

**T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ**

**TİP 1 VE TİP 3 VON WILLEBRAND HASTALARINDA  
VON WILLEBRAND FAKTÖR GENİNİN ANALİZİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Hazırlayan  
Aslıhan Seda DAĞDEMİR**

**Danışmanı  
Yrd.Doç.Dr.Baki YOKEŞ**

**İstanbul – 2010**

T.C.  
HALIÇ ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Biyoloji ve Genetik Programı Tezli Yüksek Lisans öğrencisi **Ashhan Seda DAĞDEMİR** tarafından hazırlanan “**Tip 1 ve Tip 3 Von Williebrand Hastalarında Von Willibrand Faktör Geninin Analizi**” adlı bu çalışma jürimizce Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Tarihi : 01.10.2010

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

İmzası :

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

.....  


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

.....  


Jüri Üyesi :Yrd.Doç.Dr.Kürşat ÖZDİLLİ  
HAL.Üniv.Hemşirelik Yüksekokulu Öğr.Üyesi

.....  


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

.....

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

.....

## TEŞEKKÜR

Lisansüstü öğrenimim ve çalışmalarım süresince beni isabetli bir şekilde yönlendiren ve sorunların çözümlenmesinde çok önemli katkılar sağlayan ve destekleyen saygıdeğer hocam sayın Yrd. Doç. Dr. Ergül Berber'e,

Bu tez çalışmamın yürütülmesi ve sonuçlanmasında ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli hocalarım sayın Yrd. Doç. Dr. Baki Yokeş'e ve sayın Yrd. Doç. Dr. Nagehan Ersoy saygı ve şükranlarımı arz ediyorum.

Tez süresince laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Funda Pehlevan ve Ozan Tiryakioğlu'na

Her zaman için manevi destekçilerim olan başta annem olmak üzere aileme ve arkadaşlarıma,

Lisansüstü eğitimimi teşvik edip, her daim destekçilerim olan Dr. Altan Yalçınar, Dr. Belgin Eroğlu Kesim ve Dr. Serpil Erarslan'a

Teşekkürü borç bilirim.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa No.</b>
TEŞEKKÜR.....	II
KISALTMALAR LİSTESİ.....	V
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	VII
ÖZET.....	VII
ABSTRACT.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hemostaz.....	1
1.2. VWF' nın Yapısı ve İşlevleri.....	3
1.3. VWF Biyosentezi.....	4
1.4. VWF' nın Kan Düzeyini Etkileyen Faktörler.....	7
1.5. Von Willebrand Faktör Geni.....	7
1.5. Von Willebrand Hastalığı.....	8
1.5.1. Laboratuvar Bulguları.....	10
1.5.2. VWH' nin Görülme Sıklığı.....	11
1.5.3. Hastalığın Tipleri.....	12
2. AMAÇ.....	18
3. MATERYAL.....	19
3.2.Cihazlar.....	19
3.1. Kimyasallar.....	20
4. YÖNTEM.....	
4.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu.....	23
4.2. DNA' nın Nitel ve Nicel Analizi.....	23
4.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	24
4.4. PZR Ürünü Saflaştırılması.....	24
4.5. DNA Dizi Analizi.....	27
4.6. Dizi Analizi Purifikasyonu.....	28

5. SONUÇ .....	29
5.1. DNA İzolasyon Sonuçları .....	29
5.2. PZR Sonuçları .....	29
5.3. PZR Sonrası Purifikasyon .....	27
5.4. Dizi Analizi PZR .....	28
6. TARTIŞMA .....	38
7.KAYNAKLAR .....	42
7.1. Makaleler.....	42
7.2. Web Sayfaları.....	43
ÖZGEÇMİŞ .....	44

## KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
C	: Sitozin
C	: Sistein
c.	: Kodon
F	: Fenil Alanin
G	: Guanin
G	: Glisin
H	: Histidin
L	: Lösin
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
bç	: Baz çifti
°C	: Celsius Derecesi
DDAVP	: Desmopresin
DMSO	: Dimetilsulfoksit
dNTP	: Deoksiribonükleotid
EtBr	: Etidyum Bromür
EtOH	: Etil Alkol
GIS	: Gastro İntestinal Sistem
kD	: Kilo Dalton
K'EDTA	: Potasyum Etilendiamin tetra asetik asit
Met	: Metionin
mM	: Milimolar
Tyr	: Tirozin
VWF	: Von Willebrand Faktörü
VWH	: Von Willebrand Hastalığı
WPB	: Weibel Palade Body

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No.

Şekil 1.1	: Von Willebrand faktörünün peptid yapısı ve reseptör bağlanma bölgeleri .....	4
Şekil 1.2	: Pre-Pro VWF.....	4
Şekil 1.3	: VWF'nin biyosentezi sırasında multimer oluşumu .....	5
Şekil 1.4	: VWF ve ADAMTS 13 .....	6
Şekil 1.5	: VWF Geninin Ekzon Büyüklükleri .....	7
Şekil 1.6	: En Sık Görülen Mutasyonların Gen Üzerindeki Dağılımı .....	8
Şekil 1.7	: Tip 1 Hastalarında Görülen En Sık mutasyonlar.....	12
Şekil 1.8	: Tip 3 Hastalarında Görülen En Sık mutasyonlar.....	14
Şekil 1.9	: Hastalık Tiplerinde Ortaya Çıkan Mutasyonların Gendeki Dağılımı .....	16
Şekil 1.10	: Tanı testlerinin seçimi .....	16
Şekil 5.1	: Elde edilen genomic DNA'nin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi .....	29
Şekil 5.2	: 3 Farklı hastada Ekzon 28.1, 28.2 ve 28.3 için PZR sonrası jel görüntü .....	32
Şekil 5.3	: 5 Farklı hastada Ekzon 28.4 ve 28.5 için PZR sonrası jel görüntüsü .....	32
Şekil 5.4	: Ekzon 1 için PZR sonrası jel görüntüsü.....	32
Şekil 5.5	: PZR purifikasyonu sonrası ekzon 16 PZR ürünlerinin görünümü.....	33
Şekil 5.6	: PZR purifikasyonu sonrası ekzon 1 PZR ürünlerinin görünümü .....	33
Şekil 5.7	: 049 numaralı hastanın R1659X (CGA>TGA) homozigot mutasyon görüntüsü.....	38
Şekil 5.8	: 044 numaralı hastada yeni bulunan G525R (GGG>AGG) homozigot mutasyonu .....	38
Şekil 5.9	: Tip 2B mutasyonu olan ve 039 numaralı hastada bulunan R1308C mutasyonu.....	39
Şekil 5.10	: Tip 2A mutasyonu olan ve 008 numaralı hastada görülen H484R (CAT>CGT) heterozigot mutasyonu .....	39
Şekil 5.11	: 009 numaralı hastada yeni bulunan ve ekzon 28'deki L1603P (CTG>CCG) heterozigot mutasyonu.....	40

## TABLO LİSTESİ

### Sayfa No.

Tablo 1.1	: Endotelden ve Megakaryositten Sentezlenen VWF Arasındaki .....	6
Tablo 1.2	: VWH Sınıflandırılması .....	9
Tablo 1.3	: VWH Tiplerinin Laboratuar Özellikleri .....	17
Tablo 3.1	: Çalışmalarda Kullanılan Cihazlar .....	19
Tablo 3.2	: PZR ve Agoroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Kimyasallar .....	20
Tablo 3.3	: VWF Geni Primer Listesi .....	21
Tablo 4.1	: Ekzonlara Göre PZR Koşulları .....	25
Tablo 4.2	: VWF PZRı İçin Thermel Cycler Programı.....	27
Tablo 4.3	: Dizi Analizi PZR Protokolü .....	28
Tablo 4.4	: Vwf gen analizi için Dizi Analizi PZR Programı.....	28
Tablo 5.1	: PZR Koşulları ve Ekzonların Boyları.....	30
Tablo 5.2	: VWH Tip 3 Hastalarında Görülen Mutasyon ve Polimorfizmler .....	34
Tablo 5.3	: VWH Tip 1 Hastalarında Görülen Mutasyon ve Polimorfizmler .....	35



## GENEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : Aslıhan Seda Dağdemir  
Anabilim Dalı : Fen Bilimleri Enstitüsü  
Programı : Moleküler Biyoloji ve Genetik  
Tez Danışmanı : Yrd.Doç.Dr.Baki YOKEŞ  
Tez Türü ve Tarihi : Yüksek Lisans – Eylül 2010

### TIP 1 VE TIP 3 VON WILLEBRAND HASTALARINDA VON WILLEBRAND FAKTÖR GENİNİN ANALİZİ

#### ÖZET

Düzenli kan akışı yaşam için esastır ve bunun sağlanması insan vücudu için büyük önem taşır. Hemostaz, pıhtı oluşumunu destekleyen ve antikoagulanların etkisini sınırlayan faktörler arasındaki dengedir. Bu denge ile, yaralanma sonrasında aşırı kan kaybının önlenmesi, damarlarda fazla pıhtı oluşumu da engellenir. Von Willebrand Faktör (VWF) bu dengeyi sağlayan birçok protein arasındadır. VWF eksikliği, dünyada en sık görülen kalıtsal kanamalı hastalık olan Von Willebrand Hastalığına (VWH) yol açar, fakat eksik penetrans ve hafif Von Willebrand Hastalığının klinik belirtilerindeki aşırı değişkenlik kesin tanıyı zorlaştırmaktadır.

VWH'nın, VWF molekülündeki bozukluğun tipine göre değişen klinik ve laboratuvar özelliklerine sahip olan ve genetik geçişi birbirinden farklılık gösteren çok sayıda tipi vardır. Von Willebrand faktörün (VWF) niceliksel eksikliği Tip 1 ve Tip 3 VWH, niteliksel eksikliği Tip 2 VWH olarak sınıflandırılmıştır. Bu çalışmanın amacı Türkiye'de de yüksek sıklıkla görülen VWH için moleküler analiz yöntemlerinin oluşturulması ve Türk Tip 1 ve Tip 3 VWH'larında genetik tanı yapılmasıdır.

## **GENERAL KNOWLEDGE**

Name and Surname : Aslıhan Seda Dağdemir  
Field : Institute of Life Science  
Program : Molecular Biology and Genetics  
Supervisor : Assist.Prof.Dr.Baki Yokeş  
Degree Awarded and Date : Master – September 2010

## **VON WILLEBRAND FACTOR GENE ANALYSIS IN TYPE 1 AND TYPE 3 VON WILLEBRAND DISEASE PATIENTS**

### **SUMMARY**

Continuous blood flow is essential for life and its maintenance is an important task for the body. Hemostasis is the balance between the factor which promote blood clot formation and factors that restricts the action of anticoagulants. This balance prevents, abnormal blood loss after trauma and excessive clot formation in the vessels. Von Willebrand Factor (VWF) is one the proteins that keeps this balance and deficiency of VWF results in the most common inherited bleeding disorder. However, reduced penetrance and dramatic changes observed in the clinical symptoms of mild Von Willebrand Disease (VWD) makes it difficult to diagnose. Different mutations cause different types of VWD which show different clinical and molecular characteristics and different inheritance. Quantitative deficiency of VWF classified as Type 1 and Type 3 VWD, qualitative deficiency is Type 2 VWD.

The aim of this study is to optimise molecular method for gene analysis of VWF that causes VWD in Turkish population and to conduct genetical diagnosis of Turkish Type 1 and Type 3 VWD patients.

# 1. GİRİŞ

Ekstrasellüler sıvının bir parçası olan kan, plazma adı verilen sıvı ortam içerisinde kan hücrelerinin süspansiyon halinde dağıldığı, damar sistemini dolduran ve bu sistem içinde kalbin pompa gücü sayesinde dolaşabilen bir dokudur. Kanın en önemli görevleri; taşıma, düzenleme ve savunmadır. Kan hacminin % 44-46 sını hücresel bölüm oluşturur ve buna kanın hematokrit değeri denilmektedir.

Kan hücreleri eritrositler, lökositler ve trombositlerdir. Eritrositlerin en önemli görevi dokulara Oksijen taşımaktır. Oksijeni içlerinde bulundurdukları hemoglobin molekülüne bağlayarak taşırlar. Lökositler organizmanın savunma sistemini oluştururlar. Organizmayı virüslere, bakterilere, mantarlara, kanser hücrelerine ve yabancı dokulara karşı savunurlar. Trombositler kanamanın durdurulmasında ve kanın pıhtılaşmasında görev alan hücre grubudur.

## 1.1.Hemostaz

Damar bütünlüğünü bozan bir zedelenmeden sonra organizmanın kan akımını sürdürebilme yeteneği yaşamsal önemdedir. Kanın bu durumda pıhtılaşabilmesi ve daha sonrada pıhtının ortadan kaldırılarak tekrar kan akımının sürdürülmesi ve zedelenmiş dokunun tamiri sürecine hemostaz adı verilir. Hemostazın sürdürülmüş olduğu bir organizmada pıhtı oluşumu ile pıhtı erimesi arasında bir denge durumu mevcuttur.

Kanın pıhtılaşması memelilerin yüksek basınçlı dolaşım sisteminde kan damarlarının hasar görmesinin ardından onarımın doğru yapılmasına yardımcı olan bir savunma sistemidir. Burada önemli olan damar içi pıhtılaşmayı önlerken, kanama olmasını da engellemek için çok sayıda karmaşık ve birbirleriyle karşılıklı ilişkili sistemler arasında bir dengenin sürdürülme zorunluluğudur ( Furie ve Furie, 1988).

Damar kesiğinin oluşması durumunda hemostaz 4 aşamada sağlanır;

1. Hasarın distalindeki damarların konstriksiyonudur.
2. Hasar bölgesinde geçici bir trombosit tıkaçının oluşmasıdır.
3. Trombosit tıkaçını ve kırmızı hücreleri yakalayıp daha stabil olan trombüs meydana getiren pıhtı ve fibrin ağının oluşumudur.
4. Pıhtının plazmin tarafından parsiyel veya komple çözülmesidir.

Trombositler damar duvarı hasarının meydana geldiği yerde kollajene bağlanırlar ve trombin, ADP, tromboksan A<sub>2</sub>(TxA<sub>2</sub>) veya epinefrin aracılığıyla aktif hale getirilirler. Aktifleşmiş trombositlerden iki tip granül salgınır.  $\alpha$  granüller ve dense granüller.

