



T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FMF(AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ) HASTALARINDA
İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNDEN SORUMLU MDR1
(MULTI DRUG RESISTANCE 1) GENİNDE
GERÇEKLEŞEN GEN POLİMORFİZİMLERİNİN
İNCELENMESİ**

**İSMAİL ÇAĞDAŞ
ÇİMENLER**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOMÜHENDİSLİK ve BİLİMLERİ
ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2019

T.C.
KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ FEN
BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FMF(AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ) HASTALARINDA
İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNDEN SORUMLU MDR1
(MULTI DRUG RESISTANCE 1) GENİNDE
GERÇEKLEŞEN GEN POLİMORFİZİMLERİNİN
İNCELENMESİ

İSMAİL ÇAĞDAŞ ÇİMENLER

Bu tez,

Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında

YÜKSEK LİSANS

derecesi için hazırlanmıştır.

KAHRAMANMARAŞ 2019

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü öğrencisi İsmail Çağdaş Çimenler tarafından hazırlanan “FMF(AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ) HASTALARINDA İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNDEN SORUMLU MDR1 (MULTI DRUG RESISTANCE 1) GENİNDE GERÇEKLEŞEN GEN POLİMORFİZİMLERİNİN İNCELENMESİ “ adlı bu tez, jürimiz tarafından 12.09.2019 tarihinde oy birliği / oy çokluğu ile Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Metin KILINÇ (DANIŞMAN)

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, K.Maraş Sütçü İmam Üni.

Prof. Dr. Fatma İnanç TOLUN (ÜYE)

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, K.Maraş Sütçü İmam Üni.

Doç. Dr. Mehmet Bertan YILMAZ (ÜYE)

Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı ,Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. Mustafa YAZICI

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Yazmış olduğum tezime ait bütün bilgilerin akademik çerçevede kurallara uygun olduğunu ve etik yönden kendi düşüncelerim ve araştırmalarımın sentezi olduğunu, ayrıca tezimin yazım ve imla kurallarına uygun olarak hazırlandığını, alıntı yapılan bütün kaynaklara eksiksiz atıfların yapıldığını bildiririm.

İSMAİL ÇAĞDAŞ ÇİMENLER

KAHRAMANMARAŞ 2019

Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Proje No: 2017/2-33 YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

**FMF(AİLEVİ AKDENİZ ATEŞİ) HASTALARINDA İLAÇ DİRENÇLİLİĞİNDEN
SORUMLU MDR1 (MULTI DRUG RESISTANCE 1) GENİNDE GERÇEKLEŞEN
GEN POLİMORFİZİMLERİNİN İNCELENMESİ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

İSMAİL ÇAĞDAŞ ÇİMENLER

ÖZET

Ailevi Akdeniz ateşi (AAA); Familial Mediterranean Fever (FMF) Akdeniz kökenli bireylerin oluşturduğu çoğunluklarda; Askenazi olmayan Yahudiler, Araplar, Türkler, Ermeniler arasında yaygındır. Hastalıktan sorumlu gen MEFV ilk olarak 1997 de tanımlanmıştır ve hastalığın tanımı değişmiştir. Bu tanımlama ile ailesel akdeniz ateşi MEFV geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu organizmanın enflamasyona verdiği yanıtın bozulmasıdır. FMF ile ilişkili olan MEFV geni, kromozom üzerinde 16p13.3’de yer almaktadır, 60 kilobazlık bir genomik DNA’sı olan ve 781 aminoasitli bir proteini (pyrin) kodlamaktadır. Toplamda 10 ekzondan oluşur. Özellikle 2. ve 10. ekzon mutasyonların çoğunu barındırmaktadır. Bu mutasyonlardan arasında en çok görüleni M694V (MEFV geninde 2080. nükleotitte (694. aminoasit) valinin proteini yerine metionin proteinin gelmesi neden olmaktadır.) E148Q, M680I (G/C), M680I (G/A), I692DEL, M694V, M694I, V726A, R761H ‘dır.

P-glikoproteini (P-gp) kodlayan insan MDR1 geni, değişik bireyler topluluğunda ilaçların biyo faydasını ve ilaç yanıt düzeyinin tespit edilmesinde kilit bir konumda bulunmaktadır. Akademik çalışmalarda günümüze dek MDR1 genine ait 50’den fazla SNP (Single Nucleotide Polymorphism) belirlenmiştir. ABCB1 geni olarak da bildiğimiz insan MDR1 (Multidrug Resistance) geni 7p21’de yer almaktadır, 28 ekzonu kapsamaktadır. P-glikoprotein (P-gp) adıyla daha çok bilinen 170 kDa büyüklüğünde bir transmembran taşıyıcı protein kodlamaktadır. P-gp, yüksek ATP ihtiyacı ksenobiyotiklerin, metabolik artık ürünlerin ve daha pek çok ilacın hücre metabolizması dışına taşınmasında aktif olarak rol üstlenmektedir. MDR1 geni üzerinde gerçekleşen polimorfizmlerin P-gp hareketliliğini ve ifade düzeyini değiştirerek çalışma fonksiyonları üzerinde önemli fonksiyonlarının olduğu yönünde bilgiler artmaktadır.

Çalışmamız da toplam 50 FMF mutasyonu taşıyan birey ile 50 adet FMF mutasyonu taşımayan birey olmak üzere toplam 100 bireyin kan örneklerinden MDR1 gen

polimorfizmine ait üç adet SNP noktasını inceledik. Bu SNP noktaları rs201298259 C/T; rs150114592 C/T ve rs199509670 A/G'ydı. Sonuç olarak bu bölgelerin genotipik varyantlarında çalışmış olduğumuz hasta grubuna ait sonuçlar ve kontrol grubuna ait sonuçlar arasında anlamlı bir ilişki bulunamadı.

