

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Homosistein Metabolizmasında Rol
Oynayabilecek Gen Değişimlerinin
İncelenmesi**

Biyolog Lütfiye Yasemin Koç

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nejat AKAR**

**ANKARA
2007**

ÖZET

Homosistein Metabolizmasında Rol Oynayabilecek Gen Değişimlerinin İncelenmesi

Bu araştırmada homosistein metabolizmasında görevli olan MTHFR enzimindeki 677. nükleotitte gerçekleşen CT değişimi, CBS enzimindeki 844. nükleotitteki 68bç'lik insersiyon, TYMS enziminin 3'UTR bölgesindeki 6 bç'lik insersiyon/delesyon ve DHFR enzimindeki 19 bç'lik delesyon incelenmiş, ayrıca bu mutasyonların homosistein düzeyi üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Önceki çalışmalarda MTHFR, CBS ve TYMS enzimlerindeki mutasyonlar konu olmuşken DHFR enzimi ile ilgili yapılan bu çalışma Türk toplumunda ilk kez konu olmuştur. Ayrıca yapılan çalışmalarda enzimlerdeki mutasyonlar bir hastalıkla ilişkilendirilmişken bu araştırmada herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş ve önceden homosistein düzeyi belirlenmiş 296 birey çalışma grubunu oluşturmuştur.

Çalışmada MTHFR 677 CT değişimi için Real-Time PCR yöntemi uygulanırken; CBS 844ins68, DHFR 19 bç'lik delesyon ve TYMS 3'UTR 6bç'lik insersiyon/delesyon mutasyonları tespiti için PCR yöntemi yapılmıştır. TYMS 3'UTR 6bç'lik insersiyon/delesyon için PCR ürünü eldesinden sonra restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. Elde edilen veriler non-parametrik analiz yöntemleriyle değerlendirilmiştir.

Yapılan analizlerle tüm enzimler tek tek incelenmiş ve enzimler arası korelasyon analizleri yapılmıştır. Sonuç olarak homosistein düzeyi üzerine MTHFR 677 CT değişimi için mutant genotip olan TT genotipinin bir risk faktörü olduğu bulunmuştur. Diğer analizlerde istatistiksel bir anlam bulunmamıştır.

Anahtar kelimeler: Homosistein (tHcy), Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR), Dehidrofolat redüktaz (DHFR), Sistatyon β sentaz (CBS), Timidilat Sentaz (TYMS)

ABSTRACT

Genetic Polymorphism at Homocysteine Metabolism Related Genes

In this study, CT replacement in the 677th nucleotide in MTHFR enzyme involved in homocysteine metabolism, 68 bp insertion in the 844th nucleotide in CBS enzyme, 6bp insertion/deletion in the region of 3'UTR in TYMS enzyme and 19 bp deletion in DHFR enzyme were investigated. The effects of these mutations over homocysteine levels were also studied. In previous studies the main subjects were mutations in MTHF, CBS and TYMS enzymes. However, DHFR enzyme of Turkish society was studied first time in this work. Although the mutations have been related with illnesses in the previous works, 296 individuals with known homocysteine levels and individuals who's any mutations not related with any illnesses were used in this study.

Real-Time PCR method was used for a MTHFR 677 CT replacement. The CBS844ins68 and DHFR 19 bp deletion were studied using Polymerase Chain Reactions. TYMS 3'UTR 6bp insertion/deletion mutations were studied using Polymerase Chain Reaction based Restriction Fragment Polymorphism (PCR-RFLP). Obtained data was evaluated with non-parametric analyze methods.

All enzymes were studied and correlation analyzes were tested between enzymes. As a result; it is discovered that TT genotype could be a risk factor for mutant genotype MTHFR 677 CT over homocysteine levels. There was no statistical meaning in other analyzes.

Key words: Homocysteine (tHcy), Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), Dehydrofolate reductase (DHFR), Cystatione β syntase (CBS), Thymidylate Synthase (TYMS)

ÖNSÖZ

Tezin oluşturulması sırasında beni yönlendiren, çalışmanın gereklerini öğreten sayın hocam Prof. Dr. Nejat Akar'a, bilgilerinden faydalandığım hocam Doç.Dr. Mustafa Tekin'e, tez çalışmalarım boyunca vakit ayırıp değerli fikirleriyle çalışmalarına katkıda bulunan ve beni yönlendiren değerli ablam Uzm. Bio. Ece Akar'a, veri analizlerinde yardımcı olan Yrd.Doç.Dr. Sibel Aşçıoğlu'na ve Doç.Dr. M.Mahir Özmen'e, çalışmalarım boyunca bilimsel tecrübelerini paylaşan, hayatın güzel anlarını yaşatan ablam Uzm.Bio.Yonca Eğin'e, neşesiyle hep yanımda olan ablam Dilek Çetin'e, her türlü tecrübesiyle ve arkadaşlığıyla yanımda olan Uzm. Bio. Ayşenur Öztürk'e, tezime başladığım andan itibaren bana yardımcı olan Dr. Erkan Yılmaz'a, Dr. Duygu Özel Demiralp'e, Vet.Hek. Gamze Özsöz Turunç'a, Bio. Didem Torun'a, Bio. Zehra Veli'ye, Uzm. Bio. İdil Arslan'a, Bio. Emel Uslu'ya, Tkn. Kadir Sipahi'ye, Tkn. Çiğdem Arslan'a ve tüm diğer Moleküler Patoloji ve Genetik laboratuvarında çalışan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca, her adımında yanımda olan, hayallerimi devam ettirmem için manevi desteklerini usanmadan gösteren, her zaman yüzümdeki gülümseme olan başta annem, babam, abim ve biricik babaannem olmak üzere sevgili aileme teşekkür ederim.

Lütfiye Yasemin Koç
Temmuz 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET		i
ABSTRACT		ii
TEŞEKKÜR		iii
İÇİNDEKİLER		iv
SİMGELER ve KISALTMALAR		vi
ŞEKİLLER		ix
TABLolar		x
DİZİLER		xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ		1
1.1	Genel Bilgiler	3
1.1.1	Homosistein	3
1.1.2	Homosistein Metabolizması	4
1.1.3	Homosistein Metabolizmasındaki Bozukluklar	7
1.1.4	Hiperhomosisteinemi nedenleri	10
1.1.5	Folik Asidin Önemleri	11
1.1.6	Homosistein Metabolizmasında Görev alan Enzimler	14
1.1.5.1.	Metilentetrahidrofolat Redüktaz	14
1.1.5.2.	Dehidrofolat Redüktaz	18
1.1.5.3.	Sistationin B Sentaz	21
1.1.5.4.	Timidilat Sentaz	23
1.1.5.5.	Moleküler Teknikler	26
1.2.1	DNA Ekstraksiyonu	26
1.2.2	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	26
1.2.3	Restriksiyon Enzimleriyle Kesim	28
1.2.4	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	28
2. MATERYAL ve YÖNTEM		30
2.1	Yöntemler	30
1.1.6.	DNA Ekstraksiyonu	30
1.1.7.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	31

1.1.7.1.	CBS 844ins68 Mutasyonu Tayini	31
1.1.7.2.	TYMS 3' UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyon tayini	32
2.1.2.2.1.	TYMS 3' UTR 6 bç'lik insersiyon / delesyon Mutasyonunun <i>Dra I</i> Enzimiyle Kesim Analizi	33
2.1.2.3.	DHFR 19 bç'lik Delesyonu Tayini	34
2.1.3.	Agaroz Jel elektroforezi	35
2.1.4.	MTHFR 677CT Polimorfizminin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Tayini	36
2.1.5.	Poliakrilamid Jel Elektrofezi	37
2.1.6.	Gümüş Boyama	38
2.1.7.	İstatistiksel Analiz	39
3. BULGULAR		40
4. TARTIŞMA		52
KAYNAKLAR		57
ÖZGEÇMİŞ		70

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	: Adenin bazı
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATP	: Adenozin trifosfat
BBF	: Bromfenol mavisi
Bç	: Baz çifti
C	: Sitozin bazı
°C	: Santigrat derece
CBS	: Sistation β Sentaz
cDNA	: Tamamlayıcı Deoksiribonükleik asit
CI	: Güven Aralığı
Cys	: Sistein aminoasiti
ddH ₂ O	: Deiyonize su
del	: Delesyon
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
DHFR	: Dehidrofolat Redüktaz
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
g	: Gram
G	: Guanin bazı
HCl	: Hidroklorik asit
HPCL	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
K ⁺	: Potasyum iyonu
kb	: Kilobaz
KCl	: Potasyum Klorür
kDa	: Kilo dalton
KHNO ₃	: Potasyum Bikarbonat
L	: Litre
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
M	: Molar
MA	: Molekül ağırlığı
mRNA	: Mesajcı RNA
MTHF	: Metilentetrahidrofolat
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz

MS	: Metilen sentaz
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
Met	: Metiyonin aminoasiti
mg	: Miligram
Mg^{+2}	: Magnezyum iyonu
MgCl_2	: Magnezyum klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür
NH_4Cl	: Amonyum Klorür
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NADPH	: Yükseltilmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
OR	: Odds Değerleri
p	: Kromozomun kısa kolu
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
pH	: Asitlik-Bazlık Derecesi
pmol	: Pikomol
RBC	: Kırmızı kan hücresi
rpm	: Dakikadaki dönüş sayısı
s	: Saniye
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
T	: Timin Bazı
Taq	: <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
TE	: Tris-EDTA
TEMED	: Tetraetilmetildiamin
TYMS	: Timidilat sentaz
UV	: Ultraviyole
V	: Volt
Val	: Valin aminoasiti

ŞEKİLLER

- Şekil 1. 1.** Metiyonin, homosisteinin ve sisteinin kimyasal yapısı
- Şekil 1. 2.** Homosistein metabolizması
- Şekil 1. 3.** Folat-homosistein yolağında görev yapan enzim ve genler
- Şekil 1. 4.** Folik asitin yapısı
- Şekil 1. 5.** Bağırak, karaciğer ve dokuda folik asit absorblanması ve aktivitesi
- Şekil 1. 6.** Farklı toplumlarda MTHFR 677 CT polimorfizminin mutant olan TT genotipinin sıklığı
- Şekil 2. 1.** CBS844ins68 mutasyonu PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı.
- Şekil 2. 2:** DHFR 19 bç'lik delesyonu PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı.
- Şekil 2. 3.** TYMS 3'UTR insersiyon/delesyonu için elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı
- Şekil 2. 4.** MTHFR 677 CT Geniş zamanlı PCR analizi
- Şekil 2. 5.** TYMS 3' UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyon mutasyonunun *Dra I* enzimi ile kesim ürünlerinin %10'luk PAGE görüntüsü.

TABLÖLAR

- Tablo 3. 1.** Çalışma grubuna ait homosistein düzey verilerinin dağılım tablosu.
- Tablo 3. 2.** Verilerin normal dağılım gösterebilmesi için yapılan değişimler.
- Tablo 3. 3.** MTHFR 677 C-T değişimine ait genotip dağılımı
- Tablo 3. 4.** MTHFR 677 CT genotip-homosistein dağılımı
- Tablo 3. 5.** MTHFR 677 CT genotiplerinin kendi aralarında karşılaştırılması
- Tablo 3. 6.** MTHFR 677 CT Kruskal-Wallis testi
- Tablo 3. 7.** DHFR 19 bç' lik delesyonu için genotip dağılımı
- Tablo 3. 8.** Farklı DHFR 19bç'lik delesyon genotip-homosistein dağılımı
- Tablo 3. 9.** DHFR 19bç'lik delesyon genotiplerinin kendi aralarında karşılaştırılması.
- Tablo 3. 10.** DHFR 19bç'lik delesyon Kruskal-Wallis testi
- Tablo 3. 11.** CBS 844insersiyon68 için genotip dağılımı
- Tablo 3. 12.** CBS 844ins68 Mutasyon genotip-homosistein dağılımı
- Tablo 3. 13.** CBS 844ins68 Mutasyon genotiplerinin kendi aralarında karşılaştırılması
- Tablo 3. 14.** CBS 844ins68 mutasyonu Kruskal-Wallis testi
- Tablo 3. 15.** TYMS 3' UTR 6 bç' lik insersiyon/delesyon için genotip dağılımı
- Tablo 3. 16.** TYMS 3'UTR 6 bç'lik İnsersiyon/Delesyon_genotip-homosistein dağılımı
- Tablo 3. 17.** TYMS 3'UTR 6 bç'lik İnsersiyon/Delesyon_genotiplerinin kendi aralarında karşılaştırılması
- Tablo 3. 18.** TYMS 3'UTR 6 bç'lik İnsersiyon/Delesyon_Kruskal-Wallis testi
- Tablo 3. 19.** Non-parametrik korelasyon analizi
- Tablo 3. 20.** Çoklu değişim analizi
- Tablo 3. 21.** Veri kodlaması
- Tablo 3. 22.** Enzim genotiplerinin kıyaslanmalarına göre beklenen homosistein ortalamaları

DİZİLER

- Dizi 1. 1.** CBS844ins68 mutasyonunun tespit edilebilmesi için çoğaltılan dizi
- Dizi 2. 1.** TYMS 3' UTR 6 bç 'lik insersiyon/delesyon mutasyonunun tespit edilebilmesi için çoğaltılan dizi
- Dizi 2. 2.** MTHFR 677 CT değişiminin tespit edilebilmesi için çoğaltılan dizi

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Homosistein, metiyoninden bir metil grubunun ayrılmasıyla ortaya çıkan ve proteinin primer yapısında yer almayan kükürtlü bir aminoasittir. Kimyasal adı 2-amino 4-merkaptobutirik asittir. Diyetle alınan metiyonin organizmada metiyonin adenozil transferaz enziminin etkisiyle önce S-adenozil metiyonine (SAM) daha sonra da S-adenozil homosisteine (SAH) dönüşür. SAH homosisteini oluşturmak üzere hidrolize olur. SAM, nükleik asitler, nörotransmitterler, fosfolipidler ve bazı hormonlar için metil donörüdür. Aynı zamanda SAM, homosisteinin hangi metabolik yola gireceğinin belirlenmesinde önemli bir regülatördür. Eğer SAM miktarı artarsa remetilasyon yolunun en önemli enzimi olan metilen tetrahidrofolat redüktaz enzimi inhibe olur ve fazla miktarda homosistein transsülfürasyon yoluna yöneltilir. (Dennis ve Robinson 1996)

Plazma homosistein konsantrasyonu çeşitli etmenler tarafından düzenlenir. Homosistein metabolizmasında rol oynayan sistatinyonin β sentaz, metilentetrahidrofolat redüktaz gibi enzimlerin kalıtsal defektlerinde hiperhomosisteinemi görülebilir. Folat, vitamin B₁₂ ve vitamin B₆ eksikliklerinin hiperhomosisteinemi etyolojisinde rolü olduğu bilinmektedir (Makris 2000).

Ayrıca pernisiyöz anemi, böbrek yetersizliği, hipotiroidizm, diabetes mellitus, çeşitli maligniteler (akut lenfoblastik lösemi, meme, over ve pankreas kanserleri) ve ciddi psöriazis gibi çeşitli hastalıklar da homosistein düzeylerini artırmaktadır (Makris 2000). Vücutta homosistein düzeylerindeki artışın önemi, erken yaşlarda gelişen ve hayatı tehdit edecek derecede önemli olabilen damar tıkanıklıklarına (beyin, kalp-koroner ve periferik) yol açmasıdır. Vurgulanması gereken önemli bir konu ise, hafif düzeylerdeki artışın bile damarlardaki tıkaçıcı mekanizmaları uyarabilmesidir. Yapılan geniş kapsamlı çalışmalarda, genel toplumda hiperhomosistein prevalansının %5, 60 yaş altında venöz tıkaçıcı damar hastalığı geçiren kişilerde %30.4, arteriyel tıkaçıcı damar hastalığı geçiren kişilerde ise % 37.5 olduğu saptanmıştır (Harker vd 1974).

Yüksek homosistein seviyeleri ile vasküler hastalıklar arasında sıkı bir bağlantı kurulmasının ardından klinik çalışmalarda da dikkat çeken bir yeri olmuştur. Hiperhomosisteinemi de serum lipid seviyelerinde bir değişikliğe neden olmazken, dolaşımdaki trombositleri ve pıhtılaşma faktörlerinin aktivitesini direk etkilediği düşünülmektedir. Bu yüzden homosisteinin vasküler doku üzerine olan etkisi daha fazla ilgi görmektedir (Lentz 1996) Homosistein asit gibi homosistein metabolitleri, hücre içi Ca^{+2} artışı ve proapoptotik proteinlerin aktivasyonu ile apoptozise neden olur. Bu nedenle homosistein düzeyinin artması, nörodejeneratif etkiler için potansiyel bir kaynak olmaktadır. Mekanizması tam olarak bilinmemekle beraber, homosisteinin çeşitli düzeylerde damar endotel disfonksiyonuna neden olduğu kabul edilmektedir (Engbersen vd 1995).

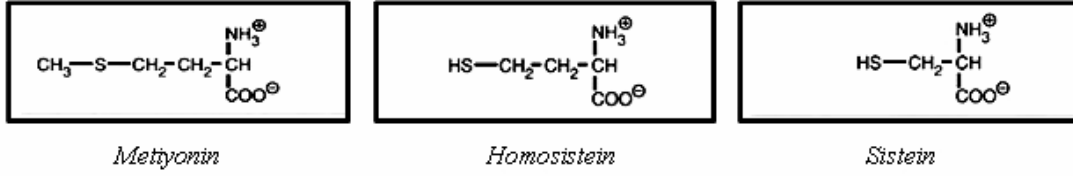
Bizim çalışmamızda amacımız; homosistein metabolizmasında rol oynayan metilentetrahidrofolat redüktaz 677 CT, dehidrofolat redüktaz 19 bç'lik delesyon, sistatyon β sentaz 844ins68 ve timidilat sentaz 3' UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyon mutasyonlarının homosistein düzeyine olan etkilerinin hiçbir hastalıkla ilişkilendirmemiş bireyler arasında incelenmesidir.

1.1. GENEL BİLGİLER

1.1.1. Homosistein

Homosistein (2-amino-4-merkaptobütirik asit), ilk olarak 1932 yılında Butz ve du Vigneaud tarafından tanımlanmıştır. Araştırmacılar insülin ile ilgili bir çalışma yaparken konsantre asit ile muamele edilmiş metiyoninden bir ara ürün elde etmişlerdir. Deney sırasında araştırmacıların insülinde bulunan sülfürü hesaba katmaları ve insülinde metiyoninin yokluğunu bilmemeleri homosisteinin keşfini sağlamıştır (Vigneaud 1952). Şekil 1’de homosistein, metiyonin ve sistein yapıları gösterilmektedir.

Hastalıklar ve yüksek homosistein seviyeleri arasındaki ilişki, 1962 yılında Carson ve Neil tarafından bulunmuştur. Araştırmacılar, mental geriliği olan çocukların idrarlarında homosistein seviyesinin yüksek olduğunu saptamışlardır (Carson ve ark. 1963). Homosisteinüri denilen bu durum, çocukluk çağı dahil olmak üzere hastaların %25’inin damar tıkanıklığı sonucu oluşan kardiyovasküler hastalıklardan ölmesiyle ilişkilendirilmiştir (Gibson 1964). Homosistein metabolizmasındaki bazı enzim eksikliklerinin, yüksek homosistein seviyesine sebep olduğu bulunmuştur (Gerritsen ve ark. 1962). 1964’te sistation β sentaz (CBS) enzimidaki genetik eksikliklerin, homosisteinüriye sebep olduğu ve plazma homosistein seviyesini artırdığı tespit edilmiştir (Mudd ve ark. 1964). 1969’da homosistein, aterosklerozlu hastaların patogenezinde rol oynayabilecek önemli bir aminoasit olarak ileri sürülmüştür (McCully 1969). Daha sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda homosistein metabolizmasında görev alan metiyonin sentaz (MS) ve metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) gibi enzimlerde eksikler saptanmıştır (Mudd ve ark. 1972, McGill ve ark. 1990, Rozen 1996). 1988 yılında yapılan çalışmada kobalaminin, metil kobalamine dönüşmesindeki bozukluk (Cbl G) sonucu MS aktivitesini azaltmakta olduğu ve multiple sklerozisi gösteren bulgular ortaya çıkardığı bildirilmiştir (Carmel ve ark. 1988).



Şekil 1.1: Metiyonin, homosistein ve sisteinin kimyasal yapısı.

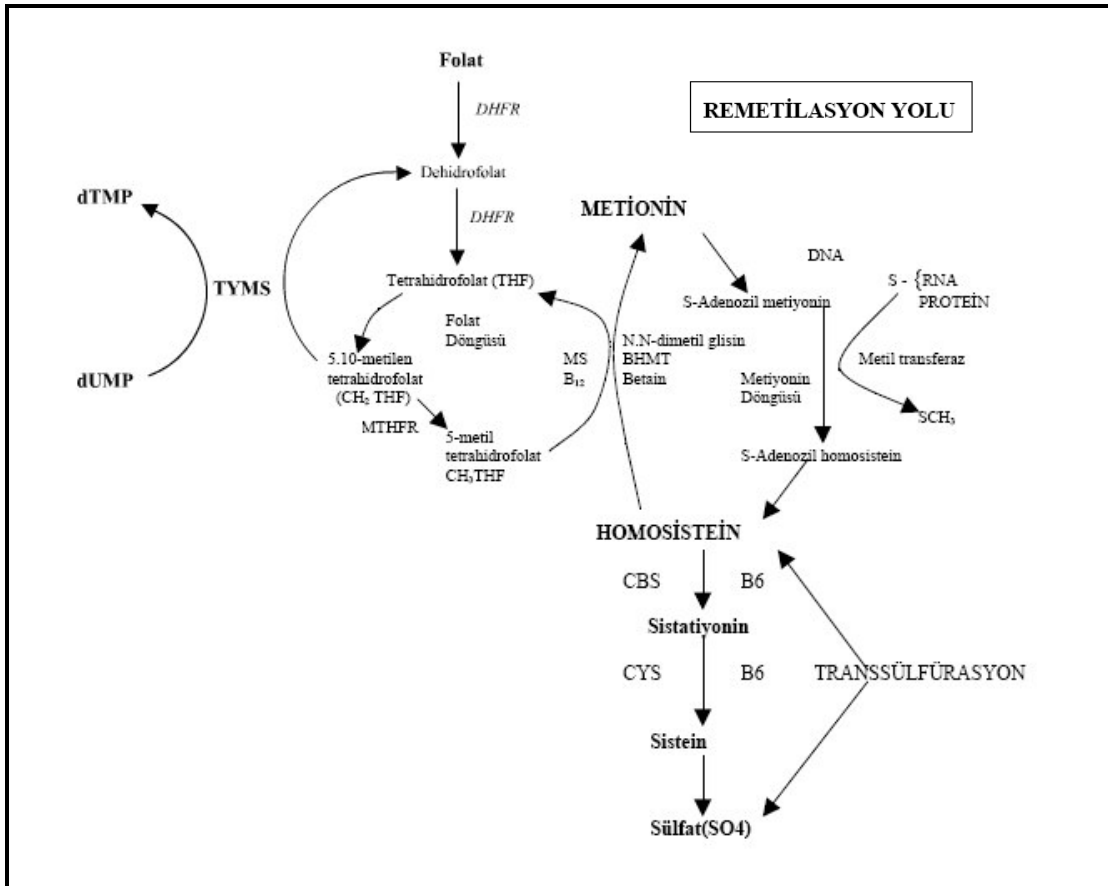
1. 1. 2. Homosistein Metabolizması

Homosistein, protein yapısında olmayan sülfürlü bir aminoasittir. Bu aminoasit, diyetle alınan ve endojen proteinlerden sentezlenen esansiyel bir aminoasit olan metiyoninin metil grubu alınmış bir türevidir. Remetilasyon yoluyla tekrar metiyonine dönüşerek ya da transsülfürasyon yoluyla sistein, metilmalonik ve 2-metilsitrik aside dönüşerek metabolize edilir (Bolander-Gouaille 2002). Tüm hücrelerde bulunan metiyonin, hem protein sentezi hem de S-Adonozilmetiyoninin (SAM) oluşmasını sağlayan bir maddedir. Metiyoninin ihtiva ettiği metil grubu, SAM'e dönüşümü sırasında aktive olur. SAM biçimlenmesi, adenozin 3-fosfat (ATP) ve metiyonin adenozil tranferaz enzimleri (MAT I, II, III) aracılığıyla gerçekleşir. Bu reaksiyonlarla hücre içi SAM miktarı regüle edilir. Metiyoninin kükürt atomuna ATP'den bir adenozil grubunun bağlanmasıyla SAM molekülü meydana gelir. Adenozil grubunun aktarılmasıyla kükürt atomu pozitif yük ile yüklenir. Bu durum sonucunda kükürt oldukça reaktif bir duruma geçerek içerdiği metil grubu akseptör, substratlarca kolayca transfer edilir. Metil grubu fosfatidil etanol amin (sefalin) akseptör olarak iş gördüğünde alınır ve S-Adenozil Homosistein (SAH) oluşur. Bu molekül de daha sonra adenozin ve homosisteine hidrolizlenir. SAM organizmalarda başlıca metil grubu vericisidir (Hankey ve Eikelboom 1999).

