

**T.C.
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK PROGRAMI**

**TİP 2 VON WILLEBRAND HASTALARINDA VON
WILLEBRAND FAKTÖR GENİNİN ANALİZİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Hazırlayan
Funda PEHLEVAN**

**Danışmanı
Yrd.Doç.Dr.Baki YOKEŞ**

İstanbul-2011

T.C
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi **Funda PEHLEVAN** tarafından hazırlanan “**Tip 2 Von Willebrand hastalarında Von Willebrand faktör geninin analizi**” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi:14.02.2011

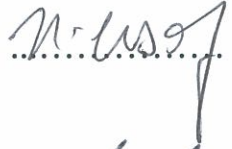
(Jüri Üyesinin Ünvanı , Adı , Soyadı ve Kurumu) :

İmzası :

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.M.Baki YOKEŞ
Danışman-HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi


.....

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Nagehan ERSOY TUNALI
HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi


.....

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Ergül BERBER
AREL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi


.....

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Burcu Irmak YAZICIOĞLU
HAL.Üniv.Mol.Biy.ve Gen.ABD Öğr.Üyesi

.....

Jüri Üyesi: Yrd.Doç.Dr.Kürşat ÖZDİLLİ
HAL.Üniv.Hemş. Yük.Ok. ABD Öğr.Üyesi

.....

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince beni yönlendiren ve yardımlarını esirgemeyen saygıdeğer hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Ergül Berber'e,

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca ve bu tezin yürütülmesi, sonuçlandırılması aşamasında yardım ve desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım sayın Yrd. Doç. Dr. M. Baki Yokeş'e ve sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy Tunalı'ya saygı ve şükranlarımı arz ediyorum.

Her konuda olduğu gibi eğitim sürecimde de hiçbir desteğini esirgemeyen annem, babam ve teyzelerim başta olmak üzere bütün aileme,

Manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarıma,

Tez süresince laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Aslıhan Dağdemir ve Ozan Tiryakioğlu'na

Teşekkürü bir borç bilirim.

İstanbul-2011

Funda Pehlevan

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

KISALTMALAR LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hemostaz	1
1.2. VWF' nin Yapısı ve İşlevleri.....	2
1.3. VWF Geni	4
1.4. VWF'nin Biyosentezi	4
1.5. VWF' nin Kandaki Düzeyini Etkileyen Faktörler	6
1.6. Von Willebrand Hastalığı	6
1.6.1. VWH' nin Görülme Sıklığı.....	8
1.6.2. Laboratuvar Bulguları	8
1.6.3. VWH'nin Tipleri.....	10
1.6.3.1. Tip 1 VWH.....	10
1.6.3.2. Tip 2 VWH.....	11
1.6.3.2.1 Tip 2A.....	11
1.6.3.2.2 Tip 2B	12
1.6.3.2.3 Tip 2M.....	13
1.6.3.2.4 Tip 2N.....	14
1.6.3.3. Tip 3 (ağır) VWH.....	15

2. AMAÇ	17
3. MATERYAL	18
3.1.Cihazlar	19
3.2. Kimyasallar	19
3.2.1. Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler	20
3.2.1.1 DNA İzolasyonu	20
3.2.1.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri	20
3.2.1.3 Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri	21
3.2.1.4 Oligonükleotid Primerler.....	21
3.2.1.5. Dizi Analizi PZR Saflaştırılması ve Dizi Analizi.....	22
4. YÖNTEM	23
4.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu	23
4.2. DNA' nın Nitel ve Nicel Analizi	24
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu	24
4.4. Agaroz Jel Elektroforezi.....	26
4.5. PZR Ürünü Saflaştırılması	26
4.6. DNA Dizi Analizi	27
4.7. Dizi Analizi Saflaştırılması	29
5. SONUÇLAR.....	30
5.1. DNA İzolasyon Sonuçları	30
5.2. PZR Sonuçları.....	30
5.3. PZR Sonrası Purifikasyon	31
5.4. Dizi Analizi Sonuçları	31
6. TARTIŞMA.....	33

7. KAYNAKLAR	35
7.1. Kitap	35
7.2. Makale	35
7.3. İnternet.....	37
8. ÖZGEÇMİŞ	38

KISALTMALAR

A	: Adenin
C	: Sitozin
C	: Sistein
c.	: Kodon
G	: Guanin
G	: Glisin
H	: Histidin
n.	: Nükleotid
Q	: Glutamin
p.	: Protein
P	: Prolin
R	: Arjinin
T	: Triyonin
T	: Timin
V	: Valin
W	: Triptofan
Y	: Tirozin
X	: Stop Kodon
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
3'-UTR	: 3' Untranslated Region
aa	: Amino Asit
ADAMTS 13	: A Disintegrin And Metalloproteinase With A
ADP	: Adonezin difosfat
bç	: Baz çifti
BPB	: Bromofenol mavisi
°C	: Celsius Derecesi
C terminal	: Karboksil terminal
CH ₅ N ₃ •HCl	: Guanidin hidrolorit
CH ₅ N ₃ •HSCN	: Guanidin tiyosiyenat
DDAVP	: Desmopresin
DMSO	: Dimetilsulfoksid
dNTP	: Deoksiribonükleotid
ddNTP	: Dideoksi ribonükleikasit
Dk	: Dakika
ECM	: Ekstraselüler Matriks
EtBr	: Etidyum Bromür
EtOH	: Etil Alkol
EvWs	: Edinsel Von Willebrand Sendromu
FVIII	: Faktör 8
GIS	: Gastro İntestinal Sistem

GpIb	: Glukoprotein I b
kD	: Kilo Dalton
K'EDTA	: Potasyum Etilendiamin tetra asetik asit
Met	: Metionin
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
mM	: Milimolar
NaI	: Sodyum İyodit
N terminal	: Amino terminal
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RCOF	: Ristosetin kofaktör
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
TBE	: Tris-Borik asit-EDTA
T-Pa	: Doku plazminojen aktivatör
TXA ₂	: Tromboksan A ₂
Tyr	: Tirozin
U	: Ünite
VWF	: Von Willebrand Faktörü
VWD	: Von Willebrand Disease
VWH	: Von Willebrand Hastalığı
WPB	: Weibel Palade Body

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No.
Şekil 1.1. : VWF yapısı ve bağlanma bölgeleri	3
Şekil 1.2. : VWF'ün hemostazdaki görevi	3
Şekil 1.3. : VWF geni	4
Şekil 1.4. : VWF mRNA'sı	4
Şekil 1.5. : Pre-pro-VWF yapısı	5
Şekil 1.6. : VWF'ün ADAMTS13 ile kesilmesi	6
Şekil 4.1 : PZR ürününün saflaştırma prosedürü	27
Şekil 5.1 : Elde edilen genomik DNA'nin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi	30
Şekil 5.2 : Elde edilen PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde yürütülmesi	30
Şekil 5.3 : Saflaştırılmış PZR ürünlerinin %2'lik Agaroz jelde yürütülmesi	31
Şekil 5.4 : 39 Numaralı Hastanın 3922C>T mutasyonu	31

TABLO LİSTESİ

	Sayfa No.
Tablo 1.1. : VWF'ünün ve VWH'nın tanımlanmasındaki aşamalar	7
Tablo 1.2. : VWH'nın Tipleri	8
Tablo 1.3. : VWH'nın tiplerine göre multimer analizi sonuçları	9
Tablo 1.4. : Tip 1 hastalarında en sık görünen mutasyonlar	10
Tablo 1.5. : Tip 2A hastalarında en sık görünen mutasyonlar	12
Tablo 1.6. : Tip 2B hastalarında en sık görünen mutasyonlar	13
Tablo 1.7. : Tip 2M hastalarında en sık görünen mutasyonlar	14
Tablo 1.8. : Tip 1 hastalarında en sık görünen mutasyonlar	15
Tablo 3.1. : Hastaların klinik bilgileri	18
Tablo 3.2. : Çalışmada kullanılan cihazlar	19
Tablo 3.3. : PZR için kullanılan kimyasallar	20
Tablo 3.4. : Elektroforez ve jel sistemi Tamponları	21
Tablo 3.5. : PZR Primer dizileri	21
Tablo 4.1. : PZR Koşulları	25
Tablo 4.2. : PZR Programı	25
Tablo 4.3. : Dizi analizi PZR Protokolü	28
Tablo 4.4. : VWF gen analizi için Dizi Analizi PZR Programı	28
Tablo 5.1. : Hastalarda görülen polimorfizm ve mutasyon sonuçları	32

GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Funda PEHLEVAN
Anabilim Dalı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik
Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Baki YOKEŞ
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Ocak 2011

TIP 2 VON WILLEBRAND HASTALARINDA VON WILLEBRAND FAKTÖR GENİNİN ANALİZİ

ÖZET

Hemostaz, normal şartlar altında damar içinde kanın pıhtısız bir şekilde sıvı olarak akışını sağlarken, vasküler bir hasar olduğunda ise çok hızlı bir şekilde travma yerinde hemostatik bir tıkaç oluşturabilen mekanizmadır. Bu iyi kurgulanmış hemostaz sürecinin uygun bir şekilde fonksiyon göstermesi yaşamsal önem taşır. Trombositlerin kolajene bağlanmasında kofaktör görevi gören koagulasyon kaskadında önemli bir protein olan Von Willebrand Faktörün (VWF) eksikliği dünyada en sık görülen kalıtsal kanamalı hastalıktır. Von Willebrand hastalığı (VWH) klinik olarak trombosit sayısı normalken, kanama zamanında uzama, menoraji ve spontan mukozal kanamalar ile karakterizedir. VWH'nın klinik özelliklerine, genetik geçişine ve VWF'ün kalitatif ve kantitatif değişikliğine göre üç farklı alt tipi bulunmaktadır. VWF molekülünde kantitatif değişim gözlemlendiğinde Tip 1 ve Tip 3 olarak sınıflandırılırken, diğerlerinden farklı olarak miktar değil fonksiyon bozukluğu saptandığında ise Tip 2 VWH olarak tanımlanır.

Bu çalışmanın amacı Tip 2 Von Willebrand hastalarında VWF geninin fonksiyonel bölgesiolan ekzon 28 için moleküler analiz sistemini oluşturmak ve Türk Tip 2 Von Willebrand hastalarında genetik tanının yapılabilmesidir. Bu amaçla 20 Tip 2 Von Willebrand hastasından alınan örneklerle yapılan dizi analizi sonucunda c.4453G/C, c.4500G/A,

c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T olmak üzere beş adet polimorfizm ve daha önceden Tip 2B mutasyonu olarak tanımlanmış c.3922C>T mutasyonu bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: VWF, VWH, Hemostaz, VWF geni, kanama, polimorfizm

GENERAL INFORMATION

Name and Surname : Funda PEHLEVAN
Field : Moleküler Biology and Genetics
Program : Molecular Biology and Genetics
Supervisor : Assist.Prof.Dr.Baki Yokeş
Degree Awarded and Date : Master – January 2011

VON WILLEBRAND FACTOR GENE ANALYSIS IN TYPE 2 VON WILLEBRAND DISEASE PATIENTS

SUMMARY

Hemostasis is the mechanism which ensures clot-free flow of blood through veins under normal conditions, while rapidly inducing a homeostatic plug at the site of vascular damage. Propitious modulation of this well regulated process is vital. Von Willebrand Factor (VWF), a cofactor for binding of platelets to collagen, has a very important role in coagulation cascade and VWF deficiency or dysfunction is the most common hereditary hemorrhagic disease in the world. Von Willebrand disease (VWD) is characterized clinically by spontaneous bleeding from mucous membranes, menorrhagia, and a prolonged bleeding time in the presence of a normal platelet count. VWD is categorised in three subtypes based on clinical features, quantitative and qualitative changes on VWF and hereditary transmission. Quantitative changes in VWF protein are categorised as Type I or Type II VWD, whereas dysfunction of VW protein unlike other types is categorised as Type II.

