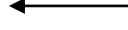


ELİF ZENGİNOL



Adınızı soyadınızı giriniz

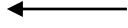
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

Tez kabul edildikten sonra eğer basılacak ise yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak

Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya (sol yandaki gibi) olacak .

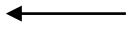


YÜKSEK LİSANS TEZİ



Tez, Yüksek Lisans'sa, YÜKSEK LİSANS TEZİ;
Doktora ise DOKTORA TEZİ ifadesi kalacak

İSTANBUL-2023



Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

KISRAKLARDA MATERNAL PLAZMADA AMELY VE
GAPDH GENLERİNİN ANALİZİ VE KANTİTASYONU

ELİF ZENGİNOL

DANIŞMAN
DOÇ. DR. BİLGE ŞADAN ÖZSAİT SELÇUK

GENETİK ANABİLİM DALI
GENETİK TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

İSTANBUL-2023

İTHAF

Sevgili aileme ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimime başladığım ilk günden bu yana ve bu tez çalışmasını hazırlama süreci boyunca bilgi birikimi ve desteğiyle her zaman yanımda olan ve bana her türlü imkanı sağlayarak beni her zaman motive edip benimle birlikte emek veren sevgili danışmanım Doç. Dr. Bilge Şadan ÖZSAİT SELÇUK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisansüstü eğitimime başladığım ilk günden bu yana desteğiyle yanımda olan sevgili Prof. Dr. Burçak VURAL'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışmasının periferik kan örneklerinin sağlanmasında ve çalışmanın gelişiminde katkıları olan sevgili Prof. Dr. Mehmet Can Gündüz'e ve Doç. Dr. Zeynep Günay UÇMAK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Bu tez çalışmasının genetik analizlerini yürütürken bilgi birikiminden ve teknik desteğinden yararlandığım sevgili Prof. Dr. Ayşe Evrim BAYRAK'a teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm lisansüstü eğitimim boyunca bana her zaman güler yüzle destek olan Aziz Sancar DETAE Genetik Anabilim Dalındaki sevgili hocalarıma ve araştırma laboratuvarlarındaki öğrenci arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunuyorum.

Lisansüstü eğitimim boyunca bu yolda benimle birlikte yürüyen ve her türlü destekleri ve motivasyonları ile yanımda olan sevgili arkadaşlarım Mol. Bio. Rukiye ASLAN ve Mol. Bio. Çağla DÖNMEZ'e teşekkürlerimi sunuyorum.

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi her türlü destekleriyle her zaman yanımda olan ve bana her türlü imkanı sağlayan sevgili aileme teşekkürlerimi ve şükranlarımı sunuyorum.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından kısmen desteklenmiştir. Proje No: 31671

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	viii
ÖZET	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Dolaşımdaki Serbest Hücre Dışı DNA	5
2.2. Hücre Dışı DNA'nın Kökeni	6
2.3. Hücre Dışı DNA'nın Yapısal Özellikleri.....	9
2.4. Dolaşımdaki Serbest Hücre Dışı DNA'nın Kullanım Alanları.....	12
2.5. Maternal Plazmadaki Hücre Dışı DNA Konsantrasyonunun Gebelik Aylarına Göre Değişimi.....	15
2.6. Maternal Plazmadaki Hücre Dışı DNA ile Fetal Cinsiyet Tayini.....	16
2.7. <i>AMELY</i> Geni	17
2.8. <i>GAPDH</i> Geni	19
2.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	23
3.1. Gereç	23
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	23
3.1.2. Kullanılan Kitler	24
3.1.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasallar	25
3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler.....	26
3.1.5. Kullanılan Sarf Malzemeler	27
3.2. Yöntem.....	28
3.2.1. Maternal Kan Örneklerinin Toplanması	28
3.2.2. Maternal Kan Örneklerinden Plazma Eldesi.....	28

3.2.3. cfDNA İzolasyonu	29
3.2.4. İzole Edilen cfDNA'ların Konsantrasyonlarının Ölçümü	31
3.2.5. Primer Tasarımı.....	31
3.2.6. Touch-Down PCR.....	33
3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi	34
3.2.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR.....	35
3.2.9. Çözülme Eğrisi Analizi.....	37
3.2.10. İstatistiksel Analizler ve Data Analizi	37
4. BULGULAR.....	38
4.1. Gebelik Süresi Boyunca Gestasyonel Aylarda Maternal Plazmadaki cfDNA Konsantrasyonlarının Değişimi	38
4.2. Gebeliğin Üç Üçayında Maternal Plazmadaki cfDNA Konsantrasyonlarının Değişimi.....	40
4.3. Dişi ve Erkek Fetüs Taşıyan Kısıraklarda cfDNA Konsantrasyonlarının Karşılaştırılması	41
4.4. <i>AMELY</i> Geninin Analizinde Gerçekleştirilen Optimizasyon Bulguları	42
4.4.1. <i>GAPDH</i> Genine Ait Optimizasyon Verileri.....	44
4.5. <i>AMELY</i> Geninin qRT-PCR Analizi Sonucunda Elde Edilen Bulgular.....	45
4.6. <i>AMELY</i> Geni Amplifikasyon Reaksiyonlarının Gebelik Aylarında Karşılaştırılması	46
4.7. <i>GAPDH</i> Geninin qRT-PCR Analizi Sonucunda Elde Edilen Bulgular.....	46
4.8. <i>AMELY</i> Genine Ait Çözülme Eğrisi Analizi	47
4.9. <i>GAPDH</i> Genine Ait Çözülme Eğrisi Analizi.....	49
5. TARTIŞMA	50
KAYNAKLAR	55
İNTİHAL RAPOR FORMU.....	65

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Kullanılan cihazların listesi.....	23
Tablo 3-2: Kullanılan solüsyonların listesi.....	25
Tablo 3-3: Kullanılan kimyasalların listesi.....	26
Tablo 3-4: <i>AMEL</i> genine özgü tasarlanan primerlerin dizisi.....	31
Tablo 3-5: <i>AMELX</i> (Query) ve <i>AMELY</i> (Subject) dizilerinin programında birbirlerine olan benzerliklerinin karşılaştırılması.....	32
Tablo 3-6: <i>GAPDH</i> geninin primer dizisi.....	32
Tablo 3-7: TD-PCR içeriği	33
Tablo 3-8: TD-PCR koşulları	34
Tablo 3-9: qRT-PCR yönteminde kullanılan bileşenler ve miktarları.....	35
Tablo 3-10: qRT-PCR tekniğinde uygulanan koşullar	36
Tablo 3-11: qRT-PCR tekniğinde kullanılan ısılar.....	36
Tablo 4-1: Gebe kısıraklarda tüm gebelik aylarında maternal plazmadaki cfDNA (ng/mL plazma) konsantrasyonları	39
Tablo 4-2: Kısıraklarda gebeliğin üç üç ayında maternal plazmadaki total cfDNA konsantrasyonları	40
Tablo 4-3: Dişi ve erkek fetüs taşıyan kısıraklarda cfDNA konsantrasyonlarının karşılaştırılması (n=8).....	41
Tablo 4-4: Kısırakların gebelik boyunca <i>AMELY</i> geninin ortalama Ct değerinin karşılaştırılması (n=8).....	46

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1 : cfDNA'nın keşiflerinin kronolojik olarak gösterimi [31].	5
Şekil 2-2: cfDNA'nın salınım mekanizmalarının gösterimi [49].	8
Şekil 2-3: Plazmada ve üriner sistemde bulunan cfDNA'ların gösterimi [52].	10
Şekil 2-4: Maternal plazmada bulunan cfDNA ile fetal cfDNA'nın gösterimi [57].	11
Şekil 2-5: Maternal plazmada gebeliğin üç aylarındaki cfDNA konsantrasyonları [77].	16
Şekil 2-6: qRT-PCR yönteminde SYBR GREEN çalışma prensibinin gösterimi [101].	22
Şekil 4-1: <i>AMELY</i> genine özgü TD-PCR ürünlerinin 1:10 dilüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çözülme eğrisi analizi.	42
Şekil 4-2: <i>AMELY</i> genine özgü primerler kullanılarak 1:500 dilüe edilmiş TD PCR ürünleri kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çözülme eğrisi analizi.	43
Şekil 4-3: <i>AMELY</i> genine özgü primerler kullanılarak 1:1000 dilüe edilmiş TD-PCR ürünleri kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çözülme eğrisi analizi.	43
Şekil 4-4: <i>GAPDH</i> genine özgü primerler kullanılarak 1:10 dilüe edilmiş TD-PCR ürünleri kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çözülme eğrisi analizi.	44
Şekil 4-5: <i>GAPDH</i> genine özgü primerler kullanılarak 1:500 dilüe edilmiş TD-PCR ürünleri kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çözülme eğrisi analizi.	44
Şekil 4-6: <i>AMELY</i> genine özgü qRT-PCR analizinde amplifikasyon eğrileri.	45
Şekil 4-7: <i>GAPDH</i> genine ait qRT-PCR analizinde amplifikasyon eğrileri.	47
Şekil 4-8: <i>AMELY</i> genine ait çözülme eğrisi analizi	48
Şekil 4-9: <i>AMELY</i> genine ait çözülme eğrisi analizi	48
Şekil 4-10: <i>GAPDH</i> genine ait çözülme eğrisi analizi	49

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

cfDNA: Cell free DNA

cffDNA: Cell free fetal DNA

DNA: Deoksiribonükleik asit

RNA: Ribonükleik asit

bç: Baz çifti

qRT-PCR: Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

AMELX: Amelogenin X

AMELY: Amelogenin Y

SRY: Sex determining region Y

ZFX/ZFY: Zinc finger

TD-PCR: Touch-Down polimeraz zincir reaksiyonu

GAPDH: Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz

HDL: Yüksek yoğunluklu lipoprotein

LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein

cfmtDNA: Cell free mitokondriyal DNA

NCP: Nükleozom çekirdek parçacığı

IVF: Tüp bebek

NET: Nötrofil hücre dışı ağları

NIPT: Non-invaziv prenatal test

RhD: Rhesus D

XIST: X-inactive specific transcript

DDX3Y: DEAD-Box helicase 3

RPS4Y1: Ribosomal Protein S4 Y-Linked 1

TSPY: Testis Specific Protein Y-Linked

DNaz: Deoksiribonükleaz

cDNA: Komplementer DNA

HKG: Housekeeping gen

mRNA: Mesajcı RNA

EtBr: Etidyum Bromür

Ct: Eşik siklusunun değeri

mL: Mililitre

µL: Mikrolitre

µM: Mikromolar

L: Litre

dNTP: Deoksinükleotid trifosfat

dk: Dakika

EtOH: Etanol

nm: Nanometre

ng: Nanogram

UV: Ultraviyole

Tm: Erime derecesi

GA: Gestasyonel ay

ÖZET

Zenginol E. Kısıraklarda Maternal Plazmada *AMELY* ve *GAPDH* Genlerinin Analizi ve Kantitasyonu. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Genetik ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2023.

Dolaşımdaki serbest hücre dışı fetal DNA (cell free fetal DNA, cffDNA) maternal kanda serbest olarak bulunan ve boyutu yaklaşık olarak 80-200 baz çifti (bç) uzunluğu arasında değişkenlik gösteren küçük DNA fragmentleridir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR (qRT-PCR) tekniği kullanılarak maternal plazmada bulunan hücre dışı DNA'nın (cell free DNA, cfDNA) tespiti hassas ve doğruluğu yüksek şekilde gerçekleştirilebilmektedir.

Yarış atlarında ve damızlık atlarda fetal cinsiyetin tayin edilmesi, hayvan yetiştiriciliği alanında ve ekonomik alanda önem taşımaktadır. Amelogenin Y (*AMELY*), sex determining region Y (*SRY*) ve Zinc Finger (*ZFX/ZFY*) genleri kısıraklarda fetal cinsiyet tayininde kullanılan genler arasında gösterilmektedir.

Bu tez çalışması kapsamında, 15 gebe kısırağın maternal plazmasından izole edilen cfDNA örneklerinde, Touch-Down PCR (TD-PCR) ve kantitatif gerçek zamanlı PCR deneylerinin optimizasyonu ve *AMELY* ve Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (*GAPDH*) genlerinin maternal plazmada kantitatif analizleri gerçekleştirilmiştir. Ek olarak, 15 kısırakta tüm gebelik süresince (1-11. aylar) izole edilen cfDNA örneklerinin gestasyonel aylara ve 8 kısırakta gebelik uçaylarına göre plazma konsantrasyonlarındaki değişimi analiz edilmiştir. Tez çalışması sonucunda, maternal kanda cfDNA'nın analizi ile erkek ve dişi fetüsler arasında *AMEL* geninindeki farklılığın tespit edilebildiği ancak bu tespitin cfDNA'nın kalitesi ile doğru orantılı olduğu belirlendi. Maternal cfDNA konsantrasyonlarının ortalamasının her bir üçayda farklı olduğu ve özellikle 3. ayda dişi fetüs taşıyan gebelerde erkek fetüs taşıyanlara göre anlamlı olarak yüksek olduğu tespit edilmiştir ($p=0,024$).

Anahtar Kelimeler: Maternal plazma, cfDNA, *AMELY*, *GAPDH*, fetal cinsiyet, kısırak

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından kısmen desteklenmiştir. Proje No: 31671

ABSTRACT

Zenginol E. Analysis and Quantification of *AMELY* and *GAPDH* Genes from Maternal Plasma in Mares. İstanbul University, Institute of Health Science, Department of Genetics MSc Thesis. İstanbul. 2023.

Circulating cell free fetal DNA (ccffDNA) is small fragments that exist in maternal blood and vary in size from approximately 80-200 base pairs (bp) length. By using the quantitative real-time PCR (qRT-PCR) technique, the detection of cell free DNA (cfDNA) in maternal plasma can be performed sensitively and with high accuracy.

Determination of fetal sex in race horses and stud horses is important in domestic and economic field. Amelogenin Y (*AMELY*), sex determining region Y (*SRY*) and Zinc Finger (*ZFX/ZFY*) genes are among the genes used in fetal sex determination in mares.

In the scope of the thesis, we conducted, optimization of Touch-Down PCR (TD-PCR) and quantitative real-time PCR (qRT-PCR) experiments and quantitative analyzes of *AMELY* and *GAPDH* (Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) genes in maternal plasma were performed using cfDNA samples isolated from maternal plasma of 15 pregnant mares. In addition, the change in plasma concentrations of cfDNA samples isolated during the whole pregnancy (1-11 months) in 15 mares according to gestational months and in 8 mares by trimesters were analyzed. In the result of the thesis study, it was determined that discrimination of *AMEL* gene between male and female fetuses could be performed in maternal blood cfDNA samples. However, this determination was directly proportional to the quality of cfDNA. It was found that the mean of maternal cfDNA concentrations were different in each trimester and it was significantly higher in pregnant women carrying a female fetus, especially in the 3rd month, compared to those carrying a male fetus ($p=0.024$).

Key Words: Maternal plasma, cfDNA, *AMELY*, *GAPDH*, fetal gender, mare

The present work was partially supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 31671

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hücre dışı serbest DNA (cfDNA) ilk olarak 1948'de sistemik lupus eritematozuslu hastalardan elde edilen örneklerde tanımlanmıştır. Serum cfDNA seviyeleri ise ilk kez 30 yıl sonra kanser hastalarının örneklerinde incelenmiş ve dolaşımdaki toplam cfDNA miktarının kanserli hastalarda sağlıklı bireylere göre daha yüksek olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, plazmada artış gösteren cfDNA konsantrasyonu, sadece malignitelere özgü değildir; gebe kadınların plazma örneklerinde ve transplantasyon yapılan hastalarda da yüksek miktarda cfDNA konsantrasyonu tespit edilmiştir. Yüksek miktardaki cfDNA konsantrasyonu aynı zamanda fizyolojik ve malign olmayan patolojik süreçler, iltihaplanma, diyabet, doku travması, sepsis ve miyokard enfarktüsü gibi etkenler sonucunda da tespit edilebilmektedir [1]. Sağlıklı bireylerde, dolaşımdaki cfDNA seviyeleri 0–100 ng/mL aralığındadır [2].

cfDNA, çeşitli formlarda bulunan ve multimoleküler kompleksle ilişkide olabilen farklı DNA tiplerini içeren heterojen bir yapı olarak tanımlanmaktadır. Diğer yandan, patolojik veya fizyolojik koşullarda vücut sıvılarında tespit edilebilen atık bir molekül olarak da değerlendirilebilmektedir. Salınım, biyolojik aktivite ve hücreden temizlenme aşamaları, cfDNA'nın ömrünün üç ana bileşeni olarak kabul edilmektedir [1].

cfDNA'nın kökeninin tanımlanması, etkilenen doku veya organların belirlenmesine ve cfDNA'nın dolaşıma salınım mekanizmalarının aydınlatılmasına katkı sağlamaktadır. Promotör metilasyonunun dokuya özgü paternlerinin tanımlanması [3][4], dolaşımda bulunan nükleozomlardaki dokuya özgü modifikasyonların analizi [5][6] ve dokuya özgü DNA parçalanma modellerinin veya nükleozom yerleşiminin tanımlanması, cfDNA'nın kökeninin araştırılması amacı ile kullanılan yaklaşımlar arasındadır [7][8][9]. cfDNA salınımında yer alan mekanizmalar cfDNA alt fraksiyonlarının analizi ile tespit edilebilmektedir. cfDNA, çift sarmallı nükleer DNA ve miyokondriyal DNA'dan (mtDNA) köken almaktadır. Mitokondriyal cfDNA'nın (mtcfDNA) boyutu yaklaşık olarak 30-80 bp aralığındadır [2]. Ek olarak, küçük

kromozom dışı dairesel DNA, mikroDNA ve tek sarmallı viral, bakteriyel DNA'lar da tanımlanmıştır [10][11].

Dolaşımdaki cfDNA miktarı, hücrelerden salınımı ile temizlenme oranı arasındaki dengeye bağlıdır. cfDNA'nın dolaşıma salınımı ilk olarak, apoptoz, nekrotik hücre ölümü ve NETosis olarak adlandırılan hücresel temizleme sistemlerinden kaynaklanmaktadır. İkinci olarak, ağ benzeri kromatin ve proteaz yapılarının kan dolaşımına salınımını sağlayan nötrofillerden kaynaklanmaktadır. Sağlıklı bireylerde, cfDNA'nın büyük çoğunluğu kan hücreleri, endotel hücreleri ve hepatositlerden kaynaklanırken hastalık durumlarında patolojik dokular dolaşımdaki cfDNA havuzuna katkıda bulunmaktadır. cfDNA klirensinin altında yatan potansiyel mekanizmalar arasında karaciğer ve dalakta, retiküloendotelial sistem tarafından gerçekleştirilen aktif alım, renal sistem tarafından gerçekleştirilen pasif filtrasyon ve nükleazlar tarafından gerçekleştirilen doğrudan bozunma yer almaktadır [12].

cfDNA'nın dolaşımdan temizlenmesi, karaciğer, dalak ve böbrekte gerçekleşmektedir. Karaciğer, nükleozom klirensi için ana organdır. Nükleozomların %71.0 ile %84.7'si 10 dakika içinde dolaşımdan uzaklaştırılmaktadır. Karaciğerdeki kupffer hücrelerinin ve dalaktaki makrofajların, DNA ve nükleozomların yakalanması ve temizlenmesinden sorumlu olduğu gösterilmiştir [1]. Dolaşımdaki cfDNA'nın tahmini yarı ömrü birkaç dakika ile 1-2 saat arasında değişmektedir [13][14]. Fetal cfDNA'nın maternal dolaşımdan temizlenmesi iki faz şeklinde gerçekleşmektedir. İlk olarak, ortalama yarılanma ömrü yaklaşık olarak 10 dakika ile 1 saat olan hızlı bir faz meydana gelmektedir. İkinci olarak, ortalama yarı ömrü yaklaşık olarak 13 saat olan yavaş bir faz oluşmaktadır [15].

İnsanlarda vücut sıvılarında cfDNA'ların pek çok salınım ve temizlenme mekanizmaları olduğu ve çeşitli cfDNA fragmenti popülasyonlarının sürekli olarak yenilendiği gösterilmiştir. Solid tümörlerin, fetal genetik anomalilerin, organ nakli redlerinin ve enfeksiyonların teşhis ve izlenme şeklini değiştirmekte olan, prenatal dönemde fetal cinsiyet tayini için yüksek potansiyelde olan cfDNA analizlerinin geliştirilmesiyle cfDNA'nın bu gibi çalışma alanlarında biyobelirteç olarak tanımlanması konusunda dikkate değer bir ilerleme kaydedilmiştir [16].

cfDNA, non-invaziv prenatal tarama veya tanı amacı ile hastalıkların saptanmasında kullanılmaktadır [17]. İlk olarak 1997 yılında, erkek fetüs taşıyan gebe

kadınların plazmasında Y kromozomu dizilerinin tespit edilmesi ile tanımlanmıştır [18]. cffDNA'nın ana kökeninin, sinsitiyotrofoblasttan sinsityal düğümler şeklinde salınan trofoblastik kökenli hücreler olduğu öne sürülmektedir. cffDNA, insanlarda gebeliğin 4. haftasından itibaren saptanabilmektedir. Bununla birlikte, cffDNA gebeliğin yaklaşık olarak 6-7. haftalarından itibaren klinik testler için daha güvenilir bir şekilde kullanılabilir seviyeye ulaşmaktadır [17].

