OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTÜTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI'NA BAĞLI
TIBBİ GENETİK BİLİM DALI

107613

# HEMOFİLİ B HASTALARINDA FAKTÖR IX GENİNDEKİ MUTASYONLARIN DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİ İLE ORTAYA KONMASI

DOKTORA TEZİ

107613

**Arş. Grv. Dr. Oğuz ÇİLİNGİR**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

Danışman: Doç. Dr. Sevilhan ARTAN

2001

**KABUL VE ONAY SAYFASI**

Oğuz ÇİLİNGİR'in Doktora Tezi olarak hazırladığı " **Hemofili B hastalarında faktör IX genindeki mutasyonların dizi analizi yöntemi ile ortaya konması**" başlıklı bu çalışma, jürimiz Lisansüstü Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

24/12/2001

Prof.Dr. Nurettin BAŞARAN
ÜYE

Prof.Dr. Mustafa SOLAK
ÜYE

Prof.Dr. Zafer GÜLBAŞ
ÜYE

Doç.Dr. Sevilhan ARTAN
ÜYE

Yrd.Doç.Dr. M. Hamza MÜSLÜMANOĞLU
ÜYE

Osmangazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 27.12.2001 gün ve 528/1434 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof.Dr. Yusuf ÖZYÜREK
Enstitü Müdürü

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ


| | | Sayfa |
|---|---|---|
| İÇİNDEKİLER | | iii |
| ÖZET | | v |
| SUMMARY | | vi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | | vii |
| TABLOLAR DİZİNİ | | viii |
| RESİMLER DİZİNİ | | ix |
| SİMGE VE KISALTMALAR | | x |
| **1.** | **GİRİŞ** | 1 |
| **2.** | **GENEL BİLGİLER** | 4 |
| | 2.1. Hemostaz ve Koagülasyon Mekanizması | 4 |
| | 2.1.1. Fibrin Oluşumunda İntrinsik ve Ekstrensek Yollar | 9 |
| | 2.1.2. Kan pıhtılaşmasında Ortak Sonlanma Yolu | 11 |
| | 2.1.3. Fibrinojenin Fibrine Dönüşümü | 12 |
| | 2.2. Hemofili B | 13 |
| | 2.2.1. Hemofili Hastalığı'nınTarihçesi | 13 |
| | 2.2.2. Hemofili B Hastalığı'nın Klinik Özellikleri ve Tanısı | 13 |
| | 2.3. Faktör IX Geni | 17 |
| | 2.3.1. Faktör IX Geninin Yapısı | 17 |
| | 2.3.2. Faktör IX Geninin Regülasyonu | 20 |
| | 2.3.3. Faktör IX Geninin Polimorfizmi | 22 |
| | 2.3.4. Faktör IX Genindeki Mutasyon Tipleri | 24 |
| | 2.4. Mutasyon Analizlerinde Kullanılan Yöntemler | 27 |
| | 2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) | 27 |
| | 2.4.2. Direkt Analiz Yöntemleri | 30 |
| | 2.4.2.1. Delesyon Analizleri | 30 |
| | 2.4.2.2. Nokta Mutasyonu Analizleri | 31 |
| | 2.4.2.3. Allele Spesifik Oligonükleotid (ASO) Problarla Mutasyon Analizi | 31 |
| | 2.4.2.4. Allele Özgü Amplifikasyon (Amplification Refractory Mutation Systems- ARMS) | 31 |
| | 2.4.3. Mutasyon Tarama Çalışmaları | 31 |
| | 2.4.3.1. DDGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) Yöntemi | 32 |
| | 2.4.3.2. SSCP (Single Strand Conformation Polymorphism) Yöntemi | 32 |
| | 2.4.4. DNA Baz Dizi Çalışmaları (Sequencing Reaction) | 33 |
| | 2.4.4.1. Manual Baz Dizileme Yöntemleri | 33 |
| | 2.4.4.1.1. Maxam-Gilbert Yöntemi | 33 |
| | 2.4.4.1.2. Sanger Yöntemi | 34 |
| | 2.4.4.2. Otomatik DNA Baz Dizileme Yöntemi | 34 |

Sayfa

**3. GEREÇ VE YÖNTEMLER** 37
3.1. Gereç 37
3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri 37
3.1.2. Kullanılan Gereçler 37
3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler 38
3.2. Yöntemler 39
3.2.1. Fenol/Kloroform Kullanılarak DNA İzolasyonu 39
3.2.2. İzole Edilen DNA Miktarının Ölçümü 42
3.2.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin PCR ile Amplifikasyonu 43
3.2.3.1.Faktör IX Geni İçin Kullanılan Amplifikasyon Şartları 43
3.2.3.2. Faktör IX Geni İçin Kullanılan Primer Dizileri 44
3.2.4. Amplifikasyonun Agaroz Jel Elektroferezinde Değerlendirilmesi 45
3.2.5. PCR Ürünü Pürifikasyonu 46
3.2.6. Döngü Dizileme [ Cycle Sequencing (CS)] Reaksiyonu 47
3.2.7. Etanol Pürifikasyonu 47
3.2.8. Kullanılan Çözeltiler 49
3.2.8.1. Ana Çözeltileri Hazırlamak İçin Gerekli Olan Çözeltiler 49
3.2.8.2. Fenol/Kloroform Yöntemiyle DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler 50
3.2.8.3. Agaroz Jel Elektroforez Çözeltileri 52

**4. BULGULAR** 53
4.1. PCR Amplifikasyonu Sonrası Delesyon Tanımlaması 53
4.2. PCR Amplifikasyonları ve PCR Pürifikasyonundaki Problemler 55
4.3. Döngü Dizileme Reaksiyonu Stratejileri 57
4.4. DNA Baz Dizilenmesi 58
4.5. DNA Baz Dizilenmesi Sonrası Alınan Sonuçların Değerlendirilmesi 60

**5. TARTIŞMA** 72
5.1. Mutasyon Belirleme Yöntemlerinin Değerlendirilmesi ve Karşılaştırılması 72
5.1.1. Otomatik Kapiller Jel Elektroforezi Yöntemi İle Dizi Analizi ve Avantajları 74
5.1.2. Otomatik Kapiller Jel Elektroforezi Yöntemi Dezavantajları 75
5.2. Hemofili B Hastalarında Tanımlanmış Mutasyonların Değerlendirilmesi 76

**6. SONUÇ** 79

**KAYNAKLAR DİZİNİ** 82

**ÖZGEÇMİŞ** 92

# ÖZET

Hemofili B hastalığının nedeni, kanın temel fonksiyonları arasında bulunan koagülasyon mekanizmasında etkin olan faktör IX'un konjenital eksikliği veya disfonksiyonel olmasıdır. Faktör IX'u kodlayan gen, X kromozomunun q27.1 bandında lokalize olup, 34 kilobaz (kb) uzunluğunda ve 8 ekzon ile 7 introndan oluşmaktadır. Hem genotipik hem de fenotipik olarak oldukça heterojen bir yapıda olan hemofili B hastalığının şiddeti, gendeki mutasyonun lokalizasyonu ve yapısıyla yakından ilgilidir.

Bu çalışmadaki temel amaç, yüksek heterojenite gösteren faktör IX geninde, hızlı, efektif ve kesin sonuç veren otomatik kapiller jel elektroforezi ile DNA baz dizileme yöntemini kullanarak, kesin moleküler tanıya gidilmesi, yöntemin avantajlarının belirlenmesi ve Türk popülasyonundaki mutasyon profilinin ortaya çıkartılmasıdır.

Yapılan çalışmada, klinik olarak tanısı konmuş 13 hemofili B hastasında, otomatik kapiller jel elektroforezi yöntemi ile DNA dizi analizi yapılarak mutasyonlar taranmış ve 2'si yeni olmak üzere 11 farklı mutasyon tanımlanmıştır. Tespit edilen mutasyonlar en çok ( %33 ) 8. ekzon bölgesinde gözlenmiştir. Ayrıca, faktör IX geninin CpG'den zengin bölgelerinde mutasyonların daha çok ( %36 ) olduğu görülmüş ve missens mutasyonların faktör IX geninde hastalığa en fazla ( %46 ) neden olan mutasyon tipi olduğu literatürle de uyum gösteren bir şekilde ortaya konmuştur.

Sonuç olarak, kapiller DNA dizi analizi yönteminin, faktör IX geni mutasyonlarının tanımlanmasında hızlı ve etkili bir yaklaşım olduğunu ve bu çalışmanın sonuçlarının, Türk popülasyonunun faktör IX geni mutasyon profilinin belirlenmesi ile ilgili başka çalışmalara da ışık tutacağını düşünmekteyiz.

Anahtar kelimeler : Hemofili B, otomatik kapiller jel elektroforezi, DNA baz dizilemesi, mutasyon, heterojenite, moleküler tanı, faktör IX, koagülasyon

## SUMMARY

Hemophilia B is an X linked coagulopathy due to deficiency of clotting factor IX. The gene for factor IX is situated on the long arm of the X chromosome at band Xq27.1, and spans 34kb. It consist of eight exons and seven introns. The clinical and molecular basis of hemophilia B is heterogeneous and the clinical severty is related to the levels of factor IX activity.

The main purpose of this study was to perform molecular diagnosis of hemophilia B disease by DNA sequence analyses of the promoter, poly A and coding regions of the factor IX gene. Evaluation of the usage of technique in the diagnosis of factor IX gene mutations will light up further studies that aim to obtain mutation profile of the factor IX gene spesific to Turkish population.

By this aim, blood samples from thirteen clinically diagnosed hemophilia B patients were analysed by the automatic capiller gel electrophoresis tecnique. At least one mutation were identified in the patients, expect one case with mild hemophilia B of 11 identified molecular abnormalities, two were new mutations according to "Hemophilia B mutation bank" data of the recognised mutations, 33% were localised at the exon 8 of the factor IX gene. The frequency of mutations was higher in the CpG rich regions of the gene and missens mutations was regarded as the most common type of mutations causing severe hemophilia B and this conclusion was in accordance with the literature.

In conclusion, we suggested that capiller DNA sequencing is a fast and efficient approach to identify mutations in the factor IX gene and the results of this study will light up further studies in obtaining the factor IX gene mutation profile of the Turkish population.



Key words : Hemophilia B, automatic capiller gel electrophoresis, DNA sequence analyses, mutation, heterogeneity, molecular diagnosis, factor IX, coagulation

## ŞEKİLLER DİZİNİ


| | Sayfa |
|---|---|
| Şekil 2.1.Trombosit aktivasyonu | 6 |
| Şekil 2.2. Koagülasyon mekanızmasının intrinsik ve ekstrinsik yolları | 9 |
| Şekil 2.3. Faktör IX geninin yapısı | 19 |
| Şekil 2.4. Hemofili B'ye neden olan faktör IX gen delesyonlarına örnekler | 25 |
| Şekil 2.5. Polimeraz zincir reaksiyonunun ana basamakları | 30 |
| Şekil 2.6. GENTAM'da yapılan faktör IX geni 5. ekzonunun Baz dizileme çalışması | 35 |
| Şekil 4.1. HB6 Hastasının faktör IX geni 5. ekzon Dizisi | 61 |
| Şekil 4.2. HB1 Hastasının faktör IX geni 5. ekzon Dizisi | 62 |
| Şekil.4.3. HB3 hastasının faktör IX geni promoter ve 1. ekzonunun dizisi | 63 |
| Şekil 4.4. HB6 hastasının faktör IX geni 7. ekzonunun dizisi | 64 |
| Şekil 4.5. Hasta HB1'de bulunan 31335. pozisyonundaki T >A Missens mutasyonu | 67 |
| Şekil 4.6. Hasta HB2'de bulunan 30842. pozisyonundaki G ins mutasyonu | 68 |
| Şekil 4.7. Hasta HB3'de bulunan 20551. pozisyonundaki C >T Nonsens mutasyonu | 68 |
| Şekil 4.8. Hasta HB6'de bulunan 17719. pozisyonundaki A >T Missens mutasyonu | 69 |
| Şekil 4.9. Hasta HB8'de bulunan 30118. pozisyonundaki C >T Nonsens mutasyonu | 69 |
| Şekil 4.10. Hasta HB9'de bulunan 6392. pozisyonundaki T >C Missens mutasyonu | 70 |
| Şekil 4.11. Hasta HB10'da bulunan 30133. pozisyonundaki T >C Missens mutasyonu | 70 |
| Şekil 4.12. Hasta HB11'de bulunan 31119. pozisyonundaki G>A Missens mutasyonu | 71 |
| Şekil 4.13. Hasta HB13'de bulunan 30150. pozisyonundaki G>A Missens mutasyonu | 71 |

## TABLOLAR DİZİNİ


| | Sayfa |
|---|---|
| Tablo 2.1. Pıhtılaşma faktörleri | 7 |
| Tablo 2.2. Pıhtılaşma faktörlerinin sınıflandırılması | 8 |
| Tablo 2.3. Hemofili'nin klinik olarak sınıflandırılması | 14 |
| Tablo 2.4. Faktör IX genindeki polimorfizmler | 23 |
| Tablo 3.1. Faktör IX geninin analizinde kullanılan primer dizileri | 44 |
| Tablo 4.1. Döngü dizileme reaksiyonunda kullanılan reaksiyon şartları | 57 |
| Tablo 4.2. CS reaksiyonunda karşılaşılan sorunlar ve uygulanan çözümler | 58 |
| Tablo 4.3. Faktör IX geninde dizilenen DNA baz bölgeleri | 59 |
| Tablo 4.4. Hemofili B hastalarında faktör IX geninde dizilemesi yapılabilen bölgeler | 59 |
| Tablo 4.5. Faktör IX geninde bulunan mutasyonlar | 60 |
| Tablo 4.6. Hemofili B hastalarındaki klinik ve moleküler bulgular | 65 |

## RESİMLER DİZİNİ


| | | Sayfa |
|---|---|---|
| Resim 4.1. | HB7 hastasının FIX 2.1'deki delesyon tayini | 54 |
| Resim 4.2. | HB5 hastasının FIX 2.7'deki delesyon tayini | 54 |
| Resim 4.3. | HB4 hastasının FIX 2.1'deki delesyon tayini | 54 |
| Resim 4.4. | Ekzon 5'in agaroz jel görüntüsü | 55 |
| Resim 4.5. | Faktör IX geni poly A ucu jel görüntüsü | 56 |
| Resim 4.6. | Poly A ucunun pürifikasyonu sonrası ortaya çıkan DNA kaybı | 56 |

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|---|---|
| A | Adenin |
| ADP | adenozin di fosfot |
| AE3′ | Yaş regülatör elementi |
| AE5′ | Yaş regülatör elementi |
| AHF | Antihemofilik faktör |
| AHG | Antihemofilik globin |
| ARMS | Amplification refractory mutation systems |
| ARE | Androjene cevap elementi |
| ASO | Allele spesifik oligonükleotid |
| Bp | Baz çifti (base pair) |
| C | Sitozin |
| cDNA | Komplementer DNA |
| C/EBP | CCAAT/ enhance-bağlanma proteinleri |
| CMC | Chemical mismatch cleavage |
| CS | Döngü dizileme (cycle sequencing) reaksiyonu |
| dATP | deoxy Adenosine Tri Phosphate |
| dCTP | deoxy Ciytidine Tri Phosphate |
| DGGE | Denaturing gradient gel electrophoresis |
| dGTP | deoxy Guanosine Tri Phosphate |
| dNTP | Deoksinükleotidtrifosfat |
| dTTP | deoxy Thymidine Tri Phosphate |
| dUTP | deoxy Uridin Tri Phosphate |
| ddUTP | di deoxy Uridine Tri Phosphate |
| DNA | Deoksiribonükleikasit |

| | |
|---|---|
| EB | İçeriği bilinmeyen PCR pürifikasyon kiti solüsyonu |
| EBP | Enhancer bağlanma proteini |
| EDTA | Etilendiamintetraasetat |
| ELIZA | Enzyme-linked immünosorbent assay |
| FSF | Fibrin atabilize edici faktör |
| FVIII:C | Faktör VIII koagülan aktivitesi |
| FIX:C | Faktör IX koagülan aktivitesi |
| G | Guanin |
| HCL | Hidroklorik asit |
| HD | Heteroduplex analyses |
| HNF-4 | Hepatik nükleer faktör 4 |
| KCl | Potasium Chlorur |
| KZ | Kanama zamanı |
| lt | Litre |
| M | Molarite |
| mg | miligram |
| µg | mikrogram |
| ml | mililitre |
| µl | mikrolitre |
| mRNA | Ulak RNA |
| mM | mili Molar |
| NaCl | Sodyum Klorür |
| NaOH | Sodyum Hidroksit |
| NF1-L | Karaciğer nükleer faktör-1 |

| | |
|---|---|
| $NH_4Ac$ | Amonyum asetat |
| ng | Nanogram |
| nm | Nanometre |
| NTP | Nükleotid Tri Phosphate |
| OD | Optik dansitemetre |
| PB | İçeriği bilinmeyen PCR pürifikasyon kiti solüsyonu |
| PE | İçeriği bilinmeyen PCR pürifikasyon kiti solüsyonu |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PFGE | Pulsed field jel electrophoresis |
| PTA | Plazma tromboplastin antesedant |
| PTC | Thromboplastin Component |
| PTZ | Parsiyel tromboblastin zamanı |
| PZ | Protrombin zamanı |
| RFLP | Restriction fragment legth polymorphism |
| RITA | Ristosetin ile trombosit agregasyonu |
| RNA | Ribonükleik asit |
| Rpm | Rotation Per minute |
| Ry(i) | Cryptic tekrarlar |
| SDS | Sodyumdodesil sülfat |
| SPCA | Serum protrombin konversiyon akseleratör |
| SSC | NaCl Trisodium Citrate |
| SSCP | Single strand conformation polymorphism |
| T | Timin |
| TAE | Trisasetikasit EDTA |
| TN | Tris NaCl |

| | |
|---|---|
| TNT | Tris NaCl Tween 20 |
| $TxA_2$ | Tromboksan $A_2$ |
| TSR | Template suppression reagent |
| u | Unit |
| US | Ultrasound |
| UV | Ultraviyole |
| UTP | Uridin Tri Phosphate |
| V | Volt |

# 1. GİRİŞ

Kanın pıhtılaşması (koagülasyon), memelilerin yüksek basınçlı dolaşım sisteminde kan damarlarının hasar görmesinin ardından onarımın doğru yapılmasına yardımcı olan bir savunma sistemidir (25). Pıhtılaşma mekanizmasının in vivo etkisi normalde, sağlam damarlarda pıhtı oluşumunu önleyen ve kanın sıvı halde tutulmasını sağlayan sınırlayıcı tepkimelerle dengelenir. 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 (26).

Kan pıhtılaşmasında fibrin pıhtı oluşumu iki yolla mümkündür. Bunlar intrinsik ve ekstrinsik yollardır. Pıhtılaşma mekanizmasının bu iki yolunda da, inaktif formdan aktif enzim haline dönüşen ve sürekli birbirini etkinleştirerek çalışan birçok pıhtılaşma faktörü görev alır (52).

Pıhtılaşma mekanizması ile ilgili hastalıklardan biri olan hemofili B, intrinsik yolda işlev gören ve K vitaminine bağımlı bir plazma proteini olan faktör IX'un eksikliği veya disfonksiyonel olması sebebiyle meydana gelmekle birlikte, faktör IX'un pıhtılaşma mekanizmasındaki etkileşimlerini geciktirir veya önler (77).

Hemofili B, X kromozomuna bağlı resesif geçiş gösteren bir kalıtsal hastalıktır (7, 50). Bu hastalık, 1/25.000 – 1/30.000 erkekte görülmekle birlikte, çok nadir durumlarda kadınlarda da görülür (23, 27, 75).

İnsan koagülasyon faktörlerinden birisi olan faktör IX'u kodlayan gen, sığır faktör IX aminoasit sekansı kullanılarak ilk kez 1982 yılında klonlanmıştır (15). 1984 yılında ise X kromozomonun uzun kolunun distal bölümüne lokalize edilmiştir (12). Genin komple dizilemesi 1985 yılında tanımlanmıştır (79).

Faktör IX geni, 34 kb uzunlukta olup 8 ekzon ve 7 intron içeren bir gendir. Bu gen X kromozomonun uzun kolundaki Xq27.1 bandında yer almaktadır (29, 30, 48). Bütün genin uzunluğu 34 kb olmakla birlikte mRNA'nın uzunluğu sadece 1.4 kb'dır. İntronlar genin yaklaşık % 95'ini oluşturmaktadır.

Hem genotipik hem de fenotipik olarak oldukça heterojen bir yapıda olan hemofili B, faktör IX genindeki mutasyonlar sebebiyle meydana gelmekte olup, hastalığın şiddeti gendeki mutasyonun lokalizasyonu ve yapısıyla yakından ilgilidir (51). Faktör IX geninin, 1985 yılında dizilenmesinin ardından, 1990 yılında bir veri bankası oluşturulup, dünyadaki bir çok hemofili merkezinden toplanmış hemofili B olgu serilerinin analizi ile, 1713 hemofili B hastasında mutasyonlar bildirilmiş ve 652 moleküler olay tanımlanmıştır (17). Faktör IX proteininin kompleks bir süreçten geçmesi ve çok sayıda fonksiyonel alanlara sahip olması, hemofili B hastalığında gözlenen moleküler defektlerin heterojenitesini açıklamaktadır (69).

Hemofili B hastalığına neden olan moleküler defektlerin 1/3'ü *de novo* mutasyonlardır. Büyük delesyonlar, mikro delesyonlar, insersiyonlar, missens ve nonsens nokta mutasyonları tanımlanmıştır. Hastalığın % 85'ine neden olan mutasyonlar tek baz değişimlerinden kaynaklanırken, büyük ve kompleks gen yeniden düzenlenmeleri nadir olarak görülmektedir (44).

Hemofili B hastalığında, faktör IX geninde bulunan mutasyonlar üzerinde yapılan çalışmalar faktör IX gen ürününün yapısı ve fonksiyonu ile regülasyonu arasındaki ilişkileri göstermesi bakımından önem arz etmektedir. Ayrıca bu mutasyonların karakterizasyonu, doğru taşıyıcı tanısı yapılması ve prenatal tanı testlerinin geliştirilmesi için doğrudan klinik uygulamaya sahiptir (77).

Faktör IX geni gibi heterojenite gösteren gen yapılarında en etkili yöntemin direkt DNA baz dizileme yöntemi olduğu genel olarak kabul edilmektedir. Ancak yine de günümüze kadar bir çok moleküler analiz yöntemi uygulanmış olup, farklı popülasyonlara özgü haplotip analizleri yapılıp hot-spot bölgeler tanımlanmaya çalışılmıştır. Yapılan bu çalışmaların hastalığın tanısında kesin olarak güvenilir olamaması sebebiyle, referans yöntem olarak kabul edilen DNA baz dizileme yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. Etkili olmasına rağmen, uzun ve zahmetli bir çalışma gerektiren DNA baz dizileme yöntemi, günümüzde otomatik kapiller jel elektroforezi sayesinde çok daha kolay, hızlı ve efektif bir hale gelmiş, bu konudaki stratejilerin değişmesine neden olmuştur (17).

Faktör IX genindeki mutasyonların PCR reaksiyonunun ardından direkt DNA baz dizilenmesi yolu ile yapılabilmesi, informatif segregasyon "marker"larının kullanılması ile probandın akrabalarının taranması ve hastalığın aile hikayesinin çıkarılması zorunluluğunu ortadan kaldırmıştır.

Türk popülasyonundaki faktör IX geninin moleküler analizinin detaylı bir şekilde yapılabilmesi, mutasyon dağılımının ve varsa yeni mutasyonların belirlenebilmesi, genin promoteri, poly A ucu ve tüm ekzonlarının dizilenerek kesin moleküler tanıya ulaşılabilmesi amaçlarını gerçekleştirmek üzere planlanmış olan bu araştırma, 13 hemofili B hastasında otomatik kapiller jel elektroforezi yöntemi ile DNA baz dizilemesi yapılarak ortaya konmuştur.

# 2. GENEL BİLGİLER

Kan, kan damarlarının oluşturduğu kapalı bir sistemde dolaşan, sıvı plazmada yayılmış bulunan solid elementler ile eritrosit ve lökositlerden oluşan bir dokudur. Kan ve özellikle de plazma, sağlığın devamlılığı için koşul olan önemli fonksiyonları yerine getirirler.

Koagülasyon, kanın temel fonksiyonları arasında yer almakta olup homeostazisin sağlanmasında önemlidir. Koagülasyon ve fibrinoliz ile ilgili olayların temellerinin anlaşılması, tıbbi açıdan ciddi olan pek çok düzensizliğin kontrolünde kolaylık sağlamaktadır.

## 2.1. Hemostaz ve Koagülasyon Mekanizması

Vasküler bütünlüğün bozulmasının ardından, kanın durmasına hemostaz denilir. Bu yolla hasarlı damar bölgesi kapatılır ve daha fazla kan kaybı engellenir. İlk görülen olay damarın büzülmesi ve trombositlerin kollajene bağlanması ile tetiklenen, trombositlerden yapılmış geçici bir hemostatik tıkaç oluşmasıdır. Bu olayı geçici tıkaçın kesin tıkaç haline dönüşmesi izler (26).

Kanın pıhtılaşması (koagülasyon), memelilerin yüksek basınçlı dolaşım sisteminde kan damarlarının hasar görmesinin ardından onarımın doğru yapılmasına yardımcı olan bir savunma sistemidir (25). Pıhtılaşma mekanizmasının in vivo etkisi normalde, sağlam damarlarda pıhtı oluşumunu önleyen ve kanın sıvı halde tutulmasını sağlayan sınırlayıcı tepkimelerle dengelenir. 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 (26).

Hemostazda 4 faz vardır:

1- İlk faz hasarın distalindeki damarların konstriksiyonudur.



