

T.C.
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

FAKTÖR II, FAKTÖR V LEIDEN VE MTHFR C677T MUTASYONLARININ
TESPİTİNE YÖNELİK MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİT GELİŞTİRİLMESİ

FUNDA KARATEKE

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. Dr. NURAY ALTINTAŞ

MANİSA 2009

**T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU TEZ MERKEZİ
TEZ VERİ GİRİŞ FORMU**

Referans No	
Yazar Adı/Soyadı	Funda KARATEKE
Uyruğu /T.C.Kimlik No	T.C./
Telefon / Cep Telefonu / e-Posta	
Tezin Dili	Türkçe
Tezin Özgün Adı	FAKTÖR II, FAKTÖR V LEIDEN VE MTHFR C677T MUTASYONLARININ TESPİTİNE YÖNELİK MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİT GELİŞTİRİLMESİ
Tezin Yabancı Dildeki Adı	DEVELOPING MULTIPLEX REAL TIME PCR KIT FOR DETECTION OF MUTATIONS OF FACTOR II, FACTOR V AND MTHFR C677T
Konu Başlıkları	Tıbbi Biyoloji
Tezin Yapıldığı Yer	Manisa
Üniversite	Celal Bayar Üniversitesi
Enstitü	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji
Bilim Dalı / Bölüm	Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Tez Türü	Yüksek Lisans
Yılı	2009
Sayfa	36
Giriş sayfaları :2	Ana bölüm:34
Tez Danışmanları	Yrd. Doç.Dr. Nuray ALTINTAŞ
Türkçe Dizin Terimleri	Real time PCR SNP Mutasyon analizi Taqman Scorpion
İngilizce Dizin Terimleri	Real time PCR SNP Mutation analysis Taqman Scorpion

21.08.2009
imza:.....

T.C.YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
Yayın ve Dökümantasyon Daire Başkanlığı
Tez Merkezi
TEZLERİN ÇOĞALTILMASI VE YAYIMI İÇİN İZİN BELGESİ
(Telif Hakkı Tez Yazarına Ait Olan Tezler için)

Tez Yazarının

Soyadı : KARATEKE
Uyruğu : T.C.
Telefon No: 0 232 363 16 98
Üniversite Adı:
Enstitü Adı :
Fakülte,Bölüm/Yüksekokul
Tez Türü :
Mezuniyet Tarihi:
Tezin Başlığı:

Adı: Funda
Kimlik No:
E-Posta: zeytinfunda@hotmail.com
Celal Bayar Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıp Fakültesi/Tıbbi Biyoloji
Yüksek Lisans
2009
FAKTÖR II. FAKTÖR V LEIDEN
VE MTHFR C677T
MUTASYONLARININ
TESPİTİNE YÖNELİK MULTİPLEKS
REAL TIME PCR KİT GELİŞTİRİLMESİ

Tez yazarı seçeneklerden birini işaretleyerek imzalamalıdır.

Not: Yükseköğretim Kurulu'nun kabul ettiği ilke tüm tezlerin, makul gerekçeler dışında (patent başvurusu, yayınlama sürecinde oluşu vb.) hiçbir kısıtlama olmaksızın tüm araştırmacıların erişimine açık olmasıdır.

(Tezin kopyalanması endişesi, tezin erişime açılmasının engellenmesi için bir gerekçe olarak kabul edilemez.)

- a) Yukarıda başlığı yazılı olan tezimin, ilgilenenlerin incelemesine sunulmak üzere Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezi tarafından arşivlenmesi, kağıt,mikroform veya elektronik formatta, internet dahil olmak üzere her türlü ortamda tamamen veya kısmen çoğaltılması, ödünç verilmesi,dağıtımını ve yayımı için, tezimle ilgili fikri mülkiyet haklarım saklı kalmak üzere hiçbir ücret ve erteleme talep etmeksizin izin verdiğimi beyan ederim.

İmza:

Tarih:

- b)Tezimin Yükseköğretim Kurulu Tez Merkezi tarafından çoğaltılması veya yayımının 28.01.2012 tarihine kadar ertelenmesini talep ediyorum. Bu tarihten sonra (a) maddesindeki koşulların geçerli olacağını kabul ve beyan ederim.(ertelenme süresi formun imzalandığı tarihten itibaren 3 (üç) yıldır.)

İmza:

Tarih:

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
Yüksek Lisans öğrencisi Funda KARATEKE 'nin Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı
**“FAKTÖR II, FAKTÖR V LEIDEN VE MTHFR C677T MUTASYONLARININ
TESPİTİNE YÖNELİK MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİT
GELİŞTİRİLMESİ”** başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretmenliğini
ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek KABUL kararı verilmiştir. 21.08.2008

Jüri Üyesi
Yrd. Doç.Dr.Nuray ALTINTAŞ (Tez Danışmanı)

İmza

Jüri Üyesi
Doç. Dr. Ülkü ERGENE

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Zeki ARI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç.Dr.Gülten KARADENİZ
Enstitü Müdür V.

YÜKSEK LİSANS TEZ SAVUNMA TUTANAĞI

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Funda KARATEKE 'nin Yüksek Lisans tezi olarak hazırladığı “**FAKTÖR II, FAKTÖR V LEIDEN VE MTHFR C677T MUTASYONLARININ TESPİTİNE YÖNELİK MULTİPLEKS REAL TIME PCR KİT GELİŞTİRİLMESİ**” başlıklı bu çalışma jürimizce Lisansüstü Eğitim Öğretmenliğini ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek KABUL kararı verilmiştir. 21.08.2009

Jüri Üyesi
Yrd. Doç.Dr.Nuray ALTINTAŞ (Tez Danışmanı)

İmza

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Zeki ARI

Jüri Üyesi
Doç. Dr. Ülkü ERGENE

Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun .../.../.... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Doç.Dr.Gülten KARADENİZ
Enstitü Müdür V.

ÖZET

Son yıllarda gelişen teknolojik ilerlemeler ile birlikte özellikle virus-bakteri tanısına yönelik testler başta olmak üzere, Real Time PCR metodu ile birçok mikroorganizma ve genetik hastalık tanıları kantitatif ve tam otomatize cihazlarla yapılabilir olmuştur.

Mutasyona yönelik genetik ve mikrobiyolojik Real Time PCR test sistemleri ise genellikle “Melting curve” analiz temeline dayanan ve spesifik bilinen mutasyonu/mutasyonları hedeflemeyen random (rastlantısal) sistemlerdir. Ancak, bu mutasyon analiz sistemi, spesifik mutasyon/mutasyonlar bulunan gen bölgelerini tespit edemediği gibi, sanki mutasyon varmış gibi başka alanları analiz etmeleri nedeni ile, güvenilir testler sınıfında kabul edilmemektedir.

Temeldeki bu dezavantajı sebebi ile “melting curve” analizine dayanan mutasyon tespitine yönelik Real Time PCR test sistemi dünyada yaygın kullanım alanı bulamamaktadır. Ayrıca, mutasyon analizi için RFLP ve DNA dizi analizi yönteminden başka güvenilir yöntemler olmaması nedeni ile TaqMan ve Scorpion prob kullanan Real Time PCR sistemindeki yeni uygulamaya sokulacak olan bu yöntem çok önem kazanmaktadır.

Test sistemi temel olarak, TaqMan ve/veya Scorpion primer-problarının kullanıldığı ve herhangi bir örnekte bulunan bildiğimiz-hedeflediğimiz spesifik DNA dizisinin/nükleotidinin tespit edilmesini hızlı ve güvenilir bir biçimde multipleks olarak sağlayacaktır.

Proje; yukarıda çerçevesi çizilen ana hatlar ile ülkemizde yeni teknolojiler geliştirerek, biyoteknoloji alanında “know how” kazandıracaktır.

Anahtar kelimeler: Real Time PCR, SNP, Mutasyon Analizi, TaqMan, Scorpion

SUMMARY

In recent years, diagnosis of several microorganisms and genetic diseases using Real Time PCR method could be performed with fully automated equipments.

Real Time PCR test systems to detect genetic and microbial mutations are usually based on “melting curve” analysis which is not targetting to specific nucleotide but only the random mutations. Besides this analysis system is not detecting the target mutation nucleotide, as if it looked to be able to detect the target mutations. Thus, this system could not be approved as a confirmatif test systems.

Because of this disadvantages for melting curve analysis based on Real Time PCR test systems to detect single nucleotide mutations are not widely used. Furthermore, according to the literatures other methods except RFLP and DNA Sequencing are not reliable. For these reasons Real Time PCR methods based on/using TaqMan and Scorpion probs will be prominent in near future.

Basically the test systems we will develop are going to use TaqMan and/or Scorpion primer-prob combinations. We believe that this combination will be able to detect the single nucleotide polimorphism we are targetting in manner of rapid, confirmative and reproducible.

The Project described above will be aquired know-how in biotechnologies in the country via developments of new technologies .

Key words: Real Time PCR, SNP, Mutation analysis, TaqMan, Scorpion

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında her türlü desteği sağlayan değerli hocam, danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Nuray ALTINTAŞ'a, bu araştırmada bilgileri ile yol gösteren ve laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan GATA Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilimdalı öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Ayhan Kubar'a, çalışmamın San-Tez ortağı Dr.Zeydanlı Firmasına, her zaman yanımda olduğunu hissettiren eşim Ender Karateke'ye ve tüm çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkür ve saygılarımla.

Funda KARATEKE

	İÇİNDEKİLER	Sayfa
ÖZET		iv
İNGİLİZCE ÖZET		v
TEŞEKKÜR		vi
KISALTMALAR DİZİNİ		vii
ŞEKİLLER DİZİNİ		viii
TABLO DİZİNİ		ix
1. GİRİŞ		1
2. GENEL BİLGİLER		4
2.1 Kalıtsal Trombofili Nedenleri		4
2.1.1 Aktive protein C direnci ve FVL mutasyonu		4
2.1.2 Faktör II (Protrombin)		6
2.1.3 MTHFR mutasyonu ve hiperhomosisteinemi		7
2.1.4 Antitrombin eksikliği		9
2.1.5 Protein C eksikliği		10
2.1.6 Protein S eksikliği		11
2.1.7 Endotel disfonksiyonu		12
2.1.8 Lipoprotein a yüksekliği		13
2.2 FVL, Protrombin, MTHFR Mutasyon Tanısında Kullanılan Moleküller Yöntemler		14
2.2.1 RFLP		14
2.2.2 Real time PCR		15
2.2.3 DNA dizi analizi		20
3. GEREÇ VE YÖNTEM		22
4. BULGULAR		26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ		30
6. KAYNAKLAR		33
7. ÖZGEÇMİŞ		

ŞEKİLLER DİZİNİ

No	Şekil Açıklama	Sayfa
Şekil 1.1	Pıhtılaşma faktörleri	2
Şekil 2.1	Aktive protein C'nin fonksiyonu	4
Şekil 2.2	FV geni	5
Şekil 2.3	FII geni	6
Şekil 2.4	MTHFR geni	7
Şekil 2.5	MTHFR enzimi ve fonksiyonu	9
Şekil 2.6	Protein S geni	11
Şekil 2.7	RFLP yöntemi	15
Şekil 2.8	FRET yöntemi	16
Şekil 2.9	Taqman prob yöntemi	17
Şekil 2.10	Moleküler boncuk yöntemi	18
Şekil 2.11	SYBR green I yöntemi	19
Şekil 2.12	Otomatize DNA dizi analizi aşamaları	21
Şekil 4.1	FII tek tüp multipleks mutasyon analiz sistemi ile test edilen Heterozigot DNA örneğine ait çalışmada FAM ve JOE floresan boyaalarının aynı yerde birbiri ile bitişik pikleri	26
Şekil 4.2	FII tek tüp multipleks mutasyon analiz sistemi ile test edilen Normal DNA örneğine ait çalışmada floresan boyalarından sadece FAM olanın pik vermesi, JOE boyasının yatay seyir izlemesi	27
Şekil 4.3	FVL tek tüp multipleks mutasyon analiz sistemi ile test edilen Heterozigot DNA örneğine ait çalışmada FAM ve JOE floresan boyaalarının pik görüntüsü.	27
Şekil 4.4	MTHFR tek tüp multipleks mutasyon analiz sistemi ile test edilen Heterozigot DNA örneğine ait çalışmada Texas Red ve FAM floresan boyaalarının pik görüntüsü.	28