Anahtar Kelimeler: Ailevi Akdeniz Ateşi, MDR1 Gen Polimorfizmi, İlaç Dirençliliği

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Biyomühendislik ve Bilimleri Anabilim Dalı, Ekim / 2019

Danışman: Prof. Dr. METİN KILINÇ

Sayfa sayısı: 38

**INVESTIGATION OF GENE POLYMORPHYSIS IN MDR1 (MULTI DRUG
RESISTANCE 1) GENE RESPONSIBLE FOR DRUG RESISTANCE IN FMF
(FAMILY MEDITERRANEAN FEVER) PATIENTS**

(MASTER THESIS)

İSMAİL ÇAĞDAŞ ÇİMENLER

ABSTRACT

Familial Mediterranean fever (FMF) In Mediterranean-based communities; Are widespread among Jews without Ashkenazi, Arabs, Turks, and Armenians. The gene responsible for the disease MEFV was first described in 1997 and the definition of the disease has changed. With this definition, the resulting of the mutations in the familial Mediterranean fever MEFV gene disrupt the response of organism to inflammation. The MEFV gene responsible for FMF is localized on chromosome 16p13.3, has a genomic DNA of 60 kb, and encodes a protein which includes 781 amino acid (Pyrine).Totally it is composed of 10 exons. The second and tenth exons contain most of the mutations. The most common mutations are M694V (2080. nucleotide in the MEFV gene (694. amino acid) causing the valine to substitute methionine.) E148Q, M680I (G/C), M680I (G/A), I692DEL, M694V, M694I, V726A, R761H .

The human MDR1 gene encoding P-glycoprotein (P-gp) plays a key role in determining drug bioavailability and drug response in different populations. More than 50 SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) have been identified in the MDR1 gene to date. The human MDR1 (Multidrug Resistance) gene, also known as ABCB1, is localized in 7p21 and contains 28 exons. This gene encodes a 170 kDa transmembrane carrier protein known as P-glycoprotein (P-gp). P-gp functions as an ATP-dependent pumping of xenobiotics, metabolic residues, and many drugs out of the cell. There is increasing evidence that existing polymorphisms in the MDR1 gene play an important role in functioning by affecting P-gp activity and expression level of the gene.

We studied three SNP points of MDR1 gene polymorphism from blood samples of a total of 100 individuals, 50 FMF mutation-bearing individuals and 50 FMF mutation-bearing individuals. These SNP points were rs201298259 C / T; rs150114592 C / T and rs199509670 A / G. Consequently no significant relationship was found between patient and control group in genotypic variants of these regions.

Key Words: Familial Mediterranean fever, MDR1 Gene Polymorphism, Drug Resistance

Kahramanmaras Sutcu Imam University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Bioengineering and Sciences, October / 2019

Supervisor: Prof. Dr. METİN KILINÇ

Number of pages: 38



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim de hem ders dönemim boyunca hem de tez çalışmalarım boyunca sahip olduğu bilgi birikimini paylaşarak, sabırla bana yol gösteren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Metin KILINÇ'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bu yola başlamama vesile olan değerli hocam Doç. Dr. Petek Piner BENLİ 'ye teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezimin her aşamasında bana manevi desteğini hissettiren kıymetli eşime, aileme ve tez hazırlama aşamasında dünyaya gelen oğluma teşekkür ederim.

İSMAİL ÇAĞDAŞ ÇİMENLER

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	I
ABSTRACT	III
TEŞEKKÜR	V
İÇİNDEKİLER.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	VIII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	IX
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Ailesel Akdeniz Ateşi	1
1.2 Kolşisin	2
1.3 MDR1 Geni	4
1.4 Genetik Polimorfizm	5
1.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu	5
1.5.1. PCR İşleminin Uygulama Aşamaları.....	5
1.5.2. DNA'nın Denatürasyonu Basamağı	7
1.5.3. Primerlerin Bağlanması (Annealing) Basamağı.....	7
1.5.4. Primerlerin Uzatılması (Extention, Elongation) Basamağı.....	8
2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	9
3. MATERYAL VE METOD	10
3.1. Materyal	10
3.2. Metod	10
3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu.....	10
3.2.2. Kullanılan Laboratuvar Cihazları.....	11
3.2.3. Kullanılan Diğer Ekipmanlar	11
3.2.4. DNA Miktarlarının Ölçülmesi.....	12
3.2.5. Real Time PCR.....	12
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	14
4.1. Tek Nokta Mutasyonu C/T (rs150114592).....	14
4.2. Tek Nokta Mutasyonu A/G (rs199509670)	15
4.3. Tek Nokta Mutasyonu C /T (rs201298259).....	18
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	20
KAYNAKLAR.....	22
ÖZGEÇMİŞ.....	25

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. MEFV geninin 16. Kromozomun kısa kolu üzerinde ki pozisyonu.....	2
Şekil 2.2. “Colchium Autumnale” ve Kolşisin.....	3
Şekil 2.3. “Gloriosa superba”	3
Şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Basamakları.....	6
Şekil 2.5. Termal Isıtıcı Cihazı (PCR Cihazı)	7
Şekil 3.1. Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Cihazı.....	12
Şekil 4.1. Sağlam ve hasta örneklerine ait çoğalma eğrileri	14
Şekil 4.2. Sağlam ve hasta örneklerine ait çok bileşenli prob çoğalmaları.....	15
Şekil 4.3. Sağlam ve hasta örneklerine ait rs150114592 için Allel Ayrılma Tabloları	15
Şekil 4.4. Sağlam ve hasta örneklerine ait çoğalma eğrileri	16
Şekil 4.5. Sağlam ve hasta örneklerine ait çok bileşenli prob çoğalmaları.....	17
Şekil 4.6. Sağlam ve hasta örneklerine ait rs199509670 için Allel Ayrılma Tabloları	17
Şekil 4.7 Sağlam ve hasta örneklerine ait çoğalma eğrileri	18
Şekil 4.8 Sağlam ve hasta örneklerine ait çok bileşenli prob çoğalmaları.....	19
Şekil 4.9 Sağlam ve hasta örneklerine ait rs201298259 için Allel Ayrılma Tabloları	19

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Örnek seçilimi	10
Çizelge 3.2. MN kandan DNA izolasyon kiti içeriği.....	11
Çizelge 3.3. PCR reaksiyon karışımı	12
Çizelge 3.4. Real Time PCR cihazında allellerin işaretli olduğu boyalar.....	13
Çizelge 3.5. Real Time PCR yürütme şartları	13



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AAA	: Ailevi Akdeniz Ateşi
FMF	: Familial Mediterranean Fever
MEFV	: Ailevi Akdeniz Ateşi geni (Mediterranean Fever)
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
kb	: Kilobaz
°C	: Santigrat derece
ML	: Mililitre
mg	: Miligram
µL	: Mikrolitre
dk	: Dakika
sn	: Saniye
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre

1. GİRİŞ

Popülasyonlarda; her bir bireyin veya toplulukların belirli bir ilaca göstermiş olduğu tepkilerin farklılıklar gösterdiği bilinmektedir. Bu farklılıklar her bir bireyin veya topluluğun genetik yapısında ki değişkenlere bağlı olarak kişiye özel tedavi mekanizmasının geliştirilmesini mecbur kılmaktadır. Hasta bireylere verilen ilaç tedavilerinin ve moleküler genetik araştırmaların bir arada yürütüldüğü bilim dalı olarak Farmakogenetik, kişinin genetik düzeninde varyasyonlara bağlı olarak ilaçlara göstermiş olduğu tepkileri ölçer. Hastanın genetik oluşumunu temel aldığı için, uygulanan tedaviyi kişiselleştirir en doğru dozda, en az yan etkiyle uygun ilaçların kullanılmasını amaçlar.

Ailevi Akdeniz Ateşi, ataklar şeklinde karın ağrısı ve ateş şikayetleriyle kendini belli eden çekinik geçişli bir genetik rahatsızlıktır. Bu rahatsızlığın en yaygın olarak görüldüğü yerler Akdeniz'e kıyısı olan ülkeler olup Türkler, Araplar, Yahudiler, Ermeniler ve Kuzey Afrikalılarda özellikle yaygındır.

Moleküler düzeyde bir yöntem olan gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile örneklerden elde edilen DNA ların hassas işaretli primerler vasıtasıyla çoğaltılmasını sağlamak ,bu çoğalan PCR lar üzerinden elde edilecek bilgiler ışığında da belirlediğimiz gene ait anne ve babadan gelen allellerin durumlarını inceleyerek polimorfizimleri araştırılacaktır.

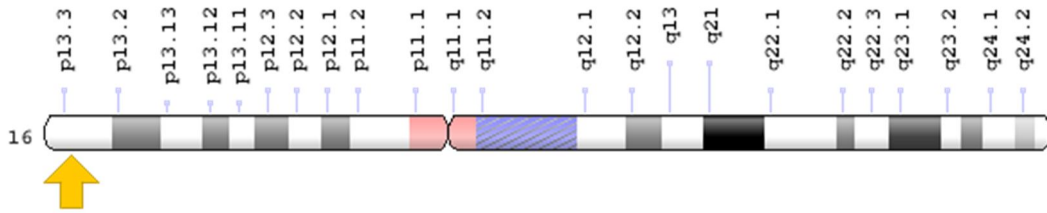
Araştırmamızda Ailevi akdeniz ateşi (AAA) hastası olan bireylerin, MDR1 gen polimorfizmlerini inceleyerek günlük kullanım zorunluluğu olan kolşisinin hastalar üzerinde gerçekten etki mekanizmasına sahip olup olmadıklarını ve MDR1 gen bölgesinde ki polimorfizmlerin dağılımına göre uygun kolşisin dozuyla tedavi olabilmelerine yardımcı olmayı, ve böylece kolşisin tedavisi sırasında hastanın karşılaşması muhtemel yan etkileri minimuma indirmeyi amaçladık .

1.1 Ailesel Akdeniz Ateşi

Ailesel Akdeniz Ateşi (Familial Mediterianian Fever, FMF, AAA), belirli periyotlarda gösterdiği atak şeklinde gelen ateş ve bununla birlikte seröz zarlarının inflamasyonu ile belirgin ,otozomal resesif geçişli, otoinflamatuvar bir hastalık türüdür. FMF; dağılım olarak özellikle Akdeniz çevresinde yerleşim gösteren Türk, Arap ,Yahudi ve Ermeni etnik kökenli insanlarda görülmekte olup; çok nadir olarak da Akdeniz bölgesi

dışında rastlanmaktadır (El-Shanti ve ark.,2006; Ergüven ve ark.,2006). Hastalığın klinik belirtileri başlıca, tekrarlayan kendini sınırlayan ateş ve bununla beraber karın ağrısı ,artrit ve deri lezyonları şeklinde gözlenir. Hastalığın semptomları % 60-70 olarak 10 yaşından önce, % 80-90 olarak 20 yaşından önce geç çocukluk döneminde görüldüğü ve ortalama 4,5 yaşında başladığı tespit edilmiştir (Gök ve ark.,2006 ; Majeed ve ark. 1989). FMF ‘ in Türkiye de görülme frekansı her bin kişide bir şeklinde olup; hastalığın kişi üzerinde etkisi 1-4 gün süresince, tekrarlanma sıklığı ise haftada bir ile yılda bir gibi değişkenlik göstermektedir. Yapılan farklı araştırmalara göre de yaklaşık olarak ülkemizde ki her beş kişiden bir tanesi taşıyıcılık göstermektedir. Ailevi akdeniz ateşinin en korkulan yanı ise amiloidoz oluşumuna bağlı olarak böbrek yetmezliğidir (Bakkaloğlu ve ark.; 2003).

FMF hastalığının sorumlu MEFV (MEditerranean FeVer) gen bölgesi, 16. Kromozoma ait kısa kolunda (16p13.3) yer almış olup 781 aminoasit uzunluğundadır. MEFV geni 10 ekzon bölgesinden oluşmuş olup günümüze kadar yaklaşık olarak 198 mutasyon tespit edilmiştir(Grimaldi ve ark., 2006; Kavak ve ark.2003). Yapılan çalışmalar göstermiştir ki mutasyonların büyük çoğunluğu ekzon 2 ve ekzon 10 içerisinde yer almış ve Türk toplumunda görülme sıklığı en fazla olanları ekzon 2 de E148Q ,G138A, T267I , E167D, E230K; ekzon 10 da ise M680L, 692delATA, V726A , K695R, G678E, 691delAAT ,V704I, M680I(G M680I(G >C), M694V, R761H, T681I, M694I 693delTGA, A744S, M680I(G M680I(G >A), mutasyonlarıdır (Tekin ve ark., 1999).



