

**T.C.**  
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİYARBAKIR YÖRESİNDE TİOPURİN S-METİL  
TRANSFERAZ ENZİM EKSİKLİĞİ VE TPMT\*2, \*3B VE  
\*3CMUTASYONLARININ BELİRLENMESİ**

**Koray GELEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR**  
**2011**



**T.C.**  
**DİCLE ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİYARBAKIR YÖRESİNDE TIOPURİN S-METİL  
TRANSFERAZ ENZİM EKSİKLİĞİ VE TPMT\*2, \*3B VE \*3C  
MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ**

**Koray GELEN**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**DİYARBAKIR**

**Şubat 2011**



T.C  
DİCLE UNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
DIYARBAKIR

Koray GELEN tarafından yapılan "DIYARBAKIR YÖRESİNDE TIOPÜRİN S-METİL TRANSFERAZ ENZİM EKSİKLİĞİ VE TPMT\*2, \*3B VE \*3C MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ" konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

Ünvanı                      Adı Soyadı

Başkan: Prof. Dr. M. Orhan AYYILDIZ

Üye : Prof. Dr. Birol OTLUDİL

Üye : Yrd. Doç. Dr. H. Hakan İNCE

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 28/02/2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

( MÜHÜR )



## TEŞEKKÜRLER

Bu araştırmanın konusunu bana Yüksek Lisans Tezi olarak veren, laboratuvar çalışmaları ve tezimin hazırlanması süresince benden hiçbir Şekilde yardımını esirgemeyen değerli tez danıŐmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. H. Hakan İNCE'ye; bilimsel anlamda yardımını gördüğüm Prof. Dr. M. Orhan AYYILDIZ'a; laboratuvar çalıŐmalarım sırasında tecrübelerinden faydalandığım laborant Murat Yurt'a; çalıŐmam boyunca bana her türlü desteği sunan sevgili aileme teŐekkürü bir borç bilirim. Ayrıca bu çalıŐmayı bir proje (DÜBAB 08-EF- 29) olarak destekleyen Dicle Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Birimine de teŐekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

<b>TEŞEKKÜRLER</b> .....	I
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	II
<b>ÖZET</b> .....	III
<b>ABSTRACT</b> .....	IV
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	V
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	VI
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR</b> .....	VII
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Tiopürin S-Metil Transferaz Enzimi Nedir?.....	1
1.2. TPMT Geni.....	3
1.3. Yaygın TPMT mutant alleleri.....	3
1.4. TPMT Fenotipi ile Genotipi Arasındaki İlişki.....	6
1.5. Tiopürin Metabolizması ve TPMT'nin Etkisi.....	7
<b>2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR</b> .....	10
<b>3. MATERYAL VE METOD</b> .....	40
3.1. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi.....	40
3.2. Kan Örneklerinin Saklanması.....	40
3.3. DNA saflaştırılması ve DNA'ların saklanması.....	40
3.4. Real Time PCR ve Mutasyon Kitleri İle TPMT*2, TPMT*3B ve TPMT*3C Mutasyonlarının Tespiti.....	42
3.4.1. Real Time PCR Nedir?.....	42
3.4.2. LightCycler® 480 II Cihazında Mutasyon Analizlerinin Yapılması....	46
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMAR</b> .....	53
4.1. TPMT*2, TPMT*3B ve TPMT*3C Mutasyonlarını Tespiti İçin Yapılan Real Time PCR Analiz Sonuçları.....	53
4.2. Türkiye'de ve Dünya'da Yapılmış TPMT Mutasyonlarının Tespitine İlişkin Bazı Çalışmalar ve Bu çalışmaların karşılaştırılması .....	60
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b> .....	65
<b>6. KAYNAKLAR</b> .....	67
ÖZGEÇMİŞ .....	78

## ÖZET

### DIYARBAKIR YÖRESİNDE TİOPÜRİN S-METİL TRANSFERAZ ENZİM EKSİKLİĞİ VE TPMT\*2, \*3B VE \*3C MUTASYONLARININ BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Koray GELEN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

Tiopurin S-metil transferaz (TPMT) enzimi, 6-mercaptopürin veya azatiopürin gibi tiopürin ilaçlarının metilasyonunu katalizleyen sitoplazmik bir enzimdir. TPMT aktivitesi polimorfiktir ve üç tip enzim aktivitesi gözlenir. Populasyonlar içerisinde; insanların %89'u yüksek aktivite, yaklaşık olarak %11'i orta düzeyli aktivite ve %0,3'ü (300'de 1) düşük veya belirlenemeyen aktiviteye sahiptir. TPMT enzim eksikliği olan hastalar tiopürin ilaçlarının standart dozları ile tedavi edildiğinde, hematolojik toksisite ya da ölüm riski normal aktiviteye sahip olanlardan daha yüksek olacaktır. Değişik populasyonlarda yapılan araştırmalarda TPMT enzim aktivitesi ve genotipi arasında yüksek ilişki olduğu gösterilmiştir. TPMT enzim eksikliğinin nedeni; TPMT genindeki SNP (tek nükleotid polimorfizmi)lerdir. Yaygın olan dört mutant allel vardır. Bunlar TPMT\*2 (G238C), TPMT\*3A (G460A ve A719G), TPMT\*3B (G460A) ve TPMT\*3C (A719G)dir. Bu SNP'ler TPMT aktivitesinin belirlenmesinde majör belirleyicilerdir. Hastalar tiopürinler ile tedavi edilmeden önce TPMT aktivitesinin belirlenmesi yaşamı tehdit eden komplikasyonlardan kaçınmak için faydalı olacaktır.

Bu çalışmanın amacı; Diyarbakır yöresinde TPMT\*2, \*3B ve \*3C mutasyonlarını belirlemek ve TPMT mutasyonları hakkında klinisyenlere bilgi vermektir.

Bu çalışmada tam kan örnekleri hastalardan alınmış ve DNA'lar DNA saflaştırma kitleri kullanılarak izole edilmiştir. TPMT genotipleri Real Time PCR ve TPMT mutasyon kitleri kullanılarak belirlenmiştir. Çalışmada 96 hasta değerlendirilmiştir. Bu hastalardan 2 tanesinde heterozigot TPMT\*3B mutasyonu belirlenirken, 2 tanesinde ise heterozigot TPMT\*3C mutasyonu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** TPMT genotipleri, Real Time PCR, TPMT mutasyon kitleri.

## ABSTRACT

### THE DEFICIENCY OF THIOPURINE S-METHYL TRANSFERASE ENZYME AND DETERMINATION OF TPMT\*2, \*3B AND \*3C MUTATIONS IN DIYARBAKIR REGION

M Sc. THESIS

Koray GELEN

DEPARTMENT OF BIOLOGY  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF DICLE

2011

Thiopurine S-Methyltransferase is a cytoplasmic enzyme that catalyzes methylation of thiopurine drugs such as 6-mercaptopurine or azathioprine. The activity of TPMT is polymorphic and it has three types of enzyme activity. In populations; about 89% of people have high enzyme activity, approximately 11% intermediate activity and 0,3% (1: 300) low or undetectable enzyme activity. When patients who have TPMT deficiency is treated with standart dose of thiopurine drugs, hematologic toxicity or the risk of mortality will be higher then normal enzyme activity. In researchs which was made in different populations have shown that there is a high relation between TPMT enzyme activity and genotype. The reason of TPMT deficiency is SNP(s) in TPMT gene. There are four common mutant alleles. These are TPMT\*2 (G238C), TPMT\*3A (G460A and A719G), TPMT\*3B (G460A) and TPMT\*3C (A719G). These SNP's(Single Nucleotide Polymorphsim) are major frequent mutations of TPMT. Before patients is treated with thiopurine drugs, determination of TPMT activity will be useful to avoid life-threatening complications.

The aim of this study is to determine TPMT\*2, \*3B and \*3C mutations in Diyarbakir region and to give information to clinicians about TPMT mutations.

In this study, whool blood samples were obtained from patients randomly and DNA's were isolated by using DNA purification kits. TPMT genotypes were determined by using Real Time PCR and TPMT mutation kits. 96 patients were evaluated. 2 of 96 patients were heterozygot TPMT\*3B mutant allele and 2 of 96 patients were heterozygote TPMT\*3C mutant allele.

**Key Words:** TPMT genotypes, Real Time PCR, TPMT mutation kit.

## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 1.1.</b>	Değişik popülasyonlarda TPMT allel sıklığı	5
<b>Çizelge 3.1.</b>	ROCHE MagNA Pure Nucleic Acid Isolation Kit I içeriği	41
<b>Çizelge 3.2.</b>	PCR mix için gerekli maddeler ve miktarları	47
<b>Çizelge 3.3.</b>	LightCycler® 480 Instrument Çalışma Prosedürü	48
<b>Çizelge 3.4.</b>	LightSNiP TPMT*2 kiti için mutasyon varlığındaki Melting Curve eğrisi, Melting Piki ve Tm değerleri	48
<b>Çizelge 3.5.</b>	LightSNiP TPMT*3B kiti için mutasyon varlığındaki Melting Curve eğrisi, Melting Piki ve Tm değerleri	49
<b>Çizelge 3.6.</b>	LightSNiP TPMT*3C kiti için mutasyon varlığındaki Melting Curve eğrisi, Melting Piki ve Tm değerleri	50
<b>Çizelge 4.1.</b>	TPMT*2 mutasyon taramasında elde edilen Tm değerleri	54
<b>Çizelge 4.2.</b>	TPMT*3B mutasyon taramasında elde edilen Tm değerleri	56
<b>Çizelge 4.3.</b>	TPMT*3C mutasyon taramasında elde edilen Tm değerleri	58
<b>Çizelge 4.4.</b>	Araştırma sonucu tespit edilen mutasyonların allel frekansları	60
<b>Çizelge 4.5.a.</b>	Yaygın TPMT allelerinin Türk Toplumundaki dağılımı	61
<b>Çizelge 4.5.b.</b>	Bir grup ALL hastası Türk Popülasyonunda TPMT allel Frekansları	61
<b>Çizelge 4.6.</b>	LightCycler'la taranan ALL hastaları arasında TPMT Genotipleri	63
<b>Çizelge 4.7.</b>	DNA-mikroçip yöntemi ile belirlenen TPMT mutantları	63

## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Tiopürin ilaçlarının kimyasal yapısı	1
Şekil 1.2.	TPMT ile SAM'ın kristal yapısı	1
Şekil 1.3.	TPMT genindeki allelik varyantlar	3
Şekil 1.4.	Yaygın TPMT mutant allelleri	4
Şekil 1.5.	TPMT-TGN toksisite ilişkisi	6
Şekil 1.6.	6-MP'nin inaktif moleküllere dönüşümü	7
Şekil 1.7.	Azatiopürin metabolizması	8
Şekil 3.1.	Simpe Prob Format	44
Şekil 3.2.	Simple Prob Format	45
Şekil 3.3.	Simple Prob Format (Melting Curves ve Melting Peaks)	45
Şekil 3.4.	LightCycler® 480 II Real Time PCR cihazı	51
Şekil 3.5.	Real Time PCR'daki Erime Eğrisi ve Melting Curves örneği	51
Şekil 4.1.	TPMT*2 mutasyon taramasında elde edilen Melting Curve eğrileri	55
Şekil 4.2.	TPMT*2 mutasyon taramasında elde edilen Melting Pikler	55
Şekil 4.3.	TPMT*3B mutasyon taramasında elde edilen Metlin Curve eğrileri	57
Şekil 4.4.	TPMT*3B mutasyon taramasında elde edilen Melting Pikler	57
Şekil 4.5.	TPMT*3C mutasyon taramasında elde edilen Metlin Curve eğrileri	59
Şekil 4.6.	TPMT*3C mutasyon taramasında elde edilen Melting Pikler	59

## SİMGELER VE KISALTMALAR

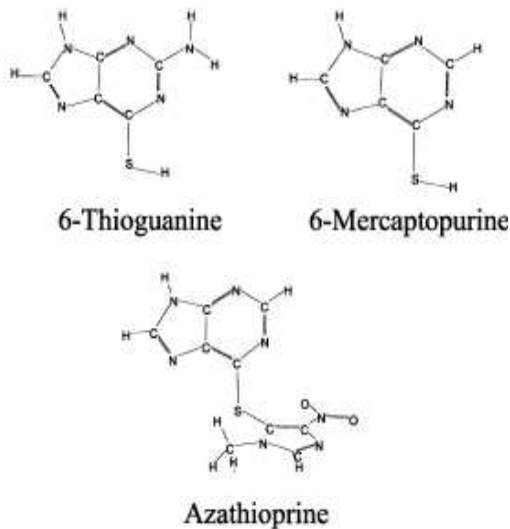
- TPMT** : Tiopürin S-Metil Transferaz
- SAM** : S-Adenozil –L- Metionin
- AZA** : Azatiopürin
- 6-MP** : 6-merkaptopürin
- TGN** : Tioguanin Nükleotid
- HGPRT** : Hipoksantin Fosforibozil Transferaz
- XO** : Ksantin oksidaz
- SNP** : Single Nucleotid Polymorphism
- VNTR** : Variable Number Tandem Repeat
- 6-MMP** : 6-metil merkaptopürin
- RBC** : Red Blood Cell
- PCR** : Polimerase Chain Reaction
- ARMS** : Amplification Refactory Mutation System
- UTR** : Untranslated Region
- HPLC** : High Performance Liquid Chromatography
- DHPLC** : Denaturing High Performance Liquid Chromatography
- FRET** : Fluorescence Resonanca Energy Transfer
- ORF** : Open Reading Frame
- EDTA** : Etilen diamin tetra asetikasit
- Tm** : Melting Temperature
- MGP** : Magnetic Glass Particle



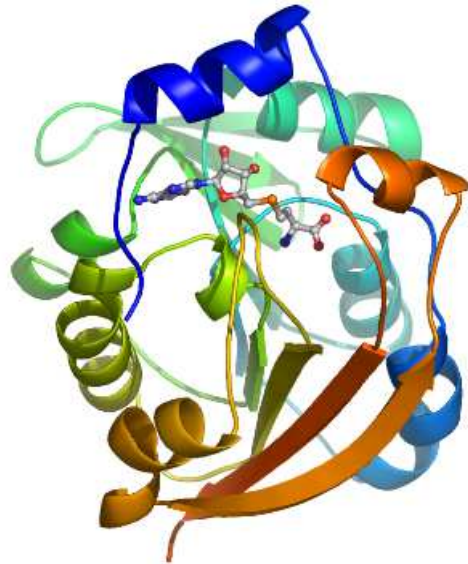
## 1.GİRİŞ

### 1.1 Tiopürin S-Metil Transferaz Enzimi Nedir?

Tiopürin S-Metiltransferaz [TPMT; (EC 2.1.1.67)] azatiopürin, 6-merkaptopürin ve 6-tioguanin gibi aromatik ve heterosiklik sülfidril bileşiklerinin metilasyonunu katalizleyen sitoplazmik bir enzimdir (Meleod ve ark. 1995, Moureyre ve ark. 1998) TPMT azatiopürin, 6-merkaptopürin ve 6-tioguanin gibi tiopürin ilaçlarını (Şekil 1.1) S-Adenozil L-metionini (SAM) (Şekil 1.2) metil donörü olarak kullanıp metiller ve inaktif metabolitler haline dönüştürür. Enzimin etki ettiği bu tiopürin ilaçları enzim için substrat olmakla birlikte, TPMT'nin doğal substratı ve fizyolojik fonksiyonu belirlenememiştir (Weinshilboum ve Sladek 1980, Krynetski ve Evans 2003). Bu tiopürin grubu ilaçlar; romatolojide, inflamatuvar hastalıklarda, dermatolojide ve bazı kanser türlerinin (ör: ALL) tedavisinde kullanılırken, organ nakillerinde ise vücudun organ tarafından reddini önlemek amacıyla immün sistem baskılayıcısı olarak kullanılmaktadır (Reuther ve ark. 2004, Sies ve ark. 2005).



Şekil 1.1. Tiopürin ilaçlarının Kimyasal yapısı (Genç 2009)



Şekil 1.2. TPMT ile SAM ın kristal yapısı (Genç 2009)

## 1. GİRİŞ

---

Tiopürin grubu ilaçlar ilk anda inaktiftirler. Bu ilaçların hastalıkların tedavisinde etkili olabilmeleri için aktif bir form olan tioguanin nükleotidlerine(TGN) dönüşmesi gerekir. Bu dönüşüm enzimatik bir yolla olur ve bu işi yapan enzim hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz (HGPRT)dir (Zhou 2006, Zhang ve ark. 2006, Katsanos ve Tsianos 2007).

Tiopürinler pürin analogu olarak tasarlanmıştır. Görevleri ise; tedavisinde kullanılan hastalığı oluşturan hücreleri yok etmektir. Bunu DNA sentezi sırasında normal pürin bazları ile rekabete girip normal pürinlerin yerini alarak DNA sentezini bozma yoluyla gerçekleştirirler (Thomsen ve ark. 1999, Naughton ve ark. 1999).

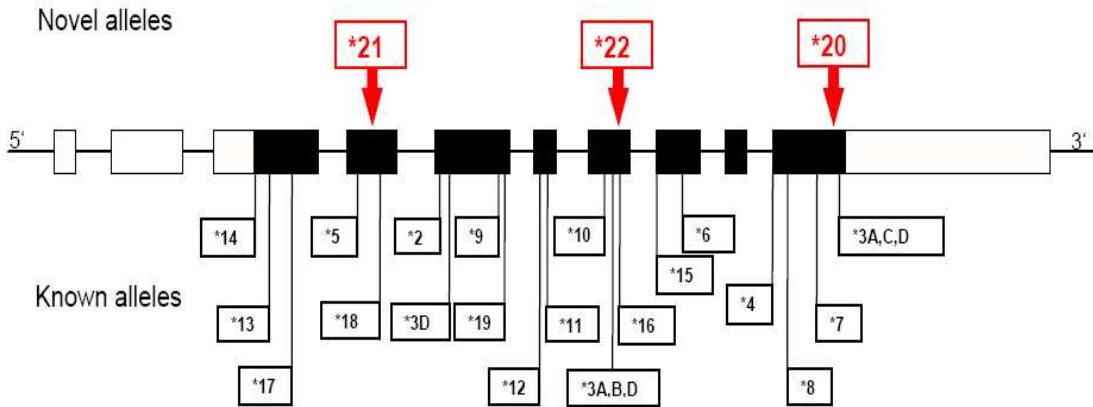
Tiopürinlerin inaktif metabolitlere dönüşmesini TPMT enzimi sağlamaktadır (Coulthard ve ark. 2002, Evans 2004, Young ve ark. 2006) TPMT eksikliği olan hastalarda aktif TNG'lerin birikmesinin sonucu olarak; hematolojik toksisite, miyelosüpresyon görülmekte ve hatta ölümcül sonuçlar ortaya çıkmaktadır (Schaeffler ve ark. 2006, Tümer ve ark. 2007).

TPMT aktivitesi tüm dokularda görülmekle birlikte, en çabuk aktivite tayini eritrositlerden yapılmaktadır. Eritrosit TPMT aktivitesi Kafkas ve Afro-Amerikan ırklarında trimodal bir dağılım göstermektedir. Yani üç tip enzim aktivite düzeyi bulunmaktadır. Trimodal dağılımın görüldüğü populasyonlardaki TPMT aktivite düzeyleri; %89 yüksek aktivite, yaklaşık olarak %11 orta dereceli aktivite ve % 0,3 (300'de 1) düşük veya belirlenemeyen aktivite düzeyi görülmektedir (Hon ve ark. 1999).

TPMT enzim eksikliğine TPMT genindeki tek nükleotid polimorfizimleri (SNP) neden olmaktadır. Bugüne kadar 20 den fazla SNP tespit edilmiş olup, bunlardan dört tanesi ( TPMT\*2, TPMT\*3A, TPMT\*3B ve TPMT\*3C) en yaygın olarak görülenleridir (Tanaka ve ark. 2000, Lagnley ve ark. 2002). Enzim eksikliğinin, hatalı genden oluşan hatalı TPMT proteinlerinin proteolizi sonucu oluştuğu bulunmuştur (Wang ve ark. 2005)

## 1.2 TPMT Geni

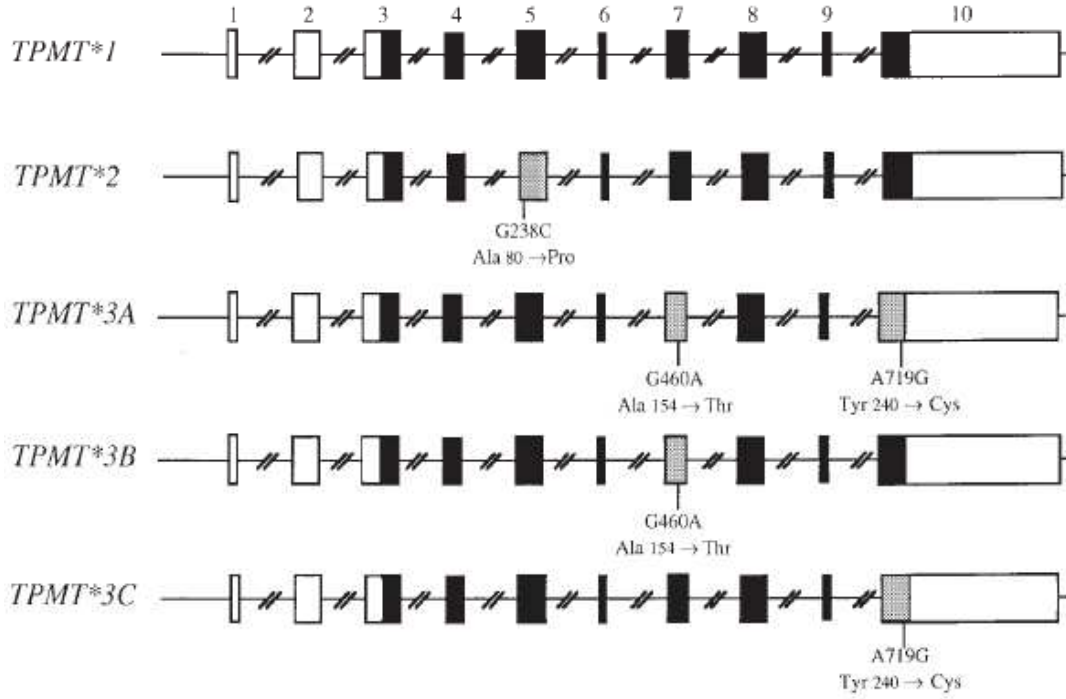
TPMT enzim eksikliği otozomal kodominant olarak kalıtım göstermektedir (Ameway ve ark. 1999). TPMT geni 6. kromozom üzerinde (6p22.3) bulunan bir gendir. Bu gen yaklaşık olarak 34kb, 9 intron ve 10 eksondan oluşmakta olup, 245 amino asit ihtiva etmektedir (Şekil 1.3). TPMT geninin promotor bölgesinde VNTR'ler bulunmaktadır ve bunların tekrarı popülasyonda 3 tekrardan 9 tekrara kadar çıkmaktadır. Yapılan araştırmalarda promotor bölgesinde VNTR sayısı ile aktivite arasında zıt bir korelasyon görülmektedir. VNTR sayısı arttıkça enzim aktivitesi düşmektedir (Shazia ve ark. 2009)



**Şekil 1.3** TPMT geninde bilinen alelik varyantların dağılımı. Siyah kutular oper-reading frame (ORF) leri kodlayan eksonları, beyaz kutular ise ORF dışındaki eksonları göstermektedir. Ara bölgeler ise intronlardır (Schaeffeler 2006)

## 1.3 Yaygın TPMT Mutant Alelleri

TPMT enzim eksikliğini TPMT genindeki tek nükleotid polimorfizimlerinin neden olduğu nokta mutasyonlar sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir ve bugüne kadar 20 den fazla mutant allel belirlenmiştir. Bunlar en yaygın olanları TPMT\*2 (G238C kodon 80'de Alanin-Prolin değişimi), TPMT\*3A (G460C ve A719G kodon 154 de Alanin-Tireonin ve kodon 240 da Tirozin-Sistein değişimi) TPMT\*3B (G460A kodon 154 de Alanin-Tireonin değişimi) ve TPMT3\*C (A719G kodon 240 da Tirozin-Sistein değişimi)dir (Şekil 1.4.). Bu 4 mutasyon, popülasyonlardaki enzik eksikliğini %95'inden sorumludur.



**Şekil 1.4** İnsan TPMT wild-tip (TPMT\*1) ve yaygın mutant aleller. Beyaz kutular translasyonu yapılmayan ekzonik bölgeleri, siyah kutular open-reading frame (ORF) dizisinin kodladığı ekzonları, gri kutular ise amino asit değişimi ile sonuçlanan mutasyonları içeren ekzonları göstermektedir (Genç 2009)

TPMT enzim eksikliği, bu eksikliğin sık görüldüğü Kafkas, Afro-Amerikan populasyonları gibi populasyonlarda trimodal dağılım göstermektedir. Yani aktivite seviyesi üç tiptedir. Trimodal dağılımın olduğu toplumlarda; %89 normal veya yüksek aktivite, yaklaşık %11 orta dereceli aktivite ve %0,3 (300’de 1) düşük veya belirlenemeyen aktivite görülmektedir. Değişik popülasyonlardaki TPMT mutant sıklığı(Çizelge 1.1.)’daki gibidir.

Çizelge 1. 1. Değişik populasyonlarda TPMT mutant sıklığı (Genç 2009)

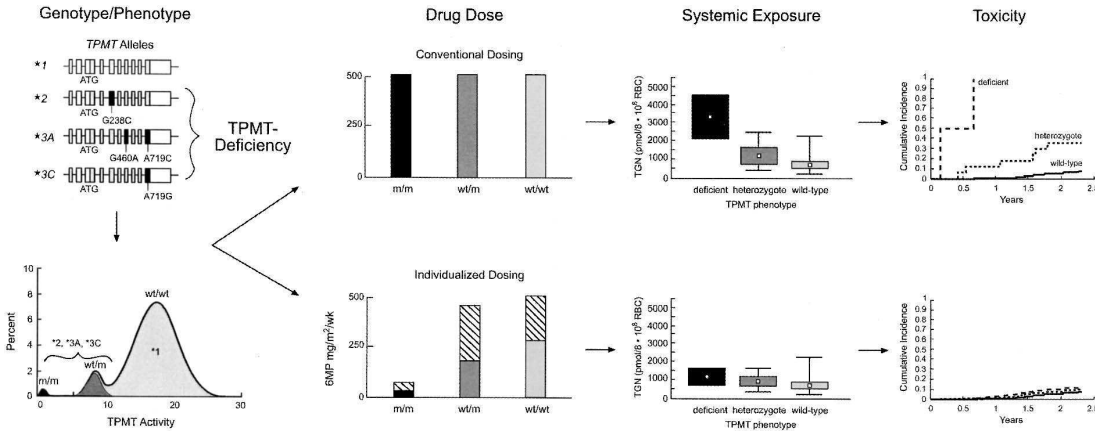
Populasyon	Sayı	*2	*3A	*3B	3*C
Amerikan	564	0.2	4.5	TE	0.3
İngiliz	398	0.5	4.5	TE	0.3
Fransız	938	0.7	3	0	0.4
Alman	2428	0.5	8.6	TE	0.8
Polonya	716	0.4	2.7	0	0.1
İsveç	1600	0.06	3.75	0.13	0.44
Danimarka	400	TE	3.3	0	0.3
Norveç	132	0	3.4	0	0.3
Norveç Sami	388	0	0	0	3.3
Bulgar	626	0.16	2.24	0	0.16
İtalyan	206	0.4	3.9	TE	0.9
Afro- Amerikan	248	0.4	0	TE	2.4
Arjantin	294	0.7	2.1	0	0
Gana	434	0	0	TE	7.6
Kenya	202	0	0	TE	5.4
Çin	384	0	0	TE	2.3
Japon	1044	0	0	0	1.6
Tayvan	498	0	0	0	0.6
Tayland	400	0	0	0	4.75
Güneybatı Asya	198	0	1	TE	0
Güneydoğu Asya	1098	0	0	TE	1
Brezilya	408	2.2	1.5	0.2	1
Kolombiya	280	0.4	3.6	0	0
Mısır	400	0	0.003	0	0.013

\*TE: Tespit Edilmedi

### 1.4 TPMT Genotipi İle Fenotipi Arasındaki İlişki

TPMT genotipleri ile fenotipi yani enzim aktivitesi arasında önemli bir ilişki olduğu yapılan birçok çalışmada ortaya konulmuştur. Bu bağlamda TPMT genotiplerine bakılarak enzim aktivite düzeyi hakkında bilgi sahibi olunabilir (Chrzanowska ve ark. 2006).