$\alpha$  granüller; trombopodin, 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 agregasyon olurlar.

VWF trombosit tıkaçının oluşumunda görev alan en önemli moleküllerdendir. Trombosit tıkaçının oluşumu sırasında trombositler endotel altında açığa çıkan kolajene VWF aracılığı ile yapışırlar. Trombosit tıkaçının oluşması sırasında VWF trombosit membranında glikoprotein Ib-IX ve kollajen matrikse bağlanarak damar kesiğinin oluştuğu bölgede trombosit agregasyonunun oluşması sağlanır.

Hemostaz sürecinde oluşan defektler kanama eğilimini arttıran hastalık tablosu ile seyrederek hemostaz sırasında VWF'ün eksikliği ya da fonksiyonunu yerine getirememesi trombosit adezyonunu bozar ve Faktör VIII'de sekonder bir eksikliğe neden olarak kanama bozukluğuna yol açar. (Westrick ve Ginsburg, 2009)

## 1.2. VWF' nin Yapısı ve İşlevleri

VWF plazmada bulunan multimerik yapıda hemostazın sağlanması için gerekli bir glikoproteindir. VWF'nin hemostazda iki önemli görevi vardır:

- Zedelenen damar duvarında trombositlerin adezyonu ve agregasyonuna aracılık etmek
- Kan pıhtılaşma sisteminde kofaktör olan FVIII'i taşımak

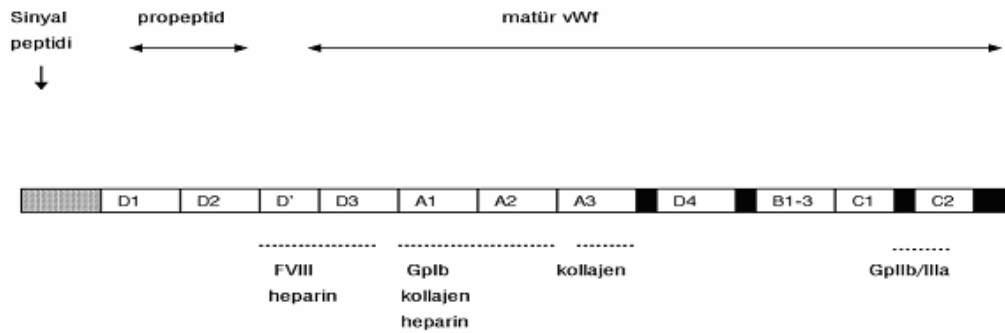
VWF kayma gerilimi yüksek kapiller damarların duvarına trombositlerin adezyonu ve bunu izleyen agregasyonu için gereklidir. Bu nedenle VWF nin eksikliğinde tipik olarak kapiller damarlardan zengin olan mukozal yüzey ve deri kanamaları görülür. VWF'nin bu hemostatik işlevi özgün multimerik yapısı ile ilişkilidir. Molekül ağırlığı en yüksek olan multimerler hemostatik yönden en etkin olanlardır. Yüksek molekül ağırlıklı multimerlerin kaybı veya normal multimerik yapının bozulması hemostatik fonksiyonun da azalmasına ve ya kaybına yol açar.

Molekül üzerindeki çeşitli bağlanma yerleri sayesinde trombosit ve endotel altı doku arasında köprü işlevi görür (Şekil 1.1). Yara yerinde bulunan VWF, hızla geçip gitmekte olan trombositleri önce GpIb aracılığı ile endotele bağlar ve hemen aktive olan trombositlerin membranında açığa çıkan GpIIb/IIIa ya da bağlanarak hem endotel altı doku ile daha güçlü bir bağlantı oluşturur hem de trombosit agregasyonuna neden olarak yara yerinde trombosit tıkaçı oluşmasını sağlar.

VWF aynı zamanda kan pıhtılaşma sisteminde önemli bir kofaktör olan FVIII: C için taşıyıcı protein görevi yaparak onu dolaşımda zamansız yıkımlara karşı korur ve hemostaz oluşurken VWF üzerindeki bağlanma yerine tutunan FVIII in yara yerinde hazır bulundurulması fibrin oluşumu için kolaylık sağlar (Keeney ve Cumming 2001).

### 1.3 VWF'nin Biyosentezi

Vücutta büyük oranda endotel hücreleri tarafından sentezlenen VWF megakaryositler tarafından da üretilir. VWF sentezinde ilk basamak primer mRNA translasyonu ile 2813 aminoasit içeren pre-pro-VWF oluşmasıdır. Pre-pro-vWF 22 aa'lık sinyal peptid, 741 aa'lık propeptid ve 2050 aa'lık matur subunit içerir. Molekülün primer yapısı birbirini birkaç kez tekrarlayan Şekil 1.2'de gösterildiği gibi organize olan A, B, C ve D bölgelerden oluşur. Her bölgenin farklı bağlanma fonksiyonları vardır: D' bölgesi FVIII'i, kollajeni ve heparini, A1 bölgesi platelet membranındaki GPIb reseptörünü, kollajeni ve heparini, A3 kollajeni, C1 ise plateletin agregasyon reseptörü olan GpIIb/IIIa'yı bağlar (Sadler 2009).



Şekil1.1. Von Willebrand Faktörünün peptid yapısı ve reseptör bağlanma bölgeleri (Haberichter SL, 2009)



Şekil1.2. Pre-Pro VWF (Haberichter SL, 2009)

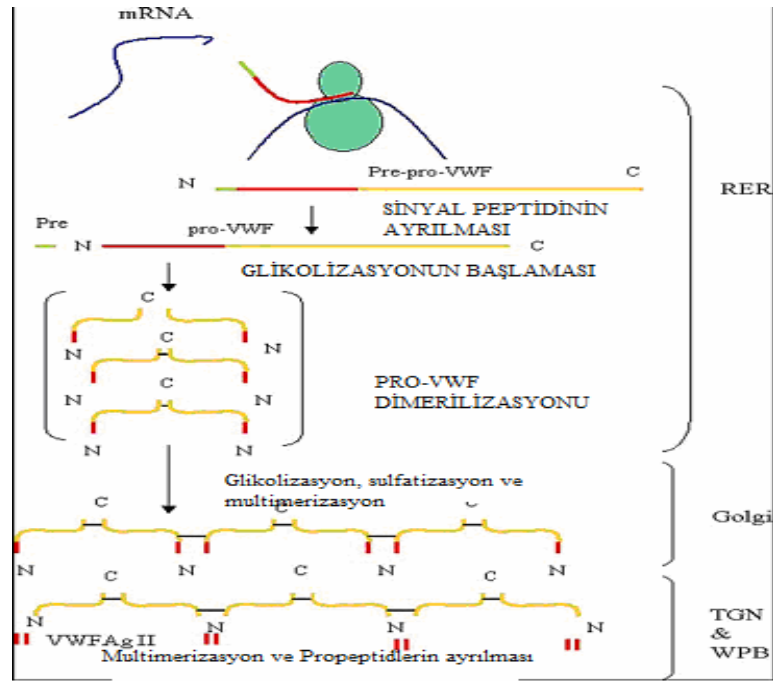
Pre-Pro-VWF'den sinyal peptidin ayrılması ile endoplazmik retikulumdaki pro-VWF posttranslasyonel modifikasyonlara girer. Pro-VWF'nin C terminali sisteince zengindir. Sinyal peptidinin ayrılmasıyla pro-VWF'nin N terminali glikolize olurken C terminali (C1099) ise başka bir pro-VWF'nin C terminalindeki (C1142) sistein rezidüleri arasında disülfid bağlarını kullanarak birbirlerine bağlanırlar. Bu aşamadan sonra dimerize olmuş pro-VWF molekülleri golgi aygıtına geçer. VWF multimerleri daha sonra golgi cisimciğine geçer ve dimerler burada disülfid bağları ile multimerleri oluşturur. Golgi cisimciğinde multimer oluşumu mature VWF molekülünün N terminalindeki disulfid bağları ile gerçekleşir.

Yapılan çalışmalar pro-peptid dizisinin multimer oluşumunda etkili olduğunu göstermiştir (Haberichter SL, 2009) (Şekil 1.3).

VWF multimerlerinin Golgiden dışarı salgılanmasından hemen önce her peptid monomerinin başlangıcındaki 760 aa'lık propeptid kısmı intrasellüler proteazlar tarafından kesilir. Golgiden salgılanan VWF multimerleri ya düzenli olarak hücre dışına verilir veya trombositlerin alfa granüllerinde ve endotel hücresinin Weibel- Palade cisimciklerinde (WPB) depolanır.

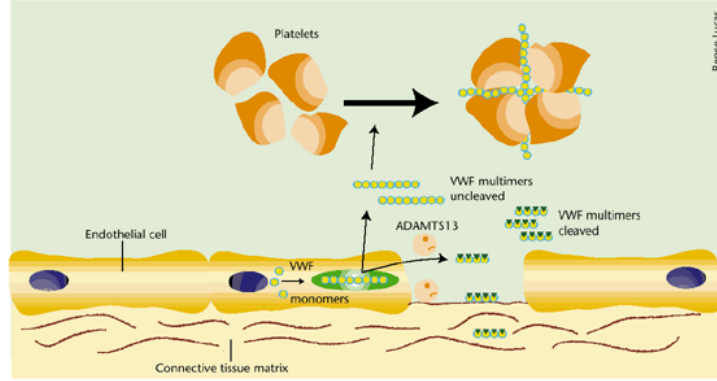
Yapılan çalışmalarda WPB'den salgılanan VWF'nin yüksek moleküler ağırlıklı multimerler olduğunu göstermiştir. Sağlıklı bireylerde VWF plazma düzeyi 0,3-1,57 IU/ml'dir (Kim ve diğ. 2010).

VWF megakaryositte ve endotel hücresinde benzer şekilde sentez edilir. Endotelden ve megakaryositte sentezlenen VWF arasındaki farklar Tablo1.1'de verilmiştir. Endotelde sentezlenen VWF multimerleri endotel altı dokuya ve kana geçer ayrıca endotel hücresinde gereksinim halinde salgılanmak üzere depolanır. Megakaryositte sentezlenen VWF ise plateletlerin alfa granüllerinde depolanır. VWF dolaşımında molekül ağırlıkları 10.000kD'a kadar çıkabilen farklı büyüklükte multimerler şeklinde bulunur (Millar ve Brown, 2006).



Şekil 1.3- VWF'nin Biyosentezi Sırasında Multimer Oluşumu (Millar ve Brown, 2006)

Plazmaya sekrete edilen VWF multimerleri bir metalloproteaz olan ADAMTS- 13 tarafından A2 bölgesinden (Tyr842 - Met843) kesilerek daha küçük multimerlere yıkılır (Şekil 1.4). VWF'nin trombosit kofaktör aktivitesi multimer büyüklüğü ile korelasyon gösterir ( Pruss ve diğ. 2008).



Şekil1.4. VWF ve ADAMTS 13 ( Pruss ve diğ. 2008)

Tablo1.1. Endotelden ve Megakaryositten Sentezlenen VWF Arasındaki Farklar

(McGrath ve diğ. 2010).

ÖZELLİK	ENDOTEL	MEGAKARYOSİT
Esas Salgılama	Evet	Hayır
Depolama	WPB	$\alpha$ GRANÜLLERİ
Multimer dağılımı	Yüksek moleküler ağırlıklı olanlar WPBde, üçüncül boyutlular normal plazmada	Yüksek moleküler ağırlıklı olanlar $\alpha$ granüllerinden
Salgı yapımı uyarıcı madde	Trombin, ADP, Epinefrin, histamin	Trombin, ADP, kollojen, tromboksan A2
ABO antijen ekspresyonu	+	-
Sialik Asit	++	+
Galaktoz Ekspresyonu	++	+
Kollojen Bağlama Yeteneği	++	++
GpIb Bağlama Yeteneği	++	+
GpIIb/IIIa Bağlama Yeteneği	++	+++
Heparin Bağlama Yeteneği	++	+++



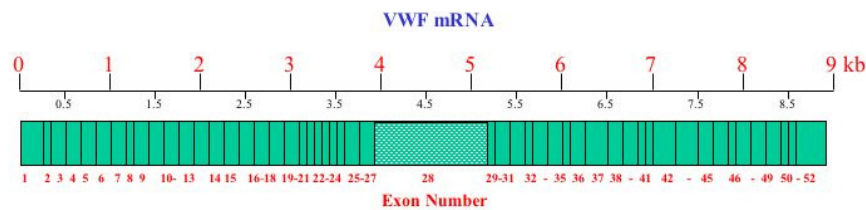
## 1.4-VWF'nin Kan Düzeyini Etkileyen Faktörler

VWF'nin plazma düzeyi, genetik ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişir. Gebelik, östrojen, progesteron, glukokortikoid tedavileri, adrenalin veya adrenalin salınımını artıran stres ve ağır egzersiz, hipertiroidi, inflamatuvar hastalıklar, vaskülitler, diabetes, karaciğer ve böbrek hastalıkları VWF düzeyini artırırken, hipotiroidi ve valproik asit tedavisi VWF düzeyini azaltır (Mannucci ve diğ. 1977). Kan grubu 0 olan bireylerin VWF düzeyi diğer gruplardan yaklaşık %25 daha düşük düzeydedir (Hill ve diğ. 1987).

## 1.5-VWF Geni

VWF geni 12. kromozomda olup yaklaşık 180 kb büyüklüğündedir ve 52 ekzon içermektedir. mRNA transkripti ise yaklaşık 8,5 kb kadardır. 12. kromozomun kısa kolunda lokalize olan VWF geninin 22. kromozomda 22q11–13 bölgesinde lokalize olmuş VWF dizisinin ekzon 23 ve 34 arasında %97 homoloji gösteren bir de pseudogeni vardır (Budde ve Schneppenheim, 2001; Laffan ve diğ. 2004).

Ekzon uzunlukları oldukça değişik olup en küçük ekzonu ekzon 50'dir ve 40 bç kadardır (Şekil 1.5). Genin en uzun ekzonu ise ekzon 28 olup 1347 bçdir ve oldukça polimorfiktir. Diğer ekzonların ortalama boyu 146 bçdir. 51 introna sahip olan VWF geninin en büyük intronu 19,9 kb büyüklüğündeki intron 6'dır. En küçük intron ise intron 29'dur. İtronların ortalamasına bakıldığında yaklaşık olarak 3 - 3,5 kb olduğu görülmüştür (Mancuso, 1989).