Remetilasyon yolunda homosistein kofaktör olarak vitamin B₁₂ (kobalamin)'nin substrat olarak da 5-metiltetrahidrofolatın (5-MTHF) kullanıldığı ve metiyonin sentaz enziminin görev yaptığı bir reaksiyonla metillenir ve metiyonine tekrar dönüşür. Bu metabolik yolun substratı olan 5-MTHF termolabil MTHFR enziminin katalizlediği bir reaksiyonla metilentetrahidrofolat (MTHF)'tan sentezlenir (Friedman ve ark. 2001). Karaciğer ve böbreklerde remetilasyon için metil verici olarak betain de kullanılabilir.

Betain/Hcy metiltransferaz enziminin katalizlediği reaksiyonla homosistein remetilenecek de metiyonine dönüştürülebilir (Bostom ve Lathrop 1997).

Transsülfürasyon yolunda ise homosistein, kofaktör olarak vitamin B₆'yı (pidoksin) kullanan sistationin beta sentaz (CBS) enzimi aracılığıyla sistationine çevrilir. Sistationin ise vitamin B₆'nın kofaktörlüğünde sistationinaz enzimi ile sistein ve α-ketobutirata çevrilir, α-ketobutirat ise 2-metilsitrik asit ve metilmalonik asite parçalanır (Cude ve ark. 1993). Homosisteinden metiyonin dönüşümünün ve SAM miktarının azalması, metilasyon reaksiyonlarının işleyişini bozabilir. Nitrik oksit geri dönüşümsüz olarak MS'yi metilkobalamin (aktif koenzim)'in içerdiği kobaltı okside ederek inaktive eder. Böylece SAM'in biyosentezi engellenir. Hayvan deneylerinde nörolojik fonksiyonları inceleyen araştırmacılar, metilasyon reaksiyonlarında bu enzimin inaktif olmasının yüksek derecedeki etkisini göstermişlerdir (Scott ve ark. 1994). Şekil 1.2' de homosistein metabolizması şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.2: Homosistein metabolizması

Homosistein metabolizması, karışık görünmesine rağmen oldukça düzenli bir feed back mekanizmasına sahiptir. Eğer metiyonin dengesi bozulmuşsa ve SAM düşük konsantrasyonda bulunuyorsa, homosistein öncelikle metiyonin oluşumu için MS'nin görev aldığı remetilasyon yoluna yönelir. Homosistein düzeyi yükseldiğinde S-Adenozil homosistein miktarı artar. Çok sayıda metabolik etkilere sahip olan SAH, farklı bağlanma bölgelerinde SAM ile rekabet içindedir ve bu özelliği ile metilasyonu engelleyebilir. Bu sebepten araştırmacılar, SAM/SAH oranı metilasyon döngüsünde indikatör olarak görev alabileceğini düşünmüşlerdir (Mudd ve ark. 2001). MTHFR enziminin katalizlediği bir reaksiyon sonucu oluşan Metilentetrahidrofolat, metiyoninin homosisteine dönüşümünde MS için substrat olması nedeniyle önemli bir işleve sahiptir. Bu yüzden MTHFR'nin, homosistein remetilasyonu üzerinde kuvvetli bir etkisi vardır (Bloom ve ark. 1995). Folat-homosistein yolağında görev yapan enzim ve genler Şekil1.3' te verilmiştir.

Folat-Homosistein Yolağında Görev Yapan Enzim ve Genler
5,10 metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR)
Metiyonin sentaz (MTR)
Metiyonin sentaz redüktaz (MTRR)
Metilentetrahidrofolat dehidrogenaz (MTHFD1)
Sistasyon β sentaz (CBS)
Redüklenmiş folat taşıyıcısı (RFC1)
Folat reseptör β (FR β)
Folat reseptör α (FR α)
Betain-homosistein metiltransferaz (BHMT)
Transkobalamin (TC)
Serin hidroksimetiltransferaz (SHMT)
Glutamat karboksipeptidaz II (GCPII)

Şekil 1.3: Folat-homosistein yolağında görev yapan enzim ve genler

Chen ve ark. (2001) MTHFR enziminin eksikliğinin patogenetik mekanizmaları üzerine knockout farelerle yaptıkları çalışmada, toplam homosistein düzeyini normal farelere göre daha yüksek bulmuştur. Tokluk homosistein düzeyleri çok değişken sonuçlar verebildiği için homosistein düzeyi açlık durumunda ölçülmelidir. Direkt ya da indirekt ölçüm metodları mevcuttur (Finkelstein 1998); ancak en çok kullanılan ölçüm metodu yüksek performanslı sıvı kromatografisidir (HPLC) (Stil ve McDowell 1998). Standart doz 0.1 g/kg (ağırlık ile orantılı olarak) veya 0-4g/m²'dir (vücut alanı ile orantılı olarak). Anjiyografi ile kanıtlanmış koroner kalp hastalığı olan ve bazal homosistein seviyeleri ölçülen 587 hastayı kapsayan bir çalışma yapılmıştır. Hastalar ortalama 4 ilâ 6 yıl izlenmiş ve bu süre zarfında %10.9'unun öldüğü saptanmıştır. Çalışma bulgularına göre homosistein seviyesi ile mortalite arasındaki ilişki homosistein düzeyi 15mol/L'in üzerinde olduğunda en belirgin seviyeye ulaştığı grlmştir. Düzey 15mol/L'in üzerinde olan hastalarda 10mol/L düzeyinde olanlara göre ayarlanmış mortalite oranı 1.6 olarak bulunmuştur (Nygard ve ark. 1997). Östrojen, total homosistein konsantrasyonunu beslenme ve kas kitesinden bağımsız olarak düşürdüğü için, erkeklerde homosistein kadınlara göre 1 mol/L daha yüksek olabilir. Kang ve ark. (1992) 16-30 mmol/L hafif, 31-100 mmol/L orta ve 100 mmol/L ise yüksek homosisteinemi düzeyleri sınıflandırmışlardır. Plazma homosistein konsantrasyonu yaş ve cinsiyetle yakın ilişkilidir. Yaşa bağlı olarak plazma homosistein seviyesi hafif artma eğilimi gösterir. Serumda normal homosistein düzeyi 13-18 mmol/L'dir. Pediatrik hasta grubu üzerinde yapılan çalışma neticesinde 1-6 yaş grubu için 3.87 mmol/L, 7-11 yaş grubu için 8.70 mmol/L, ve 12-17 yaş grubu arasında ise homosistein düzeyi 13.54 mmol/L olarak tespit edilmiştir (Altuntaş ve ark. 2004)

1. 1. 3. Homosistein Metabolizmasındaki Bozukluklar

Plazma homosistein düzeyinin artmasının tipik iki nedeni vardır. Bunlar homosistein metabolizmasından sorumlu bir enzimin genetik defekti veya vitamin kofaktör eksikliğine yol açan eksikliklerdir. Hiperhomosistenemi formlarının önemli farklılıklarına göre sınıflandırılması üç grupta olur: sistasyon sentazdaki bozukluk, düşük metilentetrahidrofolat ile homosistein metilasyonundaki bozukluk (folat eksikliği, MTHFR

eksikliği), normal veya yüksek metilentetrahidrofolat düzeyleriyle homosistein metilasyonundaki bozukluk (kobalamin eksikliği ve nitrik oksit). Sonraki her iki grup homosistein metilasyonu bozukluğunu gösterirken, MTHF tarafından olan glisin metiltransferazın regülasyonunu baz alan transsülfürasyon seviyelerinde farklılık gösterebilmektedir (Mosharov ve ark. 2000). 2001 yılında yapılan bir çalışmada SAM konsantrasyonunun yüksek olmasının, transsülfürasyon yolunun tercih edilmesine sebep olduğu gösterilmiştir (Nguyen ve ark. 2001). Hayvan deneylerinde B₆ vitamininin azalmasının SAH seviyesinin artmasına ve SAM seviyesinin azalmasının da transsülfürasyon yolunun engellenmesine sebep olduğu tespit edilmiştir. Sisteinin indirgenmesiyle oluşan glutation, hücredeki temel redoks tamponudur. İnsan hepatoma hücre dizisinde yapılan çalışmalarda, hücre içi glutationun kaynağının hemen hemen yarısının homosisteinden sağlandığı saptanmıştır. Glutationin birçok hücre içi içeriği oksidatif zarardan ve oluşabilecek hasarlara karşı korur (Mosharov ve ark. 2000). Transsülfürasyon yolu öncelikle karaciğer olmak üzere, böbreklerde, ince bağırsakta ve pankreasta aktiftir. Bu dokular aynı zamanda hızlı glutationin dönüşümüne sahiptir. Yüksek homosistein seviyesinin, aterosklerozis, inme, miyokard enfektüsü, alzheimer hastalığı, hamile kadınlardaki doğum kusurlarındaki riski artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca böbrek yetmezliği görülen hastalarda homosisteinin remetilasyon döngüsünde bozukluk veya sistationin sentaz enziminde bozukluk düzey artışına sebep olarak görülür. Homosistein birikimi ardından her iki yolda geri dönüşümün sağlanmasında SAM etkin bir rol oynar. Remetilasyon döngüsünde görülen aksaklıklar ile sistationin seviyeleri arasında bir ilişki olmadığı saptanmıştır (Meister 1994).

Esansiyel bir kofaktör olan B₁₂ vitamini ve folik asit eksikliğinde oldukça yüksek homosistein seviyeleri bildirilmiştir. Herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş sağlıklı insanlarda homosistein seviyesi ile B₁₂ vitamini, folik asit ve B₆ vitamini arasında negatif bir korelasyon saptanmıştır. Selhub ve ark. (1992) bir veya daha fazla B vitamini eksikliğinin tüm hiperhomosisteinemi vakalarının en az 2/3'ünde neden olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Toplam plazma homosisteinin yaklaşık %80'i disülfid köprüleri ile albümine bağlanır. Bağlı olmayan homosistein türleri ise başlıca homosistein-sistin ve homosistein-homosistein disülfitleri şeklinde bulunur. Dolaşımdaki tüm homosisteinin yalnızca %1'i

serbest homosistein şeklinde bulunur. Toplam homosistein bütün bu serbest ve bağlı biokimyasal homosistein türlerinin toplamını tanımlar (Ueland ve ark. 1993).

Vücutta homosistein düzeylerindeki artışın önemlerinden biri de erken yaşlarda gelişen ve hayatı tehdit edecek derecede önemli olabilen damar tıkanıklıklarına yol açmasıdır. Vurgulanması gereken önemli bir konu ise, hafif düzeylerdeki artışın bile damarlardaki tıkaçıcı mekanizmaları uyarabilmesidir. İnsan ve hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda homosisteine bağlı aterosklerozda endotel hasarı olan bölgelerde trombosit yığılımı ve trombositten zengin trombus oluşumu görülmüştür (Harker ve ark. 1974). Homosisteinin damar toksisitesi birbirinden farklı birçok etmenin katılımıyla ortaya çıkar. Bunlar şu şekilde sıralanmaktadır:

1. Homosisteinin homosistin, karışık disülfidler ve homosistein tiyolaktone otooksidasyonu esnasında, hidrojen peroksit, süperoksit ve hidroksil radikali gibi çeşitli sitotoksik reaktif oksijen türlerinin oluşumunu artırır. Bunlar lipid peroksidasyonunu uyararak düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksitlenmesine, dolayısıyla trombosit aktivasyona ve kümelenmesine yol açar. Endotelden serbestleşen NO, süperoksit radikaliyle birleştiği için tüketilir. Sonuçta NO aracılığıyla gerçekleşen endotel bağımlı vazodilatasyon bozulmuş olur

2. Hiperhomosisteinemi, endotelin antitrombotik özelliğini protrombotik yönde değiştirir.

3. Homosistein damar düz kasındaki hücre büyümesini artırır. Hücre dışındaki matris bileşenlerinin birikimini hızlandırır.

4. Damar düz kas hücresindeki kalsiyum salınımı ve damar reaktivitesi sonucu hiperhomosisteinemi artar (Temel ve Özerol 2002):

Bu etkilerin sonucunda pıhtılaşma ve pıhtı yıkımı arasındaki denge pıhtılaşma yönüne doğru değişir ve sonucunda tromboz ve ateroskleroz artar. Hiperhomosisteinemi tedavi sebebine göre değişmekle birlikte genellikle vitamin (folik asit, piridoksin ve B₁₂ vitamini) takviyesi ile düşmektedir. Piridoksin ve folik asitin en düşük etkili dozu henüz saptanmamıştır. Birçok hastada 1-5 mg folat takviyesi homosisteini hızlı bir şekilde düşürmektedir (Brattstrom ve ark. 1988). Homosistein normalizasyonuna genellikle 4 ilâ 6

haftada ulaşılır. 1960'tan bu yana B₆ vitamini takviyesi yapılan gıdalarla kardiyovasküler ölümlerde düşüş gözlenmiştir (McCully 1996).

1. 1. 4. Hiperhomosisteinemi Nedenleri

Toplam homosistein miktarı birçok faktörden etkilenmektedir. Bu faktörler; genetik, fizyolojik olabileceği gibi yaşam tarzı, geçirilen hastalıklar ya da kullanılan ilaçlardan kaynaklanabilir.

Yaş ve cinsiyet: Kadınlar, erkeklerden daha düşük homosistein düzeyine sahiptir ve düzey yaşla artar. Bu, kısmen vitamin durumuna bağlıdır; fakat cinsiyet hormonlarının etkisinden de ileri gelebilir. Plazma homosistein seviyeleri menapozdan sonra artar. Bu da erkeklerle karşılaştırılan kadınlarda yaşla ilgili artışı açıklayabilir.

Renal fonksiyon: Yüksek homosistein seviyesinin güçlü bir göstergesidir. Bu, minör olan üriner ekstraksiyondan ziyade renal metabolizmayla ilgili olabilir. Renal fonksiyonlardaki fizyolojik azalma kısmen yaşın etkisini de açıklayabilir.

Yaşam tarzı: Diyetle alınan vitamin B₆, B₁₂ ve folat düzeyi ile homosistein düzeyi ters orantılıdır. Aşırı sigara, alkol ve kafeinli kahve içen kişilerde homosistein düzeyi yükselirken fizyolojik aktivite ile bu düzey düşer. Bu tür hayat tarzı faktörlerinin etkisi kadınlarda erkeklerden daha belirgindir. Kronik alkoliklerde, etanolün vitamin durumunu etkilemesi sonucu homosistein düzeyi artarken; orta derecede etanol tüketenlerde homosistein düzeyi düşmektedir.

Genetik faktörler: Homosistein metabolizmasında transsülfürasyon ve remetilasyon yollarındaki enzimatik anormallikler konjenital veya kazanılmış olabilir. Bu durumlarda hiperhomosisteinemiye sebep olur.

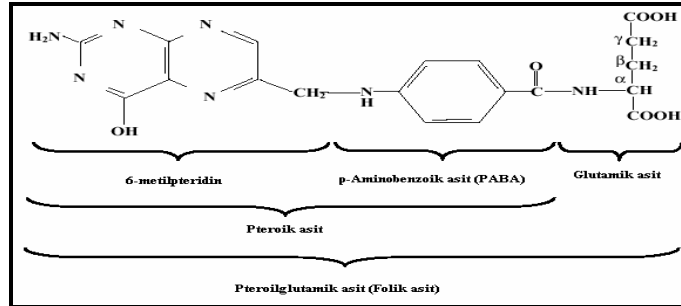
Klinik hastalıklar ve kullanılan ilaçlar: Folat ve kobalamin eksikliği hiperhomosisteineminin ana nedenidir. Yüksek homosistein seviyeleri böbrek yetmezliğinde ve çeşitli diğer durumlarda da gözlenmiştir. Hiperhomosisteinemi bazı

ilaçlarla özellikle homosistein metabolizmasını etkileyen vitaminlerle azalır (Temel ve Özerol 2002).

1. 1. 5. Folik Asitin Önemi

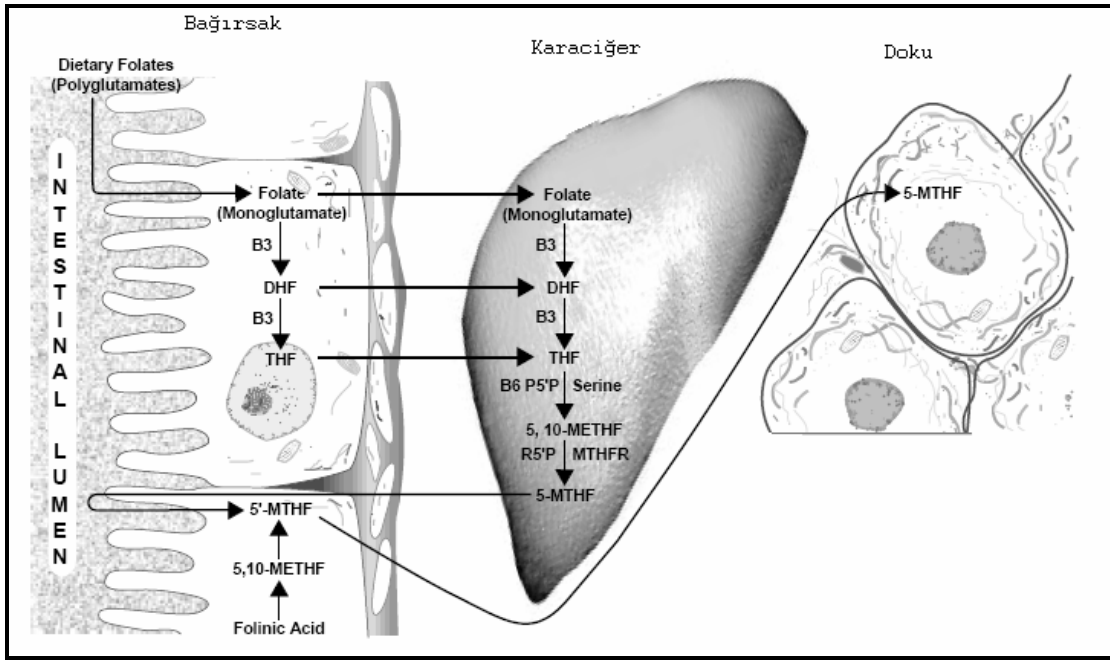
Adını yaprak anlamına gelen “folium” dan alan folik asit, suda eriyen B grubu vitaminlerden birisi olup, ilk olarak 1943 yılında doğal besinlerden ayrıştırılmıştır. Folik asit, pürin ve timidilat sentezi ile fosfolipidler, proteinler, DNA ve nörotransmitterleri içeren elzem biyolojik maddelerin metilasyonu için gerekli olan tek karbon ünitesini sağlamaktadır. Böylece nükleik asitlerin yapımı ve bazı amino asitlerin birbirine dönüşmesi (serin, glisin ve homosisteinin metiyonine dönüşümü, histidinin glutamik asite katabolizması) sağlanmaktadır (Jacob ve ark. 2000).

Folik asit yetersizliğinde; B₁₂ vitamini yetersizliğinde olduğu gibi özellikle hamile kadınlarda kırmızı kan hücrelerinin tam olgunlaşamadığı megaloblastik anemi; ilişkisinin tam olarak açıklanamadığı kolon, mide, uterus kanserleri, yükselmiş serum homosistein düzeyi ile görülen kalp-damar hastalıkları ile nöral tüp defektleri oluşmaktadır (Benoist 1998). Son yıllarda yapılan çalışmalarda folat homeostası ve homosistein metabolizması arasındaki bağlantının birçok damar hastalığında önemli bir rolü olduğu saptanmıştır. Folik asitin oldukça kompleks bir yapısı vardır. p-aminobenzoik asite bağlanmış 2-amino-4-hidroksi-pteridin (pteroik asit)’den ve sayısı 1 ilâ 9 arasında değişkenlik gösteren glutamik asitten oluşmuştur (Rosenblatt 1995) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4: Folik asitin yapısı

Diyetle alınan folat çoğunlukla poliglutamin formunda bulunan 5-metil ve 10 formil-THF'den oluşmuştur. Metabolik reaksiyonlara katılabilmesi için poliglutamat folatın, dihidro ve tetrahidrofolat şekline indirgenmesi gerekir. Folat emilimi jejunumda gerçekleşir. Emilim folipoliglutamat konjugaz'ın enzimatik bir reaksiyonuyla monoglutamil formuna hidrolizlendikten sonra hücre membranından gerçekleşir (Friedrich 1988). Spesifik membran transportu ile enterocyte hücre membranından geçtiği andan itibaren, folat metabolizması için gerekli olan hücresel ihtiyaçların karşılanması ve poliglutamat-monoglutamata oranının sağlanabilmesi için poliglutamat sentezi gerçekleşir. Poliglutamatın monoglutamata dönüşmesiyle, basolateral membrandan geçiş sağlanır ve böylece başlıca 5-metil-THF olmak üzere birçok döngüye katılır (Tefferi ve Pruthi 1994). Farklı dokularda değişkenlik gösteren reseptör ve taşıyıcı mekanizmaları folatın hücre membranından geçişini kolaylaştıran mekanizmalardır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5: Bağırsak, karaciğer ve dokuda folik asit absorblanması ve aktivitesi

Glikozil-fosfotidil-inositol ile bağlı olan folat reseptörünün indirgenmiş folata olduğu gibi folik asite de karşı yüksek bir afinitesi vardır (Anthony 1996). Folat reseptörleri üç izoformda tanımlanmıştır. Bunlardan ikisi farklı farklı metabolizmalarda yaygın olarak görülürken, biri spesifik olarak plasenta ile ilişkilidir. Bu isoformun, anne ve fetus arasındaki folat transferinde önemli bir rolü vardır (Shen ve ark. 1994).

Monoglutamil folat hücreye transfer edilir edilmez, folipoli- γ glutamat sentaz enziminin katalizlediği bir reaksiyonla poliglutamil formuna dönüşür (Girgis ve ark. 1998). Tek karbon metabolizması ve koenzim fonksiyonları, karbon atomunun formil (-HCO), metilen (-CH₂) veya metil (-CH₃)'in oksidasyonları sırasında değişmesini içerir. Folat metabolizması iki önemli metabolik döngüde yer alır. Bunlardan bir tanesi DNA sentezi için pürin ve Timidin sentezi, diğeri ise bütün metiltransferaz reaksiyonlarındaki en önemli biyolojik metil verici olan SAM'in sentezidir. Moleküler seviyede ise; yetersiz hücre içi folat, DNA'da yanlış kodlanmalara dolayısıyla zincir kırılmalarına ve mikronükleus formasyonunun artmasına sebep olur (Blount ve ark. 1997, Fenech 2001). Folat ve metiyonin döngüsünün bağlantısı, homosisteinin metiyonine dönüşümünü sağlayan reaksiyon ile kurulmuştur. Homosisteinin metionin sentaz enzimi yardımıyla metiyonine dönüşmesi için bir folat türevi olan B₁₂ (5-metiltetrahidrofolat) kofaktör olarak kullanılır. Metil grubu plazma folatın hücreye girmesinden kaynaklanır ve 5,10-metilentetrahidrofolatın MTHFR enziminin yardımıyla 5-metiltetrahidrofolat dönüşmesinde B₂ (riboflavin) gereklidir (Lee ve ark. 1999). Folat türevleri; DNA sentezinde, hücre bölünmesinde, doku gelişimi ve DNA metilasyonunda temel gereksinimlerdendir (Picciano 2000). Ayrıca, nöral tüp defekti başta olmak üzere gebelikte bağırsak rahatsızlıklarını tetikleyen çeşitli komplikasyonlarda, kolorektal kanser ve yaşlılıkta görülen algı bozuklukları folik asitin önemli rol oynadığı metabolizmalardır (Vollset ve ark. 2000, Ueland ve ark. 2003). Serumda MTHF ve monoglutamat halinde serbest veya bir kısmı proteinlere bağlı olarak dolaşırlar. Normal serum folat düzeyi 5-20 ng/ml'dir. Toplam vücut folatı 5-20 mg kadardır ve çoğu MTHF poliglutamit halinde karaciğerde depolanır. Ter, tükürük, idrar ve dışkı yoluyla vücuttan atılır. Folat alımı tamamen durduğunda 3. haftada serum folat düzeyi azalmaya başlar (Karyağar 2006). İnsanlarda poliaminobutirik asit sentezlenemediği ve moleküle ilk glutamat grubu eklenemediğinden folik asit vücutta yapılamaz. İnsanlar, bitkiler ve mikroorganizmalar tarafından sentezlenen folatı bitkisel ve hayvansal kaynaklı besinlerle alırlar. Folat eksikliğinin erken dönemlerinde bulgu olmayabilir. Fakat homosistein gibi toksik metabolitler birikir ve düzey artar. Hızlı çoğalan hücreler folat eksikliği için daha duyarlıdır. Kemik iliğinde eksikliğe, iri ve az sayıda eritrosit yapılmasına neden olur. Bu şekilde gerçekleşen anemiye megaloblastik anemi veya makrositik anemi denir. Folat eksikliği demir eksikliğinden sonra en sık görülen anemi sebebidir (Fenech 2001).