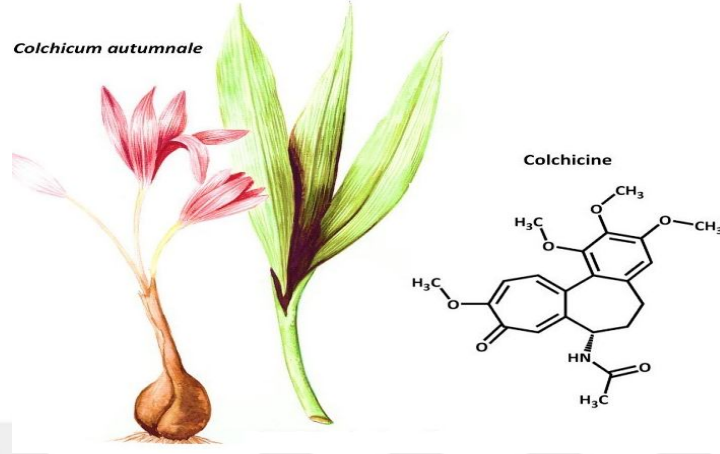
Şekil 2.1. MEFV geninin 16. Kromozomun kısa kolu üzerinde ki pozisyonu

1.2 Kolşisin

Tıp dünyasında daha çok bilinen adı “Colchium Autumnale” olan güz çiğdemi çiçeklerinden elde edilen kolşisin ile bir çok hastalık tedavisinde başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Doğada farkında olmadan kolşisin içeren bitkilerin tüketilmesi ölümcül olabilecek düzeylerde zehirlenme tehlikesi barındırmaktadır..

Kolşisin (“colchicine”), adını Karadeniz bölgesi’nin doğu kıyılarında eski dönemlerde yerleşim yeri olarak kullanılan ve kökeni Yunanca ‘ya uzanan “Colchis” isimli

yerden almaktadır. Zambakgiller familyasından olan *Colchicum autumnale* (meadow saffron) ve *Gloriosa superba* (glory lily) adlı iki farklı tür bitkiden elde edilmektedir (Ben-Chetrit ve ark. ,1998).



Şekil 2.2. “Colchium Autumnale” ve Kolşisin



Şekil 2.3. “Gloriosa superba”

İlk kez 6. yüzyılda gut tedavisi için kullanılmış olan kolşisin 1972 yılında Goldfinger tarafından AAA” nin tedavisinde kullanılmaya ilk kez başlanmıştır. Ayrıca modern tıpta da gut, behçet hastalığı, sweets”s sendromu, skleroderma, sarkoidoz, amiloidoz, vaskülit, immün trombositopenik purpura ve kistik fibrozis gibi birçok hastalığın tedavi sürecinde kullanılmaktadır (Ben-Chetrit ve ark.,1998; Cerquaglia ve ark. ,2005).

1.3 MDR1 Geni

Bir popülasyon içerisinde ilaçlara gösterilen bireysel tepkilerin geniş aralıkta olması ve benzer şekilde toplumlardan toplumlara da ilaç tepki düzeylerinde farklılıklar olduğu bilinmektedir. İlaç kinetiğinin ve her bir bireyin farklı ilaçlara karşı verdiği tepkinin kalıtsal özelliklere göre bireyden bireye ve toplumlar üzerinde çeşitlilik göstermesi, kullanılan yöntemlere bağlı kalarak toplumların genetik özelliklerinden ötürü “bireye özel tedavi” yaklaşımlarının uygulanmasını ve geliştirilmesini sağlamıştır (Schwab ve ark., 2003).

ABCB1 geni olarak da bildiğimiz insan MDR1 (Multidrug Resistance) geni 7p21’de yer almaktadır, 28 ekzonu kapsamaktadır. P-glikoprotein (P-gp) olarak da daha çok bilinen 170 kDa büyüklüğünde transmembran taşıyıcı bir protein kodlamaktadır. P-gp, yüksek ATP ihtiyacı ksenobiyotiklerin, metabolizma sonucu oluşan artık ürünlerin ve çoğu ilacın hücre dışına taşınmasında aktif olarak rol üstlenmektedir (Schwab ve ark., 2003; Sakaeda ve ark., 2005).

P-gp’nin klinik olarak önem taşıdığı öncelikle bu proteinin kanser hücrelerinde gen ifadesinin yükselmesi ve aktivitesiyle alakalı olarak kansere karşı mücadele eden ilaçlara karşı gelişen kemoterapötik direnç fenotipinin bir ürünü olarak bulunmuştur. Fakat bu protein üzerine daha detaylı yapılan çalışmalar incelendiğinde görüldü ki ince ve kalın bağırsakta bulunan epitel hücrelerinde, lökositler de, normal hücrelerde olarak değerlendirilen beyin ve testislerdeki endotel hücreleri gibi hücrelerde bu genin ifade düzeylerine rastlanmıştır (Schwab ve ark., 2003). Günümüzde P-gp’nin gastrointestinal sistem boyunca ilaç emilimini etkilediği, ilaçların idrar ve safra yoluyla atılımını gerçekleştirdiği ve ilaçların kan beyin bariyerine giriş çıkışlarda engel oluşturduğu bilinmektedir. Özetle P-gp, sadece kanserli hücrelerde görülen çoğul ilaç direncine sebep vermekle yetinmeyip, bir çok ilacın normal olduğu bilinen dokulardaki farmakokinetiklerini de etkilemektedir (Schwab ve ark., 2003).

MDR1 gen bölgesinde polimorfizm ilk olarak kanserli hücrelerde yapılan çalışmalarla tespit edilmiş ve daha sonra, tüm MDR1 kodlama bölgesi detaylı olarak belirlenmiştir (Marzolini ve ark., 2011). Yapılan bilimsel çalışmalarda MDR1 gen bölgesinde 50’den çok SNP belirlenmiştir. MDR1 gen bölgesinde yer alan polimorfizmler P-gp aktivitesini ve gen regülasyonunu düzenleyerek yapısal düzenlemeleri üzerinde etkin olmaktadır (Tang ve ark., 2002).

1.4 Genetik Polimorfizm

Deoksiribonükleik asit yapısında yeralan ve rastgele bir proteinin sentezi için gerekli reaksiyonlarında kullanılacak gizli bilgiyi barındıran özel nükleotid bölgesine gen denilir. İnsan DNA'sı yaklaşık olarak 3.000.000.000 baz çiftinden meydana gelen, 23 kromozom çifti içerisinde 35,000'den fazla gen barındıran, görünümü heliks yapısındadır. İki farklı insan arasındaki DNA'nın sadece %99,9'u benzemektedir ve bu çok küçük farklılıklar DNA dizilimdeki küçük değişikliklerden beslenmektedir (Gonzalez, ve ark., 1997).