Domestik hayvanlarda cfDNA'nın değerlendirilmesi ve analizi ile ilgili pek çok çalışma mevcuttur [19]. Gebe kısıraklarda fetüsün cinsiyetinin belirlenmesi amacı ile geliştirilen bir yöntem ile Y kromozomundaki cinsiyet belirleyici bölge (sex-determining region Y, *SRY*) ve amelogenin genlerine (*AMEL*) özgü dizilerinin eş zamanlı amplifikasyonu ile başarılı çalışmalar gerçekleştirilmiştir [20]. Kısıraklarda yürütülen çalışmalarda Amelogenin Y (*AMELY*), *SRY* ve Zinc finger (*ZFX/ZFY*) genleri fetal cinsiyet tayininde kullanılan genler arasındadır. *AMELY* geninin fetal cinsiyeti tayin etme etkinliğini araştıran az sayıda çalışma bulunmaktadır [21].

Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu tekniği, fetal DNA'nın varlığının doğrulanması ve non-invaziv fetal cinsiyet tayini için güvenilir bir yöntem olarak kullanılmaktadır [22]. qRT-PCR, plazma ve serumdaki DNA miktarının tespitinde yaygın olarak kullanılan bir tekniktir ve bu teknik ile serbest veya proteine bağlı olarak dolaşımda yer alan cfDNA tespit edilebilmektedir. Fetal cinsiyet tayini için hassasiyeti yüksek bir tekniktir. cffDNA'nın varlığını doğrulamak için etkin fetal ve referans genlerin geliştirilmesi bu analizin doğrulunun yükselmesi için önem taşımaktadır [23]. Birbirinden bağımsız şekilde gerçekleştirilen farklı çalışmalar sonucunda, fetal Y kromozomunun tespiti için *SRY* geninin kullanıldığı q-RT PCR tekniğinin özgüllüğünün % 92,8 ile %100 arasında olduğu tespit edilmiştir [24].

Planlanan bu tez çalışmasında, maternal kanda fetal cfDNA'ların kantitatif olarak analiz edilmesi ile fetüsün cinsiyetinin belirlenmesi ve gebelik boyunca cfDNA konsantrasyonlarının karşılaştırılması amaçlandı. Seçilen sekiz gebe kısırağın 3., 6., 10. gestasyonel aylarında maternal plazmadan izole edilen cfDNA örneklerinde qRT-PCR yöntemi ile *AMELY* ve kontrol olarak Gliseraldehid 3-Fosfat Dehidrogenaz (*GAPDH*) genlerinin kantitatif analizleri yapılarak cinsiyetin tespitindeki etkinlik farklılığı karşılaştırıldı. Ek olarak, tüm kısıraklarda tüm gebelik süresince (1-11. aylar) izole edilen dolaşımdaki serbest cfDNA örneklerinin gestasyonel aylara ve seçilen sekiz

kısırakta gebelik üçaylarına göre plazma konsantrasyonlarındaki değişimi analiz edildi. Gebelik süresi boyunca farklı gestasyonel aylarda *AMELY* geninin fetal cinsiyet tayini yönünde etkinliğinin araştırıldığı az sayıda çalışma bulunması ve tüm gebelik süresinde maternal plazmada her bir gestasyonel aydaki cfDNA konsantrasyonlarının karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmaması bu tez çalışmasının özgünlüğü açısından önem taşımaktadır.

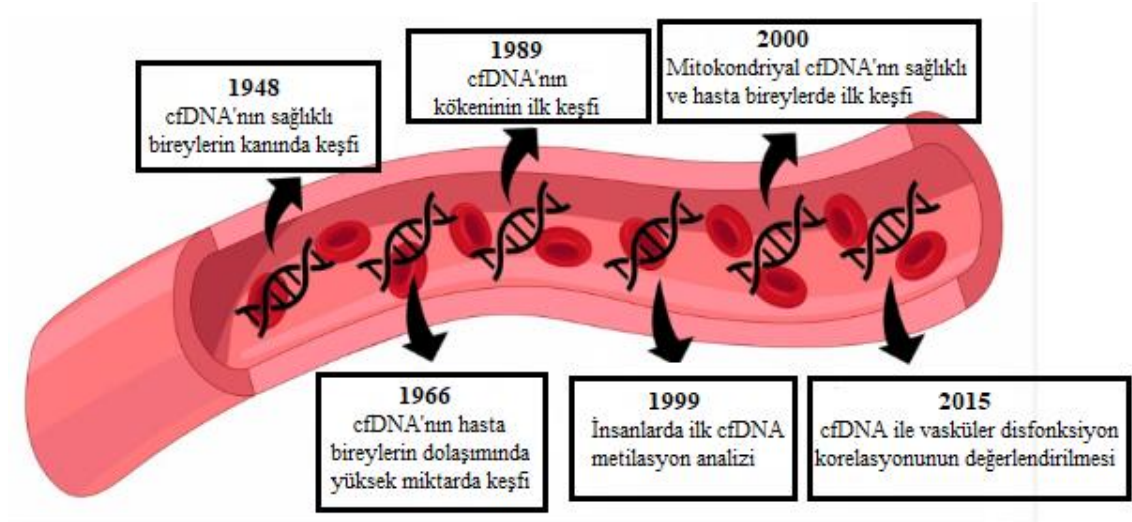


2. GENEL BİLGİLER

2.1. Dolaşımdaki Serbest Hücre Dışı DNA

Hücre dışı DNA'nın kan plazmasındaki varlığı ilk olarak 1948 yılında Mandel ve Metais tarafından gösterilmiştir [25]. Takip eden yıllarda kanser ve çeşitli hastalıklarla olan ilişkisi ve biyobelirteç olarak değeri araştırılmıştır. 1965 yılında yapılan bir çalışmada, neoplastik hücrelerden türetilen cfDNA'nın metastazlarda rol oynayabileceği gösterilmiştir [26]. İlerleyen yıllarda radyoimmunoassay tekniği ile kanser hastalarının yarısının kontrollere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek cfDNA seviyelerine sahip olduğu gösterilmiştir [27]. Ek olarak, 1970'lerin başında otoimmün hastalığı olan hastalarda cfDNA tanımlanmıştır [28]. Miyokard enfarktüsü, inme şiddeti, katı tümörler ve fetal genetik anomaliler olmak üzere birçok hastalık için invaziv olmayan bir tarama biyobelirteci olarak vurgulanmıştır [29]. Klinik kanser araştırmalarında cfDNA'nın önemi, akut miyeloid lösemi ve miyelodisplastik sendromlu hastaların cfDNA'sında *N-RAS* geninin nokta mutasyonlarının tanımlandığı 1994 yılında kabul edilmiştir [30].

cfDNA'nın keşiflerinin kronolojik olarak gösterimi Şekil 2-1'de verilmiştir.



Şekil 2-1 : cfDNA'nın keşiflerinin kronolojik olarak gösterimi [31].

Çeşitli insan hastalıkları ile ilişkisi nedeniyle cfDNA, son yıllarda klinik bir öneme sahip olmuştur ve invaziv olmayan, doğru, hassas ve hızlı bir biyobelirteç olarak klinik faydası yüksek olan aktif bir araştırma alanıdır [32].

cffDNA'nın plasenta kaynaklı sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast hücrelerinin apoptoza uğraması sonucu maternal dolaşıma katılım gösterdikleri ve fetal hematopoetik hücreler kaynaklı oldukları bulunmuştur [33]. Fetal hematopoetik hücreler düşük bir oranda etki göstermektedirler ve serbest fetal DNA'nın temel kaynağı plasenta kökenlidir [34]. Ayrıca plazmadaki maternal kökenli yapıların kaynağı ise maternal hematopoetik hücreler ve farklı maternal dokular olarak gösterilmektedir [35].

2.2. Hücre Dışı DNA'nın Kökeni

cfDNA'nın çoklu mekanizmalar tarafından dolaşıma salındığı düşünülmektedir. Bu mekanizmaların her biri, çeşitli biyolojik ve çevresel faktörlerle bağlıdır. Bu faktörler yaş, cinsiyet, etnik köken, vücut kitle indeksi, organ sağlığı, sigara içme durumu, fiziksel aktivite, diyet, glikoz düzeyleri, oksidatif stres, ilaç tedavisi, enfeksiyonlar, menstrüasyon döngüsü ve gebelik olarak belirtilmektedir [36].

Çeşitli hücrel bozukluklar, fizyolojik durumlar ve faktörler, klinik senaryolar, dolaşıma salınan cfDNA konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır. Mekanik stres, hipoksi, inflamasyon, DNA hasarı, genomik dengesizlik, lezyonlar, farklı tipteki hücrel ölümleri tetiklemekte veya dolaşıma salınan cfDNA konsantrasyonunu değiştirebilmektedir. Benzer şekilde, enzimlerin ve DNA bağlayıcı proteinlerin hücre dışı konsantrasyonu veya karaciğer, dalak ve böbrekler tarafından cfDNA alım hızı gibi birçok cfDNA konsantrasyonunu değiştiren faktör, gün içindeki zaman aralığı, vücut kitle indeksi, zindelik, egzersiz, metabolizma hızı gibi birey içinde ve bireyler arasında değişkenlik göstermektedir [16].

Çalışmalar, yaşlı bireylerde (60 yaş üstü) daha genç bireylere kıyasla dolaşımda daha yüksek oranda cfDNA konsantrasyonunun tespit edildiğini göstermiştir. Bu konsantrasyon yüksekliğinin, artan hücrel yaşlanma ve inflamasyonun neden olduğu hücre ölümü, azalmış klirens ve fagositoz kapasitesi dahil olmak üzere yaşa bağlı çeşitli

süreçlerle bağlantılı bir olgu olduğu belirlenmiştir [37]. Vücut kitle indeksi yüksek ve obez gebe kadınlarda artan yağ dokusu kütesinin cfDNA konsantrasyonunun azalmasına neden olduğu ve bu durumun genellikle invaziv olmayan doğum öncesi tarama testlerinin (NIPT'ler) sonuçlarının doğruluğunu olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir [38].

Hücreye özgü epigenetik özelliklerin, cfDNA üzerinde korunduğu tespit edilmiştir. Son yıllarda, cfDNA'ların köken aldıkları hücre ve dokuların tanımlanması amacı ile epigenetik işaretlerin analizi konusunda çeşitli çalışmalar yürütülmektedir. Bu araştırmalarda, metilasyon modellerini, nükleozom konumlandırmasını, transkripsiyon faktörü bağlama bölgesi işgallerini ve fragmantomik özellikleri kullanan farklı yaklaşımlar geliştirilmiştir. Köken doku analizi, insan vücudundan çeşitli dokuların plazma DNA havuzuna olan katkılarının tahmin edilmesine, artan hücre ölümünün meydana geldiği dokuların tanımlanmasına ve potansiyel olarak çok çeşitli patolojilerin erken teşhisi için hassas tarama testlerinin geliştirilebilmesine olanak sağlamaktadır [16].

Ek olarak, aktif hücre salınımlar sonucunda dolaşımda cfDNA'nın varlığının tespit edildiği gösterilmiştir [39]. *In vitro* hücre kültürü çalışmaları ile kültür ortamında, apoptoz, nekroz veya DNA replikasyonu ile ilişkili olmayan seviyelerde cfDNA'nın varlığı tespit edilmiştir. Tespit edilen bu cfDNA fragmentlerinin boyutları, apoptoz veya nekroz ile ilişkili olmayan bir boyut olan 1000-3000 bp uzunluğu aralığındadır [40]. Bu durum, cfDNA'nın aktif salınım ile dolaşıma salınım göstermesi hakkında kanıt sağlamaktadır. cfDNA'nın aktif salınımına dahil olan kesin mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte, cfDNA'nın, genomik dengesizliğin bir sonucu olarak salınım göstermesinin de mümkün olacağı düşünülmektedir [41].

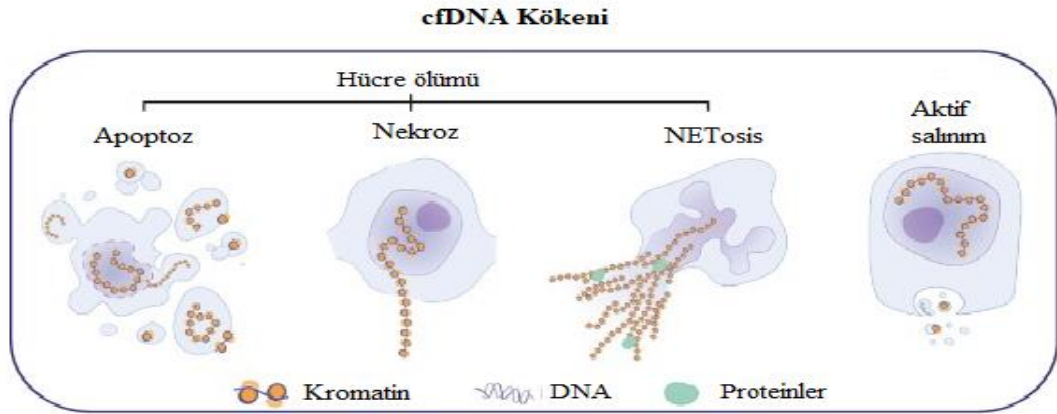
Apoptoz ve nekroz ile hücre ölümünün yanı sıra, onkoz, piroptoz, fagositoz, aktif salınım, nötrofil hücre dışı ağların salımı (NETosis) ve eksizyon onarımı, cfDNA'nın dolaşıma salınmasında etkili olan mekanizmalar arasında bulunmaktadır [42].

Apoptoz, genomik DNA'nın parçalanması sonucunda meydana gelen programlı hücre ölüm mekanizmasıdır [43]. Apoptozun başlatılması, kaspazlar olarak bilinen bir dizi sistein-aspartik proteazın aktivasyonuna bağlıdır. Plasenta kaynaklı sitotrofoblast ve sinsityotrofoblast hücreleri ile fetal hematopoetik hücrelerin apoptoza uğraması sonucu

maternal dolaşıma katılım göstermektedir. Apoptozun aksine, nekroz kontrolsüz bir hücre ölüm mekanizmasıdır ve hipoksi, iltihaplanma gibi dış uyarıcı etkenler tarafından tetiklenmektedir [44]. 10.000 bp'den daha büyük boyuttaki cfDNA fragmentleri kanser hastalarında sıklıkla gözlenmektedir ve bu gözlem cfDNA'nın dolaşıma salınımının nekrozdan kaynaklı olduğunu göstermektedir [45].

Hücre ölümüne ek olarak nötrofiller, nötrofil hücre dışı ağlarının (NET'ler) salınımını sağlayarak hücrel immün yanıtı aracılık etmektedir. Bunlar hem nükleer hem de hücre dışı ağ yapılarıdır. Histonlar ve proteazlar gibi çeşitli proteinlerle kaplı mitokondriyal DNA lifleridir [46]. Yüksek NET seviyelerinin dolaşımdaki cfDNA konsantrasyonları ile korelasyon içinde olduğu gösterilmiştir, bu da netosis sırasında hücrelerden salınan DNA'nın dolaşımdaki serbest cfDNA oluşumunda rol oynadığını göstermektedir [27].

Lenfositlerin ve diğer birçok canlı hücre tipinin kendiliğinden yeni sentezlenmiş DNA'yı serbest bırakabileceği görülmektedir [46]. Bu, cfDNA'nın hücrelerin normal işleyişindeki rolünü veya hücreler arası bir sinyal yolu olarak nükleik asitlerin salınması yoluyla hücreler arasında bir tür aktif iletişimde yer aldığını göstermektedir [48]. Bu bilgilerin şekil ile gösterimi Şekil 2.2'de verilmiştir.

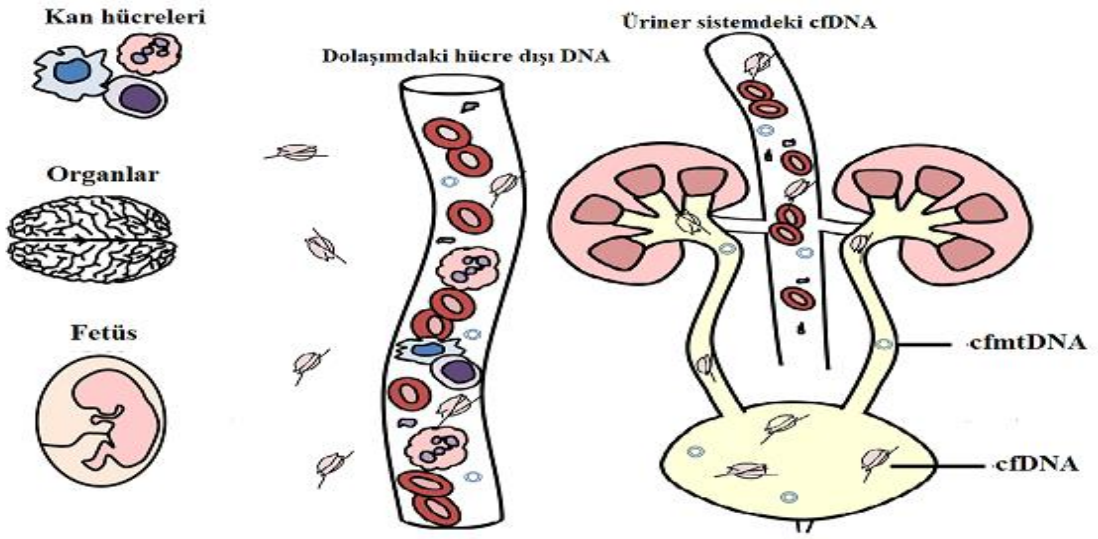


Şekil 2-2: cfDNA'nın salınım mekanizmalarının gösterimi [49].

2.3. Hücre Dışı DNA'nın Yapısal Özellikleri

cfDNA fragmentleri, hücre ölümü sırasında genomik DNA'nın parçalanarak dolaşıma salınması ile meydana gelirler. Ancak yalnızca proteinlerle ilişkili olan DNA molekülleri, DNaz enzimi tarafından parçalanmaya dirençli iken serbest DNA fragmentleri vücut sıvılarında stabil olarak yapısını koruyamamaktadır [50]. cfDNA, vücut sıvılarında serbest şekilde, proteinlere (nükleozomlar, Argonautlar, HDL, LDL) bağlı şekilde ve hücre dışı veziküllere (eksozomlar, mikroveziküller, apoptotik cisimler) kapsüllenmiş veya bağlı şekilde olmak üzere üç farklı şekilde bulunmaktadır. cfDNA'nın, hücre dışı nükleer DNA (cfDNA) ve hücre dışı mitokondriyal DNA (cfmtDNA) olmak üzere iki ana tipi bulunmaktadır [51].

cfDNA araştırmalarındaki ilk çalışmalar kan plazması veya serumdaki cfDNA'ların karakterizasyonuna odaklanmıştır. Uygulanan tekniklerin gelişmesi ile yakın dönemde yapılan araştırmalarda, idrar, tükürük, dışkı gibi dolaşım haricindeki diğer vücut sıvılarında da cfDNA tespit edilmiştir. cfDNA'nın bileşimi ve vücut sıvı içerisindeki miktarının dalgalanması, vücut sıvılarının özelliklerine bağlı olarak değişim göstermektedir. cfDNA'nın kompozisyonu ve miktarı çeşitli özgün faktörler tarafından düzenlenmektedir. Başlıca faktörler arasında; farklı hücre tiplerinin toplam cfDNA havuzuna yaptıkları nispi katkı, cfDNA'nın dokulardan veya hücrelerden dolaşıma hareketini etkileyen faktörler, hücre dışı nükleazlar ve proteolitik enzimler tarafından modifikasyonlar ve bozunma hızı, karaciğer, dalak veya böbrekler tarafından alım ve sindirim oranı, dolaşımdaki veya epitelyal hücrelere bağlanma ve ayrılma ve DNA bağlayıcı proteinler, diğer makromoleküller veya hücre dışı veziküller ile birleşme gibi düzenleyici faktörler bulunmaktadır. Ek olarak, çeşitli hastalıklar, fizyolojik durumlar ve diğer klinik senaryolar, hipoksi, iltihaplanma, DNA hasarı, genomik istikrarsızlık, lezyonlar gibi hücre ölümü veya yapısal DNA salımı ve günün saati, vücut kitle indeksi, diyet, ilaçlar, kondisyon, egzersiz ve metabolizma hızı gibi parametrelerin çoğu ve bireyler arasında önemli farklılıklara sahiptir [16]. Bu bilgilerin şekil ile gösterimi Şekil 2.3'te sunulmuştur.

