

T.C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**Light Cycler Real Time PCR Teknolojisi ile Faktör V
Geninde Yeni Mutasyon Taranması**

Biyolog S. Duygu SANLIDİLEK

Danışman Öğretim Üyesi

Prof. Dr. Nejat AKAR

2009 - ANKARA

Light Cycler Real Time PCR teknolojisi ile faktör V geninde yeni mutasyon taraması

ÖZET

Kanın vasküler sistem içinde akışkanlığının sağlanması koagülan ve antikoagülan faktörlerin dengelenmesi ile sağlanmaktadır. Bu denge kalıtsal ve edinsel faktörlerle gerçekleşir. Koagülasyon kaskatında; 1990 yılının başında Amer ve arkadaşları, trombozlu bir hastada aktive protein C'nin aktivitesini inhibe eden plazmadaki bir kısmın varlığını ileri sürdüler. Daha sonra Dahlbäck tarafından aktive protein C direncinin mekanizması tanımlandı. 1994 yılında da Bertina, FV'in 10.ekzonunda bulunan G1691A değişiminin aktive protein C direncine neden olduğunu tanımlamıştır.

Faktör V Leiden geninin tanısında en sık kullanılan teknoloji Real Time PCR'dır. Bu teknolojiye nokta mutasyon tespitinde hibridizasyon problemleri kullanılır. Problemleri 2 kısımdan oluşur ve mutasyon bölgesine spesifiktir. Hibridizasyon problemlerinde tanı erime sıcaklığı eğrileriyle gerçekleştirilir. Kit içerisinde çıkan pozitif kontrolün erime sıcaklıkları temel alınarak diğer örnekler değerlendirilir. Örneklerin erime sıcaklıkları pozitif kontrolün erime sıcaklığından $\pm 2C^{\circ}$ sapma gösterebilir. Baz kompozisyonu, nükleotidin yeri ve dış etkenler erime sıcaklığını etkiler.

2002 yılından itibaren tromboz tanısıyla gelen ve Real Time PCR ile FVL çalışılan 4100 hasta sonuçları taranmış ve 13 hastada pozitif kontrolün erime sıcaklığından $\pm 2C^{\circ}$ den fazla sapma gözlenmiştir. Bu örneklerde DNA dizi analizi yapıldığında probun erime sıcaklığına neden olacak ve gen dizisinde FVL mutasyonuna yakın başka bir mutasyon gözlenmemiştir.

Örnekler DNA bankamızdan tekrar izole edildi ve Real Time PCR cihazı ile çalışmaları tekrarlanmıştır. Sonuçlarda pozitif kontrolün erime sıcaklığından sapma gözlenmemiştir. Sapmaya neden olabilecek başka parametrelere bakıldığında; nanodrop ölçümü sırasında izolasyondan önceki DNA'larda protein, fenol gibi kirleticilerin bulunduğu gözlenmiştir.

A new mutation detection in Factor V gene with Light Cycler Real Time PCR technology

Summary

The risk of venous thrombosis is increased when the hemostatic balance between pro- and anticoagulant forces is shifted in favor of coagulation. If this is caused by an inherited defect, the resulting hypercoagulable state conveys a lifelong increased risk of thrombosis. Mutations in the genes coding for proteins in the coagulation cascade were found to be associated with increased risk for venous thrombosis. Dahlbäck et al. described a predisposition to thrombosis caused by a poor anticoagulant response to activated protein C (APC). A year later Bertina et al., reported that a point mutation in exon 10 of the gene encoding blood coagulation factor V.

Real Time PCR is a system, which analyses a mutation Factor V Leiden. In this technique hybridization probe can be used to detect and monitor single nucleotide mutation. The probe has 2 part and its specific to mutation. With the melting curve analysis the hybridization probes melt off, two fluorescent dyes are no longer in close proximity and the fluorescence will decrease. The resulting melting peaks allow discrimination between the homozygous as well as the heterozygous genotype. The anchor probe has a higher T_m than the mutation probe. During the experiment T_m degree of the unknown samples may vary $\pm 2^\circ\text{C}$ from the T_m degree of positive control. Differences in base composition, nucleotide position, and nearest-neighbor environments all affect T_m .

There were 4100 diagnostic samples for thrombophilia screening starting 2002 in our department. We found 13 patients with a variation of T_m degree more than $\pm 2^\circ\text{C}$. Results of DNA sequencing showed only FVL.

In order to delineate the reason for the artifact of the T_m degree, DNA of the patients were isolated again and the study was repeated by LC and sequencing. The shift of the LC experiment was within normal range indicating that they are FVL.

Our study showed that DNA quality and quantity is important and needs to be analyzed prior to laboratory procedures and archival and not well-kept DNA samples may cause the same variation, which causes an artifact

ÖNSÖZ

Engin bilgisi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, bakış açımın değişmesini sağlayan desteğini her zaman üzerimde hissettiğim, bana gösterdiği sabır ve anlayışla çalışmamı sağlayan Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Nejat Akar'a

Güler yüzü ve samimiyetini benden esirgemeyen, ilk günümünden bugüne kadar bana inanan ve çalışmalarımnda katkısı olan Uzm. Bio. Ece Akar'a

Staj ve yüksek lisans döneminde benle sadece iş hayatı tecrübelerini değil hayat tecrübelerini de paylaşan, deneylerimden özel hayatıma kadar her konuda bana yardımcı olan, bana ablalık yapan Uzm. Bio. Yonca EĞİN'e,

İlk günümünden itibaren bana destek olan, staj dönemimde laboratuara alışmamı sağlayan, sonrasında her konuda yanımda olan Bio. Emel USLU'ya,

Bütün sorularıma sabırla, bilgileriyle cevap veren Bio. Dr. Ayşenur ÖZTÜRK ve Bio. Dr. Erkan Yılmaz'a,

Yanlarına gittiğimde beni geri çevirmeyen, hem ders döneminde hem de deneylerimde yardımcı olan, arkadaşlıklarıyla bana moral veren; Uzm. Bio. Esin GÜNGÖR, Uzm. Bio. Dilara Fatma AKIN, Uzm. Bio. Cennet YILDIZ, Uzm. Bio. Didem TORUN, Uzm. Bio. Afife KARABIYIK, Uzm. Bio. ÖZGE CUMAOĞULLARI, Uzm. Bio. Hamit Emre KIZIL, Bio. Gülin GÜLBAHAR, Bio. Sezen BALLI, Uzm. Bio. Filiz Başak CENGİZ'e,

Stajda ve deney aşamalarımnda hep beni sakinleştiren ve bana yardım ederek ağabeyliğini gösteren Tek. Kadir SİPAHİ'ye, laboratuvarın ilk günlerinden son gününe kadar beni her konuda yalnız bırakmayan Tek. Çiğdem ARSLAN'a

Gülmesiyle günümü canlandıran Dilek ÇETİN'e, her zaman çiçeği olarak kalacağım Hemş. Gülsen ŞEKER'e

Kısacası tüm Pediatrik Moleküler Genetik Ailesi'ne

Beni bugünlere getiren, her zaman yanımda olan, bana hem maddi hem manevi destek veren, canımdan çok sevdiğim AİLEM'e

Teşekkürlerimi, sevgi ve saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

Özet	i
Abstract	ii
Önsöz	iii
İçindekiler	iv
Şekiller	vi
Çizelgeler	vii
Simge ve Kısaltmalar	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Koagülasyon Mekanizması	3
2.1.1 Protein C Sistemi ve Aktive Protein C'nin Etki Mekanizması	5
2.1.2 Aktif Protein C Direnci	6
2.1.3 Faktör V Geni	7
2.1.4 Faktör V Gen Değişimleri	8
2.2 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR)	9
2.2.1 SYBR Green	11
2.2.2 TaqMan probe(Hidroliz Prob)	12
2.2.3 Hibridizasyon problemleri	13
2.2.3.1 Erime Eğrisi Analizi	14
2.2.4 Real Time PCR Teknolojisinin Üstünlükleri	15
2.2.5 Real Time PCR teknolojisinin Sınırlamaları	15
2.2.6 Light Cyler Real Time PCR	15
2.2.6.1 Light Cyler Cihazında FVL Tanısında Kullanılan Kit Ve Protokol	17
2.2.6.2 Light Cyler İle Bulunan Mutasyonlar	18
3. MOLEKÜLER TEKNİKLER	19
3.1 Kullanılan Çözeltiler	19
3.2 DNA Ekstraksiyonu	19
3.3 Real Time PCR	19
3.4 DNA Dizi Analizi	20
3.5 Spektrofotometrik Ölçümler	21

4. MATERYAL VE YÖNTEMLER	22
4.1 Yöntemler	22
4.1.1 DNA İzolasyonu	22
4.1.2 FV 1691 G-A Değişiminin Belirlenmesi	23
4.1.3 DNA Dizi Analizi	24
5. BULGULAR	25
5.1 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları	25
5.2 DNA Dizi Analizi Bulguları	26
5.3 Nanodrop Ölçümleri	27
5.4 Tris-EDTA değerleri	27
6. TARTIŞMA	29
7. KAYNAKLAR	31

ŞEKİLLER VE RESİMLER

- Şekil 2.1 Koagülasyon kaskadı
- Şekil 2.2 Protein C'nin aktivasyonu ve FV'in inaktivasyonu
- Şekil 2.3 Faktör V geninin ekzon ve intron domain yapısı
- Şekil 2.4 Cyber green tekniğinin aşamaları
- Şekil 2.5 TaqMan tekniğinin aşamaları
- Şekil 2.6 Hibridizasyon probu
- Şekil 2.7 Prob-DNA eşleşmesi
- Şekil 2.8 Real Time PCR teknolojisinde PCR ve erime sıcaklığı analizi grafiği
- Şekil 5.1 Sapma gösteren 13 örneğin erime sıcaklığı eğrisi.
- Şekil 5.2 İzolasyon sonrasında 12 hastanın ve pozitif kontrolün erime sıcaklıkları
- Şekil 5.3 FV G1691A değişimi ve çevresindeki baz dizisi
- Şekil 5.4 Farklı TE konsantrasyonlardaki örneklerin erime sıcaklıkları
-
- Resim 2.1 Light Cycler Real Time PCR cihazının kısımları
- Resim 2.2 Light Cycler Real Time PCR cihazı

ÇİZELGELER

Çizelge 5.1 Sapma gösteren örneklerin nanodrop ölçümleri

Çizelge 5.2 Sapma gösteren örneklerin izolasyon sonrasında nanodrop ölçümleri

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin Bazı
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
APC	Aktive Protein C
APCR	Aktive Protein C Rezistansı
Arg	Arginin aminoasiti
C	Sitozin Bazı
Ca ⁺²	Kalsiyum
ddNTP	Didioksinükleotid trifosfat
ddH ₂ O	Deiyonize su
DF	Doku faktörü
dNTP	Dioksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetikasit
EPCR	Endotel Protein C Reseptörü
FII	Faktör II (Protrombin)
FIX	Faktör IX
FIXa	Faktör IXa
FRET	Floresans Rezonans Enerji Transferi
FV	Faktör V
FVa	Aktif Faktör V
FVII	Faktör VII
FVIII	Faktör VIII
FVIIIa	Aktif Faktör VIII
FVL	Faktör V Leiden
FX	Faktör X
FXa	Aktif Faktör X
FXI	Faktör XI
FXII	Faktör XII

G	Guanin Bazı
Gln	Glutamin Aminoasiti
H	Hidrojen
HCl	Hidroklorik asit
His	Histidin Aminoasiti
LC	Light Cycler
M	Molar
Mg ⁺²	Magnezyum
ml	Mililitre
mM	Milimolar
nm	Nanometre
PC	Protein C
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PS	Protein S
RBC	Kırmızı Kan Hücresi
RFLP	Restriksiyon parça uzunluk polimorfizmi
RT-PCR	Gerçek Zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
SNP	Nokta mutasyon
T	Timin Bazı
TE	Tris EDTA
Tm	Erime sıcaklığı
YMAK	Yüksek moleküler ağırlıklı kininojen
µl	Mikrolitre

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Fizyolojik koşullarda prokoagülan ve antikoagülan mekanizmalar bir denge içerisinde çalışırlar. Denge bozukluğu durumunda kanama ya da tromboz kendini gösteren patolojik bir durumdur (Dahlbäck 1993). Bu patolojik durumlar kalıtsal ya da edinse olabilir. Faktör V Leiden mutasyonu (G1691A) (FVL) tromboz yönünden kalıtsal bir risk faktörüdür. Bu mutasyon aktif protein C (APC) direncinin en önemli nedeni olarak tanımlanmıştır (Bertina 1994). APC, FVa ve FVIIIa'yı inaktive ederek pıhtılaşmayı kontrol eder.