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

2- İkinci faz hasar bölgesinde geçici bir trombosit tıkacının oluşmasıdır. Trombositler damar duvarı hasarının meydana geldiği yerde kollajene bağlanırlar ve trombin, ADP, tromboksan $A_2$ ($TxA_2$) veya epinefrin aracılığı ile aktif hale getirilirler (Şekil 2.1.). Aktiflenmiş trombositlerden iki tip granül salınır:

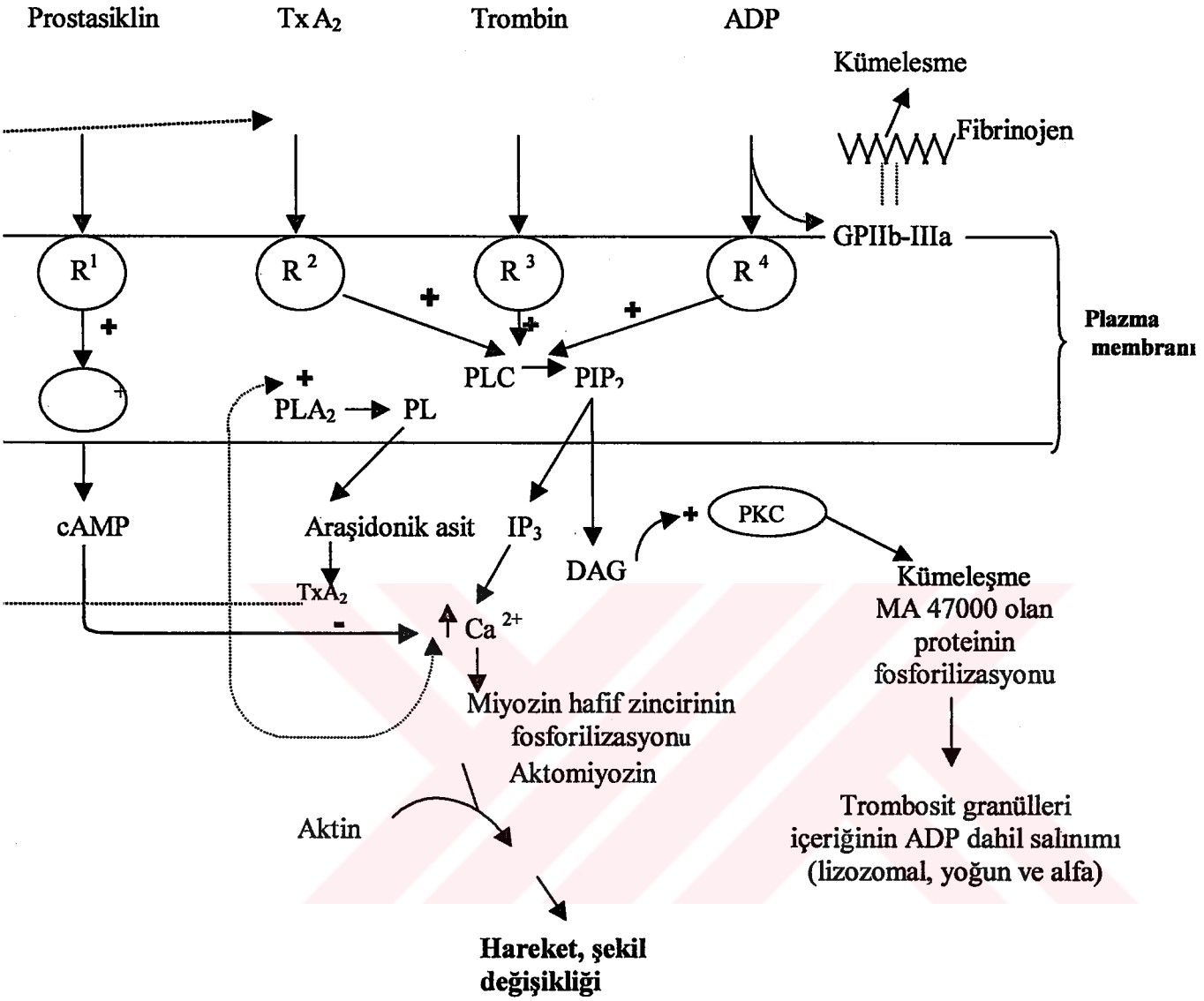
A. α granüller trombospondin, fibrinojen, vWF, faktör V ve hemostaz ile ilgili diğer proteinleri içerir

B. Dense granüller ise kalsiyum iyonları ve ADP den zengindir. Glikoprotein IIb- IIIa kompleksinin bazı plazma proteinleri (örn; fibrojen) için reseptör olarak eksprese olması trombosit tıkacı ve fibrin pıhtısının oluşması için önemli olabilir (25). Aktifleştikten sonra morfolojik ve biyokimyasal olarak değişime uğramalarının ardından trombositler, fibrinojen varlığında trombosit tıkacı oluşturmak üzere agrege olurlar.

3- Üçüncü faz trombosit tıkacını ve/veya kırmızı hücreleri yakalayarak daha stabil olan ve trombüs meydana getiren pıhtı veya fibrin ağının oluşumudur.

4- Dördüncü faz pıhtının plazmin tarafından parsiyel veya komple çözülmesidir (52).

Geçici tıkaç içinde trombositlerin yaptığı gevşek kümeler fibrin ile birbirlerine bağlanır ve kalıcı pıhtı haline çevrilir. Fibrin oluşmasından sorumlu pıhtılaşma mekanizması, etkin olmayan enzimlerin etkinleştirildiği ve etkinleştirilmiş enzimlerin daha sonra diğer etkinsiz enzimleri etkinleştirdiği, şelale (cascade) şeklinde bir grup tepkimeyi içerir. Sistemin çok karmaşık olması geçmişte, adlandırmada değişikliklere neden olmuşsa da, pıhtılaşma faktörlerinin çoğu için bir numaralama sisteminin kabul edilmesiyle durum sadeleştirilmiştir (Tablo 2.1.).




**Şekil 2.1.** Trombosit aktivasyonu.

Pıhtılaşma faktörleri genellikle 4 tipte sınıflandırılırlar :

1.Koagülasyon olayı esnasında aktive olan serine bağımlı proteazların zimojenleri,

2.Kofaktörler,

3.Fibrinojen,

4.Fibrin pıhtısını stabilize eden bir transglutaminaz (Tablo 2.2.).

**Tablo 2.1.** Pıhtılaşma faktörleri

| Faktör | İsimler |
|---|---|
| I | Fibrinojen |
| II | Protrombin |
| III | Trombosit fosfolipidi |
| IV | $Ca^{2+}$ |
| V | Proakselerin, labil faktör, akselaratör, (Ac-) globulin |
| VII | Prokonvertin, serum protombin konversiyon akseleratör (SPCA), kotromboplastin |
| VIII | Antihemofilik faktör A, antihemofilik globulin (AHG) |
| IX | Antihemofilik faktör B, Christmas faktör, plazma tromboplastin komponent |
| X | Stuart-Prower faktör |
| XI | Plazma tromboplastin antesedant (PTA) |
| XII | Hegeman faktör |
| XIII | Fibrin atabilize edici faktör (FSF), fibrinoligaz |

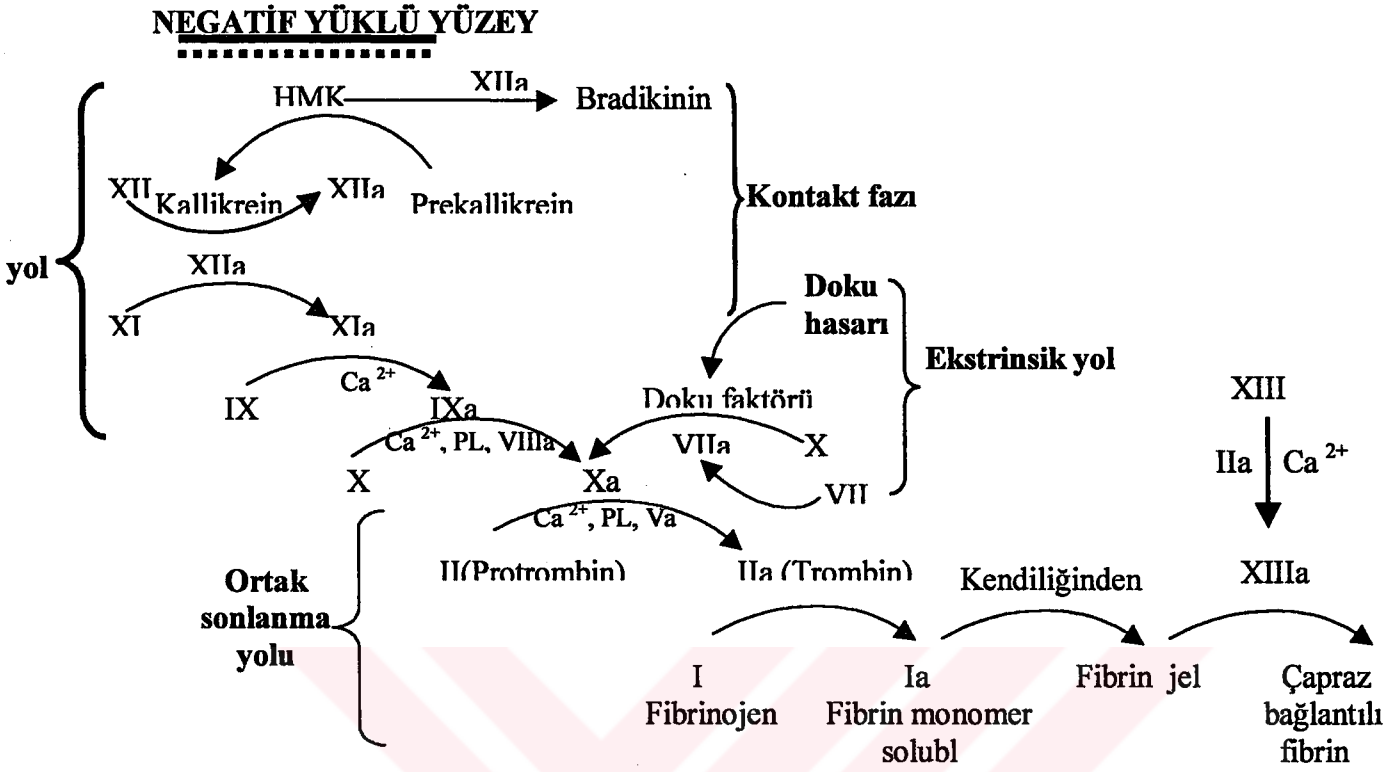
Bu faktörler için alışılagelmiş isimleri kullanılır

Bunlara genelde koagülasyon faktörleri olarak değinilmez

Kan pıhtılaşması, çözünür plazma proteini olan fibrinojenin trombin tarafından çözünmez fibrin haline dönüşmesiyle başlar (Şekil 2.2.). Bu olay her fibrinojen molekülünden iki çift polipeptid salınmasını içerir. Geri kalan fibrin monomeri daha sonra fibrin oluşturmak üzere diğer monomer moleküllerle polimerize olur. Fibrin başlangıçta iç içe geçmiş şeritlerin yaptığı gevşek bir ağ halindedir. Bu ağ kovalan çapraz köprülerin oluşması ile yoğun ve sıkı bir agregat haline çevrilir. Bu son tepkime fibrini kararlı hale getiren faktör XIII tarafından kataliz edilip $Ca^{2+}$ gerektirir.

**Tablo 2.2.** Pıhtılaşma faktörlerinin sınıflandırılması

| | |
|---|---|
| **1. Zimojenler ve serin proteazlar** | |
| Faktör XII | Damar duvarı hasarının olduğu bölgede ortaya çıkmış kollojene bağlanır; yüksek MA kininojen ve kalikrein ile aktiflenir |
| Faktör XI | Faktör XIIa tarafından aktiflenir. |
| Faktör IX | $Ca^{2+}$ varlığında faktör XIa tarafından aktiflenir. |
| Faktör VII | $Ca^{2+}$ varlığından trombin tarafından aktiflenir |
| Faktör X | Tenaz kompleksi tarafından aktiflenmiş trombositlerin yüzeyinde aktiflenir veya doku faktörü ve $Ca^{2+}$ nın varlığında faktör VIIa tarafından aktiflenir. |
| Faktör II | Protrombinaz kompleksi tarafından aktifleşmiş trombositlerin yüzeyinde aktiflenir. ($Ca^{++}$, faktör Va ve Xa) [Faktör II, VII, IX ve X, Gla taşıyan zimojenlerdir.] |
| **2. Kofaktörler** | |
| Faktör VIII | Trombin tarafından aktiflenir; faktör VIIIa, faktör X'in faktör IXa tarafından aktivasyonunda kofaktördür. |
| Faktör V | Trombin tarafından aktiflenir; faktör Va, protrombin faktör Xa tarafından aktivasyonunda kofaktördür. |
| **3. Fibrinojen** | |
| Faktör I | Fibrin pıhtısı oluşturmak için trombin tarafından parçalanır. |
| **4. Tiyol bağımlı trans glutaminaz** | |
| Faktör XIII | $Ca^{2+}$ varlığında trombin tarafından aktiflenir; kovalent çapraz bağlar ile fibrin pıhtısını stabilize eder. |




**Şekil 2.2.** Koagülasyon mekanizmasının intrinsik ve ekstrinsik yolları

Trombin, etkin faktör X'un etkisi ile dolaşımdaki öncülü olan protrombinden üretilen bir serin proteazdır. Trombinin ayrıca trombosit, endotel hücreleri ve lökositleri en azından bir tane G proteinine kenetlenerek etkinleştirmeyi içeren ek işlevleri vardır.

### 2.1.1. Fibrin Oluşumunda İntrinsik ve Ekstrinsik Yollar

Kan pıhtılaşmasında fibrin pıhtı oluşumu iki yolla mümkündür. Bunlar intrinsik ve ekstrinsik yollardır. Faktör IX her iki yol aracılığıyla aktif hale gelir. Ancak aktivasyon mekanizmaları farklıdır.

İntrinsik yol XII, XI, IX, VIII ve X'uncu faktörlerin yanısıra, prekallikrein, yüksek molekül ağırlıklı kininojen, $Ca^{2+}$ ve trombosit fosfolipidlerini kapsayıp, faktör Xa'nın üretimi ile sonuçlanır.

Pıhtılaşma faktörleri, bir veya iki peptid bağının sınırlı proteolizi yoluyla inaktif formdan aktif enzim haline dönüşürler ve geleneksel olarak aktifleşmiş faktörler "**a**" takısı eklenerek ifade edilirler.

İntrinsik yol; prekallikrein, yüksek molekül ağırlıklı kininojen, faktör XII ve faktör XI'in negatif yüklü aktifleyici bir yüzeye maruz bırakıldıkları "kontakt faz" ile başlar (Şekil 2.2.). In vitro olarak bu etkinleme; kanın cam ve kollajen lifler gibi elektronegatif yüklü, ısınabilen yüzeylerle karşılaştırılması ile gerçekleşebilmektedir. In vivo olarak muhtemelen bu konumu kan damarının temas yüzeyindeki kollajen sağlamaktadır. Kontakt faz komponentleri aktifleyici yüzeyde toplanınca faktör XII kallikrein ile proteoliz sonucu faktör XIIa'ya aktiflenir. Faktör XIIa, daha fazla kallikrein üretmek için prekallikrein'e hücum ederek karşılıklı bir aktivasyon geliştirir. Faktör XIIa daha sonra faktör XI'i, faktör XIa'ya aktifler, aynı zamanda yüksek molekül ağırlıklı kininojenden bradikinini (kuvvetli vazodilatatör) açığa çıkarır (52).

Faktör XIa, $Ca^{2+}$ varlığında faktör IX'u serin proteaza, yani faktör IXa'ya aktifler. Bu da sonra 2 zincirli serin proteaz olan faktör Xa'yı üretmek için faktör X'daki Arg-Ile bağını parçalar. Bu son reaksiyon, aktif trombositlerin yüzeyinde yer alan $Ca^{2+}$ ve faktör VIIIa'nın yanısıra, faktör IXa ve faktör X'dan meydana gelen tenaz kompleksi olarak isimlendirilen bileşiklerin biraraya gelmelerini gerektirir. Tenaz kompleksinin bir arada toplanması için, normalde istirahat halindeki aktifleşmemiş trombositlerde plazma membranının internal tarafında yer alan fosfotidil serin ve fosfotidil inozitolü yani asidik fosfolipidleri ortaya çıkarmak için trombositler öncelikle aktifleşmek mecburiyetindedirler.

Bir glikoprotein olan faktör VIII bir proteaz prekürsörü değildir ancak trombosit yüzeyinde yer alan faktör IXa ve X için bir reseptör olarak hizmet veren bir kofaktördür. Faktör VIII, faktör VIIIa'yı oluşturmak üzere bir miktar trombin tarafından aktiflenir. Faktör VIIIa trombin ile olan daha ileri parçalanmalar sonucu inaktive olur (5, 52).

Plazmada bulunan faktör VIII, fonksiyonel, biyokimyasal, immünolojik ve genetik kontrol bakımından farklılık gösteren iki komponentten meydana gelmiştir. Faktör VIII kompleksinin komponetlerinden biri, faktör VIII:C adı verilen bir antihemofilik faktördür. Diğeri, faktör VIII R olarak gösterilen ve von Willebrand faktör (vWF) de denilen bir

moleküldür. Dolaşımda, büyük bir protein olan faktör VIII R'ye faktör VIII:C molekülü non-kovalent bağlarla bağlanmış durumdadır.

Ekstrinsik yol; doku faktörü (doku tromboplastini), faktör VII, X ve $Ca^{2+}$'u kapsayıp faktör Xa'nın üretimi ile sonuçlanır. Doku hasarının meydana gelmesinin ardından plasenta, akciğer ve beyinde bol bulunan doku faktörü salınır. Ekstrinsik yolda etkili olan faktör VII bir zimojendir, fakat nispeten yüksek bir endojen aktiviteye sahiptir. Bu aktivite trombin veya faktör Xa tarafından bir serin proteaz olan faktör VIIa'ya dönüşüm sonucu artar. Salınan doku faktörü ise, faktör X'un faktör VIIa tarafından katalizlenen aktivasyonuna bir kofaktör olarak etki eder.

Faktör VIIa, faktör X'da intrinsik yolun tenaz kompleksi tarafından parçalanan aynı Arg-I1e bağını parçalar. Faktör X'un aktivasyonu intrinsik ve ekstrinsik yollar arasında önemli bir bağlantı sağlar (52).

### 2.1.2. Kan Pıhtılaşmasında Ortak Sonlanma Yolu

Faktör Xa oluşumundan itibaren pıhtılaşma mekanizması ortak bir yol izler (Şekil 2.2.). Faktör Xa, protrombini (faktör II) trombin (faktör IIa)'e aktifler. Bu da sonra fibrinojeni fibrin'e dönüştürür. Fakat faktör X'da olduğu gibi, protrombinin aktivasyonu da aktiflenmiş trombositlerin yüzeyinde meydana gelir. Bu olay, trombosit anyonik fosfolipidleri, $Ca^{2+}$, faktör Va, faktör Xa ve protrombinden oluşan protrombinaz kompleksinin bir arada toplanmasını gerektirir (52). Protrombin karaciğerde sentezlenen tek zincirli bir glikoproteindir. Faktör V ise, faktör VIII ve seruloplazmin ile homolog bir protein olup karaciğerin yanısıra dalak ve böbreklerde de sentezlenir. Trombin artıkları tarafından faktör Va'ya aktiflenince trombosit membranındaki özgün reseptörlerine bağlanıp faktör Xa ve protrombin ile bir kompleks oluşturur. Bunun ardından, trombinin daha ileri etkisi sonucu inaktive edilir, böylece protrombinin trombine aktivasyonunu kısıtlayan bir yol sağlanmış olur.

### 2.1.3. Fibrinojenin Fibrine Dönüşümü

Fibrinojen ( faktör I), solubl bir plazma glikoproteinidir. Molekül yapısından kaynaklanan aşırı negatif yükler, plazmadaki fibrinojenin çözünürlüğüne katkıda bulunurlar ve aynı zamanda fibrinojen moleküllerinin elektrostatik olarak birbirlerini uzaklaştırmalarına neden olarak agregasyonu engellemeye yardımcı olurlar.

Trombin, litik etkiyle fibrinojenin ve fibrinopeptidlerin A α ve Bβ zincirlerinin α ve β kısımları arasında yer alan 4 adet Arg-Gli bağını hidrolize ederek fibrin monomerlerini oluşturur. Fibrin monomerleri daha sonra yan yana gelerek çözünmeyen fibrin pıhtısını oluştururlar. Ancak meydana gelen pıhtı, gevşek bir pıhtıdır.

Trombin fibrinojeni fibrin'e dönüştürmenin yanısıra faktör XIII'ü de faktör XIIIa'ya dönüştürür. Faktör XIIIa, $Ca^{2+}$ varlığında fibrin moleküllerinin kovalan biçimde çapraz bağlanmalarını sağlayarak, proteolize karşı direnci artmış daha stabil bir fibrin pıhtısının oluşmasını sağlar (52).

Pıhtılaşma sistemi normal olarak fibrin pıhtılarının devamlı meydana getirildikleri ve çözündükleri dinamik bir denge durumundadır. Fibrin ve fibrinojeni yıkmaktan başlıca sorumlu olan plazmin, inaktif zimojeni olan plazminojen formunda dolaşıma katılır.

İntrinsik yol, in vitro kan pıhtılaşmasında önemli olmakla birlikte fizyolojik olarak önemi tartışılır vaziyettedir. Çünkü faktör XII, prekallikrein ve yüksek molekül ağırlıklı kininojen eksikliği olan hastalarda kanama problemleri görülmemektedir. Bu nedenle intrinsik yol normal kan koagülasyonunda, aslında daha az önemlidir. Faktör XI'in rolü ise, faktör XI eksikliği olan hastalarda değişken kanama eğilimlerinin olması sebebiyle oldukça belirsizdir (25).

## 2.2. Hemofili B

### 2.2.1. Hemofili Hastalığı'nın Tarihçesi

Hemofili hastalığı'nın tarihçesi M.Ö.2000 yıllarına kadar dayanmakla birlikte 19.yüzyılda hastalığın cinsiyete bağlı bir kalıtım gösterdiği bildirilmiştir (55).

1939 yılında hastalığın antihemofilik faktör (AHF) olarak adlandırılan bir maddenin eksikliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Ancak 1952'de bir hemofili hastasının plazmasında AHF 'den farklı olarak "Plazma Thromboplastin Component" (PTC) denilen bir maddenin eksik olduğu gözlenmiş olup, daha sonra bu faktöre "Faktör IX"ismi verilmiştir. PTC komponentinin tanımlanmasının ardından PTC eksikliği olan bir aile bildirilmiş ve ailenin soyadına dayanarak hastalığa "Christmas" hastalığı adı verilmiştir. Yine bu tarihlerde hemofilinin Hemofili A ve Hemofili B olmak üzere iki tipinin olduğu kabul edilmiştir (1, 65).

1980'li yılların başından itibaren gelişen moleküler teknolojiyle birlikte insan ve sığır faktör IX'u kodlayan cDNA'nın karakterizasyonu ve izolasyonu bir çok araştırmacı tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu gelişmelerin hemen ardından Davie ve Anson, faktör IX geninin izole edildiğini bildirmiş ve parsiyel karakterizasyonunu yapmıştır. Chace, Boyd ve Comerino ise, geni X kromozomunun uzun kolunun distal bölgesine (Xq26-27.3) lokalize etmiştir. Genin tümünün dizilenmesi ise 1985 yılında tamamlanmıştır (48, 79).

### 2.2.2. Hemofili B Hastalığı'nın Klinik Özellikleri ve Tanısı

Hemofili A (Faktör VIII eksikliği) ve hemofili B (Faktör IX eksikliği), X kromozomuna bağlı resesif geçiş gösteren kalıtsal hastalıklardır (7, 36, 50, 61). Hemofilinin görülme sıklığı (A ve B birlikte) milyonda 80-110 arasında değişir. Buna göre ülkemizde 5000-7000 arasında hemofili hastasının olması beklenmektedir. Hemofili B ise 1/25.000 – 1/30.000 erkekte görülmekle birlikte, ancak çok nadir durumlarda kadınlarda görülür (23, 27,75).

Hastalığın kadınlarda görülmesine sebep olan bu nadir durumlar şunlardır;

1. Turner Sendromu (45, XO) gibi kromozomal bir bozukluğun hastada bulunması,
2. Taşıyıcı anne ve hasta babanın kız çocuğunda hastalığın ortaya çıkması,
3. Uniparental dizomi,
4. Ekstrem lyonizasyon.

Babası şiddetli hemofili B hastası olan bir kadında faktör IX aktivitesinin % 1 olduğu belirlenmiş, ancak DNA analizi ile mutasyon saptanamamıştır. Metilasyon paternlerinin analiz edilmesiyle, bu hastada hemofili B'nin ekspresyonunun sebebinin non- random X inaktivasyonu olduğu anlaşılmıştır (76).

Hemofili A ve B'nin klinik belirtileri benzer olup, kanama semptomlarının şiddeti faktör eksikliğinin derecesine göre hafiften ağıra kadar değişir ( 17, 73);

**Tablo 2.3.** Hemofili'nin klinik olarak sınıflandırması

| Ağır Hemofili | Orta hemofili | Hafif hemofili |
|---|---|---|
| Faktör düzeyi < % 1 | % 1- 5 | > % 5 |
| Spontan kanamalar tipiktir | Hafif travmayla kanama olasıdır | Ciddi travma, cerrahi girişim ve invaziv girişimler sonrası kanama olur. |
| Haftada 1-2 kez | Ayda 1-2 kez kanama | Kanama problemi nadirdir |
| Eklem içi kanama tipiktir | Eklem içi kanama olabilir | Eklem kanaması nadirdir |

Faktör IX koagülan aktivitesi ortalama % 100 olup, % 50 ile % 150 sınırları arasında değişebilmektedir. Orta- şiddetli hemofili B hastalarında koagülan aktivitede 20 kat veya daha fazla azalma olduğu gözlenmekle birlikte, hafif hemofili B hastalarında 4 ile 19 kat arasında bir azalma mevcuttur ( 42).

Kanamaların şiddetini, vücudun yapısal özellikleri ve fiziki kondüsyon önemli oranda etkiler. Hastalık erken çocukluk çağında oral kanamalarla kendini belli eder, daha sonra diz, ayak bileği ve dirsek eklemleri başta olmak üzere eklem boşluklarında tekrarlayan kanamalar olur. Uygun tedavi almayan hastalarda tekrarlayan kanamalarla sinovit denen kronik enflamasyona, kıkırdak ve kemik yıkılımına, deformitelere ve fonksiyon kaybına neden olur. Eklem kanamalarından başka kas içinde, gastrointestinal, üriner, sinir sistemleri ile solid organlarda da kanamalar görülebilir. Travmalarda ve cerrahi girişimlerden saatler veya günler sonra ortaya çıkan gecikmiş kanamalar hemofili için tipiktir; bunları kontrol etmek son derece güçtür ( 20, 34).

Hemofili B tanısında kullanılan Laboratuar Testleri 1. ve 2. basamak tarama testleri şeklinde iki gurupta toplanabilir:

1. Basamak tarama testleri : Kanama semptomları ile başvuran her hastada aşağıdaki tarama testleri yapılmalıdır;

- Trombosit sayısı ve morfolojisi
- Kanama Zamanı (KZ)
- Protrombin Zamanı (PZ) ve Parsiyel Tromboplastin Zamanı (PTZ)
- Fibrinojen düzeyi
- Trombin zamanı
- Kan grubu
- Düzeltme deneyi
- vWF antijeni ve aktivitesi

2. Basamak testleri : İlk basamaktaki test sonuçlarına göre hemofili tipi ve vWh tanısı için aşağıdaki testlerden biri veya daha fazlası uygulanır;

- Faktör VIII koagülan aktivitesi (FVIII : C)
- Faktör IX koagülan aktivitesi (FIX :C)
- Ristosetin ile trombosit agregasyonu (RITA)
- Ristosetin duyarlılık testi
- Multimer analizi
- Epitop spesifik ELISA

- DNA analizleri (34)

Hemofili hastalığına, kanama zamanı normal olduğu halde faktör VIII:C veya faktör IX:C düzeyinde azalmanın (<%35) gösterilmesi ile tanı koymak kolaydır. Yenidoğan bebeklerde hemofili A, ağır hemofili B ve ağır vWh tanısı kolaylıkla konabilir, ancak orta ve ağır hemofili B tanısı için 6. aydan sonrasını beklemek gerekir (73).