The aim of this study is to establish a system for molecular analysis of exon 28, the exon coding for the functional domain of VW protein, in order to diagnose Type II VWD patients in Turkish population. To achieve this, 28. exon of VW gene has been amplified and sequenced from DNA samples of twenty Type II VWD patients which resulted in detection of five polymorphisms (c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T) and a mutation (c.3922C>T) that has been previously defined as Type 2B mutation.

Keywords: VWF, VWD, Hemostasis, VWF gene, bleeding, polymorfizm

1. GİRİŞ

Kan; damar sistemi içinde dolaşan, taşıma düzenleme ve savunma gibi önemli görevleri olan, akıcı plazma ve hücrelerinden meydana gelen kırmızı hayati bir sıvıdır. Kan hücreleri kanın %45'lik bir kısmını oluşturur. Bunlar; eritrositler, lökositler ve trombositlerdir. Eritrositler oksijen taşınmasında, lökositler savunmada ve trombositler ise kan pıhtılaşması ve kanın durdurulmasında görevli hücre gruplarıdır.

Hücrelerin ve dokuların sağlığı, sadece oksijen ulaşması ve atıkların atılmasıyla ilişkili değil, aynı zamanda hemostaza da bağlıdır. Gelişmiş ülkelerde hastalıkların ve ölümlerin en büyük sebebi bu normal sıvı durumunun bozulmasıdır. Hemostaz damar duvar bakımının yanı sıra; damar içi basınç ve ozmolarite gibi bazı fizyolojik durumları kapsar (Kumar, Cotran ve Robbins, 2003; 84).

1.1. Hemostaz

Damar içindeki herhangi bir hasardan sonra oluşan; pıhtılaşma, kanın damar dışına çıkmasının durdurulması, hasar gören dokunun tamirata ve sonrasında oluşan pıhtının çözülmesini kapsayan döngüye hemostaz adı verilir.

Damar içindeki hasarın tamirata dört ana aşamadan oluşur.

1. Hasarın olduğu bölgede damar daralması
2. Geçici trombosit tıkaçı oluşumu
3. Trombosit tıkaçının fibrin ağı ve pıhtı oluşumuyla güçlenmesi
4. Pıhtının plazminojen tarafından çözülmesi (Westrick ve Ginsburg, 2009).

Damar içinde hasar sonrası genel olarak nörojenik refleks mekanizması ve endotelin gibi vazokonstriktör faktörlerin salgılanmasının artması ile kısa süreli bir damar daralması (vazokonstriksiyon) oluşur. Bu daralma geçici bir etki olduğundan, eğer koagülasyon sistemi aktive olmaz ise kanama devam edecektir.

Endotelysel hasarı, aynı zamanda trombositlerin tutunması ve aktive olmasını sağlayan subendotelysel ekstraselüler matriksin (ECM) ortaya çıkmasına sağlar. Trombositler VWF

yardımla ECM'e bağlanırlar ve ADP ve tromboksan A2 (TXA2) aracılıyla aktive olurlar (Kumar, Cotran ve Robbins, 2003; 84-85). Aktifleşmiş trombositlerden iki tip granül salınır; α -granüller ve dense granüller.

α -granüller; trombospodin, fibrinojen, VWF, faktör V ve hemostazla ilgili diğer proteinleri içerir. Dense granüller ise kalsiyum iyonları ve ADP'den zengindir. Glikoprotein IIb-IIIa kompleksinin bazı plazma proteinleri için reseptör olarak eksprese olması trombosit tıkaçı ve fibrin pıhtısının oluşması için önemli olabilir. Aktifleştikten sonra morfolojik ve biyokimyasal olarak değişime uğramalarının ardından trombositler, fibrinojen varlığında trombosit tıkaçı oluşturmak üzere çökelişirler (Westrick ve Ginsburg, 2009). Böylece birincil hemostatik tıkaç oluşmuş olur.

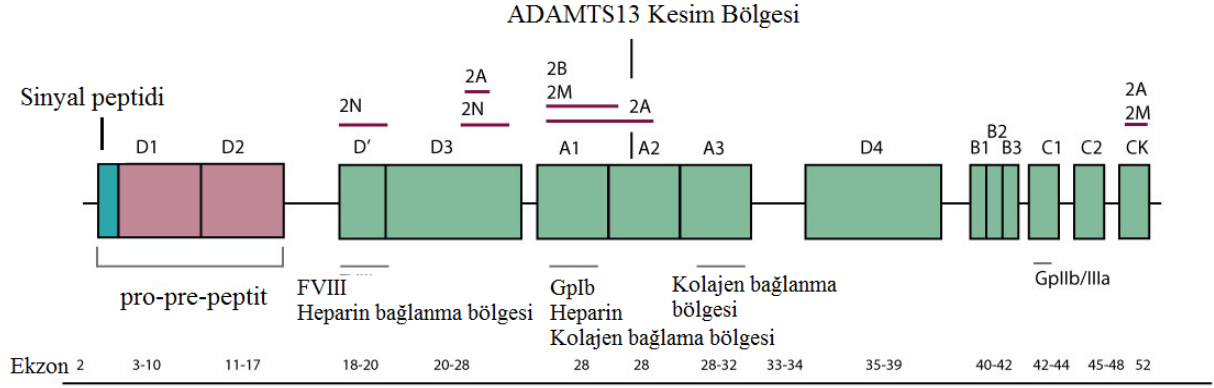
Bölgesel koagülasyon sisteminin aktive olması ile (doku faktörlerinin ve trombositlerin aktive olması ile) fibrin polimerizasyonu ikincil tıkaç oluşturur.

Doku plazminojen aktivatör'ün (T-Pa) ve trombomodülin'nin serbest kalması gibi karşı düzenleyici mekanizmalar, yaralanma bölgesinde hemostatik işlemi sınırlar (Kumar, Cotran ve Robbins, 2003; 84).

Hemostaz sürecindeki basamaklarda oluşan problemler kanama eğilimini arttıran hastalık tablosu oluşturur (Westrick ve Ginsburg, 2009).

1.2. VWF'nin Yapısı ve İşlevi

VWF zedelenen damar duvarında trombositlerin tutunmasına ve çökmesine aracılık etmek ve FVIII'i taşıyarak kan pıhtılaşma sistemine sokmak gibi iki önemli rolü olan büyük bir multimerik proteindir (Ruggeri ve Ware, 1993). VWF, trombosit tıkaçının oluşumunda görev alan en önemli molekülüdür. Trombosit tıkaçının oluşumu sırasında trombositler endotel altında açığa çıkan kolajene VWF aracılığı ile tutunurlar. Trombosit tıkaçının oluşması sırasında VWF trombosit membranındaki glikoprotein Ib-Ix'e ve kolajen matrikse bağlanarak damar hasarının olduğu bölgede trombosit çökmesini sağlar (Westrick ve Ginsburg, 2009). VWF molekülünün primer yapısı kendini birkaç kez tekrarlayan A, B, C ve D bölgelerinden oluşur (Şekil 1.1).

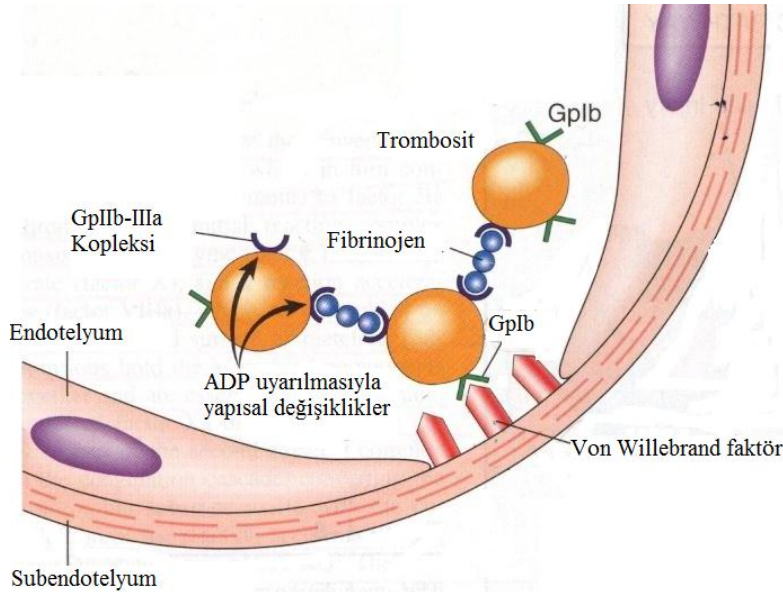


Şekil 1.1. VWF yapısı ve bağlanma bölgeleri.

(Kaynak:www.practical-haemostasis.com)

Üzerindeki çeşitli bağlanma bölgeleri ile trombosit ve endotel altı doku arasında köprü olarak yer alır. Hasarlı bölgede bulunan VWF geçen trombositleri Glukoprotein I b (GpIb) aracılığıyla endotele bağlar ve aktive olan trombositlerin hücre membranlarında oluşan GpIIb/IIIa'ya da bağlanarak endotel altı doku ile bağlantı oluşturur (Şekil 1.2). Ayrıca trombosit çökmesini başlatarak hasarlı bölgede trombosit tıkaçının oluşmasını sağlar; VWF FVIII taşıyan bir protein olarak FVIII'in aktivitesini stabilize eder (Westrick ve Ginsburg, 2009) .

VWF molekülünün multimerik yapısı homostatik fonksiyon için çok önemlidir. Molekül ağırlığı yüksek multimerler en etkin olanlardır (Keeney ve Cumming 2001).

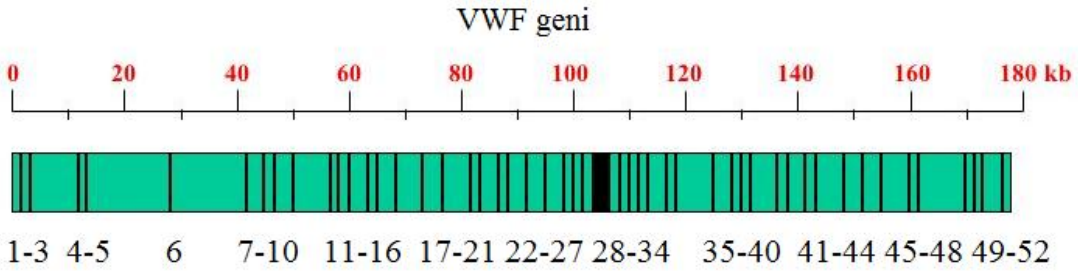


Şekil 1.2. VWF'ün hemostazdaki görevi

(Kaynak:Kumar, Cotran ve Robbins, 2003; 84)

1.3. VWF Geni

VWF geni 12. Kromozom kısa kolunda bulunup yaklaşık 178 kb uzunluğunda ve 52 ekzondan oluşan bir gendir (Mancuso ve ark. 1989) (Şekil 1.3). VWF dizisinin ekzon 23 ve 34'ü arasındaki dizile %97 homoloji gösteren bir de psödogeni bulunmaktadır. Bu psödogen 22. kromozomun 22q11-13 bölgesinde yer almaktadır (Ruggeri ve Ware, 1993).