TABLO DİZİNİ

No	Tablo Adı	Sayfa No
Tablo 1.1	Kalıtsal trombofili nedenleri	1

KISALTMALAR DİZİNİ

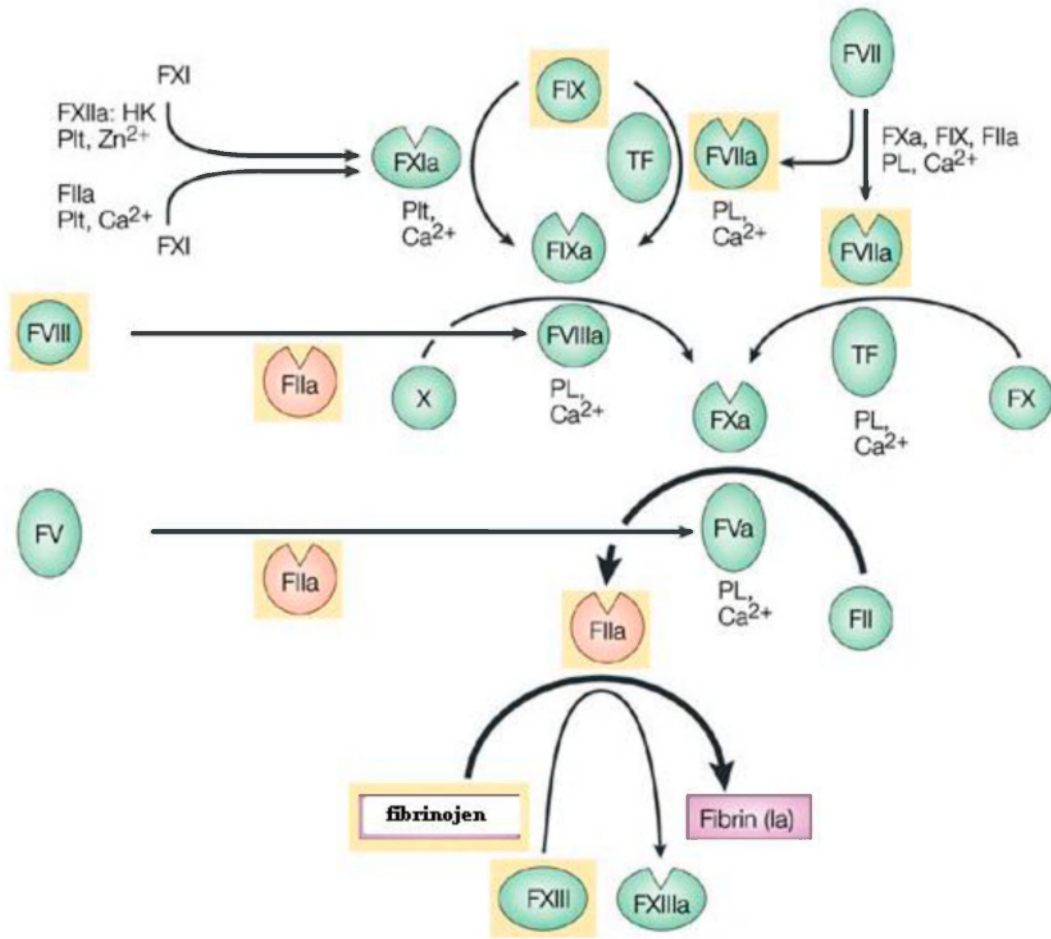
FVL	Faktör V Leiden
FII	Faktör II
MTHFR	Metilentetrahidrofolat redüktaz
APC	Aktive protein C
kD	Kilodalton
FV	Faktör V
DVT	Derin ven trombozu
VTE	Venöz trmbozembolisi
THF	Metiltetrahidrofolat
ATP	Adenoziltrifosfat
AT	Antitrombin
FVIII	Faktör VIII
FIX	Faktör IX
DGGE	Denaturing gradient gel electroforez
SSCP	Single strand conformation polymorphism
PCR	Polymerase chain reaction
vWf	Von Willebrand faktör
vWh	Von Willebrand hastalığı
Lp(a)	Lipoprotein a
RE	Restriksiyon enzimi
RFLP	Restriction fragment lenght polymorphism
RT-PCR	Real time PCR
SNP	Single nucleotid polymorphism
FRET	Floresan rezonans enerji transferi
nm	Nanometre

1. GİRİŞ

Trombofili *thrombo-philia* (*trombozu sevme*) kelimelerinden türemiştir ve tromboza neden olan tabloları tanımlamak için kullanılmaktadır (1). Tromboza eğilim ortaya çıkaran durumlar kandaki pıhtılaşma faktörlerindeki değişiklikler, kan akımındaki yavaşlama ya da damara ait bozukluklardır (2). Tromboz multifaktöriyel bir gelişim gösterir. Birçok kalıtsal veya edinsel faktör etkilidir (1-4). Tablo 1.1 ve şekil 1.1 de kalıtsal trombofili nedenleri gösterilmiştir.

Tablo 1.1. Kalıtsal trombofili nedenleri (1)

Bozukluk	Toplumdaki sıklığı (%)	Trombozlu hastalarda sıklığı (%)
Antitrombin eksikliği	0.02	1
Protein C eksikliği	0.2	3
Protein S eksikliği	0.1	1-2
APC direnci/FV Leiden mutasyonu	3-6	20
Hiperhomosisteinemi	5-10	10-25
Protrombin 20210 alleli	1-2	6
FVIII yüksekliği	11	25



Şekil 1.1: Pıhtılaşma faktörleri (5)

Faktör V Leiden (FVL) G1691A, Faktör II (FII) G20210A ve Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C6677T mutasyonları venöz tromboza yatkınlığın değerlendirilmesinde çok önemli yer tutan moleküler belirleyicilerdir (4).

Kalıtsal trombofili, tromboembolik hastalık riskini arttırıcı hemostatik sistemdeki genetik değişikliklerin neden olduğu daha sonraki nesillere aktarılan bozukluklar için kullanılan bir terimdir (6). Kalıtsal trombotik olaylar hakkındaki ilk aydınlanma 1965'te antitrombin eksikliğinin tanımlanmasıdır. 1981'de protein C eksikliği, 1984'te protein S eksikliği, 1993'te aktive protein C (APC), 1994'te FVL ve hiperhomosisteinemi, 1996' da protrombin mutasyonu tanımlanmıştır (1,2,6). Kalıtsal

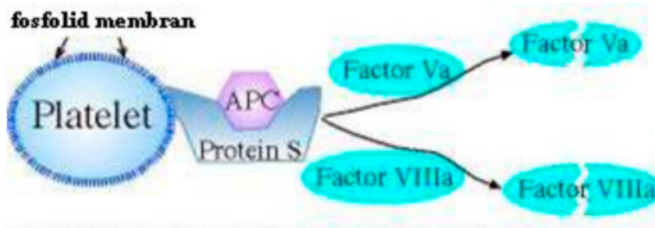
trombofili nedenlerini genetik olarak taşıyan kişilerde tromboz riski yüksektir, ancak yaşamları boyunca hiçbir trombotik atak geçirmemeleri de mümkündür (1,2,4,6).

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kalıtsal Trombofili Nedenleri

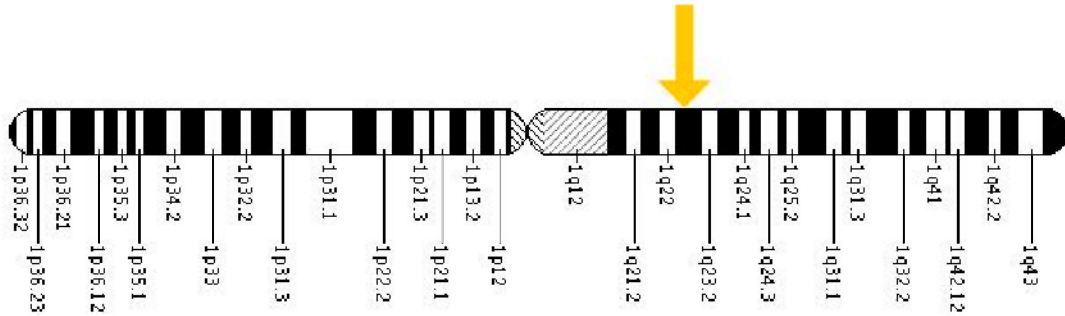
2.1.1. Aktive protein C direnci ve FVL mutasyonu

Trombofili nedeni genetik risk faktörlerinden en sık rastlanan faktördür (7,8,9). Kalıtsal tromboz olgularının % 80'ini, tüm tromboz olgularının da % 20'sini oluşturmaktadır (7). Görülme sıklığı beyaz ırkta % 3-8, zencilerde % 1 den azdır. Türkiye' de taşıyıcılık sağlıklı bireyler içinde % 7-10 arasındadır (8). Protein C, K vitaminine bağımlı, karaciğerde sentez edilen ve 62 kilodalton (kD) ağırlığında bir plazma proteindir, APC koagülasyon sisteminde faktör Va (FVa) ve faktör VIIIa' yı inhibe etme özelliğindedir (7). (Şekil 2.1)



Şekil 2.1: Aktive protein C'nin fonksiyonu (11).

APC direnci değişen derecelerde otozomal resesif olarak heterizigotlarda kalıtılır. Homozigot durum öldürücü değildir, ancak yüksek tromboz riskine sahiptir (9). APC olgularının çoğunluğu FVL olarak adlandırılan faktör V (FV) geninde 506. pozisyonda glisinin arjininle yer değiştirmesi sonucunda oluşan mutasyona dayanmaktadır. FV geni 1q23.2 gen bölgesinde lokalize olmuştur (10) (Şekil 2.2). G1691A mutasyonu sonucu FV'in APC tarafından yıkılması gerçekleşmez ve FV'in inaktivasyonu normale göre 10 kat daha yavaş gerçekleşir (7).

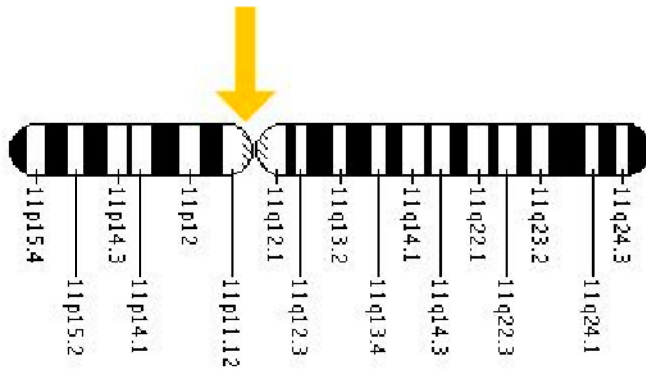


Şekil 2.2: FV geni (10).