Faktör V geni 1. kromozomun q21–25 bölgesinde lokalize olan, 25 ekzon ve 24 introndan oluşan 80kb uzunluğunda bir gendir. FVL mutasyonu, nokta mutasyon olup, genin 10. ekzonundaki 1691. nükleotidin guaninden adenine dönüşmesine neden olur. Bu dönüşüm de 506. argininin glutamin olmasıyla sonuçlanır.

FVL mutasyonunun tanısı için çok sayıda farklı moleküler teknik kullanılmaktadır. Bunlardan en sık kullanılanları klasik polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), restriction fragment length polymorphism (RFLP) ve Real Time PCR (RT-PCR)'dir.

RT-PCR, nokta mutasyon tespitinde, hibridizasyon teknolojisi kullanılır. Problar 18-25 baz çifti(bç) uzunluğunda ve mutasyon bölgesine spesifiktir. Hibridizasyon problemleri iki kısımdan oluşur. LC Red 640 işaretli işaretleyici prob ve floresan işaretli mutasyon probu. Bu problemler PCR'in annealing aşamasında primerlerle beraber tek zincirli DNA'ya bağlanırlar. Her PCR döngüsünde ışık kaynağının önünden geçerlerken floresan ışımaya gösterirler. Bu ışımaya işaretleyici probu uyarır ve sensör Red 640'ın yaydığı ışımaya algılar. Bu teknik Fluorescence resonance energy transfer (FRET) olarak adlandırılır. PCR döngüleri bittikten sonra ısı 0,2°C lik aralıklarla yükseltilir ve problemlerin eriyerek birbirine çok yakın duran iki floresan boya birbirinden ayrılması sağlanır. Böylelikle floresan ışımaya miktarı düşer. Eğer bir mutasyon varsa, mutasyon probu ile hedef DNA arasındaki uyumsuzluk hibridin stabilizasyonunu bozar. Yabancıl tip genotipte ise uyumsuzluk oluşmaz ve hedef DNA ile bire bir örtüşen hibrit yüksek erime sıcaklığına sahip olur. Mutant genotipte ise, hedef DNA ile hibrit bire bir örtüşemediğinden bazılar arasında oluşan bağlar daha gevşek olur ve erime sıcaklığı daha düşük olur. Erime eğrisi analizi

sonucu elde edilen piklerle; homozigot (yabani tip veya mutant) genotip ile heterozigot genotip arasındaki fark ayırt edilir (Biochemica 1999).

Bu cihazlar nitel ve nicel ölçüm yapmaktadır. Nitel ölçümde kullanılan teknoloji hibridizasyon problemleridir. Bu problemler daha önceden bildiğimiz nokta mutasyonları tanırlar. Erime sıcaklığı (T_m) probun dizisinde bulunan G-C oranına göre değişir. T_m derecesi, örneklerde pozitif kontrolün erime sıcaklığından ± 2 derece sapma gösterebilir. Bu orandan daha fazla sapma göstermesi örneğin farklı bir sıcaklıkta eridiğini ve farklı bir nokta mutasyon olabileceğini düşündürür.

Bu çalışmada; 2002 yılından itibaren tromboz tanısıyla gelen ve Real Time PCR ile Faktör V Leiden çalışılan hastaların sonuçlarının taranması ve sapma gösteren hastalarda yeni mutasyon taranması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Koagülasyon Mekanizması

Koagülasyon, sıvı haldeki kanın katılaşarak akışkanlığının azalması durumuna gelmesidir. Koagülasyon mekanizmasında bulunan pro- ve antikoagülanlar arasındaki hemostatik denge değiştiğinde, venöz tromboz riski artmaktadır. Eğer bu denge bozukluğu kalıtsal bir hatadan kaynaklanıyor ve hiperkoagülasyon ile sonuçlanıyorsa, ileri yaşlarda tromboz riskini arttırmaktadır (Dahlbäck 2000).

Koagülasyon mekanizmasında bulunan kofaktör proteinler (doku faktörü, Faktör V ve VIII), diğer faktörler için bağlanma noktasıdır. Doku faktörü, yapı olarak diğer kan pıhtılaşma faktörleri ile ilişkili değildir. Aktif işlev görmesi için kırılmaya gereksinimi olmayan yapısal bir zar proteindir. Faktör V (FV) ve Faktör VIII (FVIII) profaktörler olarak görev yaparlar ve kırılarak aktive edildiklerinde diğer faktörler için bağlanma noktası oluştururlar. Bu proteinlerin dışında Protein C (PC) ve Protein S (PS) düzenleyici proteinlerdir. Sadece Protein C proteolitik kırılma ile düzenlenir. Aktive olduğu zaman bir serin proteazdır (Smith 2007).

Koagülasyon mekanizmasında, intrinsik, ekstrinsik ve ortak yol olmak üzere üç sistem bulunur. İntrensik yol, dolaşımdaki kanda bulunan prokoagülan yapılarıdır. Ekstrinsik yol, kanda bulunan ve vücut dokularından köken alan enzimleri kullanır (Altınışık 2001).

Ekstrensik sistemin (doku faktörü yolu), travma sonucu uyarılması ile ortaya çıkan doku faktörü (DF) doğrudan Faktör FVII (FVII)'yi aktifleştirir, bu da kalsiyum ve fosfolipid varlığında Faktör FX (FX)'u, FXa şeklinde aktifleştirir. DF'ü yolu aynı zamanda FVIIa ile birlikte, Faktör FIX (FIX)'un da uyarılmasını sağlamaktadır.

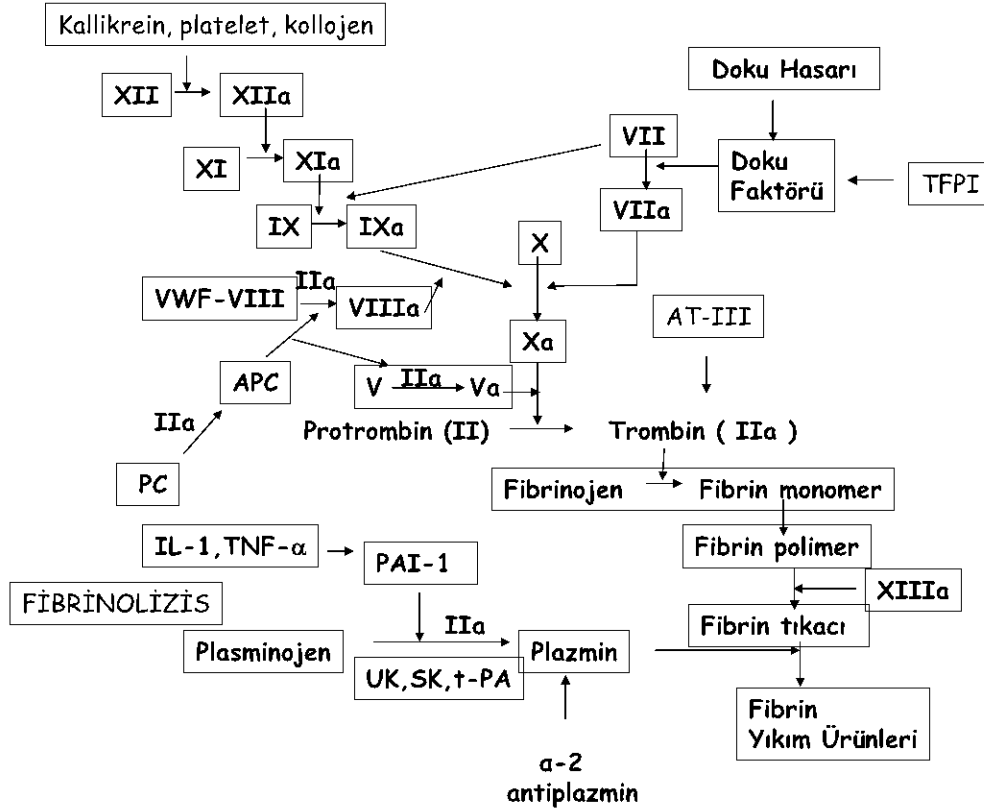
İntrensik sistemin (kontakt protein yolu) uyarılması, Faktör FXII (FXII)'nin, bozulmuş damar yüzeyi veya negatif elektrik yüklü yüzeyle aktifleştirilmesi ile olur. Bu yolda en önemli rolü FXII oynamaktadır. FXII'nin aktifleştirilmesine yardımcı olan

kofaktörler arasında prekallikrein, yüksek molekül ağırlıklı kininojen (YMAK) ve Faktör FXI (FXI) bulunur. FXIIa FXI'yi, aktif şekli olan FXIa'ya ve prekallikreini, aktif şekli olan kallikreine dönüştürür, bu sonuncu madde de bradikinin oluşturmak üzere YMAK'ı parçalar. Ayrıca FXIa, YMAK kofaktörlüğünde FIX'u uyarmaktadır. FIXa, FVIII eşliğinde FX'u, FXa şeklinde aktifleştirir.

Hem interensek hem de ekstrensek sistem ile aktiflenebilen FXa, FVa ile birlikte kalsiyum ve fosfolipid varlığında protrombini trombine dönüştürür. Oluşan trombin;

- Trombositleri aktifleştirir,
- Fibrinojeni fibrine dönüştürür,
- FVIII ve FV'i aktifleştirir.

FVIIIa ve FVa trombositlere bağlanır, proteolitik faktörler olan FIXa ve FXa'ya kofaktör olarak hizmet ederler. FVIIIa ve FVa kofaktörü oldukları prokoagülan faktörlerin (sırasıyla FIXa ve FXa) katalitik etkilerini artırır. Böylece vasküler hasar olan bölgelerde koagülasyon reaksiyonlarının hızlandırılmasını, trombin oluşumunun hızla artmasına ve sonuçta koagülasyona neden olur (Salzman 1994; Yale 1995)(Şekil 2.1).

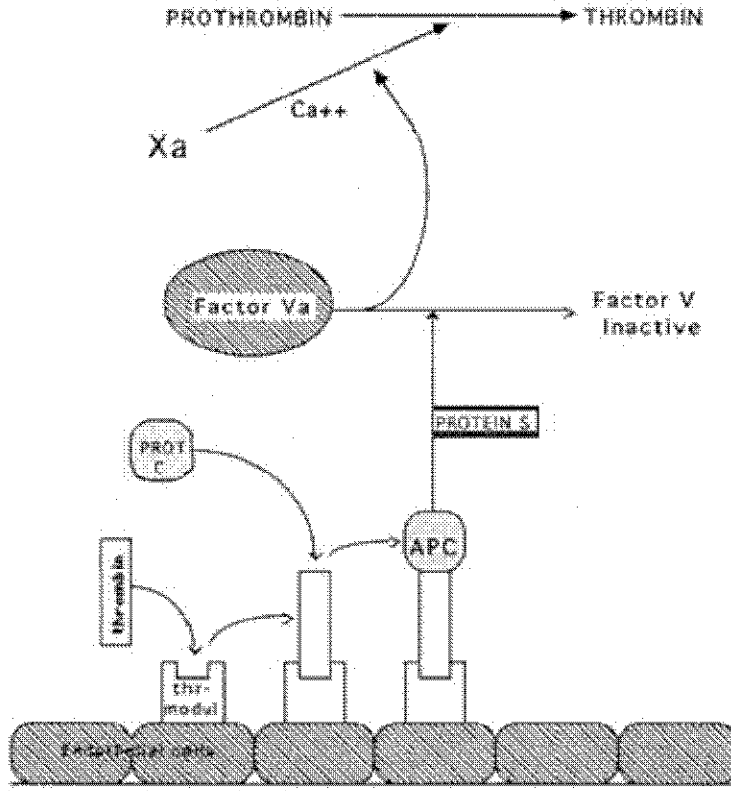


Şekil 2.1 Koagülasyon kaskadı

Pıhtılaşma mekanizmasının kontrolü kendi içindedir. Çok az miktarlarda doku faktörü ile meydana gelen minimal trombin; fibrinojenin yanında, trombositleri, FV, FVIII, FXI ve Faktör FXIII (FXIII)'ü de aktifleştirir. Trombinin prokoagülanlar üzerine yaptığı bu etkiler, pıhtılaşma sisteminde pozitif feedback reaksiyonlarıdır. Trombin diğer taraftan; endotelde bulunan protein C reseptörü (EPCR) ve trombomodulin etkisi ile Protein C'yi, antikoagülan etki gösteren, aktif protein C (APC) molekülüne dönüştürür (Beutler 2001).