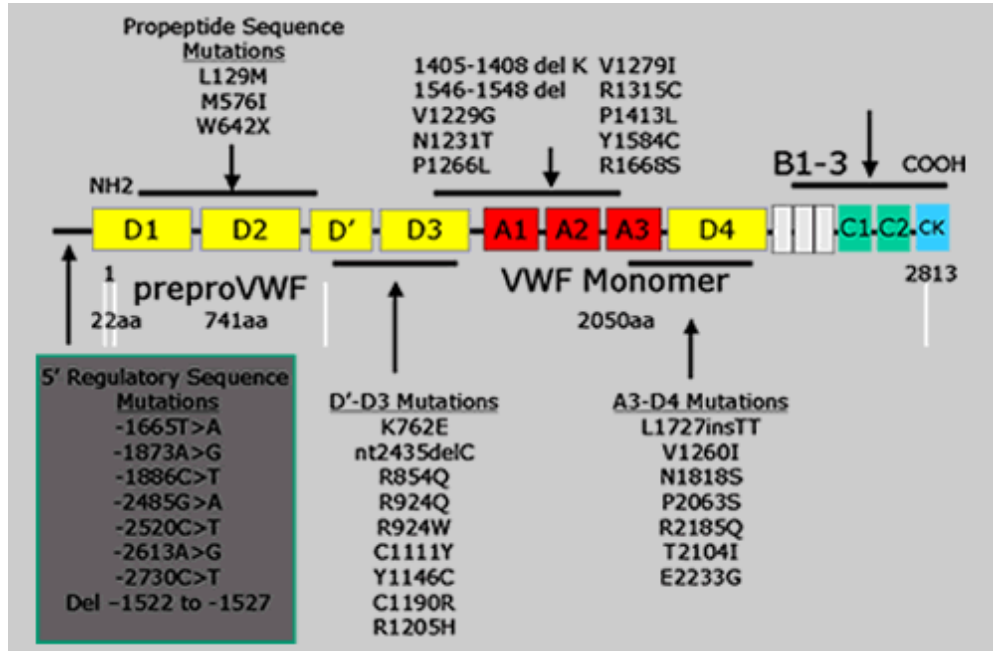
Şekil1.5- VWF Geninin Ekzon Büyüklükleri (ISTH-SSC VWF Online Database; 2007)

VWF geni yüksek derecede polimorfiktir (Şekil 1.6). VWF veri tabanında 217 tane polimorfizm listelenmiştir. Bu polimorfizmlerin %34'ü VWF'geninin duplike olduğu pseudogen bölgesinde (ekzon 23–34) tespit edilmiştir. Gen ve pseudogen arasındaki rekombinasyon sonucu bu bölgede yüksek derecede polimorfizm görülmüştür.

Örneğin Tip 1 hastalarında sıkça görülen c. 2771 G>A polimorfizm için yapılan bir çalışmada 148 hasta ve 115 normal bireyle çalışma yapılmış ve sonuçta bu polimorfizm için tek başına bir anlam ifade etmediği görülmüş. Bunun yanı sıra c.2771 G>A değişimi ikinci bir mutasyonla birlikte görüldüğünde VWF ve FVIII kandaki seviyelerinin belirgin oranda düşmesine sebep olduğu görülmüştür (Hickson ve diğ. 2010).

## 1.6-Von Willebrand Hastalığı

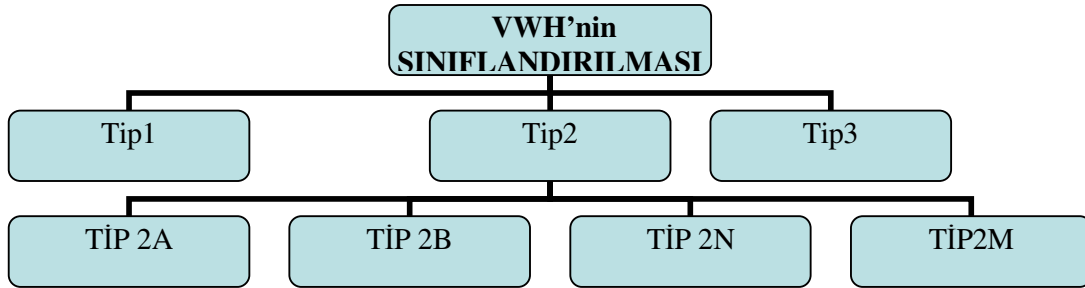
Von Willebrand Hastalığı (VWH), VWF'nin plazma düzeyinin düşmesi veya VWF fonksiyon kaybı ile gelişen ve dünyada en sık rastlanan kalıtsal kanamalı bozukluktur. Hastalık ilk kez 1926'da Finlandiya'daki Föglö adasında yaşayan bir ailede ortaya çıkmasıyla patofizyolojisi araştırılmaya başlanmıştır. Eric Von Willebrand ailede ciddi herediter kanamalar olmasından dolayı hastalığa başta pseudohemofili demiştir. Böyle demesinin sebebi de Hemofili A, X kromozomuna bağlı olarak geçiş gösteren hastalık olduğundan, bu hastalıkta hasta bireyin cinsiyeti erkektir. Ancak bu aileyi incelediğinde hastalığın bayanlarda da olduğunu görmüş ve genetik geçişin otozomal dominant özellikte olduğu görülmüştür (Ginsburg ve Bowie, 1992).



Şekil 1.6- En Sık Görülen Mutasyonların Gen Üzerindeki Dağılımı (<http://clinlabs.path.queensu.ca/queens/labs/lillicrap/images/ri1-2.gif>)

VWH, tipik olarak hafif veya orta şiddette 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 2000). Kanamanın şiddeti VWF'nin düzeyine ve fonksiyon bozukluğu olup olmadığına göre farklılık gösterir. VWF'nin düzeyi çok düşük olan veya fonksiyonlarında ciddi bozukluk olan hastalarda kanama semptomları daha ciddi olup erken çocukluk çağında başlarken, hafif tipler ancak mukozal yüzeylelerdeki travmatik girişimlerde (tonsillektomi, diş çekimi, küretaj) veya menarşta kendini belli ederler. VWF düzeyinin  $< \%1$ , FVIII düzeyinin  $< \%5$  olduğu ağır (Tip 3) VWH da ise ciddi mukozal kanamalara ek olarak hemofilide olduğu gibi eklem ve kas içi kanamaları da görülür. Bazı hastalarda gastrointestinal sistemde gelişen anjiodisplaji nedeni ile yaşamı tehdit eden ve faktör tedavisi ile durdurulamayan GIS kanamaları görülebilir. VWH'nin çocukluk çağındaki en önemli ve çoğunlukla tek semptomu burun kanamasıdır. Yaş ilerledikçe, VWF düzeyindeki artmanın da etkisiyle burun kanamalarının şiddeti azalır veya tamamen kaybolur (Italian Working Group 1977).

Otozomal bir hastalık olmasına rağmen VWH'nin, VWF molekülündeki bozukluğun tipine göre değişen klinik ve laboratuvar özelliklerine sahip olan ve genetik geçişi birbirinden farklılık gösteren farklı tipleri vardır (Şekil 1.7). Sadler bu farklı tipleri VWF'nin nitelik ve niceliksel değişikliklerine göre 3 ana grupta toplamıştır (Sadler 1994).



Tablo 1.2. VWH sınıflandırılması

VWF'nin plazmada eksik olması Tip 3 VWH, VWF'nin plazma düzeyinde düşüş olması Tip 1 VWH ve VWF fonksiyon eksikliği ise Tip 2VWH olarak tanımlanmıştır. Tip 2 VWH kendi arasında Tip 2A, Tip 2B, Tip 2M ve Tip 2N olarak dört alt gruba ayrılır.

Bu tiplendirmenin dışında kalan; hipotiroidi, otoimmün hastalıklar, solid tümörler, lenfoproliferatif ve myeloproliferatif hastalıklar, konjenital kalp hastalıkları ve enfeksiyonlar gibi birçok hastalık seyri veya öncesinde gelişebildiği gibi altta yatan bir hastalık olmaksızın da ortaya çıkabilen bir de Edinsel VWH (Edinsel Von Willebrand Sendromu–EvWS) vardır. EvWS'nin tipi, klinik seyri ve kanama semptomlarının şiddeti altta yatan hastalığa göre farklılık gösterir. Hipotiroidideki EvWS, sentez azalmasına bağlı olup DDAVP'ye iyi yanıt verir ve hipotiroidi tedavisi ile düzelir. Wilms tümöründeki EvWS nin nedeni ise VWF'nin tümör hücresindeki hiyaluronik asite bağlanmasıdır, antikor yoktur, tip 1 ve tip 3 VWH belirtileri verir. Otoimmün hastalıklara ikincil EvWS'de, VWF aktivitesini inhibe eden antikor vardır; tip 1, tip 2 veya tip 3 şeklinde olabilir.

Bu farklı tiplerinin ayırt edilmesi genetik danışma ve farklı tedavi gereksinimleri yönlerinden önemlidir.

### 1.6.1. Laboratuvar Bulguları

VWH'nin klinik tanısında kullanılan laboratuvar testleri, kanama zamanı ölçülmesi, VWF:Ag düzeyinin belirlenmesi, VWF:RCOF, FVIII:C ve VWF:RIPA belirlenmesidir ve multimer yapısının analizidir (Federici and Canciani; 2009)

**Kanama zamanı:** Bu test,duyarlılığının ve özgüllüğünün az olması nedeni ile büyük ölçüde terk edilmiştir. Bunun yerine **PFA-100** (Platelet Function Analyser-100) testi tercih edilmektedir.. PFA-100, kanama zamanına göre VWH için daha duyarlı olmakla birlikte, platelet fonksiyon bozukluklarında da uzadığından özgüllüğü düşüktür.

**VWF düzeyi:** VWF'ye karşı antikor kullanılarak ELISA ve turbidometrik yöntemlerle ölçülür. Otomatik koagülasyon analizörlerinde kullanılan turbidometrik yöntemler, romatoid faktörlere bağlı olarak yanlış sonuç verebilir.

**RcoF:** Bu test VWF'nin plateletlerin GpIb reseptörüne bağlanma kapasitesini ölçer. VWF'nin platelete bağlanmasını sağlayan bir antibiyotik olan ristosetin normal plateletlere eklendiğinde aglutinasyon ortaya çıkar. RcoF testinde yıkanmış ve fikse edilmiş normal plateletler üzerine 1.2 mg/ml yoğunlukta ristosetin ve hasta plazma dilüsyonları eklenir, oluşan aglutinasyon lam üzerinde çıplak gözle veya aggregometrede ölçülür.

VWF aktivitesi, VWF'nin kollajene bağlanma fonksiyonunu gösteren ELISA yöntemi ile de ölçülebilmektedir (collagen binding activity – CBA). CBA testi, RcoF'e göre daha iyi standardize edilmiştir.

**FVIII aktivitesi:** VWF düzeyi çok düşük veya FVIII bağlama fonksiyonu bozuk değilse FVIII düzeyinde önemli azalma olmaz.

**RİPA:** Bu test VWF'nin GpIb'ye bağlanmasının artmış olduğu Tip 2B VWH tanısı için gereklidir. Standart platelet agregasyon testinde kullanılan 1.2 mg/ml yoğunluklu ristosetinle agregasyon testi yapıldıktan sonra ristosetin yoğunluğu her seferinde 0.2 mg/ml azaltılarak normalde agregasyon oluşturmeyen düşük yoğunlukta agregasyon olup olmadığı aranır. Normal bireyler 0.6 mg/ml ristosetiinle agregasyon göstermezken Tip 2B VWH'lı hastalarda bu doz ile agregasyon görülür.

**Multimer Analizi:** Bu test SDS agar jel elektroforezi ile büyük VWF multimerlerinin bulunup bulunmadığını ve multimer bantlarında yapısal anormalliklerin olup olmadığını araştırmak için yapılır.

VWH'nin klasik laboratuvar bulguları şunlardır:

- (1) Kanama zamanında uzama,
- (2) VWF düzeyinde (VWF:Ag) azalma,
- (3) VWF ristosetin kofaktor aktivitesinde (RcoF) azalma,
- (4) FVIII koagulan aktivitesinde (FVIII) azalma,
- (5) Ristosetin ile platelet agregasyonunda (RIPA) azalma veya artma

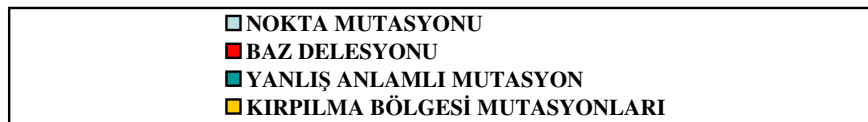
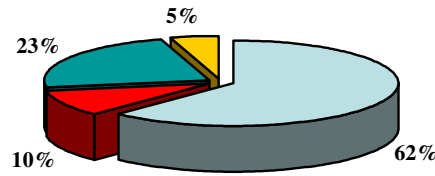
### **1.6.2. VWH'nin Görülme Sıklığı**

VWH en sık görülen kalıtsal kanamalı bir hastalıktır. Toplum taraması ile elde edilen insidans rakamları %1 dolayındadır. Bu şekilde saptanılan olguların ancak %10'unda kanama semptomu bulunmaktadır. Buna karşılık, kanama semptomu ile sağlık kuruluşlarına başvuran hastaların sıklığı 35-100/ milyon arasında olup bazı İskandinav ülkelerinde 200/ milyona kadar çıkar. Hastalığın ağır kanama eğilimi ile karakterize tipinin sıklığı 1-5: milyon olarak hesaplanmaktadır.