TPMT eksikliği olan hastalarda enzimin tiopürin ilaçlarını inaktif metabolitler haline dönüştürme kapasitesi azaldığı için hücrelerde aktif TGN miktarı artmaktadır (Şekil 1.5.). Bu artış hastalar için ciddi sorun teşkil etmektedir. Bu artışın çıkaracağı sorunları bertaraf etmek için enzim seviyesine bakarak kullanılan tiopürin ilaç dozajları azaltılmalıdır (Krynetski ve Evans 1998).

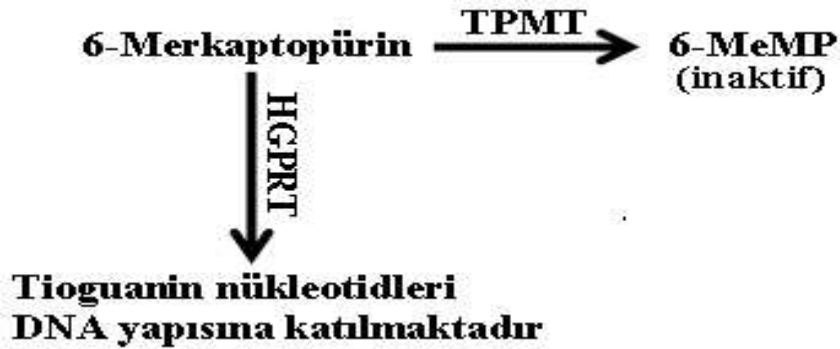


Şekil 1.5 TPMT'nin genetik polimorfizmi ve tiopürinlere yanıtın belirlenmesinde enzimin rolü. Soldaki panel insanda TPMT enzim eksikliğinin otozomal kodominant kalıtımının neden olduğu baskın mutant allelleri göstermektedir. Devam eden sağdaki üç panel ise tiopürin ilaçlarının standart dozları hastalara verildiğinde, TPMT eksikliği olan hastalarda aktif TGN'lerin hücresel birikimi belirgin şekilde (10 kat) artmaktadır ve heterozigot bireylerde yaklaşık iki kat TGN konsantrasyonu birikmiştir. Bu birikimler belirgin şekilde hematotoksisite artışına (en sağ üst grafik) neden olmaktadır. Altta panellerde ise genotipe spesifik tiopürin dozajı uygulandığı zaman, hücresel TGN konsantrasyonu karşılaştırılmıştır ve üç TPMT fenotipinin hepsi akut toksisite olmadan tedavi edilebilmektedir (Genç 2009)

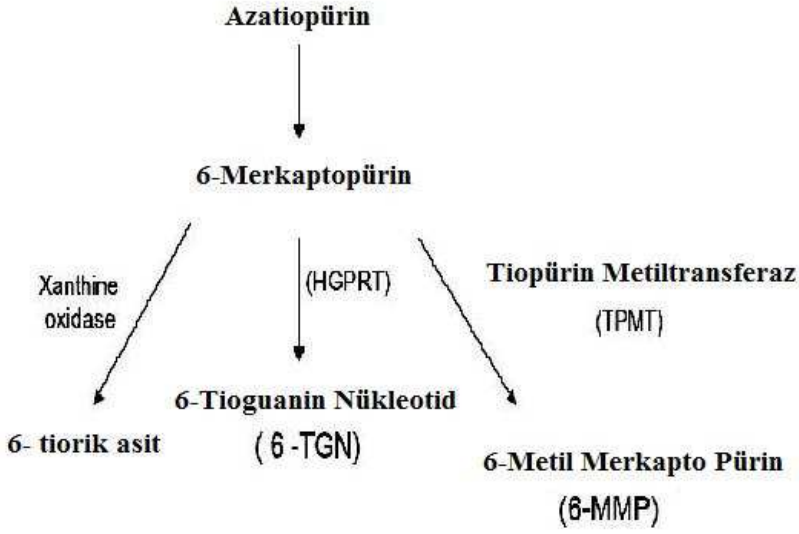
TPMT enzim eksikliği olan hastalar, tiopürin ilaçlarının standart dozları ile tedavi edildiğinde, hematolojik toksisite, miyelosüpresyon ve ölüm riski gibi ciddi komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir. Bu yüzden hastalar tiopürin ilaçları ile tedavi edilmeden önce TPMT genotip-fenotiplerine bakarak enzim seviyesinin belirlenmesi, hastalarda istenmeyen komplikasyonlardan kaçınmada klinisyenler için faydalı olacaktır (Black ve ark. 1998, Teml ve ark. 2009).

### 1.5 Tiopürin Metabolizması Ve TPMT'nin Etkisi

TPMT azatiopürin, 6-merkaptopürin gibi tiopürin ilaçların metilasyonunu katalizleyen bir enzimdir ve bu ilaçlar romatolojide, inflamatuvar hastalıklarda, dermatolojide vb. alanlarda tedavi amaçlı olarak kullanılırken organ nakillerinde immünosüpresif olarak kullanılır. Tiopürinler pürin analogudur ve DNA-RNA sentezini bozmak yoluyla hastalık tedavilerinde kullanılırlar (**Şekil 1.6.**). Bu ilaçlar ilk anda inaktiftirler ve bunların tedavilerde kullanılması için aktif form olan TGN'lere dönüşmeleri gerekir (Holme ve ark. 2002, Formea ve ark. 2004, Gardiner ve ark. 2005). Bu dönüşüm multiple enzim sistemi ile olur (**Şekil 1.7.** ).



**Şekil 1.6.** 6-merkaptopürinin (6-MP) HGPRT tarafından aktif metabolitler olan TNG'lere dönüşümü. TGN'ler DNA'nın yapısına girerek miyelotoksisite etkisini göstermektedir. 6-MP, TPMT'nin metilasyonu ile inaktif metabolit olan 6-metil merkaptopürine (6-MeMP)'ye dönüşür. Ksantin oksidaz (XO) ile oksidasyonla da inaktif metabolitler oluşmaktadır (Genç 2009)



**Şekil 1.7.** 3 enzimin yolunun etkisiyle 6-merkaptopütün metabolizması. Hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz (HGPRT) ve Tiopürin metiltransferaz (TPMT) (Dooley 2008)

Azatiopürin alındıktan sonra ilk olarak inaktif olan 6-MP ye dönüşür. Daha sonra 6-MP ye üç farklı enzim etki eder ve şu dönüşümler ortaya çıkar;

1. XO'nun (Ksantin oksidaz) etkisiyle 6-MP inaktif metabolit olan 6-tiorik asite dönüşür.
2. TPMT etkisi ile 6-MP inaktif olan 6-MMP'ye (6-metil merkaptopürin) dönüşür.
3. HGPRT etkisi ile 6-MP tedavilerde etkili rol oynayan ve enzim eksikliği olan hastalarda toksisiteye ve hatta ölümcü sonuçlara yol açabilecek olan 6-TGN' lere dönüşür.

TPMT burada önemli bir role sahiptir. 6-MP 'yi inaktif form olan 6-MMP ye dönüştürerek hücrelerde toksisiteden kurtulmayı sağlar. Burada XO'nun inaktif metabolit oluşturduğu bilinmektedir fakat inaktif metabolit oluşturma kapasitesi TPMT den çok daha azdır. Çünkü XO TPMT ye göre hücrelerde çok daha az miktarda bulunur. TPMT eksikliği olan hastalarda XO'nun inaktif metabolit oluşturma kapasitesi TGN oluşumunu yeterince önleyemediği için hücrelerde aktif TGN'ler birikmekte ve bunlar

toksisiteyi artırmaktır (Dooley ve ark. 2008, Kurzawski ve ark. 2009, Efrati ve ark. 2009, Ford ve Berg 2010).

Hastalara tiopürin grubu ilaçlar verilmeden önce TPMT enzim seviyesinin belirlenmesi hastaların olası kötü sonuçlardan korunması bakımından önem taşımaktadır.

### 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Weinshilbom ve Sladek 1980 yılındaki çalışmalarında TPMT'nin SAM molekülünü kullanarak 6-merkaptopürin gibi ilaçların S- metilasyonunu katalizlediğini ve enzim fenotipi olarak popülasyonların düşük, orta ve yüksek enzim seviyesine sahip olduklarını söylemişlerdir. (Weinshilbom ve Sladek 1980)

McLeod ve arkadaşları 1995 yılındaki çalışmaların TPMT enzim eksikliğinin otozomal resesif kalıtım gösterdiğini söylemiş ve enzimin etki ettiği merkaptopürinin enzim eksikliği nedeniyle DNA yapısına katılan tioguanin nükleotidlerine (TGN) dönüştüğünü belirtmişlerdir. Bu çalışmalarını 42 tane akut lenfoblastik lösemili (ALL) çocuğun eritrositleri üzerinde yapmış ve bu hastaların ortalama TPMT aktivitelerini 15,1 ile 21,1 U/mL pRBC olarak bulmuşlardır (McLeod ve ark. 1995).

Krynetski ve arkadaşları 1997 yılındaki çalışmalarında polimorfik insan tiopürin S-metiltransferaz enzimini izole ettikten sonra karakterize etmişlerdir. Bu çalışmada insan TPMT geni, intron-ekzon spesifik primerler yardımıyla ve phage artificial chromosome (PAC) kitaplığı PCR görüntülemesi yöntemiyle izole edilmiş ve daha sonra dizileme ve haritalama yapılmıştır. Yapılan araştırmada, kromozom 6'daki TPMT geni, spesifik insan genomik kütüphanesinde varolan ve daha önce izole edilmiş TPMT geni ile karşılaştırıldığında yapısal farklılıklar ortaya çıktığı gözlenmiştir. 5' çevreleme bölgesinin (putatif promotor) transkripsiyon başlama bölgesinin upstream 77 pozisyonunda yerleşik 17 ek nükleotid içerdiği bulunmuştur (Krynetski ve ark. 1997)

Yates ve arkadaşları 1997 yılındaki çalışmalarında TPMT enzim eksikliğinin genetik temellerini araştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Bunun için 282 örnek üzerinde (73 adet ALL hastası çocuk ve 209 sağlıklı kişi) çalışma yapıldığı bildirilmiştir. Örnekler üzerinde aktivite tayini radyokimyasal yöntem ile belirlenirken, mutant allellerin varlığı ise G238C için allel-spesifik PCR, G460A ve A719G için PRC-RFLP tekniklerini kullandığı belirtilmiştir. Araştırma sonucunda aktivite bakımından 21 kişide orta dereceli enzim aktivitesi, 21 kişide çok yüksek enzim aktivitesi ve 6 kişide ise düşük enzim aktivitesi saptandığı bildirilmiştir. Orta dereceli aktiviteye sahip 21 kişinin DNA'ları üzerinde yapılan genotipleme çalışmasında ise 18 hastada heterozigot

TPMT\*3A, 1 hastada heterozigot TPMT\*2 ve 1 hastada ise heterozigot TPMT\*3C allellerini tespit etmişlerdir. Tam eksikliğin olduğu 6 hastada fonksiyonel olmayan iki mutant allelin olduğu söylenirken bunların 3 tanesinde TPMT\*3A/\*3A, 1 tanesinde TPMT\*3A/\*3C, 1 tanesinde TPMT\*3A/\*2 ve 1 tanesinin de TPMT\*2/\*2 mutant allellerinin var olduğu rapor edilmiştir (Yates var ark. 1997).

Otterness ve arkadaşları 1998 yılındaki çalışmalarında dizi analizi, reverse trasnciption (RT) –PCR ve RFLP yöntemlerini kullanarak, TPMT geninin 9. intronunun 3' uç bölgesindeki nükleotidin intron/ekzon akseptör bölgesindeki normal yapıyı bozan ve bir G-A baz değişimi içeren yeni bir mutant allel bulmuşlar ve bu allele TPMT\*4 alleli adını vermişlerdir. Ve bunlara ek olarak bu allelin bulunduğu kişiler üzerinde pedigrî çalışması yapmışlardır (Otterness ve ark. 1998).

Black ve arkadaşları 1998 yılındaki çalışmalarında Tiopürin metiltransferaz enzimi yoluyla azatiopürinin inaktive olduğunu ve enzim eksikliği olan hastalarda azatiopürin kullanımının toksisiteye yol açacağını belirtmişler ve toksisiteden kaçınmak için TPMT genotiplemesinin yapılmasını tavsiye etmişlerdir. Bu çalışmada 67 hasta üzerinde allel spesifik PCR ve PCR-RFLP analizleri yapılmış; 6 hastada TPMT\*3A mutasyonu belirlenirken, TPMT\*2 mutasyonu hiçbir hastada belirlenememiştir. Mutant allellerin belirlendiği hastalarda azatiopürin terapisinin yapıldığı süre boyunca, hastalara verilen azatiopürin miktarında azaltma yapılması gerektiği belirtilmiştir (Black ve ark. 1998).

Krynetski ve Evans 1998 yılındaki çalışmalarında kanser kemoterapisinde TPMT enziminin ilaç metabolizasyonundaki potansiyel rolünü araştırmışlar ve merkaptopürin (MP) ve tioguaninin (TG) yaygın bir şekilde anti-lösemik ajan olarak ve azatiopürinin ise immünosüpresant olarak kullanıldığını belirtmişlerdir. İnaktif olan MP ve TG'nin hipoksantin guanin fosforibozil transferaz enzimi ile aktifleşip tioguanin nükleotidlere (TGN's) dönüştüğünü, bu TGN'lerin toksisiteye neden olduğunu ve DNA yapısına katıldığını söylemişler ve hücrel TGN birikiminin TPMT enzim aktivitesiyle zıt korelasyon gösterdiğini söylemişlerdir (Krynetski ve Evans 1998).

de la Moureyre ve arkadaşları 1998 yılındaki çalışmalarında Avrupa populasyonunda TPMT genotip ve fenotiplerini belirlemeye yönelik bir araştırma yapmışlardır. Araştırmalarında 191 Avrupa kökenli (146 adet sağlıklı gönüllü ve 45

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

adet hasta) örnek kullandıklarını, fenotip belirlemede radyokimyasal yöntem ve genotip belirlemede ise PCR-SSCP yöntemlerini kullandıklarını söylemişlerdir. Çalışmada TPMT geninin promotor, intron-ekzon sınırları ve 3' bölgesi dahil her bölgeyi analiz ettiklerini belirtmişlerdir. Yapılan araştırma sonucunda 7 adet mutant allel tespit edildiğini ve bunlardan 4 tanesinin ( TPMT\*2, \*3A, \*3C ve \*7) allelik frekanslarının sırası ile % 0.5, 5.7, 0.8 ve 0.3 olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca TPMT geninin promotor bölgesindeki VNTR'leri belirlemeye yönelik yapılan analizlerde ise en çok VNTR\*V4 ve \*V5a'nın en çok rastlanan tekrarlar olduğunu ve diğer VNTR allellerinin nadir görüldüğünü bildirmişlerdir. Ayrıca analizler değerlendirildiğinde promotor bölgesindeki VNTR sayısı ile enzim aktivitesi arasında zıt bir korelasyon olduğu sonucuna vurgu yapılmıştır (de la Moureyre ve ark. 1998).

McLeod ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptıkları çalışmada İngiliz-Kafkas ırkı ve Gana popülasyonlarında yaptıkları çalışmalarında TPMT allellerinin varlığını araştırmışlardır. Bu çalışmada mutasyon belirleme metodu olarak allel spesifik PCR ve PCR-RFLP yöntemlerini kullanmışlar ve dört allelik varyanta (TPMT\*2, TPMT\*3A, TPMT\*3B ve TPMT\*3C) yönelik çalışma yapmışlardır. Yapılan araştırma sonucunda; Gana ırkında TPMT\*3C % 7.6 oranında bulunmuş olup diğer mutant alleller tespit edilememiş, İngiliz-Kafkas ırklarında yapılan çalışmada ise TPMT\*2 % 0.5, TPMT\*3A % 4.5 ve TPMT\*3C % 0.3 oranında bulunmuş olup TPMT\*3B mutant alleli tespit edilememiştir (McLeod ve ark. 1999).

Hon ve arkadaşlarının 1999'da yaptıkları çalışmada Afro-Amerikan popülasyonu üzerinde TPMT gen polimorfizmini araştırmışlardır. TPMT aktivitesinin otozomal kodominant kalıtım gösterdiğini ve genetik olarak polimorfizm gösterdiğini söylemişler ve Kafkas ırklarında %90 oranında yüksek aktivite, % 10 civarında orta dereceli aktivite ve 300'de 1 oranında ise düşük aktivite seviyesi olduğunu belirtmişlerdir. Yaygın mutant allellerin gen üzerindeki yerlerini ise, TPMT\*2 ekzon 5'te G238C mutasyonu sonucu kodon 80'de Alanin-Prolin değişimi, TPMT\*3A ekzon 7'de G460A mutasyonu sonucu kodon 154'te Alanin-Tireonin değişimi ve ekzon 10'da A719G mutasyonu sonucu kodon 240'ta Tirozin-Sistein değişimi, TPMT\*3B ekzon 7'de G460A mutasyonu sonucu kodon 154'te Alanin-Tireonin değişimi, TPMT\*3C ise ekzon 10'da A719G mutasyonu sonucu kodon 240'ta Tirozin-Sistein değişimi olarak

belirtmişlerdir. Afro-Amerikan ırkı üzerinde yapılan çalışmada 248 örnekten 23'ünde (% 9.3) mutant alellere rastlanmış olup bunların dağılımı 23 kişi üzerinden 2 kişide TPMT\*2, 4 kişide TPMT\*3A, 12 kişide TPMT\*3C bulunmuş olup TPMT\*3B ye rastlanmamıştır. Geri kalan kişilerde ise yaygın mutant alleler dışında alleler bulunmuş olup bu çalışmalarda TPMT ekzonik bölgelerinin PCR ürünlerinin direkt dizilemesiyle ve PRC-RFLP yöntemleri kullanılarak mutasyonlara bakılmıştır (Hon ve ark. 1999).

Naughton ve arkadaşarı 1999 yılındaki çalışmalarında azatiopürin alan sistemik lopus erithematosus'lu (SLE) hastalarda TPMT polimorfizimlerinin belirlenmesinin miyelosüpresyonu etkileyip etkilemeyeceğini araştırmışlardır. TPMT\*2 mutasyonunun enzim aktivitesini 100 kat, TPMT\*3A'daki mutasyonların G460A'nın enzim aktivitesini 9 kat ve A719G mutasyonunun ise aktiviteyi 1,4 kat düşürdüğü belirtilmiştir. Yapılan araştırmada 128 SLE hastası kullanılmış olup 7 tanesinde (% 5.8) mutant alleller bulunmuştur (1 homozigot ve 5 heterozigot TPMT\*3A, 1 adet heterozigot TPMT\*3C). TPMT2 ve TPMT\*3B mutantlarına rastlanmamıştır. Bu hastalardan TPMT\*3A bakımından homozigot olan hastada azatiopürin verildiğinde belli bir süre sonra aplastik anemi açığa çıkmıştır ve bu yüzden verilen azatiopürin dozajı azaltılmıştır. TPMT mutantlığına bakılmaksızın azatiopürin terapisi hastalara uygulanmış ve 78 kişi üzerinde yapılan araştırmada 61 kişide hiçbir yan etki görülmezken, 3 kişide anormal karaciğer fanksiyonu, 1 kişide şiddetli bulantı ve 13 kişide ise lökopeni gözlenmiştir. Bu araştırmalar ışığında azatiopürine karşı toleranlığın ve buna bağlı miyelosüpresyon riskinin belirlenmesinde TPMT genotiplerine bakılmasının fayda sağlayacağı vurgulanırken, azatiopürine karşı intorelanlığın sadece TPMT eksikliğine bağlı olmadığı belirtilmiştir (Naughton ve ark. 1999).

Hiratsuka ve arkadaşları 2000 yılında yaptıkları çalışmalarında bir Japon populasyonunda TPMT polimorfizimlerini araştırmışlardır ve mutasyon belirlemede TPMT\*2 mutasyonu için allel spesifik PCR yöntemini ve TPMT\*3A, \*3B ve \*3C mutasyonlarının belirlenmesi için ise PCR-RFLP yöntemini kullanmışlardır. Yapılan bu araştırmada bakılan 192 kişi içerisinde TPMT\*3C mutasyonu % 0.8 oranında bulunurken diğer mutant alellere rastlanmadığı belirtilmiştir (Hiratsuka ve ark. 2000).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

Hongeng ve arkadaşları 2000 yılındaki çalışmalarında Tayland'da ALL (acute lymphoblastic leukemia) ve AML (acute myelogenous leukemia) hastası çocuklar üzerinde TPMT enziminin genetik varyasyonlarının araştırıldığı bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarında ALL ve AML hastası 75 örnek kullanılmıştır. TPMT varyantlarının belirlenmesinde G238C varyantı için allel-spesifik PCR, G460A varyantı için PCR-RFLP tekniği (restriksiyon enzimi olarak *MwoI*) ve A719G varyantı için ise yine PCR-RFLP tekniği (restriksiyon enzimi olarak *AccI*) kullandıklarını bildirmişlerdir. Araştırma sonucu olarak; 75 hastadan 67'sinde (%89) wild-tip yani TPMT\*1/\*1 alleli ve 8 hastada ise (%11) TPMT\*3C mutant allelinin tespit edildiğini, diğer mutant alleller olan TPMT\*2, \*3A ve \*3B'nin ise tespit edilemediğini belirtmişlerdir Hongeng ve ark. (2000).

Tanaka ve arkadaşları 2000 yılındaki çalışmalarında TPMT geninin genomik yapısı ve bu gendeki tek nükleotid polipormizimlerini (SNP's) araştırmışlardır. Yapılan araştırmada TPMT geninde 30 adet SNP bulduklarını rapor etmişlerdir. Bu SNP'lerin ise bir tanesinin 870 baz çiftlik promotör bölgesinde, 26 tanesinin intronlarda ve 3 tanesinin 3' translyasyona uğramayan bölgede (3' UTR) olduğunu belirtmişlerdir (Tanaka ve ark. 2000).

Kubota ve Chiba 2001 yılında yaptıkları çalışmalarında 151 Japon gönüllü üzerinde yaptıkları araştırmada yaygın TPMT mutant alleli olan TPMT\*2, \*3A, \*3B ve \*3C için mutasyon taraması yapmışlardır. Bu çalışmada 3 ml venöz kan alınmış ve DNA'lar saflaştırma kiti yardımıyla saflaştırılmıştır. Mutasyonların belirlenmesinde allel spesifik PCR yada PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) teknikleri mutant allellere yönelik spesifik primerler kullanılarak uygulanmıştır. Analiz sonuçlarına göre sadece TPMT\*3C mutasyonu % 0.3 oranında bulunmuş, diğer mutant allellere rastlanmadığı belirtilmiştir (Kubota ve Chiba 2001).

Hall ve arkadaşları 2001 yılındaki çalışmalarında TPMT genindeki A719G mutasyonunu belirleyebilmek için sıkça kullanılan PCR-RFLP yöntemine alternatif olarak DHPLC (Denaturing High Performance Liquid Chromatography) yöntemi kullandıklarını söylemişler ve bu bağlamda yapmış oldukları çalışmada A719G

mutasyonunu belirlemek için DHPLC yönteminin PCR-RFLP yönteminde çıkan sonuçları % 100 doğruladığını ve sıcaklık koşullarına dikkat edilerek yapıldığında DHPLC yönteminin kullanışlı bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir (Hall ve ark. 2001).

Rossi ve arkadaşları 2001 yılında yaptıkları çalışmada sağlıklı İtalyan örnekler üzerinde TPMT genotip fenotip korelasyon çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada 103 örnekten kan alındığı, TPMT aktivite ölçümü için radyokimyasal yöntemin ve TPMT genotiplerinin belirlenmesi için ise PCR-RFLP ve ASO-PCR (allel spesifik oligonucleotide polymerase chain reaction) yöntemlerinin kullanıldığı belirtilmiştir. Yapılan analizler sonucu tüm örneklerin belirlenebilir aktiviteye sahip olduğu, örneklerden 92 tanesinin homozigot wild-tip (TPMT\*1) allele sahip olduğu, 11 kişinin ise bir mutant allel bakımından heterozigot olduğu belirtilirken, genotip ve fenotip karşılaştırmaları yapıldığında TPMT genotipi ile fenotipi arasında % 97'den daha büyük bir korelasyon olduğu belirtilmiştir (Rossi ve ark. 2001).

Bomgaars ve arkadaşları 2001 yılındaki çalışmada merkaptopürin (MP) ve azatiopürin (AZA) ile tedaviye intolerant olan hastalarda TPMT fenotip ve genotip ilişkisini araştırmışlardır. TPMT fenotip ve genotip çalışmaları tüm hastalar üzerinde yapılmıştır. Enzim aktivitesi radyokimyasal yöntemle, mutasyonlar ise (TPMT\*2, TPMT\*3A,\*3B ve \*3C için) mutasyon-spesifik PCR-RFLP yöntemi ile belirlenirken, tiopürin metabolitleri HPLC (yüksek performans likit kromatografi) yöntemiyle belirlenmiştir. 23 hasta üzerinde çalışılmıştır ( 21 adet ALL, 1 adet Chorn ve 1 adet Polyarthritis hastası). Bu 23 hastadan 6 tanesi TPMT eksikliğine sahip iken (aktivite < 5 U/mL pRBC), 9 tanesi orta dereceli aktiviteye (aktivite 5 ile 13 U/mL pRBC) ve 8 tanesinin ise yüksek aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir (aktive > 13,5 U/mL pRBC). Aktivite tayinlerinden sonra yapılan mutasyon analizlerinde düşük aktiviteye sahip hastalarda homozigot mutant TPMT alleli (\*3A/\*3A), orta dereceli aktiviteye sahip hastalarda heterozigot mutant TPMT alleli (TPMT \*1/\*3A, \*1/3C ve \*1/X yaygın olmayan mutant allel), yüksek aktiviteye sahip hastalarda ise wild-tip allel (TPMT\*1 yani enzim eksikliği içermeyen normal allel) görülmüştür ve düşük ve orta dereceli enzim eksikliği olan hastalarda tedavi sürecinde AZA ve MP dozajlarının azaltılması gerektiği vurgulanmıştır (Bomgaars ve ark. (2001).