2.1.1 Protein C Sistemi ve Aktive Protein C'nin Etki Mekanizması

Protein C glikoprotein yapısında, K vitaminine bağımlı, hemostazın regülasyonunda rol oynayan anahtar moleküllerden birisidir. Plazmada inaktif bir zimogen olarak bulunur. Damar duvarındaki trombin tarafından aktive edilir. Trombin burada koagülasyon mekanizmasındaki fonksiyonundan tamamen farklı bir fonksiyon göstererek protein C'yi aktive eder. Sağlam endotel yüzeyindeki bu trombin, trombomodulin olarak bilinen bir reseptöre yüksek affinite ile bağlanır, prokoagülan özelliğini yitirir ve protein C'nin aktivatörü olur. Aktive protein C (APC) fosfolipid bağlı FVa ve FVIIIa'yı spesifik olarak parçalar ve inaktif hale getirir böylece koagülasyon inhibe olur (Şekil 2.2). FV ve FVIII kofaktörlerinin prokoagülan aktiviteleri yoktur ve APC aktive olmamış FV ve FVIII'e etki edemezken, membrana bağlı FVa ve FVIIIa'yı spesifik olarak inaktive eder. APC FVa ve FVIIIa'daki Arg aminoasidinin bulunduğu bölgelerden bir kaç peptid bağını kırar. FVa'daki Arg 506 ve Arg 306'yı kırarak FVa aktivitesinin kaybına neden olur. Factor VIIIa'da ise Arg 562'nin kırılması ile kofaktör inaktivasyonuna yol açar (Dahlbäck 1995).



Şekil 2.2. Trombinin trombomodülüne bağlanarak protein C'yi aktive etmesi ve aktive protein C'nin FVa'yı inaktive etmesi

Normal fizyolojik koşullarda prokoagulan ve antikoagulan mekanizmalar arasındaki denge antikoagülasyon lehinedir. Bununla beraber vasküler hasarın olduğu bölgelerde antikoagulan sistem etkisini kaybeder, prokoagulan güçler ortama hakim olur. Böylece ektravasküler pıhtılaşma olurken intravasküler akışkanlık devam eder.

2.1.2 Aktif Protein C Direnci

Dahlbäck, APC direncinin (APCR) PC'nin aktivasyonunda rol oynayan bir kofaktörün eksikliğine ya da FV veya FVIII genlerindeki bir mutasyona bağlı olabileceğini ileri sürmüştür. Daha sonra yapılan çalışmalarda, APC dirençli olguların plazmalarına saf FV eklendiğinde, APC direncinin olmadığı gözlenmiştir (Dahlbäck 1994). Böylece APC direncine neden olan bozukluğun FV molekülü olduğu bildirilmiştir (Griffin 1993).

APC direncinin moleküler patolojisi ilk kez Bertina ve arkadaşları tarafından 1994 yılında aydınlatılmıştır. FV geninin 1691. pozisyonundaki adeninin guanine dönüşmesi sonucu ortaya çıkan mutant gen, FV'in ağır zincirinin 506. pozisyonundaki arginin yerine glutaminin geçmesine neden olmaktadır. Bu varyant Faktör V Leiden olarak adlandırılmıştır. Bu mutasyon APCR'nin en sık nedeni olsa da tek nedeni değildir.

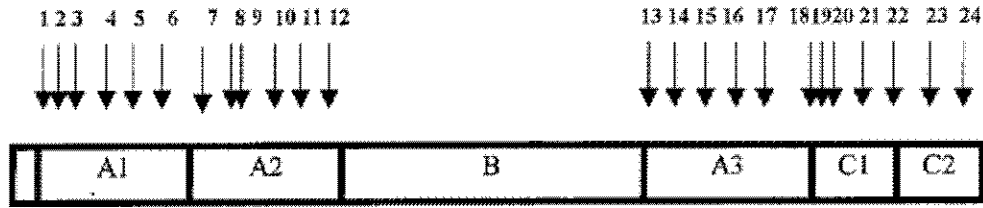
2.1.3 Faktör V Geni

FV proteini, koagülasyon mekanizmasının hem intrinsik hem de ekstrinsik yollarında kofaktör olarak görev yapar. İntrinsik mekanizmada FXa ve trombosit fosfolipitleri ile, ekstrinsik mekanizmada ise doku tromboplastinin bir parçası olarak sentezlenen fosfolipit ve FXa ile birleşerek protrombin aktivatörünü oluşturur, bu kompleks de protrombini (FII) trombine dönüştürür. Pıhtılaşma kaskadının aktive olmasıyla ortaya çıkan trombin bir yandan fibrinojeni fibrine dönüştürürken, diğer yandan endotelial bir membran proteini olan trombomoduline bağlanır (Haliloğlu 2004; Guyton 1991; İliçin 1996). FV trombin ve FXa tarafından aktif faktör V (FVa)'e çevrilmektedir. Trombin tarafından aktive edilen FV, Arg 709-Ser 710, Arg 1018-Thr 1019 ve Arg 1545-Ser1546 bağlarının kesilmesiyle oluşturulmaktadır. Tek zincirli FV molekülü, birbirlerine Ca^{2+} iyonları ile bağlı olan çift zincirli aktif molekül haline dönüşür. FVa, APC tarafından ağır zincirinin proteolitik degradasyonu ile inaktive edilmektedir. İnaktivasyon fosfolipit membranlar ve Ca^{2+} varlığında daha etkili olmaktadır. Bu işlem ilk kesim Arg 506'dan olmak üzere, Arg 306 ve Arg 679 olacak şekilde bir sıra içerisinde devam etmektedir (Lane 1996).

Mutasyona uğramış FVa normal FV prokoagülan aktivitesi gösterir fakat APC aracılığı ile olan inaktivasyona daha az hassastır. Bu trombinaz kompleksinin stabilizasyonuna, artmış trombin oluşum hızına, FVIII ve FV'in feedback aktivasyonuna yol açar. Koagülasyon mekanizmasının artmış aktivasyon hızı, beraberinde FV'e bağımlı APC kofaktör aktivitesinin kaybına, APC direncinin artışına ve hiperkoagülasyona yol açar. Arg 506 → Gln mutasyonu direkt olarak FV'in bir APC kofaktörü gibi fonksiyon görmesini bozmadığı için, APC direncinde, FV'in APC kofaktörü olarak etki etmesinde bir eksiklik yoktur. Bununla beraber, mutasyon FV'in prokoagülan ve antikoagülan durumları

arasındaki dengesizlik sonucu oluşan FV'in APC kofaktör aktivitesindeki sekonder kayıp ile ilişkilidir (Dahlbäck 1995).

Faktör V geni 1. kromozomun q21 -25 bölgesinde lokalize olan, 25 ekzon ve 24 introndan oluşan 80 kb uzunluğunda bir gendir (Cripe 1992). 1986'da Kane ve Davie, 1987'de Kane ve arkadaşları ve 1987'de Jenny ve arkadaşları ilk olarak cDNA klonlaması yaparak, insan faktör V geninin aminoasit dizisini tanımladılar. Olgun protein 2196 aminoasit içermektedir. Faktör V cDNA'nın analizinin sonucunda, domain yapısını sırasıyla A1-A2-B-A3-C1-C2 olan proteinlerin oluşturduğu bulunmuştur (Şekil2.3)



Şekil 2.3 Faktör V geninin ekzon ve intron domain yapısı. Kutular Faktör V'in domain yapısını oklar ise olgun mRNA'da ayrılmış intron bölgelerini işaret etmektedir. Her bir intron numaralarla gösterilmiştir

2.1.4 Faktör V Gen Değişimleri

Faktör V eksikliği nedeni olarak 2 mutasyon bildirilmiştir. Bunlar; 13. ekzonda 4 baz çiftlik bir delesyon ve FV Stanford olarak adlandırılan yine 13. ekzonda 2856. nükleotitte 4 baz çiftlik insersiyondur. FV üzerinde APC' nin kesim yerlerini kodlayan nükleotitlerdeki mutasyonlar, FV'in APC' ye karşı direnç oluşturmasına neden olur. APC direnci, Faktör V'in değişik bölgelerinde oluşan farklı mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkar.

FV Cambridge olarak adlandırılan mutasyon, Faktör V geninin 7. ekzonunda, Arg 306 kesim bölgesindeki tek baz değişimi sonucu arginin aminoasidini treonin aminoasidine dönüştürür ve APC direncine neden olur (Williamson 1998).

FV geninin 13. ekzonunun 4070. pozisyonundaki tek baz değişimi sonucunda 1299. aminoasit olan histidin arginine dönüşür. FV A4070G polimorfizminin venöz tromboz için bir risk faktörü değildir ancak FVL mutasyonu ile birlikte olduğunda önem kazanmaktadır. Bu mutasyon R2 haplotipi olarak isimlendirilir (Akar vd 2000, Atakan vd 2000).

FV'in 13. ekzonunda 3935. pozisyonundaki A→G (His 1254 Arg) mutasyonu da R3 haplotipi olarak adlandırılır (Lewis 2007).

FV Leiden (FVL), faktör V geninin 10. ekzonun 1691. nükleotidinin guaninden adenine dönüşmesine neden olur. Bu dönüşüm de 506. argininin glutamin olmasıyla sonuçlanır. FVL mutasyonu ile, FV molekülü proteolitik inaktivasyona dirençli olur. Bu durum trombin konsantrasyonunda yükselmeye ve hiperkoagülasyona neden olur (Sılan ve Zafer 2004, Rosen ve Sturk 1997). FVL mutasyonu taşıyan bireylerde venöz tromboz, periferel vasküler hastalıklar, fel, tekrarlayan düşük, pulmoner embolizm ve kalp krizi görülme riski artmaktadır (OMIM 2001). FVL mutasyonu penetrans azaltılmış otozomal dominant kalıtım gösterir. Mutasyonu taşıyan bireylerde sağlık problemleri görülmeyebilir Heterozigotların %10'unun ve homozigotların hemen hepsinin yaşamları süresince venöz tromboz geçirme riski vardır (Başaran 2001). FVL heterozigot bireylerde tromboz riski 5–10 kat, homozigot bireylerde ise risk 50–100 kat artar. Aktive edilmiş protein C direncinin normal bireylerdeki insidansı %3–5 thromboz öyküsü olan hastalarda %50 civarındadır (Lucotte 2001, Kujovich 2004).

2.2 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time PCR)

Higuchi ve arkadaşları, oluşturdukları PCR ürünlerini tarayan bir sistem geliştirmişlerdir. PCR kinetiğinin analizine öncülük eden bu eş zamanlı sistem, her çoğaltma reaksiyonunda tespit için etidyum bromür, ultraviyole ışığı ile her rneği aydınlatacak termal döngü adaptörü ve floresans ışımının sonuçlarını toplayacak bir kamera eşliğinde bilgisayar sistemi içerir (Higuchi et al. 1993).

PCR reaksiyonlarında sıcaklık döngüleri sağlamak için kullanılan cihazların (thermocyclers) hassas ölçüm aletleriyle birleştirilmesi, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (Real Time PCR) olarak adlandırılan yeni bir yöntemin gelişmesini sağlamıştır. Real Time PCR, reaksiyon esnasında her bir PCR döngüsünün yeterli miktarda ürünün verdiği floresans ışığa göre çalışan ve aşama aşama reaksiyonu sonuna kadar oluşan ürünü kontrol eden bir sistemdir. Real time PCR teknolojisinde diziye özgü prob lar ve diziye özgü olmayan floresan boyalar kullanılır. Floresan boyalar sayesinde nicel ve nitel analizler yapılabilmektedir (Wittwer 1997).

Real Time PCR'da tarama yapmak için 4 farklı sistem mevcuttur. Bu 4 sistemde, PCR sırasında oluşan floresans ışımayı ölçmek üzerine kurulmuştur. Yayılan floresan ışımaya miktarı, PCR ürün miktarıyla orantılıdır ve PCR reaksiyonunu gözlemlemeye olanak sağlar (Klein 2002).

En basit ve ucuz olan sistem, çift zincirli DNA arasına giren boya teknolojisine dayanmaktadır. Bu teknolojide, önceden hazır olan DNA ürününün üzerine boya kolayca uygulanabilir ve boyadan başka floresans işaretli oligonükleotid eklemek gerekmemektedir. Ancak bu teknolojide spesifik ve spesifik olmayan PCR ürünleri de taranmaktadır. Bundan dolayı PCR koşulları çok iyi optimize edilmelidir ve erime sıcaklığı eğrisi analizinde spesifik olan ve olmayan örnekler çok iyi ayrıştırılmalıdır.

Diğer üç sistem, floresans işaretli oligonükleotidlerin eklenmesi üzerine kuruludur. Yeterli miktarda floresans ışımaya; probun (hidroliz prob (Heid 1996;Gibson 1996))veya bağlanan bir (moleküler beacon (Tyagi 1996)) veya iki (hibridizasyon prob (Wittwer 1997)) oligonükleotidin ayrılması ile elde edilir.