### 1.6.3. Hastalığın Tipleri

**Tip 1 VWH:** Tüm olguların % 75-80'ini oluşturan tip 1 VWH otozomal dominant kalıtımla geçer. mutasyonların çoğunluğu nokta mutasyonudur (Şekil 1.7). Yapısal bir bozukluğu olmayan (multimerik yapısı normal) VWF'nin plazma düzeyi ortalama % 50'nin altına inmiştir. Rcof ve FVIII düzeylerinde de VWF ile orantılı azalma vardır. Bu tipe neden olan genetik defektler tam olarak aydınlatılamamış olmakla beraber, bilinen mutasyonların bazıları VWF'nin endotel hücresi içinde retansiyonuna neden olmakta, bazıları multimer oluşumunu engellemekte veya molekülün dolaşımdaki yarı ömrünü kısaltmaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada R1205H ve C1130F mutasyonları VWF'nin yarı ömrünü kısalttığı görülmüş. Hamile bayanlarda yapılan bu çalışmada kısa süreli desmopressin kullanımıyla kısa zamanda FVIII ve VWF düzeylerinde hafif artış saptanmıştır (Castaman ve diğ. 2010). Tip1 VWH'larında bulunan mutasyonlar genin promotör bölgesinde ve tüm gene yayılmış mutasyonlardır. Bunların dışında Türk populasyonunda görülen ve tip1 VWH ile ilişkilendirilebilen 3 tane nonsense 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 (Abuzenadah ve diğ. 1999). Tablo 1.2'de Tip 1 VWH'da en sık görülen mutasyon tipleri verilmiştir.

Tip 1 VWH'larında en sık mutasyonlardan olan C1149R( G3389>T) ve C1130F (3445 T>C) mutasyonları benzer fenotip özellikleri gösteren dominant negatif etkili antimorfik mutasyonlardır. C1130F mutasyonu VWF'nin D3 domainini etkilerken C1149R mutasyonu VWF'nin multimer oluşumu sırasında görev yapan sisteinler arasındaki disülfid bağlarını etkilerler. Aynı zamanda resesif Tip3 VWH'lariylada ilişkilendirilmiştir (Eikenboom ve diğ. 1998).



Şekil 1.7 - Tip 1 Hastalarında Görülen En Sık mutasyonlar

**Tip2A** : Tip 2 olguların %15-20'sini oluşturur ve dominant kalıtımla geçer. Mutasyonlar yanlış aminoasit şifreleme (missense) tipinde olup çoğu molekülün proteazla kırılma yerinin bulunduğu A2 bölgesinin 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 sınıfına girmesi gereken C1272G, R1308H, C1458Y 3 farklı mutasyon bulunmuştur. Tip 2A mutasyonları grup 1 ve grup 2 diye ikiye ayrılır. Grup 1 mutasyonları normal VWF multimerlerinin hasar görmesi sonucu yüksek molekül ağırlıklı multimerlerin birikmesi sonucu oluşur. Grup 2 mutasyonları ise plazmadaki yüksek molekül 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.

**Tip 2B:** Tüm Olguların %5 ini oluşturan bu tipte genetik mutasyonlar VWF molekülünün GPIb ye bağlanma yerinde (A1 bölgesi) öyle bir yapısal değişime yol açar ki VWF dolaşımdaki trombositlere herhangi bir uyarı olmadan kendiliğinden bağlanır ve in vivo trombosit agregatları oluşur. Platelet büyük multimer kompleksleri fagosite edilip dolaşımdan uzaklaştırıldığı için trombositopeni ve büyük multimerlerde azalma görülür. Kanamanın nedeni büyük multimerlerin kaybı ve trombositopenidir. TİP VWH'de ekzon 28'nin anterior bölgesinde birçok nokta mutasyonları tanımlanmıştır. Von Willebrand veri bankasında tip 2B için kabul edilmiş 54 mutasyon bulunmaktadır. Bu mutasyonlardan R1306W, R1308C, V1316M, VE R1314Q A1 bölgesinde değişime neden olmalarına rağmen Tip2A fenotipi göstermektedirler. (Meyer ve diğ. 1997).

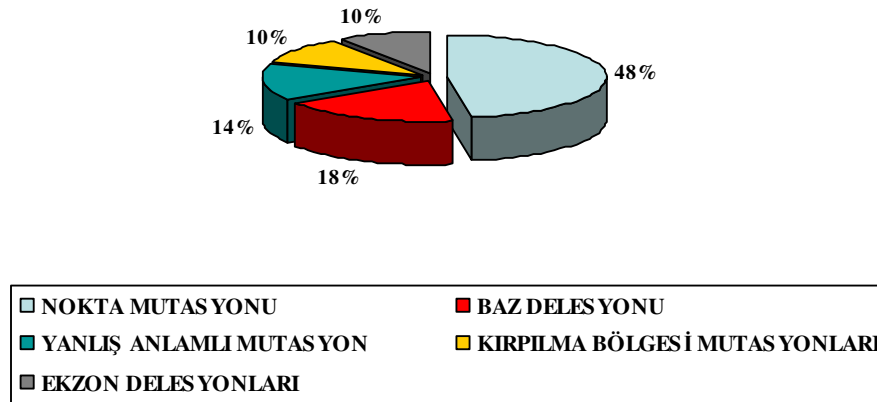
**Tip 2M:** Çok ender görülen bu tipte, büyük multimerler normal olmasına rağmen VWF'nün platelete veya endotel altı dokuya bağlanması azalmıştır. Multimer analizinde bantlarda migrasyon anomalisi veya çok büyük multimerlerde artış (Vicenza tipi) gösteren alt tipleri de tanımlanmıştır (Sztukowska ve diğ. 2008). VWF molekülünün A1 bölgesinin C terminali tarafında missense mutasyonlar, nadir olarak gen delesyonu bildirilmiştir. Klinik ve laboratuvar olarak tip 2A'ya benzer, ancak multimer analizi ile ondan ayırt edilebilir

**Tip 2N:** VWF'nin FVIII:C e bağlanmasında azalma ile karakterize bu tip otozomal resesif geçer. Bu olgularda VWF'nin FVIII:C bağlanma bölgesi olan D' - D3 bölgesinde yanlış anlamlı mutasyonlar saptanır. VWF ve Rcof düzeyleri ile multimer dağılımı normal, FVIII düzeyi ise homozigotlarda hafif veya orta hemofilideki gibi düşüktür (%10-20 arası) . FVIII:VWF oranı <0.7'dir. VWF'nin GPIb'ye bağlanmasında bozukluk olmadığından, mukozal kanamalar yerine hemofilideki gibi yalnız eklem kas içi kanamaları görülür. Aile içinde hem kız hem erkek çocuklarda hemofili tablosu bulunması ile dikkat çeker. Kesin tanı için, hastanın VWF'nin FVIII bağlanmasında azalma oluşunun gösterilmesi gerekir.

**Tip 3 (ağır) VWH:** Otozomal resesif geçiş gösteren bu tipin homozigotlarında VWF düzeyi ölçülemeyecek kadar düşük (<1 U/dl), FVIII :C düzeyi % -10'u arasında, kanama zamanı >20'dır. Klinik olarak şiddetli mukozal kanamalar yanında hemofiliye benzer kas iskelet kanamaları da görülür. Heterozigotlarda VWF düzeyi normal veya normalin alt sınırında olup genellikle asemptomatikler, ender olarak hafif şiddette kanama semptomu gösterirler. Semptomlu tip 3 VWH taşıyıcılarının tip 1 VWH'den ayırdedilmeleri 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 (Şekil 1.8).

Bunun dışın da 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 (Şekil 1.9).

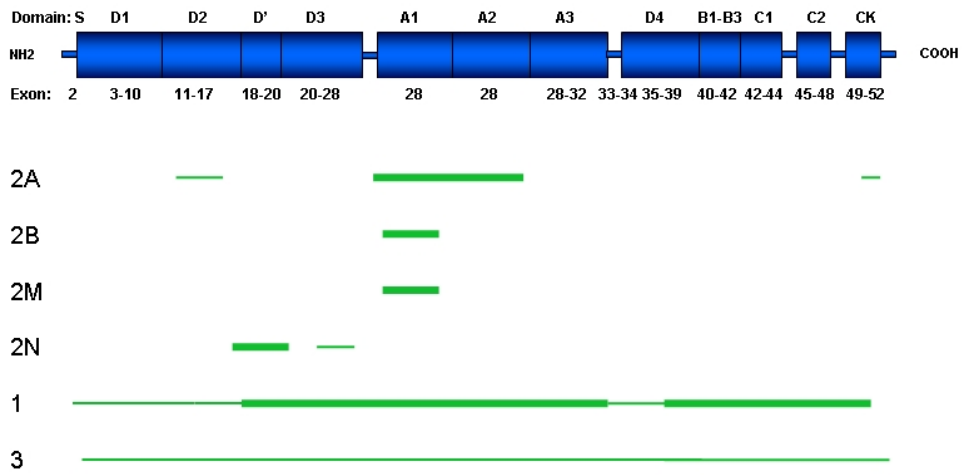


Şekil 1.8. Tip 3 Hastalarında Görülen En Sık Mutasyonlar

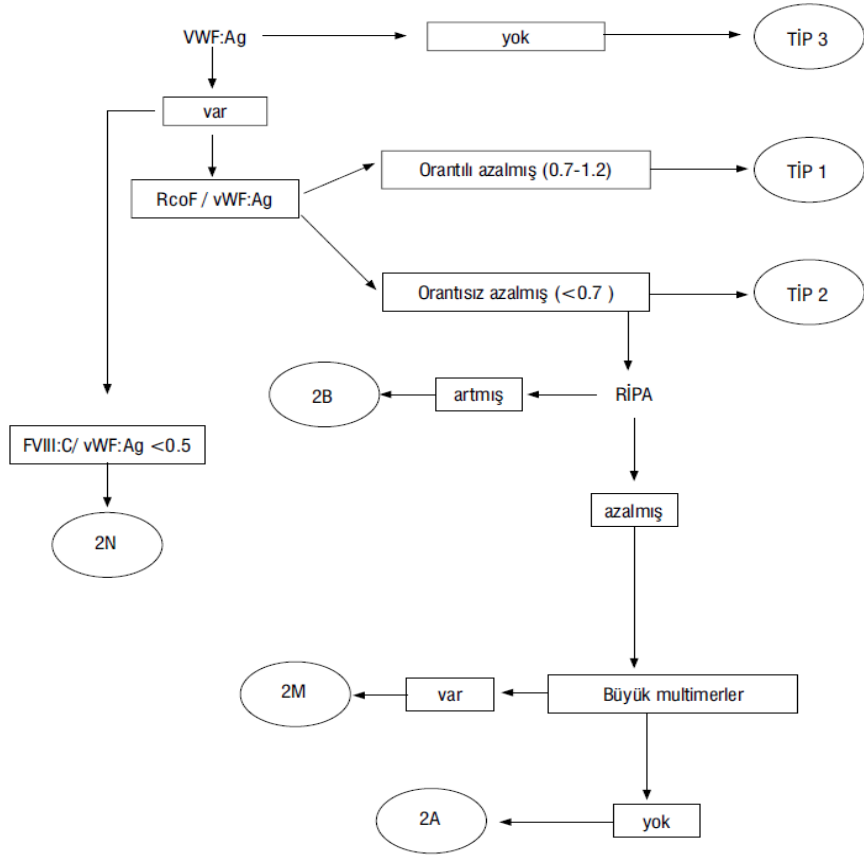


Tip 3 hastalarında meydana gelen mutasyonlar ve delesyonlar incelendiğinde genelde mutasyonların birleşik heterozigot olduğu görülmüştür.

VWH tanısı için en az VWF, Rcof ve FVIII testlerinin üçünün birlikte yapılması gerekir, kesin tanı için bu testlere ek olarak kanama zamanı veya PFA-100 ile RİPA testlerinin de eklenmesi gerekir. Multimer analizi ve FVIII bağlama testleri ancak koagulyasyonda uzmanlaşmış laboratuvarlarda yapılmaktadır (Şekil 1.10). Hastalığın farklı tiplerinin ayırt ettirici klinik ve laboratuvar özellikleri Tablo 1.3’de gösterilmiştir.



Şekil 1.9 Hastalık Tiplerinde Ortaya Çıkan Mutasyonların Gendeki Dağılımı (Goodeve A.C. ve Paulo J. 2009)



Şekil 1.11. Tanı testlerinin seçimi (Gürsel T; 2009)

Tablo 1.3. VWH Tiplerinin Laboratuvar Özellikleri

Tip	Genetik geçiş	Sıklık (%)	FVIII %	VWF	Rcof	RİPA	Multimerik yapı
Tip1	Otozomal dominant	60-70	Azalmış	Azalmış	Azalmış	Azalmış/ Normal	Normal
Tip3	Otozomal resesif	5-25	3-5U	Ölçülebilir düzeyin altında	Ölçülebilir düzeyin altında	Cevap yok	Görülmez
Tip2A	Çoğunlukla Otozomal dominant	10-15	Azalmış/ Normal	Azalmış/ Normal	Çok azalmış	Çok azalmış	Büyük multimerler
Tip2B	Otozomal dominant	2	Azalmış/ Normal	Çoğunlukla azalmış	Azalmış/ Normal	Çok azalmış	En büyük multimer eksik
Tip2M	Otozomal dominant	2	Değişken azalma	Değişken azalma	Azalmış	Değişken azalma	Normal
Tip2N	Otozomal resesif	2	Azalmış	Normal	Normal	Normal	Normal
Psödo-VWH	Otozomal dominant	Ender	Azalmış/ Normal	Azalmış/ Normal	Azalmış/ Normal	Artmış	En büyük multimer eksik

## 2. AMAÇ

VWH dünyada en sık görülen kalıtsal kanamalı bir hastalıktır. Hastalık klinik olarak heterojen bir hastalıktır ve hastalığın moleküler patogenezinin bilinmesi hastalığın doğru tanı ve tedavisi için büyük önem taşımaktadır. Hastalığın tanısı VWF:Ag VWF:Rcof oranı ve FVIII:C testi ve multimer analizi ile yapılabilmektedir. Öte yandan laboratuvar testleri ile klinik tanı mümkün olabilse de testlerde düşük tekrarlanabilirlik olması, eksik penetrans olması, VWF düzeyinin çevresel ve genetik nedenlerle değişebiliyor olması ve o merkezde multimer analizi yapılamıyorsa hastalığın klinik tanısını zorlaştırmaktadır. Hasta da mutasyonun bilinmesi hastaya doğru tanı konulmasında ve doğru tedavinin uygulanmasında yardımcı olacaktır.