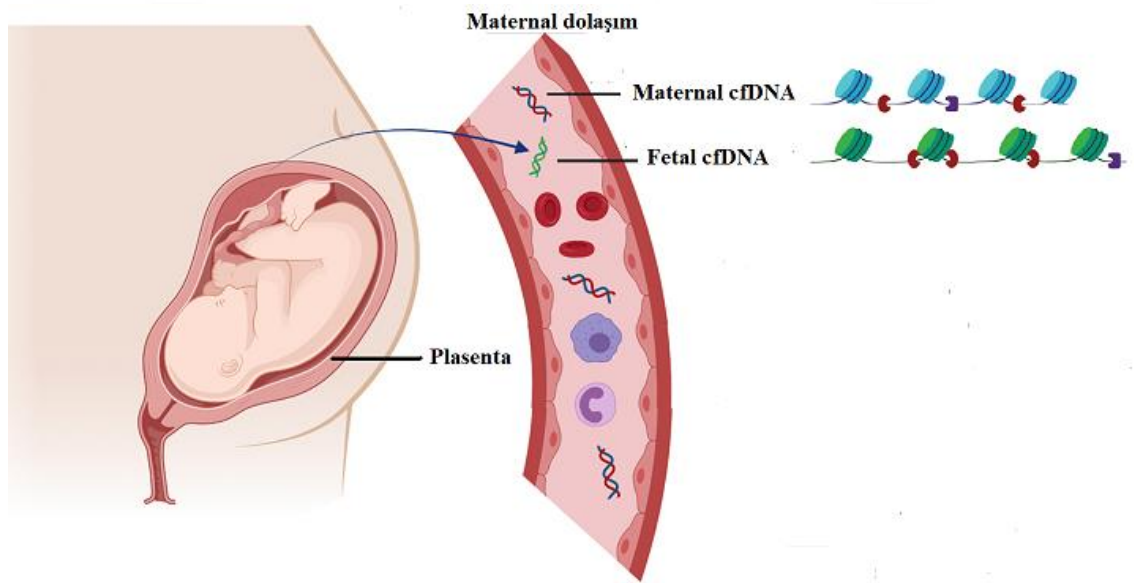


Şekil 2-3: Plazmada ve üriner sistemde bulunan cfDNA'ların gösterimi [52].

cfDNA'ların büyük oranda parçalanması sonucunda %90'ı düşük moleküler ağırlıkta bulunmaktadır [50]. cfDNA fragmentlerinin uzunluğu çoğunlukla, 80 bç ile 200 bç arasında değişkenlik göstermektedir [46]. Kan plazmasında en çok çalışılan cfDNA popülasyonu, nükleozom çekirdek parçacığının (NCP) etrafına sarılmış 145-147 bç DNA'yı ve histon H1'e bağlı bağlayıcı DNA'yı temsil eden, en sık rapor edilen 167-168 bç boyutuna sahip mono-nükleozomdur [53].

cfDNA'nın boyutlandırılması genellikle apoptotik parçalanmayı temsil eden bir merdiven modeli oluşturmaktadır. Apoptoz tarafından üretilen cfDNA'nın çoğunluğu, bir nükleozomun etrafına sarılmış 147 bç uzunluğundaki DNA'nın ve iki nükleozom çekirdeğini bağlayan histon proteini H1 üzerindeki DNA'nın gerilmesine karşılık gelen, yaklaşık olarak 166 bç uzunluğuna sahiptir. Bununla birlikte, nükleaz etkisine bağlı olarak apoptoz, di-, tri- veya poli-nükleozomları temsil eden daha uzun DNA parçaları da üretebilmektedir [32]. Yakın zamanda yapılan son çalışmalar yabani tip cfDNA ile karşılaştırıldığında tümör kaynaklı cfDNA için 90 bç uzunluğuna kadar daha kısa parça boyutlarını göstermiştir. Bu kısalmanın sebebi tam olarak anlaşılamamakla birlikte olası açıklamaları; nükleozom sargısındaki farklılıklar veya farklı doku tipleri arasında nükleaz etki şekli, farklı ekstraksiyon yöntemlerinin diferansiyel cfDNA boyutunun geri kazanımı olarak düşünülmektedir [54].

Maternal plazmada bulunan cfDNA, hem maternal hem de fetal DNA'yı içermektedir. Maternal plazmadaki fetal fraksiyon, total DNA miktarının yalnızca küçük bir yüzdesine karşılık gelmektedir [55]. İnsanlarda yapılan araştırmalar, maternal kan plazmasındaki dolaşımdaki cfDNA miktarlarının, gebelik aşaması ve fetal gelişim ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR tekniği kullanılarak gerçekleştirilen bir çalışma, cfDNA konsantrasyonlarının gebelik boyunca %3,4 ile %6,2 oranları arasında olduğunu göstermektedir [56]. Aynı zamanda gebelik yaşı ve gestasyonel ayların ilerlemesiyle maternal plazmada serbest halde bulunan cfDNA konsantrasyonlarında artış gözlenmektedir [55]. Bu bilgilerin şekil ile gösterimi Şekil 2.4'te sunulmuştur.



Şekil 2-4: Maternal plazmada bulunan cfDNA ile fetal cfDNA'nın gösterimi [57].

Dolaşımdaki serbest hücre dışı fetal DNA, maternal kanda serbestçe dolaşan çift sarmalli ve yaklaşık olarak 200 bp'den daha küçük bir boyuta sahip olan fragmentlerdir. Maternal kanda bulunan fetal hücrelerin varlığı, 1997 yılında Lo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada maternal kanda Y kromozomuna ait dizilerin bulunduğunu tespit etmeleri ve maternal kanda serbest fetal DNA'nın varlığını ortaya koymalarıyla açıklığa kavuşmuştur [58]. Fetal kaynaklı cfDNA, gebeliğin 4-5. haftasından itibaren tespit edilebilmektedir ve doğumdan sonra maternal dolaşımdan hızla temizlenmektedir, bu da fetal kaynaklı cfDNA'ların gebeliğe özgü olduğunu göstermektedir [59].

cfDNA'nın yarı ömrünün 16 dakika ile 2,5 saat arasında olduğu tahmin edilirken [60] bu yarı ömür, toplam cfDNA popülasyonunu değil, mono-nükleozomal cfDNA'nın stabilitesini ifade ettiği için yarı ömür uzunluğu kesin olarak bilinmemektedir [16].

Fetal ve maternal cfDNA'yı ayırt edici metilasyon paternlerine dayalı olarak maternal plazmadan fetal cfDNA'yı saptamak için çeşitli girişimlerde bulunulmuştur [61].

cfDNA konsantrasyonlarının, tüp bebek (IVF) prosedürleri sırasındaki endikasyonlarla pozitif korelasyon gösterdiği ve aynı zamanda kadınlardaki doğurganlık durumunu da yansıttığı saptanmıştır. Embriyoların blastosel boşluğu sıvısındaki cfDNA konsantrasyonları, embriyo morfolojisi ile pozitif korelasyon göstermiştir ve bu durum, cfDNA'ların, embriyo kalitesinin ve implantasyon potansiyelinin bir aday belirteci olarak umut vadettiğini göstermektedir. cfDNA'nın blastosel sıvısındaki varlığının kısmen preimplantasyon embriyo gelişimi sırasındaki apoptozdan kaynaklandığı doğrulanmıştır [62].

Yapılan birkaç çalışmada, cfDNA'nın hedef hücrelere girebildiği ve bu hücrelerin genomuna entegre olarak veya diğer hücre içi aktivitelerle çeşitli biyolojik tepkiler ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Aynı zamanda, hücre farklılaşmasının senkronizasyonu gibi hücreler arası iletişim işlevlerinde ve ayrıca horizontal gen aktarımı gibi evrimsel süreçlerde de yer almıştır. Bununla birlikte, cfDNA'nın hücreler arası bir haberci veya evrimsel süreçlerde etkileyici bir faktör olma olasılığı değerlendirilmektedir [16].

2.4. Dolaşımdaki Serbest Hücre Dışı DNA'nın Kullanım Alanları

Fetal cfDNA örnekleri ile yapılan ilk klinik uygulamalar babadan kalıtılan veya fetüsteki *de novo* mutasyonlar gibi maternal genomda olmayan ve fetüste bulunan alellerin tanımlanmasıyla sınırlı kalmaktaydı. Bu yaklaşımlar, fetal cinsiyet tayini, hemoglobinopati, akondroplazi ve miyotonik distrofi gibi otozomal dominant şekilde maternal kalıtılan tek gen bozukluklarının saptanmasını da içermektedir [63].

Dolaşımdaki cfDNA'nın incelendiği ve yaygın olarak kullanıldığı alanlardan biri prenatal tanıdır [64]. Prenatal dönemde, ileri anne yaşı gibi endikasyonlarda

tarama testi olarak kullanılmaktadır. Trizomi, cinsiyet kromozomu dahil olmak üzere fetal anöploidiler ve spesifik mikrolezyonların araştırılmasında rol oynamaktadır [63]. Prenatal tanıda fetal cfDNA analizi yapılarak günümüz teknikleri ile en yüksek doğruluk oranı ile sadece Trizomi 21 tespit edilebilmektedir [65].

cfDNA, genetik testlerde genellikle gebeliğin 10. haftasından itibaren kullanılmaktadır. Gebeliğin 10. haftası, cfDNA'nın maternal dolaşımdaki fetal fraksiyonunun bilgilendirici ve doğruluğu yüksek bir test sonucu için gereken minimum miktara ulaştığı zamandır. Fetal fraksiyon, testin duyarlılığını etkileyen birkaç değişkenden yalnızca biridir. Diğer değişkenler, dizilenen cfDNA sayısını, belirli bir kromozomdaki guanin ve sitozin bazlarının oranını ve maternal ve fetal kopya numarası varyantlarının varlığını içermektedir [66].

cfDNA güçlü bir tarama aracı olarak kabul edilmiş olsa da cfDNA'nın bu alanda kullanımının birkaç sınırlaması vardır. Anöploidilerin tespitinde bir karyotip analizinin yerini tutmamaktadır. Anöploidinin mevcut tespiti trizomiler (Trizomi 16, Trizomi 18 ve Trizomi 21) ile sınırlıdır. Tek gen hastalıkları ve otozomal resesif ve X kromozomuna bağlı hastalıklarda tanı amacı ile kullanımı için duyarlılık ve doğruluk oranlarının yükselmesi gerekmektedir [67]. Diğer yandan, cfDNA ile RhD ve fetal kan gruplarının genotiplemesi, güvenilirliğinin ve doğruluk oranının yüksek olması sebebiyle bazı ülkelerde klinik uygulamalarda yer almaktadır [68].

cfDNA analizi, bazı çalışma sonuçlarında biyo-bankacılıkta; kordon kanı plazmasında numune tanımlaması amacı ile kullanılmaktadır. Adli vaka çalışmalarında, kan, ter ve dışkı gibi harici olarak bulunan vücut sıvılarından elde edilen numunelerde genetik olarak profillenerek incelenebilmektedir. Kan bağışları veya transfüzyonların kalite kontrol güvencesi gibi potansiyel alanlarda da kullanıma hazır hale gelmektedir [16].

Preeklampsili gebelerin plazma DNA derişimlerindeki artışı inflamasyon ve oksidatif stres ile birlikte plasental malperfüzyonun, plasentanın tüm kıvrımlı mikrovillus yüzeyini kaplayan sinsityotrofoblastın apoptoza ve/veya nekrozuna neden olmasıyla plasenta kökenli cfDNA'nın maternal dolaşıma salınımı sonucunda gerçekleşmektedir [69]. Preeklampsia tanısında dolaşımdaki cfDNA düzeylerinin kullanılabilir bir belirteç olabileceği bildirilmiştir. Uterus damarlarındaki bozulma ile villus trofoblastları zarar görmekte ve sonuçta hücre hasarı veya apoptoz oluşarak

DNA'nın maternal dolaşıma salındığı düşünülmektedir. Maternal plazmadaki fetal DNA'nın plasental hasarın bir belirteci olarak preeklampsi şiddetiyle fetal DNA düzeyleri arasındaki ilişkisinin incelenmesi sonucunda fetal DNA düzeyi ile proteinüri ve hipertansiyon arasında güçlü bir ilişki ortaya konmuştur [70].

Yapılan klinik çalışmalar, cfDNA'nın epigenetik özellikleri ile başta kanser olmak üzere çeşitli patolojilerdeki hastalık dinamikleri arasında güçlü korelasyonlar olduğunu göstermektedir. Tek gen mutasyonları ile epigenetik modifikasyonların artış miktarlarının korelasyon göstermesi nedeniyle, epigenetik cfDNA analizleri, özellikle erken evre hastalığın karakterizasyonu için sıklıkla artan tanısal duyarlılık ve özgüllük göstermektedir. Günümüzde, klinik kullanıma dair kısıtlamalar ve çözümlenmesi gereken birçok preanalitik sorun bulunmaktadır. Ancak, cfDNA ile tanı testlerinin geliştirilebilmesi amacı ile çok çeşitli araştırmalar yürütülmektedir. cfDNA'nın dokuya ve hastalığa özgü epigenetik belirteçlerini karakterize etmek için yapılan çalışmalar sonucunda, sıvı biyopsi tekniğini önemli ölçüde genişleten yeni ve daha doğru sonuç veren tahlillerin geliştirilmesinin sağlanacağı öngörülmektedir. Bu durum, cfDNA analizlerinin uygulanmasında yeni bir yöntemi temsil etmektedir ve kişisel moleküler tıbbın cfDNA profillemeye yöntemiyle dönüştürülmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir [16].

Yapılan araştırmalardan bazıları mikrobiyota profillemesini içermektedir. Bağırsak mikrobiyomunun insan sağlığı üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalar her geçen gün artış göstermektedir. İnsan plazmasında hem bilinen hem de bilinmeyen yerleşik mikroorganizmalardan kaynaklanan yüksek seviyelerdeki cfDNA fragmentlerinin saptanmasıyla toplam cfDNA popülasyonunda kodlanan metagenomun, hem bir araştırma alanı olarak hem de insan sağlığına katkıda bulunduğu mekanizmalar veya antibiyotiklerin bağırsak mikrobiyomundaki etkileri gibi konularda bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmektedir [71].

Ek olarak, cfDNA'daki tek nükleotid polimorfizmlerinin karakterizasyonu, organ nakli hastalarında konak ve alıcıdan türetilen cfDNA'lar arasında ayırım yapılmasına olanak sağlamaktadır ve nakil sonrası gelişen organ reddini, işlev bozukluğunu ve yaralanmasını izlemek için kullanılabilecek potansiyele sahip bir klinik biyobelirteç olarak ortaya çıkmaktadır [72].

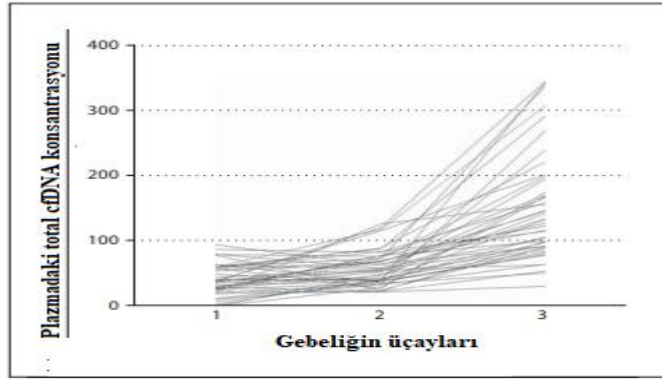
2.5. Maternal Plazmadaki Hücre Dışı DNA Konsantrasyonunun Gebelik Aylarına Göre Değişimi

Gebeliğin 7-16. haftalarında maternal plazmada saptanan cfDNA konsantrasyonu en düşük seviyededir, ancak 24. haftadan sonra artış göstermektedir ve son gestasyonel ayda doğuma kadar en yüksek seviyededir [73].

cfDNA konsantrasyonunun, gebeliğin üçüncü üç ayında ve doğumun başlangıcında maternal dolaşımda artış gösterdiği ve doğum sonrası dönemde hızla azalış gösterdiği tespit edilmiştir. Ek olarak, maternal plazmadaki cfDNA konsantrasyonunun, sistemik inflamasyonun neden olduğu erken doğumdan önce artış gösterdiği tespit edilmiştir [74].

Doğum sırasında, gebeliğin son gestasyonel ayında maternal plazmada saptanan cfDNA konsantrasyonunda herhangi bir değişiklik bulunmamaktadır. Bu bulgu, doğumun, maternal dolaşımdaki serbest cfDNA salınımı üzerinde bir etki göstermediğini ortaya çıkarmaktadır [75].

Maternal plazmadaki cfDNA konsantrasyonu, büyüme ve stabilizasyon fazları ile karakterize edilen üç belirgin yükseliş göstererek gebeliğin 39. haftasına kadar artış göstermiştir. Gebeliğin 4. haftasından 9. haftasına kadar cfDNA konsantrasyonu, haftada yaklaşık %1,19 artış oranıyla hızlı bir artış göstermiştir. Bu hızlı artış, maternal plazmadaki cfDNA konsantrasyonunun artışının ilk aşamasıdır. Bu ilk aşama gebeliğin birinci üç ayındaki cfDNA konsantrasyonunun tespitini temsil etmektedir. İlk stabilizasyon aşaması, haftada yaklaşık %0,03 oranında artış ile gebeliğin 10-19. haftalarını kapsamaktadır. Gebeliğin 19-29. haftasına kadar maternal dolaşımdaki cfDNA konsantrasyonunda, haftada yaklaşık %0,85 oranında artış olduğu gösterilmiştir. Bu ilk stabilizasyon aşaması ve ilerleyen haftalardaki artış oranı, gebeliğin ikinci üç ayını temsil etmektedir. Gebeliğin üçüncü üç ayını temsil eden 30. hafta ve sonrasındaki haftalarda, ikinci stabilizasyon döneminde %0,27 oranında artış gözlenmiştir. Tüm maternal plazmanın yaklaşık %92'sinin, gebeliğin 10. haftasından itibaren %4'ten daha büyük bir oranda cfDNA konsantrasyonuna sahip olduğu saptanmıştır [76]. Gebeliğin üç aylarında maternal plazmadaki cfDNA konsantrasyonlarının grafik ile gösterimi Şekil 2.5'te sunulmuştur.



Şekil 2-5: Maternal plazmada gebeliğin üç aylarındaki cfDNA konsantrasyonları [77].

2.6. Maternal Plazmadaki Hücre Dışı DNA ile Fetal Cinsiyet Tayini

Domestik türlerde fetal cinsiyetin doğru teşhisi, özellikle hayvancılık endüstrisinde önemli ticari uygulamalara ve araştırma alanlarına sahiptir [78]. Geleneksel olarak, kısıraklarda fetal cinsiyet tayini genellikle gebeliğin 59-68. günlerinden itibaren genital tüberkülün yerinin belirlenmesine (transrektal ultrasonografi ile) dayanmaktadır. 70. günden sonra, fetal cinsiyet tayini için transrektal ultrasonografi, uterusu fetal konumlandırmaya tabi olmaktadır [79]. Ayrıca, fetal cinsiyet tayini, gebeliğin 120-210. günlerinden itibaren fetal dış genital organların transrektal ve transabdominal ultrasonografik görüntülenmesiyle de gerçekleştirilmiştir. Bu teknikler, operatör ve kısırak için bazı riskler taşır ve özel ekipman ve uzmanlık gerektirmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu tekniğine dayalı moleküler cinsiyet tayini ile hassasiyeti kabul edilebilir hızlı sonuçlar elde edilmektedir [80].

Kısıraklarda fetal cinsiyetin belirlenmesi, ticari stratejilerin uygulanmasına olanak sağladığı için kısırak yetiştiricilerine yararlı bir hizmet sağlamaktadır. Fetüsün cinsiyetinin bilinmesi, istenilen veya istenilmeyen cinsiyette fetüsü olan gebe bir kısırağın satılması için kolaylık sağlamaktadır [81].

Diğer memelilerde olduğu gibi, kısıraklarda da suni dölleme ve gebelikte cinsiyet tayini için yeni teknoloji ve protokoller geliştirilmekte ve bununla ilgili araştırmalar artış göstermektedir. Maternal plazmada cfDNA analizine dayalı olarak

kısırlıklarda fetüs cinsiyetinin non-invaziv bir şekilde belirlenmesi, kısırlıklarda prenatal genetik tanı için fırsatlar sağlamakta ve bu alanda cffDNA'nın biyobelirteç olarak kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Atların moleküler cinsiyet ayrımı, sex determining region Y (*SRY*) ve Amelogenin Y (*AMELY*), Amelogenin X (*AMELX*), *AMELX-AMELY* genleri ve preimplantasyon embriyolarında Zinc Finger (*ZFX/ZFY*) genleri kullanılarak tanımlanmıştır. Cinsiyet tayinine dayalı qRT-PCR tekniği atlarda embriyonik cinsiyet ayrımı için kullanılmıştır [20].

Birincil erkek cinsiyetini belirleyen sinyal, Y kromozomundaki (*SRY*) cinsiyet belirleyici bölge olarak adlandırılan Y kromozomundaki bir gen tarafından kodlanan bir DNA bağlayıcı proteindir. *SRY* geni, insan XY erkeklerinde bulunan ve XX dişilerinde bulunmayan belirli bir insan Y kromozomu bölgesinin incelenmesiyle testis belirleyici faktör için en iyi belirteç olarak öne sürülmüştür [82].

X kromozomuna bağlı dişilere özgü X-inactive specific transcript (*XIST*) geni ve Y kromozomuna bağlı DEAD-Box helicase 3 (*DDX3Y*) geni ve *RPS4Y1* genlerinin ekspresyonu ile fetal cinsiyet tayini belirlenmektedir [83].

Y kromozomunda bulunan *SRY* ve *DYS14* genleri, maternal plazmada erkek fetüsün varlığının saptanmasında rol oynayan genlerdir. *SRY* geni tek hedef bir dizi olarak, fetal cinsiyet tayininde kullanılan genler arasında en iyi seçeneklerden biridir. *DYS14* genine ait fetal DNA kopya sayılarının gebeliğin ilk üç ayında maternal plazmadaki cfDNA konsantrasyonu düşük seviyede olmasına rağmen daha hassas ve verimli bir sonuç sağlamaktadır [84].

Maternal plazmadaki erkek fetüs varlığının tespiti için Y kromozomundaki *TSPY* geni fetal cinsiyet tayini için kullanılan genler arasında yer almaktadır [85].

2.7. *AMELY* Geni

Mine, dişlerin en dış tabakasında bulunan bir yapıdır ve omurgalı hayvanların vücudundaki en sert dokudur. Mine matrisi, mine ve amelogenin protein sınıflarından oluşmaktadır. İnsan, fare veya somatik hücre melezlerinden DNA'nın southern blot analizleri, karakterize edilmiş bir fare amelogenin cDNA'sına hibridizasyon yoluyla kullanılarak insan ve fare amelogenin (*AMEL*) lokuslarının kromozomal konumları

belirlenmiştir. İnsan *AMEL* dizilerinin, p22.1 → p22.3 bölgesindeki X kromozomunun distal kısa kolunda ve Y kromozomundaki sentromerin yakınında, proksimal uzun kol (Yq11) bölgesinde yer aldığı tespit edilmiştir. Bu kromozomal lokasyon, *AMEL* geninin, X'e bağlı amelogenez imperfekta tiplerinde ve ayrıca diş boyutunun ve şeklinin düzenlenmesine katılan genlerin Y kromozomal lokasyonlarında rol oynadığı hipotezi ile tutarlı gözükmemektedir. İnsanlardaki lokustan farklı olarak, fare *AMEL* lokusu yalnızca X kromozomunda bulunmaktadır. Son olarak, diğer X ve Y kromozom dizileri hakkındaki verilerle birlikte, *AMEL* haritalaması için bu veriler, primat evrimi sırasında insan Y kromozomunda meydana gelen perisentrik bir inversiyon kavramını desteklemektedir [86].