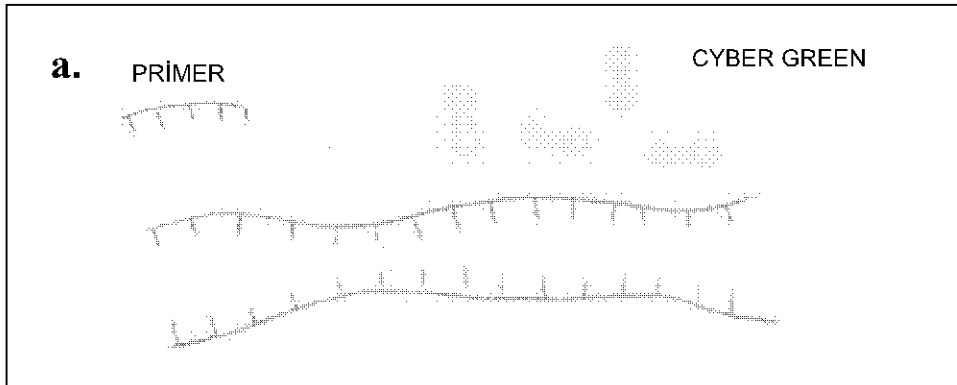
Bu dört temel sistemin yanında başka sistemlerde tanımlanabilir. Scorpion primerleri, çoğaltılacak diziye bağlanan floresans işaretli bir kuyruğa sahiptir (Whitcombe 1999).

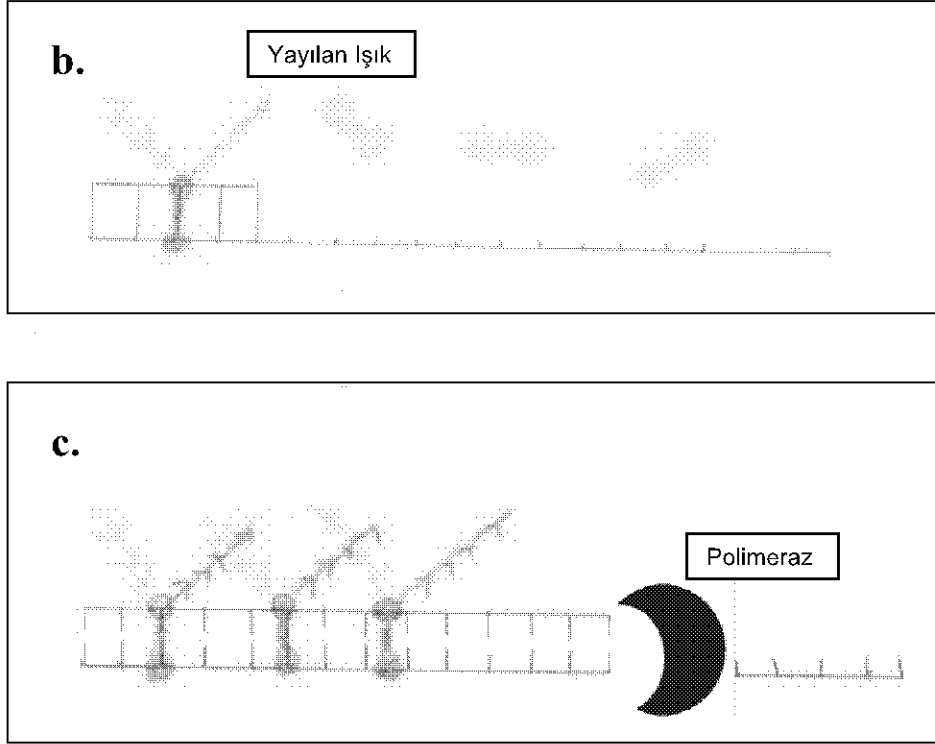
2.2.1 SYBR Green

LC sisteminin bu uygulamasında; yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren cyber green boya kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan boya miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir.

Amplifikasyonun başlangıcında reaksiyon tüpü içinde "cyber green", primerler ve denatüre edilmiş DNA ayrı ayrı bulunduğu için floresans yok denecek kadar azdır. Primerin hedef moleküle bağlanmasını takiben az miktarda "cyber green" çift sarmal yapıya katılmakta ve bunun sonucu olarak yayılan floresans miktarı da az olmaktadır. Uzama aşamasında yeni sentezlenen çift sarmal DNA'nın yapısına gittikçe fazla miktarda boya katılarak zaman içinde floresans derecesinde artışa neden olmaktadır(Şekil 2.4) (Williams 1996; Grove 1999).

Bu uygulamada, floresans artışı her zaman spesifik amplifikasyonları göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal DNA'ya entegre olan "cyber green", ortamda hedef moleküller olmadığında, primerlerin kendi aralarında gerçekleşecek olan bağlanmalar (primer dimerleri) sonucunda da yapıya katılarak floresans oluşumuna sebep olabilmektedir (PE Biosystems).



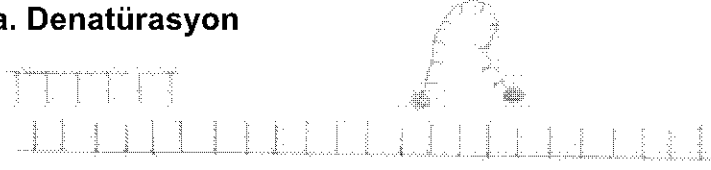


Şekil 2.4 Cyber Green tekniğinin aşamaları. **a.** Ortamda; cyber green boya, primer, denatüre olmuş DNA ve PCR için gerekli kimyasallar bulunmaktadır. **b.** Primerlerin bağlanmasıyla çift zincirli DNA arasına cyber green boya girmeye başlar. **c.** Çift zincirli DNA oluştuğunda arasına giren boya miktarı ve dolayısıyla ışımaya miktarı da artar. (Williams 1996; Grove 1999)

2.2.2 TaqMan Probe (Hidroliz Prob)

TaqMan sisteminde 5' ve 3' uçlarından florokrom maddelerle işaretli prob kullanılmaktadır. Probu 5' ucunda raportör florokrom, 3' ucunda ise baskılayıcı florokrom bulunmaktadır. Prob, tek sarmal hale getirilen hedef molekül üzerinde, primerlerin bağlanma bölgesinin arasında kalan yere bağlanır. Prob hedef molekül arasındaki hibridizasyon devam ettiği sürece raportör florokrom maddenin sinyal oluşturması, 3' uçtaki baskılayıcı florokrom tarafından engellenmektedir. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması prob'un bağlandığı noktaya kadar geldiğinde, sentezin devam edebilmesi için Taq DNA polimeraz enzimi 5'→3' nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5' uçtan yıkmaya başlar. Böylece raportör florokrom serbest hale geçer ve sinyal oluşturur. Her siklusta üretilen ampikon miktarına paralel olarak sinyal şiddeti de artmaktadır (Şekil 2.5) (Deetz 1995; Gelfand 1991).

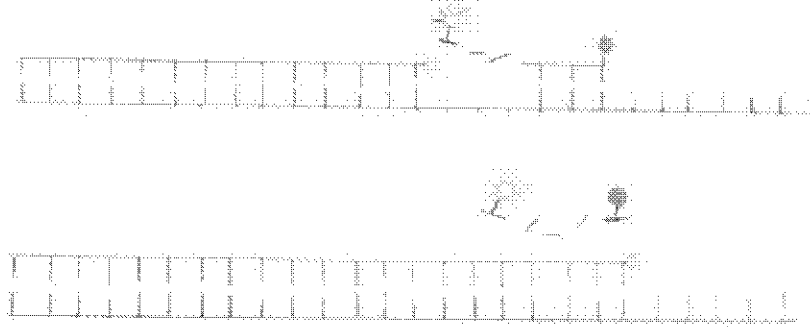
a. Denatürasyon



b. Primer ve prob bağlanması



c. Uzama

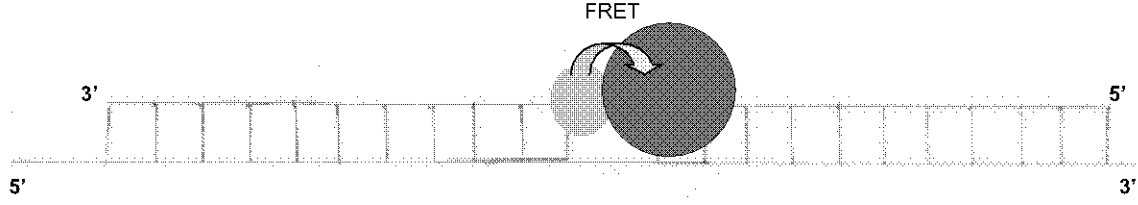


Şekil 2.5 TaqMan tekniğinin aşamaları. Probonun iki ucunda fluorescein ve quencher boyalar bulunmaktadır. Bu boyalar birbirlerini baskırlarlar. Uzama esnasında prob kırılır ve boyaların birbiri üzerindeki baskısı kalkar ve ışımaya gözlenir.

2.2.3 Hibridizasyon Problemleri:

Lee ve arkadaşları, geliştirdikleri floresans işaretli problemlerle; PCR sonrasında probun erimesini analiz etmeyi mümkün kılmışlardır (Lee 1993). Bu problemler diziyeye özgü olup 2 problemden oluşmaktadır. Bu problemlerden bir tanesi, mutasyon içeren bölgeye spesifik tasarlanır, diğeri hemen bunun yakınında (3-5 nükleotid uzaklıkta) yerleştirilmiştir (Dalay 2004). LC-Red 640 işaretli hibridizasyon problemleri, mutasyon olmayan hedef diziyi hibridize ederek işaretleyici prob olarak fonksiyon kazanmasını sağlar. Diğer hibridizasyon probu, floresans ile işaretli olup, mutasyon probuna sıkı olarak bağlanır. İlk aşamada sadece floresans boya ışıldarken, kalıp DNA'ya hibridize olduktan sonra, bu iki prob yakın olacak şekilde yan yana gelirler ve bu floresans boyanın enerjisi Red 640 boyanın ışımaya neden olur. Bu 2 boya arasındaki enerji yayılımına floresans rezonans enerjisi

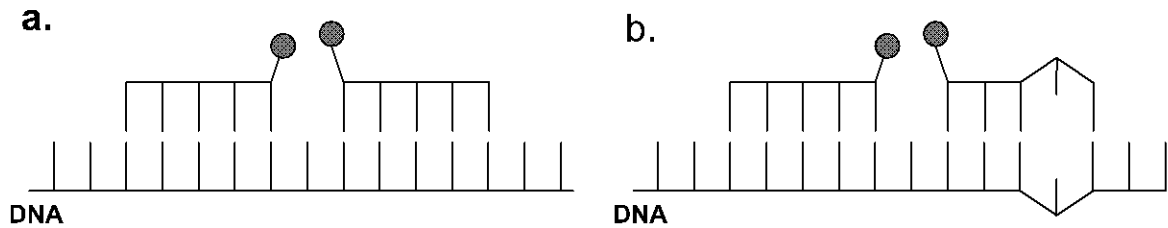
transferi (FRET) denir (Şekil2.6). Bu enerji transferi sonucunda oluşan floresans miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru orantılı olarak artar (Biochemica 1999).



Şekil 2.6 Probların ilki 3' ucunda floresans işaretli donör boya, diğeri 5' ucunda Red 640 işaretli acceptor boya ile işaretlidir.

2.2.3.1 Erime Eğrisi Analizi

PCR döngüleri sırasında annealing aşamasında primerlerle beraber problemler de bağlanır. Bu aşamada problemler yan yana geldikleri ve enerji transferi gerçekleştiğinden dolayı floresans miktarı artar. PCR döngüleri bittikten sonra erime sıcaklığı eğrisi analizi yapılarak sonuçlar belirlenir. Erime eğrisi analizinde; PCR döngülerinden sonra, sıcaklık 0,2°C aralıklarla arttırılır. Hibridizasyon problemleri erime sıcaklıklarına (T_m) geldiklerinde bağlı oldukları DNA dizisinden koparlar. Birbirleri üzerindeki enerji transferi ortadan kalktığı için floresans ışınım miktarı azalır. Eğer DNA dizisinde bir mutasyon varsa, prob ve DNA bire bir örtüşmediği için problemin erime sıcaklığı daha düşük olacaktır. Mutasyon olmayan dizi ile prob birebir örtüşerek bağlandığı için problemin erimesi ve DNA dizisinden ayrılması daha zor olacaktır ve erime sıcaklığı daha yüksek olacaktır (Şekil 2.7). Bazı kompozisyonundaki, nükleotid pozisyonu ve komşu nokta mutasyonlar T_m derecesini etkiler (Wieland 2000)



Şekil 2.7 a) Dizide mutasyon yoksa normal diziyeye spesifik prob ile DNA dizisi birebir örtüşecek şekilde bağlanırlar b) Dizide mutasyon bulunuyorsa bağlanma tam olarak gerçekleşmez.