1. 1. 6. Homosistein Metabolizmasında Görev Alan Enzimlerde Belirlenen Gen Değişimleri

1. 1. 6. 1. Metilentetrahidrofolat Redüktaz

Metilentetrahidrofolat redüktaz (EC 1.5.1.20), folat metabolizmasında görev alan önemli bir enzimdir. MTHFR defektleri folat kobalamin metabolizmasındaki en sık görülen doğuştan kalıtılan bir bozukluktur.

1972'de Freeman ve arkadaşları tarafından halüsinasyon, hayal görme ve psikoterapiye cevap vermeme hikayesi olan 15 yaşındaki zenci bir olguda plazma metiyonin yüksekliği olmaksızın homosisteinüri bulunmuştur. Aynı yıl yapılan başka bir çalışmada 16 yaşında kas güçsüzlüğü, kol ve bacaklarda hareket güçlüğüne bağlı zor hareket etme öyküsü olan olguda flavin adenin dinükleotidin homosisteinüriye sebep olabileceğini belirtmişlerdir (Shis ve ark. 1972). Nasisasawa ve ark. (1977) tarafından daha önce yayınlanan dört çalışmadan farklı olarak bir yıl içinde ölümle sonuçlanan iki olgu tanımlanmıştır. Bu olguların önemi, vasküler trombozis CBS düzensizliğine bağlı olarak ortaya çıkan metabolik yolda düzensizliklere sahip olmalarına rağmen klasik homosisteinürinin gözlenmemesidir.

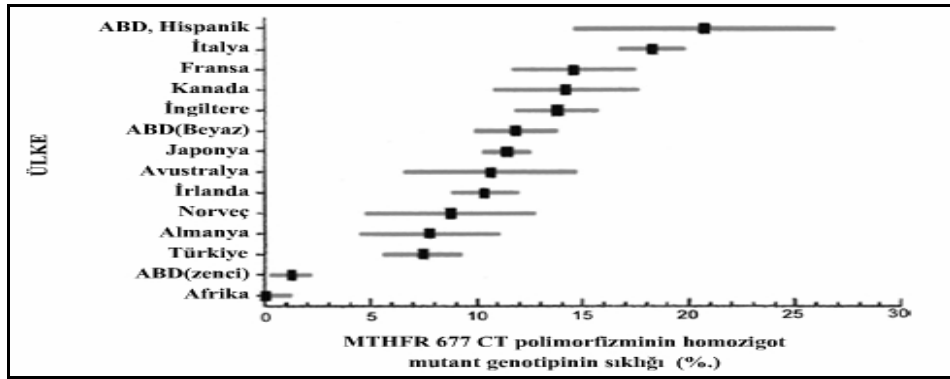
MTHFR geninden 90 bç.'lik cDNA'yı izole ederek insan MTHFR aminoasit sekansının bakteri *almE* geni ile homolojisini gösteren çalışma Goyette ve arkadaşları tarafından domuz karaciğer hücrelerinde yapılmıştır (Goyette ve ark. 1994). Bu çalışma ile MTHFR cDNA'sının her birinin 102-432 bç uzunluğunda toplam 11 ekzon ile 250 bç-1,5 kb'a kadar olabilen (bir intron hariç; 4.2 kb uzunluğunda) intronlar içerdiği saptanmıştır. Ekzon 1'in ATG başlama kodonunu taşıdığı 5' ve 3' kaynaşma bölgelerinde GT ve AG dinükleotidlerinden oluşan konsensus dizilerinin yer aldığını, ekzon 11'in 3' ucunun, cDNA'da poliadenilasyon bölgesiyle sonlanmış olduğunu yine bu çalışma göstermiştir. Poliadenilasyon sinyali (AACCTA), poliadenilasyon bölgesinin 15 bç önünde yer alır (Goyette ve ark. 1994).

MTHFR defektlerinde yeni bir form Kang ve ark. (1991) tarafından bulunmuştur. Bu yeni form nörolojik anomalilerin olmaması, % 50 oranında enzim aktivitesi göstermesi ve özel sıcaklık koşullarında farklı MTHFR enzim termolabilitesinin olmasıyla karakterize edilmiştir. Ayrıca MTHFR termolabilitesinin pozitif olarak koroner arter hastalıklarının oluşumuyla ilişkili olduğu sonucuna varmışlardır (Kang ve ark. 2001). Araştırmacılar kalp hastalarının %17'sinde kontrol grubunun ise %5'inde MTHFR termobilite değişimini bulmuşlardır (Kang ve ark. 1991). MTHFR geninde termolabiliteyi değiştiren mutasyonun, allellerden birinde veya ikisinde birden bulunmasının homosisteinüri oluşumunu etkilediği gösterilmiştir. Haworth ve ark. (1993) yaptığı çalışmada ise MTHFR defektlerini taşıyan iki kardeşten birinin 37 yaşında ve asemptomatik, daha genç olan kardeşin ise kol ve bacaklarda güçsüzlük, kordinasyon bozukluğu, ani unutma gibi semptomların tekerlekli sandalyeye bağımlılıkla birlikte görüldüğü rapor edilmektedir. İki kardeşte de homosisteinüri, hiperhomosisteinemi ve düşük plazma metiyonin seviyesi belirtilmiştir. RFLP analizi ile fareler üzerinde Frosst ve ark. (1995) yaptıkları çalışma ile fare MTHFR geninin 4. kromozom distalinde olduğunu bulmuşlardır. Goyette ve ark. (1994) yaptıkları SSCP analizi ile de MTHFR geninde, bir tane anlamsız mutasyon ve iki tane de enzim termobilitesini değiştiren yanlış anlamlı mutasyon belirlemişlerdir. Bu yanlış anlamlı mutasyonlardan biri treonin-metiyonin diğeri ise arjinin-glisin değişimine yol açmaktadır.

Frosst ve ark. (1995) MTHFR geninin 677. nükleotidinde Sitozin yerine Timin bazının gelmesi sonucu Alanin amino asidinin Valine dönüştüğünü rapor etmişlerdir. Goyette ve ark. (1996) bu değişimin, Fransız ve Kanadalılardan oluşan 114 birey kromozomunda 0.38 frekansına sahip olduğu tespit etmiş ve bu değişimin homozigot veya heterozigot olduğu bireylerde enzim aktivitesinin etkilendiğini saptamışlardır. Ayrıca aktivite düşüşünün termolabilitenin yükselmesine bağlı olduğunu ve değişimin homozigot bireylerde plazma homosistein düzeyini yükseltici etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. MTHFR 677 CT değişiminde görülen genotiplere göre enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Buna göre normal olan CC genotipinde enzim aktivitesi %100, heterozigot olan CT genotipinde %70 iken mutant olan TT genotipinde bu oran %34'tür (<http://www.takarabiousa.com>). MTHFR'nin 677 CT polimorfizminin, kardiovasküler hastalıklar, inme, nöral tüp defektleri, Down sendromu, meme ve endometrial kanser gibi hastalıklarda bir risk faktörü olduğu yapılan birçok çalışma sonucu açıklanmıştır (Kang ve ark. 1991). Farklı toplumlarda MTHFR 677 CT polimorfizmi sıklığını Şekil 1.6'da gösterilmiştir.

1998’de insan MTHFR geninin 11 ekzondan oluştuğu, insan ve fare MTHFR gen intron sınırları ve boyutlarının benzer olduğu, aminoasit sekanslarının %90 benzerlik gösterdiği bulunmuştur (Goyette ve ark. 1998). Başka bir polimorfizm olan 1298 A-C glutamin-alanin değişimi Van der Put ve ark. (1998) tarafından tespit edilmiştir.

Kromozom 1p36.3’te lokalize insan MTHFR geni, 656 amino asitten oluşan MTHFR enzimini kodlar (Rosenblatt 2001). Bu genin N-terminal ucunun yapısı tamamen açıklanamamıştır. MTHFR geninin promotor bölgesi, transkripsiyon faktörlerinin bağlanması için belirli konsensus dizilerine sahipken TATA kutusu içermez. Bu gen bölgesinde alternatif kaynaşma olayları meydana gelmekte ve bunun sonucunda, değişik dokularda, farklı MTHFR transkriptleri (3 transkript) oluşmaktadır (Hombberger ve ark. 2000). 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz enzimi, bir flavoprotein olup MTHFR familyasının bir üyesidir. Sitoplazmik bir protein olan enzim, iki alt birimden oluşan homodimer yapıdadır (Sibani ve ark. 2000). Bu izoformlar dokulara özel olup, 70 kDa’luk küçük alt birimlere sahip izoform karaciğerden, 77 kDa’luk büyük alt birimlere sahip izoform ise diğer dokulardan saflaştırılmıştır. Enzim, tripsinle proteolizise uğratıldığında, 77 kDa’luk altbirim 40 kDa ve 37 kDa’luk kısımlara ayrılmaktadır (Rozen 1998, Sibani 2000). Bu ayrılma sonucunda S-adenozil metiyonin (SAM) inhibisyonu ortadan kalkar, ancak enzimin katalitik aktivitesi değişmez. Yapılan çalışmalar sonucunda katalitik bölge olan 40 kDa’lık N-uç bölgenin substrat ve koenzim bağlama kısımlarına sahip olduğu, regülör bölge olan 37 kDa’luk C-uç bölgesinin ise, SAM bağlama kısmına sahip olduğu gösterilmiştir. Memeli enzimi kendisine non-kovalent olarak bağlı FAD koenzimi içerir. Bu koenzim, NADPH’ın metilentetrahidrofolata transferini sağlar (Fodinger ve ark. 2000).



Şekil 1.6: Farklı toplumlarda MTHFR 677 CT polimorfizminin mutant olan TT genotipinin sıklığı

MTHFR enzimi, homosisteinin remetilasyon döngüsünde görev yapar. MTHFR, 5,10 metilentetrahidrofolatı (5,10-metilenTHF) geri dönüşümsüz olarak 5-metil tetrahidrofolata (5-metil THF) dönüştürür. 5-metil THF; DNA metilasyonu ve metiyonin sentezi için metil grubu sağlar. 5,10- metilen THF ise deoksiüridilatın timidilata dönüşümünde kullanılırken bir taraftan da pürin sentezi için 10-formil THF'a okside olmaktadır. MTHFR geninde meydana gelen bir mutasyon enzim aktivitesini azaltmaktadır. Azalan MTHFR aktivitesi sonucunda 5- metil THF düzeyi azalmakta, 5,10- metilen THF miktarı ile plazma homosistein düzeyi artmaktadır (Rosenblatt 1994, Weisberg 1998).

MTHFR geninde görülen bazı mutasyonlar, enzimde inaktivasyon oluşturarak, kardiyovasküler ve serebrovasküler hastalıklar için önemli bir risk faktörü olan hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşmasına neden olur (Daly ve ark. 1999, Stern ve ark. 2000).

Chunca ve ark. (2002) tarafından Brezilyalı çocuklarda yapılan çalışmada MTHFR mutasyonlarının B12 vitamini ve homosistein üzerine etkisi olduğu tespit edilmiştir. Aynı yılda Zetternerg ve arkadaşları tarafından abortusla sonuçlanan bebeklerde yapılan çalışmada MTHFR 677C-T ve 1298 A-C polimorfizmlerinin beraber bulunma oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Zetterberg ve ark. 2002). Bjelland ve ark. (2003) yaptığı çalışmada folat, B12 vitamini, homosistein düzeyi arasında MTHFR 677 C-T polimorfizmine bakılmış ve enzim defektinin depresyona yol açtığı bulunmuştur. Aynı yılda Afman ve ark. (2003) yaptığı çalışmada ise sistation β sentaz enzimidaki 31 bç'lik tekrarların MTHFR 677 CT polimorfizmi ile beraber bulunduğu homosistein düzeyini artırdığını tespit etmişlerdir. Vaughn ve ark. (2004) tarafından yapılan çalışmada homozigot olarak MTHFR 677 CT ve Metiyonin Sentaz Redüktaz 66 AG polimorfizmi birlikte bulunduğu homosistein düzeyini artırdığı bulunmuştur.

MTHFR enziminin eksikliği durumunda klinik semptomların geniş bir dağılım gösterdiği açıklanmıştır. Hiperhomosisteinemi ve homosisteinürinin ortaya çıktığı ciddi MTHFR eksikliğinde, periferal nöropati, gelişme geriliği, hipotonia, inme, tromboz gibi klinik özellikler görülür. MTHFR eksikliğinin hafif olduğu durumlara populasyon

genelinde oldukça sık rastlanmakta olup, özellikle arterial hastalıkların oluşumunda bir risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (Goyette 1994).

1. 1. 6. 2. Dehifrofolat Redüktaz

Dehidrofolat redüktaz (DHFR; tetrahidrofolat dehidrogenaz; 5,6,7,8-tetrahidrofolat: NADP⁺ oksidoredüktaz; EC 2.5.2.3) hücre metabolizma ve hücre büyümesinde önemli rolü olan bir enzimdir. DHFR, metabolizmada sentezi olmayan ve gıda yoluyla alınan folatın hücre içinde kullanılabilmesi için gerekli olan folik asite indirgenmesinden sorumludur. Tetrahidrofolik asitin dehidrofolik asite çevrilmesini katalizleyen enzim bir metil taşıyıcısı olarak da görev yapar. Tetrahidrofolik asitteki bu metil alışverişi aminoasitler, lipitler pirimidinler ve pürinler gibi başlıca metabolitlerin biyosentezi için gereklidir (Chen ve ark. 1983).

DHFR, 21.3 kDa'lık bir sitosolik enzimdir (Tauro ve ark. 1976). Kofaktör olarak NADP'ye gereksinimi vardır. Fonksiyonel DHFR geni Chen ve ark. tarafından klonlanmış ve tanımlanmıştır (Chen ve ark. 1982, Chen ve ark. 1984). 30 kb uzunluğunda olan gen 5 intron ve 6 ekzondan oluşmuştur (Chen ve ark. 1984). Bakteri ve memeli organizmaların ökaryotik gen dizisi ile homolog olan enzimlerin protein sekansı karşılaştırılmasından intron ve ekzon bağlanmalarının benzemediği bulunmuştur. Bu protein çakışması DHFR enzimini, tiripsin ve kimotropsin proteinlerini içermiş olup sonucunda yüzeydeki bu değişimlerin açıklaması olarak enzim aile üyelerinin (serin proteaz gibi) işlevsel farklılıkları gösterilmiştir. İtron ekzon bağlantılarının kaymasının (sliding) polimorfizm oluşturma ve farklı dizileri meydana getirmek için bir mekanizma oluşturabileceği düşünülmüştür. Böylece oluşan farklı özelliklerin proteinin çekirdek kısmında bir bozulma olmaksızın gerçekleşebileceğini bulmuşlardır (Craik ve ark. 1983). İnsan-fare ve insan – Çin hamsteri hücre hibritleri arasında insan DHFR cDNA probları kullanılarak yapılan DNA transfer hibridizasyon analizleri sonucunda, insan DHFR geninin fareye göre kromozomda farklı yerleştiği bulunmuştur. İnsan DHFR lokusunun 5. kromozom, fare DHFR dokusunun kromozom 13 üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Bu bilgi, insan DHFR geni ile birlikte bulunan ve gene duyarlılığı bulunan kromozom 5 markırı ve insan-fare hücre hibritinin duyarlı olan difteria toksinin gözlenmesi ile de ispatlanmıştır. 5.

kromozom üzerinde yapılan genomik blotlama çalışmalarıyla DHFR geninin 5q11.2-q13.2'de lokalize olduğu tespit edilmiştir (Maurerve ve ark. 1985).

Johnson ve ark. (2004) DHFR enziminin 1. intronunda 19 bç'lik bir delesyon tespit etmişler ve bunun DHFR geninin ekspresyonunu etkilediğini göstermişlerdir. Ayrıca introndaki bu delesyonun, transkripsiyon faktörlerinden biri olan SP1'in bağlanma bölgesini kapsadığını; bu durumun, DHFR transkriptlerinin azalmasına sebep olduğunu ve folat kullanılabilirliğini azalttığını saptamışlar, aynı zamanda intron 1'in DHFR üzerinde düzenleyici bir etkisi olmasından dolayı da transkriptlerin azalabileceğini düşünmüşlerdir. Araştırmacılar, DHFR genini intron ve ekzon bağlanma noktalarını da kapsayacak şekilde tanımlamayı amaçlamışlardır. Yaptıkları çalışma sonucunda kodlama yapılan bölgelerde herhangi bir gen varyasyonu bulamamışlar; ancak genin 5' UTR bölgesinde Guanin ve Sitozine zengin 9bç'lik tekrarlar saptamışlardır. DHFR enziminin promotör bölgesinde bulunan 9 bç'lik tekrar ve 19 bç'lik delesyonun gen ekspresyonunu etkilediği bulunmuştur. Yapılan çalışmada 9 bç'lik tekrarın homosistein düzeyi üzerine bir etkisi olmadığı ancak bu 9 bç'lik tekrarların 3/6 ve 3/7 tekrarlarının 3/3 tekrarlar ile beraber bulunmasının folat seviyesini artırıcı yönde bir eğilimi oluşturduğu belirtilmiştir. 19 bç'lik delesyonun homozigot mutant (del/del) ve heterozigot (N/del) genotiplerinin homosistein düzeyini azaltma yönünde bir etkisi olduğunu göstermiştir. Ayrıca cinsiyet ve yaş faktörlerinin bu delesyon üzerine bir etkisi olmadığını saptamışlardır (Heijer ve ark. 2007).

DHFR gen ailesi fonksiyonel (hDHFR) ve intronu olmayan genleri içerir. Üç intronsuz gen (hDHFR-psi 2, hDHFR-psi 3 ve hDHFR-psi 4) introna sahip olan genlere göre DNA dizilimlerinin farklı olmasından dolayı yalancı (pseudo) gen olarak adlandırılabilir. Bir diğer intronsuz gen hDHFR-psi 1 ise fonksiyonel gen ile tamamen homologdur. İnsan-fare somatik hücre hibridizasyonu çalışmaları ile hDHFR-psi 4 kromozom 3' te, hDHFR-psi 1 kromozom 18' de, hDHFR-psi 2 ise kromozom 6' da lokalize olduğu saptanmıştır (Anagnou ve ark. 1985). hDHFR-psi 1'in varlığında veya yokluğunda fonksiyonel geni kodlayan dizinin farklılık göstermesinden dolayı etnik kökenlere göre değişkenlik göstereceği düşünülmüştür. hDHFR-psi 1' in bulunış sıklığı %94 olarak en çok Akdeniz ülkelerinde, en az Amerikalı zencilerde %32 olarak bulunur (Anagnou ve ark. 1988).

Enzim eksikliği, çeşitli megaloblastik anemilerine ve mental geriliğe sebep olur. Antifolat metotreksat, DHFR aktivitesini inhibe eden bir maddedir. İnhibisyon başta DNA sentezi, tümör büyümesinde ve homosistein seviyesini artırmada etkilidir (Smulders ve ark. 1998). Yapılan çalışmalarda megaloblastik anemisi olan bebeklere damar yoluyla 100 mikrogram N(5)formiltetrahidro folatın verilmesiyle tedavi edilebileceği bulunmuş; ancak formiltetrahidrofolat yerine aynı dozda folik asit verilmesinin aynı etkiyi göstermediği bulunmuştur. Bu bulgu dehidrofolat redüktaz aktivitesinde bir anormallik olduğunu göstermiş, ayrıca hepatic biyopsi bulgularıyla da desteklenmiştir (Walters ve ark. 1967). Tauro ve arkadaşlarının akraba olmayan kalıtsal olarak megaloblastik anemi saptadıkları iki bebeğin karaciğer hücrelerinde yaptıkları çalışmada dehidrofolat redüktaz eksikliğinde folik asitin tetrahidrofolata dönüşümünün engellenmiş olduğunu tespit etmişlerdir. Bu iki hasta 5-formiltetrahidrofolik asit tedavisine olumlu cevap vermiştir. Dehidrofolat redüktazdaki anormallik bu iki hastada farklı şekilde bulunmuştur. Birincisinde karaciğer enzim aktivitesi ilk aşamada tespit edilememiş; fakat daha sonra yüksek katyon konsantrasyonları ile normal seviyeye dönmüştür. İkinci hastanın enzim aktivitesi ise yüksek katyon konsantrasyonunun da dahi ancak %50 seviyesinde saptanmıştır (Tauro ve ark. 1976). Hoffbrand ve arkadaşları bu ikinci hastayı mental geriliği ve nöropatisi olması sebebiyle gözlem altında tutmuş ve iki yıl boyunca iyi hematolojik sonuç alınabilen folik asit tedavisi uygulamıştır. Sonucunda ise hastaya ait serumda transkobalamin II eksikliği bulmuşlardır (Hoffbrand ve ark. 1984).

Tetrahidrobiopterin (H4B) endotelial nitrikoksit sentaz enziminin kofaktörüdür. DHFR enziminin katalizlediği bir reaksiyon ile oksitlenmiş formu olan dehidropterininden oluşturulur. Araştırmacılar, sığır aort damarındaki endotelial hücrelerin RNA interferans ile engellendiğini bulmuşlar ve sonucunda endotelial H4B ve nitrik oksit miktarının azaldığını tespit etmişlerdir (Chalupsky ve Cai 2005). 2007 yılında yapılan bir çalışmada major ve minor olmak üzere iki promotordan oluşan DHFR geninin major promotöründe hücre döngüsüne katılmayan hücrelerde transkripsiyonel baskılanmanın kodlanmayan transkripler tarafından yapıldığı bulunmuştur (Martianov ve ark. 2007).

1. 1. 6. 3. Sistation B Sentaz

Ökaryotlarda, karbon zinciri ve amino grubu serinden oluşup, sisteinin sülfür atomu methioninden elde edilir. Bu sentezde ara metabolit homosisteindir. Homosistein metiyoninde, sisteinde ve SAM metabolizmasında bir ayrılma noktası olarak çalışmaktadır. Homosisteinin hemen hemen yarısı remetilasyon döngüsü ile oluşmuştur (Finkelstein ve Martin 1984). Diğer yarısı ise transsülfürasyon yoluyla sistation beta sentaz (CBS) bu dönüşümü sağlamasıyla oluşur. Böylece, CBS homosisteinin dönüşümüne ve sisteinin biyosentezine direkt olarak katılmış olur. *In vitro* çalışmalar SAM fonksiyonlarının metiyonin döngüsü ve transsülfürasyon yolunda kilit noktası olduğunu göstermiştir (Finkelstein ve Martin 1984). SAM'ın CBS aktivitesini SAM'ın bulunma miktarına bağlı olarak kontrol ettiği 30 yılı aşkın bir süredir bilinmektedir (Finkelstein 1975). SAM'ın yüksek konsantrasyonu 5,10 metilentetrahidrofolat redüktazı engelleyerek homosisteinin remetilasyon yolağını sınırlar. Böylece homosistein indirgenmesi transsülfürasyon yoluna yönlendir (Daubner ve Matthews 1982). Transsülfürasyon yolu iki adımdan oluşmuştur. Birinci adım homosisteinin sistationine dönüşmesi iken ikinci adım sistationinin sistin ve α -ketobütürata dönüşmesidir.

Pridoksal 5' fosfat (PLP) enzim ailesinin üyesi olan insan CBS geni (EC 4.2.1.22) ilk olarak hamster ve insan hücre hibritlerinde yapılan çalışma sonucu Skavby ve ark. (1984) tarafından tespit edilmiştir. Bu bilgi Kraus ve ark. (1986) tarafından *in situ* hibridizasyon deneyleri yapılarak desteklenmiştir. Genin kromozom 21q22.3 lokalize olduğu çalışmalarla Münke ve ark. (1988) tarafından bulunmuştur. Kraus vd (1998), tüm insan CBS genini klonlayıp dizisini belirlemiş ve 28.046 nükleotidi rapor etmiştir. Aynı yıl yapılan çalışmada CBS geninin 23 ekzondan oluştuğu ve CBS polipeptidinin 1-14 ve 16 ekzonlar tarafından kodlandığı bulunmuştur.