Uzun yıllardan bu yana hemofili taşıyıcıları belirlenebilmekte olup taşıyıcı tesbiti üç temel teste dayanmaktadır;

a) Pedigri analizi
b) Annede FVIII: C/ FIX: C/vWf: Ag oranı
c) DNA analizi

X- kromozomal resesif geçiş gösteren hemofili B hastalığında hemofilik babanın kızı zorunlu taşıyıcıdır ve prenatal tanı dışında taşıyıcılık testi gerekmez. Küçük kız çocuklarının erken yaşta taşıyıcılıklarının belirlenmesinin gerekliliği ve bunun etik yönü ise tartışmalıdır (73).

1970'lerin başında hemofilinin prenatal tanısında, fetal cinsiyet tayini amacıyla 15-16. gebelik haftalarında amniosentez uygulamaları başlamıştır. 1970'lerin sonlarında da 18-20. gebelik haftalarında prenatal tanı için fetal kan örneklemelerine gidilmiştir. 1980'lerin ortalarından bu yana ise ilk trimesterde, genellikle 10-11. gebelik haftalarında koryonik villus örneklemesi ve gen analizleri yapılmaktadır (33, 62).

DNA analizleri ile hasta ve taşıyıcıların belirlenmesinin yanısıra prenatal tanı yapılması mümkündür. Gelişen ve yaygınlaşan moleküler analizler, faktör IX genindeki yüksek heterojen yapı gösteren mutasyonların direkt dizileme ile tanımlanmasını mümkün hale getirmiştir (31). Prenatal tanı için DNA örnekleri 11. gebelik haftasından sonra koryonik villus biyopsisi, 15. gebelik haftasından sonra ise amniyosentez ile elde edilen hücrelerden sağlanır. Prenatal tanı işleminden önce annenin faktör düzeyi ölçülüp, %40'tan az ise faktör replasmanı yapıldıktan sonra girişim yapılmalıdır (73).

Ondokuzuncu gebelik haftasından itibaren kordon kanından faktör ölçülerek ve fetal cinsiyet tayini yapılarak da genetik danışma vermek mümkündür. Bu dönemde fetusta faktör VIII:C %40, faktör IX ise %10 düzeyindedir (73). Bununla birlikte, pıhtılaşma tahlilleri ve antijen düzeyi ölçümleri sadece sınırlı sayıda olguda güvenilir pozitif sonuçlar vermektedir (29). Ultrasonografi ile 15. gebelik haftasında cinsiyet tayini yapılarak doğacak bebeğin hastalığı taşıma olasılığı aileye açıklandıktan sonra gebeliğin devam edip etmemesi yönündeki karar aileye bırakılabilir (73).

Genetik danışmanları ilgilendiren bir soru, taşıyıcı olmayan ebeveynler için önemli bir tekrarlama riskinin olup olmadığı ve bu şekilde meydana gelen mutasyonların sıklıkla gonadal mozaisizme yol açıp açmadığıdır. Hemofili B hastalığı'nda gonadal ve somatik mozaisizmler zaman zaman bildirilmiş olmakla birlikte, bu gözlemlerin çoğunun anektodal olduğu ve popülasyon riskleriyle ilişki kurulmasının zor olduğu dile getirilmiştir. Ayrıca teknik farklılıklar ile araştırmacılara ait hataların mozaisizm görünümüne yol açabileceği ve yanlış raporlara sebep olabileceği düşünülerek bu konuda geniş popülasyon verilerinin alınıp değerlendirilmesi gerektiği öne sürülmüştür. Taşıyıcı olmayan ovarian mozaik bir annenin ikinci çocuğuna mutasyon geçirme şansının ancak <% 0.062 olduğu belirtilmiştir. Bu oran, mutasyonlarının çoğunu büyük delesyonların oluşturduğu Duchenne müsküler distrofi'de bulunan %20 oranına kıyasla oldukça düşüktür. Cinsiyete spesifik mutasyon oranları konusunda yapılan çalışmaların bazısında, erkeklerde mutasyon oranının daha yüksek çıkması, CpG adacıklarındaki transizyonların ve transversiyonların erkek gonadlarında daha fazla olmasına bağlanırken başka bir çalışmada bunu doğrulayacak veriler elde edilememiştir (32, 41). Sonuç olarak, gonadal mozaisizm çalışmalarından toplanan veriler, bu fenomenin hemofili B hastalığı'nda genetik danışma verirken büyük bir sorun yaratmadığını düşündürmektedir (32).

### 2.3. Faktör IX Geni

#### 2.3.1. Faktör IX Geninin Yapısı

Faktör IX, K vitaminine bağımlı bir plazma proteini olup kan koagülasyonun orta aşamalarında işlev görür. Bu faktör, bir serin proteazın zimojeni olarak kanda dolaşan tek zincirli bir glikoproteindir (79).

56.000 molekül ağırlığında olan bu plazma proteini kanın pıhtılaşmasına orta düzeyde katkı sağlar (16). Faktör IX, $Ca^{2+}$'un varlığında faktör XIa tarafından serin proteaza yani faktör IXa'ya aktiflenmektedir. Bu da sonra 2-zincirli serin proteaz yani faktör Xa'yı üretmek için faktör X'daki Arg-I1'e bağını parçalar. Faktör Xa, intrinsik ve ekstrinsik yolların aynı noktaya yaklaştıkları ve kan koagülasyonun ortak sonlanma yoluna yöneldikleri konumda bulunur (52).

Faktör IX, 12 δ–karboksiglutamik asit rezidüsü ile proteinin amino terminal bölgesinde yer alan β– hidroksiaspartik asidin bir rezidüsünü içerir (79).

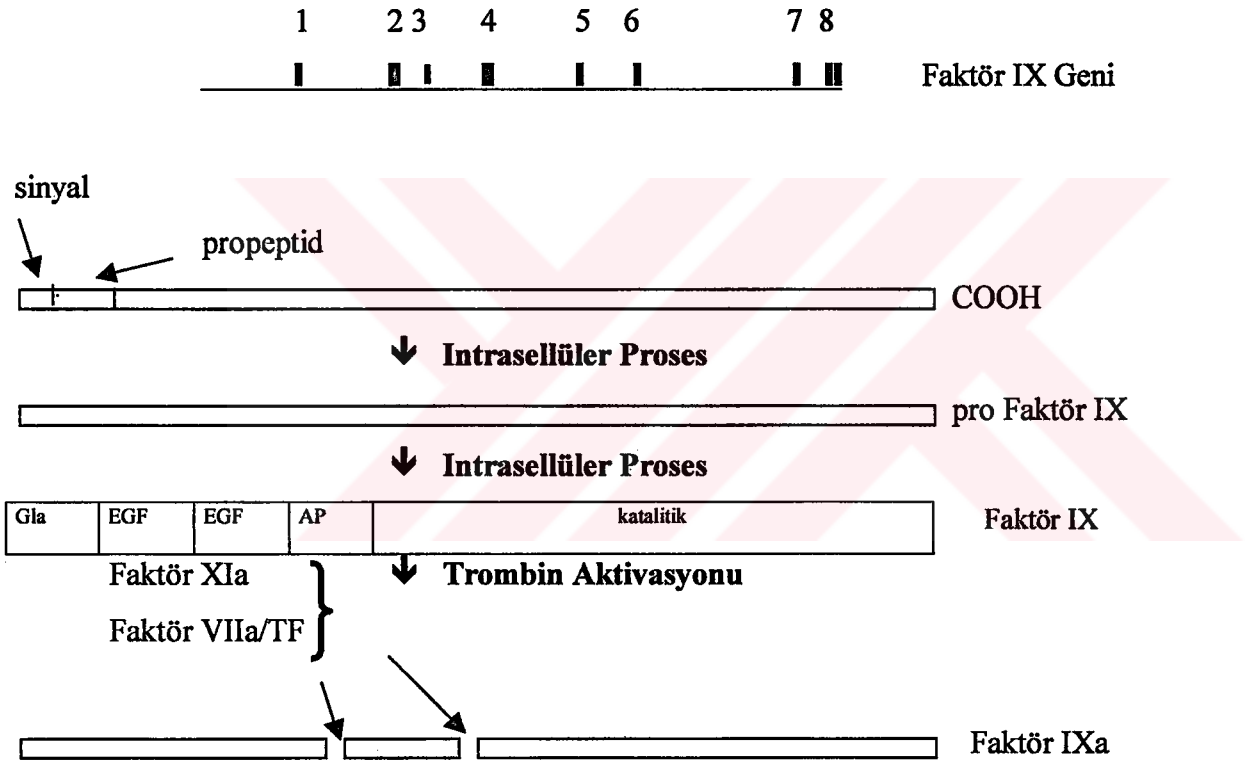
İnsan koagülasyon faktörlerinden birisi olan faktör IX'u kodlayan gen, sığır faktör IX amino asit sekansı kullanılarak ilk kez 1982 yılında klonlanmıştır (15). 1984 yılında ise X kromozomonun uzun kolunun distal bölümüne lokalize edilmiştir (12). Genin komple dizilemesi 1985 yılında tanımlanmıştır (79).

Faktör IX geni, 34 kb uzunlukta olup 8 ekzon ve 7 intron içeren bir gendir. Bu gen X kromozomonun uzun kolunda Xq27.1 bandında yer almaktadır (29, 30, 48). Bütün genin uzunluğu 34 kb olmakla birlikte mRNA'nın uzunluğu sadece 1.4 kb'dır. İntronlar genin yaklaşık % 95'ini oluşturur.

Ekzon uzunlukları 25 bp ile 1935 bp arasında değişmektedir. Promoter bölgesi çok iyi bilinmemekle birlikte, transkripsiyon faktörlerinden karaciğer nükleer faktör 1(NF1-L) ve CCAAT/enhancer-bağlanma proteinleri(C/EBP)'nin sırasıyla 99 dan – 76 ve +1 den +18'e kadar olan nükleotidlere bağlandıkları bilinmektedir.

Faktör IX geninde bulunan 8 ekzon, faktör IX'un 6 majör alanını kodlamaktadır (16, 27,28, 29, 48, 79) (Şekil 2.3.). Ekzon 1, sinyal peptidini kodlar. Ekzon 2, faktör IX'un Gla alanını ve propeptidi kodlar. Ekzon 3, Gla proteinlerinin heterodimerizasyonunu kolaylaştıran kısa bir hidrofobik alanı kodlar (35). Ekzon 4 ve 5 tarafından iki epidermal büyüme faktörü (EGF)'ne benzer alan kodlanır. Bunlardan ilki tip (B), $Ca^{2+}$ bağlanma alanına yüksek afiniteye sahip olup β - hidroksilasyon yoluyla post-translasyonel olarak modifiye olan Asp 64'ü içerir (68). 35 residü peptid içeren ekzon 6, aktif peptidi ve onu kuşatan dizinleri kodlar.

Bu alandaki amino asitlerin % 23'ü jeneriktir, % 37'si ise faktör IX özelliğindedir (24). Bu sayılar aktif peptidin K vitaminine bağlı serin proteazlar ve 8 memeli türünün faktör IX genleri arasında en az korunan alan olduğunu göstermektedir (14). Ekzon 7 ve 8, katalitik alanı birlikte kodlar. Burada katalitik alanı beş ekzonun kodladığı protrombinin tersine iki ekzon kullanılmaktadır (40, 54). Bu zıtlık, faktör IX geninin, protrombinin bir prekürsöründen atasal olarak türediğini düşündürmektedir (22). Bu katalitik alan % 69 jenerik olup, % 34 faktör IX'a spesifik amino asit rezidülerini içerir. Katalitik alanın amino asit rezidüleri $Ca^{2+}$, fosfolipid ve faktör VIIIa varlığında faktör X'un aktivasyonu için gereklidir (29).




**Şekil 2.3.** Faktör IX geninin yapısı

Faktör IX geni birkaç repetetif sekans içermektedir. Beş Alu tekrarının dördü intronların içinde, birisi 3′ flanking sekansdadır. Ayrıca 5′flanking bölgede ve intron 4'de birer Line-1 elementi bulunmaktadır (79). İntron 1'de ve genin 3′ UTR distal ucunda tanımlanmış cryptic RY (i) tekrarları (pürin-pirimidin tandem tekrarlayan dinükleotidler) da vardır (64).

### 2.3.2. Faktör IX Geninin Regülasyonu

Faktör IX geninin regülasyonu, diğer genlerle benzer özellikler gösterip, 5′ UTR proksimal ucundaki intron dizileri ile 3′ UTR distal ucunda bulunan elemanlar tarafından sağlanır (38).

Anson ve ark. – 27 pozisyonunda TGTA sekansı ile başlayan bir TATA kutusu olduğunu ileri sürmüşlerdir (3).

Yoshitake ve ark., başka iki olası TATA kutusunu daha tanımlamışlardır. Bunlardan birisi –265 pozisyonunda olan GATGAA dizisi, diğeri ise –411 pozisyonunda olan TATAAA dizisidir (79). Hemen sonrasında Salier ve ark. faktör IX geninin 5′ regülasyon bölgesini tanımlamışlardır (63). Transkripsiyon başlama bölgesi önce Yoshitake tarafından –150. pozisyona oturtulmuş, fakat Yoshitake ve Anson tarafından daha sonra yapılan çalışmalarda – 187. pozisyona TCAAT dizisiyle oturan bir TATA kutusu yanısıra –238. pozisyona AGCCACT dizisiyle oturan bir CAAT kutusu bildirilmiştir (3, 79). Ayrıca –800 ve – 750. pozisyonları arasında yer alan promoter benzeri bölgeler tespit edilmiş olup – 1600 ve –1900. pozisyonları arasında muhtemel CCTCTCCTA dizisiyle -1680'de olduğu düşünülen bir silencer tanımlanmıştır.

Faktör IX Leyden, çocuklukta ciddi kanama bozukluğu ile karakterize bir hemofili B türüdür. Faktör IX faaliyeti ve androjen seviyeleri % 1'in altındadır (11). Ergenliğin başlaması veya androjen tedavisi ile faktör IX seviyeleri normalin % 30-60'ına yükselir ve hemofili fenotipi yok olur. Faktör IX Leyden fenotipli hastalarda, pedigrisi bilinen örneklerde gerçekleştirilen faktör IX gen analizlerinde –40'dan +20'ye kadar olan alanda 11 nokta mutasyon kümesi gösterilmiştir. Mutasyonların kümelenmesi 5′ regülatör bölgede çeşitli transkripsiyon faktörlerinin nitelendirilmesine yol açmıştır (45, 57). Bu bölge aşağıdaki proteinler için bağlanma alanları içermektedir;

(1) CCAAT/enhancer – bağlanma proteini (C/EBP) +4 ve +19 arası (19)
(2) Hepatik nükleer faktör-4 (HNF-4) –19 ve –27 arası (18, 60)
(3) Tanımlanamamış proteinler –16'dan –3'e, -15'den +3'e ve +15'den +36'ya kadar (47, 53)

Faktör IX gen ekspresyonunun pozitif regülasyonu konusunda birçok araştırmacı tarafından değişik mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bu mekanizmalardan birisi, steroid hormon aktivitesinin regülasyonda rolü olduğunu ve Androjene Cevap Elementi (ARE) ile androjen reseptörünün doğrudan etkileşimde bulunduğunu düşündürmektedir (18). Bir başka çalışmada androjen reseptörünün ARE'ye bağlandığı ve promotere bağlanan diğer proteinlerle etkileşimde olduğu gösterilmiştir (10).

Steroid hormon aktivitesinin rolünü destekleyen ancak androjen reseptörü ile ARE'nin doğrudan etkileşim göstermediğini ileri süren bir başka grup ise, henüz belirlenememiş bir proteinin sorumlu olduğunu düşünmektedir (47).

Bir başka mekanizmada ise, C/EBP'nin faktör IX gen regülasyonundaki önemi kadar, hemofili B Leyden hastalarının fenotipik olarak iyileşmelerinde, D-alanına bağlanan protein (DBP)'in C/EBP ile sinerjistik etkileşiminin de önemli olduğu vurgulanmaktadır. C/EBP'nin fetal gelişim boyunca eksprese olduğu ve konsantrasyonunun sabit kaldığı bilinmektedir, ancak DBP puberte öncesi çok düşük seviyelerde eksprese olmaya başlayıp yetişkin çağda maksimum seviyeye ulaşmaktadır. Sonuçta, bu mekanizma, C/EBP ile birlikte sinerjik etkileşime giren DBP'nin gelişimsel ekpresyonunun, faktör IX yaşam süresinin artmasına etkili olduğu kadar puberte sonrası iyileşmede DBP'nin potansiyel bir role sahip olduğunu da göstermektedir (57, 58).

Crossley ve Brownlee, C/EBP için bir bağlanma bölgesi tanımlamakla birlikte, yine de karaciğer nükleer faktör 1 (NF1-L) için de bir bağlanma bölgesi olduğunu göstermişlerdir (19).

Faktör IX'un gen organizasyonu hemen hemen faktör X, VII ve protein C'nin organizasyonlarıyla aynıdır. Transkripsiyondan sonra 2.8 kb'lık bir mRNA oluşmaktadır. Bu mRNA, 1.4 kb'lık bir 5′ untranslated bölge ve uzun bir 3′ untranslated bölge içerir. Bu durum, kodlanmayan uzun bir mRNA kuyruğuna neden olur (3, 79).

Kan koagülasyon sistemi ile ilgili in vitro deneylerde fareler iyi bir memeli modeli oluşturduğu için, insan faktör IX geninin yaşla birlikte regülasyonunun moleküler

mekanizmasının araştırılmasında da transgenik fareler kullanılmıştır (46). Faktör IX seviyesi gestasyonun üçüncü trimesterine kadar yetişkin düzeyinin % 3-5'i, doğumda % 43'ü, çocukluk çağı boyunca % 75'i kadardır. Bu seviyeler yetişkinlik döneminde % 100 artarak yaşam boyunca her yıl % 1 oranında artmaya devam eder (2). Faktör IX'un bu yaşla artışı doğrudan faktör IX mRNA seviyesi ile ilgili olup, faktör IX geninin promoterinin üst regülasyonu ile ilişkilidir. Transgenik fareler kullanılarak yapılan analizlerde AE5′ ve AE3′ adı verilen iki önemli yaş regülatör elementi bulunmuştur. Bu elementlerin her ikisi de faktör IX geninin yaşla regülasyonu için önemlidir (46).

AE5′, 5′ upstream bölgede bulunmakla birlikte pozisyonundan bağımsız olarak fonksiyonlardan ve genin yaş-stabil ekspresyonundan sorumludur. AE3′, 3′ untranslated bölgenin ortalarında yer alıp, karaciğerde insan faktör IX mRNA'sının yaşla ilişkili olarak yükselmesinden sorumludur. Faktör IX'un sirkülasyondan temizlenmesi yaştan etkilenmez. İnsan faktör IX seviyesinin yaşla düzenlenmesi, öncelikle gen transkripsiyonunun stabilizasyonundan ve tahminen mRNA stabilizasyonunun artması sebebiyle meydana gelen mRNA seviyesindeki yaşa bağlı artıştan etkilenir (46).

Faktör IX gen regülasyonunun açıklanması ve hemofili B Leyden hastalarının fenotipik olarak iyileşmelerinin temel mekanizmaları hakkında günümüze kadar birçok çalışma yapılmış olmakla birlikte, halen açıklığa kavuşturulması gereken bazı noktalar araştırmacılar için merak konusu olmaktadır.

### 2.3.3. Faktör IX Geninin Polimorfizmi

Moleküler olarak çok büyük bir heterojenite gösteren Faktör IX geninde, taşıyıcıların belirlenmesi amacıyla gen içerisinde ve yakınında (flanking sekans) bir çok polimorfizm tanımlanmıştır ( Tablo 2.4.) (56).

İnformatif olduğu takdirde, bu polimorfizmlerde %99'dan fazla olasılıkla doğru teşhis koymayı sağlamıştır. Yapılan bazı çalışmalarda ise, sadece Mse I RFLP, 3′Hha I RFLP ve Dde I polimorfizmleri kullanılarak % 80 informatif sonuçlara ulaşılabilmiştir (78).

**Tablo 2.4.** Faktör IX genindeki polimorfizmler

| Lokasyon | Restriksiyon Enzimi |
|---|---|
| 5′ flanking bölge | Mse I |
| 5′ flanking bölge | Bam HI |
| İntron 1 | Dde I |
| İntron 3 | Xmn I |
| İntron 4 | Msp I |
| İntron 4 | Taq I |
| Kodon 148 | Mnl I |
| 3′ flanking bölge | Hha I |
| İntron 1 | Hinf I/Dde I |
| 3′ UTR ucu | CRY (i) |

RFLP ile elde edilen bu sonuçların çoğu, maalesef sadece beyaz populasyon için geçerlidir. Çünkü çalışmalar çoğunlukla beyaz ırkta yapılmıştır. Asıl sorun, etnik gruba bağlı olarak her bir polimorfizm frekansının değişmesidir. Örneğin, ekstragenik Bam HI polimorfizmi, beyaz ırktaki heterozigot sıklığı bakımından Amerikan zencilerinden 10 kat daha fazla yaygındır. Benzer şekilde, Msp I polimorfizmi de beyaz toplumlarda zencilere nazaran iki kat sıklıkla gözükmektedir. Asya toplumları ise, Hha I için oldukça polimorfiktir (71).

Tanımlanmış olan bütün bu polimorfizmlerin yanı sıra, faktör IX geninde iki farklı polimorfik bölge daha bulunmuştur. Bunlardan birisi, birinci intronda lokalize edilmiş olup Hinf I/Dde I polimorfizmi olarak gösterilmiştir (9). Diğeri ise faktör IX geninin 3′UTR ucunda gösterilmiş ve "Cryptic RY (i) [CRY(i)]" olarak adlandırılmıştır (27).

Bu polimofizmlerin Türk popülasyonunda analizininin yapılmasıyla, toplumun Hha I ve Hinf I / Dde I için yüksek oranda polimorfik, ancak Mnl I, Taq I ve Xmn I için daha az oranda polimorfik olduğu bulunmuştur. Ayrıca Avrupa popülasyonlarının heterozigosite paternine çok benzer bir patern de gözlenmiştir (21).

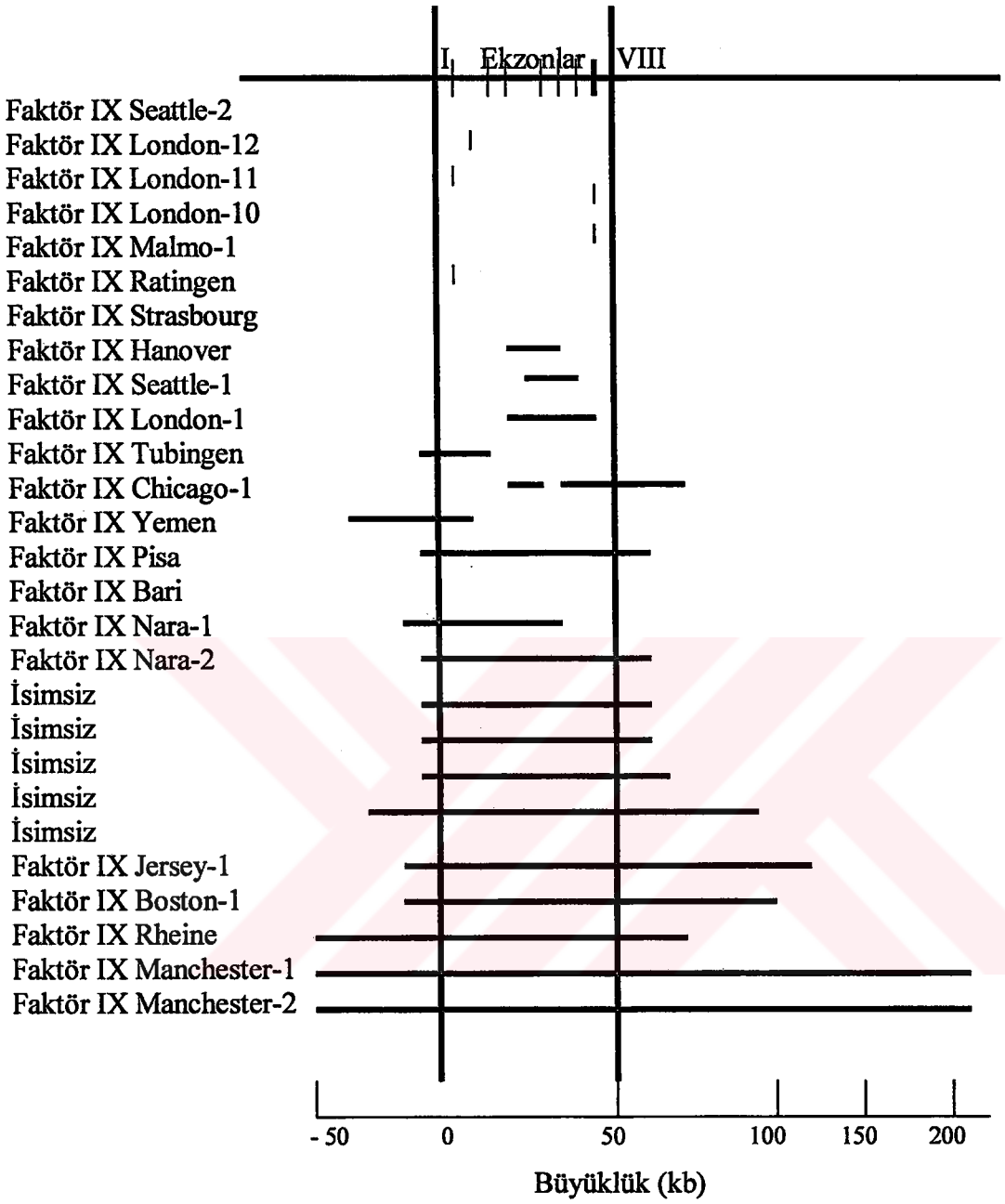
### 2.3.4. Faktör IX Genindeki Mutasyon Tipleri

Hemofili B hastalığının fenotipi faktör IX'un eksikliği veya disfonksiyonel olması sebebiyle meydana gelmektedir. Bu olay faktör IX'un pıhtılaşma mekanizmasındaki etkileşimlerini geciktirir veya önler (77).

Hemofili B hastalığı, faktör IX genindeki mutasyonlar sebebiyle meydana gelmekte olup, hastalığın şiddeti gendeki mutasyonun lokalizasyonu ve yapısıyla yakından ilgilidir (51). Hemofili B hastalığı'nın moleküler temeli heterojenite göstermektedir. Faktör IX geninin, 1985 yılında dizilenmesinin ardından, 1713 hemofili B hastasında mutasyonlar bildirilmiş ve 652 moleküler olay tanımlanmıştır (17). Faktör IX proteininin komplex bir süreçten geçmesi ve multipl fonksiyonel alanlara sahip olması, hemofili B hastalığında gözlenen moleküler defektlerin heterojenitesini açıklamaktadır (69). 1990 yılında bir veri tabanı oluşturulup, dünyadaki bir çok hemofili merkezinden toplanmış hemofili B olgu serilerinin analizi ile, günümüze kadar bir çok mutasyon bildirilmiştir (17). İnternette oluşturulan hemofili B veri tabanında (http://www.umds.ac.uk/molgen) 1713 hemofili B hastasının fenotipine ait ayrıntılar ve ilgili mutasyonlar sıralanmıştır (4, 39).