Yeryüzünde pekçok kişinin kromozomlarında lokasyonu aynı DNA parçaları birbirine yakınlık gösterir. Populasyon içerisinde yer alan iki farklı bireye ait DNA'nın hemen hemen 1000 bç boyutundaki kısmı yalnızca bir baz çifti mutasyonu içerir. Genin üzerinde belirli lokusunda alternatif kopyaların her birine allel denir. İntronlarda ve gen aralarında sınırlandırılmış DNA dizilerinde değişim gösteren bazı alleller vardır. Protein kodlayan dizi farklılıkları, protein çeşitliliğine ve farklı dışa vurumların fenotipleri etkilemesine neden olur (Strachan ve ark., 1999). Sağlıklı bir popülasyon da belirli bir karakteri birden fazla fenotip temsil ediyorsa ve bu fenotiplerin popülasyon içerisinde temsil oranı % 1'den fazla oranda ise buna 'genetik polimorfizm', aynı şekilde temsil oranı % 1'den düşük ise 'genetik mutasyon' olarak adlandırılır. Polimorfizmler sessiz veya zararsız mutasyonlar olarak da isimlendirilebilirler (Gonzalez, ve ark., 1997).

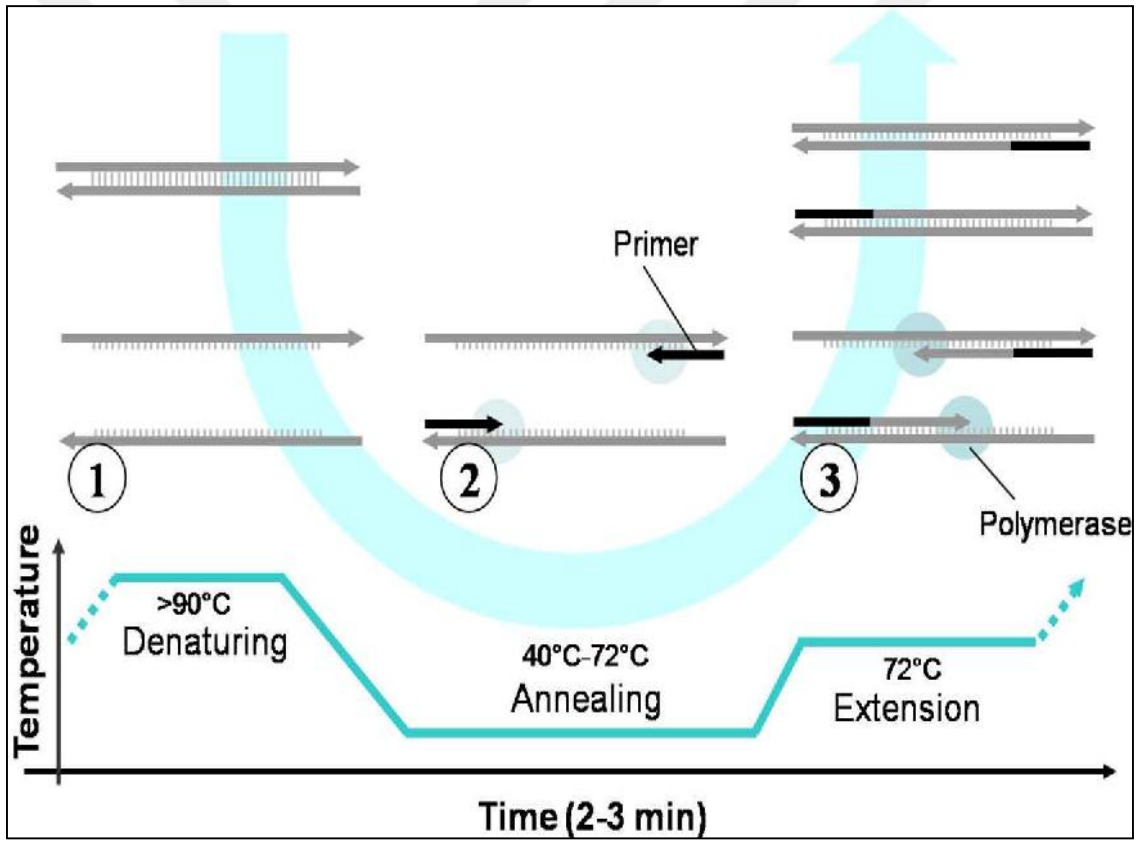
1.5 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Henry A. Erlich, Randall K. Saiki ve Kary Mullis isimli Bilim insanları 1985 yılında Amerika da çalışmış oldukları Cetus firması tarafından desteklenen bilimsel çalışmalarında hücre dışı koşullarda nükleik asitlerin çoğaltılması prensibine dayanarak bu yöntemi keşfetmişlerdir. Klinik diagnostikte özellikle tanılamada kullanım alanlarının büyük önem arz etmesi ve ayrıca bilimsel çalışmalarda da önemli kullanım alanları göstermesi Kary Mullis'a, 1993 yılında Nobel Kimya Ödülünü almasını sağlamıştır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu laboratuvar şartlarında gerçekleştirilen hücre dışı kopyalamadır. (Birben , 2006).

1.5.1. PCR İşleminin Uygulama Aşamaları

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR); DNA' nın birbirine bağlı iki ipliğinin yüksek

dereceli sıcaklıklarla koparılması (denatürasyon), ardından yapay oligonükleotidlerin hedef DNA'ya birleşmesini (hibridizasyon), DNA zincirinin uzatılmasını (polimerizasyon, iki iplikli DNA'ların oluşturulması), ve bu döngülerin belirli sayılarda yeniden uygulanmasını içermektedir. (Şekil 2.4) PCR uygulanırken, her bir döngü basamağında ısınma ve soğuma işlemlerini dijital programları ekseninde uygulayan termal ısıtıcı adı verilen PCR cihazları (Şekil 2.5) vasıtasıyla yapılmaktadır.Çeşitli firmalar tarafından sıcaklık değerleri farklı girilebilen, blok kalitelerinin farklı olduğu ve döngü sayısının programlanabildiği termal ısıtıcı cihazları satılmaktadır. Termal ısıtıcı cihazları, farklı hacim ve sayıda eppendorf tüpleri ile çalışabilmektedir. Referans aralığı bu cihazlarda 0 ile 100°C'ler değer aralığında uygulanabilmektedir ve programın sonlanmasıyla cihaz 4 °C' ye sabitlenerek istenilen süreler kadar bu sıcaklıkta tutulabilmektedir (Arda , 1980).



Şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonunun Basamakları



Şekil 2.5. Termal Isıtıcı Cihazı (PCR Cihazı)

1.5.2. DNA'nın Denatürasyonu Basamağı

PCR da ilk adım olarak iki zincirli hedef DNA' nın birbirinden ayrılıp koparılması gerçekleştirilmektedir. İki iplikli DNA ya ait hidrojen bağlarının parçalanmasıyla DNA tek iplikli hale gelmektedir. Denatürasyon basamağında, yüksek sıcaklık dereceleri Guanin-Sitozin bakımından yüksek içeriği olan hedef zincirlere daha uygun görünse de, sıklıkla denatürasyon için kullanılan sıcaklıklar 95 °C' de 30 saniye ve 97 °C' de uygulanan 15 saniyedir. Termal ısıtıcı cihazlarında, bu şekilde sıcaklık uygulamalarıyla DNA'nın birbirinden ayrılması yani tek iplikli hale gelmesi sağlanmaktadır. Ayrıca denatürasyon sıcaklığının fazla yüksek uygulanması veya uygulama süresinin fazla uzaması enzim aktivitesinin olumsuz etkilenmesine neden olmaktadır (Erlich ve ark. , 1991)

1.5.3. Primerlerin Bağlanması (Annealing) Basamağı

Polimeraz zincir reaksiyonunun bu basamağında, primer adı verilen ve çoğaltması istenen DNA bölgesi için özel olan oligonükleotidler, çift ipliğin ayrılması aşamasında elde edilen DNA tek ipliği üzerinde kendisine eş olan bölgeye bağlanmaktadır. Reaksiyonda bulunan düz ve ters olmak üzere iki tür primerin her birinin eşleniği olduğu tek iplikli hedef DNA üstündeki özel dizilere yapışması için, ayarlanan termal ısıtıcı

sıcaklığı 38-68 °C'ye düşürmektedir. Düz primere ait olan 5' ucu, hedef DNA' lardan birinin 3' ucuyla, ters primer de ikinci tek iplikçik DNA'nın diğer uç kısmında yer alan 3' ucuna DNA polimerazın aktif yönüne uygun şekilde (5' → 3') bağlanırlar. Bu basamakların sonlanması takribi bir dakika sürmektedir. Primerlerin bağlanması sırasında optimum sıcaklık ve zamanın uzunluğu; primerlerin nükleotid türüne, uzunluğuna ve PCR karışımındaki yoğunluklarına göre değişmektedir. Bağlanma sıcaklığı, primerlerden farklı olarak erime sıcaklıklarının 5 °C düşüğünde olup 55-65 °C' lerde en etkili sonucu vermektedir. En uygun bağlanma sıcaklığı; G-C, A-T nükleotitlerinin bulunma miktarlarına göre hesaplanır. Guanin ve Sitozin bazları arasında üç hidrojen bağı yer alırken, Adenin ve Timin nükleotitlerinin arasında iki hidrojen bağı yer almaktadır. Guanin ve Sitozin bazlarını ayırmak için 4 °C, Adenin ve Timin bazlarını ayırmak için de gerekli olan sıcaklık 2 °C dir. Bu değerler hesaplanarak en optimal bağlanma sıcaklıkları bulunur ve termal ısıtıcı döngüleri oluşturulur (Aldemir ve ark. 2001).

1.5.4. Primerlerin Uzatılması (Extention, Elongation) Basamağı

Primerlerin uzaması genelde 72 °C' de uygulanan bir basamaktır. Primerlerin bağlanması adımı gerçekleştikten sonra, primerlerin eleştiği tek ipliklerin eşleniği DNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenir. PCR yapılırken, genelde her bir döngü için iki dakika süren bir uzama basamağı zamanı yeterli olmakla beraber, kullanılan süre çoğaltılacak DNA bölgesinin daha fazla aminoasit içermesi halinde uzatılabilmektedir. Büyük DNA parçalarının çoğaltılabilmesi için yaklaşık her kilo baz için 60 saniye eklenmesi tavsiye edilmektedir. Bu sırada Taq polimeraz enzimi 5' → 3' doğrultusunda aktif olarak, primerlerin 3' uç kısımlarından başlayarak reaksiyondaki nükleotidleri kullanıp Hedef DNA dizisinin aynısını oluşturmaktadır. Reaksiyonun sıcaklığı yükseltilerek uzama sıcaklığını 95 °C' ye çıkartmaktadır. Sonuç olarak PCR' nin üç basamaktan oluşan ve tahmini 10-15 dakika süren birinci çoğaltma basamağı , sıcaklığın 95 °C' ye yükseltilmesi ve benzer aşamaların 30-50 kez tekrarlanmasıyla sonlandırılır. Böylece tek bir hedef DNA ipliği, her bir döngü sonunda iki katına çıkartılarak milyonlarca kopya elde edilmiş olur. Her bir döngü de değişik birim faktör etkin olarak performansını etkilemekte ve sonraki PCR döngülerinde daha net ortaya çıkmaktadır. 30-50 döngü sonrasında DNA yoğunluğunun artması ve enzim miktarının azalması arasında gerçekleşen ters oran reaksiyonun devamlılığını sınırlamaktadır. Bu süre zarfın da enzimin aktivasyonu da giderek azalmaktadır (Birben, 2006 ; Caner ve ark. 2001).

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Değişik insan gruplarına ait etnik gruplarda MDR1 geni polimorfizmlerinin allel frekansları sıklıkları oldukça değişkenlik göstermektedir. G2677T/A, C3435T polimorfizmleri diğer polimorfizmlere oranla çok daha sık görülmektedir. G2677T mutasyonuna ait polimorfizim ile yapılan bir çalışmada Timin alleli frekansının Afrika kökenli Amerika' lılarda %10, beyaz ırkta %42-46, Meksika orijinli Amerika' lılarda %40, Asya orijinli Amerika' lılarda %45 değerlerine sahip olduğu belirlenmiştir. (Chinn ve Kroetz ,2007)

Slovakya da yaşayan insanlar üzerinde yapılan bir araştırmada C1236T, G2677T, G2677A ve C3435T polimorfizm frekansları; %42,5, %43,5, %2, %44,5 değerlerinde tespit edilmiş ve en çok görülen haplotipin %42,2 ile 1236C – 2677G – 3435C haplotipi olduğu belirtilmiştir (Krivulcik ve ark., 2009).