Fare 16. ekzon ile homolog olan ekzon 15 alternatif kaynaşma bölgesidir. Bu bölgeden 14 aminoasit kodlanır (Kraus ve ark. 1998). İnsan CBS mRNA'sının 5'-UTR ucu, alternatif olarak kullanılabilen beş ekzonun birinden oluşurken, 3'-UTR ucu 16. ve 17. ekzonlardan kodlanmaktadır (Chasseine ve ark. 1995, Kraus ve ark. 1998). Birçok omurgalının karaciğerinden CBS enzimi pürifiye edilmiştir (Kraus ve ark. 1978). 1985'de

Mudd ve arkadaşlarının 629 hasta üzerinde yaptıkları çalışmada CBS eksikliği enzim defekti olarak gösterilmiştir (Mudd ve ark. 1985). CBS, homotetromer olan 63 kDa'lık dört monomerden oluşmuştur. (Skavby ve ark. 1984). Bu monomerler 551 amino asit uzunluğunda ve üç ana yapıdan oluşmuştur (Taoka ve ark. 1999). Enzimin 45 kDa'lık aktif çekirdek bölgesi Glu 37'den Arg 413'e kadar uzanır ve PLP ile bağlı olarak bulunur. Bitki ve bakterilerden izole edilen CBS'in bu 45 kDa'lık aktif bölgesi evrim boyunca enzimin en çok korunmuş kısmıdır. Bundan dolayı diğer enzimlerle benzerliğin olduğu kısım enzimin aktif bölgesidir (Kraus 1998).

CBS geninde lokusları, birçok DNA dizi tekrarları ve tek nükleotidlik baz değişimleri bulunmaktadır (Kraus ve ark. 1998, Kraus ve ark. 1999). Bugüne kadar gende 130'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. 1985'te Mudd ve arkadaşlarının sülfür amino asit metabolizması üzerine yaptıkları çalışmada CBS mutasyonlarının en çok görülen enzim eksikliği olduğu gösterilmiştir (Mudd ve ark. 1985). Kraus ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada CBS eksikliğinde en çok rastlanan mutasyon tipinin missense mutasyonları olduğunu tespit etmişler ve bunlardan sadece dördünün bilinen nonsense mutasyon olduğunu diğerlerinin delesyon ve insersiyon olduğunu belirtmişlerdir. Araştırmacıların aynı yıl yaptığı çalışmada CBS eksikliği olan hastalarda 71 missens mutasyon bulunmuştur. Bu mutasyonların yaklaşık 1/3'ü E.coli'de ifade edilmiş ve hepsinin CBS aktivitesini azalttığını bulmuşlardır. Missense mutasyonların dörtte biri 3. ekzonda bulunur (Kraus vd 1999). CBS allerinde %80'den fazla missense mutasyon bulunur. CBS genindeki mutasyonların bazıları varlığı etnik kökenlere göre farklılık gösterir. Örneğin 919 G-A (G307S) dönüşümü Celtic (İngiltere) (Gallagher ve ark. 1995), 12. ekzondaki IVS11-2A-C mutasyonu ise doğu ve merkez Avrupa'da görülür (Kraus ve ark. 1998). CBS enziminde gerçekleşen mutasyonlar sonucu homosisteinüri ve homosisteinemi oluşur. CBS eksikliği olan hastalarda homosistein seviyesinin artmasının yanı sıra bu kişilerde aynı zamanda hipermetiyoninemia ve B₆ vitamini yetersizliği görülür. CBS enzim eksikliği, göz (yüksek miyop ve lens kayması), iskelet (osteoporoz, marfanoid özellikler), vasküler sistem (prematür aterosklerozis) ve merkezi sinir sistemi (mental rötardasyon, piskolojik rahatsızlıklar) olmak üzere başlıca dört major organ sistemini etkiler (Mudd 1985).

Transsülfürasyon yolunda birçok DNA polimorfizminin kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. 833 nükleotitteki T'den C'ye olan değişim, 8. ekzonda bulunan 278 I-T ve 307 G-S CBS geninde rastlanan en sık mutasyonlardandır. Farklı

araştırmacıların yaptıkları çalışmalar sonucunda CBS eksikliği olan hastaların 7. intronun 3' ucu ve 8. ekzonun 5' ucu arasında 68 bç'lik bir insersiyon (844ins68) tanımlanmıştır. Ayrıca beyaz ırk allelerinde bu insersiyon sıklığının %5 civarında olduğu belirtilmiştir. 68 bç'lik insersiyonun 53 nükleotidi intron 7'de, 15 nükleotidi ise ekzon 8'i kapsar (Kluijtmans ve ark. 1997, Skovby ve ark. 1994, Tsai ve ark. 1996). İnsersiyon, işlevsiz bir proteinle sonuçlanan terminasyon kodonu oluşturur. Ayrıca insersiyon 7. ekzonun akseptör splice kısmında olursa, bu akseptör kısmından iki yeni transkript oluşmasına sebep olabilir. Araştırmacılar bu mutasyonun cis konumunda 833T-C değişimi ile beraber bulunduğu için T833C/844INS68 olarak rapor etmişlerdir. 7. intronda insersiyon olmaz ve mRNA'da 833 T-C mutasyonu yer almazsa bu iki mutasyonun patonojenik olmadığı bulunmuştur (Tsai ve ark. 1996). CBS844ins68 mutasyonunun enzim aktivitesini etkileyerek homosistein düzeyini azalttığı tespit edilmiştir (Tsai ve ark. 1999, Tsai ve ark. 2000). Bu sebeple mutasyonun vasküler tromboembolik hastalıklara karşı koruyucu bir etkisi olduğu düşünülmüştür (Zhang ve Dai 2001). Carsten ve ark. (2004) kardiyovasküler hastalığı olan hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada ise 844ins68 mutasyonunun homosistein düzeyini etkilemediğini, MTHFR 677 CT değişiminin ise direkt etkili olduğunu saptamışlardır. Franchis ve ark. (2000) yaptıkları çalışmada 68 bç'lik insersiyonun MTHFR 677 CT mutasyonu ile beraber bulunmasının venöz ve arteriyel oklüzif hastalıklara yol açtığını bulmuşlardır.

1. 1. 6. 4. Timidilat Sentaz

Timidilat sentaz (EC 2.1.1.45) folat-homosistein metabolizmasında anahtar rol oynayan enzimlerden bir tanesidir. TYMS deoksiuridin monofosfat (dUMP)'ın deoksitimidin monofosfat (dTMP)'a dönüşmesinde rol oynar. Bu reaksiyon DNA replikasyonu ve tamiri için gerekli olan pirimidin biyosentezini gerçekleştirir.

Enzim ilk olarak Takeishi ve ark. (1985) tarafından insan fibroblast cDNA dizisinden klonlanmıştır. Ortaya çıkan 313 aminoasit proteini 35.7 kD'lik bir moleküler kütle olarak hesaplanmıştır. 7 tripeptid bir tetrapeptid ve bir oktapeptid dahil olmak üzere TYMS'nin bazı dizileri insan, E. Coli, ve T4 bakteriyofajında aynıdır. Takeishi ve ark. (1985) ayrıca 1.6 ve 1.4 kb'lik 2 mRNA türüne artış veren 2 polidenilasyon sinyali

tanımlamışlardır. TYMS geni 7 ekzondan oluşur ve yaklaşık olarak 30 kb uzunluğundadır. Genin 5' ucu TATA ve CAAT kutuları içermez (Kaneda ve ark. 1990). TYMS enzimi Çin hamster hücrelerinden izole edilmiş ve insan limfoblastik hücreleriyle hibridizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bunun sonucunda insan TYMS geninin kromozom 18' de lökaleze olduğunu bulunmuştur. Daha sonra yapılan *in situ* hibridizasyon analizleriyle enzimin tam olarak kromozom 18q11.32' de yer aldığı tespit edilmiştir (Hori ve ark. 1990).

TYMS enziminde bugüne kadar görülen en sık polimorfizmlerden ikisi gendeki translasyonu yapılmayan dizi bölgelerindeki baz tekrarlarından kaynaklanır. Bunlardan bir tanesi enzimin 5' UTR ucunda 28 bç'lik tekrarlardan oluşan polimorfizmdir. Tekrarların dinükleotid (2R) ve trinükleotid (3R) şeklinde olması polimorfizmin en sık karşılaşılan tipleridir (Marsh ve ark. 1999). Dizideki bu tekrarlar TYMS'nin aktivitesini ve translasyon miktarını etkiler (Kawakami ve ark. 1999, Kawakami ve ark. 2001). Trinükleotid tekrarların olması yüksek TYMS ekspresyonuyla sonuçlanır (Kawakami ve ark. 2001, Marsh ve ark. 1999).

5,10-MetilenTHF'i kullanabilmek için TYMS, MTHFR ile rekabet içinde olduğunu düşünen Trinh ve ark. (2002) TYMS' deki bir polimorfizmin enzim aktivitesinde değişikliğe sebep olacağını, bunun da plazma folat seviyesi ve sonucunda indirek olarak plazma homosistein seviyesini etkileyeceği hipotezini kurmuşlardır. Araştırmacılar, TYMS genotipleri ile homosistein ve folatın plazma konsantrasyonları arasındaki ilişkiyi Singapurda yaşayan Çinlilerde incelemişlerdir. Çalışma sonucunda TYMS enziminde trinükleotid tekrarlarının homozigot (3R/3R) genotipinde olması folat konsantrasyonunun azaldığını ve homosistein seviyesinin arttığını bulmuşlardır. Bu etkileşim MTHFR 677 CT genotiplerinin homosistein ve folat konsantrasyonlarına olan etkisinden bağımsız olarak düşünülmüştür. Bu sonuç homosisteinin remetilasyon döngüsündeki folat gereksinimi olan substratlar için TYMS ve MTHFR'nin rekabet içinde olduğunu gösterir. Thrin ve ark. (2002) homosistein ve folat düzeyleri hakkındaki bu genetik bulgunun kardiyovasküler hastalıklar için risk olabilecek faktörlerin bulunabilmesi için yararlı bir bilgi olduğunu saptamıştır. Buna karşılık Brown ve ark. (2004) Avrupa'nın kuzeybatısında yaşayan erkek ve kadınlar arasında yaptıkları çalışmada ise 3R/3R genotipinin homosistein ve folat üzerine bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir.

Diğer TYMS polimorfizmi enzimin 3' ucundaki translasyonu yapılmayan bölgede 6 bç'lik insersiyon/delesyon şeklinde gerçekleşir (Ulrich ve ark. 2000). Kealey ve ark. (2005) TYMS 3'UTR ucunda ürüne çevrilmeyen dizilerde görülebilen insersiyon/delesyonun etkilerini folat ve homosistein düzeyleri belirlenen 444 genç (20-26 yaş) arasında incelemişlerdir. Kırmızı kan hücrelerindeki 3'UTR ucundaki 6 bç'lik insersiyon/delesyon ile folat ve homosistein konsantrasyonları arasında önemli bir ilişki saptamışlardır. Yapılan çalışmalar sonrasında araştırmacılar TYMS 5'UTR ucunda 28 bç'lik tekrarların ve 3'UTR ucundaki 6 bç'lik insersiyon/delesyonun spina bifida ve NTD için bir risk faktörü olabileceğini söylemişlerdir (Volcik ve ark. 2003).

Pürin ve pirimidin nükleotiterinin biyosentezinde folik asit çok önemli bir maddedir. dUMP, 5,10-MTHF'nin metil donörü olarak kullanılıp TYMS enziminin katalizlediği bir reaksiyon sonucu dTMP'ye dönüşür. Folik asit düzeyi düşük olduğunda, dUMP miktarı dTMP miktarına göre artar. DNA polimeraz enzimi timin ve urasil arasındaki farkı anlayamayarak DNA zincirine timin yerine urasil nükleotidini sokar (Wickramasinghe ve ark. 1994). Bu yanlışlık sonucu DNA zincirlerinde kırılmalar gerçekleşir. DNA stabilitesindeki bozukluk DNA tamir mekanizmaları tarafından düzeltilir. Ancak folat miktarındaki azalma devam ederse bu yanlış yerleştirme devam ederek DNA'da geri dönüşümsüz kırılmalara ve kromozomal hasara sebep olur (Reidy 1987).

Türk toplumu üzerinde yapılan araştırmalara MTHFR 677 CT ve CBS 844ins68 (Akar ve ark. 1998) daha önce konu olmuş mutasyonlar iken, TYMS 3'UTR 6bç'lik delesyon/insersiyon ve DHFR 19 bç'lik delesyon ise henüz çalışılmamış mutasyonlardır.

1. 2. MOLEKÜLER TEKNİKLER

1. 2. 1. DNA Ekstraksiyonu

DNA'lar, kan örneklerinden fenol/kloroform yöntemiyle ekstrakte edilmiş ve etanol ile muamele edilerek çöktürülmüştür.

1. 2. 2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Hücreden kaynaklanmış bir yöntem olarak polimeraz zincir reaksiyonu, DNA klonlanmasını kolaylaştırarak, rekombinant DNA araştırmalarının güçlü bir tekniği olmuştur ve pek çok durumda konakçı hücrelerin kullanıldığı klonlamanın yerini almıştır. Yani, bir çeşit in vitro klonlamadır (Klug ve Clummings, 2002).

PCR, DNA molekülleri topluluğunda, özgül hedef DNA dizilerinin doğrudan çoğaltılmasına dayanır. Bu yöntemin uygulanabilmesi için yok denecek kadar az miktarda DNA bile yeterlidir. PCR ile belirli bir bölgeyi çoğaltabilmek için, hedef DNA'nın nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerekir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş nükleotid dizisi hakkında bazı bilgiler gerektirir. Bu bilgi, tek zincirli hale getirilmiş DNA'ya bağlanacak olan iki oligonükleotid primerin sentezi için kullanılır. Primerler, çoğaltılacak tek zincirli DNA molekülündeki tamamlayıcı diziler ile hibridize olur. Isıya dayanıklı bir polimeraz, deoksinükleotid trifosfatları (dNTP; A, C, T, G) kullanarak çalışılan DNA'daki hedef bölgenin sentezini sağlar. Polimerazın çalışması için tampon görevi yapacak maddeler ve tuzlar (genellikle Tris ve KCl), ayrıca önemli olan bir kofaktör olan Mg^{+2} iyonları gereklidir (Klug ve Clummings, 2002).

PCR, DNA ipliklerinin yüksek sıcaklık ile birbirinden ayrılmasını (**denatürasyon**), sonra sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanmasını (**hibridizasyon**), daha

sonra da zincir uzamasını (**polimerizasyon**), ve bu döngülerin istenilen belirli sayıda tekrarlanmasına dayanır. Bu üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur. Elde edilecek ürünün miktarı teorik olarak, bu üç temel basamağın tekrar sayısına bağlıdır. Oluşturulan DNA zincirlerinin sayısı her döngüde iki katına çıkar ve yeni zincirler bir sonraki döngüde kalıp görevi görürler. İşlem ısı dönüştürücüsü (thermocycler) denilen makinelerde, önceden döngü sayısı ve sıcaklık koşulları belirlenen programlarla otomatik olarak gerçekleştirilir. Bu yöntemle; klonlama, dizi analizi, klinik tanı ve genetik taramalar gibi diğer işlemlerde kullanılmak üzere bol miktarda hedef DNA parçaları elde edilir (Akar,1999, Klug ve Clummings, 2002).

İlk adımda, çoğaltılacak DNA denatüre edilerek tek zincir haline getirilir. Bu genomik DNA; kurumuş kan ya da semen gibi adli tıp örnekleri, uzun süre saklanmış tıbbi örnekler ve tek bir saç teli gibi değişik kaynaklardan elde edilebilir. Çift zincirli DNA, tek zincirli hale gelene kadar 90-95⁰C ' de yaklaşık 5 dakika süreyle ısıtılır. Sıcaklık 50-70⁰C arasında bir değere düşürülerek primerlerin tek zincirli DNA'ya bağlanması sağlanır. Bu primerler 15-30 nükleotid uzunluğunda yapay oligonükleotidlerdir ve çoğaltılacak DNA'nın sınırlandırılması için başlangıç noktası ve bitiş noktası olarak görev yaparlar. Reaksiyon karışımına DNA polimeraz enziminin eklenmesiyle 70-75⁰C sıcaklıkları arasında DNA sentezi gerçekleştirilir. Polimeraz enzimi, nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek, primerlerin uzamasını sağlar ve hedef DNA'nın iki zincirli kopyasını oluşturur (Klug ve Clummings, 2002).

PCR'dan iyi sonuç alınabilmesi değişik faktörlere bağlıdır. DNA polimerazın iyi çalışabilmesi en etkin olduğu pH'ın tüm uygulama boyunca korunabilmesi en önemli faktörlerdendir. Bu amaçla genellikle Tris.HCl pH: 8.4 tepkime karışımında son değişimi 10mM olacak şekilde kullanılır. PCR karışımında tek değerli katyonların özellikle 50-60 mM düzeyinde K⁺ bulunmasının, çoğaltılmayı önemli ölçüde artırdığı saptanmıştır. Yine karışımında 100µg/ml jelatin bulunmasının da benzer etki gösterdiği saptanmıştır. Ayrıca, serbest magnezyum (MgCl₂) konsantrasyonunun azaltılması ile Taq polimeraz doğruluğu artırılabilir. dNTP, DNA ve proteinlerin tümü Mg⁺² iyonuna bağlandıkları için her PCR protokolünde Mg⁺² konsantrasyonu ampirik olarak ayarlanmalıdır. Fazla Mg⁺², enzimin spesifikliğini azaltır, azı ise; enzimin inaktif olmasına yol açar (Akar 1999).

1. 2. 3. Restriksiyon Enzimleriyle Kesim

PCR ürünlerinin incelenmesinde değişik moleküler teknikler bulunmaktadır. Bu tekniklerin en sık kullanılanlarından biri, PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri ile muamele edilerek incelenmesidir. Restriksiyon enzimleri, DNA çift sarmalında kendilerine özgü tanıma dizilimini şeker ve fosfat omurgasından kırar ve bu şekilde DNA'yı manüple etmeyi mümkün kılarlar. Tanıma dizileri çoğu restriksiyon enzimi için DNA zincirinin her iki iplikçiğinde de aynıdır, bunlar "palindromik diziler" olarak adlandırılır. Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde RE sentezler. Esas görevleri; dışarıdan bakteriye giren bazı özel gen veya markerları taşıyan genetik materyalleri ayırıştırarak mutasyonlara mani olmak ve genetik yönden kararlılığı korumaktır. Bu mekanizma, gerçekte bir savunmadır. Bakteriye özgü bu enzimler, çift sarmallı DNA üzerinde özgün bölgeyi tanırlar ve çift sarmallı DNA'nın her iki zincirindeki fosfodiester bağına keserek DNA'yı iki parçaya ayırırlar (Akar 1999).

Restriksiyon endonükleaz enzimleri adlandırılırken izole edilen prokaryotun cins isminin ilk harfi ve tür isminin ilk iki harfi kullanılır. İzozimerler ise; farklı mikroorganizmalardan elde edilip, DNA üzerinde aynı diziyi tanıyıp kesim yapan RE'lerdir (Akar 1999).

1. 2. 4. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR, RT-PCR)

Nükleik asit amplifikasyonu ile eş zamanlı olarak artış gösteren floresans sinyalin ölçülmesiyle kısa sürede, kalitatif ve kantitatif sonuç verebilen PCR yöntemidir. Floresans sinyal ölçümü DNA çift zincirine bağlanan boyalar (etidyum bromid, SYBR Green I) ve hibridizasyon problemleri (Floresans Resonans Enerji Transfer = FRET) ile yapılır.

Hibridizasyon problemleri, iki farklı floresans boya ile boyanmış diziyeye özgü oligonükleotidlerdir. Floresans boyalar, oligonükleotidlerin 3', 5' ucuna veya iç bölgelerine eklenir. Bir set hibridizasyon probu hedef DNA'yı baştan sona hibridize edebilecek bir çift oligonükleotid içerir. Oligonükleotidlerden biri 3'ucundan fluorescein

(3-FL) ile diğeri de 5'ucundan LightCycler Red 640(LC640) veya LC 705 (5LC) ile işaretlenmiştir ve serbest olan 3'-hidroksi ucu genelde polimeraz etkisiyle oluşacak uzamayı önlemek için bir fosfatla bloke edilmiştir. Problar bölgeye özgü tasarlandığı ve ancak iki prob arasında 1-5 nükleotid kadar bir mesafe olduğu takdirde bir enerji transferi oluşur, böylece non-spesifik ışımlar gözlenmez. Floresans boyanın uyarılması ve sahip olduğu enerjiyi diğer floresan boyaya aktarısına FRET denir. Floresans boyalar amplifikasyonun sonuna kadar DNA zincirine bağlı olarak bulunur. Erime sıcaklığına geldiğinde ısı ile birlikte bağlı olduğu diziden koparlar. Analiz, mutant ve normal dizi problemlerinin diziden ayrılması için uygulanan sıcaklık farklılığını temel alan bir sistemle gerçekleştirilir (<http://dna-9.int-med.uiowa.edu>).

Klinik uygulamaları giderek artan real-time PCR sistemleri, hastalıkların tanısında ve nokta mutasyonlarının belirlenmesinde sağladığı üstünlükler nedeniyle tercih edilmektedir. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygınlaşan real-time PCR sistemleri, hız ve kaliteye önem veren moleküler genetik laboratuvarlarının pek çok sorununa çözümler olmaktadır (<http://www.genetiklab.com>).

Real-time PCR'da ürünlerin analizi reaksiyon sırasında yapılmaktadır. Bu nedenle, agaroz jel elektroforezi, DNA bantlarının mor ötesi ışık altında görüntülenmesi gibi işlemlerin uygulanmasına gerek kalmamaktadır. Real-time PCR ürünlerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinde, diziye özgün olmayan floresans boyalardan ya da diziye özgün problemlerden yararlanılmaktadır. Böylece sonuçlar anında alınmakta, kontaminasyon riski azalarak tüm işlemler sıcaklık döngüleri başlayınca otomatik olarak devam etmektedir (<http://www.takarabiousa.com>).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı; Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Homosistein düzeyi belirlenen ve herhangi bir hastalıkla ilişkilendirilmemiş yaş aralığı 19 ila 88 arasında olan 181 kadın, 115 erkekten oluşan 296 birey çalışma grubu olarak belirlenmiştir. Çalışma öncesi bireylerden çalışmaya dair onam formları doldurtularak izinleri alınmıştır.

2. 1. YÖNTEMLER

2. 1. 1. DNA Ekstraksiyonu

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan 1ml 0,5 M Etilendiamintetraasetikasilikli (EDTA, Sigma, ABD) tüp içerisine 9 ml kan örneği alınmıştır. Alınan kan örneği falkon tüp içerisinde 25 ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu (155 mM Amonyum Klorid, AppliChem, Almanya); 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya) ile çalkalanarak 20 dakika buzda bekletilmiştir. Soğutmalı santrifüjde (Hettich, Almanya) +4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek, pellet üzerine tekrar 25 ml RBC Lizis solüsyonu eklenmiştir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanmıştır. Dipte kalan lökositler üzerine 1000 µl. RBC Lizis solüsyonu eklenerek, bu karışımın 800 µl'si ependorf tüpüne alınarak stok olarak saklanmıştır. Geriye kalan 200 µl'lik karışım ependorf tüpüne alınarak, üzerine 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS, Merck, Almanya), lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu (10 mM Trisklorid, Amresco, ABD) pH : 8; 100 mM Sodyum Klorid, 1 mM EDTA (pH: 8) ve 5 µl internal kontrol (Roche Diagnostics, ABD) eklenerek bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda (Kotterman, Almanya) bekletilmiştir.

İkinci gün 1:1 oranında Fenol/Kloroform (Merck, Almanya), İzooamilalkol (Merck, Almanya) eklenerek 10 dakika çalkalanmıştır. Buz içerisinde 20 dk bekletilerek +4°C 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiştir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10'u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenmiştir. Ependorf tüpü alt-üst edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20°C'de bir gece bekletilmiştir.

Üçüncü gün +4°C 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Süpernatant dökülerek tüpe 500 µl %70'lik alkol eklenir ve +4°C 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda alkol dökülmüş ve tüp, kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37°C'de bir gece bekletilerek DNA'nın çözülmesi sağlanmıştır. İzole edilen DNA +4°C'de saklanmıştır.

2. 1. 2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Bu çalışmada PCR tekniği kullanılarak, CBS 844ins68, TYMS 3' UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyon ve DHFR 19 bç'lik delesyonu kapsayan enzim gen bölgelerinin amplifikasyonları gerçekleştirildi.