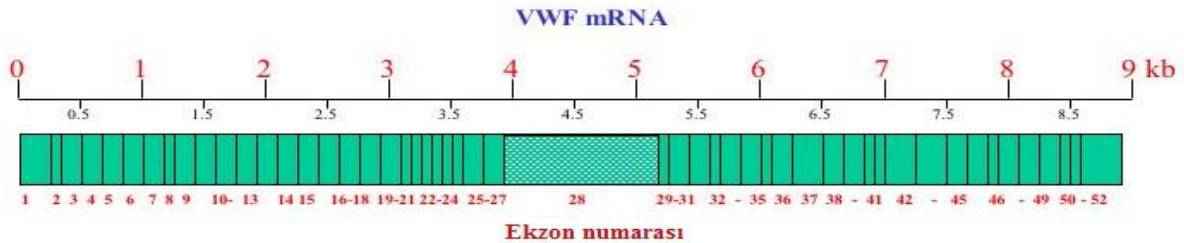
Şekil 1.3. VWF geni.

(Kaynak:ISTH-SSC VWF Online Database; 2007)

Çok polimorfik olan VWF geninde polimorfik dizilerin önemli bir kısmının psödogen bölgesine denk gelen ekzon 23-34 arasında olduğu görülmüştür. Bu durumun sebebinin ise aradaki rekombinasyondan kaynaklı olduğu düşünülmüştür (Hickson ve diğ. 2010).

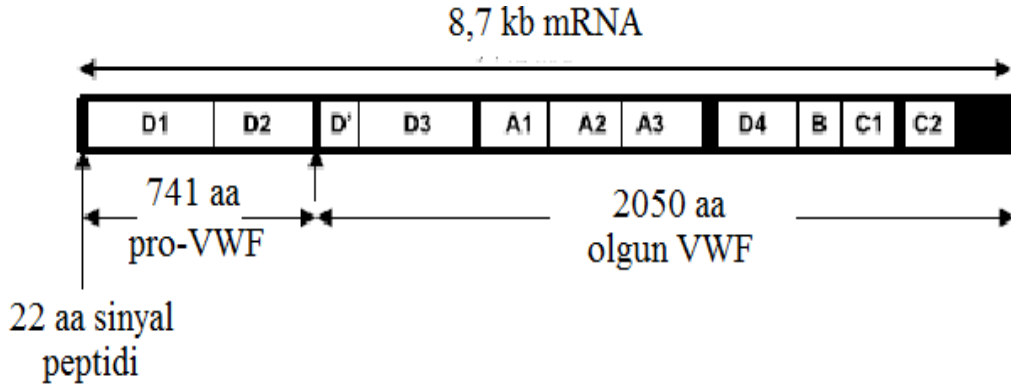
1.4. VWF'nin Biyosentezi

VWF düz bir polipeptid olarak endotel hücrelerinde ve megakaryositlerde sentezlenir. İlk aşama mRNA translasyonu ve pre-pro-VWF (2813 a.a.) oluşmasıdır. Bunun 22 amino asidi sinyal peptidi, 741 amino asidi propeptid ve 2050 amino asidi ise olgun VWF monomeridir (Haberichter ve diğ. 2005) (Şekil 1.4 ve 1.5).



Şekil 1.4. VWF mRNAsı.

(Kaynak: ISTH-SSC VWF Online Database; 2007)



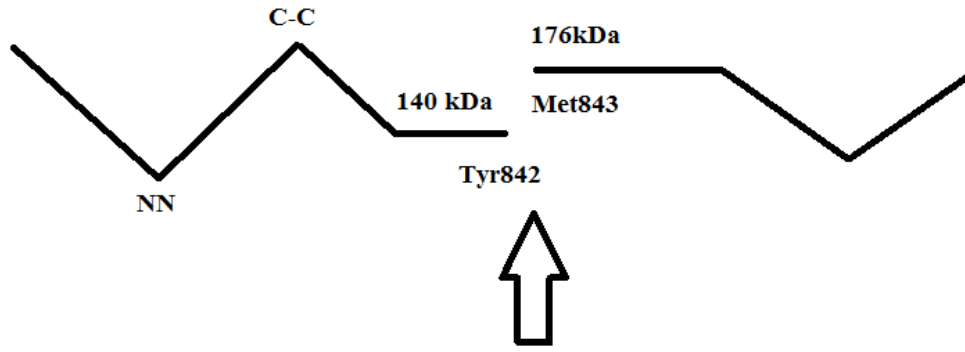
Şekil 1.5. pre-pro-VWF yapısı.

(Kaynak:Haberichter SL, 2009)

Endoplazmik retikulumdaki pro-VWF, sinyal peptidin Pre-Pro-VWF'den ayrılması ile translasyon sonrası modifikasyonlara uğrar. Pro-VWF'nin C terminali sisteince zengindir. Sinyal peptidinin ayrılmasıyla pro-VWF'nin N-terminali glikolize olurken, C terminali (C1099) ise başka bir pro-VWF'nin C-terminalindeki (C1142) sistein rezidüleri arasında disülfid bağlarıyla birbirlerine bağlanarak dimerize olur. Dimerize olmuş pro-VWF molekülleri golgi cisimciğinde disülfid bağlar ile multimerleri oluşturur. Bu multimer oluşumu olgun VWF molekülünün N terminalindeki disulfid bağları ile gerçekleşir (Haberichter, 2009).

Golgiden dışarı salınım gerçekleşmeden önce multimerdeki her monomerin pro-vWF kısmı kesilir. Buradan çıkan VWF'ler ya düzenli olarak hücre dışına verilir ya da Weibel-Palade body adı verilen endotel hücre içersindeki özel depolama alanlarında depolanırlar. Bunun yanı sıra α -granüllerde de depolanırlar. Epinefrin, trombin, fibrin gibi endojen maddeler VWF'nin depolardan salgılanmasına ve VWF'nin kan düzeyinin yükselmesini sağlar (Ginsburg ve Bowie, 1992).

Plazmaya salınan VWF multimerleri ADAMTS13 diye adlandırılan bir metaloproteaz tarafından kesilir. ADAMTS13 proteazı VWF'nin Tyr842 - Met843'den yani A2 bölgesinden keserek multimerleri yıkar (Sadler, 2008) (Şekil 1.6).



ADAMTS13 metaloproteazın kesim bölgesi

Şekil 1.6. VWF'ün ADAMTS13 ile kesilmesi

1.5. VWF'nin Kandaki Düzeyini Etkileyen Faktörler

VWF'nin kandaki düzeyi genel olarak genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişir. Kan grubu 0 olan bireylerde, diğer kan gruplu bireylere oranla VWF düzeyi %25 daha düşüktür (Hill ve diğ, 1987). Ayrıca östrojen, progesteron gebelik, glukokortikoid tedaviler, adrenalin veya adrelin salımını arttıran stres ve ağır egzersiz, hipertroidi, inflamatuvar hastalıklar, diyabet, karaciğer ve böbrek hastalıkları VWF düzeyini artırır. Hipotroidi ve valproik asit tedavisi VWF düzeyini azaltır (Mannuci ve diğ, 1977).

1.6. Von Willebrand hastalığı (VWH)

Von Willebrand hastalığı VWF'nin eksikliği veya fonksiyonel bozukluklarına bağlı, otozomal geçişli kalıtsal bir kanama hastalığıdır. (Ruggeri ve Zimmerman, 1987) . VWH'da yara yerinde tromboz oluşmadığından, deride ve mukozal yüzeylerde kanamalar olur.

Von Willebrand hastalığı Erik von Willebrand tarafından 1926'da Finlandiya'daki Aland Takım Adası'ndaki bir ailenin çeşitli üyelerinde bulunmuştur. 7 yaşında bir kızın 11 kardeşinin 9'unda önemli kanama semptomları bulunmuş ve kardeşlerin 4 tanesi 2-4 yaşlarında hemorajiden ölmüştür. Bahsedilen kız ise 13 yaşında 4. menstrual periodda ölmüştür. Ailedeki ciddi kanamalar olması sebebiyle önce psödohemofili olarak adlandırılmıştır. Pseudo denmesinin sebebi ise Hemofili A'da X'e bağlı bir kalıtım

olduğundan dolayı hastaların cinsiyeti erkek olmasına rağmen bu hastalığın görüldüğü aile incelendiğinde kadında da hastalık görülmüş olmasıdır. Ayrıca bu hastalığının otozomal geçişli olduğu gözlemlenmiştir (Ginsburg ve Bowie 1992).

Tablo 1.1. VWF'ünün ve VWH'nın tanımlanmasındaki aşamalar

1920	Minot ve Lee tarafından tanımlaması.
1928	4 farklı Amerikan grup tarafından benzer hastalıklar rapor edilmesi
1953	VWH ile FVIII'in prokoagulan aktivitesinin azaldığı ilişkisi tanımlanması
1970	FVIII, VWF mutasyonları
1984	FVIII'in klonlanması
1985	VWF'ün klonlanması
1985	Nokta mutasyonların belirlenmesi

VWH, tipik olarak hafif veya orta şiddetli deri-mukoza kanamalarıyla karakterizedir. Sık görülen semptomlar, deride kolay ekimoz oluşması, burun kanaması, diş eti kanaması, menoraji, post-partum kanamalar, yüzeysel kesilerden sonra uzun süren kanamalarıdır (Sadler ve diğ, 2000).

Kanamaların şiddeti VWF düzeyine yada fonksiyonunun ne kadar değiştiğine göre farklılık gösterebilir. Ciddi olgularda kanama erken yaşlarda ortaya çıkarken hafif seyirli olgularda kanama ancak travmatik girişimlerde kendini belli eder. VWH daha ciddi olduğu durumlarda ise ciddi mukozal kanamalara ek olarak eklem ve kas içi kanamalar da olabilir (Sadler ve diğ, 2000). Kadınlara bakıldığında ise en büyük sorun aşırı uterus kanamaları ve aşırı menstruel kanamalarıdır.

VWH, VWF molekülündeki bozukluğun tipine göre değişen klinik ve laboratuvar özelliklerine sahip olan ve genetik geçişi birbirinden farklılık gösteren tipleri vardır. Üç ana grupta toplanmıştır (Sadler ve diğ. 2000) (Tablo 1.2).

Von Willebrand Faktör Alt Kurulu VWH'nın sınıflandırılması için 1994'de öneride bulunmuştur. Bu sınıflandırmanın laboratuvar testleri esas alınıp klinik özellikleriyle de ilişkilendirilmesiyle daha basit olacağı düşünülmüştür. Sınıflandırmanın amacı VWH'nın klinik tanısını ve tedavisini daha kolaylaştırmaktır (Sadler ve diğ. 2006).

Bu sınıflandırmanın dışında kalan bazı hastalıkların seyrinde veya öncesinde hiç bir hastalık olmaksızın ortaya çıkabilen Edinsel VWH (Edinsel Von Willebrand Sendromu–EvWS) vardır. EvWS'nin tipi, klinik seyri ve kanama semptomlarının şiddeti altta yatan hastalığa göre farklılık gösterir.

Tablo 1.2. VWH'nın Tipleri.

Tip 1 VWH	Normal VWF'ün kısmi eksikliği	
Tip 2 VWH	Tip 2A	GpIb'ye bağlanma azalmış, büyük multimerler eksik
	Tip 2B	GpIb'ye bağlanma artmış, büyük multimerler eksik
	Tip 2M	GpIb'ye bağlanma azalmış, multimerik yapı normal
	Tip 2N	FVIII bağlama azalmış, multimerik yapı normal
Tip 3 VWH	Normal vWF'nin tam eksikliği	

1.6.1. VWH'nın Görülme Sıklığı

VWH en sık görülen kalıtsal kanamalı bir hastalıktır. Saptanılan olguların ancak %10'unda kanama semptomu bulunmaktadır. Fakat kanama semptomu ile sağlık kuruluşlarına başvuran hastaların sıklığı 35-100 milyon arasında olup bazı İskandinav ülkelerinde 200 milyona kadar çıkar.