Hemofili B hastalığına neden olan moleküler defektlerin 1/3'ü de novo mutasyonlardır. Büyük delesyonlar, mikro delesyonlar, insersiyonlar, missens ve nonsens nokta mutasyonlarının hepsi tanımlanmıştır. Hastalığın % 85'ine neden olan mutasyonlar tek baz değişimlerinden kaynaklanırken, büyük ve kompleks gen yeniden düzenlenmeleri nadirdir (44).

Faktör IX genindeki büyük delesyonlar antijen-negatif hemofili B'ye neden olur (Şekil.2.4.). Bu delesyonlar faktör IX mutasyonlarının % 6'sını oluşturmakla birlikte içlerinden bazıları ardışık pürin - pirimidin segmentlerinin büyük hair-loop yapısı oluşturmasından kaynaklanır. Büyük delesyonlar komplet ve parsiyel gen delesyonlarını içermektedir. Ancak günümüze kadar hiçbir komşu gen sendromu tanımlanmamıştır (49).




**Şekil 2.4.** Hemofili B'ye neden olan faktör IX gen delesyonlarına örnekler

Faktör IX genindeki küçük delesyonlar da hemofili B'ye neden olur. Şimdiye kadar bildirilen mikrodelesyonların büyük çoğunluğu kişiye özgün benzersiz yapılar oluşturmakla birlikte, en az iki mikrodelesyon için hotspot denilebilecek bölgeler lokalize edilmiştir (42).

Birçok sebepten dolayı hemofili B hastalığında dikkatler missens mutasyonlar üzerinde toplanmıştır. Orta ve şiddetli hastalık formlarının % 59'u, hafif formların ise % 97'si missens mutasyonlar sebebiyle meydana gelmektedir (42, 67). Bu mutasyonlar evrimsel

olarak korunmuş amino asitlerde oluşur. Faktör IX'a spesifik amino asitlere nazaran, kalıtsal olarak korunan amino asit rezidüleri, missens mutasyonlara 6 kat daha yatkındır (8). Missens mutasyonlar, faktör IX geninin proteinin fonksiyonu, stabilitesi ve sekresyonu için önemli olan yapısal özelliklerin kodlandığı bölgelerde amino asit yer değişimlerine sebep olmaktadır. Bu mutasyonların çoğunun ( %71) faktör IX'un aktivitesinde yaklaşık 20 kat azalmaya yol açtığı gösterilmiştir (42).

Kodlanan bölgelerdeki diğer mutasyonlar nonsens ve frameshift mutasyonlardır. Nonsens değişikliklerin yanısıra küçük delesyonlar ve insersiyonlar faktör IX'un defektif translasyonu ile sonuçlanıp stabil olmayan bir protein yapılmasına neden olur. Hemofili B'de insersiyonlar sebebiyle olan defektler nadir olmakla birlikte, kaynağı bilinmeyen bir materyalin eklenmesi sebebiyle olabileceği düşünülmektedir (13). Hafif hemofili B hastalığı olan bir olguda, genin 3′ bölgesinde bulunan parsiyel duplikasyonun ise eşit olmayan crossover neticesinde meydana geldiği bildirilmiştir (75).

Tek baz değişimleri transizyonlar ve transversiyonlar olmak üzere iki tiptir. Faktör IX genindeki tek baz değişimlerinin büyük çoğunluğu transizyonlardır. Faktör IX mutasyonlarının heterojen yapısına rağmen mutasyonların sıklıkla meydana geldiği birkaç yer bulunmaktadır. Faktör IX geninin kodlanan bölgelerindeki CpG dinükleotidlerinin nokta mutasyonlar için gerçek hotspot alanlar olduğu gösterilmiştir. Faktör IX geninde, yirmisi kodlanan bölgede ve birisi promoter bölgede olmak üzere 21 CpG adacığı vardır.

CpG dinükleotidlerindeki transizyonlar faktör IX gen mutasyonlarının % 36'sını oluşturmaktadır (59). Yapılan bir çalışmada mutasyon hızı bakımından erkek/kadın oranının yüksek bulunması, erkek gonadlarında CpG transizyon ve transversiyonlarının fazla olmasına bağlanmış olup bunun metillenmiş sitozinlerin instabilitesinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Erkek germ hücrelerinde yüksek metilasyon gözlenmesi, kadın germ hücrelerinde ise CpG dinükleotidlerinde metilasyonun çok az, hatta hiç olmaması bu verilerle uyumlu bulunmuştur (32, 59).

CpG dinükleotidlerindeki transizyonların, 5-metil sitozinin spontan deaminasyonu ile bir timine dönüşmesi sebebiyle olduğu, böylece deaminasyonun yerine bağlı olarak, CpG dinükleotidinin ya TpG ya da CpA dinükleotidine dönüştüğü düşünülmektedir. CpG hotspot

adacıklarında transversiyonlar da meydana gelmektedir. CpG hotspot adacıkları, transizyonların 24 kat, transversiyonların da 8 kat yüksek oranda gözüktüğü bölgelerdir (59).

### 2.4. Mutasyon Analizlerinde Kullanılan Yöntemler

Hemofili B hastalığında, faktör IX geninde bulunan mutasyonlar üzerinde yapılan çalışmalar faktör IX gen ürününün yapısı ve fonksiyonu ile regülasyonu arasındaki ilişkileri göstermesi bakımından önem arz etmektedir. Ayrıca bu mutasyonların karakterizasyonu, doğru taşıyıcı tanısı yapılması ve prenatal tanı testlerinin geliştirilmesi için doğrudan klinik uygulamaya sahiptir (77).

Tanı amaçlı yapılan ilk moleküler çalışmalarda yüzlerce hemofili B ailesinde Restriksiyon fragment uzunluk polimorfizm [Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)]'lerinin kullanılmasının gerekli olduğu sonucuna varılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu [Polymerase Chain Reaction (PCR)] ve PCR'ı temel alan teknolojilerin geliştirilmesinin ardından hastalığa sebep olan mutasyonlar belirlenmiştir. Bu sayede birçok laboratuarda hastalığın direkt tanısı olanaklı hale gelmiştir. Ancak pozisyonu bilinen mutasyonlarda yapılabilen direkt gen analiz yöntemleri, yüksek heterojenite gösteren faktör IX gibi gen yapılarında etkisiz kalmış ve gelişen moleküler tanı teknolojileri ile mutasyon tarama analizleri (DGGE, SSCP gibi) yapılmıştır. Uygulama alanı bulmasına rağmen, tanı amaçlı mutasyon tarama çalışmalarının tümünün fazla zaman harcanmasının yanısıra yetersiz duyarlılığa sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca bu metodlar sonunda mutasyon tespiti için referans metod olarak kabul edilen DNA baz dizi analizini (sequencing) gerektirmektedir (4, 17, 37, 51, 69).

#### 2.4.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

DNA ve RNA analizi için kullanılan tüm teknikler değerlendirildiğinde, 1985'te Salki ve arkadaşları tarafından geliştirilen ve kavramsal olarak basit bir prosedür olan polimeraz zincir reaksiyonu en fazla potansiyele sahip ve DNA analizlerinde yeni bir çağı başlatan tek yöntemdir. Polimeraz zincir rekasiyonunda birkaç saat içerisinde tek bir DNA ya da RNA molekülü birkaç milyon katına amplifiye edilebilmektedir. Bu yeteneği nedeniyle saç

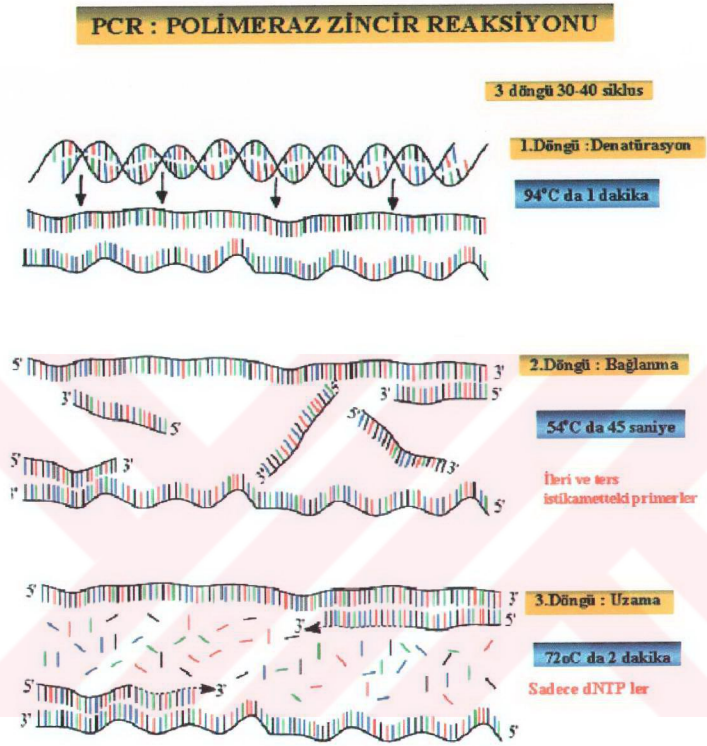
kökünden, ağız çalkantısındaki birkaç hücreden, kurumuş bir kan damlasından elde edilen tek bir hücreden izole edilen DNA materyalinden gerekli tüm analizlerin gerçekleştirilmesi mümkün olmaktadır (43, 72).

Polimeraz zincir reaksiyonu incelenmek istenen DNA fragmentinin laboratuarda tüp içerisinde 5′ ve 3′ uçlarına özgü bu bölgelerdeki baz dizilerine komplementer bir çift primer kullanılarak, bu iki primer ile sınırlandırılan DNA parçasının enzimatik olarak bir milyon kez çoğaltılmasıdır. Bu yöntemin uygulamaya konması ile geniş kullanım alanı bulmasındaki ana neden, tek bir hücreden izole edilen DNA'nın amplifikasyonu sonrası farklı analizlerde kullanılmasını olanaklı kılmasıdır. Polimeraz zincir reaksiyonunda DNA amplifikasyonu;

a. Denatürasyon (denaturation)
b. Bağlanma (annealing)
c. Uzama (extension) basamaklarından oluşan bir döngünün 25-30 kez tekrarlanması ile gerçekleşir.

İlk basamakta DNA'nın çift dalı yüksek ısı ile birbirinden ayrılır. İkinci aşamada sıcaklık düşürülerek primerlerin DNA üzerinde kendilerine komplementer olan nükleotid dizileri ile hibridizasyonu sağlanır. Son aşamada ise ortamda bulunan DNA polimeraz enzimi ve deoksinükleotidler aracılığı ile primerler arasında kalan DNA zincirlerinin sentezlenmesi gerçekleşir ( Şekil 2.5.).

Polimeraz zincir reaksiyonu bir olgudaki spesifik gen sekanslarını klonlamadan genin ve/veya baz dizilerinin bilinmesi durumunda Southern Blot tekniğine gerek duymadan ilgili mutasyonları analiz etme imkanı sağlar. Spesifik sekansların amplifikasyonunun yanısıra, direkt mutasyon analizlerinde rutin olarak kullanılmakta olup delesyonların, nokta mutasyonlarının tanımlanması örnek olarak verilebilir. DNA veya RNA'dan genomik yada cDNA kütüphanesinin oluşturulması, genomik DNA veya mRNA'dan genlerin ve gen ailelerinin klonlanması da PCR'ın kullanım alanlarına verilebilecek örnekler arasındadır (6, 43, 72).




**Şekil 2.5.** Polimeraz zincir reaksiyonunun ana basamakları.

Not : Bu şekil http://allserv.rug.ac.be/~avierstr/principles/pcr.html den modifiye edilerek alınmıştır

Özet olarak PCR, DNA ve RNA örneklerinin analizi için hem araştırma laboratuarlarında hem de klinik moleküler tanı laboratuarlarında kullanılan standart bir metod haline gelmiştir. PCR, diğer nükleik asit analiz metodlarına nazaran daha hızlı, ucuz, duyarlı

olmakla birlikte daha az hasta materyali gerektiren bir metoddur. Geniş uygulama alanı bulduğu ifade edilen bu yöntemin her geçen gün kullanım alanı genişlemekte olup, bu alanlarda uygulanan PCR çeşitlerinin sayısı da her geçen gün artmaktadır. PCR çeşitleri arasında nested PCR, RT- PCR, Multipleks PCR, DOP-PCR gibi örnekler verilebilir (6, 43, 72).

### 2.4.2. Direkt Analiz Yöntemleri

Kalıtsal hastalıkların tanısında moleküler defekt biliniyorsa direkt, moleküler defektin bilinmediği durumlarda ise indirekt yöntemlerden yararlanılır. Ancak ikinci yöntemde taşıyıcıların belirlenmesi ve prenatal tanı için informatif aileye ve pedigri analizine ihtiyaç duyulmaktadır (31, 66, 70).

Mutasyonların direkt olarak tanımlanması için, hastalık ya da özellikten sorumlu genin klonlanmış ve nükleotid dizisinin belirlenmiş olması gerekir. Direkt analiz yöntemi; incelenen hastalık açısından, hasta, taşıyıcı ve sağlam fenotiplerinin belirlenmesi ile taşıyıcı taramalarına imkan verdiği için hem doğum öncesi tanı, hem de populasyon taramalarında başarıyla kullanılmaktadır (66).

Gen teknolojisinde mutasyonların gösterilmesi; DNA'daki delesyon veya nokta mutasyonlarının taranması şeklinde olabileceği gibi Allele spesifik oligonükleotid (ASO) problar veya mutasyona özgül RFLP'ler kullanılarak da gerçekleştirilebilir.

#### 2.4.2.1. Delesyon Analizleri

DNA'daki küçük delesyonlar PCR, büyük delesyonlar Southern blot yöntemi ve daha büyük mutasyonlar (0.5 – 10 Mb) Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) gibi yöntemlerle incelenebilir. Delesyon türü mutasyon varlığında amplifikasyon primerleri DNA'ya bağlanamadığı için çoğalma (amplifikasyon) gerçekleşemez. Bu durumda pozitif kontrol eşliğinde agaroz jel elektroforezi yapılarak mutasyon gösterilebilir (66).

### 2.4.2.2. Nokta Mutasyonu Analizleri

Kalıtsal hastalıklara neden olmaları açısından nokta mutasyonlarına delesyonlara göre daha sık oranda rastlanır. Nokta mutasyonlarının hem heterojen hem de çok küçük değişimler olmaları nedeniyle tanımlanmaları çok daha zordur. Faktör IX geni gibi yüksek heterojenite gösteren gen yapılarında da aynı durumdan bahsedilebilir.

### 2.4.2.3. Allele Spesifik Oligonükleotid (ASO) Problarla Mutasyon Analizi

Spesifik bir mutasyon, herhangi bir restriksiyon enziminin kesim bölgesine rast gelmiyorsa mutasyona uğrayan ve PCR ile çoğaltılan bu bölgenin, ASO probları ve dot- blot yöntemi uygulanarak analizi yapılabilir. Bu analiz yöntemi ile mutasyon içeren alleller belirlenerek ve hibridizasyonun olup olmadığına bakılarak homozigot ve heterozigot mutant bireyler ile normal bireyler belirlenir (66).

### 2.4.2.4. Allele Özgü Amplifikasyon Yöntemi ile Mutasyon Analizi ( Amplification Refractory Mutation Systems-ARMS)

Allele Spesifik Oligonükleotid probla hibridizasyon yöntemine alternatif bir mutasyon tanımlama yöntemidir. ARMS yöntemi dot blot yöntemine göre daha kısa sürede sonuç alınması ve radyoizotop kullanılmaması gibi nedenlerle avantajlıdır. Ancak bilinen yaygın mutasyonlardan yola çıkılarak sonuç alınabildiğinden, bilinmeyen mutasyonların tanımlanmasında başvurulan bir yöntem değildir (66).

### 2.4.3. Mutasyon Tarama Çalışmaları

DNA'da yeni oluşan nokta mutasyonlarının gösterilmesi için mutasyon tarama analiz yöntemleri geliştirilmiştir. Bir çok mutasyon tarama analizi olmasına rağmen, özellikle faktör IX geninde daha çok Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) ve Single Strand Conformation Polymorphism (SSCP) çalışmaları yapılmıştır (59, 66).

### 2.4.3.1. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (D.G.G.E) Yöntemi

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis metodu ile mutasyon analizinin temeli DNA'nın denaturasyonuna yani sarmalların birbirinden ayrılması esasına dayanır. Yöntemin dayandığı en önemli ilkelerden biri dubleksin bir ucunun erimeye başladığı andan itibaren elektroforetik mobilitenin önemli oranda azalmaya başlaması durumudur. Düşük erime noktasındaki bir nokta mutasyonu dublekslerin açılmasını etkilemektedir. Dolayısıyla bu diziler denatüre edici ajan oranı basamaklı bir şekilde artan jelde, elektroforetik olarak ayırt edilmektedir.

Bu yöntemin zorluğu jel konsantrasyonunun ayırtedilmesi ile yakından ilgilidir. Bu amaçla baz dizisine bağlı olarak erime haritası çıkartabilen bilgisayar simülasyonlarından yararlanılmaktadır (66).

İlgili mutasyon bakımından heterojen bir yapıya sahip olan toplumlarda moleküler patolojilerin aydınlatılmasında sıklıkla kullanılan PCR'a dayalı bir yöntem olan DGGE, radyoizotop kullanmaksızın sonuç aldığından avantajlı bir konumda görülmüş ve rutin analizlerde kullanılmıştır (4, 66).

### 2.4.3.2. Single Strand Conformation Polymorphism (S.S.C.P) Yöntemi

Mutasyon analizi için olduğu kadar polimorfizmlerin saptanmasında da kullanılan bir yöntem olan SSCP analizi, jel üzerindeki molekülün elektroforetik hareketine bağlı olarak işlemektedir. Bu yöntemde denatüre olmayan ortamlarda tek sarmal DNA'nın katlanıp molekül içindeki etkileşimlerle aldığı konuma göre değerlendirilme yapılmaktadır (66).

Single Strand Conformation Polymorphism analizinde mutasyon belirleme yüzdesi ve şartların tahmin edilmesi mümkün olmamaktadır. Mutasyon belirleme oranı ortam şartlarına ve analiz edilen DNA fragmentinin uzunluğuna göre değişir.

Bu yöntemin duyarlılığı yani mutasyonları tarama özelliği %35-100 arasında değişmektedir. Bu yöntemde duyarlılık üzerine en önemli etkenlerden biri incelenen DNA

fragmentinin uzunluğudur. DNA fragmentinin uzunluğu artarsa tekniğin duyarlılığında düşme olur.

SSCP yöntemi, mutasyon tarama yöntemleri içerisinde en çok kullanılan yöntemlerden biri olmasına rağmen analiz ettiği DNA fragmentinin büyüklüğünün sınırlı olması, jel sonuçlarının yorumlanma güçlüğü ve ısı iyon derişimi gibi faktörlerin optimize edilmesindeki güçlükler yöntemin dezavantajlarındandır (66).

### 2.4.4. DNA Baz Dizi Çalışmaları (Sequencing Reaction)

#### 2.4.4.1. Manual DNA Baz Dizileme Yöntemleri

Genetik hastalıkların büyük bir kısmı nokta mutasyonlarından kaynaklanmakla birlikte daha az bir kısmı küçük delesyonlar sebebiyle meydana gelmektedir. Bu durumda tesadüfen bir mutasyon restriksiyon endonükleazlar için tanıma bölgesinde bir değişim meydana getirmedikçe DNA haritalamasının tek başına belirleyici olması mümkün değildir. Dolayısıyla böyle durumlarda DNA baz dizileme reaksiyonu gereksinimi ortaya çıkmaktadır.

Dizi analizi yöntemleri ilk kez 1970'lerin ortalarında Sanger, Maxam ve Gilbert tarafından tarif edildikten sonra günümüze kadar büyük bir hızla gelişim göstermiştir. Günümüzde DNA baz dizi analizi, moleküler genetik çalışmalarında mutasyonu tanımlamak ve tiplendirmek amacıyla çalışılan önemli bir analitik tanı yöntemi olup, referans yöntem olarak kabul edilmiştir ( 66, 74).

##### 2.4.4.1.1. Maxam-Gilbert Yöntemi

Bu yöntem, DNA'da yer alan nükleotidlerin bazı kimyasal maddeler ile tepkimeye girmesi ve nükleotid dizisinin tepkime olan noktalarda kırılması esasına dayanır. Bu yöntemde başlangıç noktası, tanımlanan DNA bölgesidir. Nükleotid dizisi belirlenecek DNA segmenti önce 5′ ucunda $^{32}$P ile radyoaktif olarak işaretlenir.

Her iki ucunda işaret bulunan çift sarmallı DNA'nın nükleotid dizisi saptanamaz. Bu nedenle, ya iki sarmal birbirinden ayrılır ya da söz konusu DNA uygun bir restriksiyon enzimi

ile kesilerek sadece bir ucunda işaret kalması sağlanır. Daha sonraki işlem, bir ucu işaretli milyarlarca DNA molekülünün dört deney tüpüne ayrılması ve herbirinde G,A,T veya C nükleotidlerini kırmak için gerekli kimyasal tepkimenin yapılmasıdır. Bu tepkimeler, gittikçe kısalan seriler oluşturup, poliakrilamid jel elektroforezi yapılarak birbirinden ayrılırlar ve otoradyografi yöntemi ile gözle görünür hale getirilebilirler (66).

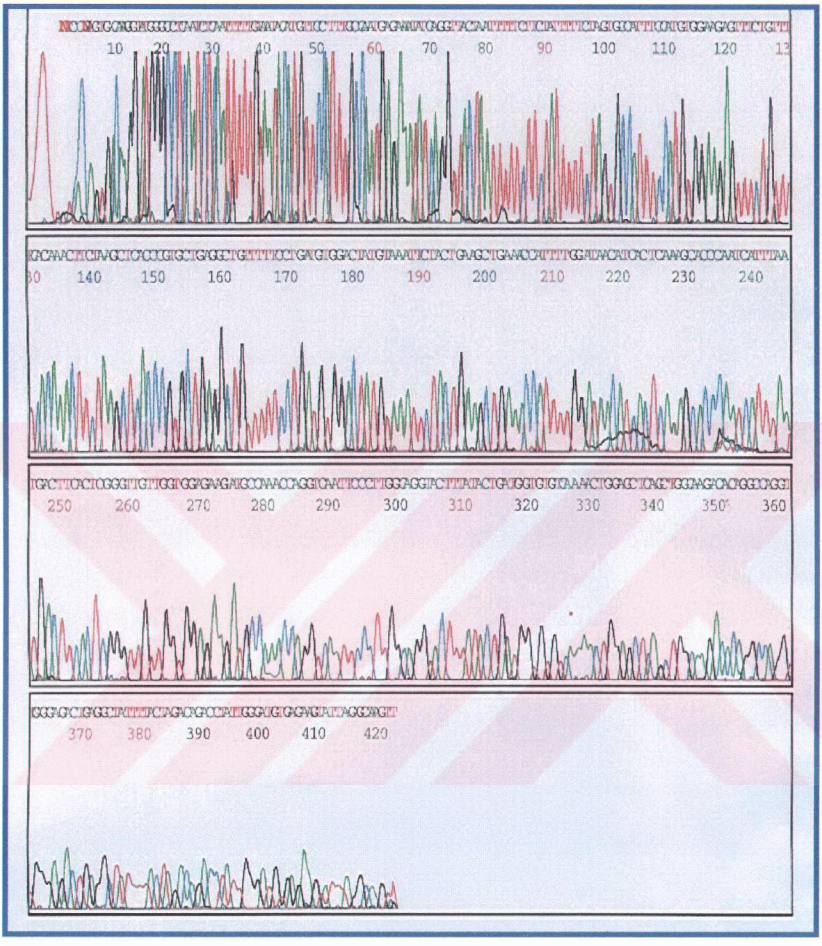
#### 2.4.4.1.2. Sanger Yöntemi

Bu yöntem, yalnızca tek sarmallı $M^{13}$ fajında klonlanan DNA fragmentlerinin dizi analizinde kullanılmaktadır. Yöntem dideoksi zincir terminasyonu esasına dayanmaktadır. Dört farklı dNTP molekülünden biri ya da daha fazlası radyoaktif olarak işaretlidir ve işlem dört ayrı reaksiyon tüpünde düşük konsantrasyondaki 4 dNTP'den biri ile sonlanır. Bu nedenle her deney tüpünde radyoaktif olarak sentezlenmiş çeşitli DNA fragmentleri vardır. Bu fragmentlerin 5′ uçları ortak, 3′ uçları ise baza göre farklılık gösterir. Belirli bir inkübasyon süresinden sonra her bir karışım denatüre edilip elektroforetik işlemlere tabii tutulur ve radyoaktif bantlar radyografi ile görüntülenir.

Sanger yönteminde, DNA sentezi için DNA polimeraz I yerine Klenow enzimi kullanılmaktadır. Bu enzim aslında DNA polimeraz I'in bir parçasıdır. Ancak 5′⟶3′ ekzonükleaz aktivitesini taşımamakta ve ayrıca sentez olabilmesi için bir primere ihtiyaç bulunmaktadır. Bu primer kimyasal olarak sentezlenmiş bir oligonükleotiddir. Böylece, sentezlenen fragmentin 5′ ucunda herhangi bir yıkım olmadan bu uç sabit kalmakta ve sentezlenen fragmentin uzunluğu için referans, yani başlangıç noktası özelliğini korumaktadır (66).

#### 2.4.4.2. Otomatik DNA Baz Dizileme Yöntemi

Bu çalışmada da kullanılan otomatik kapiller jel elektroforez dizileme yöntemi manual yöntemlere göre daha ucuz, az iş zamanı isteyen ve daha uzun DNA baz dizisi okuma imkanı veren bir yöntemdir. PCR sonrası floresan işaretleme esasına dayanan bu yöntem, dört ayrı bazın farklı renklerde oldukça demonstratif bir gösterim avantajına da sahiptir (Şekil 2.6).



**Şekil 2.6**. GENTAM'da yapılan faktör IX geni 5. ekzonun baz dizileme çalışması

Özellikle heterojenite gösteren gen yapılarındaki moleküler analiz zorlukları, gelişen teknoloji ile birlikte DNA baz dizilemesinde yeni ve farklı bir yöntemin doğmasına sebep olmuştur. Yöntem, dizilenmek istenen gen bölgesinin PCR sonrası floresan işaretleme yoluyla

kapiller bir jelden geçilerek otomatik olarak okunması esasına dayanır ve üç ana basamaktan oluşur. Bunlar;

1. PCR
2. Döngü dizileme reaksiyonu
3. Otomatik kapiller jel elektroforezidir.

Bu basamakların kolay ve basit bir prosedür içermesi ve bu sayede sağladığı hızlı mutasyon tespiti imkanı, yöntemin mutasyon tarama testi olarak kullanılabilmesi imkanını da vermektedir. Az miktarda kandan elde edilen DNA ile başlayan prosedürün tümü, PCR amplifikasyonunu ve direkt dizileme yapılmasını içerir. Mutasyon belirlenmesini takiben taşıyıcı tespiti ve prenatal tanı yapılması, sadece mutasyonu taşıdığı bilinen ekzonun amplifikasyonunu ve dizilemesini gerektirir.

Faktör IX geninde otomatik kapiller jel elektroforezi yöntemiyle DNA dizi analizinin yapıldığı bu çalışmada güdülenen temel amaç, Ülkemizde sayısının yaklaşık 1000 olduğu tahmin edilen hemofili B hastaların da, faktör IX geninin moleküler analizlerinin tam ve kesin bir şekilde yapılabilmesi ve mutasyon dağılımının eksiksiz olarak belirlenebilmesidir.