2. 1. 2. 1. CBS 844ins68 mutasyonu tayini

CBS 844ins68 mutasyonu tayini için yapılan PCR'da son konsantrasyonları 0.1 µg/ml olan iki primer kullanıldı:

Forward: 5' -CTGGCCTTGAGCCCTGAA- 3'

Reverse: 5' -GGCCGGGCTCTGGACT- 3' (MWG Biotech, Almanya)

Diğer PCR komponentleri ise; son konsantrasyon 2 mM olacak şekilde dATP, dGTP, dTTP, dCTP (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya),

10mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9.0), 50mM KCl ve 0.1% Triton[®], 25mM MgCl₂'dür. Son hacim 50 µl'ye ddH₂O ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

CBS 844ins68 mutasyonu için polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise : 94°C' de 5 dk, 94°C' de 0.5 dk, 55°C' de 0.5 dk, 72°C' de 0.5 dk ve son siklуста 2°C'de 5 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Thermoline, ABD). Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında 184 bç ve 252 bç' lik iki fragment beklenmektedir. PCR ürünleri için % 2' lik agaroz jele 10µl ürün yüklenmiştir (Şekil 2.1).

```
ACTTGGAGCCTGGGTTCTTGGGTTTCTCATCCTGCCTCTGAGGCTGGGAAC  
AGGCCACCACCCACAGGCAGATCATTAACAGGCAGTTGTTAACGGCGGTA  
TTGGCCACTCCATAATAGAATATCGAGGCATGTCCAGGCGGGGCTTTTG  
CTGGCCTTGAGCCCTGAAGCCGCGCCCTCTGCAGATCATTGGGGTGGATC  
CCGAAGGGTCCATCCTCGCAGAGCCGGAGGAGCTGAACCAGACGGAGCA  
GACAACCTACGAGGTGGAAGGGATCGGCTACGACTTCATCCCCACGGTGC  
TGGACAGGACGGTAGGTTCGAGTCCAGAGCCCGGCCACAGTGCCGGTGCAGCC  
TGTA ACTC
```

Dizi 2.1: CBS844ins68 mutasyonunun tespit edilebilmesi için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.

2. 1. 2. 2. TYMS 3' UTR 6 bç'lik İnsersiyon/Delesyon Tayini

TYMS 3' UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyon tayini için PCR işleminde son konsantrasyonları 0.1 µg/ml olan iki primer kullanıldı:

F: 5' -CAAATCTGAGGGAGCTGAGT-3'

R: 5' - CAGATAAGTGGCAGTACAGA-3' (MWG Biotech, Almanya)

PCR komponentleri; son konsantrasyon 2mM olacak şekilde dATP, dGTP, dTTP, dCTP , Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9.0), 50mM KCl ve 0.1% Triton[®], 25mM MgCl₂ olacak şekilde son hacim 100 µl'ye ddH₂O ile tamamlanarak reaksiyona sokulmuştur.

TYMS 3' UTR 6 bç 'lik insersiyon/delesyon için polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise: 95°C' de 15 dk, 94°C' de 40 s, 58°C' de 40 s, 72°C' de 40 s ve son döngüde 72°C'de 5 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Biometra, ABD). Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında TYMS 3' UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyon için 148 bç uzunluğunda oligonükleotit ürün elde edilmiştir. PCR ürünleri 2%'luk agaroz jele 10 µl yüklenmiştir.

```
TTTGGAATATTTTTAGAATATTTAAGAATTCACAAGCTATTCCTCAAATCT
GAGGGAGCTGAGTAACACCATCGATCATGATGTAGAGTGTGGTTATGAACTTT
AAAGTTATAGTTGTTTTATATGTTGCTA//TAATAAAGAAGTGTCTGCATTTCGT
CCACGCTTTGTTCAATCTGTACTGCCACTTATCTGCTCAGTTCCTTCCTAAAATA
GATTAAGAAGTCTCCTTAAGTAAA
```

Dizi 2.2: TYMS 3' UTR 6 bç 'lik insersiyon/delesyon mutasyonunun tespit edilebilmesi için PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir. Dra I enzimi kesim noktaları birbirinden eğik çizgi ile ayrılmıştır.

2. 1. 2. 2. 1. TYMS 3' UTR 6 bç'lik İnsersiyon/Delesyon Mutasyonunun Dra I ile Analizi

PCR'ları yapıldıktan ve oluşan 148 bç'lik PCR ürünleri agaroz jelde incelendikten sonra PCR'ları olan örnekler Dra I restriksiyon endonükleazı ile kesilir (Fermentas, ABD). Tango restriksiyon endonükleaz tamponu, kişi başına 10 ünite restriksiyon endonükleaz enzimi, PCR ürünleriyle muamele edilerek enzimin optimum çalışma sıcaklığında (37°C) 14-16 saat inkübe edilir. Kesim sonrasında örnekler %10'luk poliakrilamid jel elektroforezinde (PAGE) yürütülerek Etidiyum bromide ile boyanarak UV'de görüntülenir.

Oluşan bantlara göre insersiyon/delesyon, insersiyon/insersiyon veya delesyon/delesyon şeklinde mutasyonu taşıyan bireyler tayin edilir.

PAGE'de yürütme sonucu; 148 bç'lik bant delesyon/delesyon genotipini; 148bç, 88 bç ve 60 bç'lik bant insersiyon/delesyon genotipini; 88 bç ve 60 bç'lik bantlarının görülmesi ise insersiyon/insersiyon genotipini olarak değerlendirilir (Şekil 2.4).

2. 1. 2. 3. DHFR 19 bç'lik Delesyon tayini

DHFR 19 bç'lik delesyon tayini için PCR işleminde son konsantrasyonları 0.1µg/ml olan üç primer kullanıldı:

Primer 1: 5' -CCACGGTCGGGGTACCTGGG-3'

Primer 2: 5' - ACGGTCGGGGTGGCCGACTC-3'

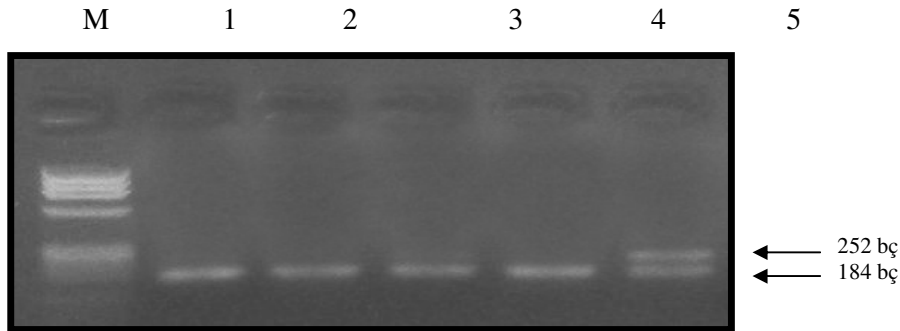
Primer 3: 5' -AAAAGGGGAATCCAGTCGG-3' (MWG Biotech, Almanya)

PCR komponentleri; son konsantrasyon 2mM olacak şekilde dATP, dGTP, dTTP, dCTP (Fermentas, Litvanya), Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 10mM Tris-HCl (oda sıcaklığında pH: 9.0), 50mM KCl ve 0.1% Triton[®], 25mM MgCl₂ olacak şekilde son hacim 50 µl'ye ddH₂O ile tamamlanarak reaksiyona sokulmuştur.

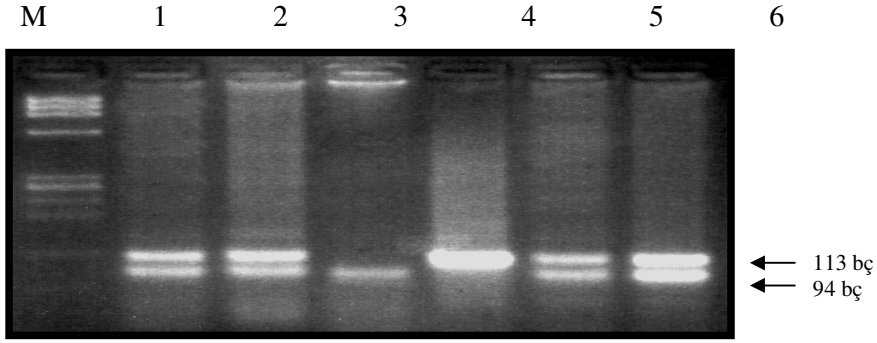
DHFR 19 bç'lik delesyon için polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları ise: 94°C' de 1 dk, 94°C' de 55 s, 64°C' de 55 s, 72°C' de 55 s ve son döngüde 72°C' de 12 dk olarak gerçekleştirilmiştir (Biometra, ABD). Polimeraz zincir reaksiyonu sonrasında 96 bç ve 113 bç'lik fragmentler elde edilir. PCR ürünleri % 4'lük agaroz jele 10 µl yüklenir. 113 bç ve 96 bç'lik bantlarının görülmesi normal/delesyon; 96 bç'lik bandın görülmesi delesyon/delesyon ve 113 bç'lik bandın görülmesi normal/normal genotipi olarak değerlendirilir.

2. 1. 3. Agaroz Jel Elektroforezi

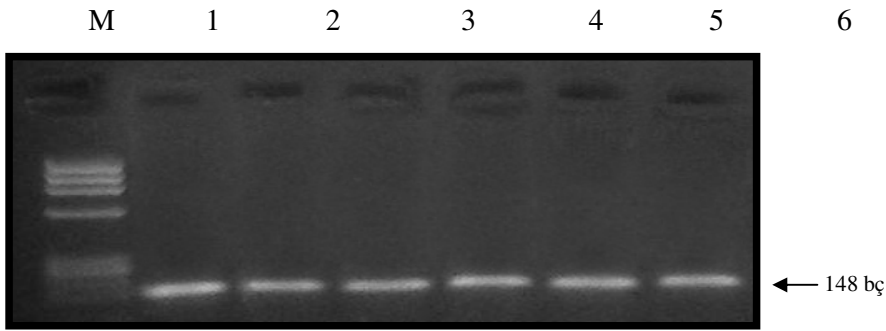
Agaroz (Sigma, ABD), kullanılacağı amaca uygun olarak belirli yüzdelerde hazırlanır. Bizim çalışmamızda CBS844ins68 ve TYMS 3' UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyon PCR ürünlerini %2'lik, DHFR 19 bç'lik delesyonu için yapılan PCR ürünlerini ise %4'lük agaroz jelde değerlendirdik. %2'lik agaroz jel için 2 g , %4'lük agaroz jel için 4 g agaroz tartılıp, TBE 1X (Tris-HCl Borik asit, EDTA) solüsyonu ile 100 ml'ye tamamlanır. TBE 1X solüsyonu, TBE 5X solüsyonunun (Tris 54 g, Borik asit 27.5 g, 0.5 M EDTA 20 ml olarak alınır ve 1 lt deiyonize suya tamamlanarak yapılır.) 1/5 oranında ddH₂O ile seyreltilmesiyle hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdelerde hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında kaynatılır. Üzerine Etidyum Bromit (Sigma, ABD)'in %5'lik stok solüsyonundan 2 µl ilave edilir. İyice karıştırıldıktan sonra önceden uygun taraklar konularak hazırlanmış olan jel tabağına (Qwl Scientific, ABD) dökülür. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklenir. Jelin donmasından sonra jel tabağı ile birlikte elektroforez tankına (Biometra, Almanya) yerleştirilir. Elektroforez tankı TBE 1X solüsyonu ile jelin üstü kapanacak şekilde doldurulur. PCR ürünlerinden 10 µl alınıp, 3-5 µl Brom-Fenol Mavisi (BBF, Merck, Almanya) ile karıştırılarak jele yüklenir. PCR ürünlerinin değerlendirilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (ΦX174 DNA Hae III BioLabs, ABD) PCR ürünleri ile birlikte jele 5 µl kadar yüklenir. 80 V akımda 25-30 dk yürütülür. Ultraviyole ışık (Spectrolite, ABD) altında incelenir ve fotoğraflanır.



Şekil 2.1. : CBS844ins68 mutasyonu PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. İlk örnek marker (ΦX174 DNA Hae III), 1 ila 4. örnekler 252 bç'lik homozigot normal PCR ürünlerini, 5. örnek ise heterozigot insersiyon/delesyon PCR ürününü göstermektedir.



Şekil 2.2. : DHFR 19 bç'lik delesyonu PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. İlk örnek marker (Φ X174 DNA Hae III), 1, 2, 5 ve 6. örnekler heterozigot (Normal/Delesyon), 3. örnek homozigot mutant (Delesyon/Delesyon), 4. örnek ise homozigot normal (Normal/Normal) PCR ürünü göstermektedir.



Şekil 2.3.: TYMS 3'UTR insersiyon/delesyonu için elde edilen PCR ürünlerinin elektroforez fotoğrafı. İlk örnek marker (Φ X174 DNA Hae III).

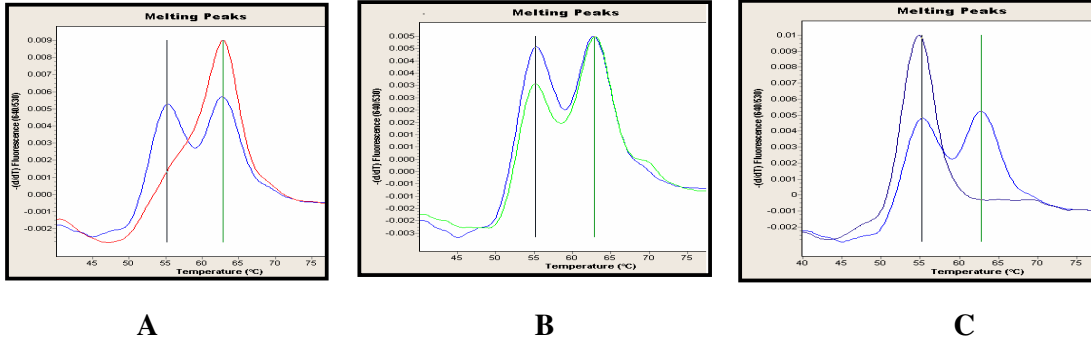
2. 1. 4. MTHFR 677 CT Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Gerçek zamanlı PCR uygulamasında erime eğrisine göre analiz temeline dayanan Light Cycler (Roche Molecular Biochemicals, Manheim, Almanya) cihazı kullanılır. Teknik için borosilikattan yapılmış olan kapiller tüpler ve MTHFR 677CT polimorfizmi belirleme kiti (Roche Molecular Biochemicals) kullanılır. Florasans rezonans enerji transfer teknolojisi ile florasans sinyallerinin algılamasına dayanan sistemde kullanılacak kit, probalar ile işaretlenmiş olan iki florasans boyadan oluşur. Florasans sinyaller Light Cycler cihazında analiz edilir.

Gerçek zamanlı PCR amplifikasyonu için sıcaklık şartları: 95⁰C’ de 10s, 55⁰C’ de 10s, 72⁰C’ de 15 s olarak gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi analizi 94⁰C’ de 0s, 40⁰C’ de 5 s ve 80⁰C’ de 0 s olmak üzere üç aşamada yapılır. Erime eğrisi analizinden sonra kısa bir soğuma prosedürü gerçekleştirilir. Analiz 55⁰C’ de ve 64⁰C’ de bağlanan problara göre yapılır. Homozigot mutant olan TT alleli için 55⁰C’ de ve 64⁰C’ de iki pik görülür. Heterozigot olan CT alleli için 55⁰C’ de tek pik ve homozigot normal olan CC alleli için 64⁰C’ de tek pik görülür.

```
GAGCTTTGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGAGCCG
ATTTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGAGGCTGACACATTCTTCCGCTTTGTGAA
GGCATGCACCGACATGGGCATCACTTGCCCCATCGTCCCCGGGATCTTTCCCAT
CCAGGTGAGGGGCCAGGAGAGCCCATAAGCTCCCTCCACCCCACTCTCACCG
CACCGTCCTCCTTGAACAGGTGGAGGCCAGCCTCTCCTGACTGTCATCCCTATT
```

Dizi 2.3: *MTHFR 677 CT değişiminin tespit edilebilmesi için RT-PCR ile çoğaltılmış dizi. Primerler altı çizili olarak gösterilmiştir.*



Şekil 2.4: *MTHFR 677 CT Geniş zamanlı PCR analizi. A: homozigot CC alleli; B: Heterozigot CT; TT: homozigot mutant genotip*

2. 1. 5. Poliakrilamid Jel Elektroforezi

Elektroforez Aparatının Hazırlanması: Camlar bol su ile iyice yıkandıktan sonra deiyonize suyla durulanır. %70’lik alkolle temizlenir ve kurulanır. 0.8 mm’lik spacerlar

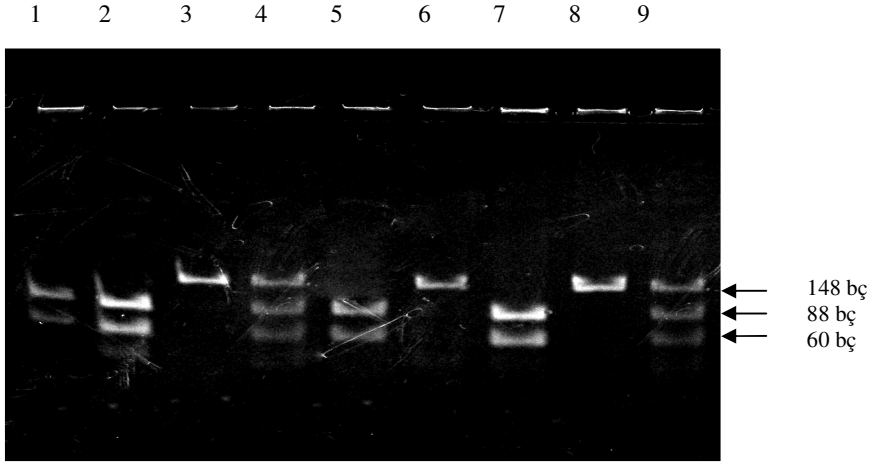
yardımıyla arada 0.8 mm boşluk bırakılması sağlanır ve klemplerle sabitlenir. Jel döküldükten sonra yine 0.8 mm'lik tarak oturtulur.

%10'luk Jelin Hazırlanması: Stok olarak hazırlanan %30'luk akrilamid, Bis-akrilamid solüsyonundan 16,6 ml, TBE 5X tamponundan 10 ml, 350µl 10%'luk Amonyum Persulfat (Sigma, ABD) ve 23.05 ml deiyonize su bir beherde manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırıldıktan sonra üzerine, 17 µl TEMED (Tetra Etil Metilen deamin, Sigma, ABD) konularak, hazırlanan camların arasına dökülür. Yükleme yapılacak hazneleri oluşturmak üzere uygun taraklar takılarak donması beklenir. Jelin polimerleşmesinden ve tarakların çıkarılmasından sonra camlar vertikal jel elektrofezine yerleştirilerek üzeri TBE 1x solüsyonuyla doldurulur. Örneklerden 10 µl kuyucuklara yüklenerek 150 V, 15 mA'de, soğutma yapılmaksızın 3 saat süreyle olacak şekilde akıma tabi tutulur. Bantlar, gümüş boyama tekniğiyle boyanarak görünür hale getirilir.

2. 1. 6. Gümüş Boyama

Gümüş boyama için %1'lik gümüş nitrat, %15'lik Sodyum Hidroksit (NaOH), %7,5'lik Sodyum Bikarbonat solüsyonları kullanıldı. Bu kimyasalların hazırlanma aşaması ise şu şekildedir; %1'lik gümüş nitrat solüsyonu, 5 g gümüş nitrat ($AgNO_3$) (AppliChem, Almanya) tartılıp distile su ile 500 ml' ye tamamlandı. %15'lik sodyum hidroksit (NaOH) solüsyonu, 150 g katı sodyum hidroksit distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. %7,5'lik sodyum bikarbonat (Na_2CO_3) distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Özellikle hazırlanan gümüş stoğu güneş almayacak şekilde saklandı.

Elektroforez sonrası jel, stok solüsyonundan distile su ile 9:1 oranında seyreltilerek hazırlanan %0,1'lik gümüş nitrat solüsyonu ile 15 dk muamele edildi. Daha sonra %1,5'lik sodyum hidroksit solüsyonuna formaldehit eklenip gümüş solüsyonunu aşamasını takiben jelle muamele edildi. Jel %0,75'lik sodyum bikarbonat solüsyonu içinde birkaç dakika bırakılarak boyama işlemi sonlandırıldı.



Şekil 2.5: *TYMS 3' UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyon mutasyonunun Dra I enzimi ile kesim ürünlerinin %10'luk PAGE görüntüsü. 1, 5 ve 7. örnekler insersiyon/insersiyon genotipini; 2, 4ve 9. örnekler insersiyon/delesyon genotipini; 3, 6 ve 8. örnekler ise delesyon/delesyon genotipini göstermektedir.*

2. 1. 7. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Öncelikle homosistein düzeylerine ait verinin dağılımı incelendi. Bu dağılımın normal olmadığı görüldü (Tablo 3.1). Bu nedenle tüm istatistik analizi boyunca iki yol izlendi:

1. Homosisten düzeyinin doğal logaritması (ln) alınarak dağılım normalleştirildi ve bu veri üzerinde parametrik (Anova vb) testler uygulandı.

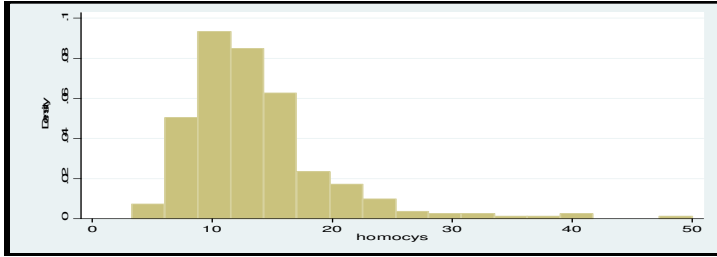
2. Homosistein düzeylerinin orjinal hali kullanıldığında ise non-parametrik istatistik testler (Kruskal-Wallis, spearman korrelasyon vb) kullanıldı. Ayrıca tüm değişkenlerin birarada kontrolünü sağlayan çok değişkenli Lineer Regresyon analizi kullanıldı. Odds değerleri (OR) ise %95 güven aralığında hesaplanmıştır.

3. BULGULAR

296 homosistein düzeyi belirli olan birey üzerinde yaptığımız çalışmada MTHFR 677 CT, CBS 844ins68, TYMS 3'UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyon ve DHFR 19 bç'lik delesyonu incelenmiş, ayrıca bu mutasyonların homosistein düzeyi üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

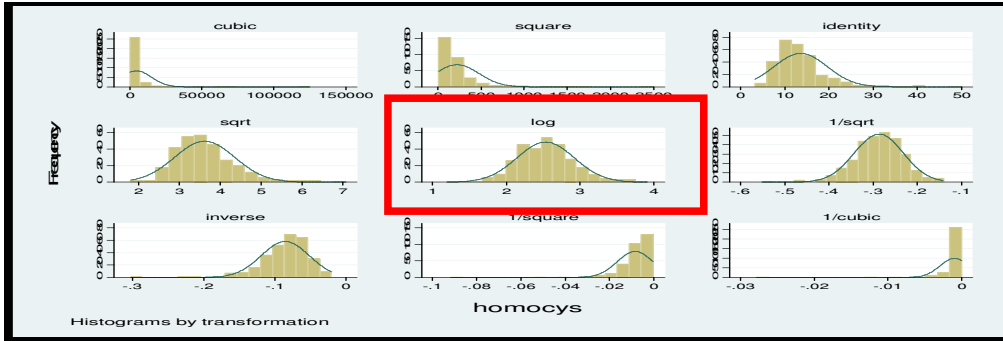
İkiden çok bağımsız grup verilerinin değerlendirilmesinde grupları birbirinden ayıran tek özellik olduğu, ya da grupların tek değişkenin değerleri ile ayrıldığı zaman tek yönlü varyans analizi (Anova) kullanılır. Anova testinin verilere uygulanması için bağımlı değişkenin normal dağılım göstermesi gerekmektedir. Çalışma grubuna ait homosistein düzeyleri normal bir dağılım göstermemektedir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1: Çalışma grubuna ait homosistein düzey verilerinin dağılım tablosu



Normal dağılım özellikleri göstermesi ve testin uygulanması için homosistein düzeylerinin doğal logaritması (ln) alındı (Tablo 3.2). Çalışılan enzimlerin tek başlarına homosistein düzeyi üzerine etkisini görmek hem ln'i alınmış homosistein değişkeni kullanılarak ANOVA hem de non-parametrik olan Kruskal-Wallis testi ve sonuçların desteklenmesi için de Bartlett's testi uygulandı.

Tablo 3.2: Verilerin normal dağılım gösterebilmesi için yapılabilecek değişimler



MTHFR 677 CT polimorfizminin genotipleri, homosistein düzeylerine göre karşılaştırılmıştır. Normal homosistein düzeyine sahip bireyler arasında CC genotipi 101, CT genotipi 92 ve TT genotipi 11 kişide görülmüştür. Bu kişilerde, C alleli sıklığı 0.72, T alleli sıklığı 1.14'tür. Yüksek homosistein düzeyi saptanan bireyler arasında ise CC genotipi 40 kişi, CT genotipi 39 kişi ve TT genotipi 13 kişide bulunmuştur. C alleli sıklığı 1.19, T alleli sıklığı 0.65'tir (Tablo 3.3).