Türkiye’de de yüksek sıklıkla (0.7 %) görülmesine rağmen Türk hastalarında VWH’nin moleküler analizi bugüne kadar yurt dışındaki merkezlerde yapılmıştır. Gen çok büyük olduğundan tümünü mutasyon yönünden taramak güç ve zahmetli bir iştir. Genin yapısının karmaşık olması, eksik penetrans olması hastalığın klinik tanısını zorlaştırmaktadır.

Öte yandan VWF geninde VWF hastalığına sebep olan mutasyonların belirlenmesi kesin lokalizasyonlarının ve identifikasyonlarının yapılabilmesi VWF proteinin fonksiyonlarının anlaşılmasını kolaylaştıracaktır.

VWF gen analizinin yapılması hastalığın tiplendirilmesi ve tiplendirilen hastaların tedavi edilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmanın amacı Türkiye’de VWF gen analizi için moleküler yöntemlerinin oluşturulması ve Türk Tip 1 ve Tip 3 VWH hastalarında VWF genetik tanı yapılmasıdır.

### 3. MATERYAL

Bu çalışmada toplam 8 Tip 1 ve 8 Tip 3 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.

#### 3.1. Cihazlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.1’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Otoklav:	Dik tip otoklav (BES, TÜRKİYE)
Tartılar:	Hassas Terazi, XB 220 A (Presica, İsviçre) Terazi, KB 400-2 (KERN, ALMANYA)
Santrifüjler:	Mikrosantrifüj, MiniSpin Plus (Eppendorf, ALMANYA)
Derin Dondurucular:	-20 °C, 2021 D (Arçelik, TÜRKİYE)
Dokümantasyon Sistemleri:	Bio-RAD Üniversal Hood II (Bio-RAD, İTALYA)
Yatay Elektroforez Sistemleri:	Flowgen (İNGİLTERE) Sub-Cell GT (Bio-RAD, İTALYA)
Vortex	Heidolph REAX (ALMANYA)
PZR Cihazı	Thermo Scientific Hypoid PX2 Thermal Cyclers
Dizi Analizi Cihazı	Applied Biosystem 3130 XL

### 3.2. Kimyasallar

Bu çalışmada kullanılan tüm katı ve sıvı kimyasallar moleküler biyoloji kalitesindedir ve aksi belirtilmediği sürece marka olarak Sigma (ABD) veya Merck (ALMANYA) tercih edilmiştir.

Kan örneklerinden DNA izolasyonu amacı ile PureLINK Genomic DNA Kit'i (Invitrogen, ABD) kullanıcı manuelinde belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ve agaroz jel elektroforezi için kullanılan kimyasallar Tablo 3.2'de gösterilmiştir. VWF genin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri Tablo 3.3'de verilmiştir. 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.

Tablo 3.2. PZR ve Agaroz Jel Elektroforezinde kullanılan kimyasallar.

PZR	Go Taq (Promega, ABD)
	5X MgCl <sub>2</sub> 'siz PZR Tamponu
	25mM MgCl <sub>2</sub> solüsyonu
	dATP, dCTP, dGTP ve dTTP, 100mM, (Fermentas, LİTVANA)
	Dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma, ABD)
Agaroz jel elektroforezi	0,5 X TBE tamponunda hazırlanmış % 1 veya % 2'lik Agaroz Jel
	Etidyum Bromür (EtBr)
	GeneRuler 100 bp DNA markörü (Fermentas, LİTVANYA)

Tablo 3.3. VWF Geni Primer Listesi

Ekzon	Primer Dizisi 5' – 3'
1F	AAGACCAGGGATCAAGTGTG
1R	ATCAGTCAGTCCTGCATCTTC
2 F	CCTGGGACTGCTGTCTGTG
2 R	CAGTTCTGTGCCACCTTTATG
3 F	TTCTATCAGAGGCAGTCTAAT
3 R	CCTTCCACTCAGACACTGT
4 F	TGGGGCGTTTTCTGCTGAG
4 R	AGGCATAGGGCATGGAGAC
5 F	TCTCCCGATTGCTGATCTA
5 R	TCAGCTTTGAGGAGCTCTA
6 F	GTTCTGGGACAGGCATAAC
6 R	GAAATGGCCCTGCGTAAGT
7 F	ACTCAGGGAGACACTAACGGA
7 R	AAAACCGCAACTGCCAAGA
8 F	TGGCATGGCTGGTGAGATGAT
8R	GTGCTGGCAAGGTCTCTGA
9 F	ACACCACAGAACAAGTTCT
9 R	ACCAGTAGCCTCCAACCTCA
10 F	GAGCTCTAAATCCATTTGCATA
10 R	AACTTCTCGCTGCCTTGAGT
11 F	TAGACTGGTTTGGGAAAGGA
11 R	GAGCTAACTGAAGTCTGGA
12 F	TTGAGGCCTTTCTCTGATTAA
12 R	TGCTAAGGGATGGGCTGTG
13 F	GCTACCATCCTTTTGAGACAC
13 R	CACCACACAAAGCCATTCTAC
14 R	CCATCTCATTAGCTAAACAAC
14 F	GAGCACTGCCTCCGGAAC
15 F	CTATTAGCAGCACTGGGCT
15 R	GTGCTGAACGAACACTAGGT
16 F	TTGGGGGTACAGCTACAA
16 R	CCGTTTTCCTCCCCAGCTC
17 F	CATTGGTAACGTTAGCAAGCT
17 R	ATTCCACACGTGAGGAATCT
18 F	GGTCCATTATCTCCTTCACT
18 R	CCTGCCTACAAGAAAACCT
19 F	AGGGCTTTAGATCAGTCACTGTGGCCCT
19 R	TGGCCGCGTGCACCCTCACTCCACC
20 F	CTGTGTTCCCTCATTGCCTC
20 R	ACTCCAGTAGAAACCAGACC
21 F	GTA CTCAAAGGCCTGTGATGA
21 R	CATTCACACGAGCTCTAAATG
22 F	GGAGGGAGGATCTGGCTGTC
22 R	GGGAGCAGAAAACACTCCAA
23 F	TTCCCTTTCCCTGAGCCG
24R	ACTCTGTGTCCATACCACCA
25 F	AGAGTCTAGGCCCTATTGTC
25 R	ATGCAGTCCCTACTAACACT
26 F	GGTGACGCCCATAGTCCCC
26 R	TTCAATACAACATTCCCCAC
27 F	AGAGATGCTCCTTGAGTGAT
27 R	TACCCAAAACCTAGTCTCTA
28-1F	GTGTCCACAGGTTCTTC
28-1R	CGTTGCACGATTTCTACTGC
28-2F	GGACATCTCGGAACCGCC
28-2R	ATTGCCAGCCAGGTGAAGTA

Tablo 3.3. (devam)

Ekzon	Primer Dizisi 5' – 3'
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
29 F	TAGGCCTGGTGGCCATTGT
29R	CAGCAGGTGACGAAGAGGCT
30F	GAGGCTCTTTTTGTGGCTCT
30R	GCTGGATGCAGAAGCTGCA
31 F	ATCCAAAAGTAACCCAGC
32 R	CAGCTCATTAATATCTGTTGA
32 F	CCCATGAACAGAACTTAAAG
33 R	GTTGGCATCATAATTATTAATAACT
34 F	CGCTGCCCTGGCTGGAGAA
35 F	CAGAGCCCCAGTTTCCTAA
35 R	CTGAGCCCCGAACAACATGAA
36 F	GTCAAGCTCTGTAAAGTCA
36 R	ATGGGCTCCGTTCTCATCA
37 F	GGCTCTGGATGCTTATAT
37 R	GCACAGAGAGGCTGAGCAA
38 F	TGCCCAGCCTAAAGTTCTGT
38 R	CTGGTGAACATATCTCCC
39 F	GAATTCTGGGCTTCGTACCT
39 R	CTAGTAGGAGTTCTGTACGGT
40 F	GAATTCTGGGCTTCGTACC
40 R	CTTACCCACCTCCTTTCAC
41 F	CAGTAGAAGTCTGCATGAATA
41 R	GGATGGGCAGAAATAAAGATT
42 F	GCACCCTATAGCATAGCTGA
42 R	CTTAGTACATAGTAGGCTCAC
43 F	TGCATATGGGCGGAGACCA
43 R	GGCGACAGAGCGAGTCTC
44 F	GAAAATGCCAGACCAGTGAT
44 R	ATGAAACCAAGTCAACGCTG
45 F	AGACGAGCCCCACTCATC
45 R	AAAGGTGGTGGCCGGTCC
46 F	GGAAAGGGCCGACCGATAC
46 R	GGCCAGGAAGTGAGTGTGA
47 F	GGAAGGCAGTGGGCCATAGGA
47 R	TCCCACACGCGTCCAGTC
48 F	GAATTCTAGGTGAAACTACTG
48 R	GGAAGCAAGATGGTGATATGT
49 F	ACACTTCTCTTGTTTCATG
49 R	CTCATGGTTTGAAGTGGCTTT
50 F	TGCAAAGAGCCCCTGGACTTG
51 F	GACCTATTTCCAGCCCAGT
51 R	CTGATCTCACCCAGAAGCA
52 A F	TTGGAGGGGGTCAGGGAGAA
52 A R	CTGCCACCGTTGCCATCTC
52 B F	ACCATGAGGTTCTCAATGCC
52 B R	AGTATCTCACACTGACACTGA



## 4. YÖNTEM

### 4.1. Periferik Kan Örneklerinden DNA İzolasyonu

Bu çalışmada hasta kan örneklerinden DNA izole etmek için DNA PureLink Genomic DNA Kits kullanılmıştır. Kitin çalışması kaotropik tuz varlığında DNA'nın proteinlerden ayrılarak silika bazlı membrana bağlanarak izole edilmesi prensibine dayanır. DNA'nın izolasyonu kitin kullanma protokolüne uygun olarak aşağıda belirtilen koşullarda gerçekleştirilmiştir: 200 µl kan 20 µl Proteinaz K ile 2 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 200 µl PureLink Genomic Lysis/Binding Buffer eklenip vortekslenir. Daha sonra proteinleri parçalamak için 10 dakika 55 °C'de inkübe edilir. Elde edilen karışıma 200 µl % 100 etanol eklenir ve 5 saniye vortekslenir. Daha sonra, karışım kit tarafından sağlanan Spin Kolonlarına alınır ve 10.000 x g'de oda ısısında 1 dakika santrifüjlenir. Spin kolonlar yeni bir tüpe alınarak 500 µl yıkama tamponu 1 eklenir ve 10.000 x g'de oda ısısında 1 dakika santrifüjlenir. Kolonlara 500 µl yıkama tamponu 2 eklenerek oda ısısında 3 dakika maksimum hızda santrifüjlenir. Spin kolonlar 1.5 ml'lik yeni mikrosantrifüj tüplerine alınır ve 100 µl elüsyon tamponu eklenir ve 1 dakika oda ısısında inkübe edildikten sonra 1 dakika oda ısısında maksimum hızda santrifüjlenir. Elde edilen saf DNAlar -20 °C'de saklanmıştır.

### 4.2. DNA'nın Nitel Ve Nicel Analizi

Hasta kanından izole edilen genomik DNA 0.5X TEB tampon çözeltisi içinde %1 konsantrasyonunda Agaroz jel analizi ile incelenmiştir. DNA'nın 260 nm ultra viyole ışığı altında görülebilmesi için etidyum bromid (EtBr) kullanılmıştır. EtBr, son konsantrasyona 0,5 mg/ml olacak şekilde ve degradasyonunu önlemek amacı ile jel solüsyonu 50°C'ye soğutulduktan sonra konulmuştur. Solüsyon jel kabına dökülür, taraklar yerleştirilir ve jelin polimerize olması için beklenir.

Çözünmüş DNA'nın tam konsantrasyonu ve saflığı spektrofotometrik analiz ile saptanmıştır. DNA örneği damıtılmış su ile seyreltilip ve optik yoğunluğu 260 nm ( $A_{260}$ ) ve 280 nm'de ( $A_{280}$ ) okunmuştur. DNA konsantrasyonunun hesaplanmasında  $50\mu\text{g}$  çift zincirli DNA'nın 260 nm'deki absorbanasının 1.0 birim kabul edilerek aşağıdaki formül kullanılmıştır. Konsantrasyon ( $\mu\text{g/ml}$ )= seyreltme faktörü x  $A_{260}$  x  $50\mu\text{g/ml}$  DNA'nın saflığı  $A_{260}/A_{280}$  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)**

52 ekzondan oluşan VWF geni 60 PZR reaksiyonunda ekzon/ intron bağlantı bölgeleri ve ekzon bölgeleri halinde çoğaltılmıştır. Her bölgenin PZR işlemi için VWF gen spesifik primerler kullanılmıştır (Tablo 3.1). Her bölgenin PZR koşullarını tespit edebilmek için primer ve Mg titrasyonu yapılmıştır. Bazı bölgelerin PZR çoğaltılması için DMSO kullanılmıştır. Farklı primer bağlanma derecesi belirlenmesi için Gradient PZR yapılmıştır.

### **4.4. PZR Ürünü Saflaştırılması**

VWF PZR ampikonlarının DNA dizi analizi için direk DNA dizi analizi yöntemi kullanılmıştır. DNA dizi analizi öncesi elde edilen ampikonlar High Pure PCR Product Purification Kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. PZR purifikasyonu PZR sonrasında ortamda kalan primer, dNTP'ler ve taq enzimi artıklarının giderilmesi için yapılmıştır. 25ul PZR ürününe 125 ul bağlanma solusyonu (binding buffer) eklenir ve çok kısa vorteks yapılır. Karışım High Pure filtreli tüplere aktarılır ve en hızlı devirde 30-60 saniye santrifüj edilir. Supernatantı atarak filtre üzerine 125 ul yıkama solusyonu (wash buffer) eklenir, en hızlı devirde 30-60 saniye santrifüj edilir. Supernatantı atarak tekrar 100 ul yıkama solusyonu eklenir, en hızlı devirde 30-60 saniye santrifüj edilir. Supernatantı atarak filtreyi temiz bir 1,5 ml'lik tüpe geçirilir ve filtre üzerine 25-50 ul çözüldürücü solusyon (elution buffer) konarak birkaç dakika oda sıcaklığında bekletilir. Daha sonra en hızlı devirde 30-60 saniye santrifüj edilir. Purifiye edilmiş PZR ürünleri % 2'lik agaroz jelde yürütülerek PZR ürünlerinin bütünlüğü kontrol edildikten sonra DNA dizi analizi reaksiyonu yapılmıştır.