Schaeffeler ve arkadaşları 2001 yılındaki çalışmalarında TPMT'nin, lösemi tedavisinde kullanılan tiopürinler üzerinde klinik bir etkisi olduğunu söylemiş ve TPMT genotiplerinden TPMT\*2 ve TPMT\*3A'yı kolay ve hızlı bir şekilde belirlemek için DHPLC (denatüre yüksek performans likit kromogotrafı) yöntemi kullanılarak "High-Throughput" genotipleme tekniğini kullanmışlar ve bunu PRC-RFLP ve ASPCR (alle spesifik PCR) ile karşılaştırmışlardır.

Bu çalışma için 98 DNA örneği toplanmıştır. Tüm fragmentler direkt dizileme yöntemiyle incelenmiştir. Buna ek olarak DHPLC'nin hassaslığını belirlemek için tüm örnekler PCR-RFLP ve ASPCR ile tekrar taranmış ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak DHPLC tekniğinin yardımıyla yapılan "High-Throughput" yöntemi ile yapılan mutasyon tarama verileri PCR-RFLP ve ASPCR verileri ile karşılaştırıldığında aradaki uyumun %100 olduğu bulunmuştur. Bunun sonucu olarak TPMT mutasyonlarının taranmasında DHPLC High-Throughput yöntemi kullanışlı ve hızlı bir yöntem olarak tavsiye edilmiştir (Schaeffeler ve ark. 2001).

Coulthard ve arkadaşları 2002 yılındaki çalışmalarında Tiopürin ilaçlarına karşı hassasiyet geliştirmede TPMT'nin ekspresyonunun önemini araştırmışlardır. Yapılan çalışmalarda 6-TG (6-tioguanin)'in 6-MP(6-merkaptopürin)'den daha etkili bir etken madde olduğu düşünülmüştür. İnaktif formlar olan 6-TG ve 6-MP'nin HGPRT (hipoksantin guanin fosforiboziltransferaz) enzimi ile aktive olup TGN'lere (tioguanin nükleotid) dönüştüğünü ve bu TGN'lerin birikimle toksisiteye neden olduğu vurgulanmıştır. 6-TG ve 6-MP'nin inaktif metabolitler haline dönüşmesinde ise TPMT ve XO (ksantin oksidaz) enzimlerinin görev yaptığını ve TPMT etkisi ile inaktif 6-MMP (6-metil merkaptopürin), XO'nun etkisi ile tiorik asitin oluştuğu söylenmiştir. Bu inaktif zararsız formların oluşmasında TPMT'nin öneminin yüksek olduğu vurgulanıp, toksik etkinin yok edilmesinde TPMT'nin sorunsuz ekspresyonunun önemi vurgulanmıştır (Coulthard ve ark. 2002).

Langley ve arkadaşları 2002 yılında yaptıkları çalışmada Otoimmün hepatitli hastalarda azatiopürin terapisinin TPMT fenotip ve genotipyle ilişkisini araştırıp ortaya koymuşlardır. TPMT aktivitesinin ölçülmesinde S-adenozil-L-metionin metil donörü olarak kullanıp 6-MP'nin 6-MMP'ye dönüşmesi sonucu oluşan 6-MMP moleküllerinin ünite cinsinden değeri bulunmuş ve aktivite seviyesi belirlenmiştir. TPMT genotipleme ise TPMT\*3A, \*3B ve \*3C mutasyonları için yapılmış olup, mutasyon belirleme yöntemi olarak PCR-RFLP yöntemi kullanılmıştır. Restriksiyon enzimi olarak ta *MwoI* ve *AccI* enzimleri kullanılmıştır. Aktivite taramasında 110 hastadan 1 tanesi düşük, 15 tanesi orta dereceli ve 94 tanesi ise yüksek aktiviteli çıkmış olup, orta ve düşük aktiviteli hastalarda tedavi sırasında kullanılan azatiopürin dozajının standart dozaja göre daha az olması gerektiği ya da icabında alternatif ilaç kullanılması gerektiği söylenmiştir. Genotipleme çalışmasında çalışılan 53 örnekten hiç birinde TPMT\*3C mutantına rastlanmazken, yedi kişide TPMT\*3A ve \*3B tespit edilmiştir. TPMT\*3A ve \*3B'nin olduğu hastalarda azatiopürin kullanımına bağlı olarak 2 hafta içinde aplastik anemi görülmüş ve azatiopürin kullanımında dozaj azaltılmasına hatta azatiopürin kullanımının bırakılmasına gerek görülmüştür.

Sonuç olarak otoimmün hepatitli hastalarda TPMT fenotip ve genotiplerinin belirlenmesinin, kullanılan azatiopürinin oluşturacağı toksisite ve buna bağlı komplikasyonlardan korunma bakımından önemli olduğu vurgulanmıştır (Langley ve ark. 2002).

Holme ve arkadaşlarının 2002 yılındaki çalışmalarında İngiltere'de yaptıkları araştırmada, çeşitli tıp dallarında azatiopürin kullanımını belirleyip TPMT'nin azatiopürin kullanımı üzerinde etkilerini araştırmışlardır. Yapılan araştırmalarda azatiopürinin en çok dermatoloji ve gastroenterolojide kullanıldığını saptamışlardır. Aktivite taramalarında ise bireylerin % 80'ni normal, % 9'u normalüstü ve yaklaşık % 10'u düşük aktiviteli çıkarken, % 0.45'inin çok aşırı düşük ya da belirlenemeyen aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir. Ve bu düşük aktivitenin azatiopürinin sitotoksik etkisinin oluşmasında etkili olduğu vurgulanmıştır (Holme ve ark. (2002).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

Hamdy ve arkadaşlarının 2003 yılındaki çalışmalarında Mısır populasyonunda TPMT genotipleri ve allelik frekanslarını belirlemeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Çalışmalarını 200 Mısırlı üzerinde yaptıklarını söylemişlerdir. Bireylerden kanlar alınmış ve genomik DNA'lar QIAamp DNA doku kitleri ile saflaştırılmıştır. Primerler, Nihon Gene Research Laboratories tarafından, TaqMan problemleri ise Applied Biosystems tarafından sentezlenmiştir. TPMT mutant allellerinin belirlenmesi işleminde, TPMT\*2 için allel spesifik PCR, TPMT\*3A ve \*3B için PCR-RFLP (RFLP işleminde restriksiyon enzimi olarak *MwoI* kullanılmıştır) ve TPMT\*3C için ise allel-spesifik real-time PCR yöntemini kullanmışlardır. Çalışma sonucunda; 200 kişiden 194'ü (%97) homozigot wild-tip (TPMT\*1), 6 kişi bir mutant allel bakımından heterozigot olarak bulunmuştur ki bunların bir tanesi TPMT\*1/\*3A, beş tanesi TPMT\*1/\*3C ve bunların allelik frekansları sırasıyla % 0.003 ve % 0.013 olarak tespit edilmiştir. TPMT\*2 ve \*3B mutant allellere rastlanmamıştır (Hamdy ve ark. 2003).

Reuther ve arkadaşları 2003 yılındaki çalışmalarında Crohn sendromu olan hastalarda TPMT genotip dağılımını araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada rasgele seçilmiş 120 hasta kullanmışlar ve genotip belirleme işleminde ise ekzon 7 ve ekzon 10'daki mutasyonları PCR tekniği kullanarak belirlemişlerdir. Yaptıkları araştırmada sonuç olarak; 120 hastanın 109'unda (%90.3'ünde) wild-tip (TPMT\*1) allel, 10 tanesinde (%8.3'ünde) bir adet ve 1 tanesinde ise iki adet fonksiyonel olmayan mutant allel olduğu saptanmış ve bulunan bu fonksiyonel olmayan mutant allellerin TPMT\*3A alleli olduğu belirtilmiştir (Reuther ve ark. 2003).

Gearry ve arkadaşlarının 2003 yılındaki çalışmalarında inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hastalarda TPMT genotiplerinin belirlenmesi ve bununla bağlantılı azatiopürin kaynaklı yan etkilerin kaynağının belirlenmesi ile ilgili bir çalışma yapmışlardır. Bu araştırma için azatiopürin yan etkilerinin görüldüğü 56 hastanın 50 tanesi ve kontrol grubu olarak ta 50 tane azatiopürine toleranslı hastanın kan örnekleri alınarak genotipleme işlemine tabi tutulduğu belirtilmiştir. Olası mutant allellerin belirlenmesi için ARMS işlemi uygulanırken sonuçları doğrulama için ek olarak PCR-RFLP tekniği uygulanmıştır. Yapılan analizler sonucu azatiopürin yan etkilerinin görüldüğü 50 hastanın 5 tanesinde TPTM\*1/\*3 genotipi ve bir tanesinde ise

TPMT\*3/\*3 genotipi bulunduğu ve TPMT\*3/\*3 genotipinin olduğu hastada ise şiddetli pansitopeni görüldüğü bildirilmiştir. 50 kişilik kontrol grubunda ise 3 kişide TPMT\*1/\*3 genotipi belirlenirken geri kalanların wild-tip (TPMT\*1/\*1) allele sahip olduğu rapor edilmiştir. Son olarak TPMT varyant allelleri bakımından azatiopürine tolerans gösterip gösterememe arasında pek fark görülmediği belirtilmiştir (Gearry ve ark. 2003).

Corominas ve arkadaşları 2003 yılındaki çalışmalarında romatoid artritli hastalar üzerinde TPMT polimorfizimlerinin kullanılan azatiopürin (AZA) miktarının belirlenmesinde major faktör olup olmadığını belirlemeye çalışmışlardır. Araştırmada 111 kişi kullanılmıştır ve bunlardan 40 tanesinde AZA terapisi uygulanmıştır. Genomik DNA'lar periferik kandan elde edilmiş ve tüm örnekler 460 ve 719'uncu nükleotid pozisyonundaki mutasyonları belirlemek için PCR-RFLP yöntemi kullanılarak analiz edilmiştir. Yapılan genotipleme işlemi sonunda romatoid artritli 111 kişiden 7 tanesinde (%6.3) mutant allele rastlandığı belirtilmiştir. Bu hastalardan bir tanesi TPMT\*3A ve \*3B bakımından çifte heterozigot, dört tanesi TPMT\*3B bakımında heterozigot ve kalan iki tanesinde ise 5' translyasyona uğramayan bölgedeki VNTR'ler V4/V4 olarak bulunmuştur. TPMT\*3A mutant allelinin olduğu hastalarda şiddetli kusma ve bulantı ile kendini gösteren gastrointestinal yan etkiler görüldüğü belirtilirken, TPMT mutant allellerinin belirlenmesinin hastalarda AZA kullanımına bağlı olarak oluşabilecek yan etkilerden kaçınılması için dozaj ayarlamaya yardımcı olabileceği söylenmiştir (Corominas ve ark. 2003).

Boson ve arkadaşları 2003 yılındaki çalışmalarında Brezilya popülasyonunda TPMT polimorfizimlerini araştırdıkları bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada 204 örnek kullandıklarını söylemişlerdir. Polimorfizim belirleme işlemine öncelikle periferik kandan kit yardımıyla DNA'ları saflaştırarak başlamışlar ve mutasyon belirleme yöntemi olarak ta allele-spesifik PCR ve PCR-RFLP yöntemlerini kullandıklarını belirtmişlerdir. DNA saflaştırma işleminden sonra PCR'da kullanılacak oligonükleotid ve primerler hazırlanmıştır. Daha sonra PRC yapılmış ve elde edilen PCR ürünleri (RFLP için *MwoI* ve *AccI* enzimleri kullanılmıştır), GFX PCR ve Gel Band Purification kiti kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri % 8'lik

akrilamid jelde elektroforeze tabi tutulmuştur. Buradan elde edilen her PCR ürünü ABI Prism 310 genetik analizatörde analiz edilmiştir. Yapılan analizler sonucu TPMT\*2 mutasyonun allelik frekansı % 2,2, TPMT\*3A allelik frekansı % 1,5, TPMT\*3B allelik frekansı % 0.2, TPMT\*3C allelik frekansı % 1.0, TPMT\*5 ve \*6 allelik frekanslarının ise % 0.0 olarak bulunduğu bildirilmiştir (Boson ve ark. 2003).

Lindqvist ve arkadaşları 2003 yılındaki çalışmalarında TPMT gen ekspresyonunun belirlenmesinde Real-time RT-PCR metodolojisinin kullanılmasına yönelik çalışma yapmışlardır. Bu çalışmadaki amaç; tam kan TPMT gen ekspresyonunu belirlemek için bir real-time ters-trankripsiyon polimeraz zincir reaksiyon (RT-PCR) metodolojisi geliştirmek ve bunu kırmızı kan hücrelerinde ölçülen TPMT enzim aktivitesi ile karşılaştırmaktır.

Bu çalışmada TPMT gen ekspresyonu housekeeping gene cyclophilin (huCYC) ve eksprese olmuş TPMT/huCYC oranı belirlenmiştir. Araştırmada 13 birey kullanılmış ve aktivite tayini için S-adenozil-L- metionin metil donörü olarak kullanılarak 6-MP'nin 6-MMP'ye dönüşümü kullanılmıştır. Yüksek TPMT aktivitesinin orta dereceli aktiviteden ayırt etmek için, orta derece olarak 9 U/mL pRBC değeri kullanılmıştır.

Sonuç olarak real-time RT-PCR ampikon dizilemesinin, TPMT pseudo geninin koamplifikasyonu gereksiz TPMT cDNA'sı için spesifik olduğu kanıtlanmıştır. Enzim aktivitesinin 9 U/mL pRBC olan hastalarda enzim aktivitesi ile kırmızı kan hücrelerindeki mRNA seviyesi arasında korelasyon olduğu görülmüştür (Lindqvist ve ark. 2003).

Krynetski ve Evans 2003 yılında yaptıkları çalışmalarında kanser tedavisinde ilaç metilasyonu ve bu metilasyon sürecinde TPMT'nin rolünü ve TPMT'nin yapısını anlatmışlardır. Bu yayında TPMT'nin moleküler ve kimyasal yapısına ilişkin şu veriler verilmiştir;

1. TPMT enzimi tiopürinlerdeki sülfür atomlarını S-adenozil-L-metionini metil donörü olarak kullanarak metilleyen bir enzimdir.

2. TPMT enzimi insanda kalp; kan hücreleri, böbrek ve karaciğer gibi birçok organ ve dokuda eksprese edilir.
3. İnsan TPMT enziminin moleküler ağırlığı 28 kDa ( kilo dalton)'dur ve 245 amino asit ihtiva etmektedir.
4. TPMT geni kromozom 6'dadır ( 6p22.3) ve 10 ekzon içermektedir.
5. Kromozom 18'de insan TPMT geninin pseudo geni bulunmaktadır.

Krynetski ve Evans bu yayınlarında TPMT eksikliği olan hastalarda; TPMT proteinlerinin degradasyona uğradığını ve bunu ATP bağımlı proteozomal yolla ve ATP bağımsız lizozomal yolla olduğunu da söylemişlerdir. TPMT varyasyonlarının oluşmasında başka bir neden olarak ta TPMT geninin promotor bölgesindeki polimorfizimleri göstermişlerdir (Krynetski ve Evans 2003).

Oellerich ve arkadaşları 2004 yılındaki çalışmalarında TPMT \*3A, \*3B ve \*3C için hızlı, uzun dizi haplotipleme tekniğini (Rapid, Long-Range Haplotyping) kullanmışlardır ve bu tekniğin TPMT polimorfizimlerinin belirlenmesinde hızlı ve kolay bir yol olduğunu söylemişlerdir. Yapılan çalışmada TPMT\*3A, \*3B ve \*3C'yi oluşturan iki tek nükleotid polimorfizimini içeren genomik bölgeyi Long-Range PCR yöntemini kullanarak amplifiye etmişlerdir. PCR ürünleri ligasyonla sirkülize edilmiş ve hibridizasyon problemleri kullanarak ASA PCR (allel-spesifik PCR) yöntemi ile haplotipleme yapılmıştır. Sonuç olarak uygulanan metot; TPMT\*1/\*3A, TPMT\*1/\*3C, TPMT\*1/\*1 ve TPMT\*3A/\*3A örneklerinde başarılı olmuştur (Oellerich ve ark. 2004).

Haglund ve arkadaşları 2004 yılındaki çalışmada genel İsveç popülasyonu ve inflamatuvar bağırsak hastalığı olan kişiler üzerinde TPMT allellerinin belirlenmesi için piro-dizileme (pyrosequencing) yöntemini kullanmışlardır. Bu yöntem 10 tane tek nükleotid polimorfizimini (SNP) belirlemek için geliştirmişlerdir. Yapılan çalışmada bireylerden tam kan örnekleri alınmış ve DNA'lar kit kullanılarak saflaştırılmıştır. TPMT aktivite ölçümü 6-MP (6-merkaptopürin)'nin 6-MMP (6-metil merkaptopürin)'e dönüştürülmesi esasına göre yapılmıştır. PCR için ekzon 7, 8 ve 10' a spesifik olan primerler üretmişlerdir. Piro-dizileme( pyrosequencing) için gerekli kimyasallar belirlenmiş ve temin edilmiştir.

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

Yapılan çalışmada sonuç olarak; TPMT\*3A allelik frekansı % 3.75, TPMT\*3C allelik frekansı % 0.44, TPMT \*3B allelik frekansı % 0.13 ve TPMT\*2 allelik frekansı % 0.06 olarak bulunmuştur (Haglund ve ark. (2004).

Reuter ve arkadaşları 2004 yılındaki çalışmalarında yaptıkları çalışmada azatiopürine (AZA) toleranslı ve toleranssız çeşitli hastalıklara sahip kişilerdeki TPMT genotip dağılımlarını araştırmışlardır. Bu çalışma için 46 aza-tolerant ve 6 tane aza-intolerant hasta seçilmiştir. Oluşan aza metabolitlerinin belirlenmesinde HLPC yöntemi, ekzon 7 ve 10'daki G460A ve A719G mutasyonlarının belirlenmesi için ise PCR yöntemi kullanılmıştır.

Çalışma sonucu olarak; 46 aza-tolerant hastadan 2 tanesinde bir adet fonksiyonel olmayan TPMT mutant alleli, 6 aza-intolerant hastadan 2 tanesinde ise bir yada iki fonksiyonel olmayan mutant TPMT alleli belirlenmiştir ve TPMT genotip dağılımının farklı hastalıklarda farklı olduğu belirtilmiştir (Reuter ve ark. 2004).

Wood ve arkadaşları 2004 yılındaki çalışmalarında multipleks RT-PCR IHG (Induced Heteroduplex Analysis) Analysis yöntemi ile TPMT mutantlarını belirlemişlerdir. Yapılan çalışmada TPMT IGH çalışmaları çeşitli hematolojik hastalıkları bulunan 47 kişi üzerinde yapılmıştır. Araştırma sonucunda yaygın mutant allellerden TPMT\*3A ve \*3C nin varlığı tespit edilirken TPMT\*3B ve TPMT\*2 mutasyonları bakılan örnekler arasında tespit edilememiştir (Wood ve ark. 2004).

Zhang ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmalarında Uygur Çin ırkı üzerinde TPMT gen mutasyonlarını belirlemeye çalışmışlardır. Yapılan çalışmada genomik DNA periferal lökositlerden fenol-kloroform yöntemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Yaygın mutasyonlar olan G238C, G460A ve A719G'nin belirlenmesi için PCR tabanlı analizler yapılmıştır. Bu mutasyonlara özgü spesifik primerler kullanılmış olup, oluşan PCR ürünlerine *MwoI* ve *AccI* enzimleri (G460A ve A719G için) kullanılarak PCR-RFLP analizi yapılmıştır. 160 Uygur Çinli'si arasında yapılan bu analizler sonucu; 1 adet heterozigot TPMT\*3A ( G460G/A719G) ve 5 adet heterozigot TPMT\*3C ( A719G) tespit edilmişken TPMT\*3B ( G460A) tespit edilememiştir.

TPMT\*3A ve \*3C'nin allelik frekansı sırası ile % 0.3 ve % 1.6 olarak hesaplanmıştır (Zhang ve ark. 2004).

Oh ve arkadaşları 2004 yılındaki çalışmalarında Kore'de yaptıkları bir çalışmada azatiopürin tedavisinde PCR ile yapılan TPMT polimorfizm görüntüleme işlemini farmako-ekonomik açıdan incelemişler ve bu incelemede TPMT için geleneksel yöntem ile PCR tabanlı görüntüleme yöntemi ekonomik açıdan değerlendirilmiştir. Geleneksel yöntemin azatiopürin dozajı ayarlama stratejisi olarak çok kullanıldığını, fakat bu klasik yöntemin kan transfüzyonu, başka ilaçlar ve gen dışı faktörler gibi şeylerden etkilendiği ve maliyetinin yüksek olduğu vurgulanırken,PCR tabanlı görüntüleme ile yapılan azatiopürin dozaj ayarlama stratejisinin çabuk, iyi sonuç veren, kan transfüzyonu, başka ilaçlar ve gen dışı faktörlerden etkilenmediği ve maliyet olarak konvansiyonel yöntemden daha az maliyetli olduğu belirtilmiştir (Oh ve ark. 2004).

Ganiere ve arkadaşları 2004 yılında yapılan çalışmada Fransız-Kafkas populasyonunda TPMT fenotip/genotip araştırması yaparak TPMT aktivitesine yaşın etkisini araştırdıklarını belirtmişlerdir. Yapılan çalışmada 304 yetişkin, 147 çocuk ve 18 adet ise kordon kanı örneği kullanılmıştır. TPMT enzim aktivitesini HPLC tekniği, genotipleri ise PCR-reverse dot-blot yöntemi ile belirlemişlerdir. Analizler sonucu örneklerin % 91.9'unda wild-tip allel, % 7.9'unda heterozigot mutant allel ve % 0.2'sinde ise homozigot mutant allel tespit edilmiştir. Aktivite bakımından yapılan değerlendirmede ise kordon kanı aktivitesi ile çocuk aktivitesi arasında önemli bir fark olmadığı fakat TPMT aktivitesinin çocuklarda yetişkinlere göre daha az olduğu sonucunun ortaya çıktığı söylenmiştir (Ganiere ve ark. 2004).

Roberts ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada TPMT'nin polimorfik olduğunu ve TPMT eksikliğin otozomal çekinik genle kalıtıldığını söylemişlerdir. Yaygın TPMT mutasyonlarını belirlemek için multipleks allel spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (allel spesifik PCR) yöntemini kullanmışlardır. Çalışmalarında 100 adet inflamatuvar bağırsak hastalığı olan hasta kullanmışlardır. Bu hastalardan kan örnekleri alınıp DNA'ları guanidin izosiyanat ekstraksiyonu ile saflaştırılmıştır. Mutasyon belirleme aşamasında ARMS ve PCR-RFLP yöntemleri kullanılmış olup; kullanılan

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

primerler bu yöntemlere özgüdür. Yapılan multipleks ARMS analizleri sonucu hastalarda sadece TPMT\*3A alleli bulunmuştur ve bunun doğruluğu PCR-RFLP yöntemi ile de doğrulanmıştır. TPMT\*2, \*3B ve \*3C allelerine rastlanmamıştır (Roberts ve ark. 2004).

Formea ve arkadaşları 2004 yılında yapılan çalışmada azatiopürin alan organ nakli yapılan kişilerde TPMT genindeki mutasyonlar ve ilaç yan etkilerinin oluşumu arasında bir ilişki olduğunu fark ettiklerini söylemişlerdir. Bunu için yaptıkları çalışmada TPMT mutant allellerini belirlerlerken aynı zamanda organ nakli yapılan kişilerin kan değerlerini de gözlem altında tuttuklarını belirtmişlerdir. Transplant vakası olarak böbrek naklini seçmişler ve araştırmalarını 89 hasta üzerinde yapmışlardır. Bu araştırmada mutasyon belirleme yöntemi olarak PCR tabanlı metot kullanılmıştır. 89 hastadan 36 tanesi mutant allel araştırma işlemine tabi tutulmuş ve analizler sonucu 5 kişide mutant allele (TPMT\*3A: n=2, TPMT\*3B: n= 1 ve TPMT\*3C: n= 2) rastlandığı rapor edilmiştir. Genotip araştırılması ile kan değerleri birlikte değerlendirildiğinde; bu mutant allellerin bulunduğu hastalarda organ nakli sonrası ilk bir ay içinde hematolojik değerlerde önemli bir düşme olduğu ve bunun mutant alleller ile alakalı olduğu sonucuna varıldığı bildirilmiştir. Yapılan bu araştırmaların ışığında böbrek transplantasyonu yapılan ya da yapılacak hastalarda TPMT genotip belirleme analizlerinin yapılmasının immünosupresif ilaç optimizasyonu ve ilaç toksisitesinin azaltılması bakımından yardımcı olabileceğine vurgu yapılmıştır (Formea ve ark. 2004).

Alves ve arkadaşları 2004 yılındaki çalışmalarında en yaygın mutant allellerden olan TPMT\*3A ve TPMT\*3C için orijin araştırması yapmışlardır. Çalışmalarında dünya üzerinde TPMT\*2, \*3A, \*3B, \*3C, \*3D\*, \*5, \*6 ve \*8 mutant allellerinin dağılımını göstermişlerdir. TPMT\*3C allelinin TPMT\*3A'ya göre dünya üzerinde daha çok dağılım gösterdiğine vurgu yapmışlardır. TPMT\*3C coğrafik olarak geniş bir yayılım gösterirken; bununla beraber popülasyonel bir sınırlılık içinde olduğu söylenmiştir. Bu iki allelin tarihsel evrimini açığa çıkarmak için TPMT genindeki flanking bölgesinde CA tekrarları olan AFM161y<sup>f</sup>4 ve D6S1688'i analiz etmişler ve Portekiz ve Mozambik ırkları üzerinde ise genotip belirleme çalışması için PCR ve HCSGE (horizontal conformational sensitive gel electrophoresis) yöntemlerini

kullanılmışlardır. Son olarak ta LD ölçümü, haploit varyasyon ve yaş hesabı yaptıklarını söylemişlerdir. Araştırmada atasal sonuç olarak TPMT\*3A mutant allelinin tahmin edilen yaşının 5700 ve TPMT\*3C allelinin yaşının ise yaklaşık 14000 olduğu kanısına varılmıştır (Alves ve ark. 2004).

Wang ve arkadaşları 2005 yılındaki çalışmalarında en yaygın TPMT varyantının TPMT\*3A olduğunu ve bu TPMT\*3A mutantında enzim aktivitesinin çok az ya da hiç olmadığı ya da enzim proteininin hiç olmadığını söylemişlerdir. Yaptıkları çalışmada TPMT\*3A mutantında enzim proteininin ekspresyon sonrasında yanlış katlandığını ve agregasyona (toplanma) uğradığını ve ubiquitin-proteozom kompleksinin dahil olduğu bir süreçte hatalı enzim proteininin yıkıldığını söylemişler ve tiopürin ilaçlarına karşı tepkinin oluşmasını ise enzim proteininin yıkımı sonucu olduğunu belirtmişlerdir (Wang ve ark. 2005).