Karaciğerde sentez edilen FV tek zincirli bir glikoproteindir. 330000 dalton molekül ağırlığına sahip olan FV'in yarılanma ömrü 12-36 saattir. Megakaryositler ve lökositler tarafından üretilmekte ve monosit, trombosit ve endotelial hücrelerin yüzeyinde bulunmaktadır (12). FVL mutasyonu APC direncinin % 85'ini oluşturmaktadır. Tromboemboli riskini homozigotlarda 80, heterozigotlarda 7 kez arttırdığı bulunmuştur (7). Genel populasyonda FVL mutasyonunun prevalansının % 2-15 oranında değiştiği gözlenmiştir. Beyaz ırkta yaygındır. Ridker ve arkadaşların çalışmasında bu mutasyon 2468 Amerikalı'nın % 5,27'sinde, 407 hispanic-Amerikalı'nın % 2,21'inde, 600 Afro-Amerikalı'nın % 1,23'ünde, 442 Asya kökenli Amerikalı'nın % 0,45'inde ve 80 Amerika yerlisinin % 1,25'inde tespit edilmiştir (11,13). Yapılan bu çalışmalar neticesinde; dünyada coğrafik ve etnik farklılıklar, FVL mutasyonunun yaklaşık 31-34 bin önce ortaya çıktığının düşünülmesine sebep olmuştur (7). FVL mutasyonunun venöz trombozembolisi (VTE) olan gruplarda görülme sıklığı incelenmiştir. Bu mutasyona ilk kez derin ven trombozu (DVT) geçiren hastaların % 18'inde ve trombofilisi olan ailelerde ise % 40 oranında rastlanmıştır. FVL sadece DVT için risk faktörü değildir bunun dışında serebral ven trombozu ve yüzeysel ven trombozu ile de ilişkilendirilmiştir (13).

2.1.2 Faktör II (Protrombin)

Otozomal dominant kalıtım gösteren, karaciğerde üretilen ve K vitamini bağımlı tek zincirli bir glikoprotein olan FII, fibronojenin fibrine dönüşümünde görev yapmaktadır (7,9,13). Protrombin geni 11. kromozomda yer almaktadır (Şekil 2.3). Geninin 20210 pozisyonundaki guaninden adenine baz değişimi mutasyona neden olmaktadır (7,9,13,14). Bu baz değişimi sonucunda plazma protrombin düzeyinde artış görölmektedir.



Şekil 2.3: FII geni (10).

Trombozlu hastalarda kalıtsal trombofililer içerisinde en fazla risk oluşturan ikinci genetik bozukluktur (7,14). Toplumda % 2-3, trombozlu hastalarda ise % 6 oranında saptanmaktadır (7,8). Bu mutasyonu taşıyanlarda tromboz için relatif:risk 2-6 kat artmaktadır (8,14). Rosendal ve ark.'nın dokuz ülkeden 11 merkez seçerek mutasyonun coğrafik dağılımını incelemişlerdir. Bu çalışma sonucunda; 111 heterozigot taşıyıcı bulunurken, homozigot bireye rastlanmamıştır. Güney Avrupa'da özellikle Akdeniz bölgesinde yaygın olduğu bulunmuştur. FVL ve FII mutasyonunun her ikisini

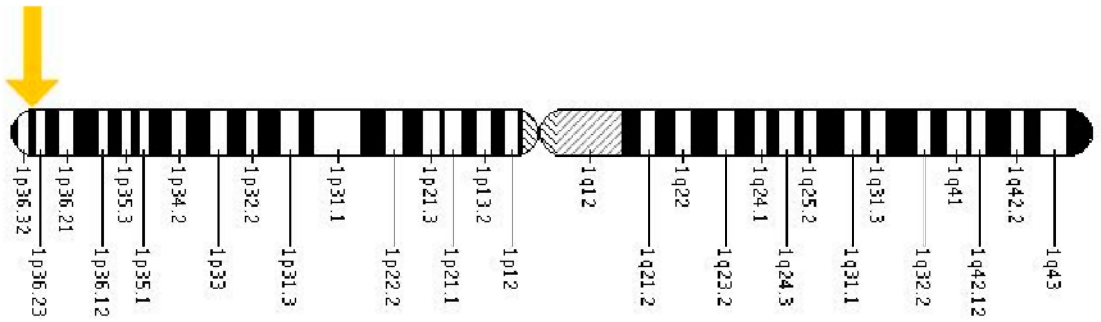
de taşıyan bireylerde sadece birini taşıyanlara göre ilk kez tromboz geliştirmesi riski daha fazladır (13). Mutasyonun tanısı için moleküler analiz önerilmektedir (7,8).

Moleküler analiz önerilmesi gereken birey kriterleri;

- Provake edici bir sebep olmaksızın derin ven trombozu veya pulmoner emboli geçirenler
- 50 yaşın altında tromboz geçirenler
- Gebelik, oral kontraseptif kullanımı sırasında derin ven trombozu veya pulmoner emboli geçirenler,
- Beklenmeyen bir yerde venöz tromboz geçirenler
- Ailesinde venöz tromboz öyküsü olanlar
- Tekrarlayan düşük, ölü doğum gibi gebelik komplikasyonları geçirenler olarak bildirilmektedir (7-9,13-15).

2.1.3. Metilentetrahidrofolat redüktaz mutasyonu ve hiperhomosisteinemi

MTHFR, folat metabolizmasında önemli bir yeri olan enzimdir. İnsanda, MTHFR geni, kromozom 1p36.3 de lokalize olmuştur ve MTHFR enzimini kodlamaktadır (Şekil 2.4).

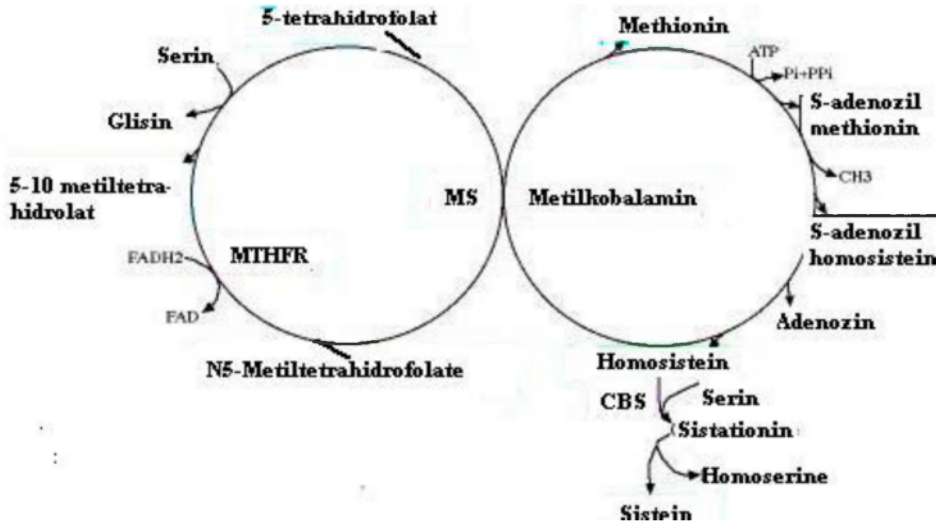


Şekil 2.4: MTHFR geni (10)

Bu enzim homosistein remetilasyon döngüsünde görev yapmaktadır (16). Homosistein methioninden sentezlenen esansiyel bir aminoasittir (7,17). MTHFR geninde N terminal katalitik bölgesini etkileyen 4. ekzonda 677. nükleotid sitozinin timine değişmesi sonucu bir nokta mutasyon oluşmaktadır. Bu mutasyon sonucunda alanin yerine valin aminoasiti kodlanması enzim aktivitesini azalmaktadır ve 5-metiltetrahidrofolat (THF) düzeyinde azalma, 5-10 metilen THF miktarı ve homosistein düzeyinde artma meydana gelmektedir (14,16).

MTHFR geninde meydana gelen diğer bir mutasyon 1298. nükleotid adeninin sitozone değişimi ile oluşan nokta mutasyonudur. Bunun sonucunda glutamat aminoasiti yerine alanin aminoasiti kodlanmakta, C677T mutasyonunda olduğu gibi enzim aktivitesinde azalmaya neden olmaktadır (16).

Esansiyel bir amino asit olan methionin çoğunlukla hayvansal proteinlerde bulunur. Sistein ve şistin yapılıması methionin varlığında gerçekleşir. Methioninin aktive olarak S-adenozil methionin haline gelmesi sistein sentezinin başlangıcını oluşturmaktadır. Bu sentez sırasında adenzil grubu adenziltrifosfat (ATP)' dan methionin kükürdüne taşınmaktadır. S-adenozilmethionin metil grubunu transferaz enzimleri ile alıcı moleküle taşımakta ve S-adenozilhomosistein oluşmaktadır. S-adenozilhomosistein, homosistein ve adenzine hidrolizlenmektedir (17). (Şekil 2.5)



Şekil 2.5: MTHFR enzimi ve fonksiyonu (18)

Plazmadaki homosistein düzeyinin normal sınırları 5-15 mikromol/l olarak belirlenmiştir. Hafif yüksekliğinde bile tromboz riskini arttırdığı belirtilmektedir (7,8). Hiperhomosisteinemi arteriyel veya venöz tromboza neden olabilmektedir (8,9). Çeşitli mekanizmalarla tromboza neden olan hiperhomosisteinemi, düz kas hipertrofisi, intima kalınlaşması, lipoprotein a oluşumu, endotelial zehirlenme, düşük dansiteli lipoprotein oksidasyonu, monositlerin endotele göçü, trombin oluşumunda rol oynamaktadır. Ayrıca tümör baskılayıcı genlerdeki DNA'nın hipometilasyonunda artış veya DNA içindeki urasilin birleşmesinde hataya yol açarak malignite riskini arttırdığı düşünülmektedir (7,14).

2.1.4. Antitrombin eksikliği

Plazma glikoproteini olan antitrombin (AT) otozomal dominant geçiş göstermektedir. Homozigot birey enderdir ve yaşamla bağdaşmaz. Karaciğer ve endotelden sentezlenmekte; trombin, faktör IX, X, XI, XII'nin inhibisyonunu sağlamaktadır. Güçlü bir fibrin inhibitörü olan antitrombinin heparin varlığında etkisi

1000 kat artmaktadır. Tromboz riskini 40 kat arttırmaktadır. Yüzden fazla mutasyonu tespit edilmiştir.

Tip I AT eksikliği: Miktar da azalma saptanmaktadır.

Tip II AT eksikliği: Miktar normaldir fakat fonksiyon bozuktur

Tip II RS: AT molekülü aktif bölgesinde bozukluk.

Tip II HBS: AT molekülü heparin bağlanma bölgesinde bozukluk.

Tip II PE: AT molekülünde pleiotropik etki bozukluğu.

AT eksikliğinde en sık karşılaşılan gebelik komplikasyonu preklemisidir. Yapılan çalışmalarda tekrarlayan bebek kayıpları kontrol grubunda 2-5 kat daha fazla bulunmuştur (8,14).

2.1.5. Protein C eksikliği

Antikoagülan etkisi 1960 yılında tanımlanan protein C, K vitaminine bağımlı, karaciğerde sentezlenen bir glikoproteindir (8,14,19). Pıhtılaşma sisteminde doğal inhibitör görevindedir. Protein C, protein S ile birlikte FVa ve aktive faktör VIII'i inaktive ederek pıhtılaşma önleyici etkisini göstermektedir. Protein C pıhtılaşma önleyici etkisini gösterebilmesi için trombin ve trombomodulin molekülü tarafından aktive protein C' ye dönüştürülmektedir (8, 19). Protein C'nin inflamasyon önleyici ve hücre koruyucu etkileri vardır (19).

Heterozigot protein C eksikliği otozomal dominant kalıtılır. Klinik olarak daha ağır seyir izleyen formu otozomal resesif olarak kalıtılır (19). Heterozigot protein C'nin iki tipi vardır:

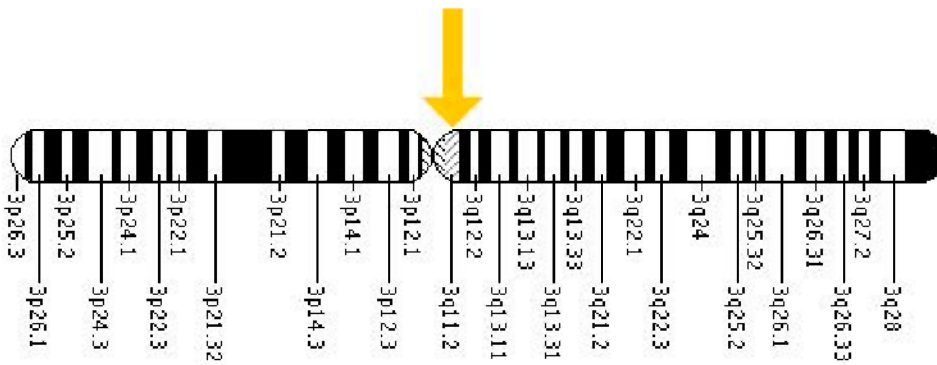
Tip I protein C eksikliği: Moleküler yapı normal ancak miktar azdır.