Tablo 4.1. Ekzonlara Göre PZR Koşulları

EKZONLAR	Mg (25mM)	DMSO(%1)	PRIMER (10uM)	SICAKLIK
1	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
2	3ul	0	1ul	59,5 <sup>0</sup> C
3	3ul	0	0.75ul	56,9 <sup>0</sup> C
4	2ul	0	0.75ul	56,9 <sup>0</sup> C
5	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
6	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
7	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
8	3ul	2, 5ul	1ul	60,9 <sup>0</sup> C
9	3ul	2, 5ul	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
11	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
13	2, 5ul	2, 5ul	1ul	55,8 <sup>0</sup> C
14	3ul	2, 5ul	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
15	3ul	2ul	1ul	62 <sup>0</sup> C
16	2,5ul	2ul	1ul	62 <sup>0</sup> C
17	2,5ul	2ul	1ul	62 <sup>0</sup> C
18	2,5ul	2ul	1ul	62 <sup>0</sup> C
19	3ul	2ul	1u	64,1 <sup>0</sup> C
20	3ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C
21	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C
22	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C
24	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C
25	2,5ul	2ul	1ul	58,2 <sup>0</sup> C
26	2,5ul	2ul	1ul	58,2 <sup>0</sup> C
27	2,5ul	2ul	1ul	60 <sup>0</sup> C
28_1	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C
28_2	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C
28_3	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C
28_4	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C
28_5	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C
28_6	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C
28_7	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C

Tablo 4.1. (devam)

EKZONLAR	Mg (25mM)	DMSO(%1)	PRIMER (10uM)	SICAKLIK
29	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C
30	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
31	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
32	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C
33	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C
34	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
35	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
36	2ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
37A	2ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
37B	2ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
38	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C
39	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C
40	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C
41	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C
42	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C
43	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C
44	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C
45	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C
46	3ul	0	1ul	59,5 <sup>0</sup> C
47	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C
48	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C
49	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C
50	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C
51	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C
52A	3ul	0	1ulu	62,4 <sup>0</sup> C
52B	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C

Tablo 4.2. VWF PZR için Thermal Cycler Programı

<b>VWF gen analizi için PZR Programı</b>	
Denaturasyon 94 °C ; 4 dakika	
Amplifikasyon 94 °C; 30 saniye	} 30 Döngü
A.T* ;30 saniye	
72°C; 45 saniye	
Uzama 72°C; 5 dakika	

\*A.T: Annealing Temperature: Primerin Bağlanma Sıcaklığı

#### 4.5.DNA Dizi Analizi

DNA örneğindeki nükleotidlerin tam dizisinin belirlendiği bir yöntemdir. Bu amaç için günümüzde uygulanan yöntem dideoxy metodudur. DNA, dört çeşit deoksiniükleotid trifosfatla sentezlenir. Her bir nükleotid 3' -OH ucundan bir sonraki nükleotide bağlanır. Dideoksi metoduyla sentetik oligonükleotid sentezinde 3' -OH molekülü kritik rol oynar. Sentez sırasında zincire bir dideoksiniükleotid eklenmesi zincir uzamasını sonlandırır. Çünkü 3. karbon atomundaki 3' -OH molekülünün oksijen atomu bulundurmaması zincirin uzamasına izin vermez. Bu nedenle metod aynı zamanda zincir sonlandırma (chain termination method ) olarak da adlandırılır.

Prosedür 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 dideoxynükleotidler vardır; ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP. DNA Polymerase I ise sentezde zincirin uzaması aşamasında gereklidir. Zincir uzaması esnasında normal nükleotidler sırayla eklenir; fakat DNA polimeraz normal deoxynükleotid yerine dideoxy nükleotid eklediği zaman zincirin uzaması sonlanır. Bu eklenme rastgele olduğu için değişik uzunluklarda milyonlarca fragment oluşur. Bu fragmentler aynı zamanda sonlandıkları noktada kendilerine özgü flouresan boya da taşımaktadırlar. PZR ile benzer yönleri olmasına rağmen farklı işlemlerdir. PZRde iki primer kullanılırken dizileme PZR'ında bir tane kullanılır (forvard ya da reverse primeri). Dideoksiniükleotid trifosfat (ddNTP)kullanılır

Tablo 4.3 -Dizi Analizi PZR Protokolü

2 ul	Big Dye Terminator v.3.1
2 ul	Big Dye Buffer
4 ul	0,8 mM primer (forvard yada reverse)
2 ul	Purifiye edilmiş PZR ürünü
10 ul	Distile su
20 ul	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	

#### 4.6.Dizi Analizi Purifikasyonu

Dizi analizi PZR programı bittiği gibi ürünleri dizileme cihazına yüklemeyen önce ikinci bir purifikasyon gerekmektedir. Dizi PZR purifikasyonu için Qiagen kitinin Dyex kiti kullanıldı. İçinde solusyonu hazır olan tüpler 3.000 rpm de 3 dakika santrifüj edildikten sonra alttaki supernatan atılır ve oluşan kolonlar filtreyle beraber yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarılır. PZR ürünleri pipet yardımıyla kolonların üstüne aktarıldıktan sonra tekrar 3.000 rpm de 3 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonunda dibe çöken purifiye PZR ürünü bekletilmeden cihaza yüklenmelidir.

## 5. SONUÇLAR

### 5.1 DNA İzolasyon Sonuçları

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bölümünden elde edilen 8 tane VWH Tip 1 ve 8 tane Tip 3 hastalarının periferik 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 genomic DNA'nin %1'lik agaroz jelde yürütülmesi

### 5.2. PZR Sonuçları

52 ekzonu olan VWF geni 60 farklı bölge halinde bölüm 4.3'de anlatıldığı gibi çalışılarak PZR ile çoğaltılmıştır (Şekil 5.2-5.6). Bu bölgeler arasında ekzon 10, 12 ve 23. bölgelerin PZR'ları elde edilememiş olup dolayısıyla bu bölgelerin dizi analizi yapılamamıştır. Bu üç ekzon için optimizasyon çalışmaları halen devam etmektedir. Elde edilen PZR ürün boyları Tablo 5.1'deki gibidir.

Tablo 5.1. PZR Koşulları ve Ekzonların Boyları

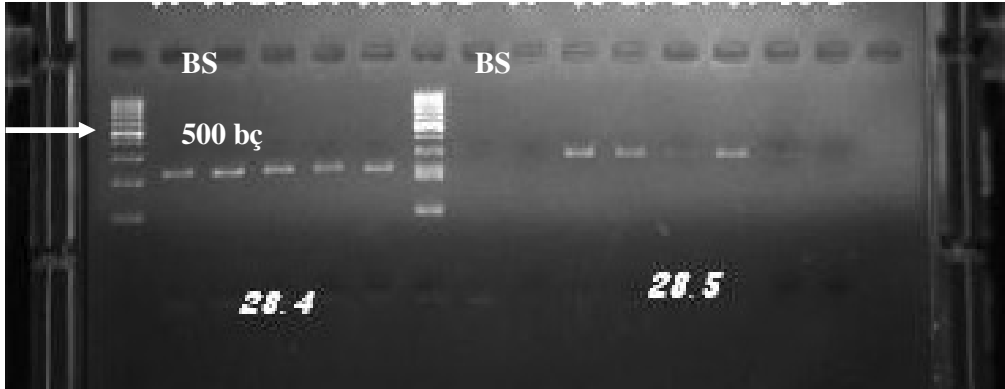
EKZONLAR	Mg CON.(25mM)	DMSO(%10)	PRIMER (10uM)	SICAKLIK	Bç
1	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	382
2	3ul	0	1ul	59,5 <sup>0</sup> C	184
3	3ul	0	0.75ul	56,9 <sup>0</sup> C	332
4	2ul	0	0.75ul	56,9 <sup>0</sup> C	277
5	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	351
6	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	249
7	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	323
8	3ul	2, 5	1ul	60,9 <sup>0</sup> C	236
9	3ul	2, 5	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	279
11	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	278
13	2, 5ul	2, 5	1ul	55,8 <sup>0</sup> C	280
14	3ul	2, 5	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	302
15	3ul	2	1ul	62 <sup>0</sup> C	365
16	2 ,5ul	2	1ul	62 <sup>0</sup> C	355
17	2,5ul	2	1ul	62 <sup>0</sup> C	308
18	2,5ul	2	1ul	62 <sup>0</sup> C	306
19	3ul	2	1ul	64,1 <sup>0</sup> C	285
20	3ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C	212
21	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C	230
22	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C	276
24	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C	286
25	2,5u	2	1ul	58,2 <sup>0</sup> C	304
26	2,5lu	2	1ul	58,2 <sup>0</sup> C	841
27	2 ,5lu	2	1ul	60 <sup>0</sup> C	260
28_1	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C	194
28_2	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C	267
28_3	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C	240
28_4	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C	218
28_5	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C	275
28_6	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C	327



EKZONLAR	Mg CON.(25mM)	DMSO(%10)	PRIMER (10uM)	SICAKLIK	Bç
28_7	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C	261
29	2,5ul	0	1ul	58 <sup>0</sup> C	270
30	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	278
31	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	238
32	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	300
33	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	300
34	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	295
35	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	364
36	2ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	311
37A	2ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	310
37B	2ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	240
38	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	220
39	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	329
40	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	260
41	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	215
42	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	280
43	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	353
44	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	273
45	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	265
46	3ul	0	1ul	59,5 <sup>0</sup> C	316
47	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C	210
48	3ul	0	1ul	56,9 <sup>0</sup> C	281
49	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C	221
50	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C	265
51	3ul	0	1ul	58,2 <sup>0</sup> C	194
52A	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	240
52B	3ul	0	1ul	62,4 <sup>0</sup> C	204



Şekil 5.2- 3 farklı hastada Ekzon 28.1 (194 bç), 28.2 (267 bç), 28,3 (240 bç) için PZR sonrası jel görüntüsü. BS:Moleküler Büyüklük Standartı



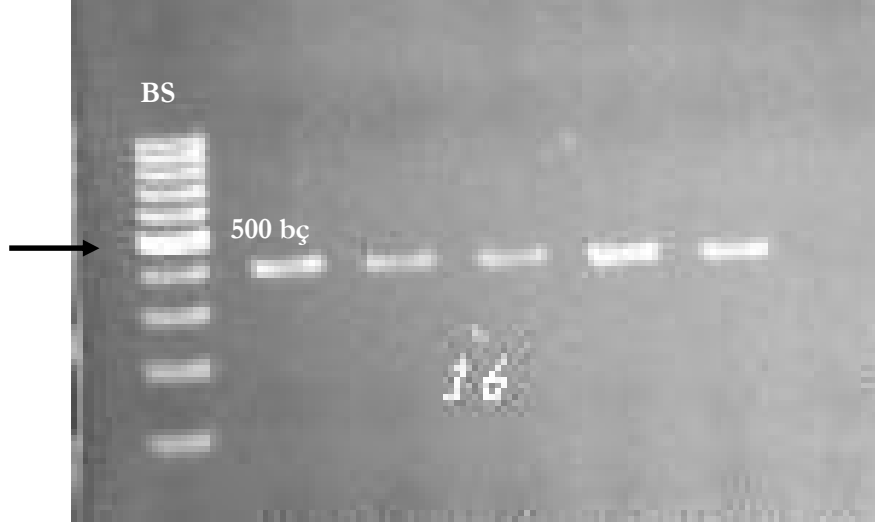
Şekil 5.3- 5 farklı hastada Ekzon 28.4(218) ve 28.5 (275 bç) için PZR sonrası jel görüntüsü



Şekil 5.4- Ekzon 47 için PZR sonrası jel görüntüsü

### 5.3.PZR Sonrası Purifikasyon

PZR sonrasında ürünlerin saflaştırılma işlemi Roche firmasının High Pure PZR Product Purification Kiti kullanılarak bölüm 7.4'de anlatıldığı gibi yapılmıştır. Purifiye edilen ürünler daha sonra %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek kontrol edilmiştir.



Şekil 5.5 - PZR purifikasyonu sonrası ekzon 16 (355 bç) PZR ürünlerinin görünümü



Şekil 5.6 - PZR purifikasyonu sonrası ekzon 1 (382 bç) PZR ürünlerinin görünümü

## 5.4. Dizi Analizi PZR

VWF geni ekzonlarının bir kısmı ileri (forward) primer ile, bir kısmı geri (reverse) primer ile ve diğer bir kısmı da hem ileri (forward) hem de geri (reverse) primer ile ekzon, ekzon-intron bağlantı bölgeleri dahil olmak üzere DNA dizi analizi yapılmıştır. Yapılan dizi analizi PZRının koşulları bölüm 4.5’de anlatıldığı gibidir.

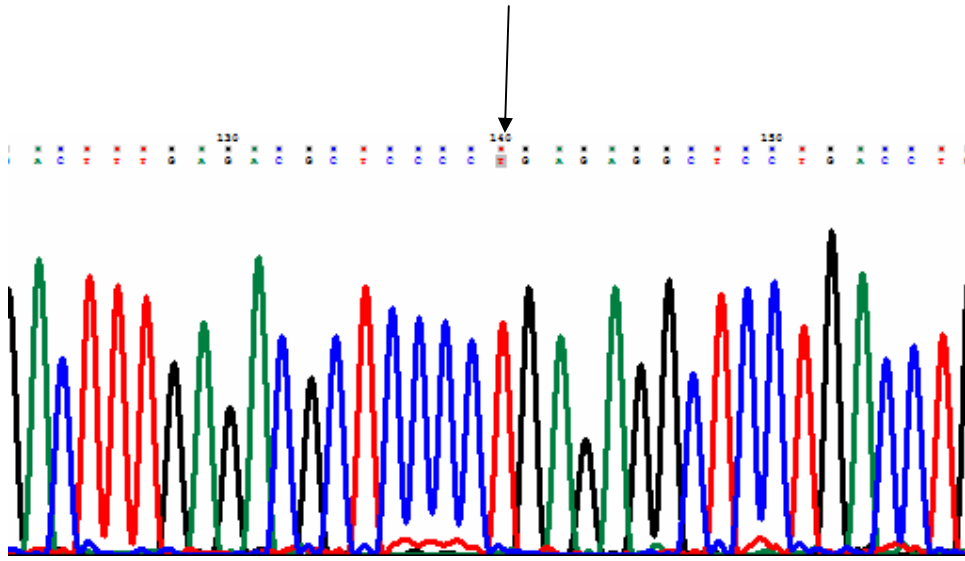
Bu tez kapsamında Tip 1 VWH tanısı konulan 8 hasta ve tip 3 VWH tanısı konulan 8 hasta ile çalışılmıştır. Bu hastalarda görülen mutasyon ve polimorfizmlerin listesi Tablo-5.2 ve 5.3’de verilmiştir.