Jung ve arkadaşları 2005 yılındaki çalışmalarında TPMT polimorfizimlerini, azatiopürin (AZA) alan SLE'li hastalarda TPMT mutant allelleri ile AZA alımı sonucu oluşan yan etkiler arasındaki korelasyonu inceledikleri bir çalışma yürütmüşlerdir. Yapılan çalışmada 342 SLE hastasından DNA örnekleri alınmış ve mutant allellerin varlığını tespit etmek için MALTI-TOF mass spectrometry (kütle spektrometresi) yöntemi kullanılmış ve primer tasarımı için MIT Primer 3 programından yararlanılmıştır. DNA örneği alınan hastalardan 94 tanesinin AZA terapisi görmekte olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan araştırma sonucunda 342 hastanın 17'sinin (%5.0) heterozigot mutant allele sahip olduğu görülmüştür. Bu alleller TPMT\*1/\*3C (12 hasta, frekans %3.5) ve TPMT\*1/\*6 (5 hasta, frekans %1.5) olarak belirtilmiştir. Mutant allellerin tespit edildiği 17 hastanın AZA alan hastalar olduğu ve bunlardan 2 tanesinde şiddetli lökopeni ve kusma belirtileri görüldüğü için AZA alımının durdurulduğunu söylemişlerdir ve yaptıkları araştırma doğrultusunda TPMT polimorfizimleri ile AZA bağlantılı yan etkilerin birbirleri ile tam korelasyon göstermediğini vurgulamışlardır (Jung ve ark. 2005)

Sies ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada azatiopürinin toksik etkisinden kaçınmak ve hastalara verilecek dozun değerlerini önceden belirlemeye yönelik bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada doz ayarını belirlemek için öncelikle

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

hastaların TPMT enzim aktivite seviyelerine bakılmış, mutant allellere sahip olup olmadıklarına ise yöntem olarak multipleks allel spesifik PCR yöntemi ile bakılmıştır. Mutant allel olarak TPMT\*2, \*3A ve \*3C ye bakılmıştır. Analizlerin sonucunda hastaların % 90'ı yüksek enzim aktivitesi ve wild-tip TPMT alleleline (TPMT\*1/\*1), % 8'i orta düzeyli aktivite ve heterozigot mutant allellere (TPMT\*1/\*2, \*1/\*3A ve \*1/\*3C) ve geri kalanların ise çok düşük yada belirlenemeyen enzim aktivitesine ve homozigot mutant allele ( TPMT\*3/\*3) sahip oldukları belirlenmiştir. Enzim eksikliğine neden olan mutant allellere sahip hastalarda azatiopürin kullanımında ise standart dozlar kullanıldığında toksik etki görüldüğü ve toksik etkiden kaçınmak için hastalara verilen dozların azaltılması gerektiğine vurgu yapılmıştır (Sies ve ark. 2005).

Okada ve arkadaşları 2005 yılında yapılan çalışmada SLE'li ( Systemic Lupus Erythematosus) 68 hasta ve 174 adet sağlıklı gönüllü Japon üzerinde yaptıkları çalışmada TPMT polimorfizimlerini araştırmışlardır. Yapılan çalışmada TPMT genotipleri Yates ve arkadaşlarının uyguladığı yöntemle bağlı kalınarak belirlenmiştir. Kısaca TPMT\*2 mutant allelinin belirlenmesi için allel-spesifik PCR tekniği, TPMT\*3A, \*3B ve \*3C mutant allellerinin belirlenmesi için ise PCR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Araştırma sonucunda 68 SLE hastası arasında sadece TPMT\*3 mutant alleli bulunmuş ve frekansı ise % 2.9, sağlık gönüllüler arasında ise yine sadece TPMT\*3C mutant alleli bulunmuş ve frekansı ise % 1.1 olara belirtilmiştir (Okada ve ark. 2005).

Khalil ve arkadaşları 2005 yılındaki çalışmalarında Crohn's sendromu olan hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada iki nadir TPMT varyantını belirlediklerini söylemişlerdir. Yapılan bu çalışmada bir Kafkas hastanın TPMT geninde pozisyon 365'te A>C değişimi (TPMT\*19, Lizin amino asidi yerine Tironin amino asidi oluşmaktadır) ve bir Fas'lı hastanın TPMT geninde ise pozisyon 488'de G>A değişimi (TPMT\*16, Arjinin amino asidi yerine Histidin amino asidi oluşmaktadır) tespit edildiği bildirilmiştir. Yapılan aktivite araştırmasının sonucunda TPMT\*19 mutasyonunun aktivitede önemli bir değişikliğe neden olmadığı belirtilirken, TPMT\*16 mutasyonunun enzim aktivitesini 3 kat kadar düşürdüğü saptandığı söylenmiştir (Khalil ve ark. 2005).

Gardiner ve arkadaşları 2005 yılında yaptıkları çalışmada TPMT eksikliği ve azatiopürine bağlı yan etkiler arasındaki ilişkiyle alakalı 2 vaka incelemesi yapmışlardır. Birinci vaka günde 100 mg azatiopürin alan ve kendisinde pansitopeni gelişen bir hastayla ilgilidir. Bu hastada pansitopeniyi ortadan kaldıran uygulamalar yapıldıktan sonra tekrar günde 100 mg azatiopürin verilince pansitopeninin tekrar gözlemlendiği bildirilmiştir ve bunun TPMT eksikliği ile alakalı olabileceği düşünülerek hasta üzerinde TPMT fenotip ve genotip analizleri yapılmıştır. Radyokimyasal yöntem ile aktivite tayini, multipleks ARMS yöntemi ile de genotipe bakıldığı söylenmiş ve bu analizler sonucu hastada düşük enzim aktivitesi ve homozigot TPMT\*3A mutasyonu olduğu belirlenmiştir.

İkinci vakada ise ülseratif kolit hastası olan bir kişiye günde 50 mg azatiopürin uygulaması başlandığında hastaya TPMT aktivite ve genotip analizi yapılmıştır. Analizler sonucu hastada düşük aktivite ve homozigot TPMT\*3 mutant alleli saptandığı bildirilmiştir. Bu analizlerin 4 gün sürdüğü, hastanın toplam 200 mg azatiopürin aldığı ve analiz sonucu belirlenen mutant allel ve bunun neden olduğu düşük aktivite nedeniyle kemik iliği baskılanması ihtimali yüksek olduğu için hastaya azatiopürin verilmesinin durdurulduğu bildirilmiştir (Gardiner ve ark. 2005).

Stocco ve arkadaşları 2005 yılındaki çalışmalarında TPMT enziminin tiopürinleri metilasyon yoluyla metabolize eden bir enzim olduğunu ve tiopürinlerin inflammatuar bağırsak hastalığı tedavisinde kullanıldığını söylemişlerdir. Bu bağlamda, Stocco ve arkadaşları pediatrik inflammatuar bağırsak hastalığında tiopürin kullanımı ve TPMT genotiplerinin araştırıldığı bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada TPMT enzim aktivitesi HPLC ile, TPMT genotipleri (TPMT\*2, \*3A, \*3B ve \*3C) ise PCR tabanlı analizlerle belirlenmiştir. Analizler 70 hasta üzerinde yapılmış ve sonuç olarak 70 kişiden 5 tanesinde heterozigot TPMT mutant alleleline ( 4 adet \*3A ve 1 adet \*2) rastlandığı belirtilmiştir. Bu 70 kişiden 19 tanesinde azatiopürine bağlı yan etkiler (kemik iliği baskılanması, hepatotoksisite, pankreatik toksisite vb.) görüldüğü, kemik iliği toksisitesi ve hepatotoksisite görülen 6 kişide sorunun azatiopürin dozajının

azaltılmasıyla çözüldüğü, diğer yan etkilerin ise azatiopürin verilmesinin kesilmesi ile ortadan kaldırıldığı rapor edilmiştir (Stocco ve ark. 2005).

Sayitoğlu ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada Türk popülasyonunda TPMT mutant allellerini (TPMT \*2, \*3A, \*3B ve \*3C) belirlemek için bir çalışma yapmışlardır ve çalışmalarında yöntem olarak allel spesifik PCR, PCR-RFLP ve direkt dizileme yöntemlerini kullanmışlardır. Hastalardan kanlar toplanıp genomik DNA saflaştırmaları proteinaz K/ salting out yöntemi ile yapılmıştır. Mutasyon belirlemek için yukarıda sayılan yöntemler kullanılmış ve sonuç olarak mutant allel frekansları sırasıyla TPMT\*2 % 2.0, TPMT\*3A %1.0, TPMT\*3C % 1,4 ve TPMT\*3B % 0 olarak bulunmuştur (Sayitoğlu ve ark. 2006).

Davison ve arkadaşları 2006 yılındaki çalışmalarında akut lenfoblastik lösemili (ALL) hastalarda LightCycler PCR cihazı ile TPMT mutant allellerini belirlemeye çalışmışlardır. Bu cihazın genotiplemede hızlı bir sistem olduğu söylenmiştir. Bu sistem ilke olarak ‘‘anchor ve sensor’’ olarak bilinen iki adet bitişik (yada çok yakın) hibridizasyon probu arasındaki floresans rezonans enerji transferi (FRET)’ne dayanmaktadır

Yapılan çalışmada 55 ALL hastasından kan örnekleri alınıp DNA’ları saflaştırma kitleri kullanılarak saflaştırılmıştır. Genotiplemede kullanılan LightCycler PCR için uygun oligonükleotid primerleri ve hibridizasyon problemleri kitler vasıtasıyla kullanılmıştır. LightCycler cihazında uygun ayarlamalar yapıp mutant allellerin belirlenebilmesi için ekzon 5, 7 ve 10 için amplifikasyonlar yapıp işlem sonucunda her ekzona yönelik melting curve analizleri yapılmıştır. ALL hastaları üzerinde yapılan bu araştırma sonucunda; 55 ALL hastasından hiçbirinde TPMT\*2, \*3B ve\*3C mutantlarına rastlanmazken, hastaların % 94.5’nin wild-tip allele, %5.5’nin ise heterozigot TPMT\*3A mutant alleleline sahip olduğu görülmüştür.

Chrzanowska ve arkadaşları 2006 yılındaki çalışmada diyaliz hastalarında TPMT fenotip-genotip korelasyonunu araştırmışlardır. Yapılan araştırmada fenotip HPLC, genotipler (TPMT \*2, TPMT\*3A ve \*3C) ise allel-spesifik PCR ve PCR-RFLP

teknikleri ile belirlenmiştir. Yapılan araştırmada hastalarda % 88.5'lik frekansla homozigot TPMT\*1/\*1, yaklaşık % 11.5'lik frekansla heterozigot TPMT\*3A (%10.3) ve TPMT\*3 (% 1.1) mutant allelleri belirlenmiştir. Yapılan bu fenotip-genotip belirleme işlemlerinde ise TPMT fenotip ve genotipi arasında önemli bir korelasyon olduğu vurgulanmıştır (Chrzanowska ve ark. 2006).

Nasedkina ve arkadaşları 2006 yılındaki çalışmada TPMT enzim eksikliğine neden olan yaygın TPMT allelleri belirlemek için DNA-mikroçip tekniğini kullandıklarını belirtmişlerdir. Bu çalışmada lenfoproliferatif hastalığı olan 280 hasta ve 420 adet sağlık gönüllü örnekten alınan DNA örnekleri üzerinde çalışıldığı rapor edilmiştir. Uygulanan teknik ise şu şekildedir: İlk olarak kit yardımıyla DNA'lar saflaştırılmıştır. Daha sonra hedef DNA iki aşamalı multipleks PCR ile hazırlanmıştır ve bu arada işlemlerde kullanılacak DNA oligonükleotid problemleri hazırlanmıştır. Bu aşamadan sonra biyoçip photo-induce copolymerization yöntemiyle hazırlanmıştır. Bunun ardından TPMT mutasyonlarını belirleyecek TPMT biyoçipi hazırlanmıştır. Bu TPMT biyoçipi 6 adet kolon içerisinde her biri olası tek nükleotid değişimlerini algılayabilen 12 adet oligonükleotid prob içermektedir ve bu biyoçipin katalitik aktivite eksikliğine neden olan altı adet mutasyonu (G238C, G292T, G460A, G466A, T681G ve A719G) ve 7 mutant alleli (TPMT\*2, \*3A, \*3B, \*3C, \*3D, \*7 ve \*8) tespit edebildiği belirtilmiştir. Daha sonra hibridizasyon yapılmıştır ve analizler sırasındaki floresan görünümüleri CCD kamera ile donatılmış çip analizörü ve dataların işlenmesi için ise Imageware v1.1 programı kullanılmıştır. Araştırma sonucunda 700 örnekten 656'sında (% 93.7) TPMT\*1/\*1 wild-tip allel, 37'sinde TPMT\*1/\*3A (% 5.3), 5'inde TPMT\*1/\*3C (% 0.7) ve 2'sinde ise TPMT\*1/\*2 (% 0.3) mutant alleli tespit edildiği söylenmiştir (Nasedkina ve ark. 2006).

Bloomfeld ve arkadaşları 2006 yılındaki çalışmalarında TPMT enziminin genetik polimorfizimlerinin inflamatuvar bağırsak hastalığı olan kişilerdeki azatiopürin ve 6-merkaptopürin metabolizmasını etkilediğini söylemişlerdir. Yaptıkları çalışmada TPMT enzim aktivitesi ile 6-tioguanin nükleotidleri (6-TGN) ve 6-metil merkaptopürin nükleotidlerinin (6-MMPN) seviyeleri arasında zıt bir korelasyon olduğunu belirtmişlerdir (Bloomfeld ve ark. 2006).

Zhou 2006 yılında yaptığı çalışmada TPMT aktivitesini nongenetik faktörlerinde etkileyebileceğini söylemiş ve özellikle kırmızı kan hücresi transfüzyonu yapılmış kişilerde TPMT aktivitesinin değişeceğini ve değerlendirme yapılırken buna dikkat edilmesi gerektiğini belirtmiştir. Ayrıca tiopürin ilaçlarının bir enzimatik yol ile tioguanin nükleotidlerine (TNG) dönüştüğünü ve bu TNG'lerin DNA ve RNA'nın yapısına katıldığını söylemiştir (Zhou 2006).

Zhang ve arkadaşları 2006 yılında yaptıkları çalışmada TPMT polimorfizimlerinin Çin popülasyonundaki farklı etnik gruplar (Han, Jing, Yang ve Uygur Çinli'si) arasındaki farklılıklarını araştırmışlardır. TPMT aktivitesini yüksek performans likit kromatografi (HPLC) yöntemi ile belirlemişlerdir. TPMT genotiplerinin belirlenmesinde yaygın mutant alleller olan TPMT\*2, \*3A\*, \*3B ve \*3C'ye bakılmıştır. Genomik DNA'lar kişilerden fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi ile saflaştırılmış olup mutant allellerin belirlenmesinde TPMT\*2 için allel spesifik PCR, diğer mutant alleller için ise PCR-RFLP yöntemi kullanılmış ve yöntemde mutantları belirlemeye yönelik uygun primerler ve restriksiyon enzimleri kullanılmıştır. Araştırma sonucunda TPMT\*3C allelik frekansı Han ırkında % 2.2, Jing ırkında ise % 1.9 olarak bulunurken diğer mutant allellere Han ve Jing ırklarında rastlanmamıştır. Uygur Çinli'lerinde TPMT\*3C allelik frekansı % 3.7, TPMT\*3A ise % 0.3 olarak bulunmuş olup TPMT\*2 ve \*3B mutantlarına rastlanmamıştır. Yao ırkında ise yaygın mutant allellerden hiçbirine rastlanmamıştır (Zhang ve ark. 2006).

Yong ve arkadaşları 2006 yılındaki çalışmalarında TPMT enziminin metilleyici bir enzim olduğunu, enzimin substratlarının 6-merkaptopürin, 6-tioguanin ve azatiopürin olduğunu ve 6-merkaptopürinin ALL (akut lenfoblastik lösemi) tedavisinde kullanıldığını söylemişlerdir. TPMT genindeki polimorfizimlerin 6-merkaptopürin toksisitesi ve terapötik etki ile ilişkili olduğunu vurgulamışlardır. TPMT eksikliği olan hastaların, yaşamı tehlikeye sokan toksisiteden kaçınmak için doz azaltımına ihtiyacı olduğunu söylemişlerdir. RBC'de (red blood cell) TPMT'nin geleneksel değerlendirme yollarının bazı sınırlamalara sahip olduğunu belirtmişler ve bunları şöyle sıralamışlardır.

1. Test sonuçları kan transfüzyonu yapıldıktan sonraki 60 gün içerisinde güvenilir olmayabilir.
2. Bu geleneksel yöntemler zaman alıcıdır.
3. Kişilerde, özellikle heterozigot bireylerde tiopürin verilmesi yaklaşık % 20 oranında enzim aktivitesini artırabilir (Yong ve ark. 2006).

Schaeffeler ve arkadaşları 2006 yılındaki çalışmalarında azalmış enzim aktivitesi ile ilgili yeni mutant allel varlığını araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmada genomik DNA'ları lökositlerden saflaştırma kitleri yardımıyla saflaştırmışlar ve ilk adım olarak TPMT genindeki 5, 7 ve 10'uncu ekzonlar PCR yardımıyla amplifiye edilmiş ve alleller ( TPMT\*2, \*3A, \*3B, \*3C ve \*3D) denatüre yüksek performans likit kromatografi ( DHPLC) yöntemi ile belirlenmiştir. Daha sonra tüm TPMT açık okuma çerçeveleri ( ORF'ler) genomik DNA'dan PCR ile amplifiye edilmiş, saflaştırılmış ve uygun primerler kullanılarak dizilime işlemine tabi tutulmuştur. Yapılan işlemler sonucunda 4'üncü ekzonda kodon 69'da C205G mutasyonu ile Lösin - Valin değişimine neden olan TPMT\*21, 7'nci ekzonda kodon 163'te G488C mutasyonu ile Arjinin - Prolin değişimine neden olan TPMT\*22 ve son olarak ta 10'uncu ekzonda kodon 238'de A712G mutasyonu ile Lizin - Glutamik asit değişimine neden olan TPMT\*20 mutant allelleri bulunmuştur. Bu üç mutant allellin (TPMT\*20, \*21 ve \*22) orta düzeyli enzim aktivitesine neden olduğu belirtilmiştir (Schaeffeler ve ark. 2006).

Boyunegmez ve arkadaşları 2007 yılında yaptıkları çalışmada Türk populasyonunda akut lenfoblastik lösemili (ALL) 212 kişi arasında TPMT mutant allelleri belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada TPMT\*2 mutasyonunu belirlemek için allel-spesifik PCR yöntemini, TPMT\*3A, \*3B ve \*3C mutant allelleri belirlemek için ise PCR-RFLP yöntemlerini kullanmışlardır. 212 ALL hastası pediatrik vaka üzerinde yapılan araştırmanın sonucunda TPMT\*2 ve \*3B mutantlarına rastlanmazken, TPMT\*3C allelik frekansı % 0.9 ve TPMT\*3A allelik frekansı % 0.9 olarak bulunmuş ve hastaların % 98.2'nin wild-tip allele (TPMT\*1) sahip olduğu ortaya çıkmıştır (Boyunegmez ve ark. 2007).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

Payne ve arkadaşları 2007 yılındaki çalışmalarında Azatiopürinin 40 yıla yakın bir süredir uygun bir immünoşüpresif ajan olarak kullanıldığını ve 2004 yılında İngiltere’de azatiopürinin hastalara reçete edilme sayısının yaklaşık 0,6 milyon olduğunu söylemişler ve buna ek olarak TPMT enzim testlerinin rutin olarak yapılmaya başlanmasıyla birlikte İngiltere’de azatiopürinin reçete edilmesindeki sayının önemli ölçüde değiştiğini söylemişlerdir. TPMT ile ilgili testler için British Society of Rheumatology, British Association of Dermatologists gibi kuruluşların azatiopürin uygulaması yapılmadan önce TPMT testlerinin yapılmasının iyi olacağını bildirdikleri belirtilmiştir. Bunlara ek olarak TPMT fenotip ve genotiplerinin belirlenmesinin TPMT enzim düzeyi ve ilaç kullanımına bağlı olarak oluşabilecek olası nötropeni riskini değerlendirmede kullanılabileceği söylenmiştir. Ayrıca genotiplenimin tüm varyantları belirleyemeyeceği, genotip ve fenotip belirlemenin benzer maliyetlere sahip olduğu, bilinen TPMT gen varyantlarının fenotiple karşılaştırılıp değerlendirilmesi yapıldığında fenotip ve genotip arasında % 98.4’lük bir uyum olduğu ve bu bilgiler ışığında TPMT fenotip ve genotipinin komplementer bir yapı oluşturduğuna vurgu yapılmıştır (Payne ve ark. 2007).

Katsanos ve Tsianos 2007 yılında yaptıkları çalışmada TPMT genindeki tek nükleotid polimorfizimlerinin dünya genelinde birçok yerde tanımlandığını, popülasyonlardaki kişilerde % 90- 95 oranında mutant allele rastlanmadığını ve % 5- 10 oranında ise bir yada daha fazla yaygın mutant allelin var olduğunu söylemişlerdir. Bazı hastalıkların tedavisinde kullanılan AZA ve 6-MP’nin metabolize edilmesinde TPMT’nin rolü olduğunu belirtmiş ve AZA ve 6-MP’nin ise hastalarda bazı yan etkiler meydana getirdiğini söylemişlerdir. Bu yan etkilerin hastaların % 5-25’inde görüldüğünü ve 2 tip olduğunu, bu etkilerin birincisinin alerjik ve dozdan bağımsız olduğunu ve pankreatit, ateş, cilt tahrişi, sindirim toleranssızlığı ve hepatotksisite şeklinde ortaya çıktığını, ikincisinin ise alerjik olmayan ve doza bağımlı olduğunu ve kemik iliği toksisitesi, enfeksiyonlar ve malignansi şeklinde ortaya çıktığını belirtmişlerdir (Katsanos ve Tsianos 2007).

Tamori ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları çalışmada otoimmün karaciğer hastalıkları olan Japon hastalar üzerinde TPMT gen polimorfizimlerini ve TPMT enzim

durumuna göre azatiopürine bağlı yan etkilerin değerlendirilmesine yönelik bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada 49 adet AIH'li (Autoimmune Hepatits), 67 adet PBC'li (Primary Biliary Cirrhosis) ve 120 adet HCV'li (Hepatits C Virus) hasta üzerinde araştırma yapıldığını bildirilmiştir. Hastalarda mutasyon belirleme yöntemi olarak PCR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Analizler sonucunda AIH hastalarının % 90'ının TPMT\*1/\*1, % 8'inin TPMT\*1/\*3C ve % 2'sinin ise TPMT\*3C/\*3C mutant alleleline, PBC hastalarının % 94'ünün TPMT\*1/\*1, % 4.5'inin TPMT\*1/\*3C ve % 1.5'inin TPMT\*3C/\*3C mutant alleleline ve HCV hastalarından sadece bir tanesinin ise TPMT\*3C mutant alleleline sahip olduğu belirlenmiştir. Ayrıca içlerinden bir tanesinin homozigot TPMT\*3C mutant alleleline sahip olduğu tespit edilen ve azatiopürin alan 9 AIH hastasından 2 tanesinde ise şiddetli kemik iliği baskılanması görüldüğü bildirilmiştir. Tüm araştırmalar ışığında Tamori ve arkadaşları AIH ve PBC hastalarında en sık rastlanan mutant allelin TPMT\*3C olduğuna ve hastalara azatiopürin uygulanmaya başlanmadan önce TPMT polimorfizimlerinin belirlenmesinin TPMT eksikliği olan hastalarda oluşabilecek ciddi hematotoksik sorunları önlemede yardımcı olabileceği kanısına varıldığına vurgu yapılmıştır (Tamori ve ark. 2007).

Dooley ve arkadaşları 2008 yılındaki çalışmalarında tiopürinlerin metabolize edilmesinde 3 majör enzimin görev yaptığını, bunlardan TPMT ve ksantin oksidaz (XO)'nun tiopürinleri inaktif metabolitlere, hipoksantin fosforiboziltranseferaz (HGPRT)'in ise tiopürinleri, aktif metabolitler olan 6-tioguanin metabolitlerine (6-TGN) dönüştürdüğünü ve 6-TGN'lerin DNA yapısına katılarak terapötik etki gösterdiklerini söylemişlerdir. Buna ek olarak TPMT eksikliği olan kişilerde bu eksikliğe bağlı olarak 6-TGN birikimi olduğunu söylemişler ve çok yüksek enzim aktivitesine sahip kişilerde 6-TGN konsantrasyonunun normal seviyelerin altına düşebileceği ve buna bağlı olarak ta tedavinin başarısız olabileceği vurgulanmıştır. Dooley ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tiopürin alan hastalarda TPMT fenotiplerinin belirlenmesi ile ilgili bir araştırma yapmışlardır. Yapılan bu araştırma, değişik hastalık gruplarından olan 287 tiopürin alan hastadan 21'inde (% 8.8) aktivite ölçümü yoluyla TPMT fenotipleri belirlenmiştir. Bu 21 hastanın hiç birinde çok düşük aktivite seviyesi belirlenmezken % 24'ünde düşük aktivite, % 71'inde normal aktivite ve % 5'inde ise çok yüksek aktivite seviyesi belirlenmiştir (Dooley ve ark. 2008).

Schwab ve arkadaşları 2008 yılında MALDI-TOF kütle spektrometresi yöntemiyle farklı etnik gruplarda (Gana ve Kore populasyonları) TPMT varyantlarının belirlenmesine yönelik bir çalışma yapmışlardır. Bu çalışmada mutipleks PCR yönteminden oluşan 2 adet İPLEX, bir adet 16-plex ve bir adet 7-plex, karides alkalın fosfataz ile genomik DNA'ların parçalara ayrılması, primerle genişletme ve TPMT\*2 den \*23 e kadar olan varyantların belirlenmesine olanak sağlayan MALDI-T OF MS analizi yöntem olarak kullanılmıştır. Yapılan çalışma sonucunda 116 Ganalı ve 118 Koreli içinde en yaygın varyant TPMT\*3C olarak belirlenmiş ve frekansları sırasıyla % 6.5 ve % 2.5 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte Gana ırkında 8 adet TPMT\*8'in (A539T) heterozigot taşıyıcısı ve Kore ırkında ise 3 adet TPMT\*6'nın ( G644A) heterozigot taşıyıcısı tespit edilmiş ve bu varyantlardan TPMT\*6'nın ekzon 8, TPMT\*8'in ise ekzon 10 da olduğu belirlenmiştir (Schwab ve ark. 2008).

Slanar ve arkadaşları 2008 yılındaki çalışmalarında Çek Cumhuriyeti'nde 300 sağlık gönüllü ve 396 IBD (inflammatory bowel disease) hastası üzerinde TPMT polimorfizimlerini araştırmışlardır. Bu araştırmada TPMT\*2, \*3A ve \*3B mutantlarına bakıldığı söylenmiştir. Araştırma için bireylerden periferal kan örnekleri alınmış ve DNA'lar standart fenol/kloroform yöntemi ile saflaştırılmıştır. PCR amplifikasyonları uygun primerler kullanılarak MyCycler cihazında yapılmıştır. Daha sonra mutasyon teşhisi için TPMT\*3A ve \*3B için RFLP ve TPMT\*2 için allel spesifik PCR yapılmış ve oluşan fragmentler % 3'lük agaroz jelde ayrıştırılmış ve görünürlük sağlamak için ise etidium bromid kullanıldığı belirtilmiştir. Araştırma sonucunda sağlıklı kişilerde varyant allel frekansı % 5.33 iken, IBD'li hastalarda ise % 4.93 olarak bulunduğu bildirilmiştir. Ayrıca bulunan bu varyant alleller içerisinde en sık görülenin ise TPMT\*3A olduğu rapor edilmiştir (Slanar ve ark. 2008).