Tablo 3.3 : MTHFR 677 C-T değişimine ait genotip dağılımı

	tHcy ≤ 15 n = 204 n%	tHcy >15 n = 92 n%	P	OR
MTHFR 677 CC	101 (50)	40 (43)	-	1
MTHFR 677 CT	92 (45)	39 (42)	0.79	1.08 (0.6-1.82)
MTHFR 677 TT	11 (5)	13 (15)	0.01	3.01 (1.2-7.2)
MTHFR 677 C alleli	294 (72)	119 (65)	-	1
MTHFR 677 T alleli	114 (28)	65 (35)	0.06	1.4 (0.9-2)

Tablo 3.4: MTHFR 677 CT genotip-homosistein dağılımı

Mthfr	Mean	Std. Dev.	Freq.
C/C	2.5046963	.34622559	140
C/T	2.5077275	.38361493	132
T/T	2.8486871	.51363889	24
Total	2.5339392	.38881052	296

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	2.58800081	2	1.29400041	9.03	0.0002*
Within groups	42.0082172	293	.143372755		
Total	44.596218	295	.15117362		

Bartlett's test for equal variances: $\chi^2(2) = 7.3745$ Prob> $\chi^2 = 0.025$

Yukarıdaki tablodan da görüldüğü gibi bu çalışma grubunda genotipi CC olanların ortalama homosistein düzeyi 12.24 $\mu\text{mol/L}$, CT olanlarınki 12.3 $\mu\text{mol/L}$, TT olanlarınki ise 17.11 $\mu\text{mol/L}$ olarak bulunmuştur. Bu genotipler arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı p değerinin 0.0002 çıkması ile görülmüştür (Tablo 3.4).

Tablo 3.5: MTHFR 677 CT genotiplerinin kendi aralarında karşılaştırılması

Comparison of loghomo by mthfr1 (Bonferroni)		
Row Mean-	Col Mean	
	C/C	C/T
C/T	.003031	
	1.000	
T/T	.343991	.34096
	0.000	0.000

Analizde; MTHFR 677 CC, CT ve TT genotipleri karşılaştırılmıştır. Genotipler kendi aralarında da karşılaştırılmıştır. CC ve CT genotipleri bireysel olarak homosistein düzeyine etki etmezken TT genotipinin bir risk faktörü olduğu görülmektedir (Tablo 3.5). CC ve CT genotipleri, TT genotipiyle karşılaştırıldığında düzeye etkili gibi görünmektedir (p=0.000). Ancak bunun sebebi TT tek başına olan etkisinden kaynaklanmaktadır.

Tablo 3.6: *MTHFR 677 CT Kruskal-Wallis testi*

+-----+				chi-squared =	9.729 with 2 d.f.
mthfr1 Obs Rank Sum				probability =	0.0077*
-----+-----+-----				chi-squared with ties =	9.730 with 2 d.f.
C/C	140	20292.00		probability =	0.0077*
C/T	132	18849.00			
T/T	24	4815.00			
+-----+					

Sonuçlar yapılan Kruskal-Wallis testi ile de desteklenmiş, istatistiksel olarak aynı anlamda sonuçlar bulunmuştur.(Tablo 3.6) (p= 0077).

DHFR 19 bç delesyonu değerlendirmesine göre; normal homosistein düzeyine sahip bireyler arasında normal genotipi 106, heterozigot olan normal/delesyon genotipi 84 ve homozigot mutant olan delesyon/delesyon genotipi 14 kişide görülmüştür. Bu kişilerde, DHFR 19 bç'lik delesyonu olmayan normal genotip sıklığı 2.96, delesyon genotip sıklığı 1.12'dir. Yüksek homosistein düzeyi saptanan bireyler arasında ise normal genotipi 56, normal/delesyon genotipi 33 ve delesyon/delesyon genotipi 3 kişide görülmüştür. Normal allel sıklığı 0.45, delesyon bulunan allel sıklığı ise 0.39'dur (Tablo 3.7).

Tablo 3.7: *DHFR 19 bç' lik delesyonu için genotip dağılımı (N= normal, N/Del: normal/delesyon)*

	tHcy ≤ 15 n = 204 n%	tHcy >15 n = 92 n%	p	OR
DHFR N	106 (52)	56 (61)	-	1
DHFR N/Del	84 (41)	33 (36)	0.25	0.75 (0.4-1.2)
DHFR Del/Del	14 (7)	3 (3)	0.25	0.40 (0.1-1.4)
DHFR N frekansı	296 (72.5)	45 (79)	-	1
DHFR Del frekansı	112 (27.5)	39 (21)	0.1	0.7 (0.4-1)

Tablo 3.8: DHFR 19bç'lik delesyon genotip-homosistein dağılımı

dhfr1	Mean	Std. Dev.	Freq.
N	2.5525444	.40594443	162
N/Het	2.5148149	.37861067	117
Del/Del	2.4882622	.28530781	17
Total	2.5339392	.38881052	296

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.134336946	2	.067168473	0.44	0.6428
Within groups	44.461881	293	.151747034		
Total	44.596218	295	.15117362		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 3.2554 Prob>chi2 = 0.196

DHFR 19 bç'lik delesyon için yapılan analiz de ise istatistiksel olarak bir anlam bulunamamıştır (p= 0.64). Yapılan DHFR genotip analizlerinde risk getirilerinde hemen hemen aynı olduğu görülmektedir (Tablo 3.8).

Tablo 3.9: DHFR 19bç'lik delesyon genotiplerinin kendi aralarında karşılaştırılması

Comparison of loghomo by dhfr1
(Bonferroni)

Row Mean-		
Col Mean	n	n/het
N/Del	-.037729	
	1.000	
Del/Del	-.064282	-.026553
	1.000	1.000

Analizde; DHFR genotipleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu yine anlamlı p değerine ulaşılmamıştır (Tablo 3.9).

Tablo 3.10: DHFR 19bç'lik delesyon Kruskal-Wallis testi

```
+-----+
| dhfr1 | Obs | Rank Sum | chi-squared = 0.567 with 2 d.f.
|-----+-----+-----| probability = 0.7530
|      n | 162 | 24531.00 | chi-squared with ties = 0.567 with 2 d.f.
| n/het | 117 | 17088.00 | probability = 0.7530
| del/del | 17 | 2337.00 |
+-----+
```

Sonuç desteklenmesi için yapılan Kruskal-Wallis analizlerinde de istatistiksel anlam bulunamamıştır (Tablo 3.10).

CBS 844ins68 delesyon/insersiyon mutasyonu değerlendirmesine göre; normal homosistein düzeyine sahip bireyler arasında normal genotipi 179, delesyon/insersiyon genotipi 25 kişi saptanmıştır. Yüksek homosistein düzeyine sahip bireyler arasında normal genotipi 82 kişide, delesyon/insersiyon genotipi ise 10 kişide bulunmuştur (Tablo 3.11).

Tablo 3.11 :CBS 844insersiyon68 için genotip dağılımı (N: normal, Del/ins: delesyon/insersiyon)

CBS	tHcy ≤ 15 n =204 n%	tHcy >15 n =92 n%	P	OR
CBS N	179 (88)	82 (89)	-	1
CBS Del/Ins	25 (12)	10 (11)	0.85	0.9 (0.03-0.85)

Tablo 3.12: CBS 844ins68 Mutasyon genotip-homosistein dağılımı

CBS	Mean	Std. Dev.	Freq.
N	2.5326676	.38862564	262
Del/ins	2.543738	.39595408	34
Total	2.5339392	.38881052	296

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.003688212	1	.003688212	0.02	0.8762
Within groups	44.5925298	294	.151675271		
Total	44.596218	295	.15117362		

Bartlett's test for equal variances: chi2(1) = 0.0204 Prob>chi2 = 0.886

CBS 844ins68 mutasyonu için yapılan analiz de ise istatistiksel olarak bir anlam bulunamamıştır(p= 0.87). Yapılan CBS genotip analizlerinde risk getirilerinin de hemen hemen aynı olduğu görülmektedir (Tablo 3.12).

Tablo 3.13: CBS 844ins68 Mutasyon genotiplerinin kendi aralarında karşılaştırılması

```
Comparison of loghomo by cbs1
(Bonferroni)

Row Mean-|
Col Mean |           N
-----+-----
Del/ins |           .01107
|           0.876
```

Analizde; CBS genotipleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu yine anlamlı p değerine ulaşılmamıştır (Tablo 3.13).

Tablo 3.14: CBS 844ins68 mutasyonu Kruskal-Wallis testi

```
+-----+
| cbs1 | Obs | Rank Sum | chi-squared = 0.167 with 1 d.f.
|-----+-----+-----| probability = 0.6826
|   n  | 262 | 39099.00 | chi-squared with ties = 0.167 with 1 d.f.
|   di |  34 | 4857,00 | probability = 0.6826
+-----+
```

Sonuç desteklenmesi için yapılan Kruskal-Wallis analizlerinde de istatistiksel anlam bulunamamıştır (Tablo 3.14).

TYMS 3' UTR 6 bç' lik insersiyon/delesyon değerlendirmesine göre; normal homosistein düzeyine sahip bireyler arasında delesyon/delesyon genotipi 67, insersiyon/delesyon genotipi 94 ve insersiyon/insersiyon genotipi 43 kişide görülmüştür. Bu kişilerde, delesyon frekans sıklığı 2.28, insersiyon frekans sıklığı ise 1.8'dir. Yüksek homosistein düzeyi saptanan bireyler arasında ise delesyon/delesyon genotipi 26, insersiyon/delesyon genotipi 53 ve insersiyon/insersiyon genotipi 13 kişide görülmüştür. Delesyon frekans sıklığı 1.05, insersiyon frekans sıklığı ise 0.79'dur (Tablo 3.15).

Tablo 3.15: TYMS 3' UTR 6 bç' lik insersiyon/delesyon için genotip dağılımı (D/D: delesyon/delesyon, I/D: insersiyon/delesyon, I/I: insersiyon/insersiyon)

TYMS	tHcy ≤ 15 n =204 n%	tHcy >15 n =92 n%	P	OR
TYMS D/D	67 (33)	26 (28)	-	1
TYMS I/D	94 (46)	53 (58)	0.1	1.4 (0.8-2.5)
TYMS I/I	43 (21)	13 (14)	0.5	0.7 (0.3-1.6)
TYMS D frekansı	228 (56)	105 (57)	-	1
TYMS I frekansı	180 (44)	79 (43)	0.7	0.9 (0.6-1.3)

Tablo 3.16: TYMS 3'UTR 6 bç'lik İnsersiyon/Delesyon genotip-homosistein dağılımı

TYMS	Mean	Std. Dev.	Freq.
Del/Del	2.5075064	.39788689	95
Ins/Del	2.5816993	.40113938	146
Ins/Ins	2.4528146	.32263319	55
Total	2.5339392	.38881052	296

Analysis of Variance

Source	SS	df	MS	F	Prob > F
Between groups	.76137071	2	.380685355	2.54	0.0802
Within groups	43.8348473	293	.149606987		
Total	44.596218	295	.15117362		

Bartlett's test for equal variances: chi2(2) = 3.6868 Prob>chi2 = 0.158

TYMS 3'UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyon mutasyonu için yapılan analiz de ise istatistiksel olarak bir anlam bulunamamıştır(p= 0.08). Yapılan TYMS genotip analizlerinde risk getirilerinde hemen hemen aynı olduğu görülmektedir (Tablo 3.16).

Tablo 3.17: TYMS 3'UTR 6 bç'lik İnsersiyon/Delesyon genotiplerinin kendi aralarında karşılaştırılması

Comparison of loghomo by tyms1
(Bonferroni)

Row Mean-	Col Mean	Del/Del	Ins/Del
Ins/Del		.074193	0.440
Ins/Ins		-.054692	-.128885
		1.000	0.108

Analizde; TYMS genotipleri karşılaştırılmıştır. Karşılaştırma sonucu yine anlamlı p değerine ulaşılmamıştır (Tablo 3.17).

Tablo 3.18: TYMS 3'UTR 6 bç'lik İnsersiyon/Delesyon Kruskal-Wallis testi

tyms1	Obs	Rank Sum		chi-squared =	4.711 with 2 d.f.
Del/Del	95	13523.00		probability =	0.0948
Ins/Del	146	23186.00		chi-squared with ties =	4.712 with 2 d.f.
Ins/Ins	55	7247.00		probability =	0.0948

Sonuç desteklenmesi için yapılan Kruskal-Wallis analizlerinde de istatistiksel anlam bulunamamıştır (Tablo 3.18).

Enzimlerin tek tek homosistein düzeyi üzerine etkilerine bakıldıktan sonra birbirleriyle olan korelasyonlarını anlamak için Spearman korelasyon analizi yapılmıştır (Tablo 3.19). Analiz de ilk satır rho sayısını, ikinci satır gözlem sayısını ve 3. satır ise p sayısını belirtmektedir.

Tablo 3.19: Non-parametrik korelasyon analizi

	mthfr1	dhfr1	cbs1	tyms1
mthfr1	1.0000 296			
dhfr1	0.0583 296 0.3179	1.0000 296		
cbs1	-0.0146 296 0.8018	0.0509 296 0.3825	1.0000 296	
tyms1	-0.0127 296 0.8282	-0.1010 296 0.0828	0.0296 296 0.6126	1.0000 296

Spearman analizinde hem rho sayısı hem de p sayısı bir istatistiksel göstergedir. Rho sayısının 0.5'ten büyük olması ($\rho > 0.5$) iki enzim arasında bir korelasyon olduğunu gösterir. p sayısının 0.05'ten küçük ($p < 0.05$) olması ise bu sonucun istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığını gösterir. Analiz ile 4 enzimin kendi aralarında korelasyonuna bakılmıştır. Bu sonuçlara göre enzimlerin hiç birisi diğeriyle korele değildir, yani bir enzimi taşıyan kişilerin başka bir enzimi daha sık taşıma olasılıkları yüksek değildir.

Çalışma grubuna ait veriler Lineer regresyona tabi tutulmuştur. Bu analiz ile ayrı ayrı tüm enzim genotiplerini taşımanın ortalama homosistein düzeyini nasıl etkilediği test edilmiştir (Tablo 3.20). Ayrıca analizle MTHFR 677 TT genotipinin homosistein düzeyi üzerine bir risk faktörü olduğu p değerinin anlamlı çıkmasıyla tekrar teyit edilmiştir.

Tablo 3.20: Çoklu değişkenli lineer regresyon analizi sonuçları

```
xi: regress loghomo i.mthfr1 i.dhfr1 i.cbs1 i.tyms1
i.mthfr1      _Imthfr1_1-3      (naturally coded; _Imthfr1_1 omitted)
i.dhfr1      _Idhfr1_1-3      (naturally coded; _Idhfr1_1 omitted)
i.cbs1      _Icbs1_1-2      (naturally coded; _Icbs1_1 omitted)
i.tyms1      _Ityms1_1-3      (naturally coded; _Ityms1_1 omitted)
```

Source	SS	df	MS	Number of obs =	296
Model	3.58562997	7	.512232852	F(7, 288) =	3.60
Residual	41.010588	288	.142397875	Prob > F =	0.0010
				R-squared =	0.0804
				Adj R-squared =	0.0581
Total	44.596218	295	.15117362	Root MSE =	.37736

loghomo	Coef.	Std. Err.	t	P> t	[95% Conf. Interval]
_Imthfr1_2	.0126635	.0462062	0.27	0.784	-.0782813 .1036082
_Imthfr1_3	.3514416	.0834733	4.21	0.000*	.1871465 .5157368
_Idhfr1_2	-.0446964	.0461348	-0.97	0.333	-.1355005 .0461077
_Idhfr1_3	-.0698387	.0974048	-0.72	0.474	-.2615542 .1218768
_Icbs1_2	-.0001144	.0693934	-0.00	0.999	-.1366969 .1364681
_Ityms1_2	.0676772	.0500891	1.35	0.178	-.0309098 .1662642
_Ityms1_3	-.07812	.0644935	-1.21	0.227	-.2050584 .0488184
_cons	2.502622	.0508167	49.25	0.000	2.402603 2.602641

$$\text{Bu test için; } \ln(\text{thcy}) = \text{const} + (\beta_1 \times \text{MTHFR2}) + (\beta_2 \times \text{MTHFR3}) + (\beta_3 \times \text{DHFR2}) \\ + (\beta_4 \times \text{DHFR3}) + (\beta_5 \times \text{CBS2}) + (\beta_6 \times \text{TYMS2}) + (\beta_7 \times \text{TYMS3})$$

formülü kullanılır. Enzim isimlerinden sonra görülen 2 ve 3 sayıları genotipleri göstermektedir (Tablo 3.21). 1 olarak kabul edilen genotipler enzimlerin normal halleri olup formülde baz alınan değerdir. Formülde β sayıları regresyon katsayılarını ifade etmektedir.

Tablo 3.21: Veri kodlaması

MTHFR2= CT	DHFR2= N/Del	CBS2= N/Del	TYMS2= Ins/Del
MTHFR3=TT	DHFR3=Del/Del		TYMS3= Del/Del

Tablo 3.22: Enzim genotiplerinin kıyaslanmalarına göre beklenen homosistein ortalamaları

	MTHFR CT	MTHFR TT	DHFR N/DEL	DHFR Del/Del	CBS Del	TYMS Ins/Del	TYMS Del/Del
MTHFR CT	12.3	-	7.86	11.5	12.33	13.23	11.38
MTHFR TT	-	24,5	11	16.11	17.28	18.54	15.95
DHFR N/DEL	7.86	11	7,76	-	7.76	8.33	7.17
DHFR Del/Del	11.5	16.11	-	11.35	11.35	12.18	10.48
CBS Del/Ins	12.33	17.28	7.76	11.35	12.18	13.06	11.24
TYMS Ins/Del	13.23	18.53	8.33	12.18	13.06	13.06	-
TYMS Del/Del	11.38	15.95	7.17	10.48	11.24	-	11.24

Analizde görüldüğü gibi diğer sonuçları teyit eden sonuçlar çıkmıştır. MTHFR 677 TT genotipi tek başına etkili olduğundan diğer enzim genotipleriyle karşılaştırıldığında da homosistein düzeyi yüksek bulunmuştur (Tablo 3.22).

4. TARTIŞMA

Homosistein, diyet ile alınan metiyonin remetilasyonu sonucu oluşan ve protein yapısına katılmayan, yapısında sülfidril grubu bulunduran bir aminoasittir. Homosistein düzeyi konjenital olarak metabolizmasında rol oynayan enzimlerin eksikliklerinde ya da edinsel olarak çeşitli hastalıklar ve fizyolojik durumlarda yükselmektedir. Homosistein metabolizmasında rol oynayan sistatyon β sentaz, metilentetrahidrofolat redüktaz, metiyonin sentetaz gibi enzimlerin kalıtsal defektlerinde hiperhomosisteinemi görülebilir. Folat, vitamin B₁₂ ve vitamin B₆ eksikliklerinin hiperhomosisteinemi etiolojisinde rolü olduğu bilinmektedir (Makris 2000, Gtaeme ve John 1999). Hiperhomosisteinemi vücutta birçok zararlı etkilere yol açmaktadır. Bunlardan bazıları arasında serbest radikaller gibi davranıp endotel hasarı oluşturması ve bu olayın sonucunda da trombosit aktivasyonu, pıhtılaşma faktörlerinin modifikasyonu, trombüs formasyonu gibi koagülasyonu artırıcı etkiler meydana getirmesi, biyolojik membranlarda oksidasyon yapması, LDL oksidasyonu yaparak ateroskerozu artırıcı etkiler ortaya çıkarması sayılabilmektedir (Boushey ve ark. 1995).

Deneyel çalışmalar göstermiştir ki hiperhomosisteineminin aterojenik olma özelliği endotel disfonksiyonu ve hasar sonrası gelişen trombosit aktivasyonu ve trombus oluşumu ile ilişkilidir. Homosisteine bağlı olarak oluşan ateroskleroz için yapılan insan ve hayvan deneylerinde endotel hasarı olan bölgelerde trombosit yığılımı ve trombosit zengin trombus oluşumu görülmüştür (Harker ve ark. 1974). Harker ve ark. (1974) homosisteine bağlı endotel hasarının subendotelyal matriksi açığa çıkardığını ve trombosit aktivasyonuna yol açtığını ileri sürmüşlerdir. Lentz ve ark. (1996) primatlarda diyete bağlı hiperhomosisteineminin invivo vazomotor bozukluğa, invitro ise endotelyal antitrombotik fonksiyona yol açtığını göstermişlerdir. Bu bulgular Celermajer ve ark. (1993) hiperhomosisteinemili hastalarda bozulmuş endotele bağlı vazodilatasyon ve Berg ve ark. (1995) arkadaşlarının genç hiperhomosisteinemili hastalarda bozulmuş endotelyal antikoagülan fonksiyonu gösterdikleri çalışmalarla desteklenmiştir. Tam olarak mekanizması bilinmemekle beraber homosistein birçok düzeyde endotel hasarına sebep olur. Homosistein endotelin normal antirombotik fenotipini faktör XII'nin ve faktörV'in aktivitesini artırarak ve protein C'nin aktivasyonunu azaltarak değiştirir (Ratnoff 1968).

Homosistein ayrıca trombomodülin ekspresyonunu azaltır, doku faktörü ekspresyonunu artırır ve endotelden heparan sülfat ekspresyonunu artırır (Nishinaga ve ark. 1993). Tüm bu etkiler sonucunda trombin oluşumu kolaylaşır ve protrombotik bir ortam oluşur. Homosistein seviyeleri ile Alzheimer, osteopoz, anemi, böbrek yetmezliği, hipotiroidizm gibi farklı hastalık grupları arasındaki ilişki birçok çalışmada irdelenmiştir.