# 3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

## 3.1. Gereç

### 3.1.1. Araştırma Grubu Bireyleri

Otomatik kapiller DNA baz dizilenmesi tekniği ile Hemofili B hastalarında mutasyon analizini içeren bu çalışma Kasım 2000- Kasım 2001 tarihleri arasında Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbı Genetik Bilim Dalı Moleküler Genetik Tanı Laboratuarında, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalının, Ege Üniversitesi ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalları ile birlikte belirlediği 13 Hemofili B hastasından alınan periferik kan örneklerinde gerçekleştirilmiştir.

### 3.1.2. Kullanılan Gereçler

Buz makinesi (Philips)
Elektroforez için güç kaynağı
Hassas terazi (Ainsworth AA-250)
Pastör pipeti
Manyetik karıştırıcı (ısıtıcılı)
Minijel elektroforez aleti (Pharmacia LKB GNA 100)
Mikrosantrifüj (eppendorf)
PCR aleti (thermal cycler)(perkin Elmer)
PH metre (NEL electronic)
Pipet takımı (Gilson)
Soğutmalı santrifuj (Megafuje Heraeus)
Spektrofotometre (Pharmacia LKB Ultraspec II)
Su banyosu (Nüve BM 402)
UV transilüminatör
Vorteks (Janke & Kunkel I KA)
Mezür

Beher

Bidistile su cihazı (Barnstead F. II Glasstill)

Deep-freeze (Heraus Vötsch)

Mikrodalga fırın (Arçelik)

UV gözlüğü (Oberon)

Shaker

Buzdolabı (Arçelik)

Falkon tüpü (Orange Scientific)

Ependorf tüpü (Micronic)

Printer (Hewlett Packard Deskjet 1600 CM)

Jel dökümantasyon sistemi (UVP)

Otomatik dizileme cihazı (310 ABI genetic analyzer)(ABI PRİZM)

Kesintisiz güç kaynağı (EMKA)

Lamin-air flow

Spin column tüpü (QIAGEN)

### 3.1.3. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Agaroz (Sigma A-9539)

Amonyum asetat (Merck A-886415)

Amonyum klorid (Meck A-577342)

Asetik asit (Merck K-24788756)

Borik asit (Merck K-11041960)

Bromfenolblue

dNTP seti

EDTA (dihidrat) (Applichem A-2937)

Etanol (95%) (Tekel)

Etidyum bromid (Sigma E-1510)

Proteinaz K (Boehringer Mannheim)

HCl (Merck 22328814)

Mineral yağ (Sigma M-5904)

Potasyum bikarbonat (Sigma P-9144)
Sodyum dodesil sülfat (loril sülfat) (Sigma L-5750)
Sodyum hidroksit (Merck C-549562)
Sodyum klorid (Sigma S-9625)
Trisma base (Sigma T-6066)
Fenol (Merck ZA-2449300)
Kloroform (Merck K-26895731)
Parafilm (American National)
İzoamil alkol (Sigma I-1885)
İzopropanol (Codex Carlo Erba 309505)
Sodyum sitrat (Sigma)
PCR purifikasyon kit (QIAGEN 28106)
10xPCR buffer (dizileme cihazı içi)
Big dye terminator kit (PE Applied Biosystems)
TSR (Perkin Elmer 401674)
Pop 6 (PE Applied Biosystems 402837)
Kapiller (PE Applied Biosystems Green)
Marker 5
PB buffer (QIAGEN)
PE buffer (QIAGEN)
EB buffer (QIAGEN)

### 3.2. Yöntemler

#### 3.2.1. Fenol/Kloroform Kullanılarak DNA İzolasyonu

*Olgulardan 5-10 cc taze kan, Na-EDTA ile 1/10 oranında karıştırılarak alınmıştır. Eğer kan taze ise alınır alınmaz (Na-EDTA ile karıştırılmadan) falkon tüpüne boşaltılmıştır. Üzerine 35-50 cc retikülosit solüsyonu eklenerek, 15 dakika, 5000 rpm de, +2/+4°C de santirifüj edilmiştir. Eğer, kan bekletilmiş ise falkon tüpüne aktarıldıktan sonra

karışım (kan +Na-EDTA + retikulosit sol.) vorteks ile fazla uzun olmamak şartıyla karıştırılmıştır.

*Kan taze ise 3 kez, bekletilmiş ise aynı şartlar uygulanarak 4 kez retikulosit solüsyonu ile yıkanmıştır. İyi bir yıkamanın gerçekleştiği, süpernatantın berrak hale gelmesi ile anlaşılmıştır.

*Her santrifüj sonunda süpernatant atılıp üzerine retikülosit solüsyonu eklenip tüp alt-üst edilerek karıştırılmıştır. Dipteki hücre peleti her yeni koyduğumuz retikulosit solusyonu ile iyice karıştırılmış, dipteki hücre peletinin tüpü alt-üst ederek yerinden ayrılamadığı durumlarda ise vorteks cihazı kullanılmıştır. Kan yukardaki işlemlerden geçirildikten sonra hücre dışındaki kan komponentlerinden temizlenmiştir.

*Eritrosit ve diğer tüm hücrelerin sitoplazmalarını parçalayıp, nükleusunu elde etmek için lizisi sağlayan solüsyondan 35-50 cc ye kadar falkon tüpüne eklenmiştir. Hücre metabolizmasını en aza indirip ortaya çıkan enzimlerin etkisini minimize etmek amacıyla falkon tüpü 3 saat kırık buz içerisinde bekletilmiştir.

*Daha sonra, 15 dakika, 5000 rpm de, +2/+4°C de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra 1 M STE solusyonundan 25 ml ye kadar konulup, 15 dakika, 5000 rpm de, +2/+4°C de santrifüj edilmiştir. Süpernatant atılmış ve pelet üzerine;

*4,5 ml 1M STE
250 µl % 20'lik SDS,
50µl Proteinaz K

ilave edilmiştir. Bu karışım 37.5 °C de yaklaşık olarak 16 saat etüvde bırakılmıştır. % 20 lik SDS hücrelerin yüzey membran gerilimini azaltıp, proteinlerin çözünürlüğünü arttırmaktadır. Proteinaz K hücre çekirdeğini parçalayarak DNA nın etrafındaki proteinleri soluble hale getirmektedir. Çekirdek içerisinde bulunan bütün proteinleri parçalayarak ve

sudaki çözünürlüklerini arttırarak DNA'yı açığa çıkarmaktadır. Bu nedenle proteinaz K tüpün dibine enjekte edilmelidir.

*Etüvden alınan tüp içerisinde yaklaşık 5 cc lik bir materyal bulunmaktadır. Bunun üzerine 5 cc fenol (1/1 oranında) ilave edilip, elde karıştırılmış, daha sonra 15 dakika, 5000 rpm de +2/+4°C'de santrifüj edilmiştir. Bu adımdan sonra daima süpernatant çalışılmıştır. Çünkü DNA süpernatantta, diğer şekilli elementler ise tüpün dibinde toplanmıştır. Fenolün proteinlere karşı afinitesi çok yüksek olduğundan, proteinlerle birleşerek çökmekte ve böylece DNA'nın saflaşmasını sağlamaktadır.

*Santrifüjden alınan tüp içerisinde iki faz gözlenmiştir. Fazlar arasında bulutvari bir kısım oluşmuştur. Bir pastör pipeti yardımıyla özellikle bulutvari kısımdan çekmemeye özen gösterilerek berrak süpernatanttan 4-5cc alınıp ayrı bir falkon tüpüne aktarılmıştır.

*1/24 lük izoamil alkol/kloroformdan 1/1 oranında, yani 4-5cc ilave edilmiştir. Elimizdeki tüp hafifçe sallanarak karıştırılmış, 15 dakika, 5000 rpm de, +2/+4°C'de santrifüj edilmiştir. İzoamil alkol DNA'nın kristalize yapı kazanmasına, kloroform ise proteinlerle birleşerek çökmelerine neden olmaktadır.

*Diğer taraftan

500 µl 3M Na asetat (PH 5.2) + 50 ml saf etanol (1/100) oranında hazırlanarak küçük bir behere konulmuştur.

*Santrifüj ettiğimiz falkon tüpünün üst kısmından 3-4 pastör pipeti kadar çekip ufak beherin içine boşaltıldığında DNA saf etanol/Na-asetat karışımına göre daha yoğun olarak görülmüştür. Pastör pipeti ile daha yoğun gözüken kısım çekilerek ependorf tüpüne aktarılmıştır.

*Ependorf tüpü, 2 dakika, 12000 rpm de santrifüj edilmiştir.

*Santrifüjden çıkartılan tüpün içerisindeki DNA, beyaz bir nokta olarak görülmüştür. Supernatant, DNA avuç içi tarafına gelecek şekilde tutularak dökülmüştür.

*%75 etanolden 1 ml konulup santrifüj edilmiş, böylece ortamdaki Na-asetat ortamdan uzaklaştırılmıştır. Süpernatant yine DNA avuç içerisine gelecek şekilde dökülmüştür.

*Ependorf tüpünün ağzı açık bırakılarak DNA kurutulmuştur. Kurumuş DNA 200 µl-500µl steril distile su ile çözülerek DNA hazır hale getirilmiştir. Bu DNA +2/+4°C'de saklanmıştır.

*Ortalama olarak, 10 ml kandan 200 µg DNA elde edilmiştir.

### 3.2.2. İzole Edilen DNA Miktarının Ölçümü

*Elde edilen DNA nın miktarı Optik Dansite (OD) değeri ölçülerek hesaplanır. Optik Dansite, 1 ml sıvıda belli dalga boyundaki (DNA için 260 nm) ışığa 1 cm yol aldıran madde miktarına 1 OD denir. Çift iplikçik DNA için 50 µg, tek sarmal için 40 µg dir.

*DNA'ya spektrofotometrede bakabilmek için 990 µl distile su+10 µl DNA olmak üzere solüsyon 1 ml'ye tamamlanmıştır. Okunan OD değerine göre hesaplama aşağıda verildiği gibi yapılmıştır.

| | |
|---|---|
| 50 µg DNA | 1 OD |
| X | Okunan OD değeri |

---

X = Okunan OD değeri x 50µg DNA

### 3.2.3. İzole Edilen DNA Örneklerinin PCR ile Amplifikasyonu

Hemofili B hastalarından elde edilmiş DNA örneklerinin PCR ile amplifikasyonu için 50 µl lik karışım hazırlanmıştır.

| | |
|---|---|
| $ddH_2O$ | 18.8 µl |
| 10xPCR buffer | 5 µl |
| dNTP mix | 5 µl |
| primer 1 | 10 µl |
| primer 2 | 10 µl |
| Taq pol | 0.2 µl |
| DNA | 1 µl |
| | --- |
| | 50 µl |

#### 3.2.3.1. Faktör IX Geni İçin Kullanılan Amplifikasyon Şartları

94 °C de 7 dakika (taq gold için) ⟶ Denatürasyon

95 °C de 1 dakika denatürasyon
Primer'e göre değişken 1 dakika bağlanma
72°C de 1 dakika uzama
} 35 döngü yapılmıştır.

En sonunda 72°C de 10 dakika tutularak ürünün arttırılması sağlanmıştır.



T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

### 3.2.3.2. Faktör IX Geni için Kullanılan Primer Dizileri

**Tablo 3.1.** Faktör IX geninin analizinde kullanılan primer dizileri

| | Primer posizyonu | Büyüklüğü (bp) | Bağlanma ısıları °C |
|---|---|---|---|
| FIX 2.1 F<br>FIX 2.1 R | Promoter + ekzon 1 | 407 | 60 |
| FIX 2.2 F<br>FIX 2.2 R | Ekzon 2 + 3 | 506 | 64 |
| FIX 2.3 F<br>FIX 2.3 R | Ekzon 4 | 245 | 64 |
| FIX 2.4 F<br>FIX 2.4 R | Ekzon 5 | 272 | 62 |
| FIX 2.5F<br>FIX 2.5R | Ekzon 6 | 458 | 57 |
| FIX 2.6F<br>FIX 2.6R | Ekzon 7 | 393 | 56 |
| FIX 2.7F<br>FIX 2.7R | Ekzon 8 | 394 | 51 |
| FIX 2.8F<br>FIX 2.8R | Ekzon 9 | 391 | 59 |
| FIX 2.9F<br>FIX 2.9R | Poly A | 521 | 59 |

FIX 2.1 F 5′- CCC ATT CTC TTC ACT TGT CC –3′
FIX 2.1 R 5′- CCT AGC TAA CAA AGA ACC AGT –3′

FIX 2.2 F 5′- AGA GAT GTA AAA TTT TCA TGA TGT T –3′
FIX 2.2 R 5′- GCA GAG AAA AAA CCC ACA TAA T –3′

FIX 2.3 F 5′- CTG CAG GGG AGG ACC GGG CAT TCT A –3′
FIX 2.3 R 5′- GAA TTC AAC TTG TTT CAG AGG GAA –3′

FIX 2.4 F 5'- CAT GAG TCA GTA GTT CCA TGT ACT TT –3'
FIX 2.4 R 5'- TGT AGG TTT GTT AAA ATG CTG AAG TT –3'

FIX 2.5 F 5'- TTT AAA TAC TGA TGG GCC TG –3'
FIX 2.5 R 5'- GTT AGT GCT GAA ACT TGC CT –3'

FIX 2.6 F 5'- AAG CTC ACA TTT CCA GAA AC -3'
FIX 2.6 R 5'- TGG GTT CTG AAA TTA TGA –3'

FIX 2.7 F 5'- TAA GAA TGA GAT CTT TAA CA –3'
FIX 2.7 R 5'- CTA AGG TAC TGA AGA ACT AA –3'

FIX 2.8 F 5'- GAA GAG TCT TCC ACA AAG GG –3'
FIX 2.8 R 5'- AAG ATG GGA AAG TGA TTA GTT A –3'

FIX 2.9 F 5'- AAG AGA ACC GTT CGT TTG CA –3'
FIX 2.9 F 5'- AGA ACT AAA GGA ACT AGC AAG –3'

### 3.2.4. Amplifikasyonun Agaroz Jel Elektroferezinde Değerlendirilmesi

*PCR sonrası oluşan ürünlerin incelenmesi için % 3'lük agaroz jeli hazırlanmıştır ve örnekler agaroz jel elektroforezi yöntemine tabi tutulmuştur. Bu aşamada % 3 lük agaroz jel için tartılan agaroz, mikrodalga fırın yardımıyla yüksek ısıda 1xTAE solusyonu içinde çözündürülmüştür. Çözelti yaklaşık 60 °C ye kadar soğutulduktan sonra üzerine konsantrasyonu 0.5 µl\ml olacak şekilde etidyum bromür eklenip karıştırılmıştır.

*Elektroforeze başlamadan önce tank, taraklar ve jel yatağı temizlenip, tankın benç üzerindeki dengesi ayarlanmış, tarak ve jel küveti tanka yerleştirilip, hazırlanan jel küvete dökülmüştür. Jel donduktan sonra tank 1×TAE çözeltisi ile doldurulmuştur.

*18 µl PCR ürünü alınıp, üzerine 2 µl 10x lik yükleme tamponundan konarak karıştırılmış ve jeldeki kuyucuklara yüklenmiştir [Her jelin bir kuyusuna marker (Marker V) yüklenmiştir].

*Yükleme işlemi bittikten sonra elektrodlar yerleştirilerek 80-100 voltta yürütülen PCR ürünü, elektroforez tamamlandıktan sonra jel dökümantasyon sistemiyle görüntülenmiş ve fotoğraflanmıştır.

### 3.2.5. PCR Ürünü Pürifikasyonu

*Hazır kit (QIAGEN) kullanılarak yapılmış olan bu protokol, PCR ürününü primerler, nükleotidler ve tuzdan uzaklaştırabilmek üzere oluşturulmuş bir protokoldür. Hazır kitin içinde üç farklı tampon solüsyonu bulunmaktadır (PB, PE ve EB). Protokol aşağıdaki şekilde uygulanmıştır;

*Elde edilen 1 volüm PCR ürünü, 5 volüm PB buffer ile karıştırılmıştır.

*Bu karışım spin column tüplerinin içine konulmuştur. Spin column tüpleri ise 2 ml hacimli toplama tüplerine (collection tübe) yerleştirilmiş ve 30-60 saniye, 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

*Santrifüj sonrası toplama tüpleri boşaltılmış ve spin column tüpleri tekrar içlerine yerleştirilmiştir. İçlerine PE buffer konan spin column tüpleri tekrar 30-60 saniye 14.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve toplama tüpleri santrifüj sonrası boşaltılmıştır.

*Bu işlemden sonra 1 dakika ilave santrifüj daha yapılmış ve spin column tüpleri 1,5 ml'lik eppendorf tüplerinin içlerine yerleştirilmiştir. Sonrasında 50 µl EB (elution buffer) solüsyonu, dikkatlice spin column tüplerinin tam ortasına gelecek şekilde boşaltılmıştır. 1 dakika oda ısısında inkübe edilen tüpler, 1 dakika daha 14.000 rpm'de santrifüj edilmiştir.

*1,5 ml'lik ependorf tüplerine pürifikasyon sonrası biriken pürifiye PCR ürünü döngü dizileme reaksiyonu için hazır hale gelmiştir.

### 3.2.6. Döngü Dizileme [ Cycle Sequencing (CS)] Reaksiyonu

Hazır kit (cycle sequencing ready reaction kit) ile yapılan bu reaksiyon pürifiye PCR ürününün dallarından birinin floresan boyayla işaretli forward ya da reverse primer kullanılarak, otomatik kapiller jel elektroforezi cihazında görüntülenebilmesi esasına dayanır.

| | |
|---|---|
| Hazır kit | 8 µl |
| Pürifiye PCR ürünü | 30-90 ng |
| Primer | 3.2 pmol |
| $ddH_2O$ | Değişken |
| Toplam Volüm | 20 µl |

olacak şekilde hazırlanan reaksiyon;

| | | |
|---|---|---|
| 96°C | 10 Saniye | 25 döngü |
| 50°C | 5 Saniye | |
| 60°C | 4 Dakika | |

şartlarında amplifiye edilmiştir.

* Amplifiye olan döngü dizileme CS ürünü, hemen buz üzerine alınıp etanol pürifikasyonu işlemine tabi tutulmuştur.

### 3.2.7. Etanol Pürifikasyonu

*0.2 µl'lik tüplerde olan ürün, 1,5 µl'lik ependorf tüplerine aktarılmış ve her tüpe;

16 µl $ddH_2O$

64 µl % 95'lik etanol konulmuştur.

Sonuç olarak son etanol konsantrasyonu %60±3 olur.

*Tüpler kapatılıp vortekslendikten sonra 15 dakika oda ısısında bırakılmış ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası süpernatant hemen boşaltılarak, 100 µl % 70'lik etanol ilave edilmiştir.

*Tüpler, 14.000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant ortamdan uzaklaştırılmış ve kalan etanolü uçurmak için 37°C'lik etüvde kapakları açık bırakılarak inkübe edilmişlerdir.

*Etanolden tamamıyla uzaklaşıp presipite olmuş CS ürünü, otomatik kapiller elektroforez cihazına yüklemek üzere, 12-25 µl TSR (Template suppression reagent) ile ependorf tüpünün cidarlarına tamamen sıvanarak muamele edilmiştir.

*Vorteks ve spin edilen ürün, 0.5ml'lik dizileme tüplerine aktarıldıktan sonra 95°C'de 2 dakika denatüre edilmiş ve hemen buz üzerine alınıp tekrar vortekslendikten sonra mikro santrifüjde spin edilmiştir.

*Tekrar buz üzerine alınan ürün ABI 310 otomatik kapiller elektroforez analizörüne (ABI PRIZM 310 Genetic Analyzer) konularak dizileme işlemine başlanmıştır.

*Elektroforez Şartları;

| | |
|---|---|
| Modül(modüle file) | Pop 6 Rapid (1ml) E |
| Enjeksiyon zamanı(Injection time) | 30 saniye |
| Koşu zamanı (run time) | 36 dakika |
| Lazer gücü | 9.9mV |
| Jel ısısı (Gel temp) | 50°C |

Yukarıdaki şartlarda kapiller elektroforezde yapılan DNA baz dizilemesi sonrası elde edilen sonuçlar http://www.ncbi.nlm.nih.gov. web veri tabanında değerlendirilmiş ve analiz edilen gen bölgesi tanımlanmış normal gen dizisi ile kıyaslanarak mutasyon analizleri yapılmıştır.

### 3.2.8. Kullanılan Çözeltiler

#### 3.2.8.1. Ana Çözeltileri Hazırlamak için Gerekli Olan Çözeltiler

0.5 M EDTA (pH 8.0) Çözeltisi

*Disodium ethylendiamine tetra acetate 2 $H_2O$ : 186.1 g tartılarak beher içine konmuş, dd$H_2O$ ile 800 ml ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürülmüştür ve pH'ı NaOH ile 8.0'e ayarlanmıştır. 120 °C de, 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

1 M Tris Çözeltisi

*Tris base: 121.1 g tartılıp mezür içerisine konmuştur. Üzerine, 42 ml HCl (hidroklorik asit) ilave edilerek, dd$H_2O$ ile 1 lt ye tamamlanmıştır. Manyetik karıştırıcı yardımı ile çözündürülmüştür.

1 M NaOH Çözeltisi

*NaOH : 40 g tartılıp mezür içerisinde dd$H_2O$ ile 1 lt ye tamamlanmıştır.

50 x TAE Çözeltisi

*Tris base : 242 g
* Glacial acetic acid : 57.1 ml

EDTA (0.5M) : 100 ml

* Mezür içine aktarılıp, $ddH_2O$ ile 1 lt ye tamamlanmıştır.
* 120 °C de, 15 dk otoklavda sterilize edilerek, oda ısısında saklanmıştır.

### 3.2.8.2. Fenol/Kloroform Yöntemiyle DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

5 x Retikülosit Tuz Çözeltisi

| | | |
|---|---|---|
| Sodyum Klorür : | 686 mM | =40.089 g/lt |
| Potasyum Klorür : | 25 mM | = 1.864 g/lt |
| Magnezyum Klorür : | 35 mM | = 7.1155 g/lt |

*Karışım $ddH_2O$ ile 1lt'ye tamamlanır

Çözücü Çözelti (Lizat Hazırlama Çözeltisi)

| | | |
|---|---|---|
| Amonyum Klorür : | 155.0 mM | = 80.29 g/lt |
| Potasyum Bikarbonat : | 10.0 mM | = 1.001 g/lt |
| Disodyum EDTA : | 0.1 mM | = 0.03722 g/lt |

*Karışım $ddH_2O$ ile 1lt'ye tamamlanır

Ya da;

| | | |
|---|---|---|
| Amonyum Klorür : | 131.0 mM | = 7.00719 g/lt |
| Amonyum Bikarbonat | 0.9 mM | = 0.0711g/lt |

* Karışım $ddH_2O$ ile 1lt'ye tamamlanır

STE Çözeltisi

| | | |
|---|---|---|
| Sodyum Klorür : | 100.0 mM | = 6 g/lt |
| Tris HCl : | 10.0 mM | = 1.2114 g/lt (ph 8.0) |
| EDTA (Disodyum tuzu) : | 1.0 mM | = 0.3722 g/lt |

* Karışım dd$H_2O$ ile 1lt'ye tamamlanır

Doymuş Fenol Hazırlanması

DNA özütlemesinde kullanılan doymuş fenolu hazırlayabilmek için:

*250 g kristal fenol 50 ml saf suda çözündürülmüştür.

*Üzerine 500 ml 1 M Tris. HCL (pH 8.0) eklenip, karıştırılmıştır.

* Fazlar ayrıldıktan sonra su fazı alınmış ve bu işlem 2-3 kez tekrarlanmıştır.

*Su fazının pH sı 8.0 oluncaya kadar bu işlem sürdürülmüştür.

*Su fazı alınarak koyu renkli şişede saklanmıştır.

%10 SDS Çözeltisi

*SDS : 10 g tartılmıştır. Dikkatlice beher içine alınıp SDS tozlarını kaldırmamaya dikkat ederek üzerine ddH2O ile 100 ml ye tamamlanmıştır. 56 °C de bekletilerek çözündürülmüştür. [Ya da iyice solusyona geçmesi için uzun bir süre (1-2 saat) manyetik karıştırıcıda çevrilmiştir.] 0.22 mikron'luk filtreden geçirilerek sterilize edilmiştir ve pH 7.2 ye ayarlanarak, oda ısısında saklanmıştır.

Proteinaz K Çözeltisi

*1 mg\ml olacak şekilde hazırlanmıştır.

### 3.2.8.3. Agaroz Jel Elektroforezi Çözeltileri

Agaroz jel (%3)

* 2.1 g agaroz tartılıp, bir beher içinde 1xTAE solusyonu ile 70 ml ye tamamlanmış ve mikrodalga fırında, %30'luk güçte 5 dakika kaynatılmıştır.

Etidyum Bromür

*Stok 10 mg\ml olacak şekilde steril dd$H_2O$ ile 10 ml hazırlanmıştır.

Agaroz Jel Yükleme Tamponu

*% 0.25 bromfenol blue
*% 30 gliserol olacak şekilde steril dd$H_2O$ ile 10 ml hazırlanmıştır.

TAE (Stok-50 x) Solüsyonu

*0.04 M Tris-asetat
* 0.001 M EDTA olacak şekilde steril dd$H_2O$ ile 1 l hazırlanmıştır.
* 120 °C de, 15 dk otoklavda sterilize edilmiştir.

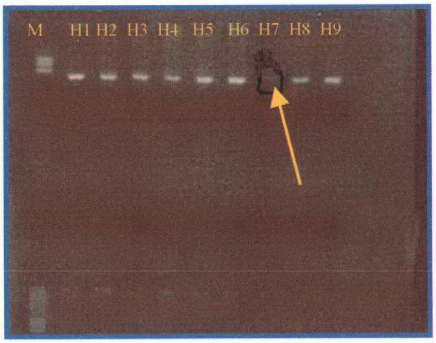
# 4. BULGULAR

Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbı Genetik Bilim Dalı, Moleküler Genetik Tanı Laboratuarında, Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalının, Ege Üniversitesi ve Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Bilim Dalları ile birlikte belirlediği 13 hemofili B hastasından alınan periferik kan örneklerinde gerçekleştirilen bu çalışmada, hemofili B hastalığından sorumlu olan mutasyonlar, faktör IX geninin 8 ekzonu, promoter ve poly A ucu da dahil olmak üzere DNA baz dizi analizi ile belirlenmiştir.

Bu çalışmanın temel amacı, yüksek heterojenite gösteren faktör IX geninde otomatik kapiller jel elektroforezi ile DNA baz dizileme yöntemini kullanarak kesin moleküler tanıya gidebilmektir. Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbı Genetik Bilim Dalı, Moleküler Genetik Tanı Laboratuarında yapılan bu çalışmada, kapiller jel elektroforezi yönteminin değişik şartlarda ve baz dizilerinde optimizasyonu yapılarak, hemofili B hastalarında moleküler tanı amacıyla rutin kullanıma girilebilecek düzeyde ekip ve ekipman seviyesine ulaşılmıştır.