Tip II protein C eksikliği: Miktar normal ancak molekül fonksiyonu bozuktur (8,19).

Venöz tromboemboli tanısı ile başvuran hastaların % 0,5-4'ünde protein C eksikliği saptanmaktadır. Ağır derecede etkilenmiş ve kalıtsal protein C eksikliği olan kişilerin % 75'i hayatı boyunca bir veya birden daha fazla tromboz atağı geçirmektedir. Gebelik sırasında kadınlar ilk tromboz atağını geçirebilmektedir (19).

2.1.6. Protein S eksikliği

Protein S, K vitamini bağımlı, belirgin antikoagulan aktivitesi olan bir serum glikoproteinidir (13,20). Protein S, FVa ve faktör VIIIa'nın inaktivasyonu sırasında APC'nin kofaktörüdür (1,13,20). Protein S'nin antikoagulan etkisi, trombotik olayların gelişmesi için risk faktörü oluşturmaktadır (13,20). Protein S, tirozin kinaz reseptörüne ve damar düz kas hücrelerinde spesifik reseptörlere bağlanarak hücre proliferasyonuna katılmaktadır. Protein S geni 3. kromozomun 3p11.1 ve 3p11.2 bölgesinde yer almaktadır (1). (Şekil 2.6)



Şekil 2.6: Protein S geni (10)

Protein S eksikliği kazanılmış ya da herediter olabilmektedir. Kazanılmış protein S eksikliği karaciğer hastalığı ya da K vitamini eksikliğine bağlıdır (20). VTE ile klinik olarak kendini göstermektedir. Kalıtsal trombofilili ve trombozlu hastaların yaklaşık % 2-3'ünde protein S eksikliği görülmektedir (9,20). VTE ile protein S eksikliği arasındaki ilk ilişkilendirme 1984 yılında ortaya konmuştur. Daha sonra 1987 yılında insan genomunda iki tip protein S geni bulunmuştur. PROS1 aktif olan ve protein S üretiminden sorumlu olan gendir, PROS2 aldatıcı (psödo) gendir. Protein S eksikliğinin kalıtsal aktarım şekli otozomal dominanttır. Protein S eksikliğine PROS1'deki mutasyonel fonksiyon kaybı neden olmaktadır. Gen defektleri oldukça fazla ve heterojen yapıdadır (13). Üç tip protein S eksikliği tanımlanmıştır:

Tip I eksiklik: Hem total hem de serbest protein S miktarı azalmıştır.

Tip II eksiklik: Hem total hem de serbest protein S miktarı normaldir, ancak protein S fonksiyonu bozuktur.

Tip III eksiklik: Total protein S miktarı normal, serbest protein S miktarı azalmıştır, fonksiyon bozuktur (1,13).

Protein S eksikliğine neden olan mutasyonlarla ilgili son bilgiler Gandrille tarafından toplanmıştır. Protein S eksikliği olan 203 aile üzerinde çalışma yapmış ve 131 mutasyon tespit etmiştir. Bu mutasyonlar arasında yedi tanesi tip II eksikliğine ait bulunmuştur. Protein S eksikliğinin toplumdaki prevalansı % 0,03-0,13 arasındadır. Trombofilisi olan ailelerde oran % 6'ya ulaşmaktadır. Protein S eksikliği olan ailelerin % 40'ında aynı zamanda FVL mutasyonu da görülmüştür (13).

2.1.7. Endotel disfonksiyonu

Endotel, tek sıra yassı hücrelerden oluşan, damar iç yüzeyini döşeyen damar duvarı ile kan akımı arasında yer alan fonksiyonel bir bariyerdir (21,22). Otokrin, parakrin ve endokrin fonksiyonlara sahiptir (22). Koagülasyon kontrolü, fibrinolizis, vasküler tonus, immün sistem ve büyümede önemli rol oynamaktadır (21,22). Endotel, vazodilatasyona eğilimli, parlak yüzeyle, kaygan bir yapıdır fakat vasküler risk faktörleri (sigara, diyabet, hipertansiyon, dislipidemi v.s) mekanik, şimik ve hemodinamik etkiler ile bu yapı bozmaktadırlar (22). Sağlıklı bir endotel normal fizyolojik koşullarda, vazokonstriktör ve vazodilatatör maddeler sentezleyip, vazokonstrüksiyon ve vazodilatasyon arasındaki dengeyi korumaktadır. Endotel disfonksiyonu ile bu denge bozulmakta, endotel proaterojenik ve proinflamatuvar bir rol oynamaktadır (21,22). Sistemik hipertansiyon, hiperkolesterolemi ve buna eşlik eden endotel disfonksiyonu koagülasyona teşvik eder. Endotel disfonksiyonu ateroskleroz ve koroner arter hastalığı gelişiminde önemli rol oynamaktadır (23). Son yıllarda Japonyada hipertansif bireylerler yapılan çalışmada endotelial NO sentetaz geni ile ilişkili mutasyonlar bulunmuştur (21).

2.1.8. Lipoprotein a yüksekliği

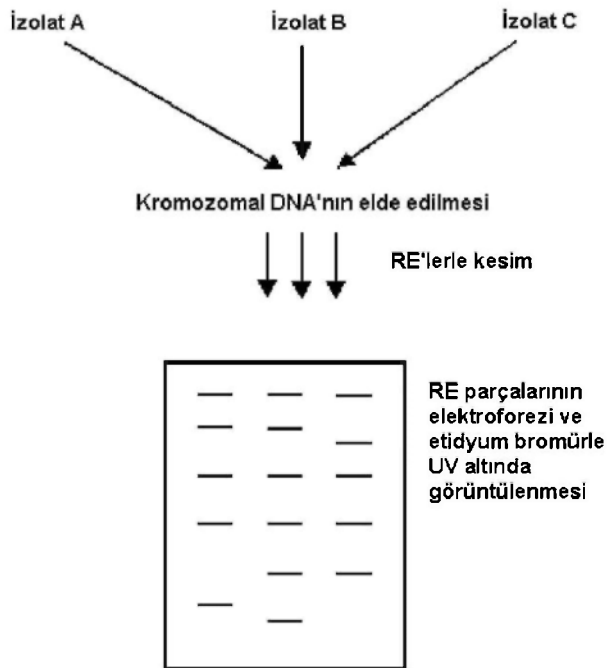
Berg tarafından ilk kez 1963'de tanımlanan lipoprotein(a) [Lp(a)], düşük dansiteli bir lipoprotein partikülüdür (25,26). Protein bölümü başlıca karaciğer tarafından üretilen ve çoğunlukla LDL'ye bağımlı olarak bulunan molekül ağırlığı yaklaşık 550000 dalton olan Apo B-100'den oluşmaktadır. Apo (a), Lp(a)'nın ayırteğici özelliğini oluşturmaktadır ve ağırlığının % 30'u polipeptid zincir ve karbohidrattır. Molekül ağırlığı polipeptid zincirin büyüklüğüne göre değişmektedir (25). Lp(a) trombotik ve atherosklerotik hastalıklar için risk faktörüdür (26). Apo(a) isoformlarının molekül ağırlıkları ile serum Lp(a) konsantrasyonundaki farklılıklarla ters orantılıdır ve önemli ölçüde genetikdir (25).

2.2. FV, Protrombin, MTHFR Mutasyon Tanısında Kullanılan Moleküler

Yöntemler

2.2.1 RFLP

Seçici olarak DNA'yı belirli bölgelerden keserek 1000-20000 bp'lik parçalar oluşturan enzim restriksiyon enzimidir (RE). Restriction fragment length polymorphism (RFLP), DNA'nın RE ile kesime uğratılması ve etidyum bromür ile boyanan agaroz jel üzerinde DNA bantlarının yerinin sayısının belirlendiği bir yöntemdir (27). Şekil 2,9'da görüldüğü gibi yöntem dört aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalar; DNA'nın izolasyonu, DNA'nın RE ile özgül parçalara ayrılması, kesilen DNA'nın agaroz jel elektroforezi, agaroz jeldeki DNA parçalarının görüntülenmesidir (27,28).



Şekil 2.7: RFLP yöntemi (27)

RFLP, enzim seçiminin önemli olduğu kolaylıkla uygulanabilen hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir ancak metodolojik zorluklar yaşanmaktadır. Çok sayıda ya da çok yakın bantları değerlendirmek mümkün olamayabilmektedir (27,28). Az sayıda örnek ile çalışıldığında değerlendirme daha kolay iken, sayı arttıkça kıyaslama yapmak zor olmaktadır. Kromozomal DNA'nın direkt olarak RE ile kesime uğratılması saflığı yüksek ve fazla miktardaki DNA varlığında iyi sonuç vermektedir. Bunu sağlayabilmek için eklenen hibridizasyon basamağı zamanı uzatmaktadır (27).

2.2.2. Real Time PCR

Real time PCR (RT-PCR), nükleik asit amplifikasyonun ekrandan izlenebildiği, reaksiyonun gidişine müdahale edilebilen, döngülerin sayısında değişiklik yapılabilen, floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı ve oluşan DNA ile floresanın doğru orantılı olarak arttığı çoğalma yöntemidir. Kantitatif RT-PCR, kinetik RT-PCR, homojen PCR gibi farklı isimlerle adlandırılmıştır. RT-PCR'ın kullanım alanları; mRNA düzeyinin sayısal olarak belirlenmesi, ki bu sayede tümör hücrelerinin ilaç dirençleri, kemoterapi taramaları yapılabilmektedir, DNA'nın kopya sayısının sayısal değerlere dönüştürülmesi, tek nokta mutasyonlarının belirlenmesi, kromozom bozukluklarının tespiti, SNP (Single Nucleotid Polymorphism) analizi, DNA hasarı, viral kantitasyon, patojen tespiti, metilasyon tespiti gibi çalışmalarda kullanılmaktadır.

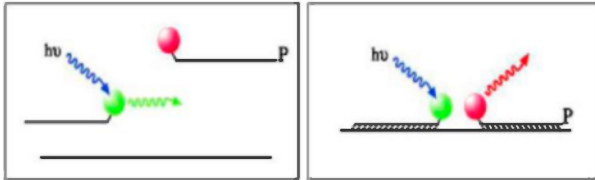
RT-PCR da kullanılan boyalar ve prob sistemlerine göre bir sınıflandırma yapıldığında iki alt gruba ayrılmaktadır (29,30,34-37).