2.2.4 Real Time PCR Teknolojisinin Üstünlükleri

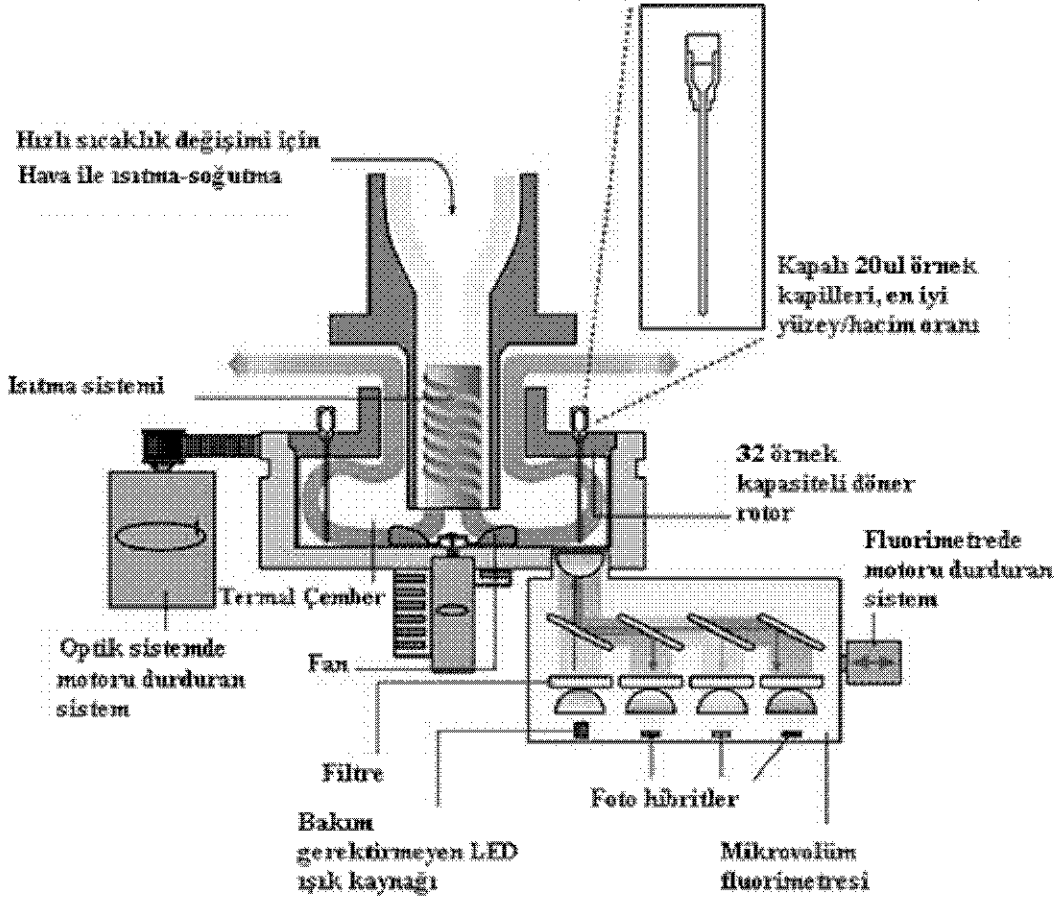
- Floresans boyalar sayesinde eş zamanlı olarak sonuç alınabilir. Her döngü sonunda oluşan ışımlar sayesinde bilgi eş zamanlı olarak ekrana yansır.
- Sonuç almak için ikinci bir tekniğe ihtiyaç yoktur. Klasik PCR da döngüler bittikten sonra RFLP, agaroz jelde yürütme gibi tekniklere ihtiyaç varken, Real Time PCR teknolojisinde örnekler makineye yüklendikten sonra sonuç alınabilmektedir.
- Sonrasında gerekli olan teknikler yüzünden klasik PCR 2 gün sürmesine rağmen, Real Time PCR yaklaşık 40 dk sürmektedir.
- Kapalı bir sistem olmasından ve ikinci bir tekniğe ihtiyaç duyulmamasından dolayı kontaminasyon riski çok azdır.
- Diziye özgü mutasyonu ya da normal diziyi tanıyan problemler kullanıldığından özgü olmayan bir bağlanma görülmez.
- Çok yüksek teknik duyarlılığa ve hassasiyete sahiptir. (Klein 2002; Wieland 2000)

2.2.5 Real Time PCR teknolojisinin Sınırlamaları

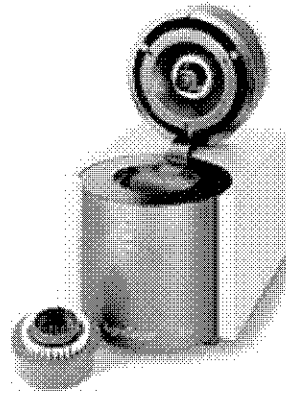
- Kullanılan malzemelerin çok pahalı olması
- Protokol oluşturmak için çok gelişmiş bir teknolojiye ihtiyaç duyulması.
- Sadece bilinen mutasyonları taraması (Klein 2002)

2.2.6 Light Cyler Real Time PCR

Light Cyclers (LC) (Roche, Mannheim, Almanya) (Resim 2.1) 32 örnekle çalışan eş zamanlı olarak sonuç gösteren bir cihazdır. Sıcaklık döngülerini hava akımı sayesinde gerçekleştirir. 530, 640 ve 705nm olmak üzere üç dalga boyunda ölçüm yapmaktadır. FVL taraması için kullanılan 640nm dalga boyudur. Farklı floresans boyalar işaretlenerek farklı genlere aynı anda bakılabilmektedir. Floresans boyalar sayesinde PCR döngülerinin her birinin sonunda ekrana bilgi yansmasıyla gerçek bir eş zamanlı yöntemdir. Sıcaklık iletiminin daha iyi olması için 20µl cam kapiller kullanılır (Resim 2.2). Bu cam kapiller yüzey alanını genişleterek tepkime alanını artırır (Biochemica 1999).



Resim 2.1 Light Cycler Real Time PCR cihazının kısımları



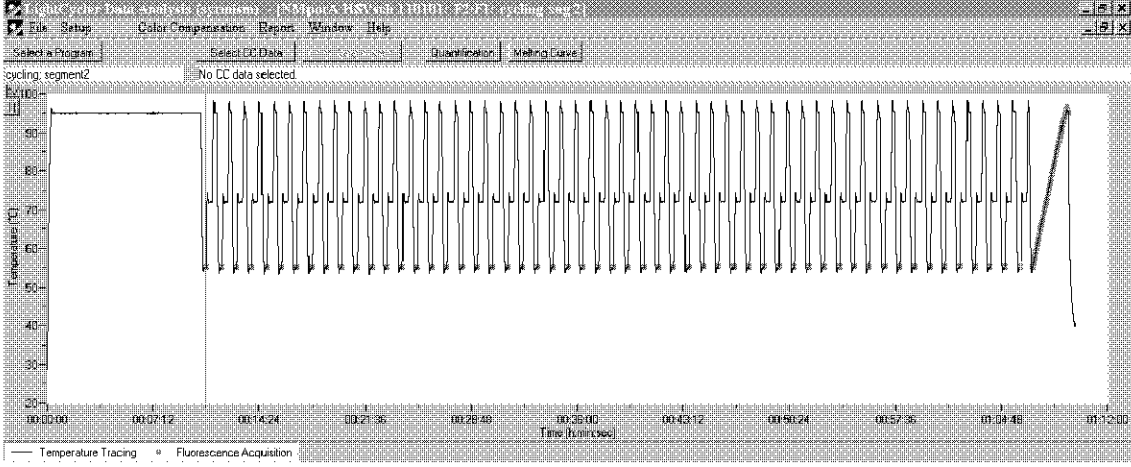
Resim 2.2 Light Cycler Real Time PCR cihazı

2.2.6.1 Light Cycler Cihazında FVL Tanısında Kullanılan Kit ve Protokol

Light Cycler Mutation detection kit 32 hasta için tasarlanmıştır. Bu kit insan FV genindeki 1691 G→A nokta mutasyonu belirlemek için tasarlanmıştır. Bu kit sadece yaşam bilimleri araştırmaları içindir (Biochemica 1999).

FV mutation detection kit 3 tane tüp içerir. Bu tüplerden bir tanesi mutation detection mix ikincisi, reaction mix ve üçüncüsü de pozitif kontrol olarak adlandırılır. Mutation detection mix; FVL gen bölgesini sınırlayacak primerler, floresans işaretli hibridizasyon problemleri ve konsantrasyonu optimize edilmiş Mg^{+2} içermektedir. Reaction mix ise Roche moleküler biyokimyasalları tarafından üretilen Light Cycler DNA master hibridizasyon prob tamponu içermektedir. Bu tamponun içinde; nükleotidler, *Thermus aquaticus* DNA polimeraz ve 10mM Mg^{+2} bulunur. Pozitif kontrol ise heterozigot bir örnektir. Bu örneğin erime sıcaklıkları önceden belirlenmiştir. Normal diziye bağlanan probun erime sıcaklığı 64C°, mutant diziye bağlanan probun erime sıcaklığı ise 56C°'dir. Çalışmalar sırasında örneklerin erime sıcaklıkları pozitif kontrolün erime sıcaklığından $\pm 2C^\circ$ sapma gösterebilir. Bazı durumlarda negatif kontrolde kullanılmaktadır. Negatif kontrol olarak steril PCR için uygun H₂O kullanılmaktadır (Wieland 2000).

Başlangıçta bir denatürasyon basamağından sonra; 45 döngü PCR reaksiyonu gerçekleşmektedir. Bu sırada her döngüde floresans ışına primerlerin bağlandığı annealing fazının sonunda ölçülmektedir. PCR döngüleri bittikten sonra sıcaklık, erime eğrilerini oluşturmak için 45C°'ye düşürülür. Bu sıcaklık DNA ile probun en fazla birleştiği sıcaklıktır. Sıcaklık 0,2C° aralıklarla 75C°'ye yükseltilir. Bu sıcaklık artışı sırasında her basamakta floresans ışına miktarları ölçülür (Şekil 2.8). Böylece floresans işaretli boyanın kaç derecede eridiği belirlenir ve erime eğrisi çizilir (Wieland 2000).



Şekil 2.8 Real Time PCR teknolojisinde PCR ve erime sıcaklığı analizi grafiği

2.2.6.2 Light Cyler ile Bulunan Mutasyonlar

Pozitif kontrolün erime sıcaklığı ile örneklerin erime sıcaklıkları arasında $\pm 2^{\circ}\text{C}$ farklılıklar olabilir. Bu $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'lik sapmadan daha fazla bir sapma gözlenirse, erime sıcaklığını etkileyen faktörlere bakılması gerekmektedir (Akar 2006). Bu faktörlerden bir tanesi komşu bölgelerdeki nokta mutasyonlardır. Bu sapmalardan yola çıkılarak DNA dizi analizleri yapılmış ve protrombin geni; C20209T (Akar 2006), A20207C (Lyon 2001), A20218G (Weiskirchen 2005) ve C20221T (Klinger 2001) değişimleri, faktör V geninde; C1690T (Benson 2005), A1696G (Lyon 2004), 1690 delC (Lyon 2004), G1689A (Wittwer 1998) değişimleri ve MTHFR geninde; C685G, G679A (Wittwer 2003) gen değişimleri bulunmuştur (Lyon 2005).

3. MOLEKÜLER TEKNİKLER

3.1 Kullanılan Çözeltiler

Bu çalışmada DNA izolasyonunda kırmızı kan hücrelerini lize etmek için RBC (Red Blood Cell) lizis çözeltisi [155 mM Amonyum Klorid (Applichem, Almanya), 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (Applichem, Almanya)] ve fenol/kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), izoamil alkol (Merck, Almanya)] karışımı kullanılmıştır.

3.2 DNA Ekstraksiyonu

Genomik DNA'lar, kan örneklerinden proteinaz K, fenol/kloroform yöntemiyle izole edilmiş ve etanol ile muamele edilerek çöktürülmüştür.

3.3 Real Time PCR

Gerçek zamanlı PCR sistemi, polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına ulaşmak için harcanan zamanı azaltmaktadır. Ayrıca kullanıcının PCR ürünlerinin amplifikasyonunu aynı zamanda, eş zamanlı olarak görüntülenmesine olanak sağlarken, tek bir reaksiyondan elde edilen bilginin miktarını en üst seviyeye çıkarabilmek üzere geliştirilmiştir. Sistem, gen ekspresyonunun miktarını belirlenmesinde (Giulietti 2001), tek nükleotid polimorfizmlerinin tayini, virüslerin miktarının belirlenmesinde (Niesters 2001; Mengelle 2003), patojenlerin tespitinde (Uhl 2002; Mackay 2004; Perandin 2004), DNA hasar tespitinde (Dietmaier 2001) ve metilasyon tespitinde (Trinh 2001; Cottrll 2004) kullanılabilir. Ayrıca PCR'nin kısa sürede tamamlanması için hızlı ısı döngüsü kullanılmaktadır. PCR ürünlerini erime eğrisi analizi programları kullanarak yeni sınırları araştırmamıza yardımcı olarak daha önceden ulaşılabilenin aksine daha zengin bir bilgiye sahip olabilmeye olanak sağlamaktadır. Real-Time PCR, üstün kopyalama yeteneği, hassasiyet ve dinamik alan gibi performans sağlamaktadır. PCR uygulamalarında optimum performansa ulaşabilmek için geliştirilmiştir(Roche, Molecular Biochemicals Light Cycler System). Hata payı yüzde birin altındadır.