Boonsrirat ve arkadaşları 2008 yılındaki çalışmalarında Tayland'da TPMT\*3C mutant alleli taşıyan 10 yaşında bir kız çocuğu ile ilgili bir vakayı rapor etmişlerdir. Bu çocuğun SLE hastası olduğu bildirilmiştir. Hastaya normal SLE tedavisinde kullanılan ilaçların ardın AZA terapisi yapılmaya başlanmıştır. Hastaya AZA verildikten 2 hafta içinde hastada abdominal ağrı, pnömoni ve septik şok görülmüş ve bununla ilgili

araştırmalar yapılmıştır. Hastanın TPMT seviyesi HPLC yöntemi ile belirlenirken, TPMT mutasyon varlığı ise Real Time PCR kullanılarak belirlenmiştir. Analizler sonucu hastada orta dereceli enzim aktivitesi ve genotip olarakta heterozigot TPMT\*1/\*3C mutant alleli tespit edildiği söylenmiştir. AZA verilmesinin üzerinden geçen birkaç haftalık süre içerisinde başka yan etkilerde ortaya çıkmıştır ki bunların miyelosüpresyon ve immünosüpresyon olduğu belirtilmiş ve hastanın meydana gelen bu yan etkilerle bağlantılı olarak *Acinetobacter baumannii* septisemisi sonucu öldüğü rapor edilmiştir. Bu vaka ve yapılan tetkikler sonucu AZA kullanılmadan önce hastanın TPMT fenotip ve genotipine bakılmasının oluşabilecek yan etkilerden kaçınmada yardımcı olacağı hususuna vurgu yapılmıştır (Boonsrirat ve ark. 2008).

Ban ve arkadaşları 2008 yılındaki araştırmalarında inflamatuvar bağırsak hastalığı olan Japon hastalarda TPMT genotip analizi çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada 41 sağlıklı gönüllü ve 70 IBD'li (Inflammatory Bowel Disease) hasta kullanılmıştır. Mononklear hücreler bireylerden Ficoll dansite gradienti kullanılarak heparinize kandan elde edilirken, DNA'lar ise saflaştırma kiti kullanılarak elde edilmiştir. TPMT genotipleri ise PCR-RFLP yöntemi ile belirlenmiştir. Burada kullanılan PCR primerleri ve PCR protokolü Yates ve arkadaşlarının uyguladığı Şekilde yapılmıştır. Araştırmada sonuç olarak sağlıklı gönüllerin bir tanesinde heterozigot TPMT\*1/\*3C görülürken diğer sağlıklı gönüllüler ve 70 IBD hastasında mutant allellere rastlanmamıştır. Belirlenen TPMT\*1/\*3C heterozigot mutantının allelik frekansı ise % 0.9 (1/111) olarak hesaplanmıştır (Ban ve ark. 2008).

Shazia ve Seshadri 2009 yılındaki çalışmalarında TPMT geni üzerinde VNTR (değişik sayıdaki tekrar bölgeleri) bölgelerini farklı etnik gruplar üzerinde araştırmışlardır. Çalışmada sırasıyla DNA saflaştırılması, PCR amplifikasyonu, allellerin belirlenmesi için otomatik ALF DNA fragment analiz edicisi kullanılarak 7 molar üre içeren % 6'lık denatüre edici poliakrilamid jelde PCR rnlerin elektroforeze tabi tutulması ve istatistiksel analizler yapılmıştır. Sonuç olarak TPMT genindeki VNTR'lerin sayısal olarak 3'ten 9'a kadar olabildiği ve populyasyonlarda en çok 4 ya da 5 tekrarın görüldüğü belirlenmiştir (Shazia ve Seshadri 2009).

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

Kapoor ve arkadaşları 2009 yılında yaptıkları çalışmada TPMT gen polimorfizimlerini belirlemede SNaPshot yöntemini kullanmışlardır. Çalışmada başlangıç olarak belirli sayıda gönüllü ve hasta bireylerden kan örnekleri alınmış ve DNA'ları saflaştırma kitleri ile saflaştırılmıştır. Kemik iliğinden kit yardımıyla RNA elde edilmiş ve M-MuLv ters transkriptaz enzimi ile cDNA sentezlenmiştir. Daha sonra TPMT geninde TPMT\*2, TPMT\*3A ve TPMT\*3C mutantlarının varlığını araştırmak için bu allellerin bulunduğu TPMT genindeki bölgeler PCR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. cDNA'ların analizi için kullanılacak olan primer ve oligonükleotidler sentezlenmiştir. Genotip analizi SNaPshot Multiplex kit yardımıyla yapılmıştır. SNaPshot reaksiyon ürünleri 3730 DNA analiz cihazı yardımıyla analiz edilmiş ve dizileme işlemi yapılmıştır.

Yapılan analizlerde sonuç olarak; TPMT\*2 mutantına rastlanmazken, TPMT\*3A mutanı % 0,8 oranında ve heterozigot olarak, TPMT\*3C mutanı ise % 4,1 oranında ve heterozigot olarak bulunmuştur. Buna ek olarak hiçbir homozigot mutanta rastlanmadığı bildirilmiştir (Kapoor ve ark. 2009).

Kurzawski ve arkadaşları 2009 yılındaki araştırmalarında TPMT ve ITPA polimorfizimlerin renal transplant alıcılarında azatiopürine toleranssızlık riskini etkileyip etkilemediğini belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Bunun için azatiopürin tedavisi gören renal transplant hastaları üzerinde TPMT ve ITPA polimorfizimlerini belirlemeye çalışmışlardır. Bunu için hastalardan genomik DNA'lar elde edilmiş ve TPMT mutasyonlarının (TPMT\*2, \*3A, \*3B ve \*3C) belirlenmesi için PCR tabanlı analizler, ITPA genindeki SNP'lerin ( 94C>A – rs1127354 ve IVS2+21A>C – rs 7270101) belirlenmesi için ise *XmI* endonükleazın kullanıldığı PCR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Analizler sonucu 314 örnek üzerinde TPMT\*1 (wild-tip) allel frekansı % 93.3, TPMT\*2 allel frekansı % 0.6, TPMT\*3A allel frekansı % 4.8 ve TPMT\*3C allel frekansı ise % 0.6 olarak bulunurken, ITPA analizlerinde % 81.1 wild-tip, % 6.4 94A ve % 11.8 IVS2+21C allelik frekansları tespit edildiği bildirilmiştir.

Yapılan araştırmalar sonucu, hastalarda tespit edilen TPMT ve ITPA polimorfizimlerinin azatiopürine karşı toleranssızlığı etkilediği vurgulanmıştır (Kurzawski ve ark. 2009).

Pavloic 2009 yılındaki çalışmasında genotip analizinin TPMT enzim aktivitesinin bilinmesine çok büyük katkı sağladığını, TPMT genotipi ile fenotipi arasında % 98'den daha fazla bir uyum olduğunu ve tiopürin terapisi yapılacağı zaman TPMT genotiplerine bakılmasının gerekliliğini vurgulamıştır. Pavlovic genotip belirlemede ARMS ve PCR-RFLP tekniklerinin kullanışlı olduğunu söylerken, Kapoor ve arkadaşlarının uyguladığı SNaShot metodunun daha kolay ve hızlı olduğunu belirtmiştir (Pavloic 2009).

Efrati ve arkadaşları 2009 yaptıkları araştırmada İsrail popülasyonunda TPMT mutant allellerinin dağılımını araştırmışlardır. Araştırmalarında 881 kişiden (Yahudi, Durzi ve Müslüman) kan rneği almışlardır. Genomik DNA'ları pürifikasyon kiti ile saflaştırmışlar ve mutasyon belirlemede ise PCR-RFLP ve HRM (high-resolution melting) tekniklerini uygulamışlar ve her iki metotta metotlara özgü primerler kullanılmıştır. Bireylerde yaygın mutant alleller olan TPMT\*2, \*3A, \*3B ve \*3C allelleri taranmıştır. 881 kişi (531 Yahudi, 194 Müslüman ve 156 Dürzi) zerinde yapılan araştırma sonucunda hiçbir bireyde TPMT\*2 ve TPMT\*3B alleleline rastlanmazken, TPMT\*3A allelinin frekansı Yahudi'lerde % 0.73, Müslüman'larda % 0.79 ve Dürzi'lerde ise %3.19, TPMT\*3C allelinin frekansı Müslüman'larda % 1,5 iken Dürzi'lerde % 0.75 olarak bulunmuştur. TPMT\*3C alleleline Yahudi ırkında rastlanmamıştır (Efrati ve ark. 2009).

Azad ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları çalışmada İnan popülasyonunda yaygın TPMT polimorfizimlerini (TPMT\*2, \*3A, \*3B ve \*3C) araştırmışlardır. DNA'ları kit yardımıyla saflaştırmış ve mutasyon belirlemede ise TPMT\*2 alleli için allel-spesifik PCR yöntemi, diğer alleller için ise PCR-RFLP tekniği kullanılmıştır. Yapılan araştırma 127 kişi üzerinde yapılmıştır. Araştırma sonunda TPMT\*2 allelik frekansı % 7.08, TPMT\*3A allelik frekansı % 2.18 bulunmuşken TPMT\*3C allelik

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

---

frekansı ise % 2.47 olarak tespit edilmiştir. TPMT\*3B mutantına rastlanmamıştır (Azad ve ark. 2009).

Kham ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları bir çalışmada şiddetli atopik egzema teşhisi konmuş bir hastada azatiopürin kullanımından sonra hastada miyelosüpresyon oluştuğunu fark ettiklerini ve bu hastadan alınan kan örneği üzerinde araştırma yaparak yeni bir mutant allel olan TPMT\*26'yı bulduklarını bildirmişlerdir. Hastanın Çinli bir hasta olduğunu belirtmişler ve Çinli'lerde yaygın görülen TPMT\*3A, \*3C ve \*6 mutantlarının varlığını PCR-RFLP yöntemiyle araştırmışlardır. Fakat bu mutantlar bulunamayınca PCR-ARMS ve dizi analizi yapmışlardır. Yapılan analizler sonucu orta dereceli aktivite eksikliğine neden olan bir mutasyon bulmuşlardır. Bu mutasyon TPMT\*26 mutasyonudur. TPMT\*26'nın ekzon 9'da ve 208'inci bazda meydana gelen (Fenilalanin'in Lösin amino asidine dönüşümü) bir nokta mutasyon sonucu oluştuğunun açığa çıkarıldığı rapor edilmiştir (Kham ve ark. 2009).

Samochatova ve arkadaşları 2009 yılında Rusya Federasyonu'nda pediatrik kanserli olan 446 ve kanser olmayan 549 kişilik bir grup üzerinde TPMT mutasyonlarını araştırmışlardır. Yapılan araştırmada bireylerden tam kan örnekleri alınıp DNA'ları kit yardımı ile saflaştırılmıştır. TPMT genotip belirleme işlemi ise enzim eksikliğine neden olan 7 tane mutant alleli (TPMT\*2, \*3A, \*3B, \*3C, \*3D, \*7 ve \*8) oluşturan 6 adet tek nükleotid polimorfizimi ( G238C, G292T, G460A, G644A, T681G ve A719G) TPMT biyoçip yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Yapılan araştırmada sonuç olarak toplam 995 kişiden 55 tanesinin (% 5.5) TPMT varyant alleleline, 940 tanesinin (% 94.5) ise wild-tip allelele (TPMT\*1/\*1) sahip olduğu bildirilmiştir. Mutant allellerin tespit edildiği kişi sayısı ve frekansları ise; TPMT\*1/\*3A (n=45: % 4.5), TPMT\*1/\*3C (n=8: % 0.8) ve TPMT\*1/\*2 (n= 2: % 0.2) olarak bildirilmiş ve bunlar dışındaki diğer mutant allellere rastlanmadığı söylenmiştir (Samochatova ve ark. 2009).

Ford ve Berg 2010 yılındaki makalelerinde TPMT enziminin tiopürin ilaçlarını metabolize eden bir enzim olduğunu ve bu enzimin eksikliğinde tiopürin ilaçlarının TGN'lere dönüşümünün ve bu bağlamda hücrelerde TGN birikiminin arttığını

söylemişlerdir. Populasyonlarda TPMT enzim eksikliğinin trimodal dağılım gösterdiği ve bu trimodal dağılımın TPMT genindeki polimorfizimlerin bir sonucu olduğunu vurgulamışlardır. Ford ve Berg bugüne kadar 29 farklı TPMT varyant allelinin tespit edildiğini söylemiş ve bu varyantları belirlemede restriksiyon işlemi, SSCP ( single strand conformational polimorphism), ARMS (amplication refoactory mutation system), denaturing HPLC, pyrosequencing ve LightCycler cihazında kullanılan TPMT LC PCR kitlerinin kullanıla bilineceğini belirtmişlerdir (Ford ve Berg 2010).

Bahari ve arkadaşları 2010 yılındaki araştırmalarında Güneydoğu İran populasyonunda 832 kişi üzerinde yaygın TPMT mutasyonlarını (TPMT\*2, \*3A, \*3B ve \*3C) belirlemek için bir çalışma yapmışlardır. Yapılan çalışmada genotip belirlemek için multipleks allel-spesifik PCR yöntemini kullandıklarını belirtmişlerdir. Gerçekleştirilen analizler sonucu TPMT genotip dağılım oranlarını; TPMT\*1/\*1 % 87.98, TPMT\*1/\*2 % 4.33, TPMT\*1/\*3A % 3.36, TPMT\*1/\*3B % 3.24 ve TPMT\*/\*3C % 1.08 olarak bulduklarını bildirmişlerdir (Bahari ve ark. 2010).

## 3. MATERYAL VE METOD

### 3.1. Kan Örneklerin Elde Edilmesi

Yapılan çalışmada TPMT enzim eksikliğine neden olan TPMT\*2, TPMT\*3B ve TPMT\*3C nokta mutasyonlarının varlığının tespiti için, Dicle Üniversitesi Hematoloji Kliniği'ne gelen hastalardan rızaları alınarak 96 adet tam kan örneği her hastadan 2 ml olmak üzere toplanmıştır.

### 3.2. Kan Örneklerinin Saklanması

Hastalardan toplanan tam kan örnekleri EDTA'lı tüplerde (BD Vacutainer®) +4 °C de beklemede tutulmuştur.

### 3.3. Kan Örneklerinden DNA'ların Saflaştırılması ve DNA'ların Saklanması

Hastalardan alınan tam kan örneklerinden DNA'lar Roche MagNA Pure Compact DNA saflaştırma cihazı ve bu cihazla uyumlu Roche MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I adlı saflaştırma kiti yardımı ile üretici firma talimatlarına uygun olarak saflaştırılmıştır. Saflaştırma kitinin özellikleri ve yapılan işlemler şöyledir;

Her bir DNA saflaştırma kiti bir kerede 8 tam kan örneğinden DNA saflaştırabilme özelliğindedir ve 8 örnekten saflaştırma işini takriben 25-26 dakika içerisinde gerçekleştirmektedir. Set halinde alınan üründe toplam 32 izolasyonluk kit bulunmaktadır. Toplanan tam kan örneklerinden 200 µl alındı. Kan saflaştırma kitine ve kit te cihaza yerleştirilip saflaştırma işlemi başlatıldı ve bu işlem 96 tam kan örneği bitene kadar yapıldı. Her tam kan örneğinden 100 µl saf DNA elde edildi. Saflaştırma işlemi bitip tüm DNA'lar saf halde elde edildikten sonra, elde edilen DNA'lar Real Time PCR işlemleri yapılmaya kadar -20 °C de bekletildi. Saflaştırmada kullanılan kitin kimyasal ve diğer yapısal özellikleri (Çizelge 3.1) deki gibidir.

**Çizelge 3.1.** ROCHE MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I içeriği

Reagent Cartridge	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 32 sealed cartridge</li> <li>- contains reagents sufficient for one isolation run ( well 1: proteinase K, well 2: Lysis Buffer, well 3: MGPs, well 4,5: Wash Buffer 1, well 6: Wash Buffer 2, well 7: Wash Buffer 3, well 8: Elution Buffer</li> </ul>
Tip Tray	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 32 disposable Tip Trays</li> <li>- contains Reaction Tips (2 large and 1 small) and Piercing Tool</li> </ul>
Sample Tube	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 32 tubes, 2.0 ml</li> <li>- to be placed into the Tube Rack of MagNA Pure Compact Instrument</li> </ul>
Elution Tube	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 32 barcoded tubes, 2.0 ml</li> <li>- to be placed into the Elution Tube Rack of MagNA Pure Compact Instrument</li> </ul>
Elution Tube Cap	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 35 tube caps</li> <li>- to seal the Elution Tubes</li> </ul>

#### 3.4. Real Time PCR ve Mutasyon Kitleri İle TPMT\*2, TPMT\*3B ve TPMT\*3C Mutasyonlarının Tespiti

Yapılan çalışmada LightCycler® 480 II Real Time PCR (ROCHE DIAGNOSTIC) ve LightSNiP TPMT mutasyon kitleri (TIB MOLBIOL) kullanılmıştır. Bu cihaz ve kitin kullanımdan önce Real Time PCR yönteminden bahsetmek yerinde olacaktır.

##### 3.4.1. Real Time PCR Nedir?

“Real Time” demek, reaksiyon boyunca veri toplanması ve analizin aynı anda devam etmesi demektir. Real Time PCR’da amplifikasyon ve analiz aynı anda yapılır. DNA boyaları ya da floresan probalar gibi analiz için gerekli olan reaktifler PCR karışımına amplifikasyondan önce eklenir. Veriler, amplifikasyon süresince aynı tüp içinden ve aynı cihaz ile toplanır. Örnek transferi, reaktif eklenmesi ve jel ayrımı yoktur. Çünkü kapalı sistemden örneğin çıkarılmasına ihtiyaç yoktur, takip eden reaksiyonlarda ürünün kontamine olma riski büyük ölçüde azaltılmıştır (Persing ve ark. 2006)

Bugün Real Time PCR birçok alanda kullanılmaktadır. Bu alanları şöyle özetleyebiliriz;

- ° Gen ekspresyonunun kantitasyonu
- ° Viral kantitasyon
- ° Patojenlerin tespiti
- ° DNA hasar tespiti
- ° Metilasyon tespiti
- ° KİT sonrası kimerizmin izlenmesi
- ° KİT sonrası MRD izlenmesi
- ° Genotipleme – melting curve- analizi
- ° Anne kanından izole edilen tek hücrede prenatal tanı
- ° Hemoglobinopatilerin prenatal tanısı (Sayitoğlu).

Real Time PCR floresan okuma yapmaktadır. Okunan bu floresanlık primer ya da probun taşıdığı floresan madde sayesinde çeşitli dalga boylarında meydana yreaksiyon sırasında PCR ürününün miktarı ile oluşan floresan sinyal arasında bir ilişki kurar (Herrmann ve ark. 2006). Florometrik PCR reaksiyonlarının belirlenmesi ve değerlendirilmesinde birkaç farklı metod vardır. Bunlardan en yaygın olanları şunlardır;

1. Sequences-Independent Detection Assays ( Dizi bağımsız belirleme)

Bu işlem dizi gözetilmeksizin tüm çift zincirli DNA moleküllerine bağlanan flouroforlara dayanır.

- SYBY Green I
- Etidyum Bromid

2. Sequence-Specific Prob Binding Assays ( Dizi spesifik prob bağlama)

Bu işlem sadece belirli DNA ürünlerini belirleyen dizi-spesifik oligonükleotid hibridizasyon problemlerinde oluşan flourofor çiftlerine dayanır.

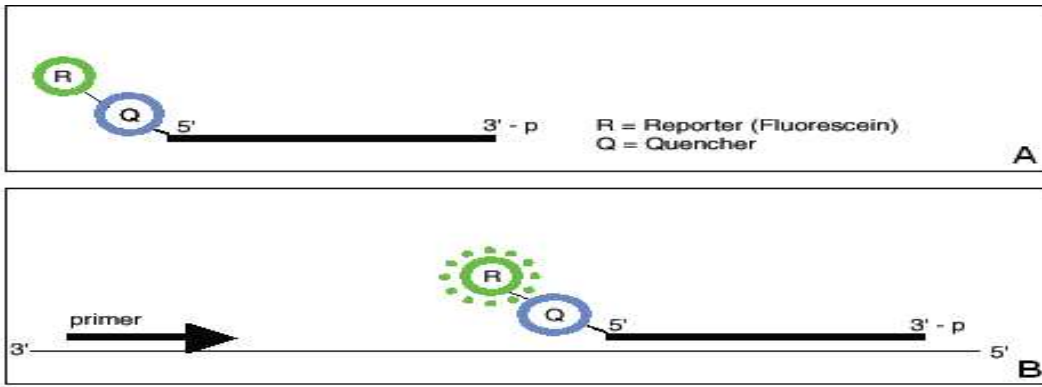
- Single Labeled probes ( Tek işaretli problemler) (SimpleProbe format)
- Hybridization probes (Hibridizasyon problemleri) (HybProbe format)
- Hydrolysis probes (Hidroliz problemleri) (‘‘TaqMan’’ format) (Wittwer ve ark.

2001)

Piyasada farklı firmaların üretmiş oldukları çeşitli Real Time PCR cihazları bulunmaktadır. Örneğin ABI, Biorad, LightCycler v.b gibi. Yapılan bu mutasyon analizi çalışmasında sıcak hava akımıyla ısınan kapalı bir sistem olan LightCycler® 480 II (ROCHE Diagnostic) cihazı kullanılmıştır. Bu cihaz aynı anda 96 örneğin analizini yapabilme özelliğine sahiptir. Ayrıca mutasyon kiti olarak LightSNip TPMT mutasyon kitleri (TIB MOLBIOL) kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada kullanılan kit içerisindeki probun türü yukarıda bahsedilen dizi-spesifik simple probdur (Single –Labeled Probe). Bir single-labeled probu, mutasyon ve SNP’lerin varlığını belirleyebilen özelleştirilmiş hibridizasyon prob tipidir. Simple Prob formatı sadece bir adet flourofor ile işaretlenmiş bir adet hibridizasyon probu içerir. Tipik olarak böyle bir prob SNP içeren hedef bir diziyi hibridize etmek için tasarlanmıştır. DNA denature olup tek zincir haline geldiğinde prob mutasyonun olduğu hedef bölgeye gelerek bağlanır. Probun 5' ucunda reporter(R) ve quencher(Q) birbirine bağlı olarak durmaktadır ve kaydadeğer bir

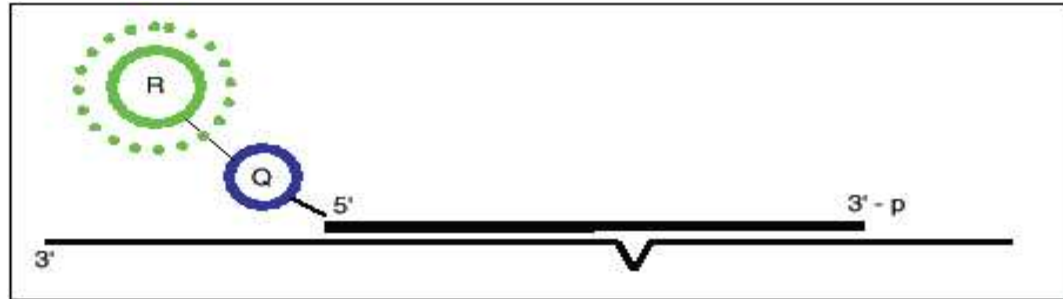
floresans yaymamaktadır. Prob bağlanması tek zincirli DNA'da meydana gelirken aynı anda DNA polimeraz ise 5'-3' yönünde sentez işlemine devam eder. Sentez probun bağlandığı bölgeye geldiğinde DNA polimerazın 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi sayesinde probun 5' ucundaki R-Q bağı probdan kopartılır ve prob ve Reporter-Quencher serbest kalır. Bunun andan itibaren Reporter yüksek derecede floresan ışık yaymaya başlar ve bu floresanlık 530 nm(nanometre)'de Real Time PCR cihazı tarafından okunur. Bu okuma bize mutasyon olduğunu gösterir. Simple prob hedef diziyeye bir kez hibridize olduğunda bağlanma olmadan önceki duruma göre çok daha fazla floresan ışık yaymaya başlar ki bu ışımada Real Time PCR cihazında görülür (Wittwer ve ark. 2001, Roche 2009, Sohoeli ve Samiei 2005). Simple Prob formatı Şekil 3.1. , Şekil 3.2. ve Şekil 3.3. de ayrıntılı olarak gösterilmektedir.

Şekil 3.1. Simple Prob Format



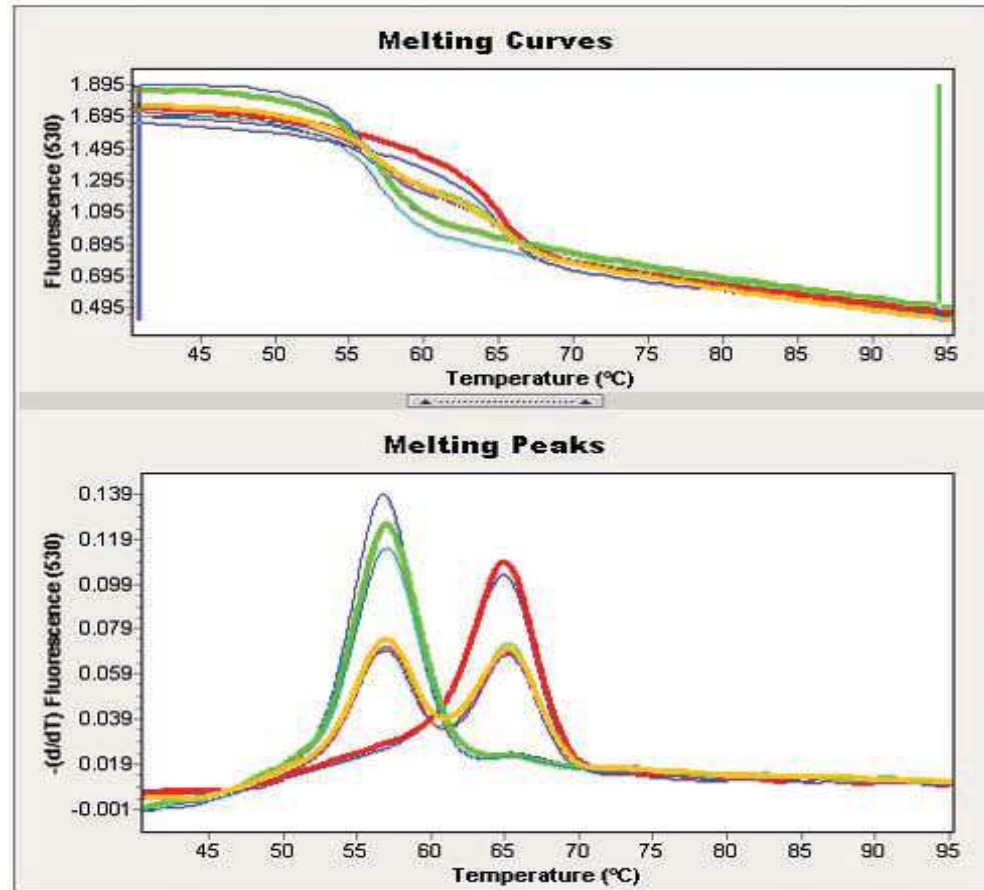
Şekil 3.1. Simple probun nasıl çalıştığını göstermektedir. Bir simple prob 3' ya da 5' ucundan işaretlidir. Bir Simple Prob solüsyon içerisinde iken reporter boyanın emisyonu, non-floresan quencher tarafından yavaşlatılır (A). Prob hedef diziyeye bağlandığında, LightCycler® cihazının yaydığı LED ışığının uyarıcı etkisiyle yeşil floresan yaymaya başlar (B) (Roche Applied Science Technical Note 2005)

Şekil 3.2. Simple Prob Format



SNP analizi için LightCycler® cihazı Simple Probun erime davranışını Görüntüler. Floresan ölçümü sayesinde, cihaz sıcaklık artışı olarak prob- Hedef hibridinin erimesini belirler. Prob ve hedef arasında ne kadar çok Hibridizasyon olursa, melting sıcaklığı o kadar belirgin olur (Roche Applied Science Technical Note 2005)

Şekil 3.3. Simple Prob Format (Melting Curve Analizi)



Üstteki şekilde her örnekte floresan sinyalin sıcaklık arttığında azaldığı görül mektedir. Çünkü sıcaklık arttıkça prob hedef bölgeden ayrılmakta ve buda flo resanı düşürmektedir. Altteki şekil ise Melting Pikleridir ki bunlar bulunan Mutasyonun wild-type, homozigot mutant ya da heterozigot mutant olduğunu anlamamızı sağlar (Roche Applied Science 2005)

Simple proplar SNP belirlenmesinde çok yeteneklidirler çünkü hızlı bir şekilde wild-type, mutant ve heterozigotluğu belirleyebilmektedirler (Lohmann ve ark. 2000, Wittwer ve ark. 2002, Fraga ve ark. 2008).