Tablo 5.2- VWH Tip 3 Hastalarında Görülen Mutasyon ve Polimorfizmler

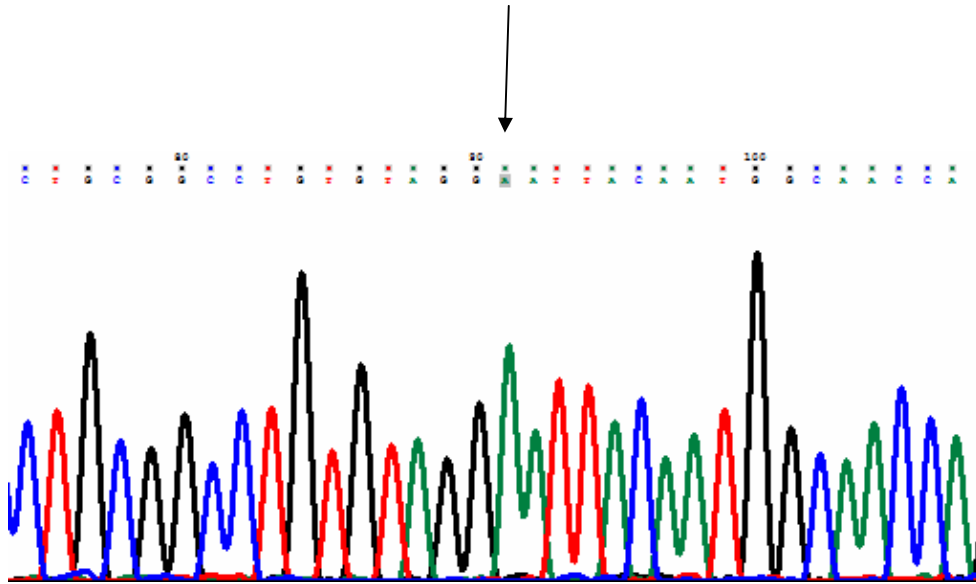
DNA NO	İncelenmeyen ekzonlar	MUTASYON	POLİMORFİZM
049	29,30,31,332,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52	Ekzon28; R1659X (Tanımlı Tip3 Mutasyonu)	p.D1472H,p.V1485L, p.V1500I, p.L1501(CTG>CTA), p.L1503(CTG>CCG), p.S1506L
025	12,16,18,23,25,2742,43,44,45,46,50	Ekzon 20; c.delC2641	p.T391,p.S394, p.D1472H, p.V1485L
044	8,9,10,12,15,18,23,26,29,46	Ekzon 14; p.G525R (YENİ)	p.D1472H,p.V1485L, p.V1500I, P.L1501(CTG>CTA), p.L1503(CTG>CCG), p.S1506L
037	8,10,12,14,15,16,18,20,23,25,27,29,33,35,38,40,41,42,4344,45,47,51,52		p.L1381, p.D1472H
036	10,12,15,18,20,23,25,27,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,43,44,49		p.L1381, p.D1472H
018	4,5,8,10,11,12,14,15,1618,20,23,25,27,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52		p.D1472H,p.V1485L,p.V1500I,p.L1501(CTG>CTA), p.L1503(CTG>CCG),p.S1506L
016	12,16,18,23,25,27,36,42,43,44,45,46		p.L1381,p.D1472H,V1485L, V1500I,L1501(CTG>CTA), L1503(CTG>CCG),S1506L
069	12,18,23		p.T391,p.S394,p.D1472H, p.V1485L,p.T1547

Tablo 5.3- VWH Tip 1 Hastalarında Görülen Mutasyon ve Polimorfizmler

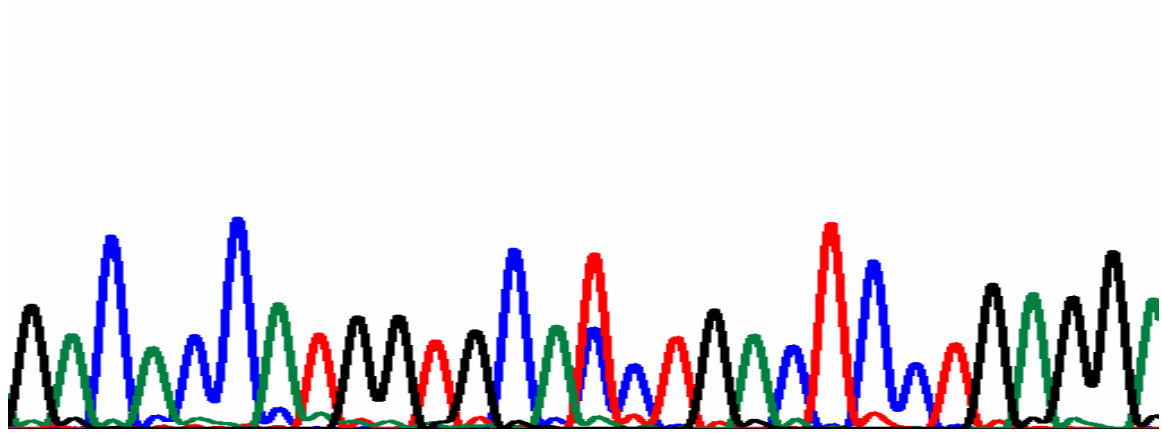
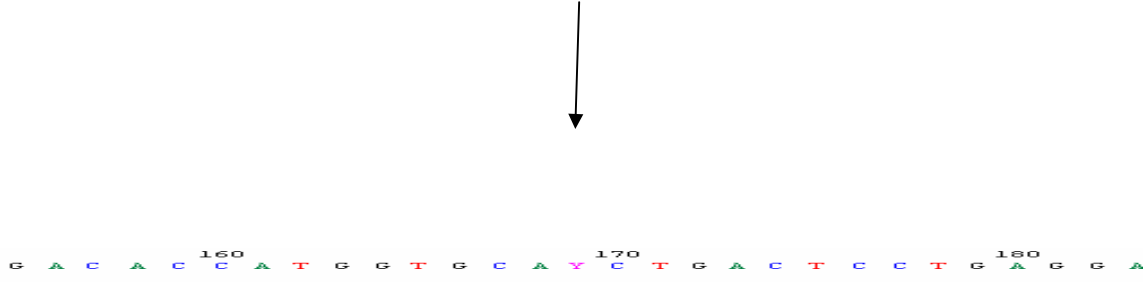
DNA NUMARASI	İncelenmeyen ekzonlar	MUTASYON	POLİMORFİZM
056	12,14,18,19,23,25,42		p.T391,p.S394,p.D1472H,p.V1485L p.V1500I,p.L1501(CTG>CTA), p.L1503(CTG>CCG),p.S1506L
013	9,12,14,16,18,19,23,25, ,27,42,43,44,	delAG 3385-3386 (Tip 3 mutasyonu)	T391,S394,D1472H,V1485L,V1500I,L1501(CTG>CTA), L1503(CTG>CCG),S1506L,T1547, 1945+25C/T
039	8,10,12,15,18,23,25, 29, 36,37,40,41	p.R1308C (Tip2B mutasyonu)	p.T391,p.S394,p.Y516,p.D1472H, p.T15472,p.V1500I,p.L1501 (CTG>CTA), p.L1503(CTG>CCG),p.S1506L int17+43T/T
008	12,18,23		p.D1472H,p.T15472,p.V1500I, p.L1501,p.L1503(CTG>CCG), p.S1506L, int17+43T/T
009		p.L1603P(YENİ)	p.L1381
002	12,18,23,40		p.T391,p.S394,p.D1472H,p.V1485L p.V1500I,p.L1501(CTG>CTA), p.L1503(CTG>CCG),p.S1506L
001	12,18,23	1946-4C>T (Tanımlı Tip3 Mutasyonu)	p.T391,p.S394,p.D1472H,p.V1485L p.V1500I,p.L1501(CTG>CTA), p.L1503(CTG>CCG),p.S1506L p.C1926Y, p.E1938Q, n.8253+32 T/A
011	12,18,23,25		p.D1472H,p.T15472G/C,p.V1485L, del CTT n.1946-17 -1946-19; n.1945+47 A/G; p.T391,p.S394, n.998-27 C/T htz int8



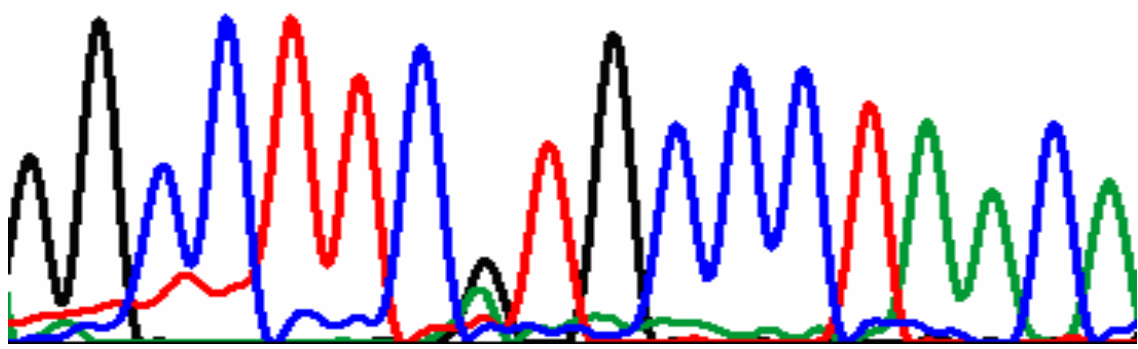
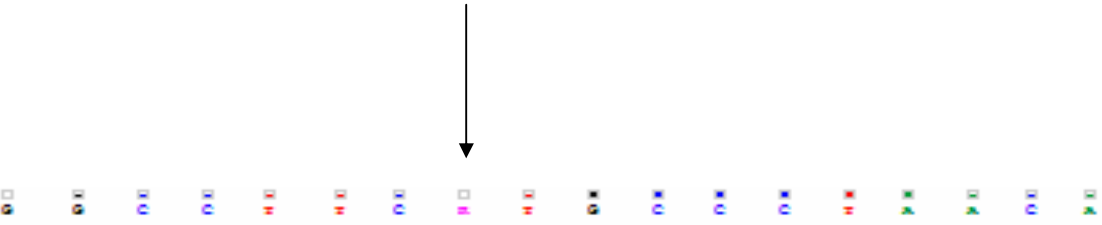
Şekil5.7- 049 numaralı hastanın R1659X (CGA>TGA) homozigot mutasyon görüntüsü



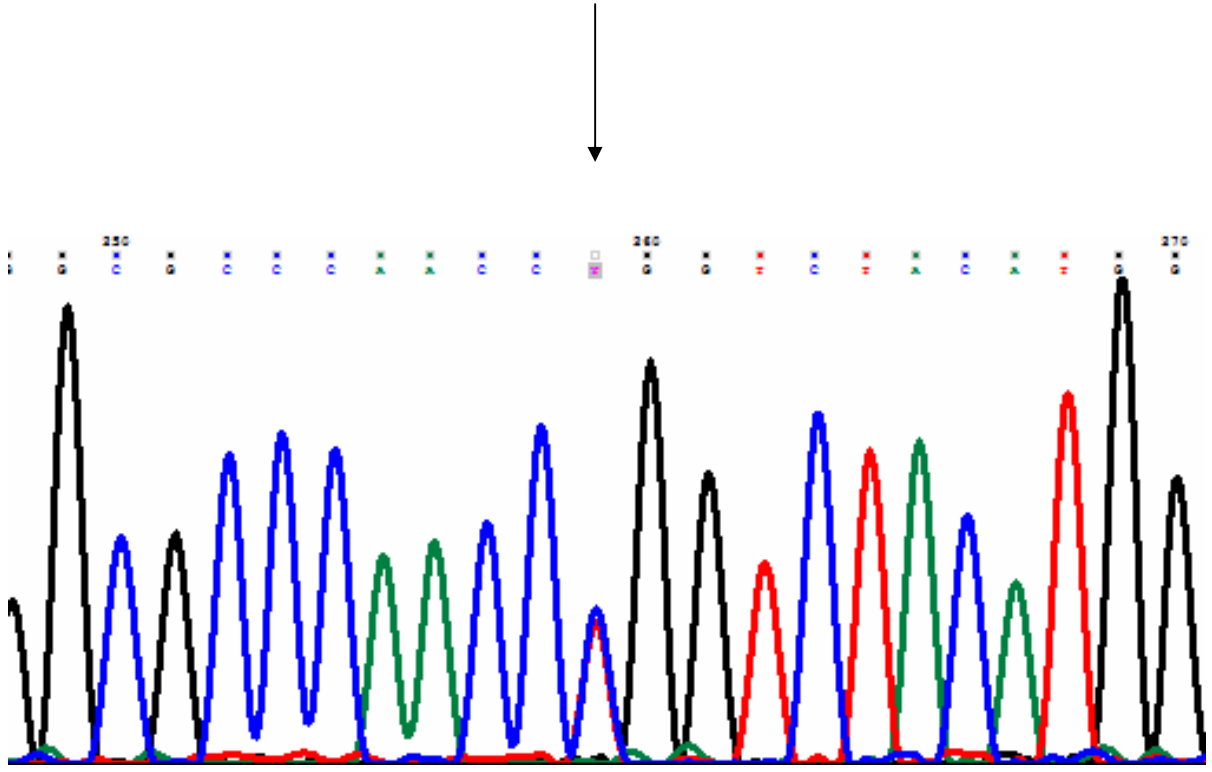
Şekil 5.8- 044 numaralı hastada yeni bulunan G525R (GGG>GGA) homozigot aday mutasyonu



Şekil 5.9 – Tip 2B mutasyonu olan ve 039 numaralı hastada bulunan R1308C mutasyonu



Şekil 5.10- Tip 2A mutasyonu olan ve 008 numaralı hastada görülen H484R (CAT>CGT) heterozigot mutasyonu



Şekil 5.11- 009 Numaralı hastada yeni bulunan ve ekzon 28'deki L1603P (CTG>CCG) heterozigot mutasyonu



## 6. TARTIŞMA

Von Willebrand Hastalığı, Von Willebrand Faktörünün eksikliği veya fonksiyon bozukluklarına bağlı, otozomal geçişli bir kalıtsal kanama diyatezidir. VWF, plateletlerin endotel altı dokuya adezyonunun ve trombus oluşturmalarını sağlayan, ayrıca Faktör VIII için taşıyıcı görevi yapan bir proteindir. VWH da yara yerinde trombus oluşmadığından, deride ve mukozal yüzeylerde minor travmalarla kanamalar olur. VWH'nın, VWF molekülündeki bozukluğun tipine göre değişen klinik ve laboratuvar özelliklerine sahip olan ve genetik geçişi birbirinden farklılık gösteren çok sayıda tipi vardır, bu farklı tiplerinin ayırt edilmesi genetik danışma ve farklı tedavi gereksinimleri yönlerinden önemlidir.