AMEL geninin X ve Y kopyaları homolog rekombinasyona katılmamaktadır, bu durum *AMEL* genini adli tıpta cinsiyet tayini için tercih edilen biyobelirteç haline getirmiştir. Bu nedenle, karşılıklı gelen X ve Y kromozomlarındaki *AMEL* genlerinin her ikisi de, X bağlantılı inaktivasyonun, X kromozomu lokusunun kendisi üzerinde etki edebileceği tek X/Y gen çiftini özetleyebilecekleri şekilde işlevsel olarak farklıdır, dolayısıyla Y kromozomu lokusundaki *AMEL* geni ayırt edilebilmektedir. Hem X hem de Y lokuslarının transkripsiyonel verimi kalitatif ve kantitatif olarak farklı olmasına rağmen dişilere kıyasla fazlalık göstermektedir [87].

İlerleyen süreçte *AMEL* geninin farklı popülasyonlarda meydana gelen çok sayıda farklı yapısal varyasyon biçimi gösterdiği tespit edilmiştir. Bu tespit, *AMEL* geninin adli tıpta cinsiyet tayini için kullanımını sınırlandırmıştır [88].

Maternal plazmada *AMEL* geninin izolasyonu yoluyla prenatal cinsiyet tayini, sadece Y kromozomunun değil, X kromozomunun eş zamanlı amplifikasyonuna izin veren alternatif bir metodoloji olarak kullanılmaktadır. Böylece, yalnızca erkek bir fetüsün yokluğunu değil, bir dişi fetüsün varlığını belirleyebilecek bir metodoloji geliştirilmiştir. *AMEL* geninin intron 3'ünde X'e bağlı amelogenin (*AMELX*) ile Y'ye bağlı *AMEL* (*AMELY*) arasında 6 bç farkı vardır. Bu, 6 bç'lik uzunluk farkının tespiti, prenatal fetal cinsiyetin değerlendirilmesine yardımcı olmaktadır [89].

AMEL, fetal cinsiyetin saptanması için bir belirteç olarak kullanmak üzere iç içe geçmiş PCR teknikleri ile araştırılmaktadır. Bu metodoloji çiftlik hayvanları türlerinde başarıyla uygulanmıştır. *AMEL* geni bu çalışmalarda % 96,5 nispi hassasiyet ve doğruluk oranıyla kullanılmıştır [90]. Aygırlarda, *AMELX* – *AMELY* heterodubleks

bantları bulunurken, kısırlarda yalnızca homodubleks *AMELX* bandı bulunmaktadır [91].

2.8. *GAPDH* Geni

GAPDH geni, glikolitik sistemde ve glukoneogenez yollarında etkili bir rolü olan bir enzimdir ve sıçan dokularındaki hücresel proteinlerin % 5'ini içermektedir. Kahverengi algler ve siyanobakteriler gibi diğer organizmalarda önem taşıyan bir proteindir [92].

Yapılan çalışmalarda, *GAPDH* geninin glikolitik sistemdeki enzimatik işlevi dışında birçok farklı aktif rolünün olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalar *GAPDH* geninin, membran füzyonu, fosfotransferaz aktivitesi, DNA replikasyonu ve DNA onarımındaki etkisini ortaya çıkarmıştır. Bu sistemlerde *GAPDH* geninin işlevinin *in vivo* olarak *GAPDH* geninin hücre altı lokalizasyonu ve oligomerik yapısı ile ilgili olduğu öne sürülmektedir. Yapılan diğer araştırmalar, *GAPDH* geninin apoptoz mekanizmasında etkili olduğunu göstermektedir. Yaşa bağlı nörodejeneratif hastalık, prostat kanseri gibi hastalıklarda da *GAPDH* geninin etkin bir şekilde rolünün olduğu düşünülmektedir [93].

GAPDH geninin çoğu hücrede stabil olması ve yapısal olarak yüksek ekspresyon seviyeleri, klinik çalışmalarda gen ekspresyon verilerinin normalizasyonunda yüksek oranda kullanılan housekeeping genlerden (HKG'ler) biri olmasında dikkate alınan özelliklerdir [94].

qRT-PCR, hücrelerde ve dokularda gen ekspresyonunu ölçmek için hassas ve doğru bir yöntemdir, ancak hatalı pipetleme, RNA kalitesi, ters transkriptaz ile cDNA sentezinin etkinliği ve PCR amplifikasyon etkinlikleri, bu yöntemin doğruluğunu azaltabilmektedir. Bu faktörleri azaltmak ve sonuçların yanlış yorumlanmasını önlemek için, referans genler, hedef genlerin göreceli ifadesini normalleştirmek ve hesaplamak için dahili kontroller olarak kullanılmaktadır. Yaygın olarak housekeeping genler olarak bilinen referans genlerin dokularda ve hücrelerde kararlı bir şekilde ekspresyon gerçekleştirdiği varsayılmaktadır ve bu nedenle uygun bir dahili referans geninin seçilmesi, sonuçların doğru yorumlanmasını sağlamanın önemli bir yoludur [95].

Kantitatif gen ekspresyon verilerinin normalizasyonu, genellikle kontrol genleri veya housekeeping genleri olarak adlandırılan genlerin ekspresyon seviyelerine göre yapılmaktadır. Housekeeping genlerin kullanım sebebi, gen ekspresyonunun araştırıldığı hücrelerde veya dokularda bu genlerin anlatımının sabit kalmasıdır. *GAPDH* geni, gen ekspresyon seviyelerinin karşılaştırılmasında kullanılan en yaygın housekeeping genlerinden biridir [96].

2.9. Kantitatif Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi

Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR), bir hedef DNA'yı veya mRNA'yı çoğaltmak ve aynı anda çoğalan amplifikasyon ürünlerinin miktarını ölçmek için kullanılan geleneksel polimeraz zincir reaksiyonuna dayanan bir tekniktir. DNA örneğinde bir veya daha fazla dizinin saptanması ve miktarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. qRT-PCR, gen ekspresyon kantitasyonu, viral kantitasyon, DNA hasar ölçümü, genotipleme, mikroarray sonuçlarının doğrulanması, ilaç tedavisi etkinliği gibi alanlarda etkin bir şekilde kullanılmaktadır. Geleneksel PCR yönteminden farklı olarak PCR sonrası elektroforez jel görüntüleme işlemine gerek kalmadan sonuç alınmaktadır. Geleneksel PCR yönteminde kullanılan mutajen bir boya olan etidyum bromür (EtBr) yerine floresans boyalar kullanılarak kantitatif sonuç alınmaktadır. Tek bir tüp içerisinde floresans boyalar saptanmaktadır ve gerçek zamanlı olarak amplifikasyon sırasında çoğalan ürünlerin kantitatif miktarı belirlenmektedir [97].

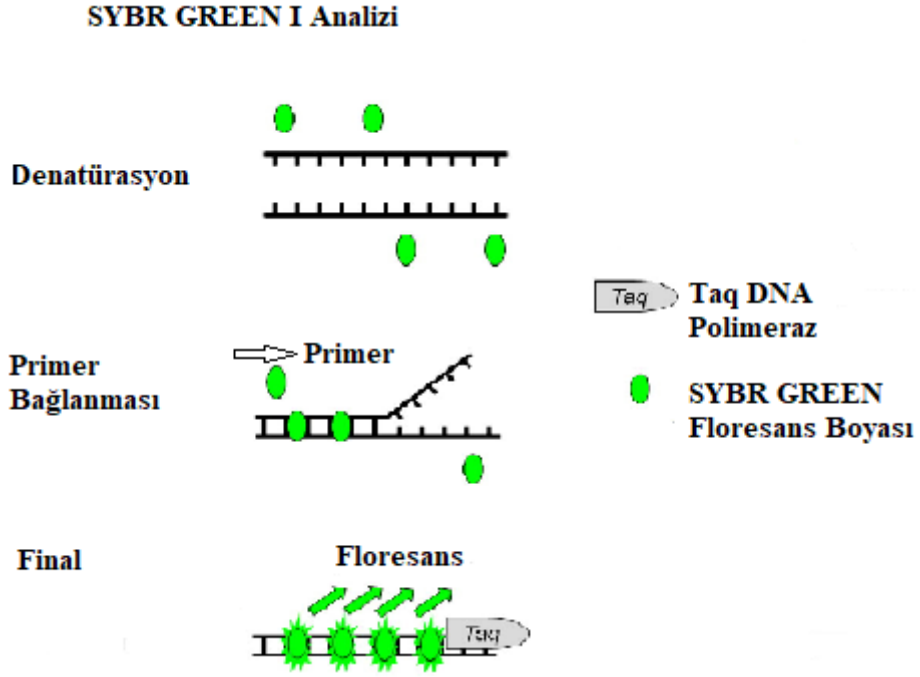
qRT-PCR'ın prensipleri bir floresans ölçümün kantitasyonu ve tanısı üzerine kuruludur. PCR ürünlerinin miktarındaki ilk önemli artış threshold cycle (Ct) değeri hedef template'in başlangıç miktarı ile orantılıdır. 29 döngünün altındaki Ct değerleri yüksek miktarda ürün göstermektedir ve 38 döngünün üzerindeki Ct değerleri minimum ürün miktarlarını göstermektedir.

Floresans prob sistemleri, hidrolizasyon problar (TaqMan), hibridizasyon problar ve DNA'ya bağlanan floresans boyalar (SYBR Green) şeklindedir. Çift zincirli DNA'ya bağlandığında floresans veren SYBR Green floresans boyası kullanılarak, amplifikasyona bağlı DNA artışı, ortaya çıkan floresansın miktarı ile ölçülmektedir.

Primerin bağlanmasına takiben gerçekleştirilen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift sarmal hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan SYBR Green boya miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresans miktarında artış gözlenmektedir. SYBR Green floresans boyasının primer dimerleri gibi spesifik olmayan çift iplikli DNA'ya bağlanması bir dezavantaj yaratabilmektedir [98].

Çözülme eğrisi analizi, qRT-PCR tekniğinde çoğaltılan gen bölgesinin özgüllüğünün araştırılması amacı ile kullanılmaktadır [67]. Reaksiyon esnasında sürekli olarak floresans izlenirken reaksiyon hacminin kademeli olarak ısıtılmasını içermektedir. Isıtma, çift sarmallı DNA'nın erime sıcaklığına (T_m) ulaşıldığında denatüre olmasına neden olmaktadır. DNA tek sarmal hale geldiğinde, bağlı olan florokrom salınmaktadır ve gözlenen floresans miktarı düşmektedir. Çözülme eğrisinin yorumlanmasını kolaylaştırmak için, floresans verilerinin negatif birinci türevi hesaplanmaktadır ve sıcaklık aralığına göre grafik çizilmektedir. Bu grafikte, her amplifikasyon ürünü, ilgili ürünün T_m 'sinde farklı bir tepe noktası olarak görülmektedir. Gözlemlenen T_m 'nin pozitif kontrolün T_m 'si ile veya doğru ürünün önceden belirlenmiş T_m 'sinin karşılaştırılması doğru amplifikasyon ürünü ile artefaktlar arasında ayırım yapılmasını sağlayarak amplifikasyon ürününün spesifikliğinin doğrulanmasını sağlamaktadır [99].

qRT-PCR yönteminin ilk basamağı ön-inkübasyon aşamasıdır. Bu aşamada, DNA denatürasyonu ve Taq DNA polimerazın aktivasyonu gerçekleşmektedir. İkinci basamak olan amplifikasyon aşamasında, PCR ürününün çoğaltılması gerçekleşmektedir. Son basamak olan çözülme eğrisi analizi aşamasında, PCR ürününün tanımlanması gerçekleşmektedir [100]. Şekil 2.6'da qRT-PCR tekniği özetlenmiştir.



Şekil 2-6: qRT-PCR yönteminde SYBR GREEN çalışma prensibinin gösterimi [101].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında kullanılan kısır maternal kan örneklerinin toplanması ve toplanan örneklerden plazma eldesi işlemleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa (İÜ-C) Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı bünyesinde yürütülmüştür. Genetik ve istatistiksel analizler İstanbul Üniversitesi, Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü (İÜ DETAE), Genetik Anabilim Dalı ve İstanbul Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir.

Bu tez çalışmasında kullanılan sarf, kit ve kimyasallar *Gebelik boyunca kısır maternal plazmasında sex determined region Y (SRY) ve amelogenin Y (AMELY) genlerinin belirlenmesi ve bu genlerin fetal cinsiyetle ilişkisi* başlıklı proje kapsamında karşılanmıştır (İÜ-C BAP Proje No: 31671).

3.1. Gereç

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

Kullanılan cihazların listesi Tablo 3.1'de sunulmuştur.

Tablo 3-1: Kullanılan cihazların listesi

Cihaz Adı	Markası
-80 °C Soğutucu	Sanyo
-20 °C Soğutucu	Panasonic
+4 °C Soğutucu	Sanyo, Arçelik
Buz Makinesi	ITV
Soğutmalı Santrifüj	Thermo Scientific
Otomatik Pipetler	Eppendorf, Gilson
Vorteks	SciLogex MixS

Su Banyosu	Memmert
Vakum Pompası	QIAvac 24 Plus (Qiagen)
Vakum Manifoldu	QIAvac 24 Plus (Qiagen)
Masaüstü Mini Santrifüj	Beckman Coulter (Microsantrifuge 16)
Isı Bloğu	Biosan Thermo Block TDB-120
Spektrofotometre	Thermo Scientific™ NanoDrop™ 2000
Laminar Akışlı Güvenlik Kabini	Thermo Scientific (Hera Safe)
Isı Döngü Cihazı	BioRad T100™ Thermal Cycler
Otoklav	ALP CL-40M
Mikrodalga Fırın	Kenwood
Yatay Elektrophorez Tankı	Biometra Compact XS/S
Elektrophorez Güç Kaynağı	EC-105 (E-C Apparatus Corporation)
Jel Görüntüleme Sistemi	UVP
Santrifüj	Beckman Coulter (Allegra X-22 Centrifuge)
Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR	Light Cycler® 480 System (Roche)

3.1.2. Kullanılan Kitler

1. QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen)

QIAGEN® Mini Kolonları

Konik Dipli Santrifüj Tüpü (15 mL)

Toplama Tüpleri (2,0 mL)

Elüsyon Tüpleri (1,5 mL)

Vakum Bağlama Aparatları

ACL Tamponu

ACB Tamponu

ACW1 Tamponu

ACW2 Tamponu

AVE Tamponu

QIAGEN Proteinaz K

Carrier RNA

2. LightCycler® 480 SYBR Green I Master Kit

LightCycler® 480 SYBR Green I Master, 2X Konsantrasyonunda

PCR için su

3.1.3. Kullanılan Solüsyonlar ve Kimyasallar

Kullanılan solüsyonların listesi Tablo 3.2’de ve kimyasalların listesi Tablo 3.3’te sunulmuştur.

Tablo 3-2: Kullanılan solüsyonların listesi

Solüsyonlar	Markası
Oligonükleotid Primer Çifti	Oligomer
DNA Ladder	Thermo Scientific
Taq DNA Polimeraz	Thermo Scientific
10X Taq Buffer (KCl, içeren)	Thermo Scientific
MgCl ₂	Thermo Scientific
Steril, Nükleaz İçermeyen Su	Qiagen
dNTP	Thermo Scientific

Tablo 3-3: Kullanılan kimyasalların listesi

Kimyasal Adı	Markası
Agaroz	Sigma
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma
EDTA	Sigma
Tris Baz	Sigma
Glasiyal Asetik Asit	Sigma
Etanol	Emsure®
İzopropanol	AppliChem

3.1.4. Kullanılan Tampon ve Çözeltiler

Primer Çözeltileri

Gene özgü olarak tasarlanan ve liyofilize şekilde temin edilen primerler 100 μ M konsantrasyonda olacak şekilde nükleaz içermeyen su eklenerek dilue edildi. Pipetlenerek ve vorteks yapılarak homojen şekilde çözülmesi sağlandı. Hazırlanan primer çözeltileri -20°C’de muhafaza edildi.

100 μ M stok primer çözeltisinden, 10 μ M ve 2,5 μ M konsantrasyonlarda olacak şekilde hacimlerde alınıp üzerleri steril, nükleaz içermeyen su ile tamamlanarak pipetleme yapıldı. Pipetleme sonrasında vorteks yapıldı ve ara stok şeklinde hacimlere bölündü. Hazırlanan 10 μ M ve 2,5 μ M konsantrasyonlarındaki ara stok primer çözeltileri genetik analizlerde kullanılmak üzere -20°C’de muhafaza edildi.

dNTP Çözeltisi

dNTP setinin içeriğindeki dNTP'lerin her birinden (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) 2,5 μ M ve nükleaz içermeyen su ile kullanılarak dNTP karışımı hazırlandı. 0,2 μ L'lik tüplere bölünerek ara stoklar halinde -20°C'de muhafaza edildi.

Etidyum Bromür Stok Çözeltisi

10 mg/mL konsantrasyonda çözelti hazırlandı.

50X TAE (Tris-Asetat-EDTA) (1L)

242 g Tris Baz (MW=121,1)

57,1 mL Glasiyal Asetik Asit

100 mL 0,5M EDTA

Tris bazı bir miktar distile su ile çözüldükten sonra glasiyal asetik asit ve EDTA eklenip üzerine 1L'ye tamamlanacak şekilde distile su ilave edildi. Hazırlanan çözelti 20 dakika (dk) otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

1X TAE (1L)

20 mL 50X TAE

980 mL distile su

Çözelti hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.1.5. Kullanılan Sarf Malzemeler

EDTA'lı kan toplama tüpü (10 mL)

Konik santrifüj tüpü (15 ml)

Kriyovial (2mL)

Eppendorf (2 ml)

Eppendorf (0,5 ml)

Eppendorf (0,2 ml)

Mikropipet ucu (1-10 μ L, 2-20 μ L, 2-200 μ L ve 100-1000 μ L)

Mikroplate (96 kuyulu)

3.2. Yöntem

3.2.1. Maternal Kan Örneklerinin Toplanması

Bu tez çalışmasında, İÜ-C Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı ekibi tarafından 15 adet kısraktan gebeliğin tüm aylarında (1-11. ayları) takipli olarak maternal periferik kan örnekleri toplandı. Ek olarak, genetik analizlerde optimizasyon çalışmalarında kullanılmak üzere gebe olmayan kısrağ (boş kısrağ) ve aygırdan periferik kan örnekleri alındı. Her bir at için 10 mL periferik kan örneği EDTA'lı tüpe alındı.

3.2.2. Maternal Kan Örneklerinden Plazma Eldesi

Toplanan kan örnekleri İÜ-C Veteriner Fakültesi, Doğum ve Jinekoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında 3000 xg'de 10°C'de 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen plazma örnekleri yeni bir santrifüj tüpüne alınarak santrifüj işlemi aynı şekilde tekrarlandı. Santrifüj sonrası elde edilen plazma örnekleri aliquotlanarak kriyoviallere aktarıldı ve genetik analizler yapılana kadar -80°C'de muhafaza edildi. Örnek toplama süreci tamamlandıktan sonra tüm örnekler kurubuz içerisinde İÜ DETAE Genetik Anabilim Dalı'na getirildi.

Bu tez çalışmasında, toplam 15 gebe kısrağa ait plazma örneklerinin tüm gebelik ayları süresince cfDNA konsantrasyonlarının değişimi analiz edildi ve 8 gebe kısrağa (4 dişi gebelik ve 4 erkek gebelik) ait plazma örneklerinden elde edilen, gebeliğin üç üçayını temsil eden 3, 6, 10. aylara ait cfDNA konsantrasyonlarının ortalamaları ayrı değerlendirildi ve bu aylara ait cfDNA'lar *AMELY* geninin kantitasyonunda kullanıldı.

3.2.3. cfDNA İzolasyonu

cfDNA izolasyonu QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen) kullanılarak optimize edilen üretici firma protokolüne göre gerçekleştirildi. Uygulanan basamaklar aşağıda listelendiği gibidir:

1. -80°C’de muhafaza edilen plazma örnekleri buz üzerinde çözüldü.
2. Çözülen 4 mL hacimdeki plazma örnekleri 15 mL’lik konik santrifüj tüplerine alınarak üretici firmanın protokolüne ek olarak 2000 xg’de 10°C’de 10 dk santrifüj edildi.
3. 50 mL’lik santrifüj tüplerinin içerisine 400 µL Proteinaz K eklendi.
4. Santrifüj işlemi sonrasında elde edilen süpernatantlar, içerisine Proteinaz K eklenen 50 mL’lik santrifüj tüplerinin içerisine eklendi.
5. Ayrı bir 50 mL’lik santrifüj tüpünde, izole edilecek örnek sayısı esas alınarak üretici firmanın protokolüne uygun bir şekilde miktarları belirlenerek ACL Buffer içerisine carrier RNA eklenerek ACL Buffer kullanıma hazır hale getirildi.
6. Proteinaz K ve süpernatantın bulunduğu 50 mL’lik santrifüj tüplerinin içerisine hazırlanmış olan ACL Buffer’dan 3,2 mL eklendi ve 30 saniye (sn) vorteks yapıldı.
7. Örnekler 60°C’de 30 dk boyunca su banyosunda inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında örneklerin üzerine 7,2 mL ACB Buffer eklendi.
8. Örnekler 15 sn vorteks yapıldı ve vorteks sonrasında 5 dk boyunca -20°C’de bekletildi.
9. Bu süre içerisinde kit içeriğinde bulunan mini kolonlar, bağlama aparatları ile vakum manifolduna takıldı.
10. Mini kolonların üzerine örneklerin aktarılacağı 20 mL’lik tüpler geçirildi.
11. Vakum manifoldu, vakum pompasına bağlandı ve çalıştırılarak basıncı kontrol edildi ve vakum pompası kapatıldı.