#### **3.4.2. LightCycler® 480 II Real Time PCR cihazında mutasyon analizlerinin yapılması**

##### **Aşama 1**

Real Time cihazında mutasyon analizleri yapılmaya başlanmadan önce bir ön hazırlık yapıp gerekli malzemeler ve PCR karışımı elde edilmiştir. Yapılan ön hazırlık işlemi şöyledir,

Öncelikle TPMT mutasyon kitleri içindeki primer ve prob (Reagent Mix) liyofilize olduğundan dolayı her kitin vialine 100µl PCR-grade water(Roche®) eklenir, oluşan solüsyon 5-10 saniye kadar vortex (Jencons Miximatik) cihazında karıştırılır ve reagent mix optimize halde elde edilir. Daha sonra her bir hasta için reaksiyon karışımı oluşturulur. Karışımdaki maddeler ve miktarları şu şekildedir:

H <sub>2</sub> O	: 10.4 µl
Reagent mix	: 1 µl
Fastart DNA Master*	: 2 µl ( İçerisinde DNA polimeraz içermektedir)
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	: 1.6 µl
Total Hacim	: 15 µl

\*: LightCycler Fastart DNA Master HybProbe (ROCHE Diagnostic)

Yukarıda elde edilen karışıma 5µl ( ~ 50 ng) saflaştırılmış DNA'dan eklenerek 20µl hacimde PCR mix elde edilir. Elde edilen PCR mixi her üç TPMT mutasyonu için 96 örneklilik olarak belirtilen miktarlarda hazırlandı. Her PCR mixte sadece kullanılan reagent mixi bakılan mutasyon tipine özgül olarak konulmuştur. Belirtilen 20µl'lik PCR karışımının elde edilmesini anlatan tablo (**Çizelge 3.2.**)'dedir.

**Çizelge 3.2.** Mutasyon taramasında hazırlanan PCR mixin her bir hasta için Gerekli maddeler ve miktarları.

<b>Preparation of the reaction mix:</b>	
<b>20 µl reaction mixture</b>	
H <sub>2</sub> O	14.4 – 10.4 µl
Reagent Mix	1.0 µl
FastStart DNA Master <sup>(1)</sup>	2.0 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.6 µl
DNA	1.0 – 5.0 µl (~ 50 ng)
<b>Final MgCl<sub>2</sub> conc.:</b>	<b>3.0 mM</b>

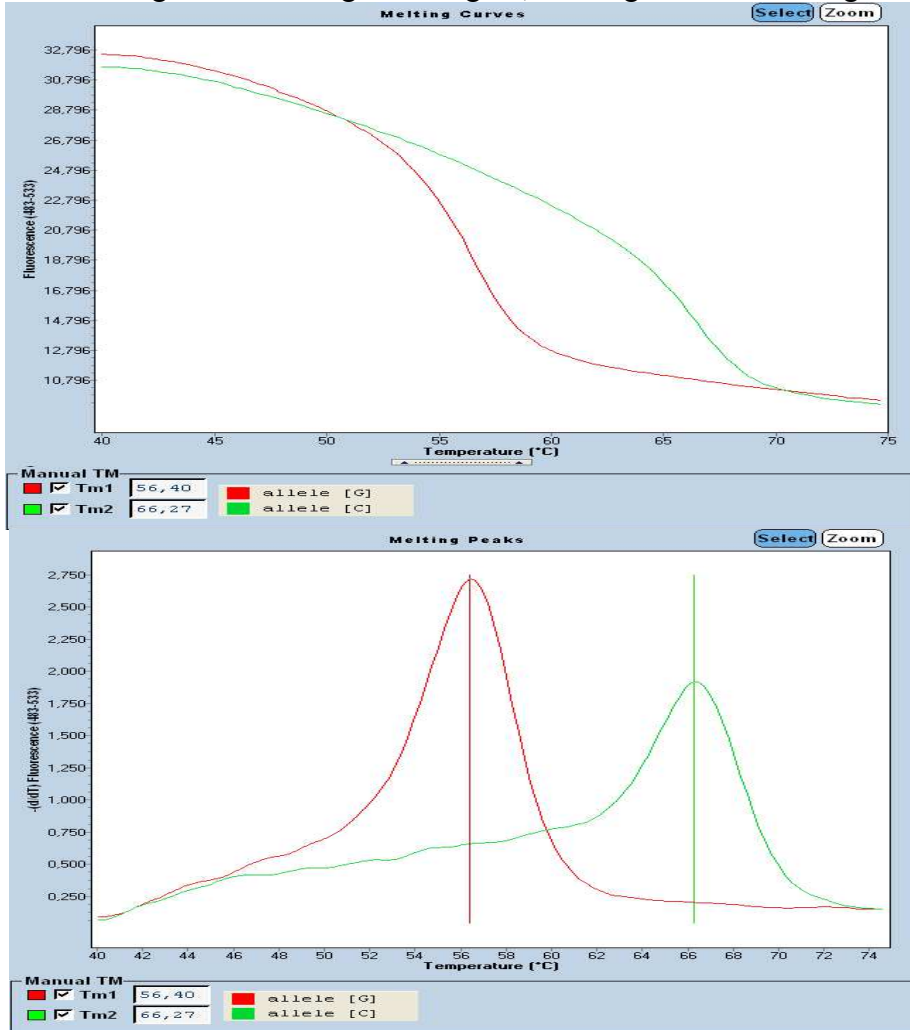
## Aşama 2

Bu aşamada 96 örnek için hazırlanmış PCR mixi 96'lık plate üzerinde kuyucuklara, örneklere verilen numara sırasına uygun olarak yüklenmiştir. Daha sonra plate, Real Time PCR cihazındaki haznesine yerleştirilerek cihazın pleytinin bulunduğu yerdeki kapağı kapatılmış ve LightCycler® 480 II cihazı gerekli cihaz programı ayarlamaları yapıldıktan sonra çalıştırılmış ve veriler (Melting Curve eğrileri ve Melting Pikleri) ekrandan takip edilmiştir. Cihazın çalışma süresi içerisindeki döngüler ve gerekli zamanlar (**Çizelge 3.3.**)'teki gibidir. LightCycler® 480 II cihazında analizi yapılan her üç mutasyon varlığında oluşması gereken Melting Curve eğrisi, Melting Pikleri ve T<sub>m</sub> (Melting Temperature) değerleri (**Çizelge 3.4., Çizelge 3.5. ve Çizelge 3.6.**)'deki gibi olmalıdır. Kullanılan LightSNiP TPMT mutasyon kitlerini üreten firmanın talimatına göre mutasyon varlığını anlamak için analiz sonucunda elde edilecek olan Melting Peaks değerlerinde oluşan piklere bakılmalıdır. Eğer Melting Peaks değerlerinin görüldüğü ekranda oluşan pik sadece sağ tarafta ise örnek homozigot mutant allele, eğer 2 tarafta pik varsa örnek heterozigot mutant allele, eğer pik sadece sol tarafta ise örnek homozigot wild-tip allele sahiptir.

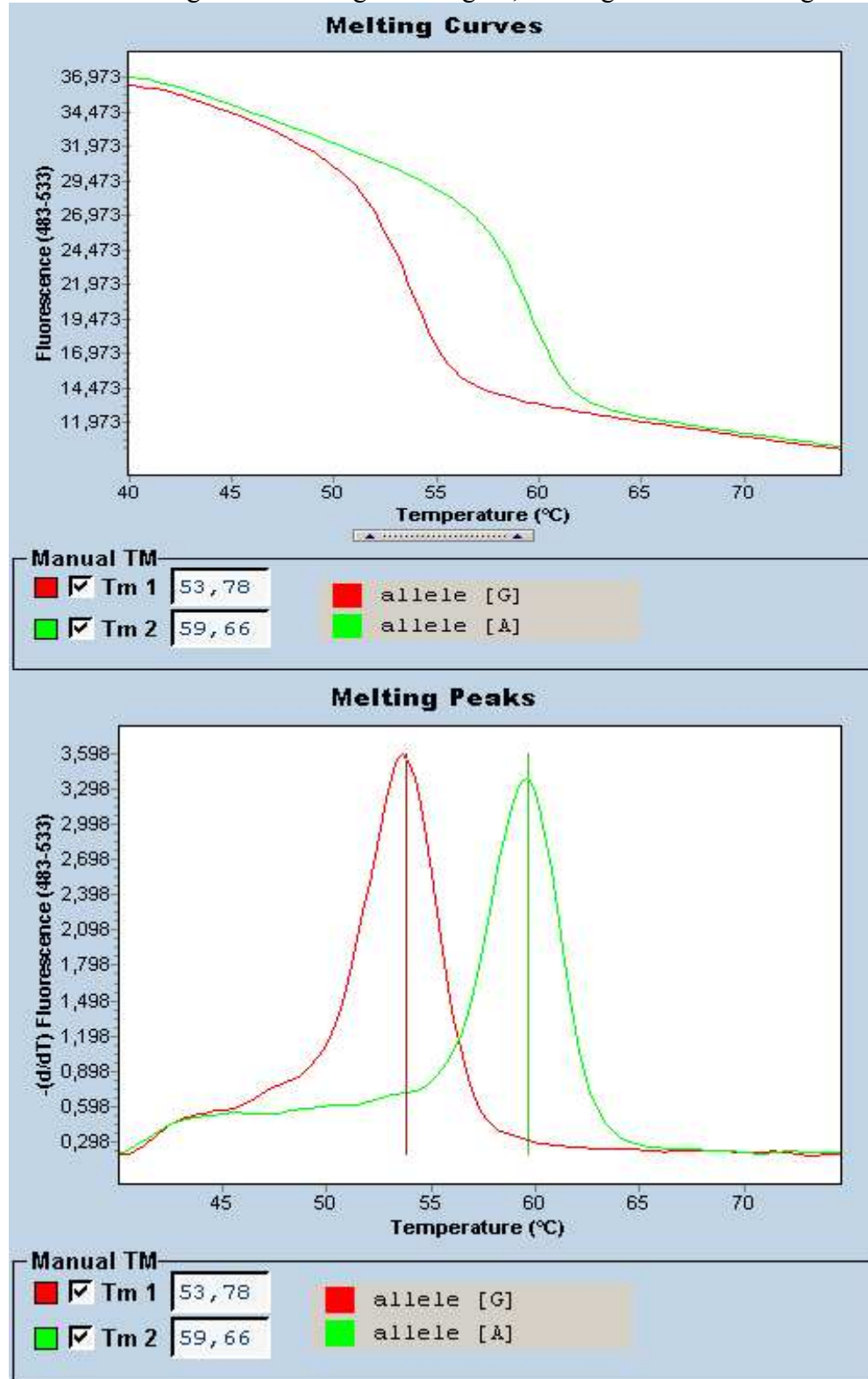
**Çizelge 3.3.** LightCycler® 480 Instrument Çalışma Prosedürü.

Program:	Denaturation	Cycling			Melting			Cooling
Parameter								
Analysis Mode	None	Quantification			Melting Curves			None
Cycles	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0
Ramp Rate [°C/s] 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None
Acquisitions [per °C]							3	

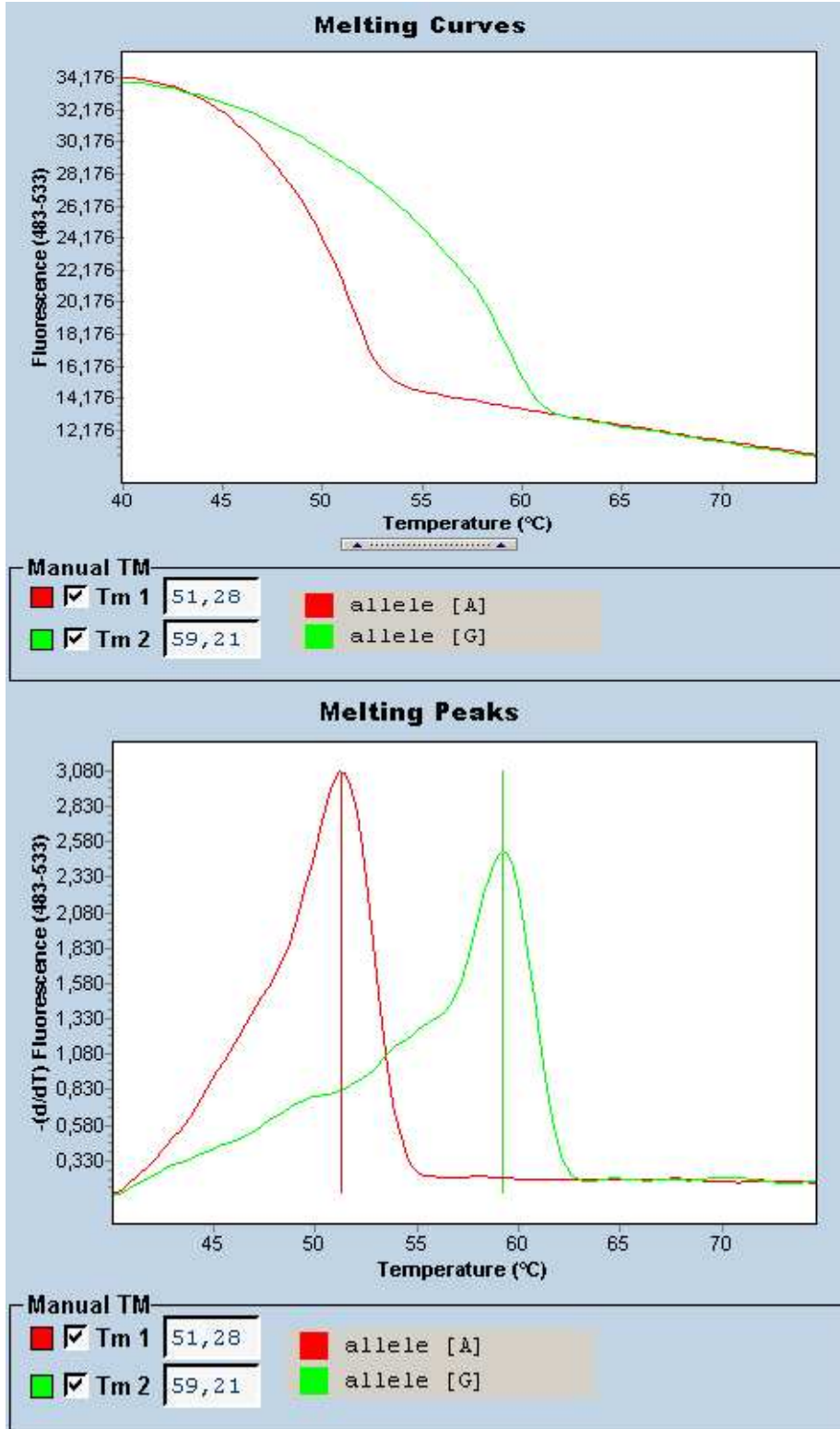
**Çizelge 3.4.** LightSNiP rs1800462 (TMPT\*2 mutasyon kiti) için mutasyon varlığındaki Melting Curve eğrisi, Melting Peaks ve Tm değerleri.



Çizelge 3.5. LightSNiP rs1800460 (TPMT\*3B mutasyon kiti) için mutasyon varlığındaki Melting Curve eğrisi, Melting Peaks ve Tm değerleri.



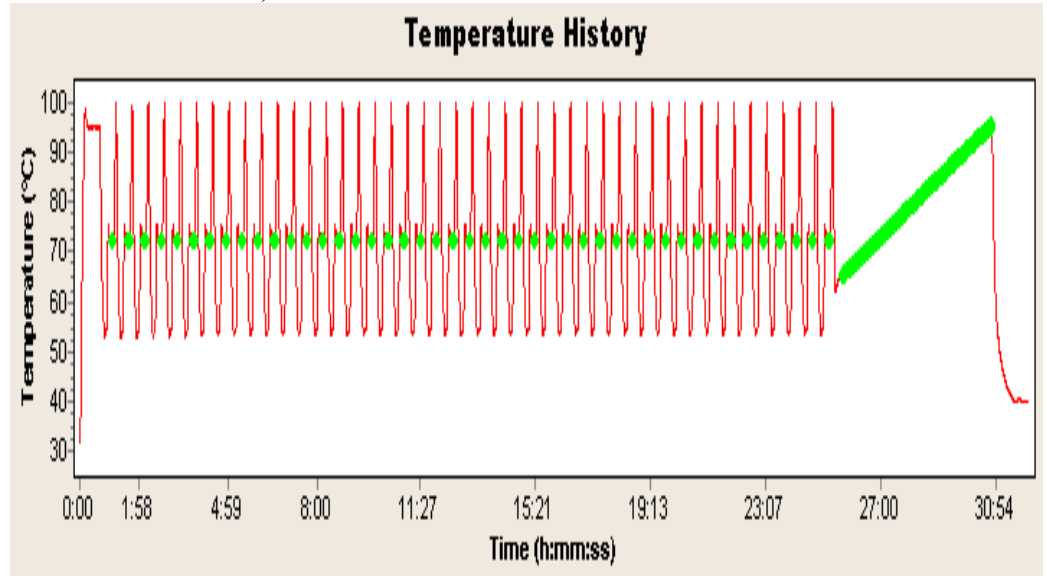
Çizelge 3.6. LightSNiP rs1142345 (TPMT\*3C mutasyon kiti) için mutasyon varlığındaki Melting Curve eğrisi, Melting Peaks ve Tm değerleri



**Şekil 3.4.** LightCycler® 480 II Real Time PCR cihazı (Roche Applied Science 2005)



**Şekil 3.5.** LightCycler® 480 II 'deki Erime Eğrisi örnek grafiği. Grafikteki her pik bir PCR döngüsünü göstermektedir (Roche Applied Science 2005)



**NOT:** Yukarıda anlatılan DNA saflaştırması, LightSNip TPMT mutasyon kitlerinin kullanıma hazırlanışı ve kullanılışı, PCR mix hazırlanışı ve Real Time cihazının kullanımı ve verilerin okunuş ve değerlendirme biçimleri malzemelerin temin edildiği üretici firmaların (ROCHE Diagnostic ve TIB MOLBIOL) talimatlarına göre yapılmıştır. Kullanılan H<sub>2</sub>O, MgCl<sub>2</sub> maddeleri ROCHE®, kan ve diğer maddelerin aktarımında kullanılan mikro pipetler ise eppendorf markadır.

## 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

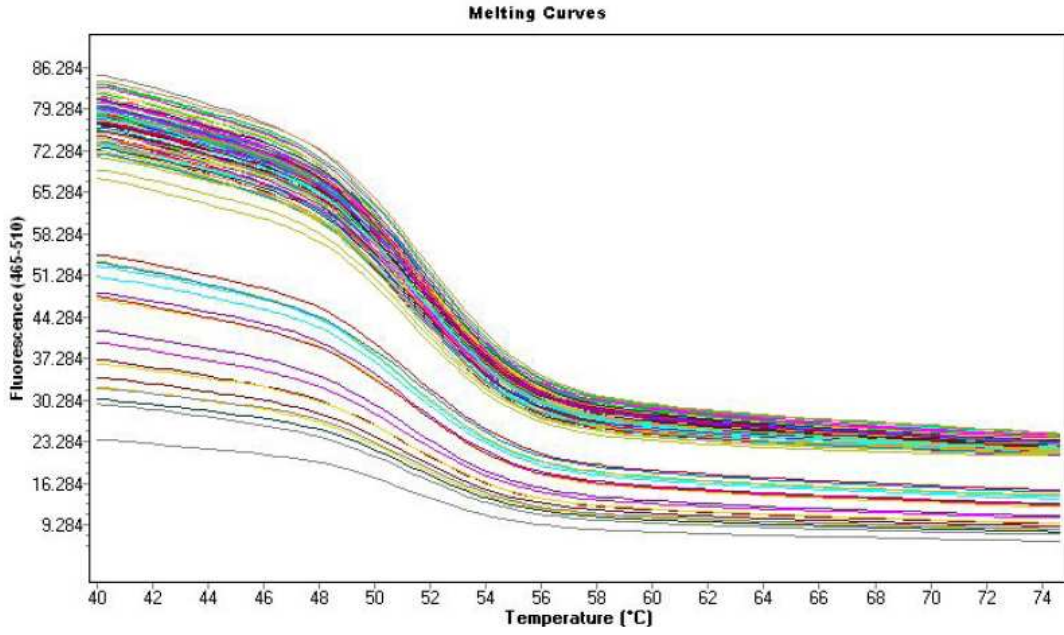
### 4.1. TPMT\*2, TPMT\*3B ve TPMT\*3C Mutasyonlarının Tespiti İçin Yapılan Real-Time PCR Analiz Sonuçları

Dicle Üniversitesi Hematoloji Laboratuvarına çeşitli nedenlerle gelen hastalardan alınan 96 tam kan örneği üzerinde yapılan TPMT mutasyonlarının araştırılması işlemi sonucunda, hastaların hiç birinde TPMT\*2 nokta mutasyonu belirlenemezken, 2 adet hastada heterozigot TPMT\*3B ve 2 hastada ise heterozigot TPMT\*3C nokta mutasyonu tespit edilmiştir. Tespit edilen mutasyonlara ilişkin Real Time PCR analiz verileri TPMT\*2 ( Çizelge 4.1. Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.), TPMT\*3B (Çizelge 4.2. Şekil 4.3. ve Şekil 4.4.) ve TPMT\*3C için ( Çizelge 4.3. Şekil 4.5. ve Şekil 4.6.)'daki gibidir. Yapılan analiz sonuçlarına göre ortaya çıkan mutasyonların araştırma grubu içerisindeki frekans dağılımları (Çizelge 4.4.) 'deki gibidir.

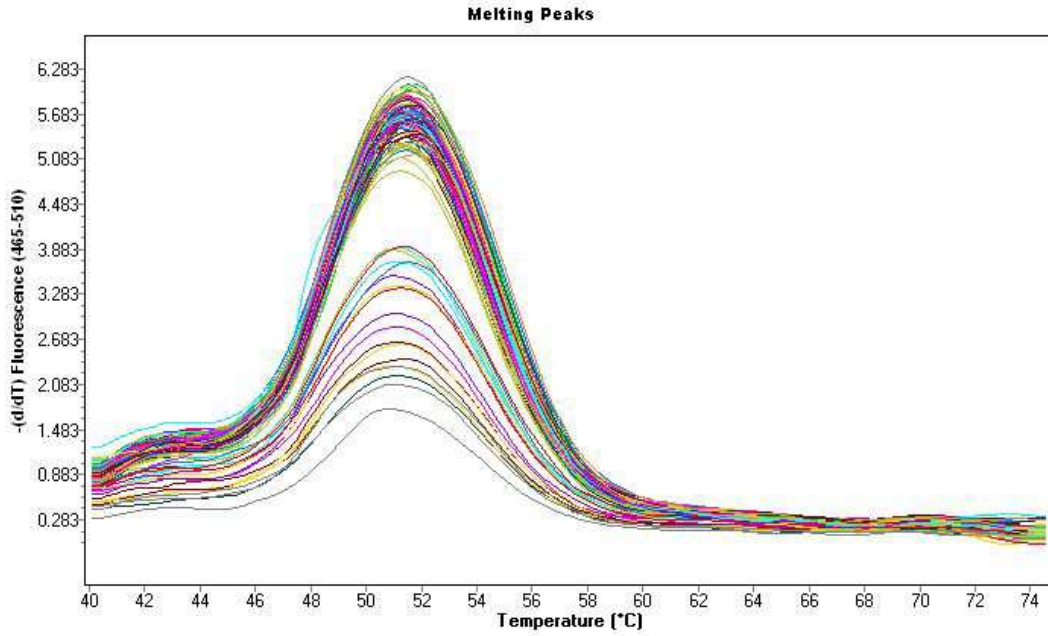
Çizelge 4.1. TPMT\*2 mutasyonu için taranan 96 örnek için elde edilen Tm değerleri.