Hiperhomosisteinemiye neden olarak metabolizmasında yer alan enzimlerde meydana gelen heterozigot ve/veya homozigot mutasyonlar enzimlerin aktivitelerini etkileyen dış faktörlerden çok daha önemlidir. MTHFR enziminin aktivitesindeki azalma, plazma homosistein düzeyinin artmasına, folat düzeyinin ise azalmasına yol açar. Çünkü plazmada folat başlıca metiltetrahidrofolat şeklinde bulunur. MTHFR, metiltetrahidrofolatı oluşturan enzimdir. Bu enzimi kodlayan genin 677. nükleotidindeki sitozin yerine timin gelmesi (MTHFR 677 CT) enzim aktivitesinin ve ısıya dayanıklılığının değişmesine neden olur (Barboux ve ark. 2000). 37⁰ C'de aktivite gösteren enzim termobilitesi 46⁰C'ye kadar çıkmaktadır (Kenet ve ark. 2000). Enzim aktivitesinin azalması, 5-MTHF seviyesinin azalmasına ve bunun sonucu olarak da homosisteinin metiyonine dönüşmemesi nedeniyle plazma homosistein seviyesinde artmaya neden olur (Schmitz ve ark. 1996) 677 CT mutasyonunda, MTHFR aktivitesi, homozigot mutant TT genotipinde, heterozigot CT ve homozigot normal CC genotiplerine göre azalırken, homosistein seviyesi önemli oranda yükselir (Bagley ve Jacob 1998). Kang ve ark. (1993) CT değişiminin homosistein düzeyini artırdığını bulmuşlardır. Harmon ve ark. (1996) ve Jacques ve ark. (1996) yaptıkları çalışmalarda 677CT mutasyonunun homosistein seviyesi üzerine güçlü bir belirleyici faktör olduğunu saptamışlardır. Kluitjsman ve ark. (1996) 677CT mutasyonunun kardiyovasküler hastalık riskini üç kat artırdığını göstermişlerdir. De Stefano ve ark. (2000) damar tombozlarında faktör V leiden ve protrombin mutasyonları üzerine yaptıkları çalışmada MTHFR 677 CT mutasyonunun trombotik riski artırmadığını tespit etmişlerdir. Akar ve ark. (2000) spina bifida hastaları ve anneleri üzerinde yaptıkları çalışmada 677 CT mutasyonunu tek başına risk getirmediği ancak MTHFR 1298 AC mutasyonu ile beraber bulunduğu spina bifida riskini artırdığı bulunmuştur. Naushad ve ark. (2007) 677CT değişiminin derin ven trombozunu artırıcı bir risk faktörü olduğunu saptamışlardır. Bizim çalışma grubumuzda bulduğumuz değerler daha önce yapılan çalışmalar ile paralellik göstermiştir

Homosistein düzeyinin dengelenmesi remetilasyon yoluyla yapılabildiği gibi CBS enziminin görev aldığı transsülfürasyon yolu ile de sağlanır. CBS enziminin katalizlediği reaksiyonla homosistein sistine indirgenir. CBS enziminin aktivitesinin azalması başlıca üç tip hastalıkla ilişkilendirilir. Birincisi homozigot olarak görülen CBS eksikliğinin sebep olduğu homosisteinüri (Mudd ve ark. 1995), ikincisi CBS'deki kısmi bir eksiklik ise hafif seyreden hiperhomosisteinemi ve sonucunda aterosklerozise sebep olması (Boers ve ark. 1985, Clarke ve ark. 1991) üçüncü olarak enzim eksikliğinden kaynaklanan down sendromunun görülmesidir (Korenberg ve ark. 1990). CBS enziminin 7. intronunun 3' ucu ve 8. ekzonunun 5' ucu arasında olan 68 bp'lik bir insersiyon (844ins68) en sık görülen mutasyonlardan biridir. Akar ve ark. (1998) tromboz oluşturma riskleri için CBS 844ins68, MTHFR 677CT mutasyonlarına Türk toplumunda bakmışlardır. Sonuç olarak MTHFR 677CT'nin tromboz oluşumu için bir risk faktörü olduğu, CBS 844ins68'in ise bir risk faktörü olmadığını bulmuşlardır. Grossmann ve ark. (2002) yaptığı çalışmada CBS 844ins68'in ve MTHFR 677CT mutasyonunun derin ven hastaları için bir risk faktörü olmadığını saptamışlardır. Kondrad ve ark. (2004) MTHFR 677 CT değişiminin homosistein seviyesini artırıcı yönde bir etkiye sahip olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca sigara, hipertansiyon, düşük B₁₂ seviyesi ya da folat seviyesindeki eksikliğin homosistein seviyesini etkilediğini bulmuşlardır. Aynı çalışmada CBS 844ins68 mutasyonu ile homosistein seviyeleri arasında bir korelasyon kuramamışlardır. Yine miyokard enfaktüslü hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada MTHFR 677 CT ve CBS 844ins64 mutasyonunun bir risk faktörü olmadığı bulunmuştur (Dilley ve ark. 2001). Zhang ve Dai'nin (2001) yaptıkları çalışmada mutasyonun enzim aktivitesini etkileyerek homosistein düzeyini azalttığını ve vasküler tromboembolik hastalıklara karşı koruyucu bir etkisi olduğunu saptamışlardır. Yu ve ark. (2006) derin ven trombozu olan hastalarda homosistein metabolizmasında görevli olan enzimlerden MTHFR 677 CT, CBS 844ins68 mutasyonlarını inceleyerek homosistein düzey artışının hastalar için bir risk faktörü olup olmadığını incelemişlerdir. Çalışmada MTHFR 677 CT derin ven trombozu oluşumu için risk getirisi olduğu ancak CBS 844ins68'in bir risk faktörü olmadığını bulmuşlardır. Bizim çalışmamızda ise homosistein düzeyi ve CBS 844ins64 mutasyonu arasında anlamlı bir istatistikî değer elde edilemeyerek mutasyonun herhangi bir etkisi olmadığı görülmüştür.

TYMS deoksiuridin monofosfat (dUMP)' ın deoksitimidin monofosfat (dTMP)' a dönüşmesinde rol oynayan bir enzimdir. Bu reaksiyonla DNA replikasyonu ve tamiri için gerekli olan pirimidinin biyosentezi gerçekleşir. MTHFR ve TYMS için bir kofaktör olan 5,10 MTHF remetilasyon yolunun önemli komponentlerinden biridir. Metabolizmada folat düzeyinin düşük olması 5,10 MTHF sentezini limitler bu da 5-MTHF'nin sentezini kısıtlar. Sonuç olarak homosisteinin remetilasyon yolu ile metiyonine dönüşmesi engellenir, plazma homosistein düzeyi artar ve pirimidin biyosentezi engellenir (Carmel ve ark. 2005). TYMS enzimin 3' ucundaki translasyonu yapılmayan bölgede 6 bç'lik insersiyon/delesyon şeklindeki mutasyon farklı hastalık grupları için incelenmiştir. TYMS enzimidaki 6 bç'lik polimorfizmin TYMS mRNA miktarının azalmasına sebep olur (Michael ve ark. 2004). Volcik ve ark. (2003) yaptıkları çalışmada 3'UTR bölgesinde yer alan insersiyon/delesyonun NTD için bir risk faktörü olduğunu bulmuşlardır. Kealey ve ark. (2005) TYMS 3'UTR ins/del mutasyon etkilerini Kuzey İrlandalı hastalar üzerinde incelemiş, sigara içmeyen kişiler arasında mutasyonun homosistein seviyesini artırıcı bir etkisi olduğunu bulmuşlardır. 6 bç'lik polimorfizmin mide kanseri üzerine etkileri inceleyen ve farklı sonuçlar bulan birçok çalışma vardır. Araştırmacılar bu farklılıkları etnik kökenden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Lu ve ark. (2006) yaptıkları çalışmada polimorfizmin mide kanseri için bir risk faktörü olduğunu söylerken, Graziano vd (2004) İtalyan hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada 6 bç'lik polimorfizmin mide kanserine karşı koruyucu bir etkisi olduğunu tespit etmişlerdir. Çin toplumunda ise 6 bç'lik polimorfizm mide kanseri için risk faktörü olduğu bulunmuştur (Zhang ve ark. 2005, Lu ve ark. 2006). Bizim çalışma grubumuzda TYMS 3' UTR bölgesinde yer alan 6 bç'lik insersiyon/delesyonun homosistein düzey artışına veya düşüşüne bir etki etmediği bulunmuştur.

Folat suda eriyen bir B vitaminidir. DNA sentezi, DNA tamir mekanizması ve remetilasyon yolağında görev alır. Folatın öncelikli görevi pürin ve timidin sentezi için gerekli tek karbon ünitesini ve homosisteinin metiyonine dönüşmesini sağlamaktır. Düşük folat konsantrasyonunda, yüksek homosistein düzeyinin görülmesi folat ve homosisteinin bu yakın ilişkilerinden kaynaklanır (Mason 2003). Düşük folat seviyesinin farklı kanser tiplerine (Blount ve ark. 1997), NTD gibi konjenital malformasyonlara (Czeizel ve Dudas 1992) sebep olduğu farklı çalışmalarda gösterilmiştir. Hücresel metabolizma ve hücre büyümesinde önemli rolü DHFR insan metabolizmada sentezi yapılamayan ve gıda yoluyla alınan folatın hücre içinde kullanılabilen formu olan folik asite indirgenmesinden

sorumlu olan enzimdir. DHFR enziminin promotor bölgesinde bulunan 9 bç'lik tekrar ve 19 bç'lik delesyonun gen ekspresyonunu etkilediği bulunmuştur. Yapılan çalışmada 9 bç'lik tekrarın homosistein düzeyi üzerine bir etkisi olmadığı ancak 19 bç'lik delesyonun del/del genotipinin homosistein düzeyini azaltma yönünde bir etkisi olduğunu göstermiştir. Araştırmacılar 19 bç'lik delesyonun bir transkripsiyon faktörü olan SP1 bağlanma bölgesini kapsamamasından dolayı ekspresyonun etkilendiğini ya da delesyonun enzim üzerinde düzenleyici bir etkisi olduğu düşünölen inton 1'de gerçekteşmesinden dolayı homosistein miktarının azaldığını düşünmüşlerdir. Ancak DHFR ekspresyonunu çalışmalarını destekleyecek RNA çalışmalarını yapamadıklarından dolayı kesin bir sonuca varamamışlardır (Johnson ve ark. 2004). DHFR enziminin homosistein metabolizması üzerine etkisini konu eden sadece bir çalışma vardır. Bizim çalışmamız bu çalışma DHFR 19 bç'lik delesyonu ve homosistein seviyeleri arasında bir korelasyon kurulamamıştır.

Yapılan bu çalışmada sonuç olarak;

1. MTHFR 677 CT polimorfizmi TT genotipi taşımanın, homosistein düzeyi üzerine etkisi bulunmuştur.
2. DHFR 19 bç'lik delesyonun, TYMS 3' UTR 6 bç'lik insersiyon/delesyonun ve CBS 844ins64 mutasyonunun homosistein düzeyi arasında bir ilişki kurulamamıştır.
3. Homosistein düzeyi üzerine etkili olabilecek enzimler arasında bir korelasyon kurulamamıştır.

KAYNAKLAR

Afman, L.A. Lievers, K.J.A. Kluijtmans, L.A.J. Trijbels, F.J.M. Blom, H.J. 2003, Gene Gene İnteraction Between The Cystathionine B-Synthase 31 Base Pair Variable Number Of Tandem Repeats And The Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C>T Polymorphism On Homocysteine Levels And Risk For Neural Tube Defects., *Molecular Genetics and Metabolism*, 78 (3); 5-211.

Akar, N. Akar, E. Mısırlıoğlu, M. Avcu, F. Yalcin, A. Cin. S. 1998, Search For Genetic Factors Favoring Thrombosis In Turkish Population. *Thrombosis Research*, 92 (2); 79–82.

Akar, N. 1999, *Klinik Moleküler Patoloji'ye Giriş (Genişletilmiş ikinci baskı)*. Ankara: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi An Tıp A.Ş Yayınları.

Akar, N. Akar, E. Deda, G. Arsan, S. 2000, Spina Bifida And Common Mutations At The Homocysteine Metabolism Pathway. *Clinical Genetics*, 57(3); 230-1.

Altuntaş, N. Soylu, K. Suskan, E. Akar, N. 2004, Homocysteine Levels in Turkish Children. *Turk J Haematol* 21(2); 79-82

Anagnou, N. P. Antonarakis, S. E. O'brien, S. J. Modi, W. S. Nienhuis, A. W. 1988, Chromosomal Localization And Racial Distribution Of The Polymorphic Human Dihydrofolate Reductase Pseudogene (DHFRI). *Am. J. Hum. Genet.*, 42; 345-352.

Anthony, A. 1996, Folate Receptors. *Annu Rev Nutr.*, 16; 501-521.

Bagley, P. Jacob, S. 1998, A Common Mutation In The Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Is Associated With An Accumulation of Formylated Tetrahydrofolates In Red Blood Cells. *Med Sci*, 95; 13217-13220.

Bailey, L. Duhaney, R. Maneval, D. 2002, Vitamin B-12 Status Is Inversely Associated With Plasma Homocysteine In Young Women With C677T And/Or A1298C Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms. *J Nutr*, 132; 24665-24709.

Bao, L. Vlcek, C. Paces, V. Kraus, J. 1998, Identification And Tissue Distribution Of Human Cystathionine Beta-Synthase Messenger-Rna Isoforms. *Arch.Biochem. Biophys.*, 350; 95-103.

Barbaux, S. Kluijtmans, L. Whitehead, A. 2000, Accurate And Rapid Multiplex And Heterodublexing Method For Genotyping Key Enzymes Involved In Folat/Homocysteine Metabolism. *Clin Chem* 46; 907-12.

Bjelland, I. Tell, G. Vollset, S. Refsum, H. Ueland, P. 2003, Folate, Vitamin B12, Homocysteine, And The MTHFR 677 C->T Polymorphism In Anxiety And Depression: The Hordaland Homocysteine Study. *Arch Gen Psychiatry.*, 60; 618-626.

Bjorke, Monsen, A. Ueland, P. 2003, Homocysteine And Methylmalonic Acid In Diagnosis And Risk Assessment From Infancy To Adolescence. *Am J Clin Nutr*, 78 (1); 7-21.

Blount, B. Mack, M. Wehr, C. Macgregor, J. Hiatt, R. Wang, G. Wickramasinghe, S. Everson, R. Ames, B. 1997, Folate Deficiency Causes Uracil Misincorporation Into Human Dna And Chromosome Breakage: Implications For Cancer And Neuronal Damage. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94 (7); 3290-5.

Bolander, C.G. 2002, Focus On Homocysteine And The Vitamins Involved In Its Metabolism. Springer Bussiness Media Gmbh, 262, France.

Bostom, A.G. Lathrop, L. 1997, Hyperhomocysteinemia In Endstage Renal Disease: Prevalence, Etiology And Potential Relationship To Arteriosclerotic Outcomes. *Kidney Int*, 52; 10-20.

Boushey, C. Beresford, S. Omenn, G. Motulsky, A. 1995, A Quantitative Assessment Of Plasma Homocysteine As A Risk Factor For Vascular Disease. Probable Benefits Of Increasing Folic Acid Intakes. *Jama*, 274; 1049-1057.

Brattstrom, L.E. Israelson, B. Jeppsson, J.O. Hultberg, B.L. 1988, Folic Acid An Innocuous Means To Reduce Plasma Homocysteine. *Scand J Clin Lab Mvest*, 48; 215-21

Benoist, B. Impact Of Folate Deficiency On Health. World Healty Organization (Facsimile) 1998.

Brown, K. Kluijtmans, L. Young, I. McNulty, H. Mitchell, L. Yarnell, J. Woodside, J. Boreham, C. McMaster, D. Murray, L. Strain, J. Whitehead, A. 2004, The Thymidylate Synthase Tandem Repeat Polymorphism Is Not Associated With Homocysteine Concentrations In Healthy Young Subjects. *Hum Genet*, 114; 182-185.

Carmel, R. Watkins, D. Goodman, S.I. Rosenblatt, D.S. 1988, Hereditary Defect Of Cobalamin Metabolism (Cblg Mutation) Presenting As A Neurologic Disorder In Adulthood. *N Engl J Med*. 318 (26); 1738-41.

Carson, N. Cusworth, D. Dent, C. Field, C. Neill, D. Westall, R. Homocystinuria: A New Inborn Error Of Metabolism Associated With Mental Deficiency. *Arch Dis Child*., 425.

Celermajer, D. Sürensen, K. Ryalls, M. 1993, Et Al. Impaired Endothelial Function Occurs In The Systemic Arteries Of Children With Homozygous Homocystinuria But Not In The Inheterozygous Parents. *J Am Coll Cardiol*, 22;854-8.

Chalupsky, K. Cai, H. 2005, Endothelial Dihydrofolate Reductase: Critical For Nitric Oxide Bioavailability And Role In Angiotensin Uncoupling Of Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 102; 9056-9061.

Chassé, J. Paly, E. Paris, D. Paul, V. Sinet, P. Kamoun, P. London, J. 1995, Genomic Organization Of The Human Cystathionine β -Synthase Gene: Evidence For Various Cdnas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 211; 826-832.

Chauveau, P. Chadeaux, B. Cude, M. 1993, Hyperhomocysteinemia, A Risk Factor For Atherosclerosis In Chronic Uremic Patients. *Kidney Int*, 43 (41); 72-77.

Chen, M. J. Shimada, T. Moulton, A. D. Harrison, M. Nienhuis, A. W. 1982, Intronless Human Dihydrofolate Reductase Genes Are Derived From Processed Rna Molecules *Proc. Nat. Acad. Sci.* 79: 7435 - 7439.

Chen, M. J. Shimada, T. Moulton, A.D. Cline, A. Humphries, R. K. Maizel, J. Nienhuis, A. W. 1984, The Functional Human Dihydrofolate Reductase Gene. *J. Biol. Chem.*, 259; 3933-3943.

Chen, Z. Karaplis, A.C. Ackerman S.L. Pogribny, I.P. Melnyk, S. Lussier-Cacan, S. Chen, M.F. Pai, A. John, S.W. Smith, R.S. Bottiglieri, T. Bagley, P. Selhub, J. Rudnicki, M.A. James, S.J. Rozen, R. 2001, Mice Deficient In Methylenetetrahydrofolate Reductase Exhibit Hyperhomocysteinemia And Decreased Methylation Capacity, With Neuropathology And Aortic Lipid Deposition. *Hum Mol Genet*, 10 (5); 433-43.

Craik, C. S. Rutter, W. J. Fletterick, R. 1983, Splice Junctions: Association With Variation In Protein Structure. *Science*, 220; 1125-1129.

Cunha, A. Hirata, M., Kim, C. Guerra-Shinohara, E. Nonoyama, K. Hirata, R. 2002, Metabolic Effects Of C677T And A1298c Mutations At The MTHFR Gene In Brazilian Children With Neural Tube Defects. *Clin Chim Acta.*, 318 (1-2); 139-43.

Czeizel, A. Dudas, I. 1992, Prevention Of The First Occurrence Of Neuraltube Defects By Periconceptional Vitamin Supplementation. *N Engl J Med*, 327; 1832– 1835.

Daly, S. Molloy, A. Mills, J. 1999, Et Al. The Influence of 5,10 Methylenetetrahydrofolate Reductase genotypes On Enzyme Activity In Placental Tissue. *Brit J Obstet Gynaec*, 106; 1214-1218.

Daubner, S. Matthews, R. 1982, Purification And Properties Of Methylenetetrahydrofolate Reductase From Pig Liver. *J.Biol.Chem.*, 257; 140-145.

De Stefano, V. Casorelli, I. Rossi, E. Zappacosta, B. Leone, G. 2000, Interaction Between Hyperhomocysteinemia And Inherited Thrombophilic Factors In Venous Thromboembolism. *Semin Thromb Hemost.*, 26 (3); 305-11.

De Franchis R., Fermo I., Mazzola G., Sebastio G., Di Minno G., Coppola A., Andria G., D'Angelo A. 2000, Contribution Of The Cystathionine Beta-Synthase Gene (844ins68) Polymorphism To The Risk Of Early-Onset Venous And Arterial Occlusive Disease And Of Fasting Hyperhomocysteinemia. *Thromb Haemost* 84:576–582.

Dilley, A. Hooper, W. C. El-Jamil, M. Renshaw, M. Wenger, N. K. Evatt, B. L. 2001, Mutations In The Genes Regulating Methylene Tetrahydrofolate Reductase (Mthfr CT677) And Cystathione B-Synthase (Cbs Ga919, Cbs TC833) Are Not Associated With Myocardial Infarction In African Americans. *Thrombosis Research*, 103; 109–115.

Duvigneaud, V. A. 1952, Trail Of Research In Sulfur Chemistry And Metabolism, Cornell University Press, Ithaca, America.

- Engbersen, A.M. Franken, D.G. Boers, G.H. Stevens, E.M. Trijbels, F.J. Blom, H.J. 1995, Thermolabile 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase As A Cause Of Mild Hyperhomocysteinemia. *Am J Hum Genet.* 56(1), 50-142.
- Enokido, Y. Suzuki, E. Iwasawa, K. Namekata, K. Okazawa, H. Kimura, H. 2005, Cystathionine B-Synthase, A Key Enzyme For Homocysteine Metabolism, is Preferentially Expressed In The Radial Glia/Astrocyte Lineage Of Developing Mouse CNS., *The FASEB Journal*, 19 (13):6-1854.
- Fenech, M. 2001, The Role Of Folic Acid And Vitamin B12 In Genomic Stability Of Human Cells. *Mutat Res*, 475;57-67.
- Finkelstein, J.D. 1998, The Metabolism Of Homocysteine: Pathways And Regulation. *Eur J. Pediatr*, 157 (2); 4-40.
- Finkelstein, J. Kyle, W. Martin, J. Pick, A. 1975, Activation Of Cystathionine Synthase By Adenosylmethionine And Adenosylethionine. *Biochem Biophys Res Commun*, 66; 81- 87.
- Finkelstein, J. Martin, J. 1984, Methionine Metabolism In Mammals. Distribution Of Homocysteine Between Competing Pathways. *J Biol Chem*, 259; 9508-13.
- Finkelstein, J. Martin, J. 1984 Inactivation Of Betaine-Homocysteine Methyltransferase By Adenosylmethionine And Adenosylethionine. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 118; 14-19.
- Fodinger, M. Horl, W. Sunder-Plassman, 2000, G. *Molecular Biology Of 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase.* *J Nephrol*, 13(1); 20-33.
- Friedman, G. Goldschmidt, N. Friedlander, Y. 1999, Common Mutation A1298C In Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Association With Plasma Total Homocysteine And Folate Concentrations. *J Nutr*, 129; 656-1661.
- Friedman, A.N. Bostom, A.G. Selhub, J. Levey, A.S. Rosenberg, I.H. 2001, The Kidney And Homocysteine Metabolism. *J Am Soc Nephrol*, 12; 2181-2189.
- Friedrich, W., 1988, *Vitamins.*, Walter De Gruyter, 675-676 Berlin-Newyork.
- Frosst, P. Blom, H.J. Milos, R. Goyette, P. Sheppard, C.A. Matthews, R.G. Boers, G.J.H. Den Heijer, M. Kluijtmans, L.A.J. Van Den Heuvel, L.P. Rozen, R. 1995, A Candidate Genetic Risk Factor For Vascular Disease: A Common Mutation In Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Nature Genet.*, 10; 111-113.
- Gallagher, P. Ward, P. Tan, S. Naughten, E. Kraus, J. Sellar, G. Mcconnell, D. 1995, Et Al High Frequency (71%) Of Cystathionine B-Synthase Mutation G307S In Irish Homocystinuria Patients. *Hum Mutat*, 6;177-180.
- Gerritsen, T. Vaughn J.G. Waisman H. 1962, The Identification Of Homocystine In The Urine. *Biochem Biophys Res Commun*, 19 (9); 6-493

- Gibson, J.B., Carson N.A., Neill D.W. 1964, Pathological Findings In Homocystinuria. *J Clin Pathol*, 17:427-37.
- Girgis, S. Nasrallah, I. Suh, J. Oppenheim, E. Zanetti, K. Mastri, M. Stover, P. 1998, Molecular Cloning, Characterization And Alternative Splicing Of The Human Cytoplasmic Serine Hydroxymethyltransferase Gene. *Gene*, 210(2);315-24.
- Goyette, P. Sumner, J.S. Milos, R. Duncan, A.M.V. Rozenblatt, D.S. Matthews R.G. Rozen, R. 1994, Human Methylenetetrahydrofolate Reductase: Isolation of cDNA Mapping And Mutation Identification. *Nature Genet.*, 7;195-200.
- Goyette, P. Pai, A. Milos, R. 1998, Gene Structure Of Human Mouse Methylenetetrahydrofolate Reductase(Mthfr). *Mammalian Genome*, 9;652-656.
- Graziano, F. Kawakami, K. Watanabe, G. Ruzzo, A. Humar, B. Santini, D. Catalano, V. Ficarelli, R. Merriman, T. Panunzi, S. Testa, E. Cascinu, S. Bearzi, I. Tonini, G. Magnani, M. 2004, Association Of Thymidylate Synthase Polymorphisms With gastric Cancer Susceptibility. *Int. J. Cancer*, 112; 1010–1014.
- Grossmann, R. Schwender, S. Geisen, U. Schambeck, C. Merati, G. Walter. U. 2002, Cbs 844ins68, Mthfr 677CT And Epcr 4031ins23 Genotypes In Patients With Deep-Vein Thrombosis. *Thrombosis Research*, 107; 13– 15.
- Hankey, G. Eikelboom, J.W. 1999, Homocysteine And Vascular Disease. *The Lancet*, 354(31); 407-413.
- Harker, L.A. Slichter, S.J. Scott, C.R. Ross, R. 1974, Homocysteinemia:Vascular Injury And Arterial Thrombosis. *N Engl J Med*, 291: 537-43.
- Harmon, D. Woodside, J. Yarnell, J. McMaster, D. Young, I. Mccrum, E. Gey, K. Whitehead, A. Evans, A 1996, The Common ‘Thermolabile’ Variant Of Methylenetetrahydrofolate Reductase is Major Determinant of Mild Hyperhomocysteinaemia.*Qjm*, 89; 571–577.
- Haworth, J.C. Dilling, L.A. Surtees, R.A.H. Seargeant, L.E. Lue-Shing, H. Cooper, B.A. Rosenblatt, D.S. 1993, Symptomatic And Asymptomatic Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency In Two Adult Brothers. *Am. J. Med. Genet.*, 45; 572-576.
- Hoffbrand, A. V. Tripp, E. Jackson, B. F. A. Luck, W. E. Frater-Schroder, M. 1984, Hereditary Abnormal Transcobalamin II Previously Diagnosed As Congenital Dihydrofolate Reductase Deficiency. (Letter) *New Eng. J. Med.*, 310; 789-790.
- Homberger, G. Linnebank, M. Winter, C. 2000, Et Al. Genomic Structure And Transcript Variants of The Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *Eur J Hum Genet*, 8; 725-729.
- Hori, T. Takahashi, E. Ayusawa, D. Takeishi, K. Kaneda, S. Seno, T. 1990, Regional Assignment Of The Human Thymidylate Synthase (Ts) Gene To Chromosome Band 18p11.32 By Nonisotopic In Situ Hybridization. *Hum. Genet.*, 85; 576-580.