1.6.2. VWH'nın Laboratuvar Bulguları

VWH'nın tanısında laboratuvar bulguları özellikle 5 sonuca dayanmaktadır.

1. Kanama zamanında uzama
2. VWF düzeyinde azalma
3. VWF ristosetin kofaktör aktivitesinde (RCOF) azalma
4. FVIII aktivitesinde azalma
5. Ristosetin ile trombosit çökelmesinde azalma veya artma (Federici ve

Canciani, 2009).

Kanamaya zamanı; Parmak ucunun küçük bir kesikle kan akışının sağlanıp kanın durma süresinin saptanmasına dayalı bir sistemdir. Normal değeri 3-7 dakikadır. Duyarlılığı düşük olan bu test yerine günümüzde PFA-100(platelet function Analyser-100) testi kullanılmaktadır. Bu sistem antikoagüle edilmiş kan arteriollere benzer şartlarda ADP veya

epinefrin ile kolajen kaplı kapillerden dar bir açıklığa doğru ilerletilir. Açıklık trombosit çökmesi sonucunda kapandığında sistem zamanı bildirir Bu sistem duyarlı olması bakımından üstün olsa da, özgüllük bakımından düşük özelliktedir. PFA-100 Normal değerleri, Kolajen-ADP 71-118sn, Kolajen-epinefrin 85-165sn'dir.

VWF Düzeyi; VWF antikorunun ELİSA yöntemiyle ölçümüne dayanan bir yöntemdir. VWF düzeyi normal değerleri, 0 kan grubu taşıyan bireylerde 40-125 IU/dL, diğer kan gruplarını taşıyan bireylerde 60-180 IU/dL'dir.

Rcof; VWF'ün trombositlere bağlanmasını sağlayan ristosetin kofaktörü varlığında VWF'lerin trombositlere bağlanması ölçülür. Rcof normal değeri, 50-150 IU/dL'dir.

FVIII aktivitesi; VWF'ün FaktörVIII'i proteolitik parçalanmadan koruma fonksiyonu değerlendirilmektedir. FVIII aktivitesi normal değeri 50-150 IU/dL'dir.

RİPA (Ristosetin uyaranlı trombosit çökmesi); Farklı konsantrasyonlarda ristosetin ile trombosit çökmesindeki değişikliğe bakılmaktadır. VWH Tip 2B tanısı için önemlidir. RİPA normal değeri, <0.7'dir.

Multimer Analizi: Bu testle agaroz jel elektroforezi ile yürütülen VWF multimerlerinin boylarına göre ayrılması sağlanır. Ve bu ayrılma sonucunda büyük multimer varlığını ve yapısı kontrol edilir.

Tablo 1.3. VWH'nın tiplerine göre multimer analizi sonuçları.

VWH Tipi	Multimer Analizi
VWH Tip 1	Normal multimer fakat sayıca az
VWH Tip 2A	Büyük ve orta ağırlıkta multimer yok
VWH Tip 2B	Büyük multimer yok
VWH Tip 2M	Normal multimer dağılımı var fakat fonksiyon bozukluğu var
VWH Tip 2N	Normal multimer ve normal fonksiyon
VWH Tip 3	Multimerler yok

1.6.3. VWH'nın Tipleri

1.6.3.1. Tip 1 VWH

En yaygın olan VWH tipidir. Otozomal dominant kalıtıma sahip olan bu tipte VWF'nin multimerik yapısında bir bozukluk olmamasına rağmen plazma düzeyi düşüktür. Tip 1 VWH'nın moleküler tanısı tam olarak aydınlatılamamıştır (Cumming ve diğ., 2006).

Rcof ve FVIII düzeylerinde de VWF ile orantılı azalma vardır. Bu tipe neden olan genetik değişiklikler tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber, bilinen mutasyonların bazıları VWF'nin endotel hücresi içinde birikimine, bazıları multimer oluşumunun engellenmesine ya da molekülün yarı ömrünün kısalmasına sebep olmaktadır.

Tablo 1.4. Tip 1 hastalarında en sık görünen mutasyonlar.

Ekzon Numarası	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi
Ekzon 26	3389G>T	C1130F
	3445T>C	C1149R
	3467C>T	T1156M
	3467C>T	T1156M
Ekzon 28	3686T>G	V1229G
	3692A>C	N1231T
	3797C>T	P1266L
	3835G>A	V1279I
	4339G>C	E1447Q
	4449delG	I523X
	4751A>G	Y1584C
	5023C>T, 5024T>A	L1675X
Ekzon 32	5471C>A	P1824H
Ekzon 37	6536C>T	S2179F
Ekzon 52	8327C>T	P2776L

(Kaynak:ISTH-SSC VWF Online Database).

Tip1 VWH'larında bulunan mutasyonlar genin promotör bölgesinde ve tüm gene yayılmış mutasyonlardır. Bunların dışında Türk popülasyonunda görülen ve Tip1 VWH ile ilişkilendirilebilen üç tane anlamsız mutasyon saptanmıştır. Bu mutasyonlar ekzon 3'teki S49R, ekzon 8'deki R324Q ve ekzon 7'deki R273W dir. Özellikle R273W mutasyonu 2 ailede homozigot mutant olarak görülmüştür (Keeney ve Cumming, 2001). Tablo 1.4'de Tip 1 VWH'da en sık görülen mutasyon tipleri verilmiştir

Klinik olarak hafif veya orta şiddette kanamalarla kendini gösterir. Hastaların çoğunda DDAVP' ye tam yanıt vardır .

1.6.3.2. Tip 2 VWH

1.6.3.2.1. Tip2A

Tip 2, olguların %15-20'sini oluşturur ve dominant kalıtımla geçer. Tip 2A VWH'nda mutasyonlar yanlış anlamlı mutasyon tipinde olup, çoğu molekülün proteazla kesilme yerinin bulunduğu A2 bölgesinde yer alır. En çok görülen mutasyonlar R1597W ve I1628T'dir. Bunlara ek olarak A1 bölgesinde yer alıp GPIb'nin bağlanmasına engel olan ve Tip 2B sınıfında bulunan C1272G, R1308H, C1458Y 3 farklı mutasyonda Tip 2A hastalarında bulunmuştur. Tip 2A mutasyonları Grup 1 ve Grup 2 olmak üzere ikiye ayrılır. Grup 1 mutasyonları normal VWF multimerlerinin hasar görmesi sonucu yüksek molekül ağırlıklı multimerlerin birikmesi sonucu oluşur. Grup 2 mutasyonları ise plazmadaki yüksek moleküler ağırlıklı VWF'nin azalması sonucu ortaya çıkar. Grup 2 mutasyonlarına örnek olarak ekzon 28'de bulunan L1503Q verilebilir (Kashiwagi ve diğ. 2008). ADAMTS13 enziminin kesme yerinde aminoasit değişikliklerine neden olan mutasyonlar enzime aşırı duyarlılık yaratır veya molekülün hücre içinde taşınmasını engeller. Laboratuvar bulgularında tipik olarak büyük molekül ağırlıklı multimerlerde kayıp ve buna bağlı GPIb'ye bağlanma fonksiyonunda azalma görülür.

Klinik olarak orta veya ağır şiddette kanamalarla kendini gösterir ve çoğu DDAVP'ye yanıt verir, ancak bazı hastalar DDAVP ye yanıt vermediğinden bu ilacı vermeden önce yanıt olup olmadığı belirlenmiş olmalıdır.

Tablo 1.5. Tip 2A hastalarında en sık görünen mutasyonlar.

Ekzon Numarası	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi
Ekzon 14	1648G>A	G550R
Ekzon 15	1869C>G	C623W
Ekzon 28	3814T>C	C1272R
	3815G>C	C1272S
	3815G>T	C1272F
	3827T>C	L1276P
	3835G>T	V1279F
	3923G>A	R1308H
	3940G>T	V1314F
	4120C>T	R1374C
	4121G>A	R1374H
	4373G>A	C1458Y
	4508T>A	L1503Q
	4508T>G	L1503R
	4514G>A	G1505E
	4517C>T	S1506L
	4541T>G	F1514C
	4552A>G	K1518E
	4628C>T	S1543F
	4667A>G	Q1556R
	4685T>C	L1562P
	4789C>T	R1597W
	4790G>A	R1597Q
	4810G>T	V1604F
	4825G>A	G1609R
	4880C>A	P1627H
4885G>A	G1629R	
4889T>A	V1630E	
4994T>A	V1665E	
5014G>A	G1672R	
Ekzon 52	8311T>A	C2771S
	8312G>A	C2771Y

(Kaynak:ISTH-SSC VWF Online Database).

1.6.3.2.2. Tip 2B

Tip 2B VWH'ı tüm olguların %5'ini oluşturur. Genellikle mutasyonlar VWF molekülünün GPIb'ye bağlanma yeri olan A1 bölgesinde gözlemlenmiştir. Bu mutasyonlar VWF'ün dolaşımdaki trombositlere herhangi bir uyarı olmadan kendiliğinden bağlanmasına sebep olan bir yapısal değişiklik oluşturur. Bu değişiklik sonucunda *in vivo* trombosit çökeltileri gözlemlenir. Bu çökeltilerin fagosite edilip dolaşımdan uzaklaştırılması sonucunda ise trombsitopeni ve büyük multimerlerde azalma gözlemlenir. Bu tip hastalarda kanamanın

nedeni büyük multimerlerin kaybı ve trombositopenidir. İlk olarak bildirilen 1985’de kritik derecede trombositopenisi olan ve spontan trombosit çökmesi bulunan bir ailede VWH Tip 2B tespit edilmiştir. Bu ailede baba iki oğlu ve farklı eşinden olma bir kızı Tip 2B olarak belirlenmiştir (Saba ve diğ., 1985). Tip 2B VWH’de ekzon 28’nin baş bölgesinde birçok nokta mutasyonu tanımlanmıştır. Von Willebrand veri bankasında Tip 2B için kabul edilmiş 54 mutasyon bulunmaktadır ve bunlar sadece ekzon 28 bölgesinde bulunmaktadır. Bu mutasyonlardan R1306W, R1308C, V1316M, ve R1314Q A1 bölgesinde değişime neden olmalarına rağmen Tip2A fenotipi göstermektedirler (Meyer ve diğ., 1997). Tip 2B’de sık görülen ekzon 28 mutasyonlar tablo m1.6’da belirtilmiştir.

Tablo 1.6. Tip 2B hastalarında en sık görünen mutasyonlar.

Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi
3802C>G	H1268D
3916C>T	R1306W
3922C>T	R1308C
3941T>A	V1314D
3946G>A	V1316M
4021C>T	R1341W
4022G>A	R1341Q
4378C>G	L1460V

(Kaynak:ISTH-SSC VWF Online Database).

1.6.3.2.3. Tip 2M

Büyük multimerler normal olmasına karşın VWF’nin trombosit veya endotel altı dokuya bağlanması azalmıştır. Multimer analizinde bantlarda migrasyon anomalisi veya çok büyük multimerlerde artış (Vicenza tipi) gösteren alt tipleri de tanımlanmıştır (Sztukowska ve diğ., 2008). VWF molekülünün A1 bölgesinin C terminali tarafında missense mutasyonlar, nadir olarak da gen delesyonu bildirilmiştir. Klinik ve laboratuvar olarak tip 2A’ya benzer, ancak multimer analizi ile ondan ayırt edilebilir. Tip 2M için ek sık görülen mutasyonla Tablo 1.7’de verilmiştir.