		Peak 1	Peak 2			Peak 1	Peak 2			Peak 1	Peak 2
Pozisyon	Hasta No	Tm	Tm	Pozisyon	Hasta No	Tm	Tm	Pozisyon	Hasta No	Tm	Tm
A1	1836	51.88		D1	1878	51.78		G1	1881	51.94	
A2	1883	51.78		D2	1934	51.82		G2	1937	51.78	
A3	1939	51.62		D3	1944	21.76		G3	1958	52.11	
A4	1961	51.66		D4	2001	51.54		G4	1838	51.91	
A5	1840	51.80		D5	1949	51.86		G5	1957	51.51	
A6	1994	51.76		D6	1995	51.49		G6	1942	51.74	
A7	2039	51.60		D7	2042	51.84		G7	2045	51.89	
A8	2047	51.45		D8	2050	51.81		G8	2053	51.85	
A9	2063	51.76		D9	2066	51.77		G9	2069	51.73	
A10	2093	51.85		D10	2096	51.74		G10	2099	51.75	
A11	2132	51.91		D11	2135	51.78		G11	2138	51.82	
A12	2140	51.77		D12	2077	51.68		G12	2073	51.75	
B1	1841	51.79		E1	1879	21.92		H1	1882	21.18	
B2	1884	52.00		E2	1935	51.94		H2	1938	51.78	
B3	1940	51.80		E3	1945	21.92		H3	1959	51.94	
B4	1997	51.79		E4	1810	51.57		H4	1939	51.92	
B5	1947	51.79		E5	1955	51.64		H5	1962	51.65	
B6	1996	51.67		E6	1946	51.97		H6	1998	51.80	
B7	2040	51.64		E7	2043	51.83		H7	2046	51.96	
B8	2078	51.72		E8	2051	51.65		H8	2054	51.93	
B9	2064	51.60		E9	2067	51.82		H9	2070	51.99	
B10	2094	51.82		E10	2097	51.94		H10	2100	52.09	
B11	2133	51.75		E11	2136	51.56		H11	2139	51.90	
B12	2075	51.85		E12	2071	51.78		H12	2074	52.01	
C1	1842	51.59		F1	1880	51.73					
C2	1885	51.96		F2	1936	51.95					
C3	1941	52.02		F3	1956	51.94					
C4	2000	51.82		F4	1837	52.01					
C5	1948	51.71		F5	1960	51.88					
C6	1999	51.62		F6	1943	51.82					
C7	2041	51.65		F7	2044	51.77					
C8	2079	51.58		F8	2052	51.87					
C9	2065	51.61		F9	2068	51.89					
C10	2095	51.79		F10	2098	51.79					
C11	2134	51.69		F11	2137	51.65					
C12	2076	51.72		F12	2072	51.67					

**Şekil 4.1.** TPMT\*2 mutasyonu için Real Time PCR analizinde elde edilen Melting Curves eğrileri.



**Şekil 4.2.** TPMT\*2 mutasyonu için Real Time PCR analizi Melting Peaks'leri

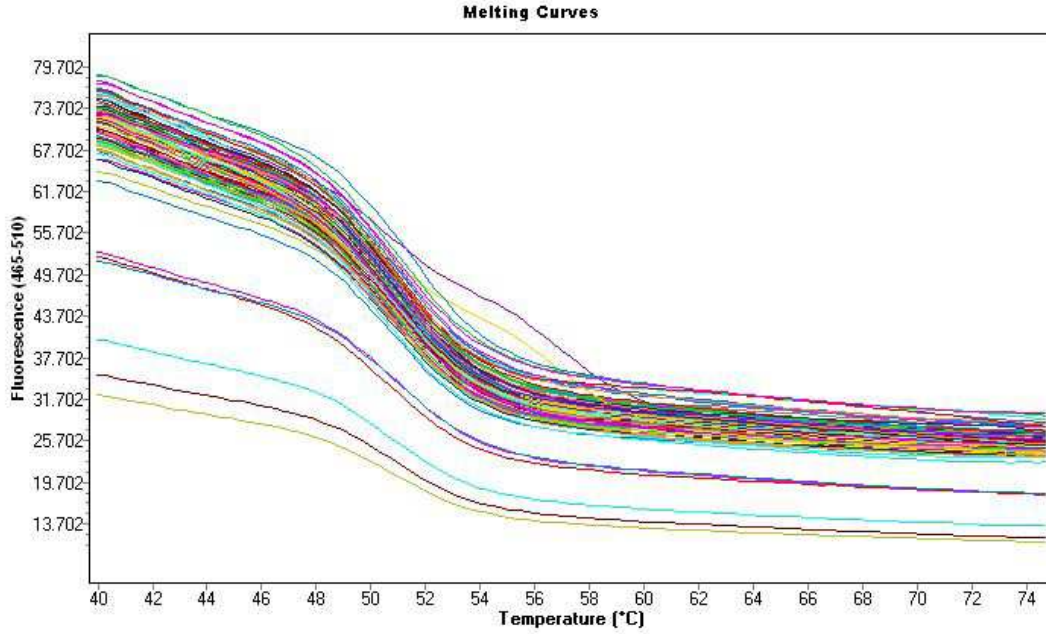


Çizelge 4.2. TPMT\*3B mutasyonu için 96 örnekten elde edilen Tm değerleri

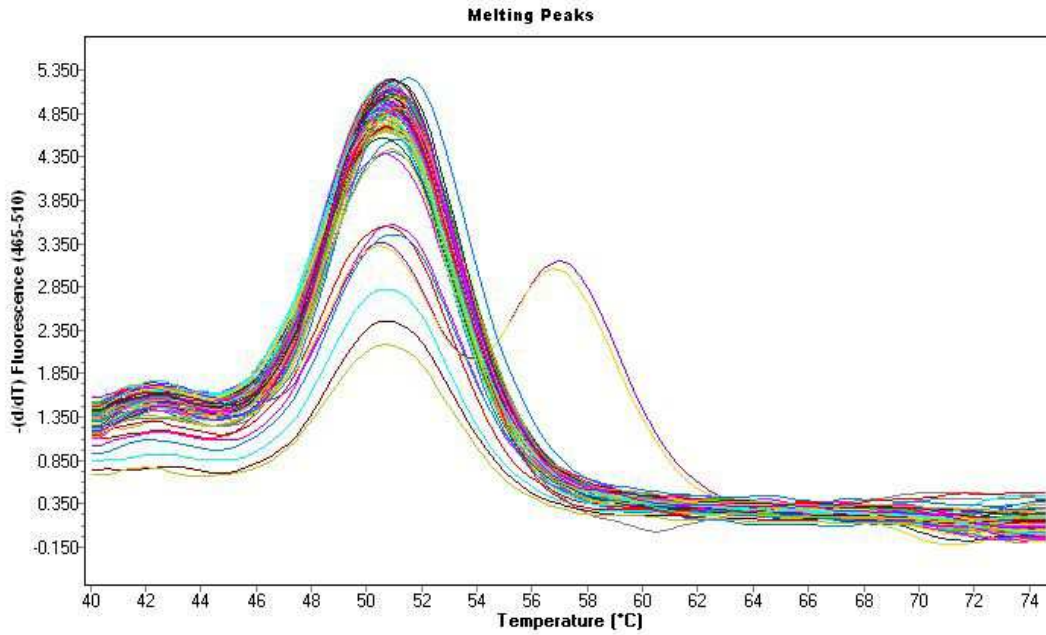
Peak1		Peak 2	Peak 1		Peak 2	Peak 1		Peak 2
Pozisyon	Hasta No	Tm	Pozisyon	Hasta No	Tm	Pozisyon	Hasta No	Tm
A1	1836	21.34	D1	1878	51.48	G1	1881	51.58
A2	1883	51.39	D2	1934	51.46	G2	1937	51.32
A3	1939	51.28	D3	1944	51.27	G3	1958	51.54
A4	1961	51.42	D4	2001	51.16	G4	1838	51.34
A5	1840	51.38	D5	1949	51.10	G5	1957	51.34
A6	1994	51.42	D6	1995	51.11	G6	1942	51.66
A7	2039	51.25	D7	2042	51.16	G7	2045	51.35
A8	2047	51.29	D8	2050	51.26	G8	2053	51.04
A9	2063	51.32	D9	2066	51.32	G9	2069	51.18
A10	2093	51.33	D10	2096	51.26	G10	2099	51.11
A11	2132	51.55	D11	2135	51.28	G11	2138	51.36
A12	2140	51.50	D12	2077	51.27	G12	2073	51.30
B1	1841	51.15	E1	1879	51.34	H1	1882	51.82
B2	1884	51.15	E2	1935	51.23	H2	1938	51.22
B3	1940	51.21	E3	1945	51.41	H3	1959	51.44
B4	1997	51.35	E4	1810	51.18	H4	1939	51.36
B5	1947	51.18	E5	1955	51.24	H5	1962	51.30
B6	1996	51.34	E6	1946	51.23	H6	1998	51.24
B7	2040	51.18	E7	2043	51.35	H7	2046	51.39
B8	2078	51.17	E8	2051	51.20	H8	2054	51.21
B9	2064	21.28	E9	2067	51.17	H9	2070	51.51
B10	2094	51.33	E10	2097	51.41	H10	2100	51.55
B11	2133	51.73	E11	2136	51.23	H11	2139	51.37
B12	2075	51.37	E12	2071	51.54	H12	2074	51.33
C1	1842	51.41	F1	1880	51.42			
C2	1885	51.32	F2	1936	51.47			
C3	1941	51.17	F3	1956	51.28			
C4	2000	51.35	F4	1837	51.17			
C5	1948	51.22	F5	1960	51.29			
C6	1999	51.13	F6	1943	51.20			
C7	2041	51.29	F7	2044	51.34			
C8	2079	51.08	F8	2052	51.24			
C9	2065	51.33	F9	2068	51.34			
C10	2095	51.28	F10	2098	51.36			
C11	2134	51.32	F11	2137	51.24			
C12	2076	51.26	F12	2072	51.33			

\* Mavi olarak belirtilen değerler mutasyon bulunan Tm değerleridir.

Şekil 4.3. TPMT\*3B için Real Time PCR analizi Melting Curvers eğrileri.



Şekil 4.4. TPMT\*3B mutasyonu için Real Time PCR analizi Melting Peaks'leri.



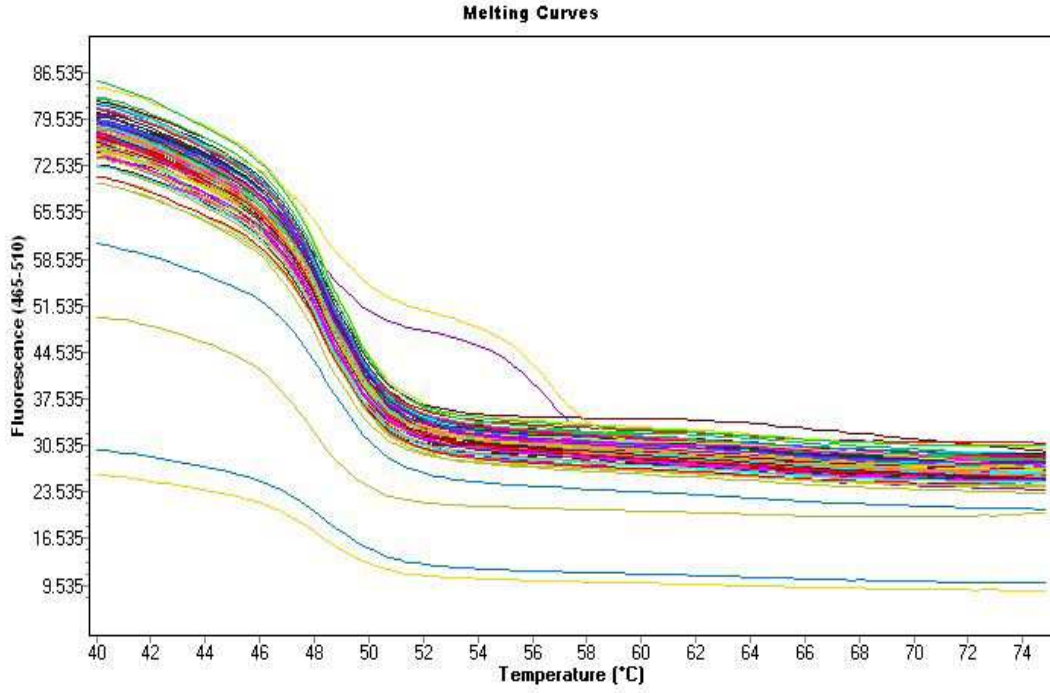
Sağ tarafta görülen 2 pik heterozigot mutasyon varlığını göstermektedir.

Çizelge 4.3. TPMT\*3C mutasyonu için 96 örnekten elde edilen Tm değerleri.

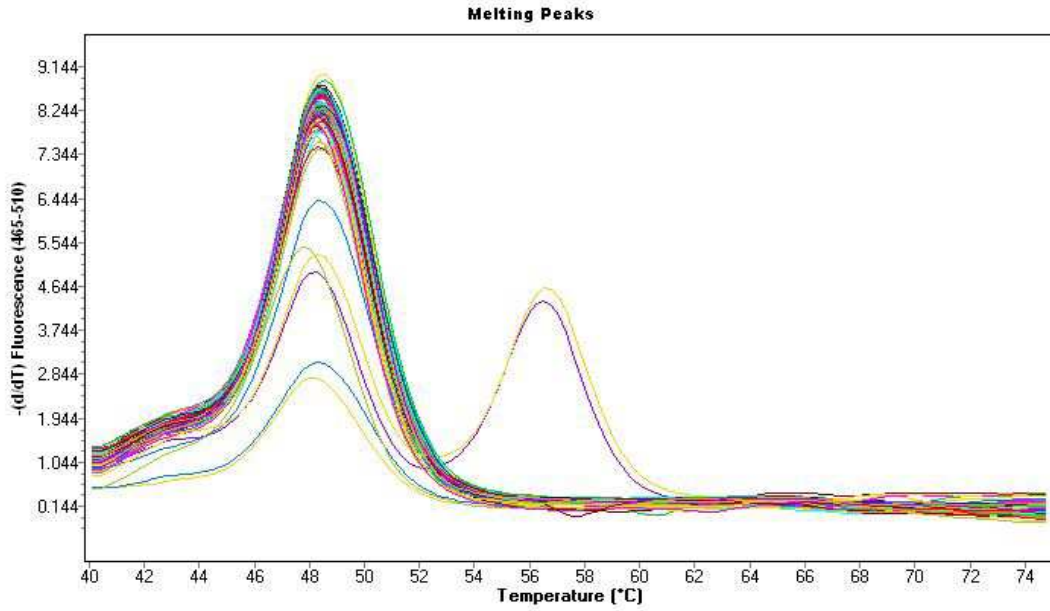
		Peak 1	Peak 2			Peak 1	Peak 2			Peak 1	Peak 2
Pozisyon	Hasta No	Tm	Tm	Pozisyon	Hasta No	Tm	Tm	Pozisyon	Hasta No	Tm	Tm
A1	1836	48.74		D1	1878	48.76		G1	1881	48.67	
A2	1883	48.70		D2	1934	48.67		G2	1937	48.72	
A3	1939	48.49		D3	1944	48.74		G3	1958	48.73	
A4	1961	48.58		D4	2001	48.54		G4	1838	48.72	
A5	1840	48.59		D5	1949	48.54		G5	1957	48.56	
A6	1994	48.45		D6	1995	48.68		G6	1942	48.44	56.88
A7	2039	48.68		D7	2042	48.66		G7	2045	48.64	
A8	2047	48.98		D8	2050	48.60		G8	2053	48.74	
A9	2063	48.64		D9	2066	48.73		G9	2069	48.63	
A10	2093	48.68		D10	2096	48.64		G10	2099	48.64	
A11	2132	48.78		D11	2135	48.57		G11	2138	48.68	
A12	2140	48.72		D12	2077	48.66		G12	2073	47.99	
B1	1841	48.71		E1	1879	48.64		H1	1882	48.77	
B2	1884	48.70		E2	1935	48.65		H2	1938	48.75	
B3	1940	48.66		E3	1945	48.60		H3	1959	48.83	
B4	1997	48.66		E4	1810	48.63		H4	1939	48.44	
B5	1947	48.55		E5	1955	48.64		H5	1962	48.69	
B6	1996	48.58		E6	1946	48.50		H6	1998	48.48	
B7	2040	48.57		E7	2043	48.70		H7	2046	48.66	
B8	2078	48.52		E8	2051	48.66		H8	2054	48.69	
B9	2064	48.59		E9	2067	48.71		H9	2070	48.82	
B10	2094	48.63		E10	2097	48.68		H10	2100	48.74	
B11	2133	48.26	56.71	E11	2136	48.69		H11	2139	48.70	
B12	2075	48.63		E12	2071	48.68		H12	2074	48.71	
C1	1842	48.69		F1	1880	48.77					
C2	1885	48.53		F2	1936	48.73					
C3	1941	48.66		F3	1956	48.68					
C4	2000	48.53		F4	1837	48.57					
C5	1948	48.63		F5	1960	48.76					
C6	1999	48.54		F6	1943	48.74					
C7	2041	48.48		F7	2044	48.70					
C8	2079	48.62		F8	2052	48.62					
C9	2065	48.61		F9	2068	48.67					
C10	2095	48.63		F10	2098	48.68					
C11	2134	48.74		F11	2137	48.68					
C12	2076	48.64		F12	2072	48.48					

\* Mavi olarak belirtilen değerler mutasyon bulunan Tm değerleridir.

Şekil 4.5. TPMT\*3C mutasyonu için Real Time PCR Metlin Curves eğrileri



Şekil 4.6. TPMT\*3C mutasyonu için Real Time PCR Melting Peaks'leri



Sağ tarafta görülen 2 pik heterozigot mutasyon varlığını göstermektedir.

**Çizelge 4.4.** Araştırma sonucunda elde edilen mutasyonların allel frekansları.

<b>Allel</b>	<b>SNP pozisyonu</b>	<b>Amino asit değişimi</b>	<b>Frekans (%) ( n = 96)</b>
<b>TPMT*2</b>	<b>238G&gt;C</b>	<b>Ala80Pro</b>	<b>% 0.0 (0/96)</b>
<b>TPMT*3B</b>	<b>460G&gt;A</b>	<b>Ala154Thr</b>	<b>% 2.08 (2/96)</b>
<b>TPMT*3C</b>	<b>719A&gt;G</b>	<b>Tyr240Cys</b>	<b>% 2.08 (2/96)</b>

#### **4.2. Türkiye’de ve Dünya’da yapılmış TPMT mutasyonlarının tespitine ilişkin bazı çalışmalar ve bu çalışmaların karşılaştırılması**

Bu çalışmada ortaya çıkan TPMT mutant dağılımının daha önce Türkiye’de yapılmış iki çalışmayla kıyaslanması şu şekildedir;

TPMT\*2, \*3B ve \*3C mutasyonlarının tespiti için 96 kişi üzerinde yapılan bu çalışmada TPMT\*3B allel frekansı % 2.08 (2/96) ve TPMT\*3C allel frekansı % 2.08 (2/96) olarak bulunmuş ve TPMT\*2 (0/96) mutasyonuna rastlanmamıştır. Tümer ve ark. (2007) yapmış oldukları TPMT mutasyon analizi çalışmasında TPMT\*1 wild-type allelinin frekansı % 98.2, TPMT\*2 allel frekansı %0.0, TPMT\*3B allel frekansı % 0.0,

TPMT\*3C allel frekansı % 0.9 ve TPMT\*3A allel frekansı %0.9, Sayitoğlu ve ark. (2006) yaptığı araştırmada ise TPMT\*1 wild-type allel frekansı % 94.6, TPMT\*2 allel frekansı % 2.0, TPMT\*3A allel frekansı % 1.0, TPMT\*3B allel frekansı % 0.0 ve TPMT\*3C allel frekansı % 1.4 olarak bildirilmiştir (**Çizelge 4.5.a. ve Çizelge 4.5. b.**).

**Çizelge 4.5.a.** Yaygın TPMT allellerinin Türk Toplumundaki dağılımı.

Allele	SNP position	Aminoacid substitution	Frequency (%) (n=296)
TPMT*1	wild type		94.6
TPMT*2	238G>C	Ala80Pro	2.0
TPMT*3A	460G>A and 719A>G	Ala154Thr and Tyr240Cys	1.0
TPMT*3B	460G>A	Ala154Thr	0.0
TPMT*3C	719A>G	Tyr240Cys	1.4

**Çizelge 4.5.b** Bir grup ALL hastası Türk popülasyonundaki TPMT allel frekansı.

Alleles	SNPs	No. of alleles	Frequency % (95% CI)
Total of allele		212	
TPMT*1	Wild-Type	208	98.2 (95.25–99.26)
TPMT*2	G238C	0	0.0 (0.00–1.78)
TPMT*3B	G460A	0	0.0 (0.00–1.78)
TPMT*3C	A719G	2	0.9 (0.26–3.37)
TPMT*3A	G460A, A719G	2	0.9 (0.26–3.37)
Total mutant alleles		4	1.8 (0.74–4.75)

TPMT\*2, \*3B ve \*3C mutasyonlarının tespiti için dünyada yapılmış bazı çalışmalar ise şunlardır;

Davison ve ark. (2006) LightCycler® Real Time PCR temeline dayalı olarak yaptıkları TPMT\*2, \*3A, \*3B ve \*3C mutasyonlarının tespiti için gerçekleştirdikleri çalışmada, akut lenfoblastik lösemi hastaları üzerinde çalışmışlar ve bu mutasyonlardan sadece TPMT\*3A'yı 55 kişi içinden 3 kişide tespit etmişlerdir (**Çizelge 4.6.**). Lindqvist ve ark. (2003) Kimyasal olarak TPMT eksikliğinin belirlendiği kişiler üzerinde gen ekspresyonu düzeyini belirleme çalışması yapmışlar ve ekspresyon düzeyini belirlemek için ise Real-Time RT-PCR (reverstranskriptaz PCR) yöntemi kullanmışlardır. Nasednika ve ark. (2006) yaygın TPMT mutant allelleri belirlemek için DNA-mikroçip tekniğini kullanmışlar ve TPMT\*2, \*3A ve \*3C mutantlarını tespit etmişlerdir (**Çizelge 4.7.**). Ford ve Berg (2010) TPMT mutasyonlarının belirlenmesinde, SSCP (single standart conformational polymorphism), ARMS (amplification refractory mutation system), denature HPLC, pyrosequencing, restriksiyon enzimi çalışmaları ve mutasyon kitleri kullanılarak belirlene bilindiğini söylemişlerdir. Samochatova ve ark. (2009) Rusya Federasyonu'nda biyoçip tekniğini kullanarak 7 TPMT mutant allelinin tespitine yönelik yaptıkları çalışmada % 4.5 TPMT\*1/\*3A, % 0.8 TPMT\*1/\*3C ve % 0.2 frekansıyla TPMT\*1/\*2 mutantlarını belirlemişken, diğer mutant allelleri (TPMT\*3B, \*3D, \*7 ve \*8) belirleyemediklerini söylemişlerdir. Stocco ve ark. (2005) pediatrik IBD'li (inflammatory bowel disease) hastalar üzerinde yaptıkları çalışmada PCR tabanlı yöntemler kullanarak % 7.1 oranında TPMT mutant alleleline (4 adet TPMT\*3A ve 1 adet TPMT\*2, N=70) rastladıklarını belirtmişlerdir.

**Çizelge 4.6.** LightCycler ile ALL hastaların arasında TPMT genotipleri.

Genotype	Control population (n, %)	ALL population (n, %)
<i>TPMT*1/*1</i>	26 (96.3%)	52 (94.5%)
<i>TPMT*1/*3A</i>	1 (3.7%)	3 (5.5%)
<i>TPMT*1/*3B</i>	0	0
<i>TPMT*1/*3C</i>	0	0
<i>TPMT*1/*2</i>	0	0
Total	27	55

**Çizelge 4.7.** DNA-microchip ile belirlenen TPMT mutantları.

TPMT genotype	Number	Genotype frequency (%) (95% CI)
<i>*1/*1</i>	656	93.7 (91.7–95.4)
<i>*1/*3A</i>	37	5.3 (3.7–7.2)
<i>*1/*3C</i>	5	0.7 (0.2–1.6)
<i>*1/*2</i>	2	0.3 (0–1.0)

Bahari ve ark. (2010) İran’da yaptıkları çalışmada yaygın TPMT mutantlarını araştırmışlar ve mutant sıklıklarını sırasıyla TPMT\*2 % 2.16, TPMT\*3A % 1.68, TPMT\*3B % 1.62 ve TPMT\*3C % 0.54 olarak bulmuşlardır. İsrail popülasyonunda yapılan başka bir çalışmada ise İsrail’de en yaygın TPMT mutasyonlarının TPMT\*3A ve TPMT\*3C olduğu belirtilmiştir (Efrati ve ark. 2009). Genel Avrupa popülasyonuna yönelik yapılan bir araştırmada fonksiyonel olmayan mutasyonların (G283C, G460A, A719G ve T681G) sıklıkları sırasıyla % 0.5, % 5.7, %0.8 ve % 0.3 olara tespit edilmiştir (Moureyre ve ark. 1998). Afro-Amerikan ırkı ile Kafkas ırklarının karşılaştırıldığı bir diğer çalışmada ise enzim aktivitesi 10.1 U/ml pBRC civarı ve daha aşağı seviyede tespit edilmiş olup, Kafkaslar’da en yaygın mutantın TPMT\*3C mutanı iken Afro-Amerikanlar’da yaygın mutantın TPMT\*3A olduğu belirtilmiştir (Hon ve ark. 1999). Japon ırkına yönelik yapılan çalışmada yaygın mutantlardan sadece TPMT\*3C tespit edilmişken diğerlerine rastlanmamıştır (Hiratsuka ve ark. 2000). Rusya’da ise en

yaygın mutantın TPMT\*3A olduğu belirtilmiştir (Samochatoca ve ark. 2009). Bizim yaptığımız çalışmada ise TPMT\*2 mutantına rastlanmazken TPMT\*3B ve TPMT\*3C mutantlarının sıklığı iki mutant içinde % 2.08 olarak tespit edilmiştir.

Yaptığımız bu çalışma ve belirtilen diğer çalışmalarda TPMT mutasyonlarına ilişkin allel frekansları farklılık göstermektedir. Bunun nedenleri arasında bakılan örneklemden kişi sayısı, örneklemin içinde bulunan kişilerin durumları (TPMT eksikliği olduğu bilinen ve bilinmeyenler üzerindeki araştırmalarda frekanslar arasında önemli farklar oluşabilmektedir) sayılabilir. Ancak belirtilen tüm çalışmalarda yöntemler farklı olmasına rağmen hepsi genotipik çalışmalardır ve bunlar standart yöntemlere göre hızlı ve doğru sonuç vermektedir. Bunlara ek olarak bu çalışmaların hepsindeki ortak nokta; tiopürin ilaçlarının hastalara verilmeden önce kesinlikle TPMT enzim eksikliğinin hastada olup olmadığının belirlenmesi gerektiğini vurgulamaktır.

Yapılan analizler sonucu Real Time PCR Tm değer tablosunda da görüldüğü gibi 1942 ve 2133 DNA numaralı hastalarda TPMT\*3B ve TPMT\*3C mutasyonları heterozigotik olarak ortaya çıkmıştır. Hastalar bu TPMT mutant allelerini taşıdıkları için TPMT enzim seviyelerinin düşük çıkması kaçınılmazdır. Ayrıca bu iki hasta heterozigot durumda hem TPMT\*3B hem de TPMT\*3C mutant allelerini taşıdıkları için bu mutant allelerden herhangi birini taşıyan bir bireye göre daha da düşük düzeyli enzim seviyesine sahip olmaları beklenir. Daha önce yapılmış çalışmalarda çeşitli yöntemler kullanılarak enzim aktivite düzeyi hakkında bilgi sahibi oluna bilindiği gibi, TPMT genotiplerine bakılarak ta enzim eksikliğinin olup olmadığı hakkında bilgi sahibi olunabilmektedir (Black ve ark. 1998, Corominas ve ark. 2003 Reuther ve ark. 2004).