2.2.2.1. Özgül floresan işaretli problemler

Bu grupta yer alan yöntemler;

Floresan rezonans enerji transferi (FRET); İki farklı floresan boya ile işaretli iki farklı prob dizayn edilmiştir. Problemlerden birinin 3' ucu (donor) diğerinde 5' ucu (acceptor) floresan boya ile işaretlidir. Amplifiye olan hedef DNA dizi üzerinde birbirine bitişik olarak durmaktadırlar. Şekil 2.10'da görüldüğü gibi sistemin ışık kaynağı ilk probdaki boyayı uyardığında, prob belli bir dalga boyunda floresan ışık

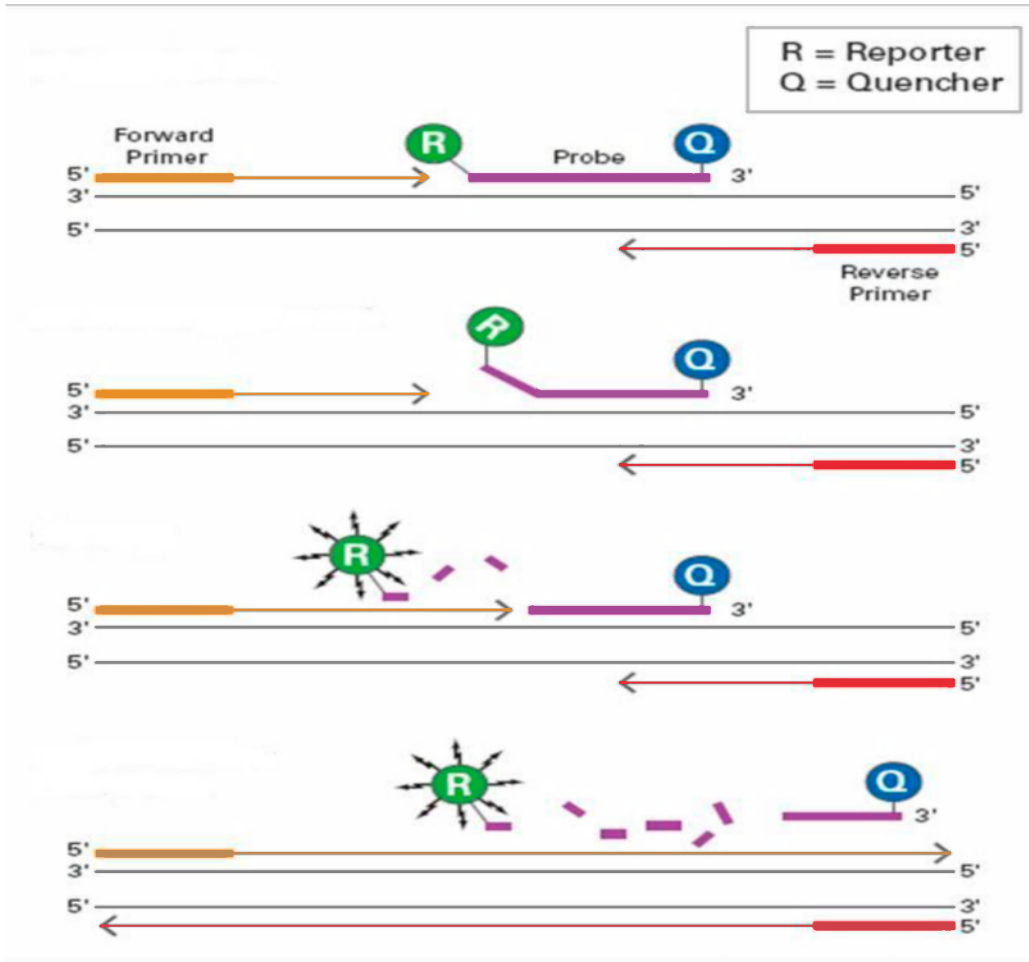
yayar eğer iki prob arasında hibridizasyon gerçekleşmiş ise yayılan enerji ile ikinci probdaki boya daha uzun dalga boyuna sahip bir ışığa yapar. Bu enerji transferi FRET olarak adlandırılmaktadır (29,31,32).



Şekil 2.8: FRET yöntemi (29).

Taqman prob yöntemi; Bu yöntemde DNA'ya tamamlayıcı floresan işaretlenmiş tek zincirli bir prob kullanılmaktadır. Probin 5' ucu reporter (bildirici), 3' ucu quencher (bastırıcı) olarak adlandırılmaktadır. Bastırıcı boya, bildirici boyanın sinyal oluşturmasını engellemektedir. Amplifikasyon esnasında hedef DNA dizisi üzerinde primer bağlanma bölgeleri arasında taqman probu bağlıdır. Primerin bağlanması ile birlikte yeni zincir oluşmaya başlar. Taq DNA polimeraz enzimi, probun bağlı olduğu bölgeye geldiğinde reporter boyayı probdan ayırır. Reporter boyanın serbest hale gelmesi ile sinyal oluşur. (Şekil 2.11)

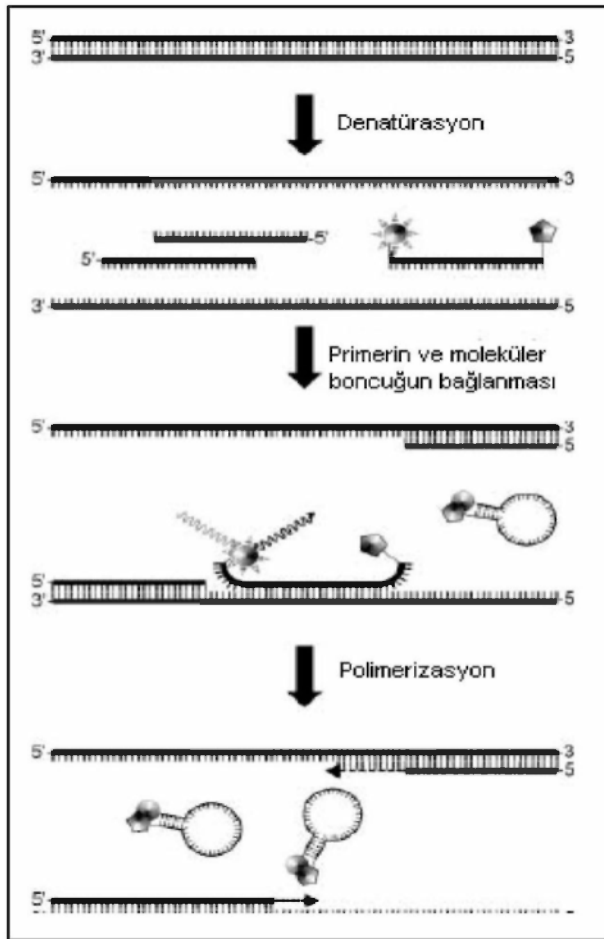
Bu proplar RT-PCR tekniğinin spesifitesini arttırmıştır. Protokolü standarttır, dizaynı kolaydır. Sayısal değerlere de ulaşabildiği için araştırmacılar için avantaj sağlamaktadır. (29-32,35-37)



Şekil 2.9: Taqman prob yöntemi (29).

Moleküler boncuk yöntemi (moleküler beacon); Teknik, hibridizasyon sonucunda oluşan floresanın ölçümüne dayanmaktadır. Bu yöntemde kullanılan oligonükleotid, 25-35 bazlık uçları birbirine yapışık bir moleküldür. Saç tokası şeklindedir. Yuvarlak olan kısımda DNA'ya tamamlayıcı olan tek zincirli primer dizisi, düz olan uç kısımlarda iki florokrom boya bulunmaktadır. PCR sırasında, DNA amplifiye olmaya başladığında prob tamamlayıcı olduğu DNA dizisi ile karşılaştığında yapı değiştirir ve düz hale geçer. Moleküler boncuğun DNA dizisi ile hibridize olması ile 5' ucunda bulunan boya serbest hale geçer ve floresan ışımaya yapar. (Şekil 2.12)

Yöntemin yaygın olarak kullanıldığı alanlar; farmakogenetik ve SNP çalışmalarıdır. Yöntemin en önemli basamağı prob dizaynıdır. Eğer uygun sıcaklık bulunmamışsa molekülün saç tokası şekli değişmeyeceğinden ortamda hedef DNA dizisi olsa dahi floresan ışımaya oluşmaz (29,31,32).



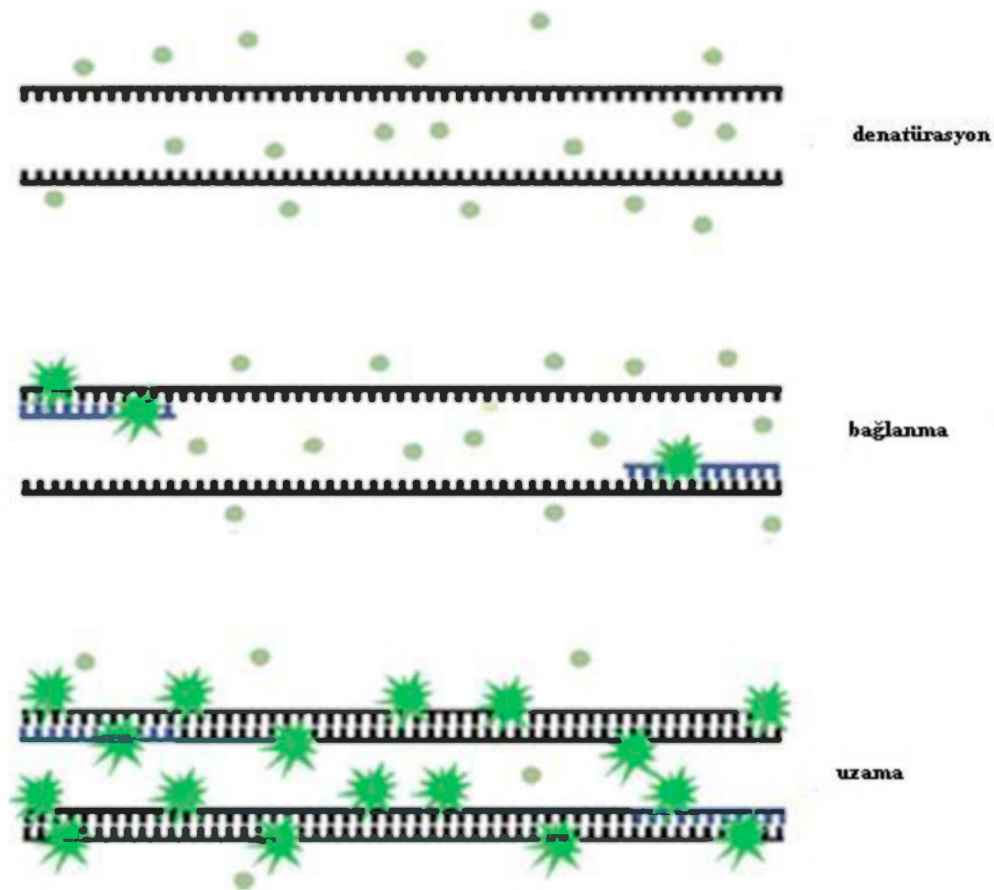
Şekil 2.10: Moleküler boncuk yöntemi (29).

2.2.2.2. Özgül olmayan floresan işaretli problemler

En yaygın kullanılan yöntem SYBR Green I yöntemidir.

SYBR Green I yöntemi; Yöntem ismini işlem sırasında kullanılan 497 nm dalga boyuna yükseltgenen ve 520 nm dalga boyuna indirgenen SYBR Green I boyasından almaktadır. Floresan boya ortamda bulunan çift zincirli DNA'ya bağlanır. Ortamdaki çoğalan DNA miktarı arttıkça okunan floresan boya miktarı da paralel olarak artmaktadır. (Şekil 2.13)

Yöntemin en önemli dezavantajı, hedeflenmeyen PCR ürünleri çoğalması ile yine floresan ışığa gerçekleşmesidir. Yanlış pozitif sonuç alınabilmektedir. Bu nedenle PCR sonrasında istenilen bölge olup olmadığını anlamak için erime eğrisi analizi (melting curve) yapılmaktadır. Erime eğrisi, bir amplifikasyon ürünü genin % 50'sinin denatüre olduğu, genin dizisine ve genin % GC oranına bağlı olarak farklılık gösteren sıcaklık değeridir (29,30,35-37).