Tablo 1.7. Tip 2M hastalarında en sık görünen mutasyonlar.

Ekzon Numarası	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi
Ekzon 17	2220G>A	M740I
Ekzon 27	3614G>A	R1205H
Ekzon 28	3845T>G	L1282R
	3854C>T	S1285F
	3887T>C	L1296P
	3905A>G	D1302G
	3943C>T	R1315C
	3970G>A	G1324S
	3971G>C	G1324A
	4075G>A	E1359K
	4085A>C	K1362T
	4105T>A	F1369I
	4263C>G	N1421K
	4273A>T	I1425F
	4399C>T	P1467S
	4645G>A	E1549K
Ekzon 52	8341C>T	P2781S

(Kaynak:ISTH-SSC VWF Online Database).

1.6.3.2.4. Tip 2N

Aile içinde hem kız, hem de erkek çocuklarda hemofili tablosu bulunması ile dikkat çeker. VWF'nin FVIII:C'ye bağlamasında azalma ile karakterize olan Tip 2N VWF otozomal resesif olarak geçer. Bu hastalarda VWF antikor değerleri ve fonksiyonel testleri normalken FVII aktivite değeri düşüktür(Ruggeri ve Zimmerman, 1987). Tip 2N Von Willebrand hastalarında VWF'nin FVIII:C bağlanma bölgesi olan D' - D3 bölgesinde yanlış anlamlı mutasyonlar saptanır. Mutasyonlar genel olarak ekzon 17 ve 27 arasında yoğunlaşmıştır. Tip 2N Von Willebrand hastalarında en sık görülen mutasyonlar Tablo 1.8'de verilmiştir.

Tablo 1.8. Tip 2N hastalarında en sık görünen mutasyonlar.

Ekzon Numarası	Nükleotid Değişimi	Amino Asit Değişimi
Ekzon 17	2278C>T	R760C
Ekzon 18	2287A>G	R763G
	2344C>T	R782W
	2354G>A	G785E
	2359G>A	E787K
	2362T>C	C788R
	2363G>A	C788Y
	2365A>C	T789P
	2372C>T	T791M
	2384A>G	Y795C
	2435C>T	P812L
Ekzon 19	2446C>T	R816W
	2447G>A	R816Q
	2451T>A	H817Q
Ekzon 20	2561G>A	R854Q
	2573G>T	C858F
	2635G>A	D879N
Ekzon 21	2771G>A	R924Q
Ekzon 24	3159G>T	Q1053H
Ekzon 25	3232G>A	E1078K
Ekzon 26	3460C>T	Q1154X
Ekzon 27	3673T>G	C1225G

(Kaynak:ISTH-SSC VWF Online Database).

1.6.3.3. Tip 3 (ağır) VWH

Otozomal resesif geçiş gösteren bu tipin homozigotlarında VWF düzeyi ölçülemeyecek kadar düşük (<1 U/dl), FVIII :C düzeyi %5-10 arasında, kanama zamanı >20'dır. Klinik olarak şiddetli mukozal kanamalar yanında hemofiliye benzer kas iskelet kanamaları da görülür (Peake ve Goodeve, 2010). Heterozigotlarda VWF düzeyi normal veya normalin alt sınırında olup genellikle asemptomatiktirler, ender olarak hafif şiddette kanama semptomu gösterirler. Semptomlu tip 3 VWH taşıyıcılarının tip 1 VWH'den ayırıldıkları ancak aile taraması ile yapılabilir. Tip 3 VWH olgularının çok azında total veya parsiyel gen delesyonları gösterilmiştir.

Bunun dışında VWF mRNA ekspresyonuna engel olan veya protein sentezini erken sonlandıran baz eklenmeleri, yapışma yeri ve kalıp kayması mutasyonları tanımlanmıştır. Nadiren yanlış anlamlı mutasyonlar için homozigot veya birleşik heterozigot olabilirler

(Lillicrap, 2009). VWF veri tabanında 52 ekzondan 34 ekzona dağılım göstermiş 126 tanımlı mutasyon vardır. Tip 3 hastalarında görülen mutasyonların çoğunluğu nokta mutasyonudur

Ayrıca Tip 3 hastalarında büyük gen delesyonları görülmüştür. Görülen en sık delesyonlar ise; ekzon1-3, ekzon 6-16, ekzon 17-18, ekzon 22-43, ekzon 23-52, ekzon 33-38 arasında olanlar olup ekzon 42 delesyonu da tek ekzon delesyonudur.

2. AMAÇ

Dünyada en sık görülen kanamalı hastalık olan VWH, klinik olarak heterojen bir hastalıktır. Bu heterojenite ise hastalığın tanısı ve tedavisi için hastalığın moleküler oluşumunu bilmeyi çok önemli kılar. Ayrıca hastalığın tanısı için eğer multimer analizi yapılamıyor ise klinik tanının konulması zorlaşmaktadır. Bunun sebebi ise kullanılan testlerin sonuç özgüllüğünün düşük olması ve VWF'ün genetik faktörlerin yanı sıra çevresel faktörlerin etkisiyle de değişebiliyor olmasıdır. Hastada VWF geninde bulunan mutasyonun tanımlanması ise tanı ve tedaviyi kolaylaştıracaktır.

VWF gen analizi, hastalığın hem tanısı ve tiplendirilmesi, hem de Türk popülasyonundaki yaygın polimorfizmlerin ve mutasyonların belirlenmesi açısından önemlidir. Fakat Türkiye'deki hastaların mutasyon analizi genel olarak yurt dışındaki merkezlerde yapılmaktadır.

52 ekzon içeren VWF geninin en fonksiyonel bölgesi olan ekzon 28, VWF'ün kolajene ve trombositlerin GpIb bölgesine bağlandığı bölge olan A1 bölgesini, ADAMTS13'ün kesim bölgesi olan A2 bölgesini ve yine kolajene bağlanma bölgesi olan A3 bölgesinin bir kısmını içermektedir. Bu sebepten dolayı ekzon 28'de oluşan mutasyonlar özellikle de VWF'ün fonksiyonelliğinin azalmasına neden olmaktadır. Bu fonksiyonel azalma ise Tip 2 VWH'nın sebebidir.

Bu çalışmada Tip 2 Von Willebrand hastalarında VWF geninin fonksiyonel bölgesi olan ekzon 28 bölgesinin moleküler analizi için yöntem oluşturmak, ayrıca Türk Tip 2 Von Willebrand hastalarında genetik tanı yapılabilmesi amaçlanmıştır.

3. MATERYAL

Bu çalışmada 20 tip 2 VWH hastasından elde edilen kandan izole edilen DNA örnekleri ile çalışılmıştır. Hastalardan kan örnekleri Ege Üniversitesi Hastanesinden sağlanmıştır. Hastalar da VWF gen analizi için gerekli etik kurul onayı Ege Üniversitesi Etik Kurul Kurulundan alınmıştır. Hastaların klinik bilgileri Tablo 3.1’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Hastaların klinik bilgileri.

Hasta Numarası	Yaş	Kan grubu	VWF:Ag, IU/dL	VWF:RCo IU/dL	FVIII IU/dL	Kanama semptomları
001	12	0	17	8	36	Ağız içi kanamalar, Burun kanamaları, Morarma
002	8	A	24	25	31.5	Kesiklerde kanama, Ağız içi kanamalar, Burun kanamaları
005	24	B	49	45	58	Ağız içi kanamalar, Burun kanamaları
007	13	B	83	31.5	151	Diş operasyonundan sonra kanama
008	9	0	17	4	43	Kesiklerde kanama, Ağız içi kanamalar, Burun kanamaları
009	33	0	27	7	17	Kesiklerde kanama, Burun kanamaları , Morarma, menoraji
010	9	A	110	28	110	Burun kanamaları
011	12	0	34	12	95	Kesiklerde kanama, Burun kanamaları , Morarma
012	18	0	105	23	98	Kesiklerde kanama Burun kanamaları
013	7	0	8	4	27.5	Kesiklerde kanama Burun kanamaları , Morarma
019	19	0	52	20	55.5	Burun kanamaları Morarma, Menoraji
024	10	0	76	38	81.5	Burun kanaması Morarma
033	11	0	37	38	67	Ağız içi kanamalar, Burun kanamaları Operasyon sonrası kanama
038	19	0	64	12	112	Kesiklerde kanama, Burun kanamaları , Morarma, menoraji
039	24	0	26	6	22	Kesiklerde kanama, Burun kanamaları , Morarma, menoraji
051	12	0	68	23	87	Burun kanamaları , Morarma
056	13	B	26	12	32	Burun kanamaları , Morarma, menoraji
058	17	0	48	47	68	Kesiklerde kanama Ağız içi kanamalar
065	8	0	48	43	57	Ağız içi kanamalar

3.1. Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan cihazlar.

Buzdolabı	Beko 8742 , Arçelik 3061 Plus (TÜRKİYE)
Derin Dondurucular	-20 °C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE)
Dizi Analizi Cihazı	Applied Biosystem 3130 XL
Dokümantasyon Sistemleri	Bio-RAD Üniversal Hood II (Bio-RAD, İTALYA)
Güç kaynağı	PowerPac Basic (BIO-RAD, İTALYA)
Isı bloğu	DB 2D (Techne, İNGİLTERE)
Manyetik karıştırıcı	MR 3001 (Heidolph, ALMANYA)
Otoklav	Dik tip otoklav (BES, TÜRKİYE)
PZR Cihazı	Thermo Scientific Hypoid PX2 Thermal Cycler
Santrifüjler	Mikrosantrifüj, MiniSpin Plus (Eppendorf, ALMANYA)
Spektrofotometre	Schimidzu UV 1601 (JAPONYA)
Su Arıtma Sistemi	Millipore Milli Q Synthesis A10 (FRANSA)
Tartılar	Hassas Terazı, XB 220 A (Presica, İsviçre) Terazi, KB 400-2 (KERN, ALMANYA)
Vorteks	Heidolph REAX (ALMANYA)
Yatay Elektroforez Sistemleri	Flowgen (İNGİLTERE) Sub-Cell GT (Bio-RAD, İTALYA)

3.2. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm sıvı ve katı kimyasallar moleküler biyoloji kalitesinde olup, aksi belirtilmediği takdirde marka olarak Merck(ALMANYA) ve ya Sigma (ABD) kullanılmıştır.

3.2.1 Tamponlar, Solüsyonlar ve Enzimler

3.2.1.1. DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden DNA izolasyonu amacıyla PureLINK Genomic DNA Kit'i (İnvitrogen, ABD) kullanılmıştır.

3.2.1.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Tamponları ve DNA Polimeraz Enzimleri

Polimeraz zincir reaksiyonu için Tablo 3.3'de verilen kimyasallar kullanılmıştır.

Tablo 3.3. PZR için kullanılan kimyasallar.

MgCl ₂ 'süz Tampon	Go Taq 5X MgCl ₂ 'süz PZR Tamponu (Promega, ABD)
	Fermentas 10X MgCl ₂ 'süz Tampon (Fermentas, LİTVANYA)
MgCl ₂	Go Taq 25mM MgCl ₂ solüsyonu (Promega, ABD)
	Fermentas 25 mM MgCl ₂ solüsyonu (Fermentas, LİTVANYA)
Deoksiribonükleotidler (dNTP)	dATP, dCTP, dGTP ve dTTP,100mM, (Fermentas, LİTVANA)
Dimetilsulfoksit (DMSO)	Dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma, ABD)
Taq DNA Polimeraz	Go Taq (Promega, ABD)
	Rekombinant Taq DNA Polimeraz (Fermentas, LİTVANYA)

3.2.1.3. Elektroforez Tamponları ve Jel Sistemleri

Tablo 3.4. Elektroforez ve jel sistemi Tamponları,

10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA)	890 mM Tris-Base, 890 mM Borik Asit, 20 mM Na ₂ EDTA.2H ₂ O, (pH 8.3)
10X Bromofenol Mavisi (BPB)	2.5 mg/ml BPB
Etidyum Bromid (EtBr)	10 mg/ml
% 1 veya 2'lik Agaroz Jel	0.5 X TBE Tamponunda %1 veya %2 (w/v) agaroz
DNA markörü	GeneRuler 100 bç DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)

3.2.1.4 Oligonükleotid Primerler

PZR için kullanılan primerlerin dizileri Tablo 3.5'de verilmiştir.