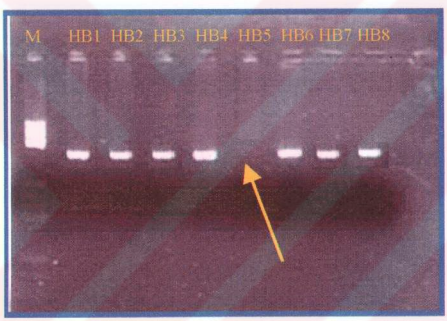
## 4.1. PCR Amplifikasyonu Sonrası Delesyon Tanımlaması

Etidyum bromid boyamayı takiben konvansiyonel bir jelde PCR reaksiyonunun analiz edilmesiyle total ve parsiyel delesyonlar kolay ve çabuk bir şekilde tespit edilir. Bu çalışmada da uygulanmış olan bu yöntemle faktör IX geni ekzon içi delesyonları tanımlanmıştır. HB7 (Resim 4.1.), HB5 (Resim 4.2.) ve HB4 (Resim 4.3.) protokol no'lu hastaların delesyonları promoter + 1. ekzon ve 8. ekzon bölgelerinde bulunmuştur. FIX2.1. primerleri, faktör IX genindeki promoter ve 1. ekzonu dizileyebilecek şekilde pozisyon – 124 ile +282 arasında çalışmakta ve 60°C bağlanma ısısına sahip bulunmaktadır. PCR reaksiyonu sonrası promoter ve 1. ekzon amplifikasyonu alınamayan HB4 ve HB7 hastalarıyla 8. ekzon amplifikasyonu alınamayan HB5 hastasındaki PCR amplifikasyonları, düşük bağlanma ısılarında tekrarlanmış (50-55°C) ve primer eşleşme bölgelerinde bulunan amplifikasyonu engelleyebilecek olası bir mutasyon riskinin ortadan kaldırılması amaçlanmıştır.



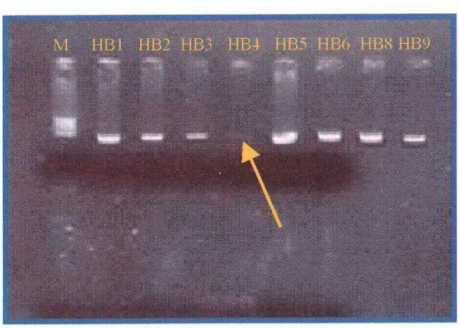

PROMOTER
+ 1. EKZON

**Resim 4.1.** HB7 hastasının FIX 2.1'deki delesyon tayini




8. EKZON

**Resim 4.2.** HB5 hastasının FIX 2.7'deki delesyon tayini



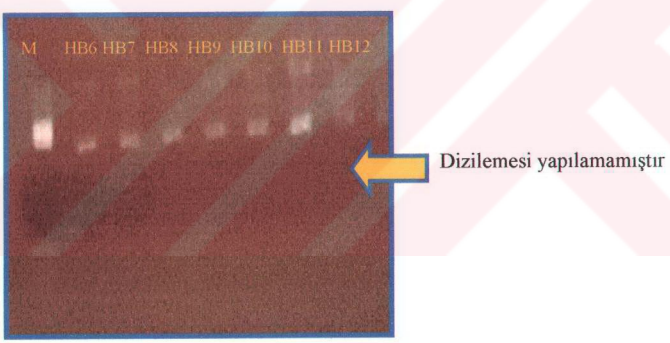

PROMOTER
+ 1. EKZON

**Resim 4.3.** HB4 hastasının FIX 2.1'deki delesyon tayini

### 4.2. PCR Amplifikasyonları ve PCR Pürifikasyonundaki Problemler

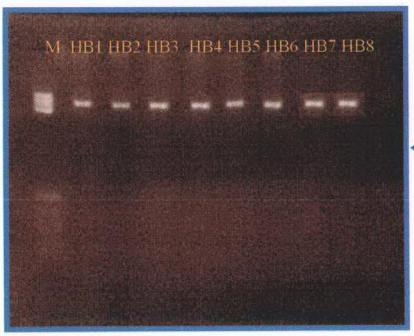
Otomatik kapiller jel elektroforezi (ABI sequencer) DNA baz dizilenmesinde büyük bir hız ve zaman avantajı getirmekle beraber, çalışılan gen bölgesine göre yapılması gereken optimizasyonlar, yöntemin çok hassas olmasından dolayı belli zorlukları da içinde barındırmaktadır.

PCR amplifikasyonlarının agaroz jelde, jel dökümantasyon sistemi yardımıyla görüntülenmesi ve yeterli seviyede güçlü bantların alınması DNA baz dizilenmesindeki gerekli şartlardandır. Bu çalışmada da tüm ekzon amplifikasyonlarında aynı prosedür uygulanmış ve alınan bantlar yeterli bulunduktan sonra PCR pürifikasyonu işlemine başlanmıştır (Resim 4.4., 4.5.).



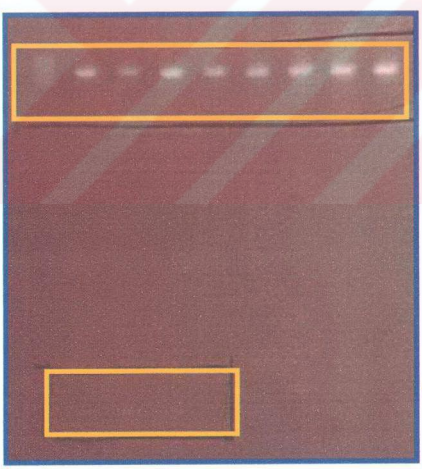

**Resim 4.4.** Ekzon 5'in agaroz jel görüntüsü

PCR pürifikasyonu, elde edilen PCR ürününün dizileme döngü reaksiyonuna girebilmesi için gerekli olan bir temizleme işlemidir. Ancak işlem sırasında PCR ürünü kaybı da meydana gelebilmekte olup döngü dizileme reaksiyonunda sorunlar oluşturabilmektedir (Resim 4.6.).




Dizilemesi yapılabilmiştir

**Resim 4.5.** Faktör IX geni poly A ucu jel görüntüsü



Pürifiye edilmemiş PCR ürünü jel görüntüsü

Pürifiye edilmiş PCR ürünü jel görüntüsü

**Resim 4.6.** Poly A ucunun pürifikasyonu sonrası ortaya çıkan DNA kaybı

Bu çalışmada yapılan pürifikasyonda, oluşan PCR ürünü kaybını en aza indirebilmek için kullanılan PCR pürifikasyonu kitinde üretici firmanın (QIAGEN) önerdiği santrifüj süreleri (30-60sn) minimumda tutulmuştur. Ayrıca protokoldeki son aşama olan EB buffer'dan, DNA konsantrasyonunu arttırabilmek amacıyla, 50 µl yerine 30 µl konularak sonuca ulaşılmıştır.

### 4.3. Döngü Dizileme Reaksiyonu Stratejileri

Otomatik kapiller jel elektroforezinin yüklenmesinden önce yapılan bu reaksiyonun protokolü ve laboratuar uygulaması kullanıcı için kolay olmakla birlikte çalışmanın optimizasyonunun yapılması belli manipülasyonları gerektirmektedir.

Döngü dizileme reaksiyonunda kullanılan "Big Dye Terminator" kit, protokolde önerilen 8 µl yerine 4µl'ye düşürülmüş ve dizileme yapılabilmiştir. DNA baz dizilemesinde en yüksek maliyeti oluşturan "Big Dye Terminator" kitin yarı yarıya kullanımı dizileme maliyetini büyük miktarlarda düşürmüştür (Tablo 4.1.).

**Tablo 4.1.** Döngü dizileme reaksiyonunda kullanılan reaksiyon şartları

| Big Dye Terminator 4µl | |
|---|---|
| PCR ürünü | 30-90 ng |
| Primer | 3.2 pmol |

Reaksiyon sırasında kullanılan primer ve PCR ürününe göre farklı şartlarda dizileme döngü reaksiyonu oluşturulması, DNA baz dizilemesini yapabilmek için gereklidir. Dizayn edilen primerin bağlanma ısısı dizileme döngü reaksiyonunda kullanılan (50°C) bağlanma ısısının altında olmamalıdır. Çalışmada GC'den zengin gen bölgelerinde reaksiyon yapılıyorsa denatürasyon ısısı 95 °C'den 98 °C'ye çıkarılmalıdır.

DNA baz dizileme diyagramında zayıf sinyaller alınıyor ya da karmaşık DNA bantları oluşuyorsa, dizileme döngü reaksiyonunda kullanılan PCR ürünü 30-90 ng'dan fazla kullanılmalıdır. Bu çalışmada da karşılaşılan aynı sorun, 150-200 ng PCR ürünü kullanılarak çözümlenmiştir (Tablo 4.2.).

**Tablo 4.2.** CS reaksiyonunda karşılaşılan sorunlar ve uygulanan çözümler

| Dizileme Problemi | Mühtemel neden | Uygulanan çözümler |
|---|---|---|
| Dizileme yapılamaması | PCR ürünü | PCR reaksiyonu ve bağlanma ısıları modifiye edilmiş PCR ürünü miktarı CS reaksiyonunda arttırılmıştır |
| | Primer | Kullanılan primer miktarı arttırılmıştır |
| | Kimyasal | Farklı stoktan ve yeniden hazırlanarak kullanılmıştır |
| | PCR reaksiyon şartları | Isı yükselmesi 1°C/sn'ye getirilmiştir |
| | PCR ürününün pürifik. sonrasında kaybolması | Santj. zamanı minimize edilmiştir<br>EB buffer miktarı düşürülmüştür |
| Düşük sinyal seviyesi veya karmaşık DNA bantları | CS.Reak.'nunda yeterli DNA olmaması | PCR ürünü arttırılmıştır |
| | | Enjeksiyon zamanı ↑(30-45 sn) |
| | CG'den zengin gen bölgesi | Denatürasyon ısısı ↑ (98°C) |
| | Eski kimyasal ya da manipulasyon hatası | Yeni kimyasal kullanımı<br>Reaksiyon tekrarı |

### 4.4. DNA Baz Dizilenmesi

Otomatik kapiller jel elektroforez yöntemi ile agaroz jelde amplifikasyonu yapılarak herhangi bir parsiyel delesyon tanımlanamamış 9 hastanın, promoter ve 5′ poly A ucu da dahil olmak üzere 8 ekzonu dizilenmiştir (Tablo 4.3., 4.4.).

Faktör IX geninin bütün fonksiyonel bölümlerinin dizilenmesi sonucunda, FIX:C>%50 olan HB12 protokol numaralı hafif hemofili B hastası dışında bütün hastalarda faktör IX geni mutasyonu tespit edilebilmiştir.

**Tablo 4.3.** Faktör IX geninde dizilenen DNA baz bölgeleri

| Primer | Amplifiye edilen bölge |
|---|---|
| FIX2.1 | Pozis.-124 / +282 |
| FIX2.2 | Pozis.6258 / 6771 |
| FIX2.3 | Pozis.10328 / 10563 |
| FIX2.4 | Pozis.17592 / 17866 |
| FIX2.5 | Pozis. 20238 / 20698 |
| FIX2.6 | Pozis. 29898 / 30293 |
| FIX2.7 | Pozis. 30709 / 31101 |
| FIX2.8 | Pozis. 31053 / 31449 |
| FIX2.9 | Pozis. 32410 / 32920 |

**Tablo 4.4.** Hemofili B hastalarında faktör IX geninde dizilemesi yapılabilen (+) bölgeler

| DNA no: | Prom.+ 1.Ekz | 2+3.Ekz | 4.Ekz | 5.Ekz | 6.Ekz | 7.Ekz | 8.Ekz | Poly A |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| HB1 | + | _ | + | + | + | + | + | + |
| HB2 | + | _ | + | + | + | + | + | + |
| HB3 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| HB6 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| HB8 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| HB9 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| HB10 | + | _ | + | + | + | + | + | + |
| HB11 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| HB12 | + | + | + | + | + | + | + | + |
| HB13 | + | _ | + | + | + | + | + | + |

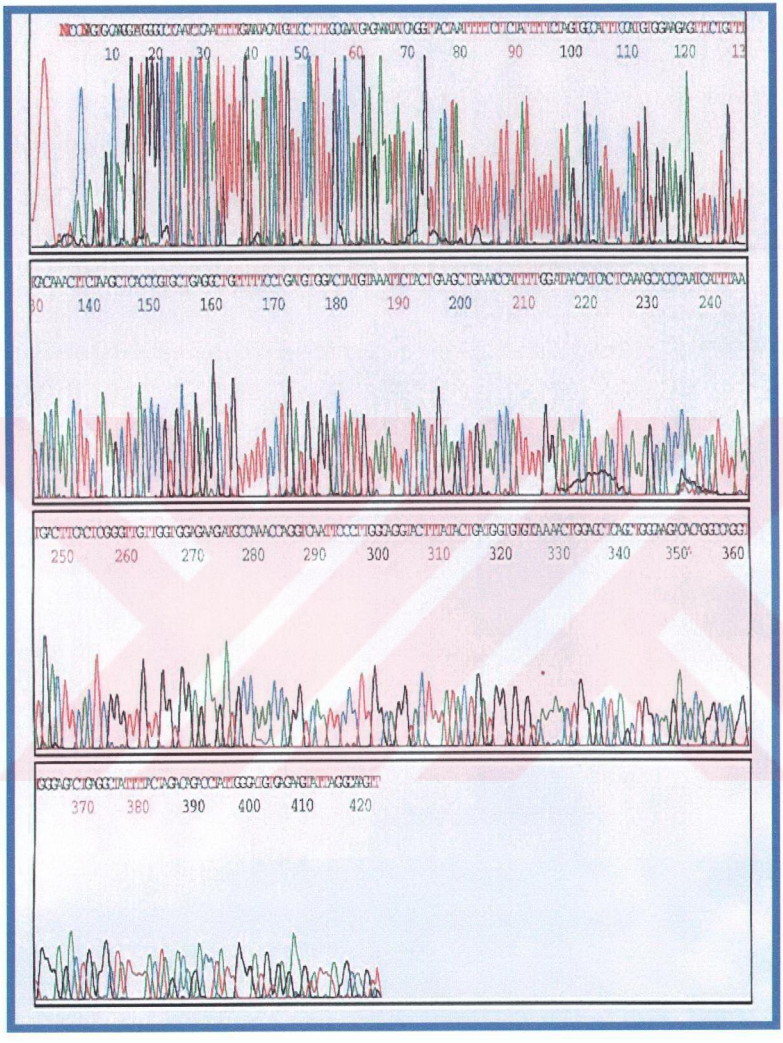
Otomatik kapiller jel elektroforezi ile yapılan DNA baz dizilemesi işlemi, doğru ve tam yapılmış bir matriks ve modül ile birlikte kullanılarak sonuca ulaşılmıştır. Tüm kalibrasyon ayarlamalarının her dizileme işleminde tekrarlanması gerekmektedir. Cihazı yüklerken enjektöre çekilen polimerde hiçbir şekilde hava kabarcığı bulunmaması, kapillere girebilecek hava kabarcıklarının dizilemede alınacak sonucu etkilemesinden dolayı kritik bir öneme sahiptir. GENTAM moleküler tanı laboratuarında faktör IX geni mutasyonu tarama çalışmalarında da benzer problemlerle karşılaşılmış ve önemi görülmüştür.

### 4.5. DNA Baz Dizilenmesi Sonrası Alınan Sonuçların Değerlendirilmesi

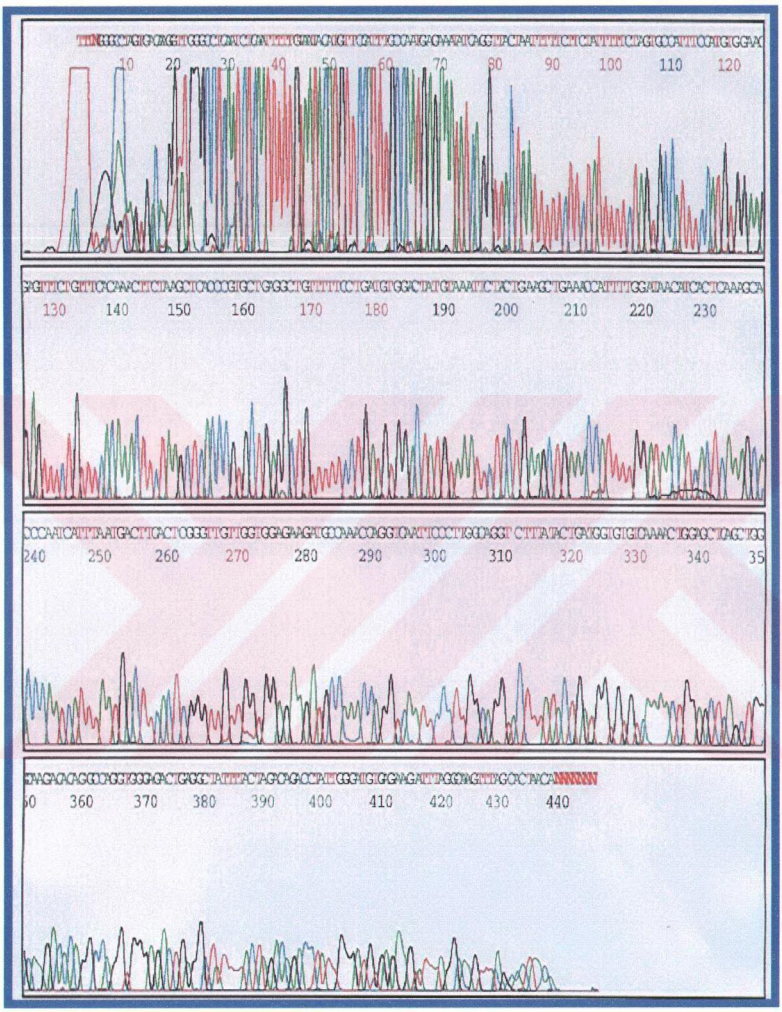
Analiz edilen faktör IX geni dizileme sonuçları bilgisayar ortamında görüntülenmiş ve her nükleotid farklı renkte olmak üzere printer çıktıları alınmıştır (Şekil 4.1.-4.4.) Ayrıca analiz edilen diziler diskete kopyalanarak internet ortamına taşınmış ve tüm sonuçların DNA veri tabanında karşılaştırılması yapılmıştır. Bu taramalar sonucunda faktör IX geni promoteri, sekiz ekzonu ve poly A bölgelerinde 9 farklı mutasyon belirlenmiştir (Tablo 4.5.).

**Tablo 4.5.** Faktör IX geninde bulunan mutasyonlar

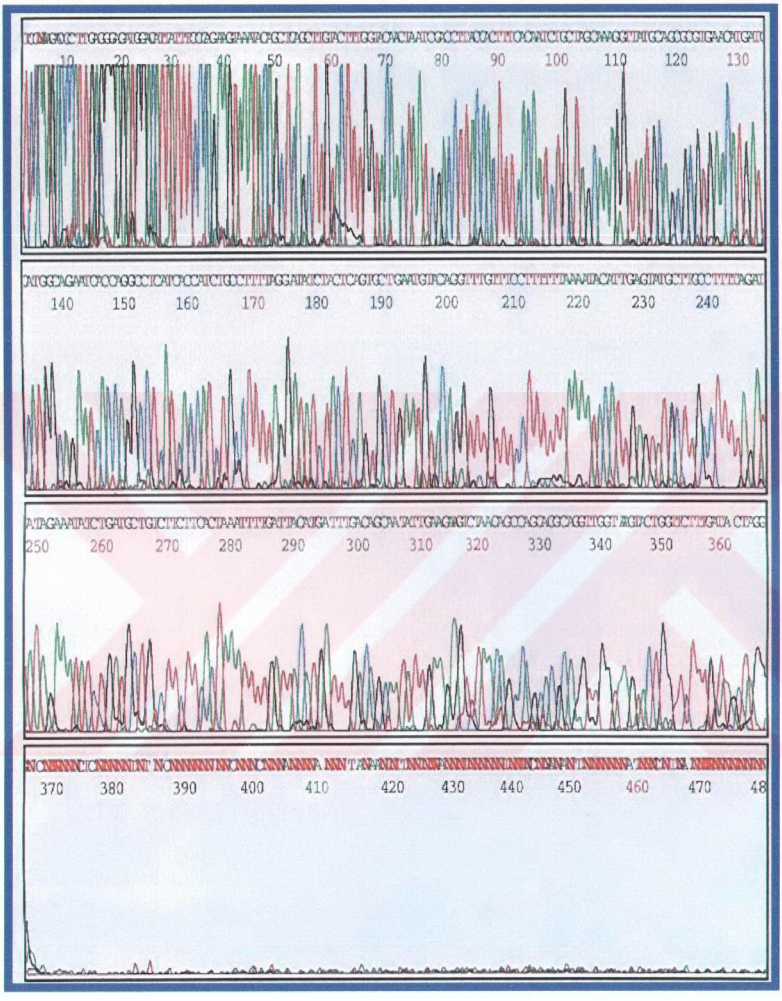
| DNA No | Amino asit değişiklikleri | Belirlenen mutasyonun gösterimi (şekil) |
|---|---|---|
| HB1 | 31335 T>A | Şekil 4.5. |
| HB2 | 30842 G ins | Şekil 4.6. |
| HB3 | 20551 C>T | Şekil 4.7. |
| HB6 | 17719 A>T | Şekil 4.8. |
| HB8 | 31118 C>T | Şekil 4.9. |
| HB9 | 6392 T>C | Şekil 4.10. |
| HB10 | 30133 T>C | Şekil 4.11. |
| HB11 | 31119 G>A | Şekil 4.12. |
| HB13 | 30150 G>A | Şekil 4.13. |



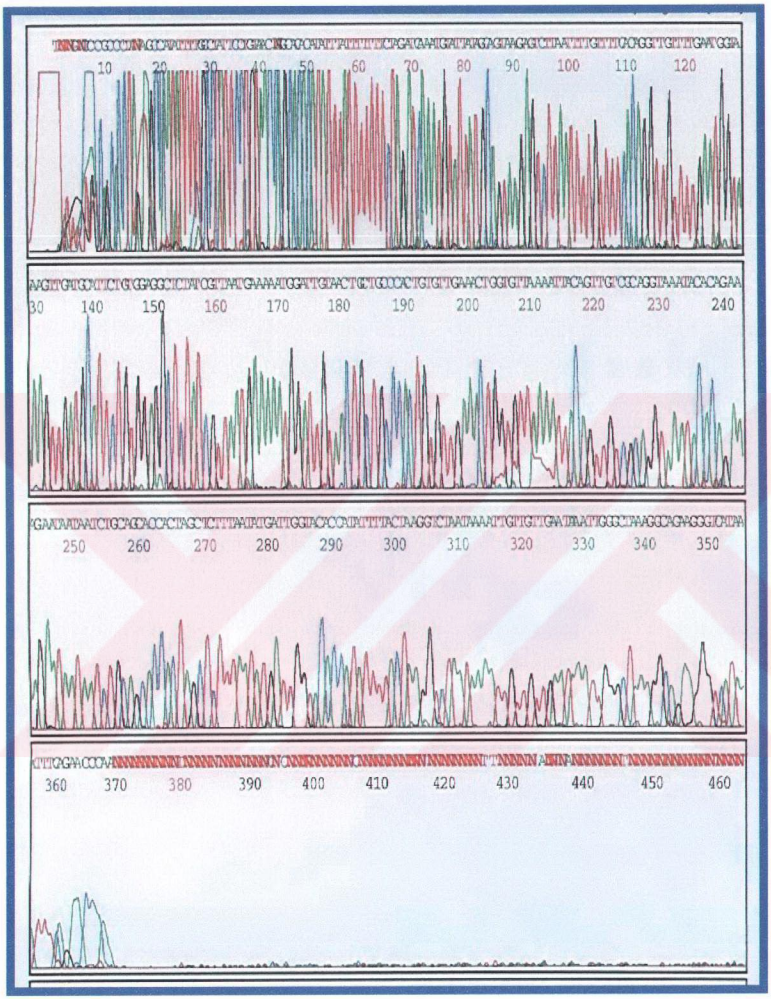
**Şekil 4.1.** HB6 hastasının faktör IX geni 5. ekzonunun dizisi



**Şekil 4.2.** HB1 hastasının faktör IX geni 5. ekzonunun dizisi



**Şekil 4.3.** HB3 hastasının faktör IX geni promoter ve 1. ekzonunun dizisi



**Şekil 4.4.** HB6 hastasının faktör IX geni 7. ekzonunun dizisi

Belirlenen mutasyonların faktör IX genindeki etkileri ve hastalığa neden olan amino asit değişimleri bulunup mutasyonların tiplendirilmesi yapılmıştır (Tablo 4.6.).

**Tablo 4.6.** Hemofili B hastalarındaki klinik ve moleküler bulgular

| DNA No | FIX : C (%) | Nükleotid Değişimi | Mutasyon Türü | Amino asit Değişimi |
|---|---|---|---|---|
| HB1 | 5 | 31335 T > A | Missens | Val 405 Asp |
| HB2 | 2.2 | 30842 Gins **(yeni)** | İnsersiyon (frameshift) | Thr 241 Asp |
| HB3 | < 1.5 | 20551 C > T | Nonsens | Gln 191 Stop |
| HB4 | 3.7 | Prom+1.ekzon Del. | | |
| HB5 | 4 | 7.ekzon Delesyonu | | |
| HB6 | | 17719 A> T | Missens | Ser 102 Cys |
| HB7 | | Prom+1.ekzon Del. | | |
| HB8 | 3 | 31118 C > T | Nonsens | Arg 333 Stop |
| HB9 | | 6392 T > C | Missens | Leu 6 ser |
| HB10 | 10.5 | 30133 T > C **(yeni)** | Missens | Val 227 Ala |
| HB11 | | 31119 G > A | Missens | Arg 333 Gln |
| HB12 | > % 50 | | | |
| HB13 | | 30150 G >A | Missens | Ala 233 Thr |

Hemofili B hastalığına neden olan faktör IX geni mutasyonlarının, 13 hemofili B hastasında belirlenmesi sonucunda, HB12 protokol numaralı hafif hemofili B hastası dışındaki bütün olgularda faktör IX geni mutasyonları tespit edilmiştir.

Akraba olan hasta HB4 ve HB7'de pozisyon –124 ile + 282 arasında, promoter ve 1 ekzonu içeren bir bölgede delesyon bulunmuştur.

Hasta HB5'te 7.ekzon bölgesinde bir delesyon tanımlanmıştır.

Hasta HB1'de 8.ekzon bölgesinin 31335'nci pozisyonunda T>A DNA baz transversiyonu bulunmuştur. Bu transversiyon normal Val 405 amino asit rezidüsünün bir Asp ile yer değiştirmesine neden olmuştur. Amino asit zincirindeki değişime neden olan T>A transizyonu, protein molekülünde yapısal değişikliklere neden olan missens mutasyonlara bir örnektir (Şekil 4.5.).

Hasta HB2'de yine 8.ekzon bölgesinin 30842'nci pozisyonunda G insersiyonu bulunmuştur. Normal 241 Thr rezidüsü, meydana gelen G insersiyonu sonucunda Asp'a dönüşmüştür (Şekil 4.6.).

Hasta HB3'de 6.ekzonun 20551'nci nükleotidinde C>A transversiyonu tespit edilmiştir. Gln 191 amino asit rezidüsü meydana gelen bu mutasyon sonucunda stop kodonunu oluşturan nonsens mutasyonlara bir örnektir. Ağır hemofili hastası olan HB3'ün FIX: C < % 1,5 ve FIX : Ag % 5'tir (Şekil 4.7.).