12. -20°'den alınan örnekler vakum manifoldu üzerindeki 20 mL'lik tüplere koyuldu ve vakum pompası çalıştırıldı.
13. Tüm örnekler kolonlardan geçtikten sonra vakum pompası kapatıldı ve 20 mL'lik tüpler çıkarılarak atıldı.
14. Mini kolonlardaki filtrenin üzerine 600 µL ACW1 Buffer eklendi, vakum pompası çalıştırıldı.
15. ACW1 Buffer ile ilk yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra vakum pompası kapatıldı ve ikinci yıkama işlemi için mini kolonların içerisine 750 µL ACW2 Buffer eklenerek vakum pompası çalıştırıldı.
16. ACW2 Buffer ile ikinci yıkama işlemi gerçekleştirildikten sonra vakum pompası kapatıldı ve üçüncü yıkama işlemi için mini kolonların içerisine 750 µL EtOH (%96-100) eklenerek vakum pompası çalıştırıldı.
17. Üçüncü yıkama işlemi sonrasında vakum pompası kapatıldı ve mini kolonlar, vakum manifoldunun üzerinden dikkatli bir şekilde çıkarılarak 2,0 mL'lik toplama tüplerinin içerisine alındı.
18. Daha sonrasında masaüstü santrifüjde 20,000 xg'de 3 dk boyunca santrifüj edildi.
19. Santrifüj sonrasında mini kolonlar yeni 2,0 mL'lik toplama tüplerinin içerisine alındı.
20. Örnekler, toplama tüplerinin içerisindeki mini kolonların kapakları açık olacak şekilde 56°C'de 10 dk inkübe edildi.
21. Inkübasyon sonrasında mini kolonlar, 1,5 mL'lik elüsyon tüplerinin içerisine alındı ve üzerlerine 25 µL AVE Buffer eklenerek oda sıcaklığında 3 dk inkübe edildi.
22. Inkübasyon sonrasında örnekler masaüstü santrifüjde 20,000 xg rpm'de santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tekrarlandı.
23. Mini kolonlar, elüsyon tüplerinin içerisinden alınarak atıldı ve elüsyon tüpleri içerisindeki izolasyonu tamamlanan cfDNA'lar buza alındı.

24. İzolasyonu yapılan cfDNA'lar genetik analizler gerçekleştirilene kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.2.4. İzole Edilen cfDNA'ların Konsantrasyonlarının Ölçümü

İzolasyonu tamamlanan cfDNA'ların konsantrasyonları (ng/μL) NanoDrop™ 2000 kullanılarak ölçüldü ve kayıt edildi. Spektrofotometrik ölçüm 260 nm ve 280 nm dalga boylarındaki ışığın absorbans değerleri baz alınarak gerçekleştirildi. cfDNA'ların saflık tayini için A260/280 oranının 1,8-2,0 arasında olması dikkate alındı.

3.2.5. Primer Tasarımı

qRT-PCR'da kullanılacak olan *AMELY* (amelogenin, Y isoform, Gene ID: 100034231, NM_001085422.1 → NP_001078891.1) ve *GAPDH* (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Gene ID: 100033897, NM_001163856.1 → NP_001157328.1) genlerine özgü primerler *Equus caballus* (EquCab3.0 Assembly, NCBI Release 103, 2018) genomunun dizilerinden yararlanılarak manuel olarak tasarlandı. Primerlerin tasarımında dimer oluşumları, saç tokası ilmeği oluşumları ve Tm dereceleri Oligo Analyzer (<https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) programında kontrol edildi. Tasarlanan primerlerin özgüllükleri BLAST ve Primer-BLAST programlarında kontrol edildi. TD-PCR ve qRT-PCR tekniklerinde kullanılan *AMEL* geninin primer dizisi Tablo 3.4'te sunulmuştur.

Tablo 3-4: *AMEL* genine özgü tasarlanan primerlerin dizisi

<i>AMELY/AMELX</i>	
İleri (Forward) primer	5'- TTCCAACCCAACACCACCAG -3'
Ters (Reverse) primer	5'- GGGAATATCGGAGGCAGAGG-3'
Amplikon Uzunluğu	<i>AMELY</i> 136 bp / <i>AMELX</i> 160 bp

AMELX (Query) ve *AMELY* (Subject) dizilerinin programında birbirlerine olan benzerliklerinin Global Align aracı (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ile karşılaştırılması Tablo 3.5'te sunulmuştur.

Tablo 3-5: *AMELX* (Query) ve *AMELY* (Subject) dizilerinin programında birbirlerine olan benzerliklerinin karşılaştırılması

Needleman-Wunsch alignment of two sequences			
Query ID NC_009175.3 genomik DNA X kromozom			
Subject ID NM_001085422.1			
Description Equus caballus amelogenin, Y-linked (AMELY), mRNA			
Molecule type nucleic acid			
Subject Length 765			
Query	5040	ACTCTTTGTTTCTCACCAGTACACTTCCTATGGTTACGAACCCATGGGTGGATGGCTGCA	5099
Sbjct	217	-----TACACTTCCTATGGTTACGAACCCATGGGTGGATGGCTGCA	257
Query	5100	CCACCAAATCATCCCCGTGCTGTCCAGCAGAATCCCTCAAATCACGCCTTGCAGCCTCA	5159
Sbjct	258	CCACCAAATCATCCCCGTGCTGTCCAGCAGAATCCCTCAAATCACGCCTTGCAGCCTCA	317
Query	5160	TCACCATATCCCCATGGTGTGCGCTCAGCACCTGTGGTCCCCCAGCAACCAATGATGCC	5219
Sbjct	318	TCACCATATCCCCATGGTGTGCGCTCAGCACCTGTGGTCCCCCAGCAACCAATGATGCC	377
Query	5220	ACTTCCTGGGCCAACACTCCATGTTCCAACCCAAACACCAGCCAAACCTCCCTCCGCC	5279
Sbjct	378	ACTTCCTGGGCCAACACTCCATGGTTCCAACCCAAACACCAGCCAAACCTCCCTCCACC	437
Query	5280	TGTCCAGCAGCCCTTCCACCCCCAGCCTGTCCAGCCGACGCTCACCAGCCCATCCAGCC	5339
Sbjct	438	TGTCCAGCAGCC-----CAGCCTCACCAGCCCATCCAGCC	473
Query	5340	TCAGCCACCTCTGCACCCCATCCAGCCCTGCGGCCACAGCCCTCTGCTGCTCCGATATT	5399
Sbjct	474	TCAGCCACCTCTGCACCCCATCCAGCCCTGCGGCCACAGCCACCTCTGCTGCTCCGATATT	533
Query	5400	CCCCCTGCAGCCCTTSCCCCCCTATGCTTCCTGACCTGCCTCTGGAAGCTTGGCCAGCAAC	5459
Sbjct	534	CCCCCTGCAGCCCTTSCCCCCCTATGCTTCCTGACCTGCCTCTGGAAGCTTGGCCAGCAAC	593
Query	5460	AGACAAGACCAAGCGGGAGGAAGTGGTGAAGTATACCCCTGAAGCCACTACACCACCTGTGA	5519
Sbjct	594	AGACAAGACCAAGCGGGAGGAAGTGG-----AT--	

İki dizinin ayrı olarak tespit edilebilmesi *AMELY* dizisindeki 24 bazlık delesyon farkı sayesinde olmaktadır. Kutular düz ve ters primerlerin bağlandığı dizileri göstermektedir.

TD-PCR ve qRT-PCR tekniklerinde kullanılan *GAPDH* geninin primer dizisi Tablo 3.6'da sunulmuştur.

Tablo 3-6: *GAPDH* geninin primer dizisi

<i>GAPDH</i>	
İleri (Forward) primer	5'- CTACAGCAATAGGGTGGTGGAC-3'
Ters (Reverse) primer	5'- GACAAGCATTTCCCAGCAGC-3'
Amplikon Uzunluğu	121 bp

3.2.6. Touch-Down PCR

Touch-Down PCR (TD-PCR), qRT-PCR’da analiz öncesinde plazma örneğinden izole edilen cfDNA havuzunda bulunan nadir miktardaki fetal cfDNA’nın zenginleştirilmesi amacı ile kullanılmıştır. TD-PCR kısa süreli denatürasyon ve yüksek bağlanma ısısının kullanıldığı bir PCR yöntemidir. Bu yüksek ısıda primer bağlanması ve amplifikasyon düşük olsa da çok daha özgün bir reaksiyon gerçekleşmektedir.

TD-PCR yönteminde kullanılacak olan en etkin primer konsantrasyonlarını belirlemek amacı ile yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda, konsantrasyonun 2,5 μ M olduğu belirlendi.

PCR öncesi hazırlık yapılmadan önce kullanılan tüm mikropipetler, sarf malzemeleri ve steril distile su PCR işlemi öncesinde 15 dakika boyunca UV ışık altında steril edildi. Tüm PCR işlemleri, öncesinde %70’lik etanol ile temizlenen laminar akışlı PCR kabini içerisinde gerçekleştirildi. TD-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler ve kullanım miktarları Tablo 3.7’de ve kullanılan koşullar Tablo 3.8’de sunulmuştur.

Tablo 3-7: TD-PCR içeriği

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar
Buffer	10X	2,5 μ l
Mg ²⁺	25 μ M	2 μ l
dNTP	2,5 μ M	2 μ l
Primer (İleri)	2,5 μ M	2 μ l
Primer (Ters)	2,5 μ M	2 μ l
Taq DNA Polimeraz	500 units	0,25 μ l
dH ₂ O	-	*
cfDNA	25 ng	*
TOPLAM		25 μl

(* Farklı miktarlarda)

Tablo 3-8: TD-PCR koşulları

Program	Isı (°C)	Süre	Siklus
Denatürasyon	95	5 dk	-
Denatürasyon	94	45 sn	16 siklus
Bağlanma	70 → 62 (-0,5 °C/siklus)	-	
Uzama	72	1 dk	
Denatürasyon	94	45 sn	25 siklus
Bağlanma	64	45 sn	
Uzama	72	1 dk	
Final Uzama	72	15sn	-

3.2.7. Agaroz Jel Elektroforezi

%4'lük 50 mL agaroz jel hazırlamak için hassas terazide 2 gr agaroz tartıldı. 50 mL 1X TAE çözeltisinin içerisine eklendi ve mikrodalga fırında çözünene kadar yaklaşık 2 dk boyunca ısıtıldı. Daha sonra içerisine çeker ocakta 3,5 µl EtBr çözeltisi eklendi ve homojen bir karışım elde etmek için köpürmemesine dikkat edilerek çalkalandı. Elde edilen homojen çözelti, tarakları takılarak hazırlanmış olan yatay agaroz jel tepsisine hava baloncuğu oluşturmamaya özen göstererek döküldü. Agarozun polimerizasyonu için yaklaşık olarak 25 dakika boyunca beklenildi.

Hazır olan agaroz jel, içinde 1X TAE tamponu bulunan yatay agaroz jel tankına aktarıldı. TD-PCR ile elde edilen cfDNA örnekleri, 6X agaroz yükleme tamponu ile karıştırılarak jelin kuyularına yüklendi. Amplifikasyon ürünlerinin kontrolü amacı ile 50 bç DNA ladder kullanıldı. Örnekler, 85 volt akımda yaklaşık olarak 40 dakika boyunca yürütüldü. Yürütülen agaroz jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

3.2.8. Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR

Fetal *AMELY* geninin varlığının maternal kanda saptanması amacı ile gebeliğin üç üçayını temsil edecek şekilde, 3,6,10. aylara ait örnekler analiz edildi. Her örnek üçlü olarak çalışıldı ve sonraki analizlerde ortalama Ct (AvgCt) değerleri kullanıldı. Kontrol olarak, gebe olmayan kısarak (dişi cinsiyet kontrolü) ve aygırdan elde (erkek cinsiyet kontrolü) edilen cfDNA'lar ve kontaminasyon kontrolü için DNA içermeyen örnek kontrolleri (NTC) kullanıldı. *GAPDH* geni amplifikasyon kontrolü amacı ile kullanıldı.

qRT-PCR yönteminde kullanılacak olan en uygun primer konsantrasyonlarını belirleme amacı ile yapılan optimizasyon deneyleri sonucunda, en uygun konsantrasyonun 10 µM olduğu belirlendi.

qRT-PCR hazırlığı yapılmadan önce kullanılan tüm mikropipetler, sarf malzemeleri qRT-PCR işlemi öncesinde 15 dakika boyunca içerisinde UV ışık altında steril edildi. Tüm qRT-PCR işlemleri, öncesinde %70'lik etanol ile temizlenen laminar akışlı PCR kabini içerisinde gerçekleştirildi.

TD-PCR sonucunda elde edilen amplifikasyon ürünlerinin steril distile su ile 1:10.000 oranında dilüsyonu yapıldı ve kantitatif qRT-PCR işleminde DNA olarak dilüsyonu yapılmış bu amplifikasyon ürünleri kullanıldı.

qRT-PCR tekniğinde kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.9'da, qRT-PCR tekniğinin uygulama koşulları Tablo 3.10'da ve kullanılan ısılar Tablo 3.11'de sunulmuştur.

Tablo 3-9: qRT-PCR yönteminde kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Konsantrasyon	Miktar
dH ₂ O	-	2 µl
Master mix	1X	5 µl
Primer (İleri)	10 µM	1 µl
Primer (Ters)	10 µM	1 µl

TD-PCR Amplifikasyon Ürünü

-

1 µl

TOPLAM**10 µl****Tablo 3-10: qRT-PCR tekniğinde uygulanan koşullar**

Program	Siklus sayısı	Analiz Modu
Ön-inkübasyon	1	-
Amplifikasyon	45	Kantifikasyon
Çözülme Eğrisi	1	Çözülme Eğrisi
Soğutma	1	-

Tablo 3-11: qRT-PCR tekniğinde kullanılan ısılar

Kullanılan Isılar					
	Hedef ısı (°C)	Acquisition	Süre	Isınma hızı (°C/sn)	Acquisition /°C
Ön-inkübasyon	95	-	5 dk	4,8	-
Amplifikasyon	95	-	10 sn	4,8	-
	59	-	20 sn	2,5	
	72	Tek	15sn	4,8	
Çözülme Eğrisi	95	-	5 sn	4,8	
	65	-	1 dk	2,5	
	97	Devamlı	-	-	5
Soğutma	40	-	10 sn	2,0	

3.2.9. Çözölme Eğrisi Analizi

Amplifikasyonu yapılan genlerin özgüllüğü çözölme eğrisi (melting curve) analizi ile değerlendirildi. Bu analiz, amplifikasyon sırasında sadece istenilen spesifik ürünün amplifikasyonunun olduğunu doğrulamak amacı ile yapılmaktadır. Her çözölme noktası ampikonun baz içeriğine bağlı olarak değişen ait belli bir çözölme ısını (T_m= reaksiyonda %50 çift iplikli DNA ve %50 tek iplikli DNA bulunduğu ısı) işaret eder. LightCycler 480 donanımına ait yazılım aracılığı ile yapılan analizde SYBR Green floresans boya eklenerek amplifiye edilmiş olan ürünlerin özgüllüğü, çözölme eğrisi ile tespit edildi. Çözölme eğrisi analizinin sonucunda triplike örneklerin tutarsızlığı ya da non-spesifik amplifikasyon şüphesi olduğunda o örnek analiz dışı bırakıldı. Erkek ve dişi fetüs taşıyan gebe kısırakların örneklerinin sonuçları birbiri ile ve kontroller ile karşılaştırmalı olarak analiz edildi. Analizlerde örnek kalitesinin belirlenmesinde *GAPDH* genine ögü çözölme eğrisi analizi sonuçları kullanıldı.

3.2.10. İstatistiksel Analizler ve Data Analizi

Maternal plazmadan izole edilen cfDNA konsantrasyonlarının karşılaştırılması ANOVA testi ile gerçekleştirildi. Sonuçlar ortalama (mean) ve standart sapma değerleri olarak ifade edildi. Her örnek için üçlü olarak analiz edilen *AMELY* geninin Ct değerlerinin ortalaması alındı ve bu değerler istatistiksel analiz için kullanıldı. Analizler SPSS.ver23 (IBM Corp., NY) programı kullanılarak yapıldı ve p<0,05 değeri anlamlı olarak kabul edildi.

Her örnek için üçlü olarak analiz edilen *AMELY* geninin çözölme eğrisi analizlerinde örneklerle aynı koşulda ve eş zamanlı olarak amplifikasyonu yapılan aygır ve boş kısrağa ait cfDNA çözölme eğrisi değerleri cinsiyet için pozitif kontrol olarak kullanıldı. *GAPDH* geni ise her bir örneğin amplifikasyon başarısının değerlendirilmesi amacı ile kullanıldı.

4. BULGULAR

Tez projesi kapsamında 15 gebe kırsağın gebeliği süresince (1-11. aylar) ve kontrol olarak kullanılan boş kırsaklar ve aygırlardan toplanan periferik kanlardan toplam 156 plazma örneği elde edildi. Her bir plazma örneğinden, kullanılan izolasyon kitinin protokolüne uygun olarak cfDNA izolasyonu gerçekleştirildi. Tüm gebelik aylarından izole edilen örnekler değerlendirildiğinde cfDNA konsantrasyonlarının 1,2-66,2 ng/ μ L ve millitre plazma başına total cfDNA konsantrasyonlarının 5,3-327,4 ng/plazma mL arasında değişim gösterdiği tespit edildi. On beş kırsağın 11 gestasyonel aydan oluşan gebelik süresi boyunca her bir gestasyonel ayda maternal plazmada tespit edilen cfDNA konsantrasyonları değerlendirildi. Seçilen sekiz kırsakta gebeliğin 3., 6, ve 10. aylarındaki ve üç üçüye ait ortalama cfDNA konsantrasyonları karşılaştırıldı. Belirlenen üç ayda *AMELY* geninin amplifikasyonu ile cinsiyet belirlenmesine dair optimizasyonlar yapıldı. Tüm gebelik aylarında *AMELY* geninin fetal cinsiyet tayininde kullanımının etkinliği ise *Gebelik boyunca kırsak maternal plazmasında sex determined region Y (SRY) ve amelogenin Y (AMELY) genlerinin belirlenmesi ve bu genlerin fetal cinsiyetle ilişkisi* (İÜ-C BAP Proje No: 31671) başlıklı projede değerlendirilerek analiz edilmiş ve ilgili bulgular bu proje kapsamında tartışılmıştır.

4.1. Gebelik Süresi Boyunca Gestasyonel Aylarda Maternal Plazmadaki cfDNA Konsantrasyonlarının Değişimi

On beş gebe kırsakta gebelik süresi boyunca gestasyonel aylarda saptanan maternal plazma cfDNA konsantrasyonları (ng/mL plazma) Tablo 4.1’de sunulmuştur. Dişi ve erkek fetus taşıyan maternal serum cfDNA konsantrasyonlarının gebelik ayları arasında fark olup olmadığı analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç gözlenmedi ($p>0,05$).

Tablo 4-1: Gebe kısıraklarda tüm gebelik aylarında maternal plazmadaki cfDNA (ng/mL plazma) konsantrasyonları

	1.GA ng/mL	2.GA ng/mL	3.GA ng/mL	4.GA ng/mL	5.GA ng/mL	6.GA ng/mL	7.GA ng/mL	8.GA ng/mL	9.GA ng/mL	10.GA ng/mL	11.GA ng/mL
KISRAK 1	169,78	123,5	262	161,33	231	152,89	139,5	327,43	161,78	188,67	144,89
KISRAK 2	184,89	81	24,5	141,5	107,11	29,5	49,33	174,29	84,5	198,5	234,5
KISRAK 3	276,8	104,44	104,44	117,78	92,5	147,11	104	171,11	222,67	129,78	115,56
KISRAK 4	170,67	53,78	196,57	59,43	129,78	193	205,14	177,14	*	162,67	203,56
KISRAK 5	64,73	129,78	109,78	159,11	141,78	98,86	157,78	*	153	119,11	162,67
KISRAK 6	112	*	256	116,67	58,5	309,71	*	176,5	119,64	94,18	*
KISRAK 7	66	*	82,8	109,2	97,5	170,5	144,67	145,5	67,5	127,5	174
KISRAK 8	37,45	71,64	106,18	53,82	65	114,67	135,11	145,33	99,64	81,82	48,73
KISRAK 9	59,64	63,64	104,5	58,4	96	159,27	70,91	92,36	135,64	188	*
KISRAK 10	286,86	106	167,11	213,33	40,8	70,22	82,29	120,44	65,2	46,4	*
KISRAK 11	163,56	*	287	129,33	194,29	173,3	212	140,44	79	152	180,5
KISRAK 12	220	108,89	88	156,89	112	181,5	130,67	142,22	131,11	110	242,29
KISRAK 13	66,67	87,56	5,33	68,44	111	84,57	101	105,5	149,3	187,1	*
KISRAK 14	49,45	*	71,5	87	123	86	63,5	180	104	92	124
KISRAK 15	164,89	262,5	236,5	140,4	212,57	192,44	134,67	126	309,5	190	155,56
Ortalama (mean)	139,55	108,43	140,14	118,17	120,85	144,23	123,61	158,87	134,46	137,84	162,38
Standart Sapma (±)	82,01	56,54	88,60	46,25	54,90	67,52	48,94	55,95	66,19	47,47	55,38

(GA: Gestasyonel Ay, *: cfDNA konsantrasyonu tespit edilemeyen gestasyonel aylar)

4.2. Gebeliğin Üç Üçayında Maternal Plazmadaki cfDNA Konsantrasyonlarının Değişimi

Belirlenen 8 kısırakta gebeliğin her bir üçayını temsilen seçilen 3,6 ve 10. gestasyonel aylardaki total cfDNA konsantrasyonları (ng/mL plazma) tespit edilerek Tablo 4.2’de verilmiştir.