Tablo 3.5. PZR Primer dizileri.

Ekzon	Primer Dizisi 5' – 3'
28-1F	GTGTCCACAGGTTCTTC
28-1R	CGTTGCACGATTTCTACTGC
28-2F	GGACATCTCGGAACCGCC
28-2R	ATTGCCAGCCAGGTGAAGTA
28-3F	CGTCAGAGCTGCGGCGCA
28-3R	TGTGATCCCGGTGGGCATTG
28-4F	CCTGAAGAAGAAGAAGGTCATT
28-4R	GACATGGCACAAGTCACTGT
28-5F	TCTGTGACCTTGCCCCTGAA
28-5R	TGGATGTGGCGTTCGTCCTGGAAG
28-6F	GGACAAAATTGGTGAAGCCGAC
28-6R	CCGGAAATCCTGCCTCTGATGA
28-7F	CTGGTCTACATGGTCACCG
28-7R	ACCTGGTATGCTGGCACCT

3.2.1.5. Dizi Analizi PZR Saflaştırılması ve Dizi Analizi

Dizi analizi öncesinde PZR ürünleri High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Almanya) kullanılarak saflaştırılmıştır.

DNA dizi analizi için Big Dye Terminator v.3 (Applied Biosystems, ABD) kullanılmıştır.

4. YÖNTEM

4.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Bu çalışmada hasta kan örneklerinden DNA elde etmek için DNA PureLink Genomic DNA Kits kullanılmıştır. Bu tip DNA izolasyon kitlerinin çalışma prensibi nükleik asitlerin sodyum iyodür (NaI), guanidin tiyosiyenat ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HSCN}$), guanidin hidroklorür ($\text{CH}_5\text{N}_3\cdot\text{HCl}$) gibi kaotropik tuzların varlığında silika bazlı membrana bağlanmasıdır. Değişik tipteki nükleik asitler solüsyonun iyonik gücüne ve pH'sına göre silika bazlı membrana az veya çok bağlanırlar. Bir kaotropik tuzun varlığında (guanidinHCl) Proteinaz K ile kısa bir inkübasyon hücrelerin liziz olmasını sağlar ve Proteinaz K tüm nükleazları inaktive ederek protein kontaminasyonunu minimize hale getirir. Rnase A ise tüm RNAları degrade ederek RNA kontaminasyonunu minimize hale getirir. Yıkama solüsyonları ve santrifüj işlemleri ile de kontaminantlardan arındırılır. Nükleik asidi membrandan kurtarmak için her zaman düşük konsantrasyonlu tuz tamponu veya su kullanılır.

Bu kitin prosedürü;

- 200 µl kan bir Eppendorf tüpe alınır ve üzerine 20 µl Proteinaz ve 20 µl Rnase A eklenir. Vortekslenir, ve 2 dakika oda sıcaklığında inkübe edilir.
- 200 µl Parçalama/Bağlama solüsyonu eklenir. Vortekslenir, ve daha sonra proteinleri parçalamak için 10 dakika 55 °C'de inkübe edilir.
- Karışıma 200 µl % 100-96 etanol eklenir. 5 saniye vortekslenir.
- Kit içerisinde çıkan spin kolonlara alınan karışım 10.000 x g'de oda sıcaklığında 1 dakika santrifüj edilir.
- Spin kolonlar yeni alt tüpe alınarak 500 µl yıkama solusyonu 1 (Wash Buffer 1) eklenerek oda sıcaklığında 10.000 x g'de 1 dakika santrifüj edilir.
- Spin kolon yeni bir alt tüpe alınarak 500 µl yıkama solusyonu 2 (Wash Buffer 2) eklenerek oda sıcaklığında maksimum hızda 3 dakika santrifüjlenir.

- Spin kolonu steril 1.5 ml'lik yeni bir Eppendorfe alınarak 50 µl elüsyon solüsyonu eklenerek 1dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra oda sıcaklığında maksimum hızda 1 dakika santrifüj edilir.
- Spin kolon üzerinden alındıktan sonra genomik DNA elde edilmiş olur.
- Elde edilen genomik DNAlar -20 °C'de saklanır.

4.2. DNA'nın Nitel Ve Nicel Analizi

İzole edilen genomik DNA bütünlüğünün kontrolü için 0.5X TEB tampon çözeltisi içinde %1 konsantrasyonunda agaroz jel analizi yapılmıştır. UV ışığının altında gözlemlenebilmesi için Etidyum bromür (EtBr) kullanılmıştır. Tek ve sıkı bir bant gözlemlenmesi DNA örneğinin bütünlüğünü koruduğu olarak yorumlanabilir. Çıkarılan DNA'nın miktarı ve kalitesi, bu özellikleri bilinen bir DNA standardı ile karşılaştırılarak tahmin edilebilir.

DNA'nın tam konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik analiz ile saptanabilir. DNA örneği damıtılmış su ile seyreltilir ve optik yoğunluğu 260 nm (A260) ve 280 nm'de (A280) okunur. 50 µg çift zincirli DNA'nın 260 nm'deki absorbansının 1.0 birim kabul edilerek örnek DNA'nın konsantrasyonu aşağıdaki formülle hesaplanabilir. DNA'nın saflığı A260/A280 oranına bakılarak tahmin edilebilir. 1.8 (± 0.1) oranına sahip örnekler saf olarak düşünülebilir. 1.8'den büyük değerler RNA kontaminasyonunu, düşük değerler ise protein kontaminasyonunu işaret eder.

4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, bir DNA parçasının kopyalarının primerler tarafından yönlendirilerek, enzimatik olarak sentezlenmesine dayanan *in vitro* bir yöntemdir. PZR'ın temel bileşenleri; kalıp olarak kullanılan DNA molekülü, DNA polimeraz enzimi, ileri ve geri primerler, dNTP karışımı, tampon ve Mg⁺²'dür. Taq polimeraz aktivitesi için Mg⁺²serbest iyonlarına ihtiyaç duyulur. Reaksiyon tamponu enzim aktivitesi için gerekli iyonları içerecek şekilde hazırlanır ve dNTP'ler de DNA sentezi için gerekli nükleotidleri sağlar. Ayrıca G-C bakımından zengin olan bölgeler içinse %10'luk DMSO kullanılmaktadır.

PZR işleminde üç aşama vardır. PZR işleminde başlangıçta genomik DNA'nın çift zincir yapısının tek zincir hale dönüşmesi için (denatüre olması için) 90-100° C gibi yüksek

sıcaklıklara kadar ısıtılır. Tek zincir hale gelen DNaya primerler kendilerine özgü bağlanma sıcaklığında bekletilir. Primerler bağlandıktan sonra ısıya dayanıklı olan Taq polimeraz enzimi, uzama aşamasında ise 5'–3' yönünde olmak üzere, ortamdaki nükleotidleri kullanarak, primerlerin 3' hidroksil ucuna nükleotidleri yerleştirir ve böylece hedef DNA parçasının bir kopyası elde edilir.

Toplam döngü sayısı genellikle 25-35 arasındadır.

VWF geninde 52 ekzon bulunmaktadır. Bu çalışmada ekzon 28 bölgesi 7 primer seti ile çoğaltılmıştır. (Tablo 3.5'de belirtilmiştir.). Her primer setinin PZR koşulları belirlemek için Mg, primer ve bağlanma sıcaklığı titrasyonu yapılmıştır. Bu çalışmadaki PZR koşulları Tablo 4.1'de, PZR programı ise Tablo 4.2'de belirtilmiştir.

Tablo 4.1. PZR Koşulları.

EKZON BÖLÜMLERİ	MgCl ₂ (25mM)	PRIMER (10pM)	SICAKLIK	EKZON BOYU (bç)
28_1	2,5mM	10pM	58 ⁰ C	194
28_2	2,5mM	10pM	58 ⁰ C	267
28_3	2,5mM	10pM	58 ⁰ C	240
28_4	2,5mM	10pM	58 ⁰ C	218
28_5	2,5mM	10pM	58 ⁰ C	275
28_6	2,5mM	10pM	58 ⁰ C	327
28_7	2,5mM	10pM	58 ⁰ C	261

Tablo 4.2. PZR Programı.

94 ⁰ C	4 dakika	
94 ⁰ C	30 saniye	30 döngü
58 ⁰ C	30 saniye	
72 ⁰ C	45 saniye	
72 ⁰ C	5 dakika	

4.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Jel elektroforezi DNA fragmanlarını tespit etmek ve ayırmak için yapılan bir metottür. DNA fragmanları uygun bir tamponun içine bir jele yüklenmiş olarak negatif elektrottan (katot) pozitif elektrota (anot) yürütülerek ayrılır. DNA'nın yapısında negatif yüklü fosfat gruplarının bulunmasından dolayı DNA molekülleri anoda doğru yürür. DNA bantları etidyum bromür ile görünür hale gelir.

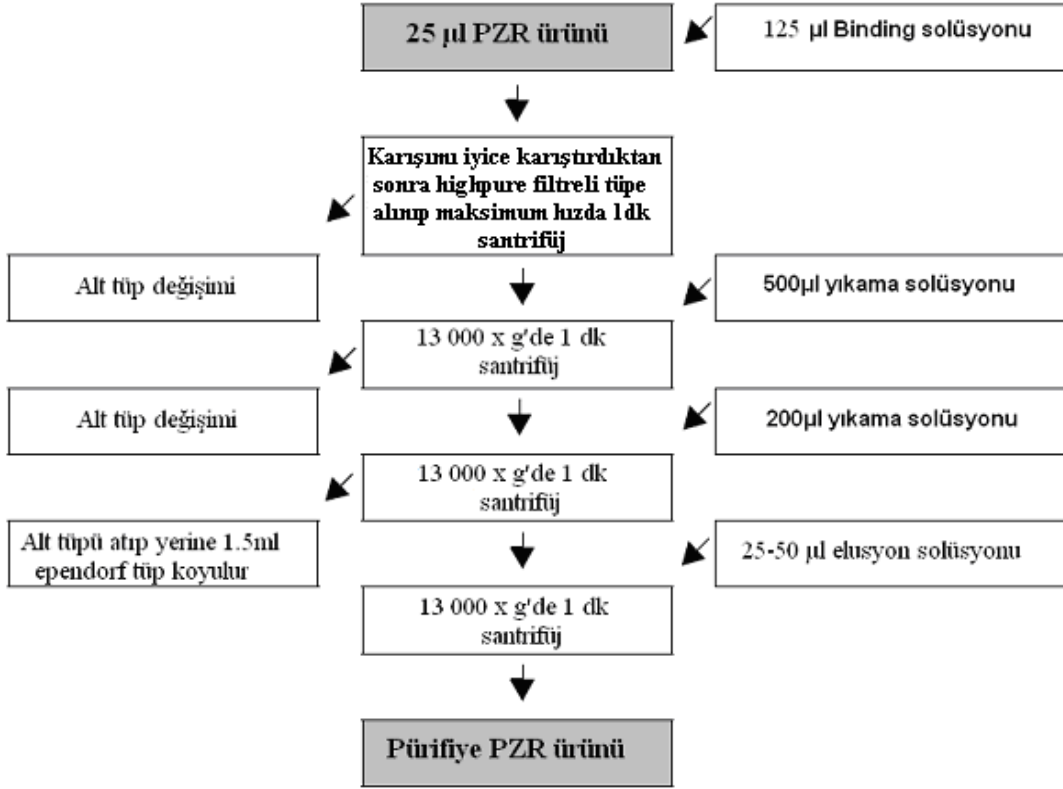
Agaroz, bir kırmızı alg türü olan *Agar agar*'dan izole edilen doğrusal bir polisakarittir. Agaroz sıcak suda çözünür ve soğutulduğu zaman polimerde karşılıklı hidrojen bağlarının oluşumu ile geri dönüşümlü bir jel yapısı oluşur. Agaroz jel elektroforezi DNA fragmanlarını moleküler ağırlıklarına göre ayırır. Agaroz konsantrasyonu değiştirilerek jelin por çapı ayarlanabilir. Yüksek konsantrasyonlar kısa fragmanları ayırmak için daha uygundur.