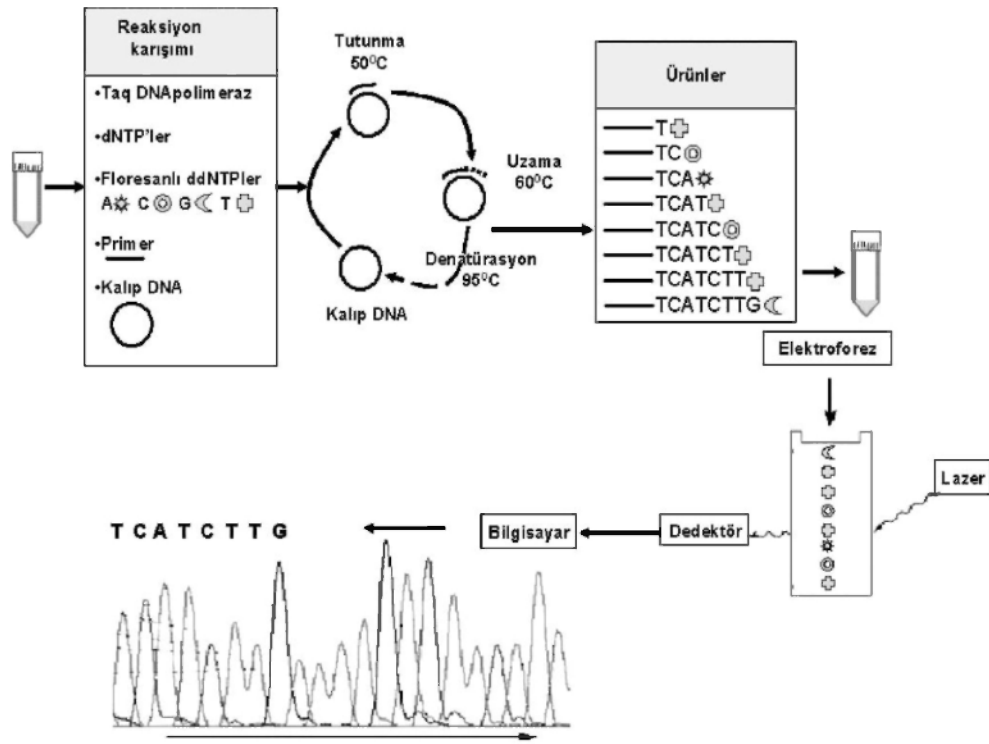
Şekil 2.11: SYBR Green I Yöntemi (37).

2.2.3. DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, bilinen ve bilinmeyen mutasyonların araştırılması için kullanılan bir yöntemdir. Radyoaktiviteyle çalışılan manuel biçimi ve floresan markalı kimyasal biçimi vardır. Mutasyon taşıyan bölge SSCP veya DGGE yöntemleri ile saptandıktan sonra DNA dizi analizi yöntemi uygulanır. Yöntemi direkt uygulamak için DNA parçası PCR ile çoğaltılır veya indirekt olarak M13 fajına klonlanır. Kimyasal (Maxam Gilbert) ya da enzimatik (Sanger) yolla direkt analiz yapılmaktadır. Kimyasal yöntemin temelini DNA polimeraz enzimi yardımı ile in vitro DNA sentezi oluşturmaktadır. Kinaz enzimi ile DNA molekülü 5' ucundan kesilir ve 32 P ile işaretlenir. Seçici özellikli kimyasal maddeler kullanılarak uzunlukları farklı DNA parçaları elde edilir. Bantlar elektroforezle ayrılır daha sonra otoradyografi ile incelenir.

Günümüzde yaygın olarak Sanger'in zincir sonlandırma yöntemi temeline dayanan dideksinükleotid yöntemi kullanılmaktadır. Otomatize yöntem şekil 2.14 de görüldüğü gibi aşağıdaki aşamalardan oluşmaktadır.

- Özgül primerlerin DNA kalıbına tutunması
- Taq DNA polimeraz, dNTP ve floresan boyalı dideksinükleotidlerin karışıma ilavesi ve yeni zincir sentezi
- Yeni zincirin sekans spesifik olarak sonlanması
- Ürünün kapiller elektroforezde yürütülmesi (32,37,38).



Şekil 2.12: Otomatize DNA dizi analizi aşamaları (32)

3.GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

Çalışmamızda Dr. Zeydanlı Hayat Bilimleri Tic. Ltd Şti Ar-Ge laboratuvarında bir önceki çalışmada kullanılan, Sekans ve RFLP yöntemi ile heterozigot ve normal DNA içerdiği test edilmiş her bir mutasyon için 5'er adet kan örneği kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Moleküler çalışma

3.2.2.Kimyasallar

- 20 X SSC tamponu, pH 7.0
- NaCl 3M
- Trisodyum sitrat (iki sulu)
- Sodyum asetat, pH 7,2
- Sodyum asetat
- SDS %10
- Proteinaz K 20mg/ml
- Fenol/kloroform/izoamil alkol 25:24:1
- Saf etanol
- TE tamponu pH 8,0
- Etanol %80
- dNTP set
- Hot start Taq DNA polimeraz

3.2.2.1. Oligonükleotid primerler ve proplar

Kullanılan her bir primer ve prob kombinasyonu, her DNA örneği ile test edilmiş ve bu test her kombinasyon için 5 kez tekrar tekrarlanmıştır. Böylece her bir

primer prob kombinasyonunun tekrar edilebilirliği ortaya konmuştur. Bulgular kısmında belirtilen dizilerden tekrar edilebilirlik kriteri göz önüne alınarak verim alınmıştır.

3.2.2.2. Diğer araç ve gereçler

- Real-Time PCR cihazı
- Santrifüj
- 8'li strip tüpler
- Eppendorf tüpler
- Otomatik pipetler
- Pipet uçları
- Vorteks
- +4 °C soğutucu
- Derin dondurucu

3.2.2.3. DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için alkali fenol kloroform yöntemi kullanıldı. Ar-Ge arşivinde bulunan her mutasyon için heterozigot ve normal 5'er adet (toplam 30 adet) kan örneği bu yöntem ile izole edildi.

3.2.2.4. DNA izolasyon protokolü

- Kan örnekleri üzerine 0,8 ml 1X SSC tamponu eklenerek karıştırıldı. Mikrosantrifüjde 12000 devir/dakika hızda, 1 dakika santrifüjlendi.
- Üst sıvı uzaklaştırıldı. Çökelti üzerine 1 ml 1X SSC tamponu eklenerek karıştırıldı. Mikrosantrifüjde 12000 devir/dakika hızda, 1 dakika santrifüjlendi.
- Çökelti üzerine 375 µl 0,2 M sodyum asetat eklenip karıştırıldıktan sonra 25µl %10 SDS ve 5 µl Proteinaz K çözeltilisi eklendi ve 55 °C'de, 1 saat bekletildi.

- Süre sonunda 120 µl fenol/kloroform/izoamil alkol karışımı eklendi ve karıştırıcıda 30 saniye karıştırıldıktan sonra mikrosantrifüjde 12000 devir/dakika hızda, 2 dakika santrifüjlendi.
- Üst faz dikkatli bir şekilde yeni bir mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı, 1 ml soğuk saf etanol eklendikten sonra karıştırıldı ve -20 °C’de 15 dakika bekletildi.
- Mikrosantrifüjde 12000 devir/dakika hızda, 2 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı uzaklaştırıldı, çökelti üzerine 180 µl TE tamponu eklenip karıştırıldıktan sonra 55 ° C’ de 10 dakika bekletildi.
- Önce 20 µl 2 M sodyum asetat eklenerek karıştırıldı. Daha sonra 500 µl soğuk saf etanol eklenerek karıştırıldı ve mikrosantrifüjde 12000 devir/dakika hızda 1 dakika santrifüjlendi.
- Üst sıvı uzaklaştırıldı, çökelti vakumlu kurutucuda 10 dakika kadar kurutuldu.
- Çökelti 200 µl TE tamponu içerisinde belirli aralıklarla karıştırılarak çözündürüldü ve 55 °C’de bir gece bırakıldı. Çözünen kromozom DNA’ sı -20 °C’de saklandı.

3.2.2.5. DNA’nın saflığı

Her hasta için kendi stoğundan 50 µl alındı ve 2950 µl distile su ile 1/60 lik dilüsyon hazırlandıktan sonra, spektrofotometrede okundu. 260 nm ve 280 nm’de optik densite belirlendikten sonra OD 260/ OD 280 oranı hesaplanarak 1.75 DNA saflığı bulundu

3.2.2.6. PCR içeriği

TaqMAN PCR

DNA ekstraksiyonu yapılmış olan bütün örnekler PE 7500 (Perkin Elmer, ABD) cihazı kullanılarak TaqMAN RT-PCR ile analiz edildi. Bu amaçla her bir örnek için aşağıdaki master miks ve oligonükleotidler kullanıldı.

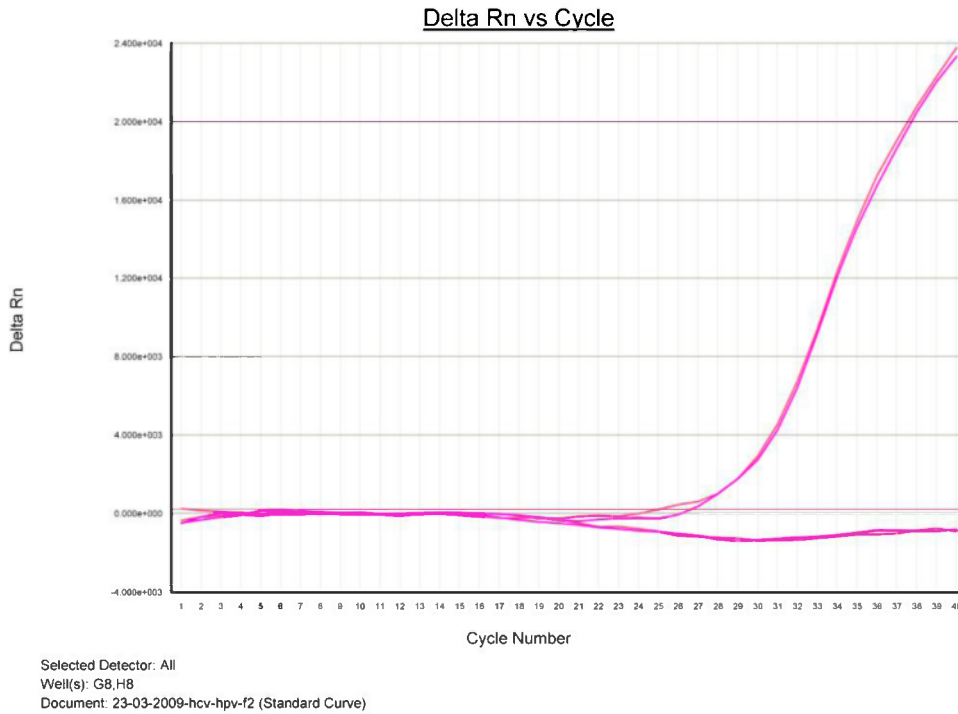
10X reaksiyon Buffer	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	6,0 µl
dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
Primer Sense ve Antisense (10 pmol)	1 µl
TaqMAN Prop (5 pmol)	0,5 µl
Hotstart Taq DNA polimeraz (5 U/ µl)	0,2 µl
Distile Su	7,8 µl
Örnek DNA'sı	5,0 µl

3.2.2.7. PCR programı

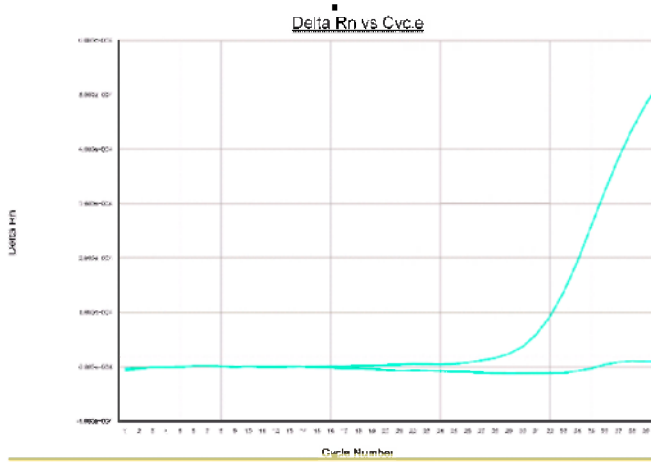
95°C	5 dk	
95°C	15 s	} 32 döngü
60°C	1 dk	