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Thiopurine S-Metiltransferaz enzimi, 6-merkaptopürin ve thioguanin gibi tiopürin ilaçlarını SAM (S-adenozil-L-metionin) molekülünü metil donörü olarak kullanıp katalizleyen sitoplazmik bir enzimdir (Weinshilboum ve Sladek. 1980, Krynetski ve Evans. 2003.). TPMT enziminin substrat olarak tiopürin ilaçlarını kullandığı bilinirken, organizma içindeki doğal substratı bilinmemektedir (Ford ve Berg. 2010). Thiopürin ilaçları dermatolojide, inflammatuar bağırsak hastalığı gibi gastroenterolojik hastalıklarda, bazı otoimmün hastalıklar v.b alanlarda tedavi amaçlı olarak, solid organ transplantasyonlarında ise rejeksiyonu önlemek için bağışık sistem baskılayıcısı olarak kullanılmaktadır (Langley ve ark. 2002, Wood ve ark. 2004, Bloomfeld ve ark. 2006).

TPMT enzim eksikliği otozomal kodominant kalıtım göstermekte olup popülasyonlarda TPMT enzim seviyesi trimodaldır. Yani enzim seviyesi normal veya yüksek, orta dereceli (intermediate) ve düşük seviye olarak 3 tiptir (Ameway ve ark. 1999). TPMT enzim eksikliğine TPMT geninde meydana gelen nokta mutasyonlar (SNP'ler yani tek nükleotid polimorfizimleri) neden olmaktadır (Seki ve ark. 2000, Sies ve ark. 2005). Bu mutasyonların olduğu bireylerde TPMT enzim proteinleri hatalı üretilir ve bu hatalı proteinler degrade edilir ki buda kişide enzim aktivitesinde düşüklüğe neden olur (Wang ve ark. 2005). Bu eksiklik insanlarda normal şartlar altında bir soruna yol açmazken, tiopürin türevi ilaçlar kullanılmasını gerektirecek bir hastalık durumunda hastanın sağlığı açısından risk teşkil etmektedir. TPMT enzim eksikliği olan hastalarda tiopürin ilaçlarının standart dozlarının kullanılması durumunda hastalarda çeşitli yan etkiler (kusma, bulantı, deri dökmesi v.b.) görülürken, bunlara ek olarak ciddi sorunlar da baş gösterir. Bu sorunlara hepatotoksisite, miyelosüpresyon, immünosüpresyon ve hatta daha ileri durumlarda ise hastanın ölümü gibi durumlar örnek olarak verilebilir (Yong ve ark. 2006, Katsanos ve Tsianos. 2007, Dooley ve ark. 2008).

TPMT enzim eksikliğinin belirlenmesinde fenotipik (direkt aktivite tayni) ve genotipik (mutasyonların varlığının tespiti) yöntemler vardır (Chrzanowska ve ark. 2006, Ganiere ve ark. 2004). Yapılan bu çalışmada genotipik yöntemlerden biri olan Real Time PCR uyumlu TPMT mutasyon kitleri kullanarak TPMT genindeki 3 mutasyonun varlığı Diyarbakır'a yönelik olarak araştırıldı. Yapılan bu araştırmanın amacı bakılan mutasyonların Diyarbakır'daki frekansı hakkında bilgi sahibi olmak ve bu bilgi ışığında TPMT enzim eksikliğine dikkat çekerek klinisyenlere ışık tutmaktır. Ayrıca Real Time PCR kullanımına ek olarak, özel olarak tasarlanmış mutasyon kitlerinin kullanımının hızlı ve doğru sonuçlar verdiğini ortaya koymak da amaçlarımızdan biridir. Yapılan bu çalışmada görülmüştür ki Real Time PCR (ve mutasyon kitleri) ile TPMT enzim eksikliği olan hastaları genotipik olarak belirlemek hızlı ve kolay bir yöntemdir (Lindqvist ve ark. 2003, Davison ve ark. 2006). Bu yöntem, tiopürin ilacı ile tedavi edilmesi gereken hastalarda TPMT enzim eksikliğinin belirlenmesinde uzun zaman alan ve yüksek maliyetli aktivite tayini ölçülmesi yöntemine alternatif oluşturacağı kanısını doğurmuştur. Değinildiği gibi TPMT enzim eksikliğinin genotipik yöntemlerle ortaya konması zaman ve maliyet açısından daha avantajlıdır (Oh ve ark. 2004, Payne ve ark. 2007). Eğer bu enzim eksikliği belirleme işlemi SAM molekülü, diğer bazı kimyasallar ve çeşitli cihazların kullanımına dayanan aktivite ölçüm yöntemiyle yapılsaydı işlem süresi çok daha fazla artacaktı. Bu çalışmada kullanılan LightSNiP TPMT mutasyon kitleri (TPMT\*2, \*3B ve \*3C için) maliyet olarak üretici firmadan 8000 TL gibi bir ücret karşılığı alınmıştır. Fakat alınan bu kitler bilimsel araştırma maksatlı olduğu için maliyet biraz yüksektir. Ancak bu kitler hastanelerde rutin çalışmalar için alınacak olunursa üretici firmadan (TIB MOLBIOL) daha ucuza temin edinilebileceği farklı firma satış temsilcilerinden öğrenilen bir unsurdur.

Sonuç olarak yapılan bu tez çalışması belirlenen amacı itibariyle Diyarbakır ilinde TPMT \*2, \*3B ve \*3C mutantlarına yönelik frekans dağılımını belirli ölçüde ortaya koymaktadır. Yapılan bu çalışmanın, tiopürin türevi bir ilaçla tedavi gereken durumlarda tedaviye başlanmadan önce özellikli hastaların TPMT enzim durumu hakkında bilgi edinmesi konusunda klinisyenlere bir yol gösterici olması düşünölmektedir.

**KAYNAKLAR****(Dergi)**

Ahsen, N. V., Armstrong, V. W., Oellerich, M. 2004. Rapid, Long-Range Molecular Haplotyping of Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) \*3A, \*3B and \*3C, *Clinical Chemistry* 50. (9):1528-1534.

Alves, S., Rocha, J., Amorim, A., Prata, M. J. 2004. Tracing the Origin of the Most Common Thiopurine Methyltransferase (TPMT) Variants: Preliminary Data from Patterns of Haplotypic Association with Two CA Repeats. *Annals of Human Genetics*. 68:313-323.

Ameway, M., Collie-Duguid, E. S. R., Powrie, R. H., Ofori-Adjei, D., Mcleod, H. L. 1999. Thiopurine Methyltransferase Alleles In British And Ghanaian Populations. *Human Molecular Genetics*. vol. 8, No. 8: 367-370.

Azad, M., Kaviani, S., Soleimani, M., Noruzinia, M., Hajfathali, A. 2009. Common Polymorphism's Analysis of Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) in Iranian Population. *Yakhteh Medical Journal*. Vol. 11, No. 3, pages: 311-316.

Ban, H., Andoh, A., Tanaka, A., Tsujikawa, T., Sasaki, M., Saito, Y., Fujiyama, Y. 2008. Analysis of Thiopurine S-Methyltransferase Genotypes in Japanese Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Inter Med.*(47): 1645-1648.

Bahari, A., Hashemi, M., Bari, Z., Moazeni-Roodi, A., Kaykhaei, M. A., Narouie, B. 2010. Frequency of Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) alleles in Southeast Iranian population. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*. 29: 237-244.

Black, A. J., Mcleod, H. L., Capell, H. A., Powrie, R. H., Matowe, L. K., Pritchard, S. C. 1998. Thiopurine Methyltransferase Genotype Predicts Therapy-Limiting Severe Toxicity From Azathioprine. *Ann Intern Med*. 129 : 716-718.

Bloomfeld, R. S., Bickston, S. J., Levine, M. E., Carrol, S. 2006. Thiopurine Methyltransferase Activity Is Correlated With Azathioprine Merabolite Leves in Patients With Inflammatory Bowel Disease in Clinical Gastroenrerology Practice. *The Journal of Applied Research*. Vol. 6, No. 4, pages: 282-287

Bomgaars, L., Evans, W. E., Hon, Y. Y., Coutre, S., Janco, R., Keller, F., Khatib, Z., Krynetski, E. Y. 2001. Preponderance of Thiopurine S-Methyltransferase Deficiency

and Heterozygosity Among Patients Intolerant to Mercaptopurine or Azathioprine. *J Clin Oncol.* 19:2293-2301.

Bonsrirat, U., Angsuthum, S., Vannaprasaht, S., Kongpunvijit, J., Hirankarn, N., Tassaneeyakul, W., Avihingsanon, Y. 2008. Azathioprine-induced fatal myelosppression in systemic lupus erythematosus patient carrying TPMT\*3C polymorphism (CASE REPORT), *Lupus.* 17: 132-134.

Boson, W. L., Romano-Silva, M. A., Correa, H., Falcao, R. P., De Marco, L., Teixeira-Vidigal, P. V. 2003. Thiopurine methyltransferase polymorphisms in a Brazilian population. *The Pharmacogenomics Journal.* 3:178-182.

Chrzanowska, M., Kurzawski, M., Drozdziak, M., Mazik, M., Oko, A., Czekalski, S. 2006. Thiopurine S-methyltransferase phenotype- genotype correlatin in hemodialyzed patients. *Pharmacological Reports ISSN 1734-1240.* 58:973-978.

Corominas, H., Domenech, M, Laiz, A., Gich, I., Diaz, C., Ceuvillas, F., Moreno, M., Biaget, M. 2003. Is thiopurine methyltransferase genetic polymorphism a major factor for withdrawl of azathioprine in rheumatoid arthritis patients?. *Rheumatology.* 42:40-45.

Coulthard, S. A., Hogarth, L. A., Little, M., Matheson, E. C., Redfern, C. P. F., Minto, L., Hall, A. G. 2002. The Effect of Thiopurine Methyltransferase Expressiob on Sensitivity to Thiopurine Drugs. *Mol Pharmacol.* 62: 102-109.

Davison, J. E. A., McMullin, M. F., Catherwood, M. A. 2006. Genotyping of thiopurine methyltransferase in patients with acute leukemia using LiGhtCycler PCR. *Leukemia & Lymphoma.* 47(8):1624-1628.

Dooley, M. J., Dixon, B., Chiang, C., Whitlock, A., Schneider, H. 2008. Phenotyping for Thiopurine Therapy in Clinical Practice. *J Pharm Pract Res.* Vol.38, No.3.

Efrati, E., Adler, L., Krivoy, N., Sprecher, E. 2009. Distibution of TPMT risk alleles of thiopurine toxicity in the Israeli polulation. *Eur J Clin Pharmacol.* 65: 257-262.

Evans, W. E. 2004. Pharmacogenetics of Thiopurine S-Methyltransferase and Thiopurine Therapy. *Ther Drug Monit.* 26:186-191.

Formea, C., Huentelman, H., Wu, R., Crabtree, J., Fujita, S., Karlix, J. L., Hemming, A. 2004. Thiopurin S-Methyltransferase Genotype Predicts Azathioprine-Induce Myelotoxicity in Kindey Transplant Recipients. *American Journal of Trasplantation*. 4:1810-1817.

Ford, L. T., Berg, J. D. 2010. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) assessment prior to starting thiopurine drug treatment; a pharmacogenomic test whose time has come. *J Clin Pathol*. 63: 288-295.

Fraga, D., Meulia, T., Frenster, S. 2008. Real-Time PCR, *Current Protocol Essential Laboratory Techniques* (Unit 10.3).

Gardiner, S. J., Gearry, R. B., Barclay, M. L., Begge, E. J. 2005. Two cases of thiopurine metyltransferase (TPMT) deficiency – a lucky save and a near miss with azathioprine. *Br J Clin Pharmacol*. 62:4, pages:473-476.

Garniere-Monteil, C., Medard, Y., Lejus, C., Bruneau, B., Pinean, A., Fenneteau, O., Bourin, M., Aigrain, E. V. 2004. Phenotype and genotype for thiopurine methyltransferase activity in the French Caucaian population: impact of age. *Eur J Clin Pharmacol*. (60):89-96.

Gearry, R. B., Barclay, M. L., Burt, M. J., Collet, J. A., Chapman, B. A., Roberts, R. L., Kennedy, M. A. 2003. Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) genotype does not predict adverse drug reactions to thiopurine drugs in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 18:395-4000.

Haglund, S., Lindqvist, M., Almer, S., Peterson, C., Taipalensuu, J. 2004. Pyrosequencing of TPMT Alleles in a General Swedish Population and in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Chemistry* 50. (2):288-295

Hall, A. G., Hamilton, P., Minto, L., Coulthard, S. A. 2001. The use of denaturing high-pressure liquid chromatography for detection of mutations in thiopurine methyltransferase. *J. Biochem. Biophys. Methods* 47. pp: 65-71.

Hamdy, S. I., Hiratsuka, M., Narahara, K., Endo, N., El-Anany, M., Mizugaki, M, Moursi, N. 2003. Genotype and allele frequencies of TPMT, NAT2, GST, SULT1A1 and MDR-I in the Egyptian population. *Br J Clin Pharmacol*. 55:560-659.

Herrmann, M. G., Durtschi, J. D., Bromley, L. K., Wittwer, C. T., Voelkerding, K. V. 2006. Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping: Cross-Platform Comparison of Instruments and Dyes. *Clinical Chemistry*. 52:3 pages:494-503.

Hiratsuka, M., Inoue, T., Omori, F., Agatsuma, Y., Mizugaki, M. 2000. Genetic Analysis Of Thiopurine Methyltransferase Polymorphism In A Japanese Population. *Mutation Research* 488. pp: 91-95.

Holme, S. A., Duley, J. A., Sanderson, J., Routledge, P. A., 2002. Erythrocyte thiopurine methyl transferase assesment prior to azathioprine in the UK. *Q J MED*. 95:439-444.

Hon, Y. Y., Fessing, M. Y., Pui, C., Relling, M. V., Krynetski, E. Y., Evans, W. E., 1999. Polymorphism Of The Thiopurine S-Methyltransferase Gene In African-Americans. *Human Molecular Genetics*. vol. 8 No. 2 : 371-376.

Hongeng, S., Sasanakul, W. Chuansumrit, A., Pakakasama, S., Chattannon, A., Hatriat, P. G. 2000. Frequency Of Thiopurine S-Methyltransferase Genetic Variation In Thai Children Acute Leukemia. *Medical And Pediatric Oncology*. 35:410-414.

Jun, J. B., Cho, D. Y., Kang, C., Bae, S. C. 2005. Thiopurine S-Methyltransferase polimorphisms and the relationship between the mutant alleles and the adverse effects in systemic lupus erythematosus patients taking azathioprine. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 23:873-876.

Kapoor, G., Maitra, Brahmachari, S&V. 2009. Application of SNaPshot for analysis of thiopurine methyltransferase gene polymorphism. *Indian J Med Res*. pp: 500-505.

Katsanos, K. H., Tsianos, E. V. 2007. Azathioprine/6-mercaptopurine toxicity: The role of TPMT gene. *ANNALS OF GASTROENTEROLOGY*. 20(4): 251-264.

Khalil, R. H., Gala, J. L., Allorge, D., Lo-Guidice, J. M., Horsmans, Y., Houdret, N., Broly, F. 2005. Identification and functional analysis of two rare allelic variants of the thiopurine S-methyltransferase gene, TPMT\*16 and TPMT\*19. *Biochemical Pharmacology*. 69: 525-529.

Kham, S. K. Y., Soh, C. K., Aw, D. C. W., Yeoh, A. E. J. TPMT\*26 ( 208F-L), a novel mutation detected in a Chinese. *Br J Clin Pharmacol*. 68:1/120-123

Kubota, T. And Chiba, K. 2001. Frequencies Of Thiopurine S-Methyltransferase Mutant Alleles ( TPMT\*2, \*3A, \*3B and \*3C ) In 151 Healthy Japanese Subjects And The Inheritance Of TPMT\*3C In The Family Of A Propositus. *B J Clin Pharmacol.* 51:475-477.

Krynetski, E. Y., Fessing, M. Y., Yates, C. R., Sun, D., Schuetz, J. D., Evans, W. E. 1997. Promoter And Intronic Sequences Of The Human Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) Gene Isolated From A Human Pac1 Genomic Library. *Pharmaceutical Research.* vol.14 No. 12.

Krynetski, E. Y., Evans, W. E. 1998. Pharmacogenetics Of Cancer Therapy: Getting Personal. *Am. J. Hum. Genet.* 63:11-16.

Krynetski, E. Y., Evans, W. E. 2003. Drug methylation in cancer therapy: lessons from the TPMT polymorphism. *Oncogene.* 22:7403-7413.

Kurzawski, M., Dziwanowski, K., Lener, A., Drozdziak, M. 2009. TPMT but not ITPA gene polymorphism influences the risk of azathioprine intolerance in renal transplant recipients. *Eur J Clin Pharmacol.* 65: 553-540.

Langley, P. G., Underhill, J., Tredger, J. M., Norris, S., Mcfarlane, I. G. 2002. Thiopurine methyltransferase phenotype and genotype in relation to azathioprine therapy in autoimmune hepatitis. *Journal of Hepatology.* 37:441-447.

Lindqvist, M., Almer, S., Peterson, C., Soderkvist, P. 2003. Real-Time RT-PCR methodology for quantification of thiopurine methyltransferase gene expression. *Eur J Clin Pharmacol.* 59:207-211.

Lohmann, S., Lehmann, L., Tabiti, K. 2000. Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System. *BIOCHEMICA.* No. 4.

McLeod, H., Relling, M. V., Liu, Q., Evans, W. E. 1995. Polymorphic Thiopurine Methyltransferase In Erythrocytes Is Indicative Of Activity In Leukemic Blasts From Children With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood.* Vol.85 No.7:1887-1992.

Moureyre, C. S., Debuysere, H., Mastain, B., Vinner, E. Marez, D., Chevalier, D. 1998. Genotypic And Phenotypic Analysis Of Polymorphic Thiopurine S-Methyltransferase gene (TPMT) In A European Population. *British Journal Of Pharmacology.* 125:879-887.

Nasednika. T. V., Fedorova, O. E., Glotov, A. S., Chupova, N. V., Samochatova, E. V., Maiorova, O. A. 2006. Rapid genotyping of common deficient thiopurine S-methyltransferase alleles using the DNA-microchip technique. *European Journal of Human Genetics*. 14:991-998.

Naughton, M. A., Battaglia, E., O'Brien, S., Walport, M. J., Botto, M. 1999. Identification Of Thiopurine Methyltransferase (TPMT) polymorphisms Cannot Predict Myelosuppression In Systemic Lupus Erythematosus Patients Taking Azathioprine. *Rheumatology*. 38:640-644.

Oh, K.-T., Anis, A. H., Bae, S. C. 2004. Pharmacoeconomic analysis of thiopurine methyltransferase polymorphism screening by polymerase chain reaction for treatment with azathioprine in Korea. *Rheumatology*. (43):156-163.

Okada, Y., Nakamura, K., Kodama, T., Ueki, K., Tsukada, Y., Maezawa, A., Tsukamoto, N., Noijima, Y., Ishizaki, T., Horiuchi, R., Yamamoto, K. 2005. Thiopurine Methyltransferase Genotype and Phenotype Status in Japanese Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Biol. Pharm. Bull.* 28(11):2117-2119.

Ottersness, D. M., Szumlanski, C. L., Wood, T. C., Weinshiloum, R. M. 1998. Human Thiopurine Methyltransferase Pharmacogenetics. *J. Clin. Invest.* 101, No. 5: 1036-1044.

Payne, K., Newman, W., Fargher, R., Tricker, K., Bruce, I. N., Ollier, W. E. R. 2007. TPMT testing in rheumatology: any better than routine monitoring?. *Rheumatology*. 46: 727-729.

Pavlovic, S. 2009. TPMT gene polymorphisms: On the doorstep of personalized medicine. *Indian J Med Res.* pages: 478-480.

Reuther, L. O., Sone, J., Larsen, N., Dalherup, J. F., Thomsen, O. O. 2003. Thiopurine methyltransferase genotype distribution in patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 17:65-68.

Reuther, L. O., Vainer, B., Sone, J., Larsen, E. V. 2004. Thiopurine methyltransferase (TPMT) genotype distribution in azathioprine-tolerant and -intolerant patients with various disorders. The impact of TPMT genotyping in predicting toxicity. *Eur J Clin Pharmacol.* (59):797-801.

Roberts, R. L., Barclay, M., Gearry, R. B., Kennedy, M. A. 2004. A multiplexed allele-specific polymerase chain reaction assay for the detection of common thiopurine S-methyltransferase (TPMT) mutations. *Clinica Chemica Acta*. 341:49-53.

Rossi, A. M., Bianchi, M., Guarnieri, C., Barale, R., Pacifici, G. M. 2001. Genotype-phenotype correlation for thiopurine S-methyltransferase in healthy Italian subjects. *Eur J Clin Pharmacol*. 57:51-54.

Sohoeli, Z., Samiei, S. 2005. Real Time PCR: Principles and Applications. *Hepatitis Monthly*. 5(3): 83-87.

Samochatova, E. V., Chupova, N. V., Rudneva, A., Makarova, O. Nasednika, T. V., Glotov, A. S., Kozhekbaeva, Z., Roumyantsev, A. G., Krynetski, E. Y., Evans, W. E. 2009. TPMT Genetic Variations in Populations of the Russian Federation. *Pediatr Blood Cancer*. 52: 203-208.

Sayitoğlu, M. A., Yıldız, İ., Hatırnaz, Ö., Özbek, U. 2006. Common Cytochrome p4503A (CYP3A4 and CYP3A5) and Thiopurine S-methyl Transferase (TPMT) Polymorphisms In Turkish Population. *Turk J Med Sci*. 36:11-15.

Schaeffeler, E., Eichelbaum, M., Reinisch, W., Zanger, U. M., Schwab, M. 2006. Three Novel Thiopurine S-Methyltransferase Allelic Variants ( TPMT\*20, \*21, \*22) – Association With Decreased Enzyme Function, *HUMAN MUTATION Mutation in Brief*.

Schaeffeler, E., Zanger, U. M., Eichelbaum, M., Asante-Poku, S., Shin, J. G. Schwab, M. 2008. Polimorphisms of the TPMT gene in the Czech healthy population and patient with inflammatory bowel disease. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids*. 27: 835-838.

Schaeffeler, E., Lang, T., Zanger, U. M., Eichhelbaum, M.Schwab, M. 2001. High-Throughput Genotyping of Thiopurine S-Methyltransferase by Denaturing HPLC *Clinical Chemistry*. vol.7, No. 3:548-555

Shazia, A., Seshadri, M. 2009. Characterization of TPMT Minisatellite Locus in Five Ethnic Groups of India. *Russian Journal of Genetics*. Vol. 45, No. 1, pages: 123-127.

Sies, C., Florkowski, C., George, P. Gearry, R., Barclay, M., Harraway, J., Pike, L., Walmsley, T. 2005. Measurement of thiopurine methyl transferase activity guides dose-initiation and prevents toxicity from azathioprine. *NZMJ*. vol. 118, No. 1210, pages:1-7.

Stocco, G., Martellosi, S., Barabino, A., Fontana, M. Lionetti, P. Decorti, G., Malusa, N., Bartoli, F., Fezzi, M., Giraldi, T., Ventura, A. 2005. TPMT genotype and use of thiopurines in pediatric inflammatory bowel disease. *Digestive and Liver Disease*. 37:940-945.

. Tamori, A., Shinzaki, M., Kasoka, S., Hayashi, T., Iwai, S., Enomoto, M., Habu, D., Sakaguchi, H., Kawada, N., Hino, M. 2007. Thiopurine S-methyltransferase gene polymorphism in Japanese patients with autoimmune liver disease. *Liver International* ISSN 1478-3223.

Tanaka, T., Seki, T., Nakamura, Y. 2000. Genomic Structure And Multiple Single-Nucleotide Polymorphisms (SNPs) Of The Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) Gene. *J Hum Genet*. 45:299-302.

Thomsen, J. B., Schroder, H., Kristinsson, J., Szumlanski, J., Weinshilboum, R., Anderse, J., Schmiegelow, K. 1999. Possible Carcinogenic Effect of 6-Mercaptopurine on Bone Marrow Stem Cells. *CANCER*. Vol. 86, No. 6. pages: 1080-1086.

Tümer, T. B., Ulusoy, G., Adalı, O., Şahin, G., Gözdaşoğlu, S., Arınç, E. 2007. The low frequency of defective TPMT alleles in Turkish population: A study on pediatric patients with acute lymphoblastic leukemia. *Am. J. Hemetol*. 82: 906-910.

Wang, L., Nguyen, T. V., McLaughlin, R. W., Sikkink, L. A., Ramirez-Alvarado, M., Weinshilboum, R. M. 2005. Human thiopurine S-methyltransferase pharmacogenetics: Variant allozyme misfolding aggregates formation. *PNAS*. vol. 102, No. 26, pages: 9394-9399.

Weinshilboum, R., Sladek, S. 1980. Mercaptopurine Pharmacogenetics: Monogenic Inheritance of Erythrocyte Thiopurine Methyltransferase Activity. *Am J Hum Genet*. 32:651-662.

Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. D., Elenitoba, K. S. 2001. Real-Time Multiplex PCR Assays. *Elsevier Science (Methods)*. 25:430-442.

Wittwer, C. T., Dietmaier, W., Sivasubramanian, N. 2002. *Rapid Cycle Real-Time PCR : Genetics and Oncology*. Springer Verlag KG.

Wood, N., Fraser, A., Bidwell, J., Standen, G. 2004. RT-PCR Permits Simultaneous Genotyping of Thiopurine S-methyltransferase Allelic Variants by Multiplex Induced Heteroduplex Analysis. *HUMAN MUTATION*. (24):93-99.

Yates, C. R., Krynetski, E. Y., Fessing, M. Y., Loennechen, T., Evans, W. E. 1997. Molecular Diagnosis Of Thiopurine S-Methyltransferase Deficiency: Genetic Basis For Azathioprine And Mercaptopurine Intolerance. *Ann Intern Med.* 126: 608-614.

Yong, P. W., Innocenti, F., Ratain, M. J. 2006. The role of pharmacogenetics in cancer therapeutics. *Br J Clin Pharmacol.* 62/1: 35-46.

Zhang, J. P., Guan, Y. Y., Xu, A. L., Wu, J. H., Wei, H., Huang, M. 2004. Gene mutation of thiopurine S-methyltransferase in Uygur Chinese. *Eur J Clin Pharmacol.* 60:1-3.

Zhang, J. P., Zhou, S. F., Chan, X., Huang, M. 2006. Determination of intra-ethnic differences in the polymorphisms of thiopurine S-methyltransferase in Chinese. *Clinica Chemica Acta* 365. pages: 337-341.

Zhou, S. 2006. Clinical Pharmacogenomics of Thiopurine S-methyltransferase. *Current Clinical Pharmacology.* 1: 119-128.

**(Kitap)**

Persing, D. H., Tenover, F. C., Versalovic, J., Tang, Y. W., Unger, E. R., Relman, D. A., Thomas, J. 2006., Real-Time PCR, MOLECULAR MICROBIOLOGY Diagnostic Principles and Practice. pp:71.

**(Tez)**

Genç, A. 2009. TIOPÜRİN S-METİL TRANSFERAZ GENOTİPLERİNİN BELİRLENMESİ. Doktora Tezi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. 3-8-9-27-28.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Koray GELEN

Doğum Yeri: KARS

Doğum Tarihi: 16.07.1984

Medeni Hali: Bekar

Yabancı Dili: İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Adana Şehit Temel Cingöz Lisesi (1998-2001)

Lisans : Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi  
Biyoloji Bölümü (2003-2008)

Yüksek Lisans : Dicle Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji  
Anabilim Dalı (2008-2010)

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Yayınları (SCI ve diğer):