Hasta HB6'da, 5.ekzonun 17719'uncu pozisyonunda A>T transversiyonu bulunmuştur. Ser 102 amino asit rezidüsü, meydana gelen missens mutasyon sonucu Cys'ye dönüşmüş ve amino asit zincirini değiştirmiştir (Şekil 4.8.).

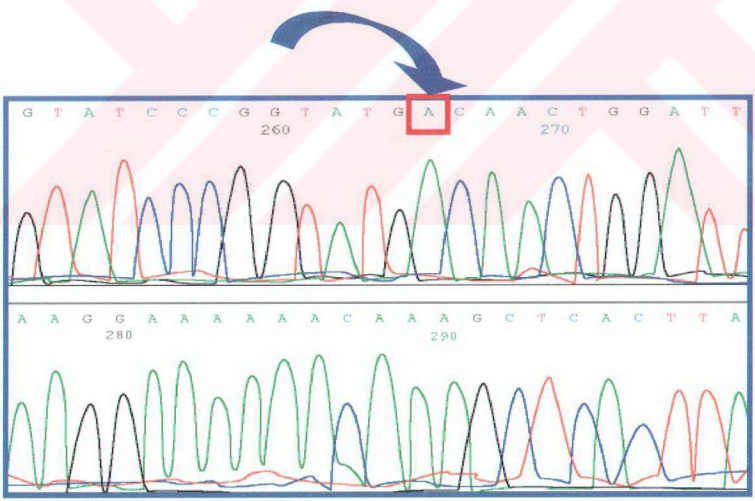
Hasta HB8'de, 8.ekzonun 31118'nci pozisyonunda C>T transizyonu tespit edilmiştir. Bu transizyon Arg 333 rezidüsünü stop (TGA) kodonuna çeviren nonsens mutasyonlara bir örnektir. Hastanın FIX: C % 3'tür (Şekil 4.9.).

Hasta HB9'da 2.ekzonun 6392'nci pozisyonunda T>C transizyonu bulunmuştur. Leu 6 amino asit rezüdüsü, meydana gelen missens mutasyonu sonucunda Ser'e dönüşmüştür (Şekil 4.10).

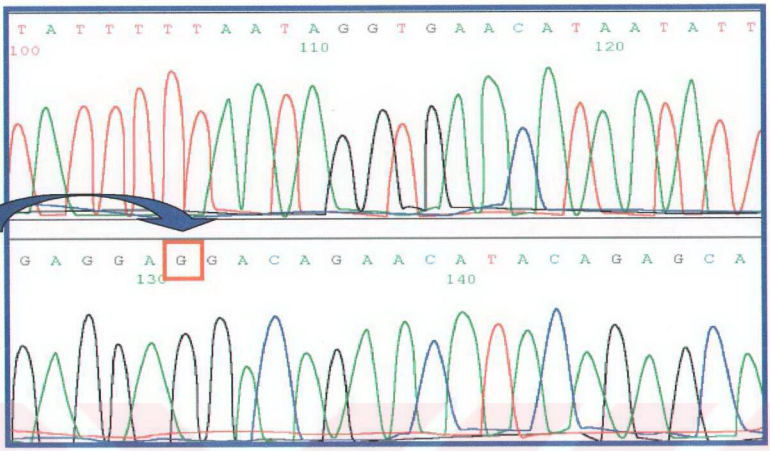
Hasta HB10'da 7.ekzonda, 30133'ncü pozisyonda oluşan T>C transizyonu tespit edilmiştir (Şekil 4.11.). Mutasyon sonucunda Val 227 rezidüsü Ala'ya dönüşmüştür.

Hasta HB11'de, 8.ekzonunu 31119'uncu posizyonunda G>A transizyonu bulunmuştur. Arg 333 rezidüsü oluşan missens mutasyonu sonucunda Gln'ye dönüşmüştür. HB11, ağır hemofili B hastası olup FIX: C (% 1,5)'dur (Şekil 4.12.).

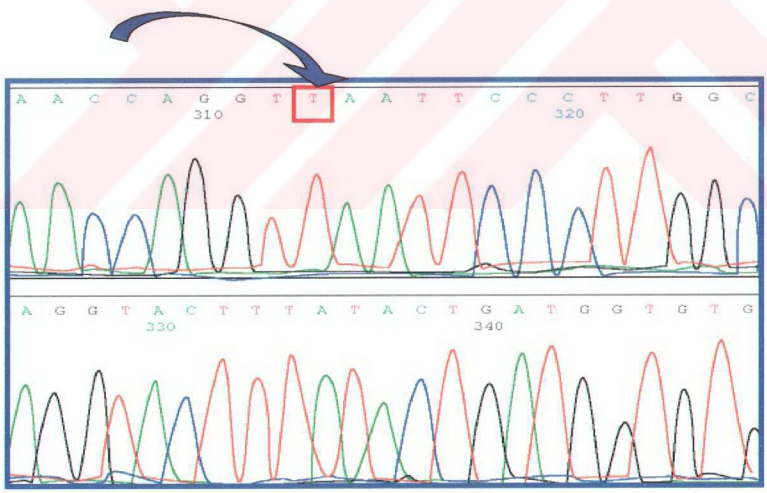
Hasta HB13'te, 7.ekzonun 30150'nci pozisyonunda G>A transizyonu tespit edilmiştir. Ala 233 rezidüsü meydana gelen missens mutasyonu sonucunda Thr'ye dönüşmüştür. HB13, ağır hemofili B hastası olup, FIX: C < % 5'tir (Şekil 4.13.).



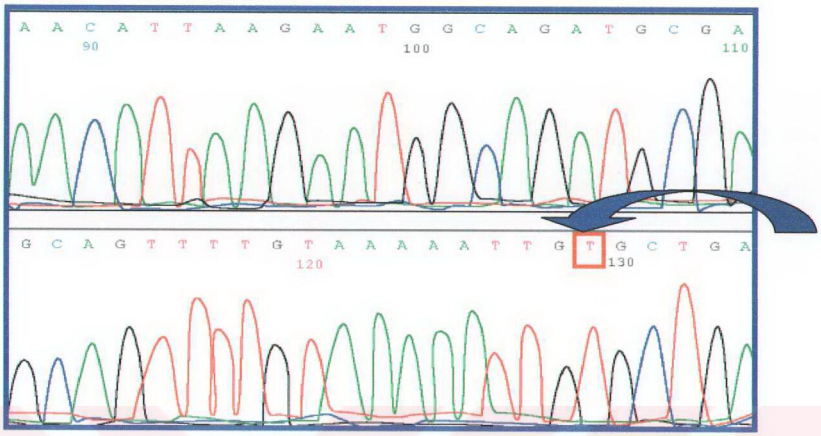

**Şekil 4.5.** Hasta HB1'de bulunan 31335. pozisyonundaki T >A Missens mutasyonu



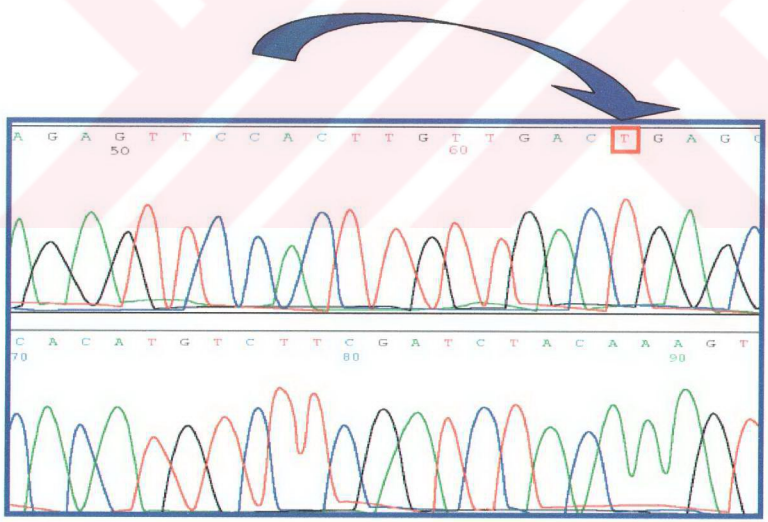

**Şekil 4.6.** Hasta HB2'de bulunan 30842. pozisyonundaki G ins mutasyonu



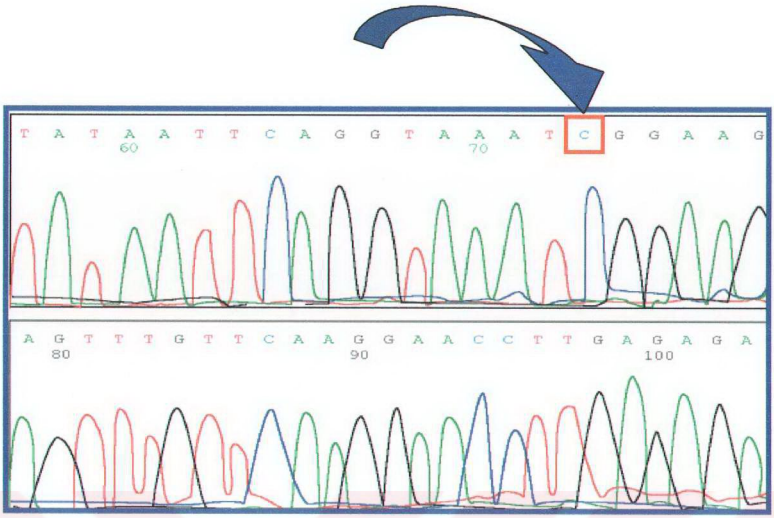

**Şekil 4.7.** Hasta HB3'de bulunan 20551. pozisyonundaki C >T Nonsens mutasyonu



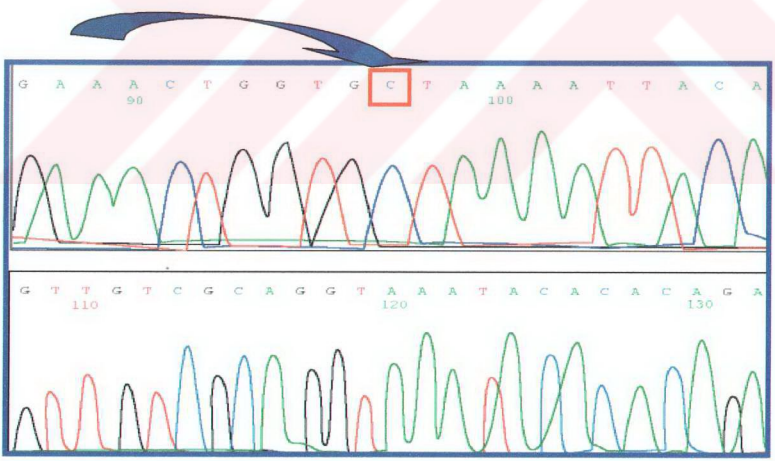

**Şekil 4.8.** Hasta HB6'de bulunan 17719. pozisyonundaki A >T Missens mutasyonu



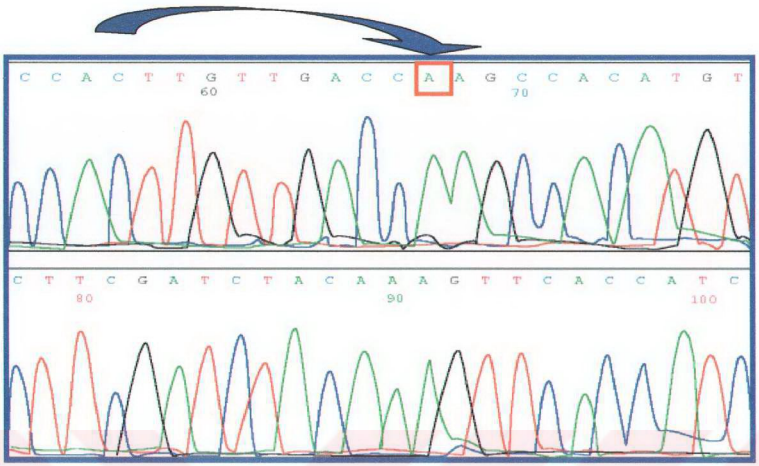

**Şekil 4.9.** Hasta HB8'de bulunan 30118. pozisyonundaki C >T Nonsens mutasyonu



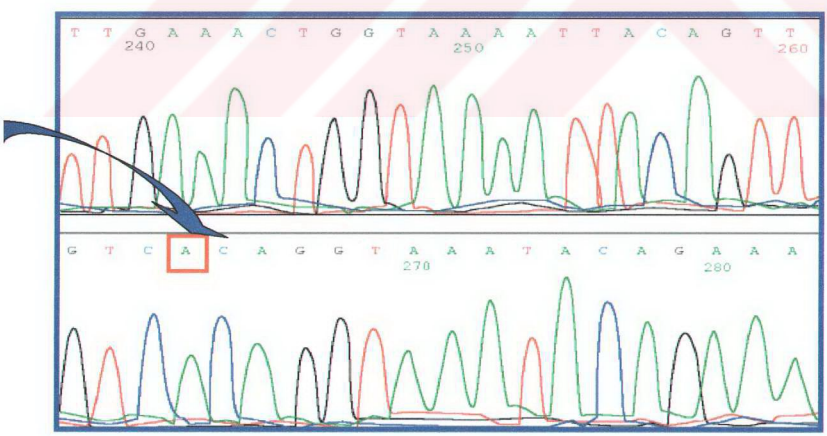

**Şekil 4.10.** Hasta HB9'de bulunan 6392. pozisyonundaki T >C Missens mutasyonu




**Şekil 4.11.** Hasta HB10'da bulunan 30133. pozisyonundaki T >C Missens mutasyonu




**Şekil 4.12.** Hasta HB11'de bulunan 31119. pozisyonundaki G>A Missens mutasyonu




**Şekil 4.13.** Hasta HB13'de bulunan 30150. pozisyonundaki G>A Missens mutasyonu

# 5. TARTIŞMA

13 hemofili B hastasından alınan periferik kan örnekleri ile gerçekleştirilen bu çalışmada, hemofili B hastalığından sorumlu olan faktör IX geninin sekiz ekzonu, promoteri ve poly A ucu, otomatik kapiller jel elektroforezi yöntemi ile DNA baz dizilemesi yapılarak belirlenmiştir. Faktör IX geninin bütün fonksiyonel bölümlerinin dizilenmesi sonucunda, FIX:C>% 50 olan HB12 protokol numaralı hafif seyreden hemofili B ile kliniğe başvuran hasta dışındaki bütün hastalarda faktör IX genine ilişkin değişik türde mutasyonlar bulunmuş ve meydana getirdikleri amino asit değişiklikleri tespit edilmiştir.

Dünya çapında tüm hemofili merkezlerinde toplanmış Hemofili B olgu serilerinin analizleriyle faktör IX geninde bir çok büyük delesyon, mikrodelesyon, insersiyon, missens ve nonsens nokta mutasyonları tanımlanmıştır (44, 77). Bu mutasyon belirleme çalışmaları, faktör IX gen ürününün yapısı ve fonksiyonu ile regülasyonu arasındaki ilişkileri gösterdiği gibi tanımlanan mutasyonların karakterizasyonu, doğru taşıyıcı tanısı yapılması ve prenatal tanı testlerinin geliştirilmesi için önem arzetmektedir. Faktör IX mutasyonlarının epidemiyolojik analizleri, insan germ hücre serilerindeki mutasyon hızlarının hesaplanması ve endojen mutasyon mekanizmalarının ortaya çıkarılması gibi geniş uygulama alanları bulmaktadır (77).

## 5.1. Mutasyon Belirleme Yöntemlerinin Değerlendirilmesi ve Karşılaştırılması

Uzun yıllar intragenik ve ekstragenik polimorfizmler kullanılarak yapılan RFLP analizleri, hasta ve taşıyıcı tespitinde etkili ve doğru olmakla birlikte bazı sınırlamalara sahip olmuştur. Bu sınırlamalar şunlardır;

1. Hasta bireyler analiz edilen polimorfizmler için her zaman informatif değildir.
2. Pedigri analizlerinin tam ve detaylı yapılması gerekliliğine rağmen, her zaman mümkün olamamaktadır.
3. Farklı etnik gruplardan olan ailelerin analizleri için çok geniş bir polimorfik marker paneli gereklidir.

4. Ekstragenik polimorfizmlerle yapılan çalışmalarda rekombinasyon ve non-paternite sebebiyle hatalar olabilmektedir (37, 59).

RFLP yöntemlerinde ortaya çıkan bu sınırlamalar araştırmacıları mutasyon tarama testlerini kullanmaya zorlamıştır. Bir çok mutasyon tarama analiz yöntemi bulunmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanları;

1. SSCP
2. DGGE
3. HD
4. CMC'dir.

Farklı araştırmacılar tarafından yapılan birçok çalışmada, faktör IX genindeki mutasyonların belirlenmesi amacıyla değişik tarama yöntemleri kullanılmış ve bu yöntemlerin birbirlerine karşı sahip olduğu avantaj ve dezavantajlar gösterilmiştir (37, 59, 69, 76).

Bu yöntemler içerisinde en sık kullanılan ve tercih edilen SSCP analizi, baz yer değişimlerini tespit etmek için kullanılan bir teknik olup ASO analizine kıyasla daha etkili, DGGE yöntemine göre ise de daha ucuzdur. Ancak SSCP analizlerinde mutasyon belirleme yüzdesinin ve şartların tahmin edilmesi mümkün olamamaktadır. Analiz ettiği DNA fragmentinin büyüklüğünün sınırlı olması, jel sonuçlarının yorumlanma güçlüğü ve ısı-iyon derişimi gibi faktörlerin optimize edilmesindeki güçlükler yöntemin dezavantajlarını oluşturmaktadır. Ayrıca SSCP yöntemi ile belirlenen mutasyonların direkt DNA baz dizilenmesinin yapılması kesin moleküler tanı için yine de zorunludur (17, 23, 59, 66).

SSCP yönteminde bahsedilen kullanım zorlukları dışında diğer mutasyon tarama analiz yöntemlerinin de benzer uygulama zorlukları bulunmaktadır.

Bütün tarama yöntemleri fazla zaman harcanmasının yanısıra, yetersiz duyarlılığa sahiptir. Ayrıca bazıları zararlı kimyasal ajanlar ve/veya radyoaktivite kullanımını

gerektirmekte olup laboratuar şartlarında spesifik düzenlemeler yapılmalıdır. Bu yöntemlerin hepsi sonunda, mutasyon tespiti için referans metod olarak verilen DNA baz dizi analizini, belirlenen mutasyonun kesin lokalizasyonunun ve meydana getirdiği moleküler değişimin doğru bir şekilde tanımlanması için zorunlu kılmaktadır. Ancak manual dizi analizinin pahalı olması, zaman kaybı yaratması ve yoğun laboratuar işlemleri gerektirmesi nedeniyle faktör IX geninde mutasyon tespiti amacıyla yapılan tarama çalışmalarında kullanılmamıştır.

Heterojenite gösteren tüm gen yapılarının moleküler analizlerinde yaşanan bu zorluklar, aynı nedenlerden ötürü faktör IX geninde de bulunmakta ve daha etkili mutasyon tespiti veya tarama stratejilerini gerekli kılmaktadır.

### 5.1.1. Otomatik Kapiller Jel Elektroforezi Yöntemi ile Dizi Analizi ve Avantajları

Heterojenite gösteren gen yapılarındaki analiz zorlukları, gelişen teknoloji ile birlikte DNA baz dizilemesinde yeni ve farklı bir yöntemin doğmasına sebep olmuştur. Bu çalışmada da faktör IX geninde uygulanan bu yöntem, dizilenmek istenen gen bölgesinin PCR sonrası floresan işaretleme yoluyla kapiller bir jelden geçilerek otomatik olarak okunması esasına dayanır. Yöntem üç ana basamaktan oluşur. Bunlar;

1. PCR
2. CS reaksiyonu
3. Otomatik kapiller jel elektroforezidir.

Bu basamakların kolay ve basit bir prosedür içermesi ve bu sayede sağladığı hızlı mutasyon tespiti imkanı, yöntemin uygulamadaki en büyük avantajıdır. Az miktarda kandan elde edilen (300 µl-10 ml) DNA ile başlayan prosedürün tümü, PCR amplifikasyonunu (3 gün) ve direkt dizileme yapılmasını içerir. Mutasyon belirlenmesini takiben taşıyıcı tespiti ve prenatal tanı yapılması, sadece mutasyonu taşıdığı bilinen ekzonun amplifikasyonunu ve dizilemesini (1 gün) gerektirir.

**Costa ve ark. (2000)** tarafından kapiller yöntem ile DNA dizi analizi, Hemofili B taşıyıcı kadınların tanısında da başarıyla uygulanmış, familyal olgulardaki linkage analizlerinin belirsizlikleri ve sporadik olgulardaki etkisizliğinin üstesinden gelinmiştir. Ayrıca, PCR amplifikasyonu sonrası meydana gelen delesyonların kolayca tanımlanması ve floresan işaretleme prosedürünün yüksek sensivitesi de, yöntemin diğer avantajları olarak belirtilmiştir (17).

### 5.1.2. Otomatik Kapiller Jel Elektroforezi Yöntemi Dezavantajları

Otomatik kapiller jel elektroforezi işlemi yukarıda belirtilen önemli avantajlarına rağmen, yöntemin uygulamasından ya da stratejisinden kaynaklanan belli dezavantajları da içinde barındırmaktadır. Yapılan çalışma sonrasında görülen bu dezavantajlar şunlardır;

1. Hızlı, güvenilir ve laboratuar işlemleri manual dizilemeye kıyasla çok daha az zaman harcatan kapiller yöntem, tüm bunlara rağmen optimizasyon sırasında hassas bir prosedür içermesinden dolayı problemler yaşatabilmektedir.

2. Otomatik kapiller yöntem, bilgisayar eşliğinde özel bir program (software) yardımıyla yapılmakta olup uygulayıcıların gerek moleküler genetik laboratuarı manipülasyonlarına gerekse bilgisayar ve program kullanımında tecrübeli olmalarına gereksinim duymaktadır.

3. Yöntemin, faktör VIII geni gibi daha büyük gen yapılarında denenmesi durumunda, harcanan laboratuar zamanının artmasından dolayı etkinliğinin azalacağı kaçınılmaz bir gerçektir. Bu gibi durumlarda kapiller yöntem, SSCP gibi mutasyon tarama analizleriyle desteklenerek, ortak bir strateji izlenmesini gerektirmektedir.

Ülkemizde sayısının yaklaşık 1000 dolaylarında olduğu tahmin edilen hemofili B hastalarında, faktör IX geninin moleküler analizlerinin detaylı bir şekilde yapılabilmesi ve mutasyon dağılımının eksiksiz olarak belirlenebilmesi, Türk toplumundaki mutasyon profilinin tam olarak çıkartılması açısından büyük önem taşımaktadır.

### 5.2. Hemofili B Hastalarında Tanımlanmış Mutasyonların Değerlendirilmesi

Hemofili B hastalığına neden olan faktör IX geni mutasyonlarının, 13 hemofili B hastasında belirlenmesi sonucunda, HB12 protokol numaralı hafif hemofili B hastası dışındaki bütün olgularda faktör IX geni mutasyonları tespit edilmiş ve meydana getirdikleri amino asit değişiklikleri bulunmuştur.

Faktör IX geninde hemofili B hastalığına sebep olan mutasyonların belirlenmesi, kesin lokalizasyonları ve identifikasyonlarının yapılabilmesi, faktör IX protein fonksiyonlarının anlaşılmasını kolaylaştıracaktır.

Akraba olan hasta HB4 ve HB7'de pozisyon –124 ile + 282 arasında, promoter ve 1. ekzonu içeren bir bölgede delesyon tanımlanmıştır. Bulunan delesyonların sınırları tam olarak bilinmemekle birlikte, bu bölgeye transkripsiyon faktörleri [NF1-L ve CCAAT/enhancer-bağlanma proteinleri (C/EBP)] bağlanamayacağından, faktör IX geni transkripsiyonunun bozularak, hemofili B fenotipinin oluştuğu düşünülmüştür. Ayrıca HB4 ile HB7'nin akraba olmaları, aynı gen bölgesinde delesyon taşımaları açısından anlamlı bulunmuştur.

Hasta HB5'te 7.ekzon bölgesinde bir delesyon tanımlanmıştır. Ekzon 7 ve 8, faktör IX genindeki katalitik alanları birlikte kodlayan gen bölgelerindendir. Dolayısıyla ekzon 7'de oluşan delesyonun faktör IX protein yapısında değişiklikler meydana getirip hemofili B hastalığına sebep olduğu düşünülmektedir. Faktör IX genindeki büyük delesyonların hemofili B'ye neden oldukları, **Ludwing ve ark. (1989)** tarafından da bildirilmiş olup HB4, HB7 ve HB5' e ait değerlendirmemizi destekler niteliktedir. Bu araştırmacılar, faktör IX mutasyonlarının %6'sının delesyonlardan oluştuğunu ve büyük delesyonların tam ve parsiyel gen delesyonlarından meydana geldiğini belirtmektedir (49).

Hasta HB8'de 8. ekzonun 31118'inci pozisyonunda C>T transizyonu, hasta HB11'de 8. ekzonun 31119'uncu pozisyonunda G>A transizyonu, hasta HB3'te ise 6. ekzonun 20551. pozisyonunda C>T transizyonu tespit edilmiştir. Bu değişimlerin C ve G

nükleotidlerinde olmasının yanında CpG adacıklarında meydana gelmesi, **Poon ve ark. (1993)**'nın faktör IX genindeki mutasyonların %36'sının CpG dinükleotidlerindeki mutasyonlar olduğunu bildirmesiyle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca aynı araştırmacılar, faktör IX geni CpG adacıklarını hot spot alanlar olarak göstermiş olup, bu bölgelerde transizyonların 24 kat, transversiyonların da 8 kat yüksek oranda gözüktüğünü ifade etmişlerdir. Bu konuda **Bottema ve ark. (1991)** tarafından yapılan bir çalışmada ise erkek gonadlarında CpG transizyon ve transversiyonlarının fazla olması metillenmiş sitozinlerin instabilitesine bağlanmıştır. **Tartary ve ark. (1993)** tarafından yapılan başka bir çalışmada, CpG dinükleotidlerindeki transizyonların 5-metil sitozinin spontan deaminasyonu sebebiyle timine dönüşmüş olduğu, böylece deaminasyonun yerine bağlı olarak, CpG dinükleotidinin ya TpG yada CpA dinükleotidine dönüştüğü bildirilmiştir. HB8, HB3 ve HB11 hastalarında bulduğumuz mutasyonların CpG adacıklarındaki lokalizasyonları ve sırasıyla C>T, C>T, G>A transizyonlarıyla ağır hemofili B fenotipine neden olmaları, diğer araştırmacıların bulgularıyla da kıyaslanarak anlamlı bulunmuştur.