Tablo 4-2: Kısıraklarda gebeliğin üç üçayında maternal plazmadaki total cfDNA konsantrasyonları

	3. GA (ng/mL) (1. Üçay)	6. GA (ng/mL) (2. Üçay)	10. GA (ng/mL) (3. Üçay)
KISRAK 1	262	152,89	188,67
KISRAK 2	24,5	29,5	198,5
KISRAK 3	104,44	147,11	129,78
KISRAK 4	196,57	193	162,67
KISRAK 5	109,78	98,86	119,11
KISRAK 6	256	309,71	94,18
KISRAK 7	82,8	170,5	127,5
KISRAK 8	106,18	114,67	81,82
Ortalama(Mean)	142,78	152,03	137,77
Standart Sapma(±)	85,70	81,19	42,16

(GA: Gestasyonel Ay)

4.3. Dişi ve Erkek Fetüs Taşıyan Kısırlıklarda cfDNA Konsantrasyonlarının Karşılaştırılması

Dişi ve erkek fetüs taşıyan kısırlıklarda cfDNA konsantrasyonlarının (ng/mL plazma) karşılaştırılması Tablo 4.3'te sunulmuştur. Genel olarak dişi fetüs taşıyan gebelerin erkek fetüs taşıyan gebelere oranla daha yüksek cfDNA konsantrasyonlarının olduğu saptandı. Bu farklılığın 3. ayda daha belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=0,024$). Ancak, 6. ayda ve 10. aylarda istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmadığı görülmektedir. Üçayların ortalamaları alınarak incelendiğinde, 1. ve 3. üçaylarda dişi fetüs taşıyan kısırlıkların erkek fetüs taşıyan kısırlıklara göre cfDNA konsantrasyonlarının belirgin bir şekilde yüksek olduğu (sırasıyla, $p=0,001$ ve $0,024$), gebeliğin 2. üçay ortalamasında ise dişi ve erkek fetüsler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$).

Tablo 4-3: Dişi ve erkek fetüs taşıyan kısırlıklarda cfDNA konsantrasyonlarının karşılaştırılması (n=8)

	Cinsiyet	n	Ortalama (Mean)	Standart Sapma(±)	Minimum	Maximum	P Değeri
A							
3.GA Total ng/mL	Dişi	4	204,7525	73,10525	104,44	262,00	0,024
	Erkek	4	80,8150	39,40251	24,50	109,78	
6.GA Total ng/mL	Dişi	4	200,6775	75,49868	147,11	309,71	0,087
	Erkek	4	103,3825	58,05527	29,50	170,50	
10.GA Total ng/mL	Dişi	4	143,8250	40,93937	94,18	188,67	0,717
	Erkek	4	131,7325	48,73875	81,82	198,50	
B							
1. Üçay Ortalaması	Dişi	4	167,8317	21,21663	140,34	185,09	0,001
	Erkek	4	86,0958	15,18825	71,76	101,43	
2. Üçay Ortalaması	Dişi	4	147,4750	29,32957	119,13	181,74	0,089
	Erkek	4	107,3792	26,42416	77,83	133,25	
3. Üçay Ortalaması	Dişi	4	178,6767	27,13585	148,07	209,57	0,024
	Erkek	4	126,0033	22,00572	102,71	155,39	

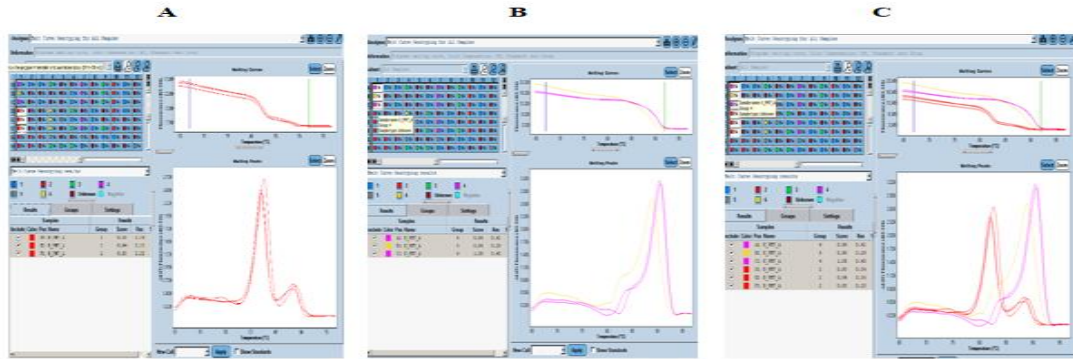
(A: 3., 6. ve 10. GA'da erkek ve dişi fetüs taşıyan gebelerin karşılaştırılması, B: Üç üçayın ortalamasının karşılaştırılması (n=8), GA: Gestasyonel Ay)

Dişi ve erkek fetüs taşıyan kısırlıklarda total cfDNA konsantrasyonları gebeliğin birinci ve üçüncü üçayında karşılaştırıldığında anlamlı bir farklılık elde edilirken ($p<0,05$) gebeliğin ikinci üçayında anlamlı bir farklılık elde edilmedi ($p>0,05$).

4.4. *AMELY* Geninin Analizinde Gerçekleştirilen Optimizasyon Bulguları

İzolasyonu gerçekleştirilen örnekler doğum sonrasında yenidoğan cinsiyetlerine göre sınıflandırıldı. PCR yöntemlerinde kullanılacak olan kalıp cfDNA miktarı, araştırılan genler için en uygun primer bağlanması ısısı, reaksiyondaki en efektif ürün miktarının elde edildiği primer konsantrasyonu ve qRT-PCR’da kullanılmak üzere elde edilen TD-PCR ürünlerinin en uygun dilüsyon oranının saptanması amacı ile optimizasyonlar yapıldı. Optimizasyon verilerine dayanarak oluşturulan standart protokol kullanılarak yöntemlere açıklandığı gibi devam edildi.

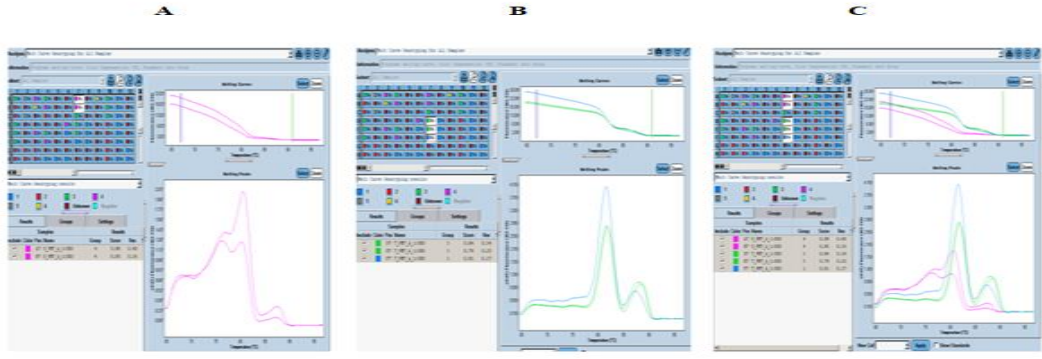
AMELY genine özgü TD-PCR’da elde edilen ürünlerin 1:10, 1:500 ve 1:1000 oranlarındaki dilüsyonları kullanılarak qRT-PCR yöntemi uygulandı. Ardından yapılan çözülme eğrisi analizi karşılaştırıldığında 1:500 dilüsyonda daha etkin sonuç alındığı saptandı. Şekil 4.1’de 1:10 dilüsyon TD-PCR ürünlerinin kullanılmasının ardından yapılan çözülme eğrisi analizi grafiği sunulmuştur.



Şekil 4-1: *AMELY* genine özgü TD-PCR ürünlerinin 1:10 dilüsyonu kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çözülme eğrisi analizi

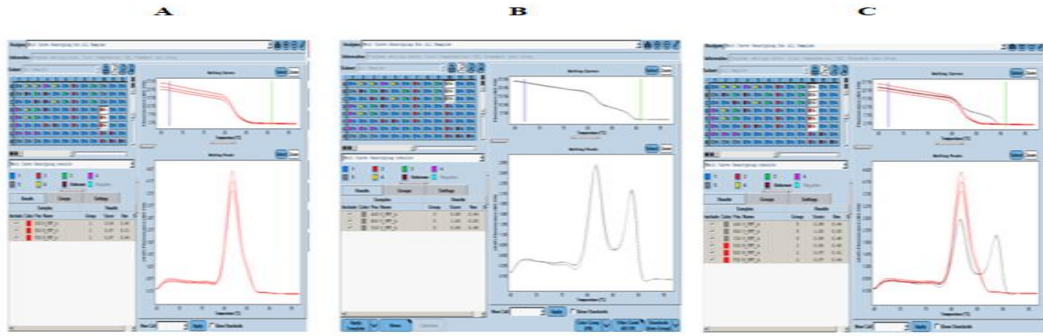
Şekilde, 6. gestasyonel ayda erkek fetus taşıyan kısrağ (A), 6. gestasyonel ayda dişi fetus taşıyan kısrağ (B) ve karşılaştırmalı olarak erkek fetus (kırmızı) ve dişi fetus (pembe) taşıyan kısrağlara (C) ait çözülme eğrisi analizlerinin görüntüleri sunulmuştur.

Şekil 4.2’de *AMELY* genine özgü TD-PCR’da elde edilen ürünlerin 1:500 ve Şekil 4.3’te 1:1000 oranındaki dilüsyonlarının kalıp DNA olarak kullanıldığı qRT-PCR yönteminin ardından yapılan çözülme eğrisi analizi görüntüleri sunulmuştur.



Şekil 4-2: *AMELY* genine özgü primerler kullanılarak 1:500 dilüe edilmiş TD PCR ürünleri kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çözülme eğrisi analizi

Şekilde, 6. gestasyonel ayda dişi fetus taşıyan kısırak (A), 6. gestasyonel ayda erkek fetus taşıyan kısırak (B) ve karşılaştırmalı olarak dişi fetus (pembe) ve erkek fetus (yeşil) taşıyan kısıraklara (C) ait çözülme eğrisi analizlerinin görüntüleri sunulmuştur.

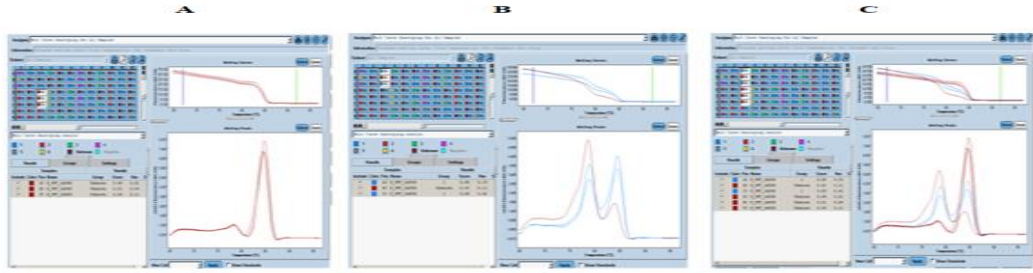


Şekil 4-3: *AMELY* genine özgü primerler kullanılarak 1:1000 dilüe edilmiş TD-PCR ürünleri kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çözülme eğrisi analizi

Şekilde, 6. gestasyonel ayda dişi fetus taşıyan kısırak (A), 6. gestasyonel ayda erkek fetus taşıyan kısırak (B) ve karşılaştırmalı olarak dişi fetus (kırmızı) ve erkek fetus (mavi) taşıyan kısıraklara (C) ait çözülme eğrisi analizlerinin görüntüleri sunulmuştur.

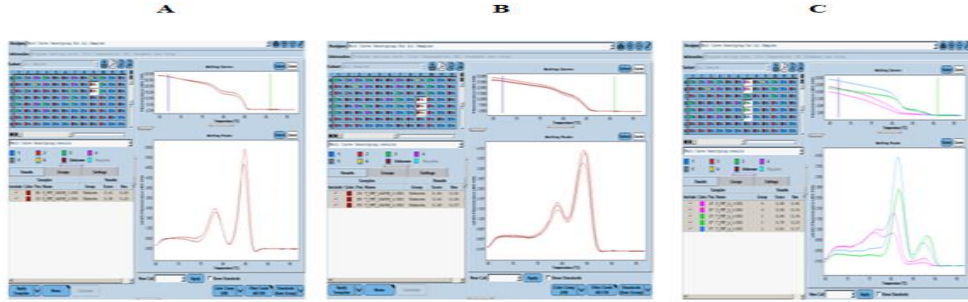
4.4.1. GAPDH Genine Ait Optimizasyon Verileri

GAPDH genine özgü TD-PCR’da elde edilen ürünlerin 1:10, 1:500 ve 1:1000 oranındaki dilüsyonları kullanılarak qRT-PCR yöntemi uygulandı. Ardından yapılan çözülme eğrisi analizi karşılaştırıldığında 1:1000 dilüsyonda daha etkin sonuç alındığı saptandı. Şekil 4.4’te 1:10 dilüsyon ve Şekil 4.5’te 1:500 TD-PCR ürünü kullanılmasının ardından yapılan çözülme eğrisi analizi grafiği sunulmuştur.



Şekil 4-4: *GAPDH* genine özgü primerler kullanılarak 1:10 dilüe edilmiş TD-PCR ürünleri kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çözülme eğrisi analizi

Şekilde, 6. gestasyonel ayda dişi fetus taşıyan kısrağın (A), 6. gestasyonel ayda erkek fetus taşıyan kısrağın (B) ve karşılaştırmalı olarak erkek fetus (mavi) ve dişi fetus (pembe) taşıyan kısrağlara (C) ait çözülme eğrisi analizlerinin görüntüleri sunulmuştur.

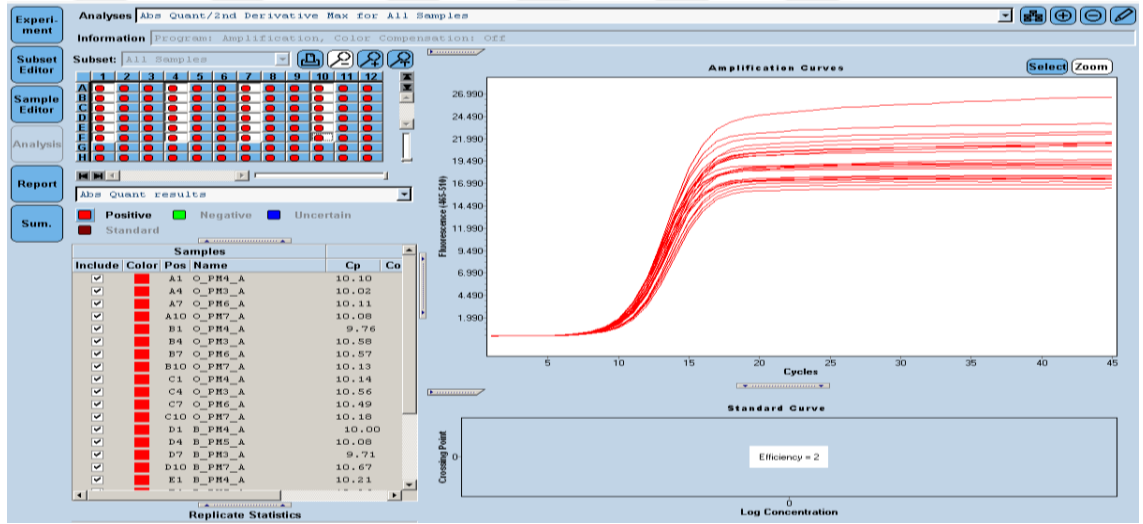


Şekil 4-5: *GAPDH* genine özgü primerler kullanılarak 1:500 dilüe edilmiş TD-PCR ürünleri kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR ve çözülme eğrisi analizi

Şekilde, 6. gestasyonel ayda dişi fetus taşıyan kısrağın (A), 6. gestasyonel ayda erkek fetus taşıyan kısrağın (B) ve karşılaştırmalı olarak dişi fetus (pembe) ve erkek fetus (yeşil) taşıyan kısrağlara (C) ait çözülme eğrisi analizlerinin görüntüleri sunulmuştur.

4.5. AMELY Geninin qRT-PCR Analizi Sonucunda Elde Edilen Bulgular

25 ng cfDNA örneği kalıp olarak kullanılarak TD-PCR ile amplifikasyon yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri 1:1000 oranında dilue edildi ve qRT-PCR yöntemi ile amplifikasyonu yapıldı. Uygulanan tekniğin hassasiyetinin yüksek olması nedeni ile *AMELY* geni için tüm örneklerde amplifikasyon elde edildi. İstatistiksel analizler sonucunda erkek ve dişi fetüs taşıyan gebeliklerde cinsiyete bağlı olarak *AMELY* geninin Ct değerleri arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görüldü ($p>0,05$). Şekil 4.6'da *AMELY* geni için uygulanan qRT-PCR analizi sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrileri örnek olarak sunulmuştur.



Şekil 4-6: *AMELY* genine özgü qRT-PCR analizinde amplifikasyon eğrileri

AMELY genine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen qRT-PCR analizinde örneklere ait amplifikasyon eğrileri görülmektedir.

4.6. *AMELY* Geni Amplifikasyon Reaksiyonlarının Gebelik Aylarında Karşılaştırılması

Dişi ve erkek olarak gruplandırmadan *AMELY* geni Ct değerlerinin gebelik ayları arasında karşılaştırılması Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4-4: Kısırakların gebelik boyunca *AMELY* geninin ortalama Ct değerinin karşılaştırılması (n=8)

GA	n	Ortalama	Standart Sapma	Minimum	Maximum	P Değeri
3	8	11,27	2,65	8,83	14,66	0,963
6	7	10,91	2,40	8,57	14,49	
10	8	11,15	2,55	8,67	14,66	

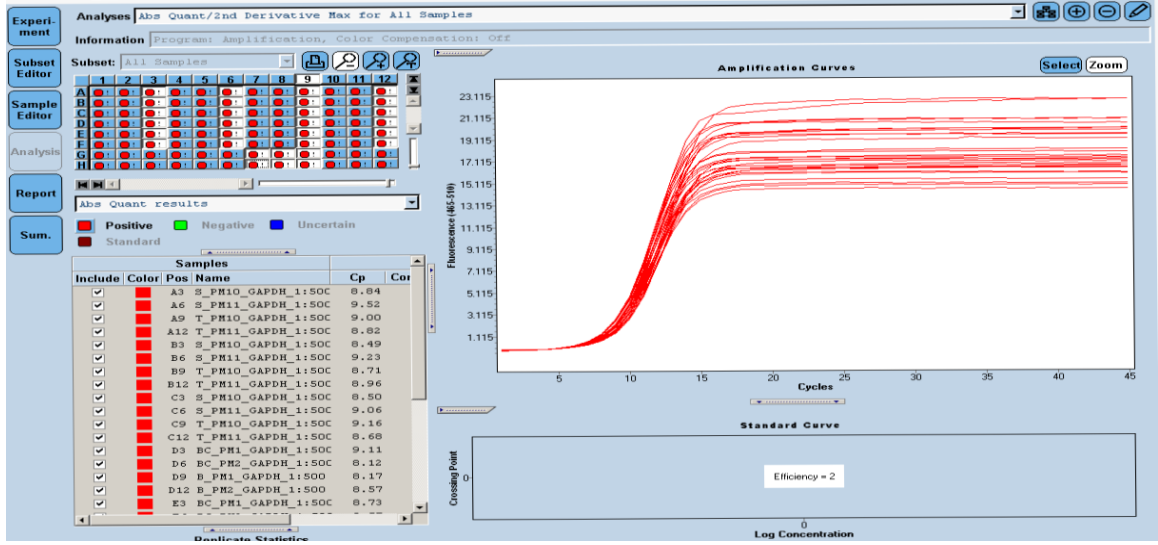
(GA: Gestasyonel Ay)

Toplam 8 kısırakta *AMELY* geni Ct değerlerinin gebelik ayları arasında fark olup olmadığı analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç elde edilmedi ($p=0,963$). Cinsiyete göre karşılaştırma yapıldığında da sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı değildir (dişi fetüslerde $p=0,990$; erkek fetüslerde $p=0,920$).

4.7. *GAPDH* Geninin qRT-PCR Analizi Sonucunda Elde Edilen Bulgular

25 ng cfDNA örneği kalıp olarak kullanılarak TD-PCR ile amplifikasyon yapıldı. Elde edilen PCR ürünleri 1:10000 oranlarında dilue edildi ve qRT-PCR yöntemi ile amplifikasyonu yapıldı. Uygulanan tekniğin hassasiyetinin yüksek olması nedeni ile *GAPDH* geni için tüm örneklerde amplifikasyon elde edildi.

Şekil 4.7'de *GAPDH* geni için uygulanan qRT-PCR analizi sonunda elde edilen amplifikasyon eğrileri örnek olarak sunulmuştur.