Agaroz jel 0.5X TBE tamponu içinde çözülür ve kaynatılarak hazırlanır. EtBr, degradasyonu engellemek için jel solüsyonu 50°C'ye soğutulduktan sonra koyulur. Solüsyon jel kabına dökülür, taraklar yerleştirilir ve jelin polimerize olması için beklenir. Polimerizasyondan sonra jel içinde 0.5X TBE tamponu bulunan yatay jel elektroforez aparatına konur, taraklar jele zarar vermeden nazikçe çıkarılır bu şekilde kuyucuklar oluşturulmuş olur. Örnekler BPB yükleme boyası ile son konsantrasyon 1X olacak şekilde karıştırılır jeldeki kuyucuklara yüklenir. Elektrik akımı verilmesi ile birlikte DNA anoda doğru hareket etmeye başlar. Agaroz jeller genellikle 100-150 Voltta (V) 10-45 dakika yürütülür. Elektroforez tamamlandığında DNA bantları UV ışığı altında görünebilecek hale gelir.

4.5. PZR Ürünü Saflaştırılması

DNA dizi analizi öncesi elde edilen amplikonlar High Pure PCR Product Purification Kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. PZR purifikasyonu primer, dNTP'ler ve Taq enzimi artıklarının giderilmesi için kullanılan bir yöntemdir. Yöntemin prosedürü Şekil 4.1'de verilmiştir.

Saflaştırma sonunda %2lik agaroz jelde yürütülerek pürifiye PZR ürünü kontrol edilir. Bir sonraki aşama dizi analizi aşamasıdır.



Şekil 4.1. PZR ürününün saflaştırma prosedürü.

4.6. Dizi analizi

Dizi analizi için Sanger Dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem Dideoksi ya da zincir sonlanması reaksiyonları olarak da bilinir.

Bu yöntem için:

- Tek iplikçik kalıp DNA'ya
- dNTP'lere
- ddNTP'lere
- DNA polimeraz'a
- Serbest OH grubu içeren primere ihtiyaç vardır.

ddNTPler riboz şekerinin ikinci karbon atomunda bulunan deoksiye ek olarak üçüncü karbon atomunda da deoksi bulunur. Bu durum fosfodiester bağının oluşumu engeller, yeni nükleotitler yapıya katılmaz. Sonuçta DNA sentezi durdurulmuş olur.

Dizi analizinin prosedürü PZR'nın işleyişine benzer DNA tek zincir haline getirilir. Reaksiyona girecek olan karışımda bol miktarda dört çeşit normal nükleotid; dATP, dGTP, dCTP, dTTP bulunur. Karışımda aynı zamanda diziyi rastgele sonlandırmak için farklı renkte flouresan kimyasallarla işaretlenmiş dideoksinükleotidler de bulunmaktadır; ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP. DNA Polimeraz I ise sentezde zincirin uzaması aşamasında gereklidir. Zincir uzaması esnasında normal nükleotidler sırayla eklenir; fakat DNA polimeraz normal deoksinükleotid yerine dideoksi nükleotid eklediği zaman zincirin uzaması sonlanır. Bu eklenme rastgele olduğu için değişik uzunluklarda milyonlarca fragment oluşur. Bu fragmentler aynı zamanda sonlandıkları noktada kendilerine özgü floresan boya da taşımaktadırlar. PZR ile benzer yönleri olmasına rağmen farklı işlemlerdir. PZR'de iki primer kullanılırken, dizileme PZR'ında bir tane kullanılır (ileri ya da geri primeri). Dizi analizi prosedürü Tablo 4.3'te, dizi analizi programı ise Tablo 4.4'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Dizi analizi PZR Protokolü.

2 µl	Big Dye Terminator v.3.1
2 µl	Big Dye Buffer
4 µl	0,8 mM primer (ileri yada geri)
2 µl	Purifiye edilmiş PZR ürünü
10 µl	Distile su
20 µl	Toplam Hacim

Tablo 4.4. VWF gen analizi için Dizi Analizi PZR Programı.

94 °C	4 dakika	40 Döngü
94 °C	30 saniye	
58 °C	30 saniye	
72 °C	45 saniye	
72 °C	5 dakika	

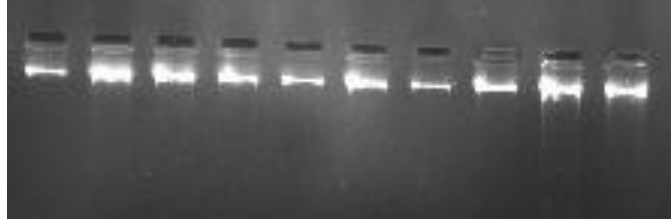
4.7. Dizi Analizi Saflaştırması

Dizi analizi PZR'sinden sonra tekrar bir saflaştırma gerektirmektedir. Bunun için Qiagen Dyex kiti kullanılmıştır. Kit içinden çıkan hazır solüsyonlu spin klonlar 3000 rpm'de 3 dakika santrifüjden sonra alt tüpler atılarak kolonlar 1,5 ml'lik ependorf tüpe alınarak kolonlara PZR ürünleri aktarılır ve 3000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir. 1.5 ml'lik tüpte biriken ürün bekletilmeden dizi analizi cihazına yüklenir.

5. SONUÇLAR

5.1. DNA İzolasyon Sonuçları

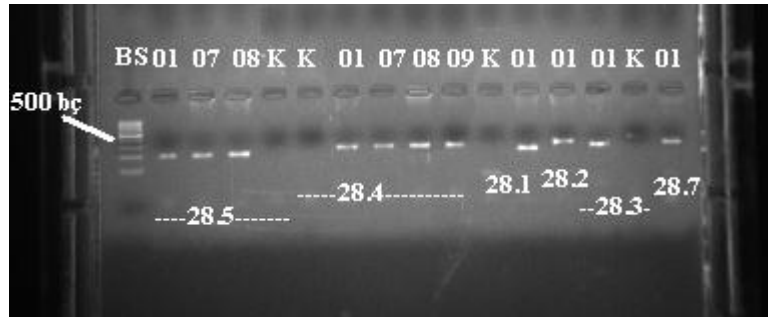
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümünden elde edilen 20 tane Tip 2 von Willebrand hastalarının kanlarından öncelikle PureLink Genomic DNA Kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Elde edilen DNA'lardan 2 µl alınarak % 1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. Elde edilen genomik DNA'nın %1'lik agaroz jelde yürütülmesi

5.2. PZR Sonuçları

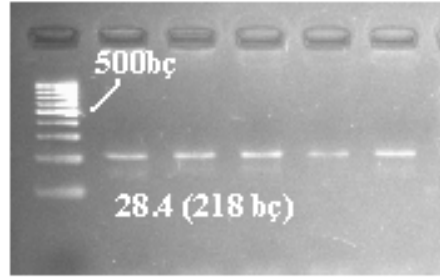
52 ekzonu olan VWF geninin ekzon 28'i geniş bir bölge olduğu için 7 primer setiyle çoğaltılmıştır. PZR koşulları Tablo 4.1'de verilmiştir.



Şekil 5.2. Elde edilen PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde yürütülmesi

5.3. PZR Sonrası Purifikasyon

PZR sonrasında ürünlerin saflaştırılma işlemi High Pure PZR Product Purification Kiti kullanılarak Bölüm 4.5’de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Saflaştırılan ürünler daha sonra %2’lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir. (Şekil 5.3)

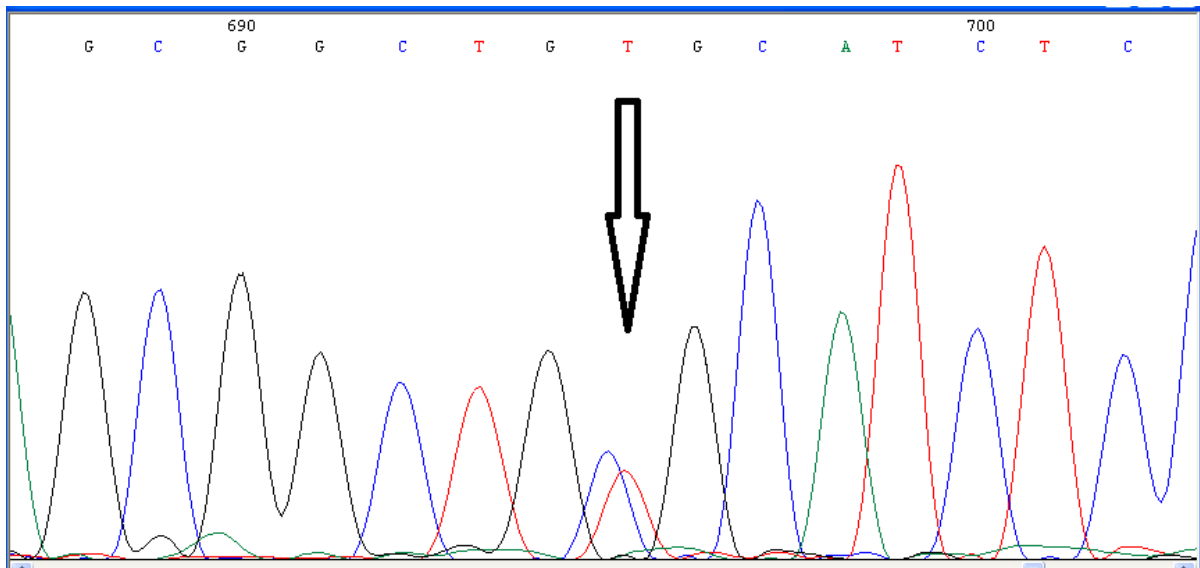


Şekil 5.3. Saflaştırılmış PZR ürünlerinin %2’lik agaroz jelde yürütülmesi

5.4. Dizi Analizi Sonuçları

VWF geninin ekzon 28’i hem geri, hem de ileri primerler ile dizilenmiştir. Yapılan dizi analizi PZR’sinin koşulları Bölüm 4.6’da anlatıldığı gibidir.

Bu tez kapsamında Tip 2 VWH tanısı konulan 20 hasta ile çalışılmıştır. Bu hastalarda görülen mutasyon ve polimorfizmlerin listesi Tablo 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.4. 39 numaralı hastanın heterozigot 3922C>T mutasyonu

Tablo 5.1. Hastalarda görülen polimorfizm ve mutasyon sonuçları.