Hasta HB2'de 8. ekzon bölgesinin 30842'nci pozisyonunda G insersiyonu bulunmuştur. Bu insersiyon sonucunda Thr 241 rezidüsü Asp'a dönüşmüş ve kodon çerçevelerinin kaymasıyla(frameshift) tüm amino asit zincirini değiştirdiği görülmüştür. **Chen ve ark. (1988)**'larına göre faktör IX geninde insersiyonlar sebebiyle olan defektlerin çok nadir olmakla birlikte, kaynağı tam olarak bilinmeyen bir materyalin eklenmesi sebebiyle olabileceği söylenmiştir. Bu tespit hemofili B veri tabanıyla da uyumlu olup, HB2 hastasında saptanan 30842 G insersiyonunun taranması sonucunda bulunan defektin nadir gözüken bir mutasyon türü olduğu anlaşılmış ve **hemofili B hastalığına neden olan bu pozisyondaki ilk tanımlanmış insersiyon olduğu görülmüştür.**

**HB10** hastasında yapılan moleküler analiz sonucunda bulunan 30133 T>C transizyonu yine hemofili B veri tabanında taranmış olup **bu pozisyonda ilk kez tespit edilen bir missens mutasyonu olduğu ortaya konmuştur.** Meydana gelen değişim sonucunda Val 227 rezidüsü Ala'ya dönüşmüştür.

Çalışmamızda, HB12 hastasında herhangi bir moleküler defekt tanımlanamamıştır. **Costa ve ark. (2000)**'ına göre kapiller DNA dizi analizi yöntemi güvenirliği %100'e yakın

bulunmakla birlikte HB12 hastasının hafif hemofili B fenotipine sahip olması ve faktör IX koagülan aktivitesinin ( FIX:C) %50'den yüksek bulunması ilgi çekici olup yanlış klinik tanı olasılığı gözden kaçırılmamalıdır. Tüm bunların yanında **Yoshitake ve ark. (1985) ile Anson ve ark. (1992)**, faktör IX geninde –800 ve –750 pozisyonları arasında muhtemel promoter benzeri bölgeler tanımlamışlardır. Araştırmacıların faktör IX geni regülasyon mekanizmasını henüz tartışılır bulmaları, HB12 hastasında bu muhtemel promoter bölgelerinin dizilenmemesinden dolayı, dikkat edilmesi gereken bir noktadır.

Yapılan çalışmada, faktör IX geninde missens mutasyonu en çok görülen moleküler defekt olup %46 ( 13 hastanın 5'inde ) sıklıkla görülmektedir. Bu durum, **Ketterling ve ark. (1993) ile Sommer ve ark. (1992)**'nın hemofili B hastalığında orta ve şiddetli formların %59'unu, hafif formların ise %97'sini missens mutasyonlarının oluşturduğunu bildiren çalışmasıyla uyumlu bulunmuştur. **Ketterling ve ark. (1993)**, missens mutasyonların evrimsel olarak korunmuş amino asitlerde oluştuğunu belirtmiş, faktör IX'a spesifik amino asitlere nazaran, kalıtsal olarak korunan amino asit rezidülerinin, missens mutasyonlara 6 kat daha yatkın olduğunu bildirmiştir.

13 hemofili B hastasında, faktör IX geni mutasyonlarının DNA dizi analizi ile belirlenmesi sonucunda HB1, HB2, HB8 ve HB11 hastalarında 8. ekzon bölgesinde dört farklı mutasyon tanımlanmıştır. Çalışmada, en sık (%33) moleküler defektin gözüktüğü bölge olan faktör IX geninin 8. ekzonu ile ilgili bu durumun, Türkiye'de hemofili B hastalarındaki olası hot-spot alanların kesin bir biçimde belirlenebilmesi için çalışılan olgu sayısının arttırılma gerekliliğinin olmasına rağmen, ilgi çekici olduğu düşünülmüştür.

# 6. SONUÇ

Pıhtılaşma mekanizması ile ilgili hastalıklardan biri olan Hemofili B, X kromozomal resesif geçiş gösteren kalıtsal bir hastalık olup, insan koagülasyon faktörlerinden biri olan, 8 ekzon ve 7 introndan oluşan faktör IX genindeki delesyon, insersiyon, missens ve nonsens nokta mutasyonlarından kaynaklanır.

Yapılan bu çalışma, Hemofili B hastalığının ülkemize özgü mutasyon profilinin ortaya konulması ve hastalığın prenatal ve postnatal tanılarında referans merkez olarak hizmet sunulması amacıyla başlatılmış uzun soluklu bir çalışmadır. Bu çalışmanın ilk bölümünde hemofili B tanısı almış 13 hasta örneğinde, faktör IX geninin promoter bölgesi, poly A ucu ve 8 ekzonunun DNA baz dizi analizi gerçekleştirilmiş, kullanılan yöntemin Hemofili B tanısındaki güvenilirliği ve duyarlılığı ile olgularda saptanan faktör IX geni mutasyonları literatür verileri ile karşılaştırılmıştır. Çalışma sonucunda ulaşılan bulgular ve yorumları aşağıda maddeler halinde ifade edilmiştir;

1. Çalışmamızda kullanılan otomatik kapiller jel elektroforezi ile DNA baz dizi analizi yöntemi, faktör IX geninin analizinde güvenilirliği ve duyarlılığı literatür ile de desteklenmiş bir tekniktir. Yöntemin manual dizilemeye göre kolay ve basit bir prosedür içermesi ve bu sayede sağladığı hızlı mutasyon tespiti imkanı, DNA baz dizilenmesinin faktör IX gibi yüksek değerde polimorfik gen yapılarında mutasyon tarama amaçlı kullanımını mümkün kılmış olup mutasyonun belirlenmesini takiben taşıyıcı tespiti ve prenatal tanı yapılma sürelerini kısaltacağı (4 gün) görülmüştür. Ayrıca tüm tarama yöntemlerinin son noktası olan bu yöntemde, dizilenecek gen bölgesinin PCR ile amplifikasyonu sonrasında, varolan delesyonun saptanma kolaylığı bu çalışmada da ortaya konmuştur.

2. Toplam 12 olguda faktör IX geni mutasyonu saptanmıştır. Mutasyon saptanmayan HB12 protokol numaralı hafif hemofili hastasında (Faktör IX koagülasyon aktivitesi > % 50) yanlış klinik tanı olasılığı ile birlikte Faktör IX geni –800 ve –750 pozisyonları arasında tanımlanan ve bu çalışmada

dizilemesi yapılmayan olası promoter bölgelerine spesifik bir mutasyon ihtimali de düşünülmesi gereken bir nokta olarak değerlendirilmiştir.

3. Çalışmamızda faktör IX geni missens mutasyon sıklığı %46 olup en çok görülen mutasyon tipidir.

4. Çalışmamızda mutasyonların en çok lokalize (%33) olduğu bölge ekzon 8 olarak belirlenmiştir.

5. İki olguda (HB4 ve HB7) –124 ile +282'nci pozisyonlar arasında, promoter ve 1. ekzonu içeren delesyon saptanmıştır. Normal koşullarda bu bölgeye bağlanması gereken transkripsiyon faktörlerinin ( NF1-L ve CCAAT/enhancer bağlanma proteinleri) bağlanamamasına bağlı olarak faktör IX geni transkripsiyonunun bozulabileceği ve hemofili B fenotipine neden olabileceği düşünülmüştür.

6. Bir olguda (HB5) 7. ekzonda delesyon saptanmıştır. Ekzon 7, faktör IX geni katalitik alanları kodlayan gen bölgelerindendir. Bu olguda saptanan ekzon 7 mutasyonunun, faktör IX protein yapısında değişime yol açabileceği düşünülmüştür.

7. HB8 ve HB11 olgularında, ekzon 8'de transizyon tipi mutasyonlar saptanmış olup bunlar sırasıyla 31118. pozisyonda C>T, 31119. pozisyonda G>A dır. CpG dinükleotid mutasyonları, faktör IX geni mutasyonlarının %36'sını oluşturmaktadır ve CpG'den zengin bölgelerdeki mutasyonların yoğunlaşması, bu bölgelerin hot-spot alanlar olarak değerlendirilebileceğini düşündürmüştür.

8. Ekzon 6'nın 20551. pozisyonunda gerçekleşen C>T transizyonu, bir olguda (HB3) gözlenmiş olup CpG dinükleotid mutasyonu olarak önemi değerlendirilmiştir.

9. Faktör IX geni CpG dinükleotid bölgelerinde transizyon tipi mutasyonları saptanan üç olgunun ağır hemofili B hastası olması dikkat çekicidir.

10. HB2'de 8. ekzonun 30842. pozisyonunda insersiyon tipi mutasyon saptanmıştır. Thr 241 rezidüsü G bazı insersiyonu ile Asp amino asitine dönüşmüş, çerçeve kayması mutasyonu nedeniyle amino asit dizi değişikliği meydana gelmiştir. İnsersiyon tipi bozukluklar, faktör IX geninde nadir olarak ortaya çıkan mutasyon tipidir. Olgumuzda bu pozisyonda saptanan mutasyon, hemofili B veri tabanına göre **tanımlanmış ilk mutasyondur.**

11. HB10 hastasında 30133. pozisyonda tespit edilen T>C transizyonu, yapılan internet taramaları ve hemofili B veri tabanına göre **bu pozisyonda ortaya konan ilk mutasyondur.** Val 227 rezidüsü meydana gelen değişim sonucunda Ala'ya dönüşmüştür.

Otomatik kapiller jel elektroforezi sistemi aracılığıyla belirlenen çalışma bulgularının, hastalığın kesin moleküler tanısında literatür verileri ile birlikte değerlendirilmesi sonucu, heterojenite gösteren hemofili B hastalığında yapılan DNA baz dizi analizinin, faktör IX geni mutasyonlarının kesin ve doğru bir şekilde tanımlanarak hasta bireylerin belirlenmesinde büyük avantajlar sağladığı saptanmıştır.

Yapılan bu çalışma ile elde edilen veriler sonucunda, ülkemizdeki hemofili B mutasyon profilinin tam olarak çıkartılmasının, hasta bireylerin, akrabalarının ve riskli gebeliklerin moleküler analizlerinin yapılmasıyla, aile ve ülke ekonomisine büyük yarar sağlanacağı düşüncesindeyiz.

## KAYNAKLAR DİZİNİ


1- Aggeler, P.M., White, S.G., Glendennig, M.B.,: Plazma thromboplastin Component (PTC) Deficiency: A New Disease Resembling Haemophilia, Proc Natl Acad Sci, 79: 692-694, 1952.

2- Andrew, M., Vegh, P., Johnston, M., Bowker, J., Ofosu, F., Mitchell, L.: Maturation of the Hemostatic System During Childhood. Blood, 80: 1998-2005, 1992.

3- Anson, D.S., Choo, K. H., Rees, D.J.G.: The Gene Structure of Human Anti-Haemophilic Factor IX. EMBO J, 3:1053, 1984.

4- Attali, O., Vinciguerra, C., Trzeciak, M.C., Durin, A., Pernod, G., Gay, V., Menart, C., Sobas, F., Dechavanne, M., Negtler, C.: Factor IX gene Analysis in 70 Unrelated Patient with Haemophilia B: Description of 13 New Mutation. Thromb Haemost, 82: 1437-42, 1999.

5- Bajaj. S.P., Birktoft J.J.: Human Factor IX and Factor IXa. Methods in Enzymology, 222: 96-128, 1993.

6- Başaran, N.: Tıbbi Genetik. Bilim Teknik Kitabevi, Eskişehir, 1994.

7- Biggs R., Spooner R.J.D.: National survey of haemophilia and Christmas disease patients in the United Kingdom. Lancet, 1: 1143, 1978.

8- Bottema, C.D.K., Ketterling, S. Yoon, L.H., Philips, A., Sommer, S.S.: Missense Mutations and Evolutionary Conservation of Amino Acids: Evidence that Many of the Amino Acids in Factor IX Function as "Spacer" Elements. Am J Hum Genet, 49: 820-838, 1991.

9- Bowen, D.J., Thomas, P., Webb, C.E., Bignell, P., Peake, I.R., Bloom, A.L.: Facile and Rapid Analyses of the Three DNA Polymorphisms within the human Factor IX Gene Using the Polymerase Chain Reaction. British Journal of haematology, 77: 559-560, 1991.

10- Brady, J.N., Notley, C., Cameron, C., Lillicrap, D.: Androgen effects on factor IX expression: in vitro and in vivo studies in mice. British Journal of haematology, 101: 273-279, 1998.

11- Briet, E., Wijnads, M.C., Veltkamp, M.D.: the Prophylactic Treatment of Haemophilia B Leyden with Anabolic Steroids. Ann Intern Med, 103: 225, 1985.

12- Camerino, G., Grzeschik, K.H. Jaye, M. Delasalle, H., Tolstoshev, P., Lecocq, J.P., Heilig, R., Mandel, J.L.: Regional Localisation on the Human X Chromosome and Polymorphism of the Coagulation Factor IX Gene. Proc Nat Acad Sci, 81: 498-502, 1984.

13- Chen, S.H., Scott, C.R., Edson, J.R., Kurachi, K.: An Insertion within the factor IX gene: haemophilia B. American Journal of Human Genetics, 42: 581-584, 1988.

14- Cheung, W.F., Hamaguchi, N., Smith, K.J., Stafford, D.W.: The Binding of Human Factor IX to Endothelial Cells is Mediated by Residues 3-II. Journal of Biological Chemistry, 267: 20529-20531, 1992.

15- Choo, K.H., Gould, K.G., Rees, T.G., Brownlee, G.G.: Molecular Cloning of the Gene for Human Anti-haemophilic Factor IX. Nature, 299: 178-180, 1982.

16- Colmon, R.W., Hirsh, J., Marder,. V.J., Salzman, E.W.: Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice. I.B. Lippincott Company, 1994.

17- Costa, J.M., Ernault, P., Vidaud, D., Vidaud, M., Meyer, D., Laveigne, J.M.: Fast and Efficient Mutation Detection Method Using Multiplex PCR and Cycle Sequencing. Thromb Haemost, 83: 244-247, 2000.

18- Crossley, M, Ludwig, M., Stowell, K.M.: Recovery from Haemophilia B leyden: an androgen responsive element in the factor IX promoter. Science, 257: 377, 1992.

19- Crossley, M., Brownlee, G.G.: Disruption of a C/EBP Binding Site in The Factor IX Promoter is Associated with Haemophilia B. Nature, 345-444, 1990.

20- Çağlayan, H.: Hemofili Genetiği, II.Ulusal Hemofili Kongresi Abstrak Kitapçığı, 1999.

21- Çağlayan, S.H., Gökmen, Y., Kırdar, B.: Polymorphisms Associated with the FVII and FIX Genes in the Turkish Population. Hemophilia, 1: 184-189, 1995.

22- Foster, D.C., Yoshitake, S., Davie, E.W.: The nucleotide sequence of the gene for human protein C. Proc Natl Acad Sci, U.S.A, 82: 4672, 1985.

23- Fraser, B.M., Poon, M.C., Hoar, D.I.: Identification of factor IX mutations in haemophilia B: application of polymerase chain reaction and single strand conformation analysis. Hum Genet, 88, 426-430, 1992.

24- Freedman, S.J., Blostein, M. D., Baleja, J.D., Tacobs, M., Furie, B.C., Furie, B.: Identification of the Phospholipid Binding Site in the Vitamin K- depend Blood

Coagulation Protein Factor IX. Journal of biological chemistry, 271: 16227-16236, 1996.

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

26- Ganong, W.F. : Tıbbı Fizyoloji. Barış kitabevi, Ankara, 1999.

27- Giannelli, F., Green, P.M., High, K.A., Sommer, S., Poon, M.C., Ludwing, M., Schwaab, R., Reitsma, P.H., Goossens, M., Yoshioka, A., Brownlee, G.G.: Haemophilia B: database of point mutations and short additions and deletions fourth edition. Nucleic acids: Research, 13: 3075-3087, 1993.

28- Giannelli, F., Saad, S. Montandon, A.J., Bentley, D.R. Green, P.M.: A new strategy for the genetic counselling of diseases of marked mutational heterogeneity: Haemophilia B as a model. Med Genet, 29: 602-607, 1992.

29- Green, P.M., Bentley, D.R., Miboihon, R.S., Nilsson, I.M., Giannelli, F.: Molecular pathology of haemophilia B. The EMBO Journal, 4: 1067-1072, 1989.

30- Green, P.M., Montandon, A.J. Bentley, D.R., Gianelli, F.: Genetics and Molecular Biology of Hemophilias A and B. Blood Coagulation and Fibrinolysis, 2: 539-565, 1991.

31- Green, P.M., Montandon, A.J., Ljung, Rl, Bentley, D.R., Nilsson, I.M., Kling, S., Giannelli, F.: Haemophilia B Mutation in a Complete Swedish population sample: a test of new strategy for the genetic counselling of diseases with high mutational heterogeneity. British Journal of Haemotology, 78: 390-397, 1991.

32- Green, P.M., Saad, S., Lewis, C.M., Giannelli, F.: Mutation Rates in Humans. I. Overall and Sex-Specific Rates Obtained from a Population Study of Haemophilia B. Am J Hum Genet, 65: 1572-1579, 1999.

33- Gustavli, B., Cordesius, E., Löfberg, L., Strömberg, P.: Fetoscopy. Acta Obstet Gynecol Scand, 58: 409-410, 1979.

34- Gürsel, T., Kavaklı, K., Aktuğlu, G., Yıldız, I., Kemahlı, S., Devecioğlu, Ö.: Hemofili ve von Willebrand Hastalığında Tanı ve Tedavi, Türk Hematoloji Derneği, Hemofili Alt komitesi, 1997-1999 Dönemi.

35- Harlos, K., Holland, S.K., Boys, C.W.G., Burgess, A.I., Esnouf, M.P., Blake, C.C.F. Nature, 330: 82-84, 1987.

36- Heimens, W.T.: Dose Calculation of Human Factor VIII and Factor IX Concentrates for Infusion Therapy. Handbook of Hemophilia, Newyork, American Elsevier, 1975.

37- Hinks, J.L., Winship, P.R., Makris, M., Preston, F.E., Peake, I.R., Goodeve, A.C.: A rapid method for haemophilia B mutation detection using conformation sensitive gel electrophoresis. British Journal of haematology, 104: 915-918, 1999.

38- Hirosawa, S., Fahner, J.B., Salier, J.P.: Structural and Functional Basis of The Developmental Requlation of Human Coagulation Factor IX Gene: Factor IX Leyden. Proc Natl Acad Sci, USA, 87: 4421, 1990.

39- http://www.umds.ac.uk/molgen

40- Irwin, D.M., Ahern, K.G., Pearson, G.D., Mac Gilliuray, R.T.A.: Characterization of the bovine prothrombin gene. Biochemistry, 24: 6854, 1985.

41- Ketterling, R.P., Vielhaber, E., Bottema, C.D.K., Schoid, D.J., Cohen, M.P., Sexaur, C.L., Sommer, S.S.: Germ-Line origins of mutation in families with haemophilia B: the sex ratio varies with the type of mutation. Am J Hum Genet, 52: 152-166, 1993.

42- Ketterling, R.P., Sommer, S.S.: Micro deletions in the factor IX gene: three recurrences associated with a quasipalindromic sequence. Hum Mol Genet, 3: 191-195, 1994.

43- Kırdar, B.: Kalıtsal hastalıklarda DNA analizi ile prenatal tanı; PCR uygulamaları "Prenatal tanı ve Tedavi", 31-39, 1992.

44- Knöll, A., Ketterling, R.P., Sommer, S.S.: Absence of somatic masaicism in 17 families with haemophilia B: an analysis with a sensitivity 10-to 1000- fold greater than that of sequencing gel. Hum Genet, 98: 539-545, 1996.

45- Kurachi, K., Kurachi, S.: Requlatory mechanism of the factor IX gene. Thromb Haemost, 73: 333, 1995.

46- Kurachi, K., Kurachi, S.: Genetic Mechanisms of Age Regulation of Blood Coagulation Factor IX Model. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20: 902-906, 2000.

47- Kurachi, S., Furukwa, M., Salier, J.P.: Regulatory mechanism of human factor IX gene: protein binding at the leyden-specific region. Biochemistry, 33: 1580, 1994.

48- Limentoni, S.A, Furie, B.C., Frie, B.: The Biochemistry of factor IX. Hemostasis and Thrombosis, J.B. Lippincott Company, Philadelphia, 1994.

49- Ludwing, M., Schwab, R., Eigel, A.: Identification of a single nucleotide C-to-T transition and five different deletions in patient with severe haemophilia B. Am J Hum Genet, 45: 115-119, 1989.

50- Martinez, P.A., Romey, M.C., Schued, J.F., Gris, J.C., Demaille, J., Claustres, M.:Factor IX gene mutations causing haemophilia B: comparison of SSC screening versus systematic DNA sequencing and diagnostic application. Human Genetic, 94: 287-290, 1994.

51- Montejo, J.M. Magallon, M., Tizzana, E., Solera, J.: Identification of Twenty-one New Mutations in the Factor IX Gene by SSCP Analysis. Human Mutation, 13: 160-165, 1999.

52- Murray, R.K., Mayes, P.A., Granner D.K., Rodwell, V.W.: Harper'in Biyokimyası, Barış Kitabevi, İstanbul, 1992.

53- Naka, H., Brownlee, G.G.: Transcriptional regulation of the human factor IX promoter by the orphan receptor superfamily factor, HNF4, ARP1 and coup/Ear3. Br J Haematol, 92: 231, 1996.

54- Neurath, H.: Evolution of Proteolytic Enzymes. Science, 224-350, 1984.

55- Patek, A.T., and F.H.L Taylor; Some Properties of a Substance Obtained from Normal Human Plazma Effective in Accelerating the Coagulation of Haemophilic Blood. Journal of Clinical Investigation, 16: 113-124, 1937.

56- Peake, I.: Molecular genetics and counseling in haemophilia. Thromb Haemost, 74: 40-44, 1995.

57- Picketts, D.J., Mueller, C.R., Lillicrap, D.: Transcriptional control of the Factor IX gene: analysis of five cis-acting elements and the deleterious effect of naturally occurring hemophilia B leyden mutations. Blood, 84: 2992, 1994.

58- Picketts, D.J., Lillicrap, D., Mueller, C.R.: Synergy Between Transcription Factors DBP and C/EBP Compensates for a Hemophilia B. Leyden Factor IX Mutation. Nature Genetics, 3: 175-179, 1993.

59- Poon, M.C., Anand, S., Fraser, B.M. Hoar, D.I., Sinclair, G.D.: Haemophilia B carrier determination based on family specific mutation detection by DNA single strand conformation analysis. J Lab Clin Med, 55-62, 1993.

60- Reijnen, M.J., Sladek, F.M., Bertina, R.M., Reitsma, P.H.: Disruption of a binding site for hepatocyte nuclear factor 4 results in haemophilia B leyden. Proc Natl Acad Sci, USA, 89:6300, 1992.

61- Rizza, C.R. The Management of Patients with Coagulation Factor Deficiencies. Human Blood Coagulation, Haemostasis and Thrombosis, 2nd, Oxford, 1972.

62- Rodeck, C.H., Morsman, J.M.: First trimester chorion biopsi. Br Med Bull, 39: 338-342, 1983.

63- Salier, J.P., Hirosawa, S., Kurachi, K.: Functional Characterization of the 5'Regulatory Region of Human Factor IX Gene. J Biol Chem, 265: 7062, 1990.

64- Sarkar, G., Paynton, C., Sommer, S.S.: Segments Containing Alternating Purine an Pyrimidine Dinucleotides.: Pattern of Polymorphism in humans and Prevalence through Phylogeny. Nucleic Acids Research, 19: 631-636, 1991.

65- Schulman, I., Smith, C.H.: Hemorrhagic disease in an infant due to deficiency of a previously undescribed clotting factor. Blood, 7:794, 1952.

66- Solak, M. Bağcı, H., Şengil, A.Z., Öztaş, S.: Moleküler Genetik ve Rekombinant DNA teknolojisi (Temel bilgiler). Afyon Kocatepe Üniversitesi, Ankara, 124-137, 2000.

67- Sommer, S.S., Bowig., Ketterling, R.P., Bottema, C.D.K.: Missense Mutations and the Magnitude of Functional Deficit: the example of factor IX. Human Genetics, 89: 285-297, 1992.

68- Stenflo, J., Lundwall, A., Dahlback, B.: Proc Natl Acad Sci, USA, 84: 368-372, 1987.

69- Tartary, M., Vidaud, D., Piao, Y., Costa, J.M., Bahnak, E.F., Congard, B., Laurian, Y., Meyer, D.: Detection of a molecular defect in 40 of 44 patients with haemophilia B by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. British Journal of Haematology, 84: 662-669, 1993.

70- Tedgard, U., Ljung, R., McNeil, T.F..: Long-term Psychological Effect of Carrier Testing and Prenatal Diagnosis of Haemophilia: Comparison with a Control Group. Prenatal Diagnosis, 19: 411-417, 1999.

71- Thomson, A.R.: Molecular Biology of the Haemophilias. Prog Hemat Thromb, 10: 175-214, 1991.

72- Thomson, M.W.: Mclnnes, R.D., Willard, H.F.: Genetics in Medicine. W. B. Sounders Company Philadelphia, London, Toronta, Montreal, Sydney, Tokyo. ISBN 0-7216-3113-45$^{th}$ Edition, 1991.

73- Türk Hemotoloji Derneği.: Hemofili 1999, II. Ulusal hemofili kongresi, İzmir, 1999.

74- Trend, R.J.: Molecular Medicine. Second edition, Churchill Livingstone, 1997.

75- Vivian, C. P., Lau A.P., Chan, T.K.: A novel haemophilia B defect due to partial duplication of the factor IX gene. British Journal of haematology, Hong Kong, 86: 601-609, 1994.

76- Wadelius, C., Lindstedt, M., Egberg, N., Pettersson, U., Anvert, M.: Haemophilia B in a 46, XX female probably caused by non-random X inactivation. Clin Genet, 43: 1-4, 1993.

77- Weikuan, G., Marjory, B., James, C, Jharna, R., Kunal, R.:Distinct Mutations Cause Severe Haemophilia B in Two Unrelated Canine Pedigrees. Thromb Haemost, 82: 1270-1275, 1999.

78- Winship, P.R., Nichols, C.E., Chuansumrit, A., Peake, I.R.: An MseII RFLP in the 5' flanking region of the factor IX gene: its use for haemophilia B carrier detection in Caucasian and Thai populations. Br J Haematol, 84: 101-104, 1993.

79- Yoshitake, S., Schach, B.G., Donald, C., Foster, E.W., Kurachi, K.: Nucleotide Sequence of the Gene for Human Factor IX (Antihaemophilic Factor B). Biochemistry, 24: 3736-3750, 1985.

## ÖZGEÇMİŞ

Türkiye Cumhuriyeti vatandaşı olan Oğuz ÇİLİNGİR 1967 yılında Eskişehir'de doğdu. İlk ve orta öğrenimini Eskişehir'de tamamladıktan sonra 1984-1985 eğitim yılında girdiği İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesinden 1991-1992 eğitim yılında tıp doktoru olarak mezun oldu. 1992 yılında Anadolu Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalına araştırma görevlisi olarak atandı ve Anadolu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünde doktora eğitimine başladı. Bir yıl süreyle Anadolu Üniversitesi Yabancı Diller Eğitim Merkezinde İngilizce dil eğitimi aldıktan sonra burslu olarak İngiltere'de East London Üniversitesinde bir yıl moleküler genetik çalışmalarına katıldı. Halen Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Bilim Dalında araştırma görevlisi olarak çalışan Oğuz ÇİLİNGİR evli ve bir çocuk babasıdır.

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