Jacob, A. 2000, Folate, Dna Methylation, And Gene Expression: Factors Of Nature And Nurture. *Am J Clin Nutr*, 72; 903-904.

Jacques, P. Bostom, A. Williams, R. Ellison, R. Eckfeldt, J. Rosenberg, I. Selhub, J. Rozen, R. 1996, Relation Between Folate Status, A Common Mutation In Methylenetetrahydrofolate Reductase, And Plasma Homocysteine Concentrations. *Circulation*, 93; 7-9.

Jian-Wei, L. Chang-Ming, G. Jian-Zhong, W. Hai-Xia, C. Kazuo, T. Ji-Feng, F. 2006, Polymorphism In The 3'-Untranslated Region Of The Thymidylate Synthase Gene And Sensitivity Of Stomach Cancer To Fluoropyrimidine-Based Chemotherapy. *J Hum Genet*, 51; 155-160.

Johnson, W. Stenroos, E. Spychala, J. Chatkupt, S. Ming, S. Buyske, S. 2004, New 19 Bp Deletion Polymorphism In Intron-1 Of Dihydrofolate Reductase (Dhfr): A Risk Factor For Spina Bifida Acting In Mothers During Pregnancy? *Am J Med Genet*, 124a; 339- 345.

Johnson, W.G. Scholl, T. O. Spychala, J. R. Buyske, S. Stenroos, E. S. . Chen. X. 2005, Common Dihydrofolate Reductase 19-Base Pair Deletion Allele: A Novel Risk Factor For Preterm Delivery. *Am J Clin Nutr*, 81; 664-8.

Kaneda, S. Nalbantoglu, J. Takeishi, K. Shimizu, K. Gotoh, O. Seno, T. Ayusawa, D. 1990, Structural And Functional Analysis Of The Human Thymidylate Synthase Gene. *J. Biol. Chem.*, 265; 20277-20284.

Kang, S.S. Wong, P.W.K. Susmano, A. Sora, J. Norusis, M. Ruggie, N. 1991, Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase: An Inherited Risk Factor For Coronary Artery Disease. *Am. J. Hum. Genet.*, 48; 536-545.

Kang, S. Wong, P. Susmano 1991, A Thermolabile Methylenetetrahydrofolate Reductase: An Inherited Risk Factor For Coronary Artery Disease. *J Hum Genet*, 48; 536-545.

Kang, S.S. Wong, P.W.K. 1992, Hyperhomocysteinemia As A Risk Factor For Occlusive Vascular Disease. *Ann. Rev. Nutr*, 12; 279-298.

Karyağar, E. 2006, Uzun Süreli Metotreksat Tedavisi Alan Jüvenil İdiyopatik Artritli Çocuklarda Folik Asit Desteğinin Plazma Total Homosistein Düzeyine Etkisi. *İstanbul Göztepe Eğitim Ve Araştırma Hastanesi. Uzmanlık Tezi.*

Kawakami, K. Omura, K. Kanehira, E. Watanabe, Y. 1999, Polymorphic Tandem Repeats In The Thymidylate Synthase Gene is Associated With its Protein Expression In Human Gastrointestinal Cancers. *Anticancer Res*, 19;3249-3252.

Kawakami, K Salonga, D. Park, J. Danenberg, K. Uetake, H. Brabender, J. Omura, K. Watanabe, G. Danenberg, P. 2001, Different Lengths Of A Polymorphic Repeat Sequence In The Thymidylate Synthase Gene Affect Translational Efficiency But Not Its Gene Expression. *Clin Cancer Res*, 7;4096-4101.

Kealey, C. Brown, K. S. Woodside, J. V. Young, I. Murray, L. Boreham, C. A. McNulty, H. Strain, J. Mcpartlin, J. J. Scott, J. M. Whitehead, A. S. 2005, A Common Insertion

/Deletion Polymorphism Of The Thymidylate Synthase (Tyms) Gene is A Determinant Of Red Blood Cell Folate And Homocysteine Concentrations. *Hum Genet*, 116; 347–353.

Kenet, G. Sadetzki, S. Murad, H. Martinowitz, U. Rosenberg, N. Gitel, S. Rechavi, G. Inbal, A. 2000, Factor V Leiden And Antiphospholipid Antibodies Are Significant Risk Factors For Ischemic Stroke İn Children. *Stroke*, 31(6); 1283-1288.

Kery, V. Poneleit, L. Kraus, J. 1998, Trypsin Cleavage Of Human Cystathionine β -Synthase İnto An Evolutionary Conserved Active Core: Structural And Functional Consequences. *Arch.Biochem.Biophys.*, 355; 222-232.

Kluijtmans, L. Van Den Heuvel, L. Boers, G. Frosst, P. Stevens, E. Van Oost, B. Den Heijer, M. Trijbels, F. Rozen, R. Blom, H. 1996, Molecular Genetic Analysis İn Mild Hyperhomocsteinemia: A Common Mutation İn The Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Is A Genetic Risk Factor For Cardiovascular Disease. *Am J Hum Genet* 58; 35-41.

Kluijtmans, L. Boers, G. Trijbels, F. Van Lith-Zanders, H. Van Den Heuvel, L. Blom, H. 1997, A Common 844ins68 Insertion Variant İn The Cystathionine β -Synthase Gene. *Biochem.Mol.Med.*, 62; 23-25.

Klug, Ws., Cummlıngs, Mr. 2000, *Genetik Kavramlar*, 6. Baskı. USA: Prentice Hall (Türkçe Çeviri: Prof. Dr. Cihan Öner, Ankara).

Konrad, C. Muller, G. Langer, C. Kuhlenbaumer, G. Berger, K. Nabavi, D. Dziewas, R. Stogbauer, F. Ringelstein, E. Junker, R. 2004, Plasma Homocysteine, Mthfr C677t, Cbs 844ins68bp, And Mthfd1 G1958a Polymorphisms İn Spontaneous Cervical Artery Dissections. *J Neurol.*, 251 (10); 1242-8.

Korenberg, J. Kawashima, H. Pulst, S. Ikeuchi, T. Ogasawara, N. Yamamoto, K. Schonberg, S. West, R. Allen, L. Magenis, E. 1990, Molecular Definition Of A Region Of Chromosome 21 That Causes Features Of The Down Syndrome Phenotype. *Am J Hum Genet.*, 47(2); 236-46.

Kraus, J. Packman, S. Fowler, B. Rosenberg, L. 1978, Purification And Properties Of Cystathionine β -Synthase From Human Liver. *J.Biol.Chem.*, 253; 6523-6528.

Kraus, J. 1998 *Biochemistry And Molecular Genetics Of Cystathionine B-Synthase Deficiency*. *Eur J Pediatr*, 157; S50–S53.

Kraus, J. Williamson, C. Firgaira, F. Yang-Feng, T. Münke, M. Francke, U. Rosenberg Le 1986 Cloning And Screening With Nanogram Amounts Of İmmunopurified Mrnas: cDNA Cloning And Chromosomal Mapping Of Cystathionine β -Synthase And The Subunit of Propionyl-Coa Carboxylase. *Proc.Natl.Acad.Sci.Usa*, 83; 2047-2051.

Kraus, J. Oliveriusova, J. Sokolova, J. Kraus, E Vlcek, C. De Franchis, R. Maclean, K. Bao, L. Bukovska, G. Patterson, D. Paces, V. Ansorge, W. Kozich, V. 1998, The Human Cystathionine β -Synthase (Cbs) Gene: Complete Sequence, Alternative Splicing And Polymorphisms. *Genomics*, 52; 312-324.

Kraus, J. Janosik, M. Kozich, V. Mandell, R. Shih, V. Sperandio, M. Sebastio, G. De Franchis, R. Andria, G. Kluijtmans, L. Blom, H. Boers, G. Gordon, R. Kamoun, P. Tsai, M. Kruger, W. Koch, H. Ohura, T. Gaustadnes, M. 1999 Cystathionine Beta-Synthase Mutations In Homocystinuria. *Hum Mutat*, 13; 362-75.

Laura E.M., Scott A., Jeanne M.R.N., Patrick S.P., Leslie N.S., Alexander S.W. 2004, Spina Bifida. *Seminers*.

Ledbetter, D. H. Airhart, S. D. Nussbaum, R. L. 1984, Localization Of Thymidylate Synthase To Human Chromosome 18 By Somatic Cell Hybrid Complementation Analysis. (Abstract) *Am. J. Hum. Genet.*, 36: 203.

Lee Me, Wang H. 1999, Homocysteine And Hypomethylation. A Novel Link To Vascular Disease. *Trends Cardiovasc Med.*;9 (1-2) 49-54.

Lentz, S. Sobey, C. Piegors, D. 1996, Et Al .Vascular Dysfunction In Monkeys With Diet Induced Hyperhomocysteinemia.*J Clin Invest*, 98; 9-24.

Lentz, S.R., Christopher G.S., Donald J.P., Monica Y.B., Frank M. F., René M., Donald D. H. 1996, Vascular Dysfunction in Monkeys With Diet-induced Hyperhomocysteinemia. *J Clin Invest.*, 98 (1); 9-24.

Makris, M. 2000, Hyperhomocysteinemia And Trombosis. *Clin Lab Haematol*; 22 (3); 133-143.

Marsh, S. Collie-Duguid, E. S. Li, T. Liu, X. Mcleod, H. L. 1999, Ethnic Variation In The Thymidylate Synthase Enhancer Region Polymorphism Among Caucasian And Asian Populations. *Genomics*, 58; 310-312.

Martianov, I. Ramadass, A. Barros, A. S. Chow, N. Akoulitchev, A. 2007, Repression Of The Human Dihydrofolate Reductase Gene By A Non-Coding Interfering Transcript. *Nature*, 445; 666-670.

Mason, J. 2003, Biomarkers Of Nutrient Exposure And Status In Onecarbon (Methyl) Metabolism. *J Nutr*, 133 (Suppl 3); 941s– 947s.

Maurer, B. J. Carlock, L. Wasmuth, J. Attardi, G. 1985, Assignment Of Human Dihydrofolate Reductase Gene To Band Q23 Of Chromosome 5 And Of Related Pseudogene Psihd1 To Chromosome 3. *Somat. Cell Molec. Genet.*, 11; 79-85.

Mccully, K.S. 1969. Vascular Pathology Of Homocysteinemia: Implications For The Pathogenesis Of Arteriosclerosis. *Am J Pathol.* 56(1);111-28.

Mccully, Ks. 1996, Homocysteine And Vascular Disease. *Nat Med* 2; 386-9.

Mcgill, J.J. Mettler, G. Rosenblatt, D.S. Scriver, C.R. 1990, Detection Of Heterozygotes For Recessive Alleles. Homocyst(E)Inemia: Paradigm Of Pitfalls In Phenotypes. *Am J Med Genet*, 36(1); 45-52.

- Meister, A. 1994, Glutathione, Ascorbate and Cellular Protection. *Cancer Res.* 54 (7): 1969-1975.
- Mosharov, E. Cranford, M.R. Banerjee, R. 2000, The Quantitatively Important Relationship Between Homocysteine Metabolism And Glutathione Synthesis By The Transsulfuration Pathway And its Regulation By Redox Changes. *Biochemistry*, 39(42);13005-11.
- Mudd, S. 1964. Homocystinuria: An Enzymatic Defect. *Science*, 143: 1443-45.
- Mudd, S.H. Uhlendorf, B.W. Freeman, J.M. Finkelstein, J.D. Shih, V.E. 1972, Homocystinuria Associated With Decreased Methylenetetrahydrofolate Reductase Activity. *Biochem Biophys Res Commun.* 46(2); 905-12.
- Mudd, S. Skovby, F. Levy, H. Pettigrew, K. Wilcken, B. Pyeritz, R. Andria, G. Boers, G. Bromberg, I. Cerone, R. Fowler, B. Grobe, H. Schmidt, H. Schweitzer, L. 1985, The Natural History Of Homocystinuria Due To Cystathionine β -Synthase Deficiency. *Am.J.Hum.Genet.*, 37; 1-31.
- Mudd, S.H. Levy, H.L. Kraus, J.P. 2007, Disorders Of Transsulfuration. In: Scriver Cr, Beaudet Al, Sly Ws, Valle D, Eds. *The Metabolic & Molecular Bases Of Inherited Disease*. 8th Ed. (2); 56 New York.
- Münke, M. Kraus, J. Ohura, T. Francke, U. 1988, The Gene For Cystathionine β -Synthase (Cbs) Maps To The Subtelomeric Region On Human Chromosome 21q And To Proximal Mouse Chromosome 17. *Am.J.Hum.Genet.*, 42; 550-559.
- Narisawa, K. Wada, Y. Saito, T. Suzuki, H. Kudo, M. Arakawa, T. Katsushima, N. Tsuboi, R. 1977, Infantile Type Of Homocystinuria With N5,10 - Methylenetetrahydrofolate Reductase Defect. *Tohoku J. Exp. Med.*, 121; 185-194.
- Naushad, S. Jamal, N. Angalena, R. Prasad, C. Devi, A. 2007, Hyperhomocysteinemia And The Compound Heterozygous State For Methylene Tetrahydrofolate Reductase Are Independent Risk Factors For Deep Vein Thrombosis Among South Indians. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 18(2); 113-7.
- Nguyen, T.T. Hayakawa, T. Tsuge, H. Effect Of Vitamin B6 Deficiency On The Synthesis And Accumulation Of S-Adenosylhomocysteine And S-Denosylmethionine In Rat Tissues. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2001 Jun;47(3):188-94.
- Nishinaga, M. Ozawa, T. Shimada, K. 1993, Homocysteine, A Thrombogenic Agent, Suppresses Anticoagulant Heparan Sulfate Expression In Cultured Porcine Aortic Endothelial Cells. *J Clin Invest*, 92;1381-6.
- Nygård, O. M.D., Nordrehaug, J.E. M.D., Refsum, H. M.D., Ueland, P.M. M.D., Farstad, M. M.D., Vollset, A.S.E. M.D. 1997, Plasma Homocysteine Levels And Mortality In Patients With Coronary Artery Disease. *Dr.P.H. N Engl J Med.* 337(4); 230-6.
- Picciano, M. 2000, Is Homocysteine A Biomarker For Identifying Women At Risk Of Complications And Adverse Pregnancy Outcomes? *Am J Clin Nutr*; 71(4); 962-8.

- Rady, P. Tying, S. Hundnall, S. 1999, Et Al. Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr): The incidence Of Mutations C677t And A1298C In The Ashkenazi Jewish Population. *Am J Med Genet*, 86; 380-384.
- Ratnoff, O. 1968, Activation Of Hageman Factor by L-Homocysteine. *Science*, 162;1007-9.
- Reidy, J. 1987, Folate- And Deoxyuridine-Sensitive Chromatid Breakage May Result From Dna Repair During G2. *Mutation Research* 192, 217-219.
- Rosenblatt, D. S. 1994, Personal Communication. Montreal, Quebec, Canada.
- Rosenblatt, D. 2001, Methylenetetrahydrofolate Reductase. *Clin. Invest Med*, 24; 56-59.
- Rosenblatt, D. 1995, Inherited Disorders Of Folate Transport And Metabolism, In *The Metabolic And Molecular Bases Of Inherited Disease (7th Ed)*, Edited By Scriver Cr, Beaudet Al, Sly Ws, Vale D. McGraw-Hill Book Co., 3111-3128.
- Rozen, R. 1996, Molecular Genetics Of Methylenetetrahydrofolate Deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 19; 589-94.
- Rozen, R. 1998, Methylenetetrahydrofolate Reductase In Vascular Disease, Neural Tube Defects And Colon Cancer. In *Reunion, Metyonin Metabolism, Molecular Mechanisms And Clinical Implications*; Index No 6.
- Scott, J.M. Molloy, A.M. Kennedy, D.G. Kennedy, S. Weir, D.G. 1994, Effects Of The Disruption Of Transmethylation In The Central Nervous System: An Animal Model. *Acta Neurol Scand Suppl*, 154; 27-31.
- Selhub, J. Miller, J.W. 1992, The Pathogenesis Of Homocysteinemia: Interruption Of The Coordiniate Regulation By S-Adenosylmethionine Of The Remethylation And Transsulfuration Of Homocysteine. *Am J Clin Nutr*, 55;131-138.
- Shen, F. Ross, J. Wang, X. Ratnam, M. 1994, Identification Of A Novel Folate Receptor, A Truncated Receptor, And Receptor Type Beta In Hematopoietic Cells: Cdna Cloning, Expression, Immunoreactivity, And Tissue Specificity. *Biochemistry*, 33(5);1209-15.
- Shih, V.E. Salem, M.Z. Mudd, S.H. Uhlendorf, B.W. Adams, R.D. 1972, A New Form Of Homocystinuria Due To N (5,10)-Methylenetetrahydrofolate Reductase Deficiency. *Pediat. Res*, 6: 395.
- Sibani, S. Christensen, B. O'ferrall, E. 2000, Charactrization Of Six Novel Mutations in The Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr) Gene in Patiens With Homocystinuria. *Hum Mutat*, 15; 280-287.
- Skovby, F. Krassikoff, N. Francke, U. 1984 Assignment Of The Gene For Cystathionine β -Synthase To Human Chromosome 21 in Somatic Cell Hybrids. *Hum.Genet.* 65; 291-294.
- Skovby, F. Kraus, J. Rosenberg, L. 1984, Biosynthesis And Proteolytic Activation Of Cystathionine β -Synthase In Rat Liver. *J.Biol.Chem.*, 259; 588-593.

- Skovby, F. Kraus, J. Rosenberg, L. 1984, Homocystinuria: Biogenesis Of Cystathionine Beta-Synthase Subunits in Cultured Fibroblasts And in An In Vitro Translation System Programmed With Fibroblast Messenger Rna. *Am J Hum Genet*, 36; 452–459.
- Smulders, Y. De Man, A. Stehouwer, C. Slaats, E. 1998, Trimethoprim And Fasting Plasma Homocysteine. *Lancet* 352; 1827–1828.
- Stern, L. Bagley, P. Rosenberg, I. 2000, Et Al. Conversion Of 5-Formyltetrahydrofolic Acid is Unimpaired in Folate- Adequate Persons Homozygous For The C677T Mutation in The Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene. *J Nutr*, 130;2238-2242.
- Still RA, McDowell I.F.W. 1998, Clinical Implications of Plasma Homocysteine Measurement in Cardiovascular Disease. *ACP Broadsheet* 152. *J Clin Pathol*; 51: 8-183.
- Takeishi, K. Kaneda, S. Ayusawa, D. Shimizu, K. Gotoh, O. Seno, T. 1985, Nucleotide Sequence Of A Functional cDNA For Human Thymidylate Synthase. *Nucleic Acids Res.*, 13; 2035-2043.
- Taoka, S. Widjaja, L. Banerjee, R. 1999, Assignment Of Enzymatic Functions To Specific Regions Of The Plp-Dependent Heme Protein Cystathionine -Synthase. *Biochemistry*, 38; 13155–13161.
- Tauro, G. Danks, D. Rowe, P. 1976, Et Al: Dihydrofolate Reductase Deficiency Causing Megaloblastic Anemia in Two Families. *N Engl Jmed*, 294; 466– 470.
- Tefferi, A. Pruthi, R. 1994, The Biochemical Basis Of Cobalamin Deficiency. *Mayo Clin Proc*, 69;181-186.
- Temel İ, Özerol E. 2002, Homosistein Metabolizma Bozuklukları ve Vasküler Hastalıklarla İlişkisi. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9; 149-57.
- Trinh, B. N. Ong, C.-N. Coetzee, G. A. Yu, M. C. Laird, P. W. 2002, Thymidylate Synthase: A Novel Genetic Determinant Of Plasma Homocysteine And Folate Levels. *Hum. Genet.*, 111; 299-302.
- Tsai M.Y., Bignell, M. Schwichtenberg, K. Hanson, N. 1996, High Prevalence Of A Mutation İn The Cystathionine β -Synthase Gene. *Am.J.Hum.Genet.*, 59; 1262-1267.
- Tsai M.Y., Bignell M., Yang F, Welge B.G., Graham K.J., Hanson N.Q. 2000, Polygenic Influence On Plasma Homocysteine: Association Of Two Prevalent Mutations, The 844ins68 Of Cystathionine Beta-Synthase And A(2756)G Of Methionine Synthase, With Lowered Plasma Homocysteine Levels.*Atherosclerosis* 149:131–137.
- Tsai M.Y., Feng Y., Michelle B.,Aras O, Hanson Q.N. 1999, Relation between Plasma Homocysteine Concentration,the 844ins68 Variant of the Cystathionine b-Synthase Gene, and Pyridoxal-5-Phosphate Concentration. *Molecular Genetics and Metabolism* 67, 352–356.

Ueland, P.M. Refsum, H. Stabler, S.P. Malinow, M.R. Anderson, A. Allen, R.H. 1993, Total Homocysteine In Plasma Or Serum:Methods And Clinical Application. Clin Chem, 39;1764-79.

Ulrich, C. Bigler, J. Velicer, C. Greene, E. Farin, F. Potter, Jd. 2000, Searching Expressed Sequence Tag Databases: Discovery And Confirmation Of A Common Polymorphism In The Thymidylate Synthase Gene. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 9; 1381–1385.

Van Den Berg, M. Boers, G. Franken, D. 1995, Et Al.Hyperhomocysteinaemia And Endothelial Dysfunction In Young Patients With Peripheral Arterial Occlusive Disease.Eur J Clin Invest, 25;176-81.

Van Der Put, N.M.J. Gabreels F. Stevens E.M.B. Smetitink J.A.M. Trijbels F.J.M. Eskes T.K.A.B. Van Der Heuvel L.P. Blom H.J. 1998, A Second Mutation In The Methyleneterahydrofolate Reductase Gene An Additional Risk Factor For Neural-Tube Defects.Am.J.Hum.Genet., 62;1044-1051.

Vaughn, J. Bailey, L. Shelnut, K. Dunwoody, K. Maneval, D. Davis, S. Quinlivan, E. Gregory, J. Theriaque, D. Kauwell, G. 2004, Methionine Synthase Reductase 66A→G Polymorphism Is Associated With Increased Plasma Homocysteine Concentration When Combined With The Homozygous Methylenetetrahydrofolate Reductase 677C→T Variantthe American Society For Nutritional Sciences J. Nutr., 134; 2985-2990.

Verhoef, P. Hennekens, C. Malinow, M. 1994, Et Al. A Prospective Study Of Plasma Homocysteine And Risk of Ischemic Stroke. Stroke, 25; 1924-1930.

Volcik, K. Shaw, G. Zhu, H. Lammer, E. Laurent, C. Finnell, R. 2003, Associations Between Polymorphisms Within The Thymidylate Synthase Gene And Spina Bifida. Birth Defects Res Part A Clin Mol Teratol, 67; 924–928.

Vollset, S. Refsum, H. Irgens, L. 2000, Et Al. Plasma Total Homocysteine, Pregnancy Complications, And Adverse Pregnancy Outcomes: The Hordaland Homocysteine Study. Am J Clin Nutr, 71;962–968.

Weisberg, I. Tran, P. Christensen, B. 1998, Et Al. A Second Genetic Polymorphism In Methylenetetrahydrofolate Reductase (Mthfr) Associated With Decreased Enzyme Activity. Mol Genet Metab, 64; 169- 172.

Wickramasinghe, S. N. Fida, S. 1994, Blood 83 (22), 1656–1661.

Goulian, M., Bleile, B., Tseng, B.Y. 1980 Proc. Natl. Acad.Sci. 77 (4); 1956–1960

Zhang G., Dai C. 2001, Gene Polymorphisms Of Homocysteine Metabolism related Enzymes In Chinese Patients With Occlusive Coronary Artery Or Cerebral Vascular Diseases. Thromb Res104:187–195.

Zhang, Z. Xu, Y. Zhou, J. Wang, X. Wang, L. Hu, X. Guo, J. Wei, Q. Shen, H. 2005, Polymorphisms Of Thymidylate Synthase In The 5'- And 3'-Untranslated Regions Associated With Risk Of Gastric Cancer In South China: A Case-Control Analysis. Carcinogenesis, 26(10); 9-1764.

Zetterberg, H. Regland, B. Palmer, M. Ricksten, A. Palmqvist, L. Rymo, L. Arvanitis, D. Spandidos, D. Blennow, K. 2002, Increased Frequency Of Combined Methylenetetrahydrofolate Reductase C677T And A1298C Mutated Alleles in Spontaneously Aborted Embryos. Eur J Hum Genet., 10 (2);113-8.

<http://www.takarabiousa.com>

<http://www.ensembl.org>

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

<http://www.uchsc.edu>

<http://gdbwww.gdb.org>

<http://dna-9.int-med.uiowa.edu>

ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Ankara'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Ankara'da tamamladı. 2001 yılında girdiği Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nü 2005 yılında Biyolog ünvanı ile bitirdi.

2005 yılında Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü'nde yüksek lisans eğitimine başladı.