Çin topluluklarında ve alt grupları içerisinde C3435T mutasyonuna ait frekansların araştırıldığı çalışmada C allel frekansı Hong Kong' daki Han Çin' lilerde % 66,8, Lahu' da % 45,7, Wa' da ise % 54,5 sıklıkta tespit edilmiştir (Dong ve ark., 2008).

Sibiryada yaşayan bireylerde ve Asya topluluklarında gerçekleştirilen araştırmalarda Rus ırkıyla Tuvinian'lar arasında MDR1 geni varyantlarının ciddi farklılıklar taşıdığı belirlenmiştir (Sinués ve ark., 2008).

Yapılan çalışmada Türk toplumunun T1236C polimorfizmi araştırıldığında C allel frekansı % 45,5, T allel frekansı ise % 54,5 olarak belirlenmiştir ve bu dağılımın diğer topluluklarda Çekoslovak, Polonyalı, Portekizli, Rus, Malezyalı ve Japonlar ile benzer özellikler taşıdığını gösterirken, Fransız, Alman, Çin ve Hint toplumları ile farklılıklar olduğu tespit edilmiştir (Gümüş-Akay, 2008).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Tezime ait çalışmada kullanılmak üzere 2015-2016 yılları arasında K.Maraş Sütçü İmam Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı'na gelen ve yapılan sekans analizleri sonucunda Ailevi Akdeniz Ateşi hastalığı mutasyonları taşıyan 50 hastaya ait kan örneği, ve sekans analizleri sonucunda herhangi bir mutasyon saptanmayan 50 hastaya ait kan örneği olmak üzere toplam 100 örnek kullanılmıştır. Hastalara ait kan örnekleri K3 EDTA'lı tüplere alınmıştır. Çalışma yapılana kadar -20 °C ' de muhafaza edilmiştir.

Çizelge 3.1. Örnek seçilimi

	Erkek	Kadın	Toplam Örnek Sayısı
FMF Hastası Birey	25	25	50
Normal Birey	25	25	50

3.2. Metod

3.2.1. Kandan DNA İzolasyonu

Kandan DNA izolasyonu yapmak için Genomic DNA from blood (Macherey Nagel ; Katalog Numarası: 740951.50) kiti kullanılmıştır. Çalışmaya başlamadan önce 12 ml Yıkama Solüsyonu B5 içerisine 48 ml ethanol eklendi ; yine 30 mg. Proteinase K içerisine 1,35 ml. Proteinase Solüsyonu eklenmiştir. 2 ml. ependorf tüpü içerisine 200 ul. kan , 25 µL. Proteinase K ve 200 µL Buffer B3 eklenerek 1 dk. vorteks cihazında karıştırıldı. Karışım 70 °C ' de 15 dk. kuru ısı bloğu üstünde inkübasyona bırakıldı. Daha sonra ependorf tüpün içerisine 210 µL ethanol eklenerek vorteks cihazında 1 dk. karıştırıldı. Oluşan karışımın tamamı NucleoSpin® Blood bağlanma kolon tüplerine aktarıldı. 11,000 x g de 1 dk. santrifüj yapıldı. Bağlanma kolunu üzerinde filtrede bağlanan DNA yıkama basamakları için yeni bir 2 ml. lik toplama tüpüne alınarak üzerine 500 µL Solüsyon BW eklenerek 11,000 x g de 1 dk. santrifüj yapıldı. Bağlanma kolunu yeni bir 2 ml. lik toplama tüpüne alınarak üzerine 600 µL Solüsyon B5 11,000 x g de 1 dk. santrifüj yapıldı. Aynı toplama tüpünün alt kısmını boşalttıktan sonra boş olarak 11,000 x g de 1 dk.

santrifüj yapıldı. Son basamaktan önce elüsyon bufferı 70 °C ye kadar ısıtıldı. 1,5 ml ependorf tüpüne aldığımız kolonun üzerine 100 µL Buffer BE ekleyerek 1 dk. oda sıcaklığında bekletildi. 11,000 x g de 1 dk. santrifüj yapıldı ve böylelikle DNA eldesi sağlandı.

Çizelge 3.2. MN kandan DNA izolasyon kiti içeriği

NucleoSpin® Blood Kit İçeriği (50 Testlik)	
İçerik	Miktar
Solüsyon B3	15 mL
Yıkama Solüsyonu BW	30 mL
Yıkama Solüsyonu B5	12 mL
Elüsyon Solüsyonu BE	13 mL
Proteinase K	30 mg
Proteinase Solüsyonu PB	1.8 mL
NucleoSpin® Blood Bağlanma Kolonları	50
Toplama Tüpleri (2 mL)	100

3.2.2. Kullanılan Laboratuvar Cihazları

- Mikro Santrifüj Cihazı (HETTİCH 120 ,Almanya)
- Kuru Isı Bloğu (BİOSAN , Letonya)
- Santrifüj Cihazı (HETTİCH Rotina 420 , Almanya)
- Real-time PCR Cihazı (THERMO FİŞHER ; Amerika Birleşik Devletleri)
- Nanodrop Spektrofotometre (THERMO FİŞHER, Amerika Birleşik Devletleri)
- Vorteks Cihazı (SCİLOGEX , Amerika Birleşik Devletleri)

3.2.3. Kullanılan Diğer Ekipmanlar

- Pipet Seti (BRAND ,Almanya)
- Buzdolabı (BEKO , Türkiye)
- 0,2 ul PCR Tüpleri (AXYGEN , Amerika Birleşik Devletleri)
- 1,5 ml Ependorf Tüpler (AXYGEN , Amerika Birleşik Devletleri)

- Steril Nitril Pudrasız Eldiven (BİMEL , Türkiye)
- DNase/RNase içermeyen filtreli pipet ucu (Capp ExPell Plus , Danimarka)

3.2.4. DNA Miktarlarının Ölçülmesi

DNA örneklerinin miktarı ve kalitesi Thermo Fisher Nanodrop cihazı ile ölçülerek çalışma için gerekli olan 50-100 ng DNA yoğunluğu ve 1,8-2.0 DNA kalitesi aralığı 260 nm dalga boyunda ölçüldü. Ölçüm değerleri baz alınarak gerekli dilüsyonları yapıp örneklerin optimal değerlerde olması sağlandı. Örnekler çalışmanın devamı için -20 °C 'de saklanmıştır.