3.4 DNA Dizi Analizi

DNA'nın nükleotid dizilerinin saptanması anlamına gelen DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında birçok bilgi edinmemizi sağlamıştır. Rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesine paralel olarak 1970'li yılların sonuna doğru etkin ve doğrudan dizi analizine yönelik yöntemler geliştirilmeye başlanmıştır (Öner 2002).

Nükleotid dizilerinin belirlenmesinde Maxam-Gilbert'in kimyasal yöntemi ve Sanger'in enzimatik yöntemi olmak üzere iki temel yöntem vardır (Akar 1999).

Maxam-Gilbert'in yöntemi, DNA'nın baza özgül kimyasal kesimine dayanmaktadır (Cooper 1997). İlk olarak, dizi analizi yapılacak DNA parçasının komplementer zincirinden ayırıp, zincirlerden biri kullanılır. Dizisi saptanacak zincir, 5' ucundan radyoaktif olarak işaretlenir. Analiz her birinde bazlardan biri için kimyasal kesimin meydana geldiği dört ayrı reaksiyon karışımında gerçekleşir. Her karışıma DNA'daki bazlardan birini tahrip edecek şekilde bir kimyasal madde eklenir. Hasar görmüş nükleotidlerin bulunduğu yerlerden DNA yapısı fosfodiester bağlarından kırılır (Akar 1999). Dört örnek karışımı daha sonra uzunluklarına göre elektroforetik olarak ayrılacakları poliakrilamid jel üzerinde, yan yana dört paralel kuyuya uygulanır (Lüleci ve ark 2000). DNA parçalarının uçları radyoaktif olarak işaretli olduğu için otoradyografi yapılarak bantlar görüntülenir (Öner 2002).

Sanger'in enzimatik yöntemi, dizi analizi yapılacak DNA parçasının 5'-3' yöndeki ipliğinin sentezini belirli bazlarda durdurma esasına dayanır (Lüleci ve ark 2000). Dizi analizi yapılacak DNA parçasının sentezi için dört reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir reaksiyon karışımı; DNA polimeraz, DNA parçalarının görüntülenebilmesi için biri radyoaktif ya da flokrom boyalarla işaretli deoksिनükleotit trifosfatları(dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve dört dideoksिनükleotit trifosfatdan (ddATP, ddGTP, ddCTP, ddTTP) sadece birini içerir. Dideoksिनükleotit trifosfatlar 3' OH grubu yerine H atomu içerir. Bu nedenle DNA sentezi dideoksिनükleotit'in eklenmesi ile durdurulur ve farklı uzunluklarda DNA parçacıkları elde edilir. Örnekler aynı jel üzerinde farklı kuyucuklara yüklenerek elektroforeze tabi tutulduklarında her biri bir nükleotid farkla birbirlerinden ayrılmış bantlar gözlenir. Bu bantlar yukarıdan aşağıya doğru okunarak dizi saptanır. Bugün bu temel prensiple çalışan otomatik sekans aletleri üretilmiştir. Bunların temel farkı radyoaktif

izotoplar yerine floresan boyalarla işaretlenmiş olmalarıdır. Sistem, üzerindeki laser ışığı ile farklı özellikteki floresan boyaları algılar, her nükleotid için ayrı renkte bir pik oluşturarak, nükleotid dizisini belirler (Öner 2002).

3.5 Spektrofotometrik Ölçümler

NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spektrofotometre küçük hacimli numunelerle yüksek doğruluk ve tekrarlanabilirlikte ölçümler yapabilmektedir. Patentli numune tutma sistemi sayesinde küvet ya da kapiler kullanımına gerek kalmamaktadır. Yüksek absorbans kapasitesi sayesinde kullanıcıyı dilüsyon yapmaktan kurtarmaktadır. Ölçüm yapılırken örneği bir kolon halinde tutabilmek için yüzey gerilimi kullanılmaktadır. 2µl örneği bir pedalin üzerine pipetlenir, ölçüm kolonu iki optik fiberler arasında oluşturulur ve ölçüm yapılır. Tüm bu işlemler 10 saniyeden daha az zamanda gerçekleştirilir. 220-750nm dalga boyunda ölçüm yapabilmektedir. Sonuçlar bilgisayar ekranından gözlenir.

4. MATERYAL VE YÖNTEMLER

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana Bilim Dalı; Pediatrik Moleküler Patoloji ve Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. 2002–2008 yılları arasında bölümümüze tromboz tanısı ile gelen ve Light Cycler Real Time PCR cihazı ile Faktör V 1691 G-A değişimi çalışılan 4100 hasta çalışma grubu olarak belirlenmiştir. DNA örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı DNA Bankası'ndan temin edilmiştir. Çalışmaya katılan tüm ailelere çalışmanın olası sonuçları hakkında bilgi verilmiş ve gönüllü olarak katıldıklarına dair onay formu alınmıştır.

Bölümümüze başvuran hastalardan alınan kan örneklerinden Fenol Kloroform yöntemiyle DNA elde edilmiş, elde edilen DNA'larda FVL mutasyonu taraması için Light Cycler "Factor V Leiden" Mutation Detection System (Roche Diagnostics, USA) kitleri kullanılmıştır.

Bu örneklerin sonuçları arşivden çıkarılarak tekrar değerlendirilmiş, $\pm 2^{\circ}\text{C}$ üzerinde sapma gösteren örneklerin DNA'ları DNA dizi analizine sokulmuştur. Proje, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenen "tromboz" konulu projeler bağlamında desteklenmiştir.

4.1 YÖNTEMLER

4.1.1 DNA İzolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan 1 ml 0,5 M etilendiamintetraasetikasit (EDTA) (Sigma, ABD) içeren polietilen tüp içerisine 9 ml kan örneği alınır. Alınan kan örneği 50 ml lik flakon tüp içerisinde 25 ml RBC (Red Blood Cell) lizis solüsyonu [155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya), 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya), 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)] eklenir, çalkalanarak 20 dk buzda bekletilir. Soğumalı santrifüjde (Hettich, Almanya) $+4^{\circ}\text{C}$ 'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülür, çökelek üzerine tekrar 25 ml RBC Lizis solüsyonu

eklenir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanır. Son kez süpernatant döküldükten sonra dipte kalan lökositler üzerine 1000 µL RBC lizis solüsyonu eklenir ve bu karışımın 800 µL'si ependorf tüpüne alınarak -20 ° C'de stok olarak saklanır. Geriye kalan 200 µL bir ependorf tüpüne alınarak üzerine 20 µg/mL olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (Merck, Almanya) ve lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu [10 mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH: 8, 100 mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1 mM pH: 8,0 EDTA (AppliChem, Almanya)] eklenerek bir gece 56 °C'de sıcak su banyosunda bekletilir.

İkinci gün tüplere 1:1 oranında Fenol/Kloroform [Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya)], izoamil alkol (Merck, Almanya) eklenerek 10 dk çalkalanır ve buz içerisinde 20 dk bekletildikten sonra +4 °C'de 4000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10' u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95'lik alkol (Türkiye) eklenir. Ependorf tüpü ters düz edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20 °C' de bir gece bekletilir.

Üçüncü gün tüpler +4 °C' de 4000 rpm' de 20 dk santrifüj edilerek DNA çöktürülür. Süpernatant dökülerek tüpe 500 µL %70' lik alkol eklenerek +4 °C' de 4000 rpm' de 20 dk santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında alkol dökülür ve tüpler kuruma kağıdı üzerinde kapakları açık bir şekilde kurumaya bırakılır. Kurutulduktan sonra tüplerin içerisine Tris EDTA (10 mM Tris – HCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenir 37 °C' de bir gece bekletilerek DNA' nın çözünmesi sağlanır. İzole edilen DNA +4 °C' de veya -20 °C' de saklanır.

4.1.2 FV 1691 G-A Değişiminin Belirlenmesi

FV geninde ortaya çıkan, 1691. pozisyonadaki G – A baz değişiminin belirlenmesinde gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu prensibine uygun olarak tasarlanmış özel bir cihaz olan Light Cyler (Roche Diagnostics, USA) kullanılır. FV Leiden gen mutasyonunu belirlemek için LC Factor V Leiden Mutation Detection (Roche Diagnostics, USA) kiti kullanılmıştır. Faktör V geninin 222 baz çiftlik fragmenti insan

genomik DNA'sından sağlanan spesifik primerler ile amplifiye edildi. Reaksiyon karışımı insan genomik DNA'sı kullanılarak cam kapiller tüplerde hazırlandı ve Real Time PCR cihazı (Light Cycler, Roche Diagnostics, USA) kullanılarak analiz edildi.

Light Cycler cihazında FVL mutasyonu analizinde kullanılan primerler F: 5'TCAGGCAGGAACAACACCAT3'; R: 5'ATACAGGTATTTTGTCC3'(Rahimi 2007) ve normal diziyi tanıyan prob dizisi 5'GACAGGCGAGGAATACAGGTATT 3'(Frank 2000)'dür.

4.1.3 DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi için yapılan polimeraz zincir reaksiyonunda, daha geniş bir bölgeyi çoğaltan ikinci bir primer dizisi kullanılmıştır. 267bç'lik bir bölge F: 5'TGCCCAGTGCTTAACAAGACC3'; R: 5'TTAGCACCAGTGTGATAACA3' primer dizisi kullanılarak çoğaltıldı(Muniz 2008). Bu PCR programı için sıcaklık koşulları; 94°C'de 5 dk denatürasyon, 30 döngü olarak 94°C'de 1 dk denatürasyon, 54°C'de 1 dk hibridizasyon, 72°C'de 1 dk uzama ve 72°C'de 5 dk son uzama olarak gerçekleştirilmiştir. %70'lik, %95'lik alkol ve 1,5 M Sodyum Asetat kullanarak, alkol presipitasyonu ile saflaştırma yapılmıştır. Forward primer kullanılarak DNA dizi analizi yapılmıştır.

Bu çalışmada nükleotit dizisinin belirlenmesi için Sanger'in enzimatik yöntemi esasına dayalı, tam otomatik kapiller sistemle çalışan bir DNA dizi analizi cihazı kullanılmıştır (Beckman Coulter, ABD).

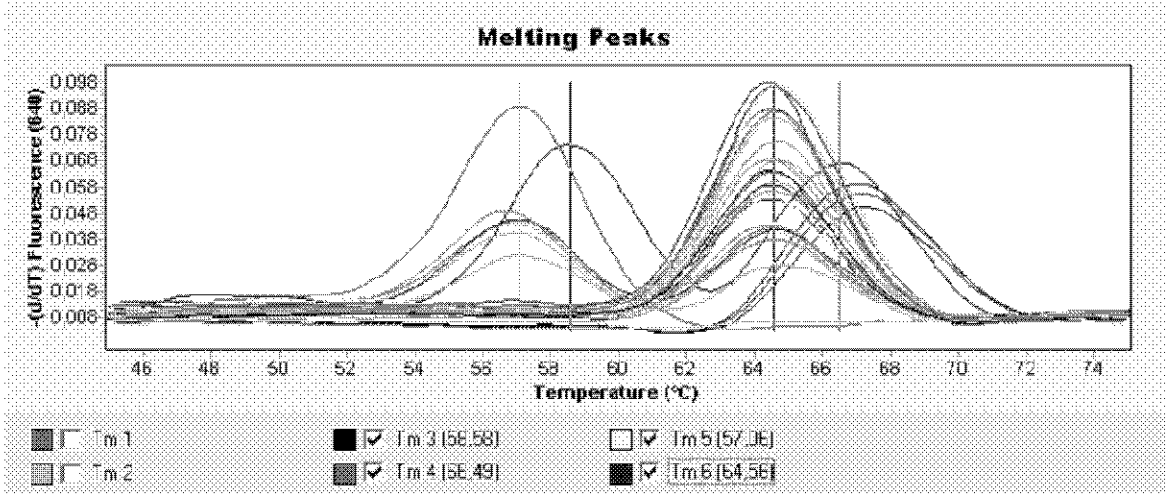
5. BULGULAR

Yaptığımız çalışmada, tromboz gen taraması istemiyle gelen ve rutin olarak gerçek zamanlı PCR ile Faktör V geni çalışılan 4100 hasta sonucu taranmıştır.