4. BULGULAR

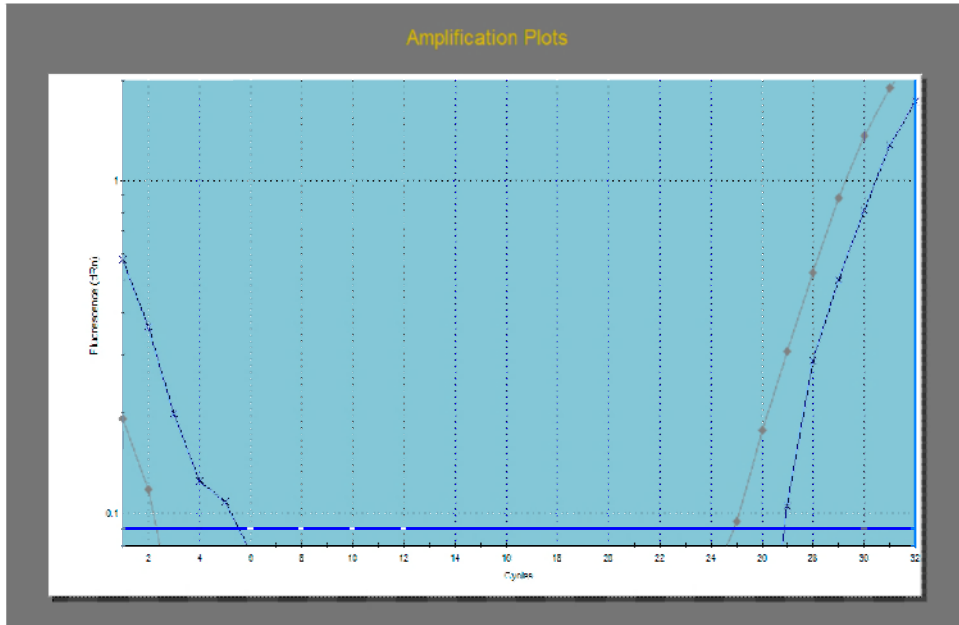
Prototip olarak Faktör II tek tüp mutasyon analiz sistemi test edildi. Faktör II tek tüp multipleks mutasyon analiz sistemi yaptığımız çalışmalar ile teorik olarak kurguladığımız şekilde LNA propları ile çalıştı ve tamamen orijinal know-how içeren bir metod olarak ortaya çıktı. Belirtilen primerlerin değişik kombinasyonları kullanılarak testler yapıldı. Bu çalışmalar sonucu “**Verim elde edilenler**” olarak adlandırılan proplar ile Faktör II testleri başarı ile ve tamamen özgün bir yöntem ile Şekil 4.1 ve 4.2’deki gibi analiz edildi. Daha sonra aynı çalışmalar FVL ve MTHFR mutasyonları ile de yapıldı.



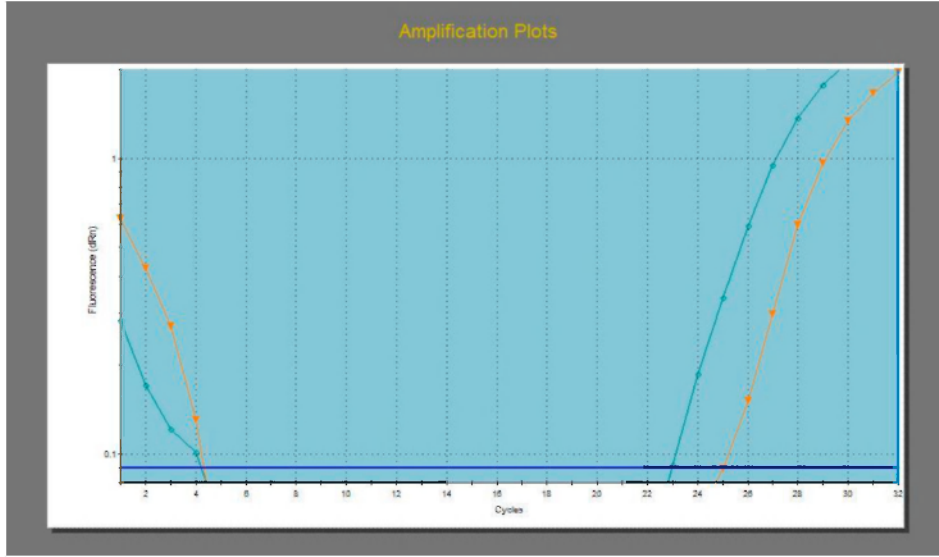
Şekil 4.1: Faktör II tek tüp multipleks mutasyon analiz sistemi ile test edilen Heterozigot DNA örneğine ait FAM ve JOE floresan boyaların aynı yerde birbiri ile bitişik pikleri görülmektedir.



Şekil 4.2: Faktör II tek tüp multipleks mutasyon analiz sistemi ile test edilen Normal DNA örneğine ait çalışmada FAM ve JOE floresan boyalarından sadece FAM olanın pik verdiği ve JOE boyasının yatay bir seyir izlediği görülmektedir.



Şekil 4.3: FVL tek tüp multipleks mutasyon analiz sistemi ile test edilen Heterozigot DNA örneğine ait çalışmada FAM ve JOE floresan boyaalarının pik görüntüsü.



Şekil 4.4: MTHFR tek tüp multipleks mutasyon analiz sistemi ile test edilen Heterozigot DNA örneğine ait çalışmada Texas Red ve FAM floresan boyalarının pik görüntüsü.

- **Verim elde edilen UZUN diziler**

- F2M1uPr aagtgactctcaACAagcctcaatg
- F2N1uPr aagtgactctcaTCGagcctcaat

- **Verim elde edilen ORTA UZUN diziler**

- F2M1uPr tgactctcaACAagcctcaatg
- F2N1uPr tgactctcaTCGagcctcaat
- F2NP1 ttcgccaacgatggtgatgattcaataaaagtgactctcagtg
- F2N1P1 ttcgccaacgatggtgatgattcaataaaagtgactctcatcg
- F2MP1 ttcgccaacgatggtgatgattcaataaaagtgactctcagaa
- F2M1P ttcgccaacgatggtgatgattcaataaaagtgactctcaaca
- F2OP2 ttcgccaacgatggtgatgattaggtggtgattcttaagtctt
- F2MPr HEX actctcagAAagcctca BHQ

- F2M1PrHEX actctca**ACA**gcct BHQ
- F2M1aPrHEX tgactctca**AcA**gcctcaa BHQ
- F2NPr FAM actctcag**TG**gcctc BHQ
- F2N1Pr FAM actctca**TCG**gcct BHQ
- F2N1aPr FAM actctca**TcG**gcctc BHQ
- FVNPr JOE acagg**AG**ggaatacag BHQ
- FVMPr FAM cagg**TA**ggaatacaga BHQ
- FVNPI tatttagccaggagacctaac
- FVN cagatccctggacagg
- FVM gcagatccctggacagg
- 677NPr Texas red cggga**AC**cgattcat BHQ
- 677MPr Texas red cggga**TT**cgattcatc BHQ
- 677P1 tcacctggatgggaaag
- 677N aaggtgtctgcgga
- 677M aagtcgagcaatg

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tek gen mutasyon analizi ile ilgili çalışmalar incelendiğinde, çeşitli moleküler yöntemler karşımıza çıkmaktadır. Genel bilgi kısmında ayrıntılı olarak değindiğimiz bu yöntemleri birbiri ile kıyasladığımızda birbirlerine avantaj ve dezavantajlarını görmekteyiz.

RFLP, enzim seçiminin önemli olduğu kolaylıkla uygulanabilen hızlı, basit ve ucuz bir yöntemdir ancak metodolojik zorluklar yaşanmaktadır. Çok sayıda ya da çok yakın bantları değerlendirmek mümkün olamayabilmektedir (27,28). Az sayıda örnek ile çalışıldığında değerlendirme daha kolay iken, sayı arttıkça kıyaslama yapmak zor olmaktadır. Kromozomal DNA'nın direkt olarak RE ile kesime uğratılması saflığı yüksek ve fazla miktardaki DNA varlığında iyi sonuç vermektedir. Bunu sağlayabilmek için eklenen hibridizasyon basamağı zamanı uzatmaktadır (27).

RT-PCR cihazları günümüzde birçok araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılmaktadır. Cihazlar birbirinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, kanal sayıları, hızları, eksitasyon-emisyon dalga boylarındaki farklılıklarına ve kullandıkları yöntem (özgül olmayan floresan işaretli-özgül floresan işaretli) göre ayrılmaktadır (29). Yaygın olarak kullanılan üç ayrı sistem mevcuttur. ABI Prism 7700 (Perkin Emler Applied Biosystems, USA) 500-660 nm floresan aralığını ölçebilme, iki saat içinde sonuç verebilme, fazla sayıda örneği aynı anda analiz edebilme özelliğine sahiptir. 96 delikli thermal ısıtıcı içerir. Ancak RT-PCR analizinin ancak amplifikasyon süreci sonunda yapılması dezavantaj olarak değerlendirilebilir. LightCycler (Roche Molecular Biochemicals-Mannheim, Germany), kapalı bir sistemdir. RT-PCR olanağını 20 dk' ya kadar indirebilir ancak sadece 32 reaksiyon gerçekleştirme ve kırılğan cam tüplerle çalışması dezavantajları olarak gösterilebilir. SYBR Green I yöntemi ile çalışmaktadır. I-cycler (BioRad), geniş dalga boyunda saptama yapabilir, dört ayrı floresan bildirici ile alternatif RT-PCR seçeneklerine imkan sağlar (30).

Özgül olmayan floresan işaretli yöntemde SYBR Green I yöntemi, iyi dizayn edilmiş primerler ve optimize edilmiş PCR şartlarında çok sayıda hedef genin

çoğaltılmasına olanak vermektedir. Floresan işaretli proba ihtiyacı göstermediği için maliyeti ucuzdur ancak ortamda hedef DNA dizisi amplifikasyonu gerçekleşmediğinde primerlerin birbiri ile bağlanmaları sonucunda yine floresan ışımaya oluşur bu nedenle yanlış pozitif sonuç almak mümkündür. Sonrasında erime eğrisi analizi yapılmalıdır (29).

Özgül floresan işaretli yöntemlerden moleküler boncuk yöntemi birçok alanda güvenilir sonuç vermesine rağmen yöntemin en önemli dezavantajı prob dizaynı ve optimizasyon sağlama zorluğudur. Uygun sıcaklık derecesi bulunamamışsa ortamda hedef DNA dizisi olmasına rağmen floresan ışımaya gerçekleşmez. Taqman yöntemi mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerlere ulaşmayı sağlaması, prob dizaynının kolay olması, standart bir protokolünün olması nedeni ile tercih edilen bir yöntemdir (29).

FII, FVL, MTHFR mutasyonlarının farklı araştırmacılar tarafından farklı moleküler yöntemler kullanılarak yapılan çalışmalarına aşağıdaki örnekler gösterilebilir.

Çalışma 1: Arteriyo-venöz fistül trombozu gelişen ve gelişmeyen kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda MTHFR polimorfizmlerinin araştırılması.

Emiroğulları ve ark. çalışmada kronik böbrek yetmezliği olan ve nedeni bilinmeyen arteriyo-venöz fistül tıkanması yaşayan 31 hasta ile kronik böbrek yetmezliği olan ve fistül tıkanması görülmeyen 51 kişi kontrol grubu olarak ayırmışlardır. Gruplardan alınan kan örneklerinden DNA izolasyonu gerçekleştirmişlerdir. MTHFR C677T polimorfizmi için belirlenen primer dizisi kullanılarak PCR amplifikasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Amplifikasyondan sonra PCR ürününü Hinf I restriksiyon enzimi ile kesime uğratmışlardır ve %3 lük agaroz jelde görüntüleyip genotip belirlemişlerdir (16).