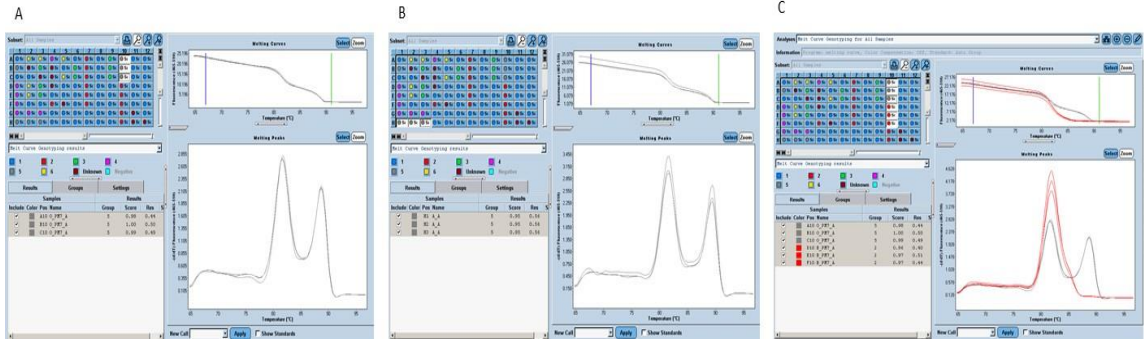


Şekil 4-7: GAPDH genine ait qRT-PCR analizinde amplifikasyon eğrileri

GAPDH genine özgü primerler kullanılarak gerçekleştirilen kantitatif gerçek zamanlı PCR sonucunda örneklere ait amplifikasyon eğrileri görülmektedir.

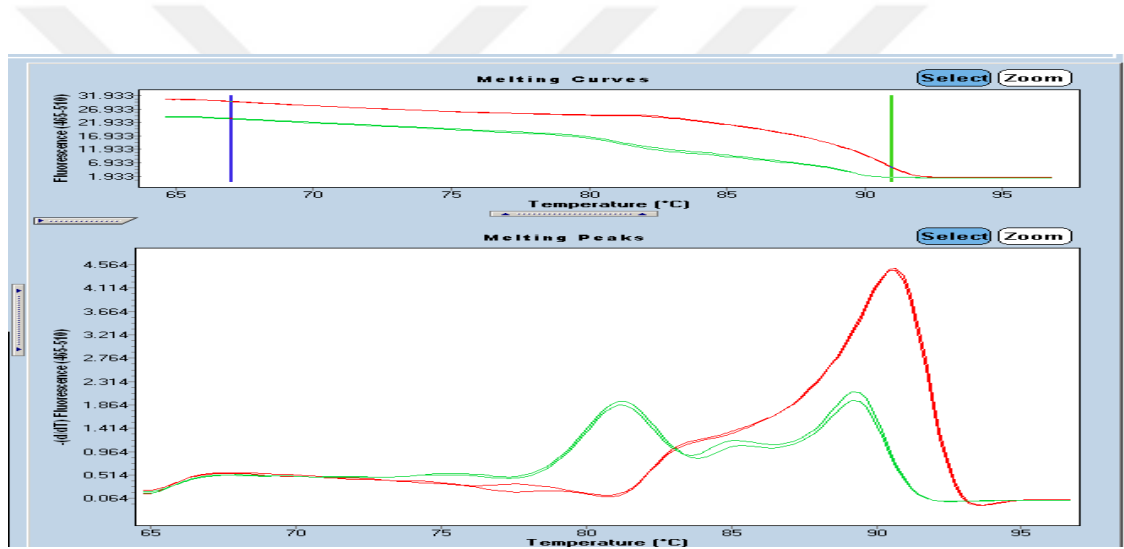
4.8. AMELY Genine Ait Çözülme Eğrisi Analizi

qRT-PCR yönteminden sonra uygulanan çözülme eğrisi analizlerinde her örnek için ampikon özgülüğü kontrol edildi. Bu analizde çalışılan maternal cfDNA örnekleri içerisinde fetal cinsiyet ile ilgili olarak araştırılan genlerin tespit edilebilme gücü belirlendi. Şekil 4.8 ve 4.9'da AMELY genine ait çözülme eğrisi analizi sonuçları sunulmuştur.



Şekil 4-8: AMELY genine ait çözülme eğrisi analizi

Şekilde, 6. gestasyonel ayda erkek fetus taşıyan kısrağın (A), kontrol olarak kullanılan aygır (B) ve karşılaştırmalı olarak dişi fetus (kırmızı) ve erkek fetus (gri) taşıyan kısraqlara (C) ait çözülme eğrisi analizlerinin görüntüleri sunulmuştur.



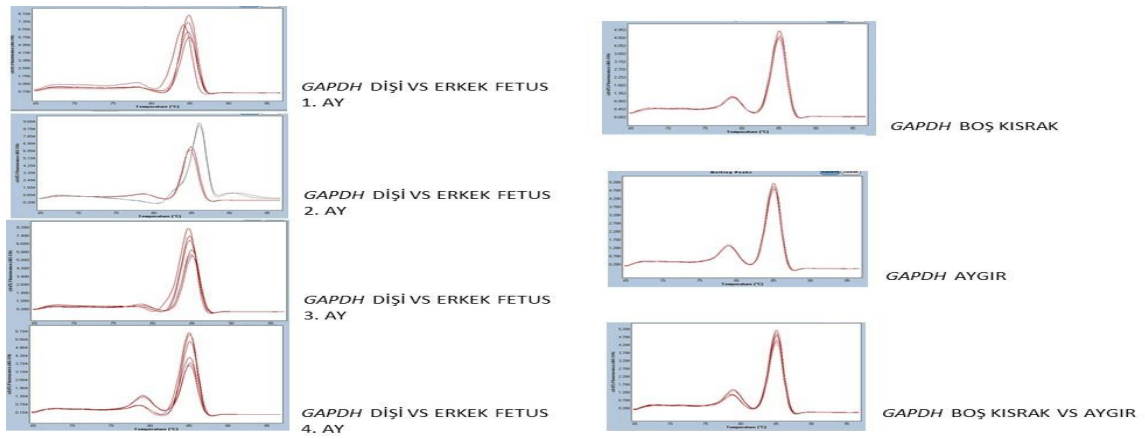
Şekil 4-9: AMELY genine ait çözülme eğrisi analizi

Şekilde karşılaştırmalı olarak, 6. gestasyonel ayda erkek fetus taşıyan kısrağın (yeşil) ve dişi fetus taşıyan kısraqlara (kırmızı) ait çözülme eğrisi analizinin görseli sunulmuştur. Üst panelde floresans boyası miktarı ve ısıya göre ampliconların çözülme eğrisi, alt paneldede ise floresans boyası miktarına göre ampliconlara spesifik olarak farklı ısılarda oluşan çözülme eğrisi tepe noktaları görülmektedir. Bu analiz sonucunda dişi ve erkek fetusların ayrımı kesin olarak yapılabilmektedir.

Y kromozomu üzerindeki *AMELY* geni ve X kromozomu üzerindeki *AMELX* geni arasında yüksek dizi benzerliği vardır. Bu dizi benzerliğinin bir dezavantajı PCR amplifikasyonunda her iki gen dizilerinin de ayrım yapılamadan çoğaltılmasıdır. Ancak, *AMELY* gen dizisinde *AMELX*'den farklı olarak 24 bazlık bir delesyon olması PCR sonrasında iki gen ürününün birbirinden ayrılabilmesini sağlamıştır. Primer tasarımı *AMELX* ve *AMELY* gen dizilerindeki 24 bazlık farklılığı gözeterek tasarlandı.

4.9. *GAPDH* Genine Ait Çözülme Eğrisi Analizi

qRT-PCR yönteminden sonra uygulanan çözülme eğrisi analizlerinde her örnek için amplicon özgüllüğü kontrol edildi. Bu analizde çalışılan maternal cfDNA örnekleri içerisinde fetal cinsiyet ile ilgili olarak araştırılan genlerin tespit edilebilme gücü belirlendi. Şekil 4.10'da *GAPDH* genine ait çözülme eğrisi analiz sonuçları sunulmuştur.



Şekil 4-10: *GAPDH* genine ait çözülme eğrisi analizi

Dişi ve erkek fetus taşıyan kısırakların 1-4. gebelik ayları, boş kısırak ve aygıra ait cfDNA örneklerinden *GAPDH* geninin amplifikasyonu sonrasında karşılaştırmalı analizlerde ürün özgüllüğü görülmektedir.

Endojen kontrol gen olan ve *AMELY* geninin kantitasyonu için kullanılan *GAPDH* geninin maternal kan ve erkek ve dişi kontrollerin kan örnekleri için çözülme eğrisi analizinde spesifik ürün varlığı doğrulandı.

5. TARTIŞMA

Maternal vücut sıvılarında serbest dolaşan hücre dışı fetal nükleik asitler, fetüse ait anöploidilerin taranabilmesi ve tek gen analizlerinde de gelecekte ümit vadeci olması nedeni ile prenatal tanı alanında önemli bir yer kazanmıştır [102][103]. cfDNA, cinsiyet tayini amacı ile de incelenebilmektedir. Cinsiyet kromozomları ile ilişkili hastalıkların saptanmasında ve adli tıp alanında cinsiyet tayini amacı ile kullanılabilir.

Maternal cfDNA'nın araştırılması ile fetüs cinsiyetinin tayin edilebilmesi domestik hayvanların üretiminde de önem taşımaktadır. Kısırlıklarda fetal cinsiyetin doğru teşhisi, hem özel hem de ticari amaçlar için birçok yetiştirici için yararlı olmaktadır. Atlarda prenatal fetal cinsiyet tayini amacıyla maternal kandan izole edilen fetal cfDNA'da *SRY* geninin saptanması amacı ile gerçekleştirilen qRT-PCR tekniğinde, testin duyarlılığı, özgüllüğü ve doğruluğu sırasıyla %90,48, %96 ve %93,48 oranlarında tespit edilmiştir. Bu yaklaşımın, çiftliklerde gebe kısırlıklardan alınan periferik kan örnekleri ile cinsiyet tayininin yapılabilmesi için yaygın bir prosedür olarak kullanılabilir.

cfDNA analiz tekniklerinin insanda duyarlılığının ve hassasiyetinin yükseltilmesi, bu uygulamaların daha sonra atlar dahil diğer hayvanlarda da testin geliştirilmesini sağlamaktadır. Günümüzde fetal cinsiyet tayini için çeşitli yaklaşımları araştıran ve her biri gebeliğin farklı aşamalarında gerçekleştirilen çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ancak, atlar dahil bazı hayvanlarda genomik dizilerin tam olarak belirlenememiş olması optimizasyonları zorlaştırmakta ve analiz güçlüğü yaratmaktadır [105][113]. Bu tez çalışmasında *Equus caballus* genom dizisi üzerinden ve dizilendiği kadarı ile *AMELX* ve *AMELY* gen dizilerinin karşılaştırılması ile tespit edilen dizilerden yararlanılarak primer tasarımı yapılmıştır. Ancak, NCBI GENBANK bilgi bankasında (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>) *AMELX* (Gene ID: 100049799) ve *AMELY* (Gene ID: 100034231) dizileri tanımlanmış iken Ensembl (<https://www.ensembl.org>) gen bilgi bankasında sadece *AMELX* (ENSECAG00000016413.3) tanımlanmıştır, *AMELY* hakkında kesinleşmiş bir dizi bilgisi bulunmamaktadır. Bu durum ve benzeri tespitler dizi bilgilerinin doğrulanması açısından karmaşa yaratmış ve analiz kapasitesini sınırlamıştır. *AMELY* geni dizisindeki bu belirsizlik Y kromozomu üzerindeki tekrar

bölgeleri nedeni ile genom dizileme çalışmalarının yetersiz kalmasından kaynaklanmaktadır.

Cinsiyet, fiziksel aktivite, gebelik gibi çeşitli patolojik veya fizyolojik koşullarda dolaşımdaki cfDNA konsantrasyonunu etkilenmektedir. Gebelik sırasında, gebe kadınların plazmasındaki serbest dolaşan cfDNA'nın ortalama %10'unun fetal kaynaklı olduğu gösterilmiştir [106]. İnsana ait kan örneklerinden elde edilen cfDNA miktarı, izolasyon için kullanılan plazma hacminin sınırlı ve düşük miktarda olması sebebiyle sınırlıdır. Bu durumun prenatal tanı testlerinde başarısızlığa sebep olduğu düşünülmektedir.

Gebeliğin üç üç ayında maternal plazmada bulunan cfDNA konsantrasyonları hakkında çok az bulgu bulunmaktadır [105]. Gebeliğin son 2 ayında maternal plazmada fetal cfDNA'nın yüksek bir oranda artışı söz konusudur [75]. Bu durumun maternal-fetal plasental bariyerin kademeli olarak parçalanmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir [109]. Ayrıca geç gebelikte fetal cfDNA konsantrasyonlarının analizinde, üçüncü üç ayda gebelik yaşı ile fetal DNA konsantrasyonları pozitif bir korelasyon göstermiştir. Geç üçüncü üç ayda her hafta fetal cfDNA konsantrasyonunda %29.3 oranında bir artış gözlenmektedir [110].

Bu tez çalışmasında, 15 gebe kısırta tüm gebelik aylarında (1-11. aylar) cfDNA izolasyonu sonucunda elde edilen cfDNA konsantrasyonları değerlendirildi, ancak tüm atlar değerlendirildiğinde aylara göre konsantrasyon oranları açısından anlamlı bir fark gözlenmedi. Dişi ve erkek fetüs taşıyan maternal serum cfDNA konsantrasyonlarının gebelik ayları arasında fark olup olmadığı analiz edildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç gözlenmedi ($p>0,05$). İlginç olarak, dişi fetüs taşıyan gebelerin erkek fetüs taşıyan gebelere oranla daha yüksek cfDNA konsantrasyonlarının olduğu saptandı. Bu farklılığın 3. ayda daha belirgin ve istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır ($p=0,024$). Ancak, 6. ayda ve 10. aylarda istatistiksel anlamlılık seviyesine ulaşmadığı görülmektedir. Üçayların ortalamaları alınarak incelendiğinde, 1. ve 3. üç aylarda dişi fetüs taşıyan kısırakların erkek fetüs taşıyan kısıraklara göre cfDNA konsantrasyonlarının belirgin bir şekilde yüksek olduğu (sırasıyla, $p=0,001$ ve $0,024$), gebeliğin 2. üç ay ortalamasında ise dişi ve erkek fetüsler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0,05$).

Literatürde gebelik süresince gebeliğin üç üçayında maternal plazmada cfDNA konsantrasyonlarının takibinin yapıldığı bir çalışmada, gebelik süresince cfDNA konsantrasyonundaki artış, üçüncü üçayında en yüksek değerde tespit edilmiştir. Gebeliğin sonuna doğru toplam maternal cfDNA yüzdesindeki artış eğilimi ardışık üçay için %8,3, %10,7 ve %23,2 değerleri ile istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur [77]. Gebeliğin üçayında maternal plazmada cfDNA konsantrasyonlarının tespitinin yapıldığı farklı bir çalışmada ise birinci üçayda cfDNA artış oranı % 1,19 olarak bildirilirken artış oranı, ikinci üçayda %0,85, üçüncü üçayda %0,27 olarak bildirilmiştir [76]. Ancak, bu yayınlarda cinsiyet dağılımı konusunda bir inceleme yapılmamıştır. Bu tez çalışması kapsamında çalışılan örnek sayısının az olması kısıtlayıcı bir unsurdur ve daha geniş kısırak popülasyonunda çalışılması daha detaylı sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır.

İnsanlar, çeşitli besinlerin geçişine ve immünolojik değişime izin veren minimum miktarda feto-maternal histolojik katman içeren bir plasenta türü olan hemokoriyal plasentaya sahiptir. Bununla birlikte, kısrakların fetal, maternal zarlardan ve 6 katmandan oluşan epitelyal bir plasentası vardır. Bu, kısrak maternal plazmasının önemli ölçüde daha az miktarda fetal cfDNA içerdiği gerçeğini vurgulayan fetüs ve kısrak arasında çok daha sınırlı bir yapı olduğu anlamına gelmektedir [105]. Bu durumda maternal plazmadan cfDNA izolasyonunun çok dikkatli ve hassas bir şekilde gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Yüksek konsantrasyonda ve saflıkta elde edilen cfDNA örnekleri, çalışmanın ileri basamakları için sağlam bir temel oluşturmaktadır. Kısraklarda fetal cfDNA'nın maternal plazmaya geçişinin bu zar katmanları nedeni ile sınırlı olması nedeni ile *AMELY* gen dizilerinin daha zenginleştirilmesi amacı ile qRT-PCR öncesinde gene özgü primerler ile TD-PCR yöntemi kullanılarak amplifikasyon gerçekleştirildi.

cfDNA kalitesini ve konsantrasyonunu önemli ölçüde etkileyen koşullardan birisi örneğin elde edilme koşullarının optimizasyonu ve maternal plazmanın elde edilme yöntemidir. Gebelik süresince gebeliğin her bir gestasyonel ayında, 11 gebelik ayı boyunca aynı koşullarda, aynı zaman diliminde ve aynı gündelik fiziksel aktivite sonrası şartlarında periferik kan örneklerinin alınması, cfDNA'nın maternal plazmaya salınımına etki etmekte olan stres, beslenme şekli, hareket miktarı gibi parametrelerin dışlanabilmesi adına önem taşımaktadır. Periferik kan örneklerinden plazma elde etme aşamaları ve elde edilen plazmanın muhafaza edilme koşulları da genetik materyalin

korunması ve verimli bir çalışma için temel oluşturması açısından dikkat edilmesi gereken önemli noktalar olarak gözlenmiştir. Tez çalışmasında *AMELY* geninin *GAPDH* geni ile beraber analiz edilmesinin en önemli nedenlerinden birisi örnek kalitesini değerlendirme amacıdır. Optimizasyonlarda ve analizlerde *AMELY* qRT-PCR ürünlerinin çözülme eğrisi analizlerinde tutarsızlık görüldüğünde *GAPDH* çözülme eğrilerinde de benzer tutarsızlıkların olduğunu saptadık. Bu bulgu, maternal kandaki cfDNA yetersizliğinden, plazmanın uygun şekilde ayırlamamasından ya da cfDNA'nın izolasyonunun yeterli kalitede yapılamamasından kaynaklanabilmektedir.

Cinsiyet tayini için yapılan PCR tekniği genellikle Y-spesifik amplifikasyonun varlığına veya yokluğuna dayanmaktadır [102]. *ZFX*, *ZFY* ve *SRY* genleri kullanılarak gerçekleştirilen PCR amplifikasyonu kısıraklarda fetal cinsiyet tayini için başarıyla kullanılmıştır [107]. *SRY* geni hayvanlarda ve insanlarda fetal cinsiyet tayininde kullanılırken *AMELY* geni ruminantlarda fetal cinsiyet tayininde kullanılmaktadır. Fetal cinsiyet tayininde en yaygın olarak sex determining region Y (*SRY*) ve Amelogenin X (*AMELX*), Amelogenin Y (*AMELY*) genlerinin kullanıldığı bildirilmiştir [68][111][66][112]. Araştırmacılar koyunlarda gebelikte *AMELY* geninin gebelik süresince maternal kan plazmasından fetal cinsiyeti belirlemişlerdir [112].

Literatürde, atlarda dolaşımdaki serbest fetal cfDNA kullanımına ilişkin araştırmalarda, maternal plazmada dişi fetüsün belirlenmesine ilişkin potansiyel olarak daha doğru sonuçlar ve özgüllük sunacak primerleri hedeflemek için homolog X ve Y fragmanlarının kullanımı araştırılmamıştır. Kadivar ve arkadaşları, koyunlarda bu tür bir metodolojinin önemini vurgulayarak %93 oranında bir doğrulukla, bir çalışma yürütmüşlerdir. İzolasyon yöntemleri ve primer tasarımı dahil olmak üzere metodolojilerin birçok yönü insan çalışmaları ile farklılık göstermektedir ve sonuçların doğruluğu, duyarlılığı ve özgüllüğü, bunların şu anda uygulanabilir rutin laboratuvar testleri olması için araştırma yoluyla henüz yeterince rafine edilmemiş ve desteklenmemiştir [105].

Deneylerde ek kontroller kullanılması çalışmanın kanıtlanabilir doğruluğu için önem taşımaktadır. Doğruluğu göstermek için gebe olmayan kısırak cfDNA'sı ile aygır cfDNA'sı kullanılmıştır. Primerlerin doğru sekansı yükseltmesini sağlamak için pozitif kontroller olarak erkek kan plazmasındaki Y kromozomuna özgü sekansların amplifikasyonu kullanılmıştır. Gelecekteki çalışmalarda kontrolü not etmek, doğruluğu,

duyarlılığı ve verimliliği ölçmek ve kontrol metodolojilerini göz önünde bulundurarak önceki araştırmalarla karşılaştırmak esastır [105].

Bu tez çalışmasının kısıtlı kalan en önemli bölümleri, *Equus Caballus* genom dizi bilgisinin net olarak belirlenememiş olması, çalışılan örnek sayısının az olması ve cfDNA miktarının gebeliğin her dönemi için yeterli kalite ve miktarda olmaması şeklindedir.