5.1 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Bulguları

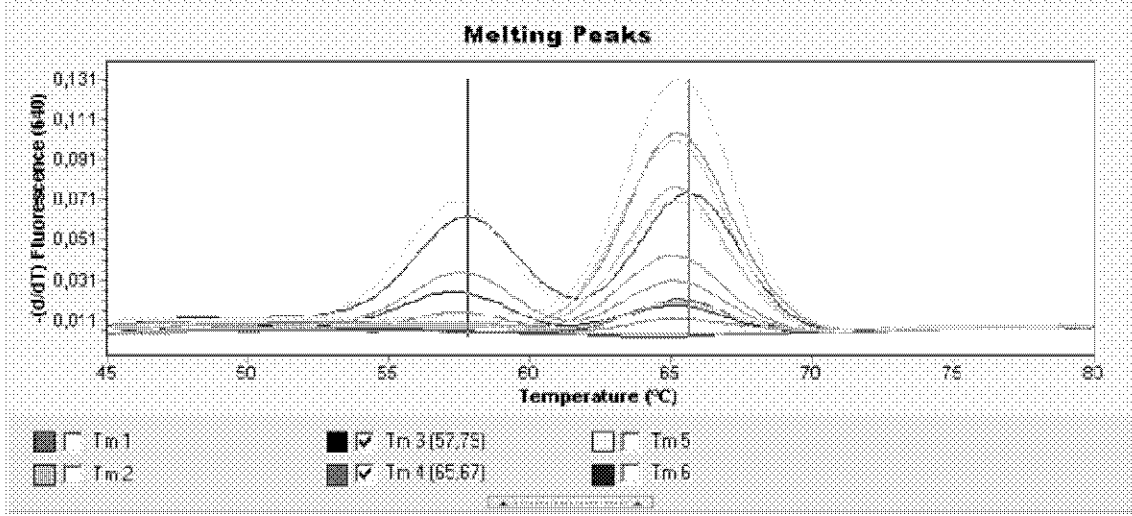
Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, Roche Diagnostics firması tarafından üretilen Light Cyler cihazında yapılmıştır. Daha önceden rutin olarak çalışılan 4100 hasta sonucu pozitif kontrolün erime sıcaklıklarına göre karşılaştırılmıştır.

4100 hasta sonucunun incelenmesin ardından, 13 hastanın erime sıcaklığının pozitif kontrolden $\pm 2C^{\circ}$ sapma gösterdiği gözlenmiştir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1 Sapma gösteren 13 örneğin erime sıcaklığı eğrisi. Tm3 ve Tm 4 pozitif kontrole ait erime sıcaklıkları, Tm5 ve Tm6 örneklerin erime sıcaklıkları

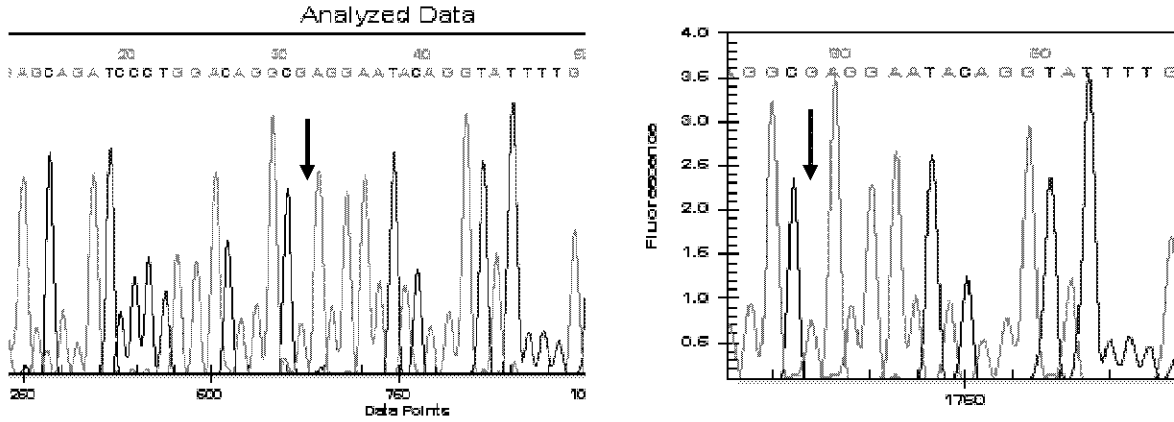
12 örnek DNA bankamızdan yeniden izole edilmiş ve Light Cyler cihazında Faktör V kit protokolüne göre hazırlanıp tekrar çalışma yapılmıştır. Bir örnek DNA bankasında bulunamamış, yeniden izole edilememiştir. Bu çalışmanın sonucunda 12 hastanın pozitif kontrolden $\pm 2C^{\circ}$ 'den fazla sapma göstermediği gözlenmiştir (Şekil4.2).



Şekil 5.1. İzolasyon sonrasında 12 hastanın erime sıcaklıkları ve pozitif kontrolün erime sıcaklığı

5.2 DNA Dizi Analizi Bulguları

12 hastanın DNA dizi analizi Bechman Coulter(USA) cihazı ile forward primer kullanılarak yapılmıştır. DNA dizi analizi sonucunda sonuçların sapmaya neden olacak başka bir mutasyon taşımadıkları gözlenmiştir(Şekil 4.3).



Şekil 5.2 FV G1691A değişimi ve çevresindeki baz dizisi

5.3 Nanodrop Ölçümleri

Her DNA örneği için spektrofotometre (Nanodrop ND-100, USA) ile miktar ve saflık tayini yapıldı (Çizelge 5.1. ve Çizelge 5.2.).

Ad Soyad	260/280	260/230	Ng/ μ l	Absorbans	PH	Sapma
S. B.	2,02	0,4	75,3	3,461	5,5	3,11
V. A.	1,82	1,6	514,7	6,417	5	2,76
İ. Y.	1,88	0,91	116,1	2,556	7,5	2,16
N. K.	1,9	0,39	11,8	0,611	5,5	2,16
E. İ.	1,85	0,44	9,5	0,433	5,5	2,16
B. Ç.	1,86	1,39	126,4	1,817	5,5	2,11
B. B.	1,88	0,57	108,2	3,808	8	2,07
M. T.	1,88	0,5	52,4	2,098	8	2,06
Y. B.	1,47	0,53	39	1,477	6	2,05
A. B.	2,16	0,39	19,4	0,908	5,5	2,02
E. Ş.	1,89	0,93	52,7	1,133	6	2,00
R.B.G.	1,93	1,44	29	1,318	6,5	2,00

Çizelge 5.1. Sapma gösteren örneklerin nanodrop ölçümleri. 260/280: 260nm ve 280nm de ölçülen absorbansların oranı. Bu oran DNA'nın saflığını belirler. Saf DNA için bu değer yaklaşık 1.8 olması gerekir. 260/230: 260nm ve 230 nm de ölçülen absorbansların oranı. Bu oran nükleik asidin saflığını belirler. Saf nükleik asit için bu değer 1.8-2.2 arasında olmalıdır.

Ad Soyad	260/280	260/230	Ng/ μ l	Absorbans	PH	Sapma
S. B.	1,83	1,52	217,5	2,86	5,5	0,5
V. A.						
İ. Y.	1,83	2,05	563,4	5,504	5,5	0,5
N. K.	1,84	1,45	182,3	2,511	5,5	0,4
E. İ.	1,89	0,94	83,1	1,765	5,5	0,5
B. Ç.	1,87	1,36	119,7	1,757	5,5	0,5
B. B.	1,87	1,76	248,4	2,824	5,5	0,5
M. T.	1,84	1,39	137,2	1,974	5,5	0,3
Y. B.	1,83	2,21	2439,9	22,063	5,5	0,6
A. B.	1,85	1,73	347,1	4,011	5,5	0,4
E. Ş.	1,84	1,88	349	3,711	5,5	0,4
R.B.G.	1,73	0,9	82,9	1,833	5,5	0,6

Çizelge 5.2. Sapma gösteren örneklerin DNA bankasından yeniden izolasyon sonrasında nanodrop ölçümleri

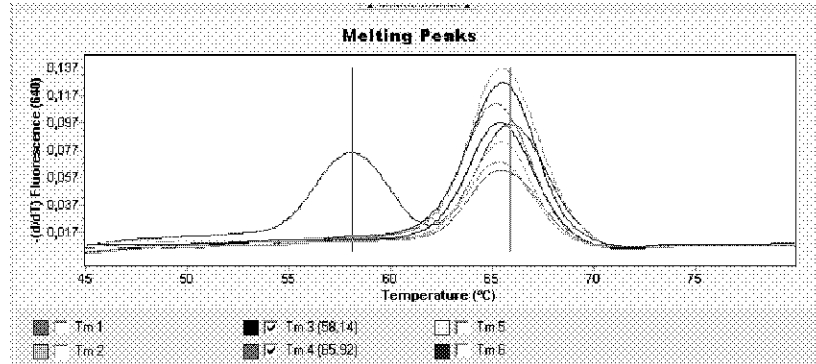
5.4 Tris-EDTA değerleri

DNA izolasyonun son basamağında; DNA'nın çözünmesi Tris EDTA (TE) solüsyonu içerisinde gerçekleşir. Bu solüsyon hazırlanırken 1ml (1M, pH:8) Tris-HCl ve 0.2ml

(0.5M, pH:8) EDTA konarak son hacim 100ml'ye tamamlanır. Bu solüsyonda oluşabilecek değişikliklerin sapma gösterip göstermeyeceğini gözlemek için, Tris-HCl ve EDTA konsantrasyonlarını değiştirerek yeni solüsyonlar hazırladık. Bu solüsyonların formülü:

- 2M Tris-HCl + 0.5M EDTA
- 3M Tris-HCl + 0.5M EDTA
- 4M Tris-HCl + 0.5M EDTA
- 1M EDTA + 1M Tris-HCl
- 1.5M EDTA + 1M Tris-HCl
- 2M EDTA + 1M Tris-HCl
- 1M Tris-HCl + 0.5M EDTA(normal solüsyon)

Sonucunda sapma olan hastalardan bir tanesinden 3µl DNA örneği alındı ve üzerine 3µl farklı TE solüsyonları eklendi. Light Cycler Real Time PCR ile çalışıldı ve sonuçların 1°C'den fazla sapma göstermediği gözlendi(Şekil 4.4).



Şekil 4.4 Farklı TE konsantrasyonlardaki örneklerin erime sıcaklıkları. TE konsantrasyonlarını değiştirerek 8 örnek hazırlandı ve Real Time PCR ile çalışıldı. 8 Örneğin sonucunda pozitif kontrolden $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'den fazla bir sapma gözlenmedi

6. TARTIŞMA

Yapılan moleküler çalışmaların tümü DNA izolasyonu ile başlar. DNA izolasyonunun kalite ve kantite olarak nitelikleri yapılan çalışmayı etkilemektedir. İzolasyon esnasında kullanılan kimyasal maddeler hem PCR'ı hem de PCR sonrasında değerlendirme işlemlerini de doğrudan etkilemektedir.

Gerçek zamanlı analiz sistemlerinde, erime sıcaklığı analizi ile probun bağlı olduğu bölgedeki değişiklikler ayırt edilebilir. Bu sistemlerde özellikle de, kullandığımız Light Cycler Real Time PCR sisteminde Hibrit prob teknolojisine bağlı olarak erime eğrisi analizi yapıldığı için; baz kompozisyonu, nükleotidin yeri ve dış etkenler, erime eğrisi derecesini etkilemektedir (Lyon 2005).

FV G1691A değişimi için incelediğimiz örneklerde pozitif kontrole göre erime sıcaklıkları değerlendirildiğinde sapma gösteren örnekler belirlenmiştir. Bu örneklerin DNA dizi analizleri yapıldığında probun bağlanma bölgesinde, aradığımız değişimden farklı bir mutasyon gözlenmemiştir. Bu örnekler oluşan sapmanın nedenini araştırmak amacıyla DNA bankamızdan klasik fenol kloroform yöntemi kullanılarak, tekrar izole edilmiştir.

Tekrar izole edilen örnekler Light Cycler ile çalışıldığında pozitif kontrolün erime sıcaklığı ile aynı sıcaklık değerleri gözlenmiştir.

Erime eğrisi analizinde sapma gösteren örnekler, yeniden izole edilen DNA örnekleri ile DNA kalitesi ve kantitesi açısından nanodrop cihazında spektrofotometrik ölçümler ile karşılaştırılmıştır. DNA'nın spektrofotometrik ölçümlerinde 260/280 oranı DNA'nın saflığını ve kalitesini belirlemektedir. Bu oranın 1.8'den fazla olması örneklerde protein, fenol ve diğer kirlenmeler bulunduğunu göstermektedir. 260/230 oranı ise nükleik asidin saflığını belirler. Bu oran 1.8 ile 2.2 arasında bulunmalıdır. Daha düşük bir değerde olması ise içinde izolasyon sırasında kullanılan saflaştırmaya yardımcı olan maddelerin varlığını gösterir.