Çalışma 2: Komplikasyonlu gebeliklerde kalıtsal trombofilinin yeri.

Akbaş ve ark. çalışmada komplikasyonu olan 31 gebe ile, aynı haftalarda sağlıklı 33 gebe dahil etmişlerdir. Her bir gruptan FVL mutasyon analizi için alınan kan örneklerinden DNA elde etmişlerdir. PCR ile FVL mutasyonunu içeren genom bölgesini çoğaltmışlardır. RE ile çoğaltılan parçanın kesilmesin ardından agaroz jel üzerinde elektroforez kesim ürünlerinin birbirinden ayrılmasını sağlamışlardır. Son olarak ultraviyole ışık altında etidyum bromürle boyanan DNA parçalarını görüntüleyip fotoğraflamışlardır (6).

Çalışma 3: Derin ven trombozu olgularında herediter trombofilik risk faktörleri

Altıntaş ve ark. çalışmada derin ven trombozu tanısı konmuş 52 olgu ile hastalarla akrabalığı bulunmayan 56 erkek, 51 sağlıklı kadından oluşan kontrol grubunu değerlendirmeye almışlardır. Hasta ve kontrol grubundan alınan kan örneklerinden DNA'ları elde etmişlerdir. RT-PCR cihazında (LightCycler) 'LightCycler-FVL mutasyon saptama kiti' kullanarak FVL nokta mutasyonunu, 'Protrombin mutasyon saptama kiti' kullanarak protrombin mutasyonunu araştırmışlardır. Hedef DNA dizisini çoğaltıp çoğalmadığını kontrol etmek amacıyla erime eğrisi analizi (melting curve) yapmışlardır (2).

Dünyada, direkt mutasyon bölgesini/bölgelerini hedefleyen primer-prob kullanarak mutasyon analizlerine yönelik hızlı, güvenilir ve konfirmasyona dayalı bir real time test sistemi bulunmamaktadır. Geliştirdiğimiz ve know-how içeren bu yeni metod, halen hiç uygulanmayan, "Mutasyon analizi" ve "5' Nükleaz assay" metodlarının kombinasyonunu kapsamaktadır. Bu çalışmada, 5' nükleaz assay ve mutasyon analizi kombinasyonu multipleks formatta uygulanmıştır. Bu test sisteminde analiz, direkt mutasyon bölgesini/bölgelerini hedefleyen, LNA (locked nucleic acid) nükleotidler içeren primer ve problar kullanılmıştır. Böylece daha stabil ve kararlı DNA amplifikasyonları elde edilmiştir. Böylece multipleks formatta PCR reaksiyonunun en önemli dezavantajı olan kararsız DNA parçacıkları elimine edilmiştir. Sonuç itibarı ile, cihaz hızına bağlı olarak, 3 saat gibi bir sürede %100 duyarlı, güvenilir, ekonomik, hızlı, uygulaması son derece basit ve tekrar edilebilirliği yüksek özelliklere sahip olan bu sistemde çoklu mutasyonlar "multipleks" formatta ve Real Time PCR test sisteminde geliştirilmiştir.

Bu çalışmada geliştirilen ve yenilikçi yönü bulunan bu metod, ülkemizde görülen ve ihtiyaç duyulan diğer mutasyonların (kistik fibrosis, beta talasemi, fenilketanüri gibi) tespitine yönelik kitlerin geliştirilmesine sağlayacaktır.

6. KAYNAKLAR DİZİNİ

1. Küçükkaya D.R, Aydın M. Trombofili genetiği. *Türk hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji Kursu* 2006; 39-42.
2. Altıntaş A., Çil T., Kaplan M.A., ve ark. Derin ven trombozu olgularında herediter trombofilik risk faktörleri. *UHOD* 2007;17: 65-69.
3. Celkan T., Apak H., Özkan A., ve ark. Hastanede yatan çocuklarda saptanan tromboz etiyojisi. *Türk Pediatri Arşivi* 2004; 39: 65-70.
4. Şahin F.İ., Ataç B., Yılmaz Z., ve ark. Tekrarlayan gebelik kayıplarında trombofili mutasyon sıklıkları. *Erciyes Tıp Dergisi*, 2009; 31(2): 104-109.
5. Bishop P., Lawson J. Recombinant biologics for treatment of bleeding disorders. *Nature Reviews Drug Discovery* 2004; 3: 684-694.
6. Akbaş F., Oral E., Bircan R., ve ark. Komplikeşyonlu gebeliklerde kalıtsal trombofilinin yeri. *T:Klin Jineköl Obst* 2003; 13: 106-112.
7. Güneş A., Baytan B., Günay Ü. Çocukluk çağında kalıtsal tromboz. *Güncel Pediatri* 2004; 2: 91-97.
8. Celkan T. Çocukluk çağında kalıtsal nedenli tromboz. *Türk Pediatri Arşivi* 2003; 38: 131-145.
9. Beyan C. Trombofilili hastada tanısal yaklaşım. *Türkiye Klinikleri J. Int Med. Sci* 2005; 1(2): 71-81.
10. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene>
11. [http://www.med.illinois.edu/hematology/PDF files/FV.pdf](http://www.med.illinois.edu/hematology/PDF_files/FV.pdf)
12. Silan F., Zafer C. Faktör V leiden mutasyonu. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi* 2004; 1: 33-36.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

13. Öner F., Kaya A., Doğan R., ve ark. Venöz tromboembolizmde kalıtsal risk faktörleri. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2003; 51(1): 60-69.

14. Kafkas S., Kadıköylü G. Gebelik ve kalıtsal trombofili. *ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi* 2005; 6(2): 43-50.

15. Varga E.A., Moll S. Prothrombin 20210 mutation (Factor II mutation). *Circulation* 2004; 110: 15-18.

16. Emiroğulları E.F., Saatçi Ç., Ünal A., ve ark. Arteriyo-venöz fistül trombozu gelişen ve gelişmeyen kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda metilentetrahidrofolat reüktaz polimorfizmlerinin araştırılması. *Sağlık Bilimleri Dergisi* 2007; 16(3): 121-128.

17. Nadir I., Duman N. Kronik böbrek yetmezliği ve hiperhomosisteinemi. *Türk Nefroloji diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1999; 2: 46-50.

18. [http:// www.med.illinois.edu/hematology/PDF files/ Hyperhomocysteinemia.pdf](http://www.med.illinois.edu/hematology/PDF_files/Hyperhomocysteinemia.pdf)

19. Sayınalp N. Koagülasyonun ABC'si: Protein C. *Türk Hematoloji Derneği 6. İlk Basamak Kursu* 2007; 29-31.

20. Erkal H., Özdiñç O., Özyurt Y. Protein S eksikliği olan hastada elektif histerektomide genel anestezi yöntemi: olgu sunumu. *Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi* 2006; 17(3): 147-149.

21. Kırkpantur A., Altun B. Endotel disfonksiyonu ve hipertansiyon. *Türk J Cardiol* 2006; 9:55-61.

22. Dursunoğlu N., Dursunoğlu D. Obstrüktif uyku apne sendromu, endotel disfonksiyonu ve koroner ateroskleroz. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi* 2005; 53(3):299-306.

23. Han S.H., Quon M.J., Koh K.K. Anormal metabolik parametreler ve endotel disfonksiyonu arasındaki resiprokal ilişki. *Current Opinion in Lipidology* Türkçe Baskı 2007; 2:2.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

24. Kaptan K. Trombosit fonksiyon bozuklukları. *Türkiye Klinikleri J Int Med Sci* 2005; 1(2): 31-40.

25. Gürmen T., Öztürk S., Gülbaran M., ve ark. Aterosklerotik koroner arter hastalığında bir risk göstergesi olarak lipoprotein (a)'nın değeri. *T Klin Kardiyoloji* 1996; 9: 1-5.

26. Tekeli O., Turhan T., Abbasoğlu Ö.E., ve ark. Diabetik retinopati ve lipoprotein (a). *T Klin Oftalmoloji* 2000; 9: 167-170.

27. Yağcı A. Restriction fragment length polymorphism ve polimeraz zincir reaksiyon bazlı tiplendirme yöntemleri. In Durmaz R.(Ed). *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji* İstanbul 2001, 149-159.

28. Durmaz R. Mikozların epidemiyolojik analizinde moleküler yöntemlerin yeri ve MSLT yöntemine özet bir bakış. *İnfeksiyon Dergisi* 2007; 21: 173-179.

29. Günel T. Gen anlatımının kantitatif analizi real time PCR. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007; 27: 763-767.

30. Savlı H., Hatırmaz Ö. Sayımsal gerçek zamanlı-polimeraz zincir reaksiyonu ve hematolojik gen anlatım analizleri. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2004; 24: 653-660.

31. Törnük F., Kesmen Z., Yetim H. Et ve et ürünlerinde patojen bakterilerin tespitinde real-time PCR tekniğinin kullanılması. *Türkiye 10. Gıda Kongresi 2008*, 519-522.

32. Çavuşoğlu C. Mycobacterium tuberculosis de moleküler antibiyotik duyarlılık test yöntemleri. *21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu* 2003; 369-386.

33. Chan Y.R., Morris A. Molecular diagnostic methods in pneumonia. *Current Opinion in Infectious Diseases* 2007; 20: 157-164.

34. Sayitoğlu M.A. Hematolojide real-time PCR. *Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu* 2005; 20-22.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

35. Giglio S., Monis P.T., Saint C.P. Demonstration of preferential binding of SYBR Green I to specific DNA fragments in real-time multiplex PCR. *Nucleic Acids Research* 2003;31,e136.

36. Ponchel F., Toomes C., Bransfield K., et.al. Real-time PCR based on SYBR Green I fluorescence: an alternative to the taqman assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 2003; 3:18.

37. Fraga D., Meulia T., Fenster S. Real-time PCR. In Wiley J and Sons. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques* Ohio 2008; 10.3.1-10.3.34.

38. Erçal D. Prenatal tanıda genetik. *Güncel Pediatri* 2008; 6(1): 47-50.

39. Başak N.A. β -Talasemi'de moleküler tanı ve yöntemleri. *Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu* 2005; 99-106.

Adı ve Soyadı : Funda KARATEKE

Doğum Yeri ve Yılı : İzmir, 1982

Uyruğu : T.C

Medeni Durumu : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim :

İlkokul	1988-1993	Meşkure Şamlı İlköğretimokulu, İzmir
Ortaokul	1993-1996	Necip Fazıl Kısakürek İlköğretimokulu, İzmir
Lise	1996-2000	İzmir Kız Lisesi, İzmir
Lisans	2000-2004	Celal Bayar Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü, Manisa

Yüksek Lisans 2006- Devam ediyor Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD

Katıldığı Kongre ve Seminerler:

- Abant İzzet Baysal Üniversitesi Biyoloji Kongresi, **2002**
Çalışma: Manisa İlinin Tıbbi Bitkileri
- Marmara Üniversitesi Biyoloji Kongresi, **2003**
Çalışma: Genetik ve Kanser
- Hücre Kültürü Teknolojisinde Temel Prensipler ve Yapay Organlar Kongresi, **2004**
- Adli Tıp Bilimleri Kongresi, **2005**
- IX. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, **2005**
- 6.Ulusal Tromboz,Hemostaz ve Anjioloji Kongresi, **2006**
- I. Nörogenetik Sempozyumu, **2007**
- 14th Biomedical Science and Technology Syposium, **2008**
- VIII. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, **2008**

İş Deneyimi:

- Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Stajer, **2002**
- Dr. Zeydanlı Hayat Bilimleri Tic. Ltd. Şti, ,Satış Sorumlusu, **2004- Devam ediyor**