Sonuç olarak, literatür taraması yapıldığında kısıraklarda erken fetal cinsiyet tayininde *AMELY* geninin kullanılması kısıtlıdır. Tez çalışmasından elde edilen bulgular cfDNA kalitesi ve miktarı yeterli olduğu koşulda *AMELY* geninin kısıraklarda fetal cinsiyet tayini için kullanılabilir olduğunu göstermektedir. Diğer yandan, cfDNA konsantrasyonlarının dişi ve erkek gebeliklerde farklı olduğu ve özellikle üçay olarak değerlendirildiğinde anlamlı farklılığının olduğu gösterilmiştir. Çalışmanın daha geniş gebe kısırak serilerinde ve diğer hayvanlarda tekrarlanması, sonuçların doğrulununun gösterilmesi açısından önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

1. Anatoli Kustanovich, Ruth Schwartz, Tamar Peretz & Albert Grinshpun. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biology & Therapy*. 2019;20(8):1057-1067.
2. Edwards RL, Menteer J, Lestz RM, Baxter-Lowe LA. Cell-free DNA as a solid-organ transplant biomarker: technologies and approaches. *Biomark Med*. 2022;16(5):401-415.
3. Lehmann-Werman R, Neiman D, Zemmour H, Moss J, Magenheimer J, Vaknin-Dembinsky A, Rubertsson S, Nellgård B, Blennow K, Zetterberg H, et al. Identification of tissue-specific cell death using methylation patterns of circulating DNA. *Proc Natl Acad Sci*. 2016;113(13):E1826–E1834.
4. Wong FCK, Sun K, Jiang P, Cheng YKY, Chan KCA, Leung TY, Chiu RWK, Lo YMD. Cell-free DNA in maternal plasma and serum: a comparison of quantity, quality and tissue origin using genomic and epigenomic approaches. *Clin Biochem*. 2016;49(18):1379–1386.
5. McAnena P, Brown JAL, Kerin MJ. Circulating nucleosomes and nucleosome modifications as biomarkers in cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9(1):5.
6. Rahier JF, Druetz A, Faugeras L, et al. Circulating nucleosomes as new blood-based biomarkers for detection of colorectal cancer. *Clin Epigenetics*. 2017;9(1):1–7.
7. Wu DC, Lambowitz AM. Author Correction: Facile single-stranded DNA sequencing of human plasma DNA via thermostable group II intron reverse transcriptase template switching. *Sci Rep*. 2018;8(1):4056.
8. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA comprises an in vivo nucleosome footprint that informs its tissues-of-origin. *Cell*. 2016;164(1–2):57–68.
9. Ivanov M, Baranova A, Butler T, Spellman P, Mileyko V. Non-random fragmentation patterns in circulating cell-free DNA reflect epigenetic regulation. *BMC Genomics*. 2015;16(13):1–12.
10. Fleischhacker M, Schmidt B. Circulating nucleic acids (CNAs) and cancer: a survey. *Biochim Biophys Acta - Rev Cancer*. 2007;1775(1):181–232.

11. Fernandes J, Michel V, Camorlinga-Ponce M, Gomez A, Maldonado C, De Reuse H, Torres J, Touati E. Circulating mitochondrial DNA level, a noninvasive biomarker for the early detection of gastric cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2014;23(11):2430–2438.
12. Kananen L, Hurme M, Bürkle A, et al. Circulating cell-free DNA in health and disease - the relationship to health behaviours, ageing phenotypes and metabolomics. *Geroscience.* 2023;45(1):85-103.
13. Celec P, Vlková B, Lauková L, Bábíčková J, Boor P. Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases. *Expert Rev Mol Med.* 2018;20:1–14.
14. Gauthier VJ, Tyler LN, Mannik M. Blood clearance kinetics and liver uptake of mononucleosomes in mice. *J Immunol.* 1996;156(3):1151–1156.
15. Yu SCY, Lee SWY, Jiang P, et al. High-resolution profiling of fetal DNA clearance from maternal plasma by massively parallel sequencing. *Clin Chem.* 2013;59(8):1228–1237.
16. Bronkhorst AJ, Ungerer V, Oberhofer A, et al. New Perspectives on the Importance of Cell-Free DNA Biology. *Diagnostics (Basel).* 2022;12(9):2147.
17. Sifakis S, Koukou Z, Spandidos DA. Cell-free fetal DNA and pregnancy-related complications (review). *Mol Med Rep.* 2015;11(4):2367-2372.
18. Scotchman E, Shaw J, Paternoster B, Chandler N, Chitty LS. Non-invasive prenatal diagnosis and screening for monogenic disorders. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2020;253:320-327.
19. Kadivar A, Rashidzadeh H, Davoodian N, Nazari H, Dehghani Tafti R, Heidari Khoei H, Seidi Samani H, Modaresi J, Ahmadi E. Evaluation of the efficiency of TaqMan duplex real-time PCR assay for non-invasive pre-natal assessment of foetal sex in equine. *Reproduction in Domestic Animals.* 2021;56(2):287-91.
20. Hasegawa T, Sato F, Ishida N, Fukushima Y, Mukoyama H. Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. *J Vet Med Sci.* 2000;62(10):1109-1110.
21. Martinez MM, Costa M, Ratti C. Molecular screening of XY SRY-negative sex reversal cases in horses revealed anomalies in amelogenin testing. *J Vet Diagn Invest.* 2020;32(6):938-941.
22. Ahmadi MH, Amirizadeh N, Rabiee M, Rahimi-Sharbat F, Pourfathollah AA. Noninvasive Fetal Sex Determination by Real-Time PCR and TaqMan Probes. *Rep Biochem Mol Biol.* 2020;9(3):315-323.

23. Meaney C, Norbury G. Non-invasive prenatal diagnosis. *Methods Mol Biol.* 2011;688:155-172.
24. Davalieva K, Dimcev P, Efremov GD, Plaseska-Karanfilska D. Non-invasive fetal sex determination using real-time PCR. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2006;19(6):337-342.
25. MANDEL P, METAIS P. Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [Nuclear Acids In Human Blood Plasma]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1948;142(3-4):241-243.
26. Tan E.M., Schur P.H., Carr R.I., Kunkel H.G. Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Investig.* 1966;45:1732–1740.
27. Lo YM, Corbetta N, Chamberlain PF, et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet.* 1997;350(9076):485-487.
28. Fournié G.J., Martres F., Pourrat J.P., Alary C., Rumeau M. Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Gerontology.* 1987;39:215–221.
29. Qi T, Pan M, Shi H, Wang L, Bai Y, Ge Q. Cell-Free DNA Fragmentomics: The Novel Promising Biomarker. *Int J Mol Sci.* 2023;24(2):1503.
30. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 2000;256:12–18.
31. de Miranda FS, Barauna VG, dos Santos L, Costa G, Vassallo PF, Campos LCG. Properties and Application of Cell-Free DNA as a Clinical Biomarker. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021; 22(17):9110.
32. Jahr S, Hentze H, Englisch S, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res.* 2001;61(4):1659-1665.
33. Gerson KD, O'Brien BM. Cell-Free DNA: Screening for Single-Gene Disorders and Determination of Fetal Rhesus D Genotype. *Obstet Gynecol Clin North Am.* 2018;45(1):27-39.
34. Taglauer ES, Wilkins-Haug L, Bianchi DW. Review: cell-free fetal DNA in the maternal circulation as an indication of placental health and disease. *Placenta.* 2014;35 Suppl(Suppl):S64-S68.
35. Vermeesch JR, Voet T, Devriendt K. Prenatal and pre-implantation genetic diagnosis. *Nat Rev Genet.* 2016;17(10):643-656.
36. Hill M, Barrett AN, White H, Chitty LS. Uses of cell free fetal DNA in maternal circulation. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2012;26(5):639-654.

37. Teo YV, Capri M, Morsiani C, et al. Cell-free DNA as a biomarker of aging. *Aging Cell*. 2019;18(1):e12890.
38. Haghiac M, Vora NL, Basu S, et al. Increased death of adipose cells, a path to release cell-free DNA into systemic circulation of obese women correction appears in Obesity. *Silver Spring*. 2012;20(11):2213-2219.
39. Borenstein S, Ephrati-Elizur E. Spontaneous release of DNA in sequential genetic order by *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*. 1969;45(1):137-152.
40. Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Aucamp J, van Dyk E, du Plessis L, Pretorius PJ. Characterization of the cell-free DNA released by cultured cancer cells. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1863(1):157-165.
41. Bronkhorst AJ, Wentzel JF, Ungerer V, et al. Sequence analysis of cell-free DNA derived from cultured human bone osteosarcoma (143B) cells. *Tumour Biol*. 2018;40(9):1010428318801190.
42. Kustanovich A, Schwartz R, Peretz T, Grinshpun A. Life and death of circulating cell-free DNA. *Cancer Biol Ther*. 2019;20(8):1057-1067.
43. Barrett KL, Willingham JM, Garvin AJ, Willingham MC. Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 2001;49(7):821-832.
44. Sekizawa A, Samura O, Zhen DK, Falco V, Farina A, Bianchi DW. Apoptosis in fetal nucleated erythrocytes circulating in maternal blood. *Prenat Diagn*. 2000;20(11):886-889.
45. Wang BG, Huang HY, Chen YC, et al. Increased plasma DNA integrity in cancer patients. *Cancer Res*. 2003;63(14):3966-3968.
46. Lui YY, Chik KW, Chiu RW, Ho CY, Lam CW, Lo YM. Predominant hematopoietic origin of cell-free DNA in plasma and serum after sex-mismatched bone marrow transplantation. *Clin Chem*. 2002;48(3):421-427.
47. Ashoor G, Syngelaki A, Poon LC, Rezende JC, Nicolaides KH. Fetal fraction in maternal plasma cell-free DNA at 11-13 weeks' gestation: relation to maternal and fetal characteristics. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013;41(1):26-32.
48. Lo YM, Zhang J, Leung TN, Lau TK, Chang AM, Hjelm NM. Rapid clearance of fetal DNA from maternal plasma. *Am J Hum Genet*. 1999;64(1):218-224.
49. Han DSC, Lo YMD. The Nexus of cfDNA and Nuclease Biology. *Trends Genet*. 2021;37(8):758-770.
50. Volik S, Alcaide M, Morin RD, Collins C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol Cancer Res*. 2016;14(10):898-908.

51. Snyder MW, Kircher M, Hill AJ, Daza RM, Shendure J. Cell-free DNA Comprises an In Vivo Nucleosome Footprint that Informs Its Tissues-Of-Origin. *Cell*. 2016;164(1-2):57-68.
52. Shi J, Zhang R, Li J, Zhang R. Size profile of cell-free DNA: A beacon guiding the practice and innovation of clinical testing. *Theranostics*. 2020;10(11):4737-4748.
53. Aucamp J, Bronkhorst AJ, Peters DL, Van Dyk HC, Van der Westhuizen FH, Pretorius PJ. Kinetic analysis, size profiling, and bioenergetic association of DNA released by selected cell lines in vitro. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(14):2689-2707.
54. Mouliere F, Robert B, Arnau Peyrotte E, et al. High fragmentation characterizes tumour-derived circulating DNA. *PLoS One*. 2011;6(9):e23418.
55. Thierry AR, El Messaoudi S, Gahan PB, Anker P, Stroun M. Origins, structures, and functions of circulating DNA in oncology. *Cancer Metastasis Rev*. 2016;35(3):347-376.
56. Duque-Afonso J, Waterhouse M, Pfeifer D, et al. Cell-free DNA characteristics and chimerism analysis in patients after allogeneic cell transplantation. *Clin Biochem*. 2018;52:137-141.
57. Che H, Stanley K, Jatsenko T, Thienpont B, Vermeesch JR. Expanded knowledge of cell-free DNA biology: potential to broaden the clinical utility. *Extracellular Vesicles and Circulating Nucleic Acids*. 2022; 3(3):216-34.
58. Szilágyi M, Pös O, Márton É, et al. Circulating Cell-Free Nucleic Acids: Main Characteristics and Clinical Application. *Int J Mol Sci*. 2020;21(18):6827.
59. van der Vaart M, Pretorius PJ. Circulating DNA. Its origin and fluctuation. *Ann N Y Acad Sci*. 2008;1137:18-26.
60. Yao W, Mei C, Nan X, Hui L. Evaluation and comparison of in vitro degradation kinetics of DNA in serum, urine and saliva: A qualitative study. *Gene*. 2016;590(1):142-148.
61. Tsui DW, Chiu RW, Lo YD. Epigenetic approaches for the detection of fetal DNA in maternal plasma. *Chimerism*. 2010;1(1):30-35.
62. Rule K, Chosed RJ, Arthur Chang T, David Wininger J, Roudebush WE. Relationship between blastocoel cell-free DNA and day-5 blastocyst morphology. *J Assist Reprod Genet*. 2018;35(8):1497-1501.

63. Lau TW, Leung TN, Chan LY, et al. Fetal DNA clearance from maternal plasma is impaired in preeclampsia. *Clin Chem*. 2002;48(12):2141-2146.
64. Zhu B, Sun QW, Lu YC, Sun MM, Wang LJ, Huang XH. Prenatal fetal sex diagnosis by detecting amelogenin gene in maternal plasma. *Prenat Diagn*. 2005;25(7):577-581.
65. Basaran S, Has R, Kalelioglu IH, et al. Clinical, Cytogenetic and Molecular Cytogenetic Outcomes of Cell-Free DNA Testing for Rare Chromosomal Anomalies. *Genes (Basel)*. 2022;13(12):2389.
66. Kadivar A, Hassanpour H, Dehcheshmeh JA. A novel approach to prenatal fetal sex diagnosis by detecting an insertion in the Y-chromosome of ovine Amelogenin gene. *Small Ruminant Research*. 2015;123(2-3):218-23.
67. Kadivar A, Tafti RD, Khoei HH, Nasirabadi MH, Esfandabadi NS, Cheraghi N, Davoodian N. Developing a nested real-time PCR assay for determining Equine fetal sex prenatally. *Journal of equine veterinary science*. 2016;40:74-9.
68. de Leon PM, Campos VF, Dellagostin OA, Deschamps JC, Seixas FK, Collares T. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). *Theriogenology*. 2012;77(3):694-698.
69. Palei AC. Cell-free DNA as a potential biomarker for preeclampsia. *Expert Rev Mol Diagn*. 2021;21(12):1253-1256.
70. Kadivar A, Hassanpour H, Mirshokraei P, Azari M, Gholamhosseini K, Karami A. Detection and quantification of cell-free fetal DNA in ovine maternal plasma; use it to predict fetal sex. *Theriogenology*. 2013;79(6):995-1000.
71. Kowarsky M, Camunas-Soler J, Kertesz M, et al. Numerous uncharacterized and highly divergent microbes which colonize humans are revealed by circulating cell-free DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017;114(36):9623-9628.
72. Sigdel TK, Archila FA, Constantin T, et al. Optimizing Detection of Kidney Transplant Injury by Assessment of Donor-Derived Cell-Free DNA via Massively Multiplex PCR. *J Clin Med*. 2018;8(1):19.
73. Ariga H, Ohto H, Busch MP, et al. Kinetics of fetal cellular and cell-free DNA in the maternal circulation during and after pregnancy: implications for noninvasive prenatal diagnosis. *Transfusion*. 2001;41(12):1524-1530.
74. Gomez-Lopez N, Romero R, Schwenkel G, et al. Cell-Free Fetal DNA Increases Prior to Labor at Term and in a Subset of Preterm Births. *Reprod Sci*. 2020;27(1):218-232.

75. Ingargiola I, Vaerman JL, Debiève F, Palgen G, Verellen-Dumoulin C, Hubinont C. Free fetal DNA concentration in maternal plasma during normal labour at term. *Prenat Diagn.* 2003;23(13):1077-1082.
76. Zhou Y, Wang Y, Addai FP, et al. Analysis of cell-free fetal DNA in 16,843 pregnant women from a single center in China using targeted sequencing approach. *Placenta.* 2022;122:18-22.
77. Horinek A, Korabecna M, Panczak A, et al. Cell-free fetal DNA in maternal plasma during physiological single male pregnancies: methodology issues and kinetics. *Fetal Diagn Ther.* 2008;24(1):15-21.
78. Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, et al. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science.* 2009;326(5954):865-867.
79. Sasaki S, Shimokawa H. The amelogenin gene. *Int J Dev Biol.* 1995;39(1):127-133.
80. Lau EC, Mohandas TK, Shapiro LJ, Slavkin HC, Snead ML. Human and mouse amelogenin gene loci are on the sex chromosomes. *Genomics.* 1989;4(2):162-168.
81. Bansal AK, Shetty DC, Bindal R, Pathak A. Amelogenin: A novel protein with diverse applications in genetic and molecular profiling. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(3):395-399.
82. Han SH, Yang BC, Ko MS, Oh HS, Lee SS. Length difference between equine ZFX and ZFY genes and its application for molecular sex determination. *J Assist Reprod Genet.* 2010;27(12):725-728.
83. Ontsouka E, Lüthi M, Zaugg J, Schroeder M, Albrecht C. Establishment and validation of an approach allowing unequivocal fetal sex determination based on placental sex-specific genes. *Placenta.* 2021;112:132-134.
84. Kolialexi A, Tounta G, Apostolou P, et al. Early non-invasive detection of fetal Y chromosome sequences in maternal plasma using multiplex PCR. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2012;161(1):34-37.
85. Zargari M, Sadeghi MR, Shahhosseiny MH, et al. Fetal Sex Determination using Non-Invasive Method of Cell-free Fetal DNA in Maternal Plasma of Pregnant Women During 6(th)- 10(th) Weeks of Gestation. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2011;3(4):201-206.
86. Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature.* 1990;346(6281):240-244.

87. Mäkinen A, Hasegawa T, Mäkilä M, Katila T. Infertility in two mares with XY and XXX sex chromosomes. *Equine Vet J*. 1999;31(4):346-349.
88. Syndercombe Court D. The Y chromosome and its use in forensic DNA analysis. *Emerg Top Life Sci*. 2021;5(3):427-441.
89. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 1991;351(6322):117-121.
90. Meyers-Wallen VN, Hurtgen J, Schlafer D, et al. Sry-negative XX true hermaphroditism in a Pasa Fino horse. *Equine Vet J*. 1997;29(5):404-408.
91. Hasegawa T, Ishida M, Harigaya T, Sato F, Ishida N, Mukoyama H. Linear SRY transcript in equine testis. *J Vet Med Sci*. 1999;61(1):97-100.
92. Jia Y, Li S, Allen G, Feng S, Xue L. A novel glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) promoter for expressing transgenes in the halotolerant alga *Dunaliella salina*. *Curr Microbiol*. 2012;64(5):506-513.
93. Sirover MA. New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1432(2):159-184.
94. Cummings M, Sarveswaran J, Homer-Vanniasinkam S, Burke D, Orsi NM. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is an inappropriate housekeeping gene for normalising gene expression in sepsis. *Inflammation*. 2014;37(5):1889-1894.
95. Lo YM, Chan KC, Sun H, et al. Maternal plasma DNA sequencing reveals the genome-wide genetic and mutational profile of the fetus. *Sci Transl Med*. 2010;2(61):61ra91.
96. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol Genomics*. 2005;21(3):389-395.
97. Singh C, Roy-Chowdhuri S. Quantitative Real-Time PCR: Recent Advances. *Methods Mol Biol*. 2016;1392:161-176.
98. Harshitha R, Arunraj DR. Real-time quantitative PCR: A tool for absolute and relative quantification. *Biochem Mol Biol Educ*. 2021;49(5):800-812.
99. Untergasser A, Ruijter JM, Benes V, van den Hoff MJB. Web-based LinRegPCR: application for the visualization and analysis of (RT)-qPCR amplification and melting data. *BMC Bioinformatics*. 2021;22(1):398.

100. Gadkar Vy, Filion M. New Developments in Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction Technology. *Curr Issues Mol Biol*. 2014;16:1-6.
101. Kim J, Lim J, Lee C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol Adv*. 2013;31(8):1358-1373.
102. Moustafa LA, Hahn J, Roselius R. Versuche zur Geschlechtsbestimmung an Tag 6 und 7 alten Rinderembryonen [Attempts at sex determination on 6- and 7- day old cattle embryos]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 1978;91(12):236-238.
103. Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for Sry. *Nature*. 1991;351(6322):117-121.
104. Fajfar-Whetstone C, Rayburn III AL, Schook L, Wheeler M. Sex determination of porcine preimplantation embryos via y-chromosome specific DNA sequences. *Anim Biotechnol*. 1993;4:183-93.
105. Piprek RP. Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. *Int J Dev Biol*. 2010;54(5):779-786.
106. Tonekaboni FR, Narenjisani R, Staji H, Ahmadi-Hamedani M. Comparison of Cell-Free Fetal DNA Plasma Content Used to Sex Determination Between Three Trimesters of Pregnancy in Torkaman Pregnant Mare. *J Equine Vet Sci*. 2020;95:103273.
107. Azarpeykan S, Dittmer KE. Evaluation of housekeeping genes for quantitative gene expression analysis in the equine kidney. *J Equine Sci*. 2016;27(4):165-168.
108. Bogaert L, Van Poucke M, De Baere C, Peelman L, Gasthuys F, Martens A. Selection of a set of reliable reference genes for quantitative real-time PCR in normal equine skin and in equine sarcoids. *BMC Biotechnol*. 2006;6:24.
109. Chan LY, Leung TN, Chan KC, et al. Serial analysis of fetal DNA concentrations in maternal plasma in late pregnancy. *Clin Chem*. 2003;49(4):678-680.
110. Mäkinen A, Suojala L, Niini T, et al. X chromosome detection in an XO mare using a human X paint probe, and PCR detection of SRY and amelogenin genes in 3 XY mares. *Equine Vet J*. 2001;33(5):527-530.
111. Dervishi E, Martinez-Royo A, Sánchez P, et al. Reliability of sex determination in ovine embryos using amelogenin gene (AMEL). *Theriogenology*. 2008;70(2):241-247.

112. Divar MR, Sharifiyazdi H, Kafi M. Application of polymerase chain reaction for fetal gender determination using cervical mucous secretions in the cow. *Vet Res Commun.* 2012;36(4):215-220.
113. Janečka JE, Davis BW, Ghosh S, et al. Horse Y chromosome assembly displays unique evolutionary features and putative stallion fertility genes. *Nat Commun.* 2018;9(1):2945.



İNTİHAL RAPOR FORMU

KISRAKLARDA MATERNAL PLAZMADA AMELY VE GAPDH GENLERİNİN ANALİZİ VE KANTİTASYONU-2

ORJİNALLIK RAPORU

% 10	% 9	% 2	% 4
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 3
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
3	Submitted to Canakkale Onsekiz Mart University Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
5	library.cu.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1
6	www.uakb.org İnternet Kaynağı	<% 1
7	openaccess.ogu.edu.tr:8080 İnternet Kaynağı	<% 1
8	cdn.istanbul.edu.tr İnternet Kaynağı	<% 1

sistem.nevsehir.edu.tr