high resolutionmelt analysis. Evaluationof RotorGene™ 6000 (Corbett Life Science), HR1™ and 384 well LightScanner™ (Idaho Technology).
66. Zöller B, B. A., García de Frutos P, Dahlbäck B. (1995). "Resistance to activated protein C as an additional genetic risk factor in hereditary deficiency of protein S." *Blood*. Jun 15;85(12):3518-23.
67. tip.kou.edu.tr/docs/tibbi_biyoloji/laboratuvarII.doc
68. www.nature.com/.../images/nprot.2006.485-F1.jpg
69. fokker.wi.mit.edu/primer3/input.htm

70. <http://insertion.stanford.edu/pub.html>
71. <http://www.path.utah.edu/news/hi-res-dna-melting-analysis>
72. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=MEFV>
73. <http://nar.oxfordjournals.org/cgi/content-nw>
74. <http://www.nobelmedicus.com/contents/200511/18-21.htm>
75. <http://www.sars.no/facilities/sequencing.php>
76. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>
77. www.med.unibs.it/~marchesi/pcr.gif
78. <http://nationaldiagnostics.com>
79. http://www.aocareggi.toscana.it/citogenetica/Genetica%20Molecolare_it.htm
80. http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/derleme/d_dhpcl.pdf
81. <http://tr.wikipedia.org>

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hülya SÜMER

Doğum Yeri : ANKARA

Doğum Tarihi : 02 / 07 / 1983

Medeni Hali : Bekar

Yabancı dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Ankara Kurtuluş Lisesi, 2001

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, 2005