Hasta numarası	Ekzon 28 sekans varyasyonları	Heterozigot/Homozigot	Ekzon 28 Mutasyonlar
001	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
002	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
005	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
007	-	-	-
008	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
009	-	-	-
010	c.4453G/C	Heterozigot	-
011	c.4453G/C, c.4500G/A	Heterozigot	-
012	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
013	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
019	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
024	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
033	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
038	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
039	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	c.3922C>T Het
051	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
056	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
058	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
063	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-
065	c.4453G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T	Heterozigot	-

6.TARTIŞMA

Von Willebrand Hastalığı VWF'nin eksikliği veya fonksiyonel bozukluklarına bağlı, otozomal geçişli kalıtsal bir kanama hastalığıdır (Ruggeri ve Zimmerman, 1987). VWF, zedelenen damar duvarında trombositlerin tutunmasına ve çökmesine aracılık etmek ve FVIII'i taşıyarak kan pıhtılaşma sistemine sokmak gibi iki önemli rolü olan büyük bir multimerik proteindir. VWH'nda ise bu görev aksadığı için zedelenen bölgede trombositlerde tutunma ve çökme olmaması sebebiyle minor kanamalar ve tramvalar oluşur. VWH'nın, VWF molekülündeki bozukluğun tipine göre değişen klinik ve laboratuvar özelliklere sahiptir. Bu tiplerin genetik geçişi birbirinden farklı özellik gösterebilir.

Bu çalışmada Türk Tip 2 Von willebrand hastalarında, VWF geninin fonksiyonel bölgeleri olan A1, A2 ve A3 bölgelerinin bulunduğu ekzon 28 bölgesinin DNA dizi analizi yöntemiyle analizi yapılmıştır. Bu çalışma içerisinde 20 Tip 2 Von Willebrand hastası ile çalışılmıştır.

Yapılan dizi analizleri sonucunda; 5 polimorfizm (c.4463G/C, c.4500G/A, c.4503C/T, c.4508T/C, c.4517C/T) ile beraber bir mutasyon c.3922C>T (rs61749387) bulunmuştur.

039 numaralı hastada veri tabanında Tip 2B mutasyonu olarak belirtilmiş, proteinin A1 bölgesinde bulunan (c.3922C>T) p.R1308C (rs61749387) mutasyonu heterozigot olarak tespit edilmiştir. Bu mutasyon değişikliğe müsait bir kodonda bulunmaktadır. Bu kodonda ayrıca p.R1308L mutasyonu bildirilmiştir ki bu mutasyon da kolajene bağlanma aktivitesini değiştirerek yine Tip 2B VWH'na sebep olduğu belirtilmiştir (Baronciaoni ve diğ. 2005). Bunun sebebi, mutasyonun VWF'ün A1 bölgesindeki disülfat halka yapının bulunduğu kısımda olmasıdır. Bu yapı GpIb, kolajen ve heparine bağlanmayla ilgili bir bölgedir.

Otozomal dominant kalıtım gösteren Tip 2B VWH, mutant VWF multimerlerinin spontan olarak trombositlere bağlanması ve trombositlerle birlikte fagosite edilmesidir. Fagositoz sonucu Tip 2B hastalarında yüksek molekül ağırlıklı multimerlerde azalma görülür ve VWF:RCof değerinde azalma vardır. p.R1308C mutasyonu tespit edilen hastanın VWF:RCof değerinde de ciddi derecede azalma bulunmaktadır. (VWF:Ag %22.5, FVIII:C %30 ve VWF:RCof %6).

Bulunan polimorfizmlere bakıldığında ise c.4453G/C (p.V1485L) (rs61750095) , c.4508 T/C (L1503P) (rs61750097), c.4517C/T (p.S1506L) (rs61750100) NCBI, SNP veri tabanında belirtilmişken diğer iki polimorfizm c.4500G/A (p.V1500I) ve c.4503C/T (p.L1501) sadece Sheffield Üniversitesinin ISTH-SSC VWF Online veri tabanında belirtilmiştir. Bu polimorfizmlerin hastalarda genel olarak birlikte görülmesi Türk popülasyonunda sık bulunan polimorfizm grubu olabileceği ve psödogen ile rekombinasyon sonucu oluşan bir bölgede olabileceği düşünülmüştür. Psödogen ekzon 23-34 arasındaki dizinin %97 homoloğu olduğu ve bu ara bölgede daha çok mutasyonlar olmasının sebebinin de bu iki gen arasındaki rekombinasyona bağlanmasından yola çıkılarak bu polimorfizmlerin bir haplotip olabileceği düşünülmektedir.

VWF geninin ekzon 28 bölgesi için moleküler genetik analizi için yöntem oluşturulmuş ve bu bölgede 5 polimorfizm ve bir hastada mutasyon belirlenerek alt tiplendirilmesi yapılmıştır. Hasta aile ağaçları ile çalışılarak bu birlikte aktarılan polimorfizmlerin sebebi belirlenebilir. Ve ayrıca bu polimorfizmlerin bir arada bulunmasının VWH oluşumunda bir etkisi olup olmadığı normal popülasyonlarla karşılaştırılarak bulunabilir. Sonuç olarak oluşturulan bu yöntemle taranan hasta sayısının yükseltilmesi ile Türk popülasyonunda belirlenen mutasyon ve polimorfizmlerin artacağı düşünülmektedir.

7.KAYNAKLAR

7.1. Kitap

Kumar, V. Cotran, R.S. Robbins, S.L. (2003), Basic Pathology (7.Baskı), Saunders;84-85-86.

7.2. Makale

Baronciani, L., Federici, A.B., Beretta, M., Cozzi, G., Canciani, M.T., ve Mannuci, P.M. (2005). Expression studies on a novel type 2B variant of the von Willebrand factor gene (R1308L) characterized by defective collagen binding. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3;2689-2694

Cumming, A., Grundy, P., Keeny, S., Lester, W., Enayat, S., Guilliatt, A., Boven, D., Pasi, J., Keelin, D., Hill, F., Bolton-Maggs, P.H.B., Hay, C., Collins, P., (2006). An investigation of the von Willebrand factor genotip in UK patients diagnosed to have type I von Willebrand disease. *Thrombosis and Haemostasis*. 96(5);630-41.

Federici, A.B. ve Canciani, M.T. (2009). Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease. *Haematologica* 94(5);679-86

Ginsburg, D. ve Bowie, E.J. (1992). Molecular Genetics of von Willebrand Disease. *Blood* 79;2507-2519

Haberichter, S.L., Merricks, E.P., Fahs, S.A., Christopherson, P.A., Nichols, T.A., ve Montgomery, R.R. (2005). Re-establishment of VWF-dependent Weibel-Palade bodies in VWD endothelial cells. *Blood* 105;145-152.

Haberichter, S.L., Allmann, A. M., Jozwiak, M. A., Montgomery, R. R., Gill, J. C. (2009). Genetic alteration of the D2 domain abolishes von Willebrand factor multimerization and trafficking into storage. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7;641-650.

Hill, J. C., Endres-Brooks, J., Buauer, H. J. (1987). The Effect of ABO Blood group on diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 69;1691.

Hickson, N., Hampshire, D., Winship, P., Goudemand, J., Schneppenheim, R., Budde, U., Castaman, G., Rodeghiero, F., Rederici, A.B., James, P., Peake; I., Eikenboom, J., Goodeve, A. (2010). On Behalf of the MCMDM-1 VWD and ZPMCB-VWD study groups Von willebrand factor variant p.Arg924Gln marks an allele associated with reduce von Willebrand factor and faktor VIII levels. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8;1986-1993.

Kashiwagi T., Matsushita T., Ito Y., Hirashima K., Sanda N., Fujimori Y., Yamada T., Okumura K., Takagi A., T., Murate, A. Katsumi, J., Takamatsu, K., Yamamoto, T., Naoe ve T. Kojima. (2008) L1503R is a member of group I mutation and has dominant negative effect on secretion of full-length VWF multimers: an analysis of two patients with type 2A von Willebrand disease. *Haemophilia* 14;556–563.

Keeney, S. ve Cumming, A.M. (2001) The molecular biology of von Willebrand Disease . *Clinical Laboratory Haematology* 23;209-230.

Lillicrap, D. (2009,) Genotype/phenotype association in von Willebrand disease: is the glass half full or empty. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7;65-70.

Mannucci, P.M., Ruggeir Z.M., Pareti F.I. ve diğ. (1977). 1-Deamino-8-D-arginine vasopressin: Anew pharmacological approach to the management of hemophilia and von Willebrand's disease. *Lancet* 1;869.

Meyer D., Fressinaud E., Gaucher C., Lavergne J.M., Hilbert L., Ribba A.S., Jorieux S. & Mazurier C. (1997). Gene defects in 150 unrelated french cases with type 2 von Willebranddisease: from the patient to the gene. INSERM network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. *Thrombosis and Haemostasis* 78;451-456.

Peake, I. R. Ve Goodeve, A. C. (2010). Genetic testing for von Willebrand disease: the case for. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 8;13-16.

Ruggeri, Z. M. Zimmerman, T. S. (1987). von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Blood* 70(4);895-904.

Ruggeri, Z.M. Ware, J. (1993). Von Willebrand Factor. *Faseb Journal* 7;308-316

Saba, H. I., Saba, S. R., Dent, J., Ruggeri, Z. M., Zimmerman, T. S. (1985). Type IIB Tampa: a variant of von Willebrand disease with chronic thrombocytopenia, circulating platelet aggregates, and spontaneous platelet aggregation. *Blood* 66;282-286

Sadler, J.E. Mannucci, P.M. Berntorp, E. Et al. (2000). Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromosis and Haemostasis* 84;160.

Sadler, J. E., Budde, U., Eikenboom, J. C. J., Favaloro, E. J., Hill, F. G. H., Holmberg, L., Ingerslev, J., Lee, C. A., Lillicrap, D., Mannucci, P. M., Mazurier, C., Meyer, D., Nichols, W. L., Nishino, M., Peake, I. R., Rodeghiero, F., Schneppenheim, R., Ruggeri, Z. M., Srivastava, A., Montgomery, R. R., Federici, A. B. (2006). Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the Subcommittee on von Willebrand Factor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 4(10);2103-2114

Sadler, J.E. (2008). Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 112;11-18.

Sztukowska M., Gallinaro L.,M. G. Cattini,E. Pontara, F. Sartorello,V. Daidone, R. Padrini, A. Pagnan and A. Casonato (2008) Von Willebrand factor propeptide makes it easy to identify the shorter Von Willebrand factor survival in patients with type 1and type Vicenza von Willebrand disease. *British Journal of Haematology* 143;107–114.

Westrick, R.J. Ginsburg, D. (2009) Modifier genes for disorders of thrombosis and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 7(1);132–135.

7.3. İnternet:

ISTH-SSC VWF Online Database;

<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/graphics/gene.jpg&imgref>

(son erişim tarihi:15.01.2011)

<http://www.ragtimedesign.com/vwf/mutation/mutationableresults.php>

(son erişim tarihi:15.01.2011)

<http://www.ragtimedesign.com/vwf/polymorphism/polyableresults.php> (son erişim tarihi:15.01.2011)

Practical-Hemostasis.com

http://www.practical-haemostasis.com/images/Images-2/Factor%20Assays/vwf_schematic.jpg

(son erişim tarihi:01.02.2011)

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

(son erişim tarihi:18.02.2011)

8. ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında İzmit'te doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İzmit'te tamamladı. 2004 yılında girdiği Haliç Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünden 2008 yılında mezun oldu. 2009 yılında çalışmaya başlamış olduğu İstanbul Düzen Laboratuvarı Viral Hastalıklar Moleküler Tanı Bölümü'nde halen çalışmaktadır.