Bu çalışma ile VWF geninin ekzon, ekzon-intron bağlantı bölgelerinin DNA dizi analizi için gerekli moleküler analiz yöntemleri başlatılmış ve Türk hastalarında VWF gen analizi yapılmıştır. Bu tez kapsamında 8 tane Tip1 VWH ve 8 tane Tip 3 VWH hastası için VWF gen analizi yapılmıştır. VWF geninde ekzon 10, 12, ve 23 dışında tüm bölgelerin PZR çoğaltılması ve DNA dizi analizi yapılmıştır. Bu bölgelerin PZR optimizasyonu için denemeler devam etmektedir.

Yapılan analizler sonucunda bazı hastalarda fenotipik genotipik uyum gözlenirken bazı hastalarda ise klinikle uyuşmayan tipte mutasyonlar elde edilmiştir.

Kan grubu 0 Rh+ olan Tip 1VWH tanısı konulan 013 numaralı hastada daha önce bir Türk Tip3 hastasında tespit edilen c.del AG3385-3386 görülmüştür. Hasta c.del AG3385-3386 delesyonu için heterozigottur ve hastanın VWF:Ag düzeyi %7'dir. Hastanın VWF:Ag düzeyindeki bu ciddi derecede azalmaya bağlı olarak FVIII:C değeri de düşmüştür (%27), VWF:Rcof değeri ise %8.5 dir. Tip 3 VWH mutasyonu için heterozigot olan bu hastada gözlenen klinik tablo için hasta Tip 3 ve Tip 1 mutasyonu için birleşik heterozigot olabilir. Fakat hastanın analiz edilen ekzonlarında bilinen polimorfizmler dışında herhangi bir mutajenik değişikliğe rastlanmamıştır. Hastanın diğer ekzonlarının analiz edilmesi için çalışmalar devam etmektedir.

001 numaralı hastada VWF mutasyon veritabanında daha önce Tip 3 mutasyonu olarak gösterilmiş c.4975C>T (p.1659R>X) stop mutasyonu tespit edilmiştir. Hastanın VWF plazma değeri ciddi derecede düşmüştür. (VWF:Ag %0) ve bu düşüş ile orantılı olarak FVIII düzeyi de ciddi olarak düşmüştür (FVIII:C 0.6%). Stop mutasyonu için homozigot olan hastanın genotipi fenotipi ile uyumludur.

Tip 1 VWH tanısı ile gönderilen 039 numaralı hastada ise VWF mutasyon veri tabanında Tip 2B mutasyonu olarak belirtilmiş, proteinin A1 bölgesinde p.R1308C mutasyonunu heterozigot olarak tespit edilmiştir. 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 hastalarda VWF:RCof değerinde azalma vardır. p.R1308C mutasyonu tespit edilen hastanın VWF:RCof değerinde de ciddi derecede azalma olmuştur (VWF:Ag %22.5, FVIII:C %30, ve VWF:RCof %6).

Tip 1 VWH tanısı konulmuş olan 009 numaralı hastanın VWF geni incelendiğinde ekzon 28 bölgesinde bir C>T değişimi görüldü. Kodon olarak incelendiğinde 1603. kodonda Lösin aminoasitinin kodlanması gerekirken değişimin sonucu olarak prolin aminoasitinin kodlandığı görüldü (p.L1603P). Hastanın FVIII değeri %17 olan hastanın VWF:RCof değeri %7 iken VWF:Ag değeri ise %27'dir. Bu bilgiler de gözönüne alındığında bu dönüşümün amino asit türünde değişikliğe neden olmasından dolayı aday mutasyon olabileceği düşünülmektedir.

İncelenen Tip 1 VWH görülen polimorfizmler incelendiğinde intron 15'deki del CTT 1946-17 -1946-19, intron 51'deki n.8253+32 T>A ve intron 17'deki n.2281+44 C>T değişimlerinin Türk popülasyonunda görülen polimorfizmler olduğu tespit edildi. Bunların dışında ekzon 28 bölgesinde aminoasit değişimine sebep olan n.3825 CTA>CTT (C1926Y) ve n.3842 CTG>CCG (E1938D) dönüşümleri tespit edilmiştir. Tip 1 hastalarının gen analizinde p.1926 C>Y ve p.1938E>D mutasyonları ilk defa Türk popülasyonunda bu çalışma ile gösterilmiştir.

İncelediğimiz Tip 3 VWH'larında ise 2 tanesinde tanımlı Tip 3 mutasyonu tespit edildi. 049 numaralı hasta, p. R1659X mutasyonunu homozigot olarak taşımakta olup FVIII değeri %1, VWF:Ag değeri %3, VWF:Rcof değeri ise %2'dir. Bu durum hastanın genotipiyle fenotipinin uyumlu olduğunu gösterir. Aynı şekilde 025 numaralı hastada da ekzon 20 bölgesinde bir baz delesyonu olmuştur. Bu delesyon Tip 3 hastaları için daha önce kabul görmüş olup hastanın FVIII, VWF:Ag ve VWF:Rcof değerleride düşüktür. (FVIII %1; VWF:Ag %3;VWF:Rcof:%2)

044 numaralı hastanın kromotogramları incelendiğinde ekzon 14 bölgesinde daha önce tanımlanmamış ve hastalığa neden olabileceği düşünülen bir değişim tesbit edilmiştir. Uzun süredir tedavi gören hastanın FVIII düzeyi %1'den %2.9'a, VWF:Rcof değeri %6'dan &12,5'a çıkmıştır. Ancak VWF:Ag değerinde hiçbir artış olmazken aksine azalmıştır (%2'den %0'a).

Kodon olarak incelendiğinde 525. kodonda Glisin aminoasitinin Arjinin aminoasitinin kodlandığı görüldü (p.G525R). Bu dönüşümün de Tip 1 hastasında görülen L1603P mutasyonu gibi aminoasit türünde değişikliğe neden olmasından dolayı aday mutasyon olabileceği düşünülmektedir.

Tip 3 VWH görülen polimorfizmler incelendiğinde ise V1485L ve L1381 (CTG>CTA) değişimlerinin Türk popülasyonunda görülen polimorfizmler olduğu görüldü.

Herhangi bir mutasyon bulunamayan 5 hasta için biyokimyasal değerleri incelendiğinde bu hastalarda büyük gen delesyonlarının olabileceği ancak dizi analizi yöntemiyle bu durumun saptanamadığı düşünüldü. Böyle bir olasılık göz önüne alındığında bu hastaların southern blot yöntemiyle incelenmesi gerekmektedir.

Tip 1 VWH da mutasyon nadir olarak gösterilebilmektedir. Küçük delesyonlar, frame shift ve anlamsız kodon mutasyonlar bildirilmiştir. Dominant geçişli klasik tip 1 VWH'nın, Vwf molekülünün hücre içinde taşınması veya salgılanmasına engel olan missense mutasyona bağlı olduğu gösterilmiştir.

Tip 3 VWH olgularının çok azında total veya parsiyel gen delesyonları görülmüştür. Bunun dışında VWF mRNA ekspresyonuna engel olan veya protein sentezini erken sonlandıran baz eklenmeleri ve frame shift mutasyonları tanımlanmıştır. Bu farklı tiplerinin ayırt edilmesi genetik danışma ve farklı tedavi gereksinimleri yönlerinden önemlidir. Bu tez çalışmasının amacı dünya da en sık görülen kalıtsal kanamalı hastalıklardan biri olan VWH' nin Türkiye'de moleküler analizleri yöntemlerinin oluşturulması ve hastalarda genetik analizlerin yapılabilmesidir. Sonuç olarak VWH'nın moleküler genetik analizi için sistem Türkiye'de ilk defa oluşturulmuş, altı hastaya genetik tanı konulabilmiş ve iki hastada da iki yeni aday mutasyon tespit edilmiştir.

## KAYNAKLAR

Abuzenadah A.M., Gursel T., Ingerslev J., Nesbitt I.M., Peake I.R. & Goodeve A.C. (1999) Mutational analysis of the von Willebrand factor gene in 27 families from Turkey with Von Willebrand disease (Abstract). *Thrombosis and Haemostasis Suppl.* 283.

Budde, U., & Schneppenheim, R. (2001). Von Willebrand factor and von Willebrand disease. *Review of Clinical Experimental Hematology*, 5(4), 335-368.

Federici Augusto B and Canciani Maria T. Clinical and laboratory versus molecular markers for a correct classification of von Willebrand disease *haematol.*2009.005751

Furie B., Furie B.C.: *The Molecular Basis of Blood Coagulation.* Cell,53: 506-518, 1988

Ginsburg D.Von Willebrand disease in: Beutler R,ed.Willams Hematology. 6th ed. New York.McGraw Hill 2001,s.1813.

Ginsburg D and Bowie E.J. Walter Molecular Genetics of von Willebrand Disease *Blood*, Vol79, No 10 (May 15). 1992: pp 2507-2519

Hill JC, Endres-Brooks J, Buauer HJ, et al. The effect of ABO blood group on the diagnosis of von Willebrand disease. *Blood* 1987; 69:1691.

Italian Working Group.Spectrum of von Willebrand disease *Br.J.Haematol* 1977;35:101.

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 and T. Kojima; 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* (2008), 14, 556–563

Keeney S. and Cumming A.M. The molecular biology of von Willebrand Disease *Clin. Lab. Haem.* 2001, 23, 209±230

Kim K. S., Park J. Y., Jou I., Park S. M.; Regulation of Weibel-Palade body exocytosis by a-synuclein in endothelial cells; 2010, *JBC Papers* M110.103499

Laffan, M., Brown, S. A., Collins, P. W., Cumming, A. M., Hill, G. H., Keeling, D., et al. (2004). The diagnosis of von Willebrand disease: A guideline from the UK haemophilia centre doctors' organization. *Haemophilia*, 10(3), 199-217.

LILLICRAP D.; Genotype/phenotype association in von Willebrand disease: is the glass half full or empty; 2009, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7 (Suppl. 1): 65–70

Mancuso, D. J., E. A. Tuley, L. A. Westfield, N. K. Worrall, B. B. Shelton-Inloes, J. M. Sorace, Y. G. Alevy and J. E. Sadler, "Structure of The Gene for Human von Willebrand Factor", *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.264, No.33, pp.19514-19527, 1989

Mannucci, PM, Ruggeir ZM, Pareti FI. et al. 1-Deamino-8-D-arginine vasopressin: A new pharmacological approach to the management of hemophilia and von Willebrand's disease *Lancet*. 1977;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 Willebrand disease: from the patient to the gene. INSERM network on molecular abnormalities in von Willebrand disease. *Thrombosis and Haemostasis* 78, 451±456.

Millar Carolyn M , Brown Simon A.; Oligosaccharide structures of von Willebrand factor and their potential role in von Willebrand disease, *Blood Reviews* (2006) 20, 83–92

Pruss Cynthia M., Colleen R. Notley P., Hegadorn Carol A, O'Brien Lee A. and Lillicrap David ADAMTS13 cleavage efficiency is altered by mutagenic and, to a lesser extent, polymorphic sequence changes in the A1 and A2 domains of von Willebrand factor; 2008

Rachel T. McGrath, Emily McRae, Owen P. Smith and James S. O'Donnel; Platelet von Willebrand factor – structure, function and biological importance; *British Journal of Haematology*, 148, 834–843; 2010

Sadler JE; A revised classification of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 71:520-525; 1994

Sadler JE, Mannucci PM, Berntorp E. Et al. Impact, diagnosis and treatment of von Willebrand disease. *Thromb Haemost* 2000; 84:160.

Sadler JE. von Willebrand factor assembly and secretion. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl. 1): 24–7.

Sztukowska M., Gallinaro L., M. G. Cattini, E. Pontara, F. Sartorello, V. Daidone, R. Padrini, A. Pagnan and A. Casonato; Von Willebrand factor propeptide makes it easy to identify the shorter Von Willebrand factor survival in patients with type 1 and type 2 von Willebrand disease, *British Journal of Haematology*, 143, 107–114; 2008

Westrick RJ, Ginsburg D. Modifier genes for disorders of thrombosis and hemostasis. *J Thromb Haemost* 2009; 7 (Suppl. 1): 132–5.

**Internet:**

ISTH-SSC VWF Online Database; 2007;  
<http://www.vwf.group.shef.ac.uk/graphics/gene.jpg&imgref>

Dr. David Lillicraps Molecular Hemostasis Laboratory  
(<http://clinlabs.path.queensu.ca/queens/labs/lillicrap/images/ri1-2.gif>)

## ÖZGEÇMİŞ

1982 yılında İstanbul'da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini İstanbul'da tamamladı. 1999 yılında girdiği Hacettepe Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Odyometri bölümünden 2001 yılında mezun olduktan sonra aynı yıl İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı. 2004 yılında çalışmaya başlamış olduğu İstanbul Düzen Laboratuvarı Genetik Tanı Merkezinde halen çalışmaktadır.