Örneklerin 260/280 oranlarına bakıldığında izolasyon öncesinde farklı değerlerde iken yeniden izolasyon sonrasında bu örneklerde kirlilik ortadan kalkmış ve erime eğrisi analizinde pozitif kontrole göre sapma gözlenmemiştir.

Örneklerin 260/230 oranlarına bakıldığında ise sonuçların 1.8 değerden çok daha düşük olduğu ve bu değerlerin izolasyon sonrasında normal sınırlara yaklaştığı gözlenmiştir.

Light Cycler cihazında, erime sıcaklığındaki sapmalar birçok etkene bağlı olabilir. Bunlar aradığımız nokta mutasyonun yakınında farklı bir mutasyon varlığını işaret etmektedir. Ancak izolasyon sırasında kullanılan maddelerin iyi temizlenmemesinin de etki eden nedenler arasında olduğunu söylenebilir. Ayrıca DNA'ların başka çalışmalarda kullanımı sırasında ki kontaminasyonları ve çalışma esnasında oluşan kontaminasyonlar da bu sapmalara neden olmaktadır. Çalışmalarda DNA'nın kalite ve kantite verileri analizlerin doğruluğu açısından önem kazanmaktadır.

Elde ettiğimiz sonuçlar; bu kadar gelişmiş teknolojik sistemlerde bile standardizasyonun önemini vurgulamaktadır.

7. KAYNAKLAR

Akar N. Trombozda Moleküler Değişimler. Ulutin O, Cin Ş(Editörler). Neonatal hemoztaz ve tromboz. Ankara: Öncü Limited;1999. s.41-57.

Akar, N. (1999). Klinik Moleküler Patolojiye Giriş. İkinci Baskı. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antıp A.S. Yayınları.

Altınışık J. Trombozlu Hastalarda Faktör V Leiden (G1691A) ve Protrombin G20210A Mutasyonlarının Araştırılması. T.C. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik Ana Bilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul, 2001

Anholt RR, Mackay TF. Quantitative genetic analyses of complex behaviours in *Drosophila*. *Nat Rev Genet*. 2004 Nov;5(11):838-49.

Başaran N. Faktör V Leiden Mutasyonu. *Anadolu Kardiyoloji Dergisi*.1(4): 246,2001

Bell CA, Uhl JR, Hadfield TL, David JC, Meyer RF, Smith TF, Cockerill FR 3rd. Detection of *Bacillus anthracis* DNA by LightCycler PCR. *J Clin Microbiol*. 2002 Aug;40(8):2897-902.

Bertina RM, Koeleman BP, Koster T, Rosendaal FR, Dirven RJ, de Ronde H, van der Velden PA, Reitsma PH. Mutation in blood coagulation factor V associated with resistance to activated protein C. *Nature*. 1994 May 5;369(6475):64-7.

Beutler E, Lichtman M.A., Coller B.S., Kipps T.J, Seligsohn V. *Williams Hematology*. 6rd ed. 2001

Cooper, G.M. (1997). *The Cell A Molecular Approach*. North America: Oxford University Press.

Cottrell SE. Molecular diagnostic applications of DNA methylation technology. *Clin Biochem*. 2004 Jul;37(7):595-604.

Cripe LD, Moore KD, Kane WH. Structure of the gene for human coagulation factor V. *Biochemistry*. 1992 Apr 21;31(15):3777-85.

Dahlback B, Carlsson M, Svenson PJ: Familial Thrombophilia due to a Previously Unrecognized Characterized By Poor Anticoagulant Response To Activated Prediction of a Cofactor to Activated Protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 1004-1008,1993.

Dahlbäck B, Hildebrand B. Inherited resistance to activated protein C is corrected by anticoagulant cofactor activity found to be a property of factor V. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Feb 15;91(4):1396-400.

Dahlbäck B. Blood coagulation. *Lancet*. 2000 May 6;355(9215):1627-32.

Dahlbäck B. Inherited thrombophilia: resistance to activated protein C as a pathogenic factor of venous thromboembolism. *Blood*. 1995 Feb 1;85(3):607-14.

Dahlbäck B. Physiological anticoagulation. Resistance to activated protein C and venous thromboembolism. *J Clin Invest*. 1994 Sep;94(3):923-7.

Deligezer U, Akışık E, Dalay N. Gen polimorfizm analizinde light cycler floresan pcr tekniğinin kullanılması: Myeloid lösemili çocuk ve yetişkin hastalarda MTHFR C677T gen polimorfizm dağılımının belirlenmesi. *Türk Onkoloji Dergisi*, Cilt 19, Sayı 4, 2004.

Dietmaier W, Hofstädter F. Detection of microsatellite instability by real time PCR and hybridization probe melting point analysis. *Lab Invest*. 2001 Oct;81(10):1453-6.

Erali M, Schmidt B, Lyon E, Wittwer C. Evaluation of electronic microarrays for genotyping factor V, factor II, and MTHFR. *Clin Chem* 2003;49:732-9.

Gibson UE, Heid CA, Williams PM. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):995-1001.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001 Dec;25(4):386-401.

Griffin JH, Evatt B, Wideman C, Fernández JA. Anticoagulant protein C pathway defective in majority of thrombophilic patients. *Blood*. 1993 Oct 1;82(7):1989-93.

Grove DS. Quantitative real-time polymerase chain reaction for the core facility using TaqMan and the Perkin-Elmer/Applied Biosystems Division 7700 Sequence Detector. *J Biomol Tech* 1999;10:11-6

Guyton, A.C: Hemostasis and Blood Coagulation. *Textbook of Medical Physiology*, 8th. Edition. Ch.36,p: 390 – 99.An ABJ International Edition, W.D. Saunders Company, Philadelphia,1991.

Haliloğlu B. Açıklanamayan Tek Bir 3.Trimester Fetal Kayıp Olgularında Faktör V Leiden Ve Protrombin Gen Mutasyonunun Yeri. T.C. Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniği, Uzmanlık Tezi, İstanbul 2004.

Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res*. 1996 Oct;6(10):986-94.

Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, Watson R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N Y)*. 1993 Sep;11(9):1026-30.

Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Aug 15;88(16):7276-80.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/2001>

http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/BIOCHEMI/no:3_99/PG12.PDF

İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalm S, Süleymanlar G. Pıhtılaşma Bozuklukları. Temel İç Hastalıkları. Güneş Kitapevi, Ankara, 1996:s: 1350 – 1370.

Jadaon MM, Dashti AA, Lewis HL. Factor V Kuwait: a novel mutation in the coagulation factor V gene discovered in Kuwait. *Med Princ Pract.* 2007;16(3):244-5.

Jolyon J, Yale N. The pathways of blood coagulation. In: Beutler E, Lichtman MA, Coller BS, Kipps TS (Eds.). *Williams hematology.* 5th ed. New York: McGraw-Hill Inc;1995. p.1227–38.

Kane WH, Davie EW. Cloning of a cDNA coding for human factor V, a blood coagulation factor homologous to factor VIII and ceruloplasmin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Sep;83(18):6800–4.

Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med.* 2002 Jun;8(6):257-60. Review.

Kujovich JL. Factor V Leiden Thrombophilia In: *GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource.* Copyright, University of Washington, Seattle.1997-2004. Available at <http://www.genetest.org>

Lay MJ, Wittwer CT. Real-time fluorescence genotyping of factor V Leiden during rapid-cycle PCR. *Clin Chem.* 1997 Dec;43(12):2262–7.

Lee LG, Connell CR, Bloch W. Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res.* 1993 Aug 11;21(16):3761-6.

Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, et al. Genotyping of single nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem* 2004;50:1156–64.

Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K. Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl.* 1995 Jun;4(6):357-62.

Lucotte G, Mercier G. Population Genetics of Factor V Leiden in Europe. *Blood Cells, Molecules and Diseases.* 27(2):362–367,2001

Lüleci, M., Sakızlı, M., Alper, Ö. (2000). *Renkli Genetik Atlası.* İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi.

Lyon E, Millson A, Phan T, Wittwer CT. Detection and identification of base alterations within the region of factor V Leiden by fluorescent melting curves. *Mol Diagn* 1998;3:203–10.

Lyon E. Discovering rare variants by use of melting temperature shifts seen in melting curve analysis. *Clin Chem.* 2005;51(8):1331-2.

Mahadevan MS, Benson PV. Factor V null mutation affecting the Roche LightCycler factor V Leiden assay [Technical Brief] *Clin Chem* 2005;51:1533–5.

Mahadevan MS, Benson PV. Factor V null mutation affecting the Roche LightCycler factor V Leiden assay. *Clin Chem*. 2005 Aug;51(8):1533-5.

Meadows CA, Warner D, Page S, Lyon E. Detection of novel mutation using fluorescent hybridization probes and melting temperature analysis [Abstract]. *J Mol Diagn* 2001;3:195.

Nauck M, März W, Wieland H. Evaluation of the Roche diagnostics LightCycler-Factor V Leiden Mutation Detection Kit and the LightCycler-Prothrombin Mutation Detection Kit. *Clin Biochem*. 2000 Apr;33(3):213-6.

Niesters HG. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. *Methods*. 2001 Dec;25(4):419-29.

Öner, C. (2002). *Genetik Kavramlar.6. Baskıdan Çeviri*. Ankara: Palme Yayıncılık.

Özdağ H, Eğin Y, Akar N. Prothrombin gene 20209 C >T along with the first description of a homozygous polymorphism at the 3' downstream region +4 C >T in the Turkish population. *Lab Hematol*. 2006;12(3):131-3.
PE Biosystems. DNA/RNA Real Time Quantitative PCR

Perandin F, Manca N, Calderaro A, Piccolo G, Galati L, Ricci L, Medici MC, Arcangeletti MC, Snounou G, Dettori G, Chezzi C. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*. 2004 Mar;42(3):1214-9.

Rahimi Z, Vaisi-Raygani A, Nagel RL, Muniz A. Thrombophilic mutations among Southern Iranian patients with sickle cell disease: high prevalence of factor V Leiden. *J Thromb Thrombolysis*. 2008 Jun;25(3):288-92.

Rosen S.B, Sturk A. Activated protein C resistance – A major risk factor for thrombosis. *Eur J. Clin.Chem.Clin Biochem* 1997, 35(7): 501-516.

Salzman E W. Plasma coagulation factors. In:Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW(Eds.). *Hemostasis and trombosis basic principles and clinical practice*. 3rd ed. Philadelphia:JB. Lippincott Co;1994. p.3–18

Salzman EW, Hirsh J. The epidemiology, pathogenesis and natural history of venous thrombosis. In: Colman RW, Hirs J, Marder VJ, Salzman EW(Eds.). *Hemostasis and thrombosis. Basic principles and clinical practice*. 3rd ed. Philadelphia: J.B Lippincott Co; 1994. p. 1275–96.

Sılan, F., Zafer, C.: Faktör V Leiden Mutasyonu. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 2004: 1: 33 -36.

Smith C, Marks A, Lieberman M. *Marks' Basic Medical Biochemistry A Clinical Approach*. Lippincott Williams & Wilkins.2. edition,2007.

Tag CG, Schiffllers M-C, Mohnen M, Gressner AM, Weiskirchen R. Atypical melting curve resulting from genetic variation in the 3'-untranslated region at position 20218 in the

prothrombin gene analyzed with the LightCycler factor II (prothrombin) G20210A assay [Letter]. Clin Chem 2005;51:1560-1.

Trinh BN, Long TI, Laird PW. DNA methylation analysis by MethyLight technology. Methods. 2001 Dec;25(4):456-62.

Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. Nat Biotechnol. 1996 Mar;14(3):303-8.

Van Boven HH, Reitsma PH, Rosendaal FR, Bayston TA, Chowdhury V, Bauer KA, Scharrer I, Conard J, Lane DA. Factor V Leiden (FV R506Q) in families with inherited antithrombin deficiency. Thromb Haemost. 1996 Mar;75(3):417-21.

Whitcombe D, Theaker J, Guy SP, Brown T, Little S. Detection of PCR products using self-probing amplicons and fluorescence. Nat Biotechnol. 1999 Aug;17(8):804-7.

Williamson D, Brown K, Luddington R, Baglin C, Baglin T. Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306-->Thr) associated with resistance to activated protein C. Blood. 1998 Feb 15;91(4):1140-4.

Wylenzek M, Geisen C, Stapenhorst L, Wielckens K, Klingler KR. A novel point mutation in the 3' region of the prothrombin gene at position 20221 in a Lebanese/Syrian family [Letter]. Thromb Haemost 2001;85:943-4.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : S. Duygu Sanlıdilek

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 31. 01. 1986

Medeni Durumu : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Özel Büyük Lise(Büyük Kolej) 2002

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 2007

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Staj: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hastalıkları ABD Pediatrik
Moleküler Patoloji ve Genetik BD

Yayımlar :

Misdiagnosis At Light Cycler System Due To Poor Quality Dna Samples. Sanlıdilek D, Eğin Y,
Akar N.