3.2.5. Real Time PCR



Şekil 3.1. Applied Biosystems 7500 Real Time PCR Cihazı

Çizelge 3.3. PCR reaksiyon karışımı

Bileşen	Hacim
Örnek DNA'sı	4 ul
qPCR Master mix	4 ul
Taqman Prob mix	2 ul
Nükleaz içermeyen Su	10 ul
Toplam	20 ul

Real Time PCR aşamasında her bir reaksiyon için Çizelge 3.3'deki karışım hazırlanmıştır. Her bir SNP bölgesi için kendi primer-probe tasarımına ait karışım

kullanılmıştır. Bir kuyucukda 4 ul DNA örneği , 4 ul qPCR Master mix karışımı (Promega GoTaq qPCR Master Mix,Katalog Numarası: A6101 , ABD), 2 ul Taqman probe karışımı (Thermo ,Taqman Assay Katalog Numarası: 4351379 ,ABD) ve toplam hacimi 20 ul yapmak için nükleaz içermeyen su 10 ul eklenmiştir.

Çizelge 3.4. Real Time PCR cihazında allellerin işaretli olduğu boyalar

Kaynak Sekans Dizisi	SNP Allelleri	VİC ile İlişkilendirilen Allel	FAM ile İlişkilendirilen Allel
TGATCCACGGACACTC [C/T] TACGAGTTGATCTTTT	C/T	C	T
ATGTGACATTTTCCTTC [C/T] AATGTGTTCTGCAATGA	C/T	C	T
GCTCCCCAACATCGT [A/G] CACATCAAACCAGCCTA	A/G	A	G

Her bir örnek için oluşturulan 20 ul toplam hacim 50 örnek olarak 96 kuyucuklu platede yüklendi. Plate yüksek sıcaklıklarda buharlaşmanın engellenmesi ve örnekler arası çapraz kontaminasyonun engellenmesi için koruyucu optik film ile örtüldü. Hazırlanmış olan plate sıcaklık döngüleri girilen Real Time PCR cihazına yüklenerek çalışma protokolü Çizelge 3.5’deki gibi yüklenmiş ve yürütme tamamlanmıştır. Yaklaşık olarak 90 dk süren çalışmamızın sonucunda her bir örnek için çoğalma değerlerine bakılarak analizler yapılmıştır.

Çizelge 3.5. Real Time PCR yürütme şartları

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
Polimeraz Aktivasyonu	95 °C	10 dk	1
Denatürasyon	95 °C	10 sn	40
Bağlanma ve Uzama	60 °C	1 dk	

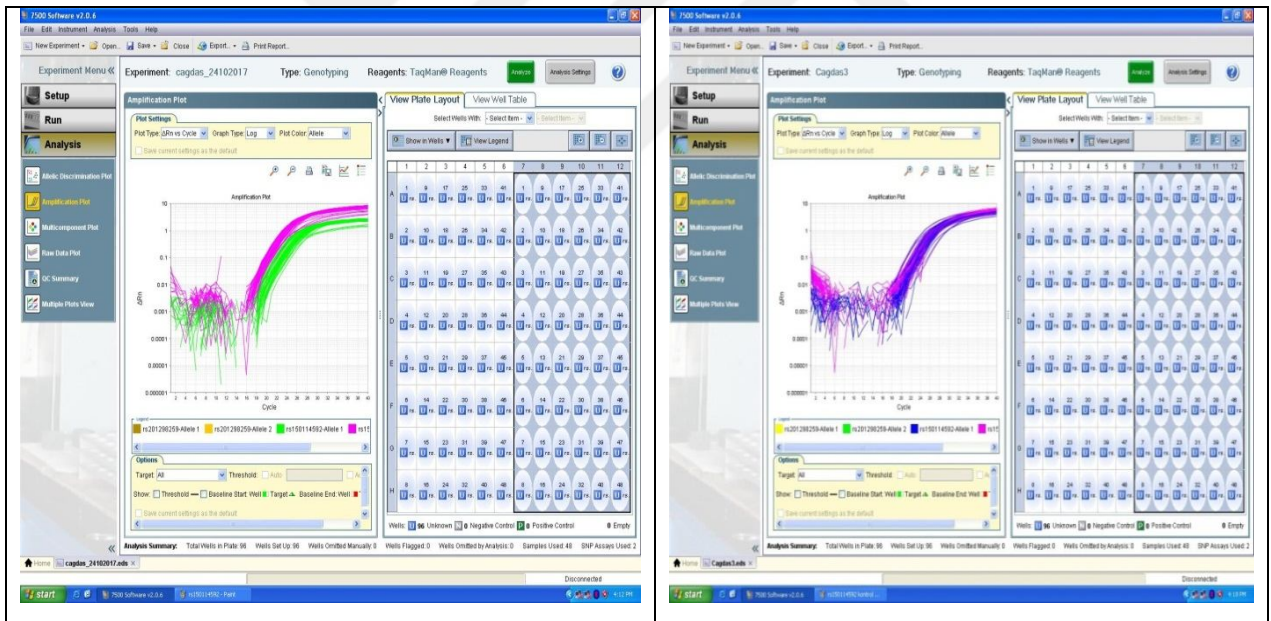
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Yapılan çalışma da toplam 50 Sağlıklı ve 50 FMF olmak üzere toplan 100 Hasta üzerinden elde edilen datalar ve sonuçlar cihaz üzerinden alınan görseller şeklinde paylaşıldı.

Real Time PCR cihazından elde edilen sonuçlar, bütün örneklerde tek nokta mutasyonu heterozigot allel olarak bulunmuştur.Bu grafiklerde heterozigot allellere ait çoğalma eğrileri, çoklu prob eğrileri ve ayrılma tabloları gösterilmiştir.

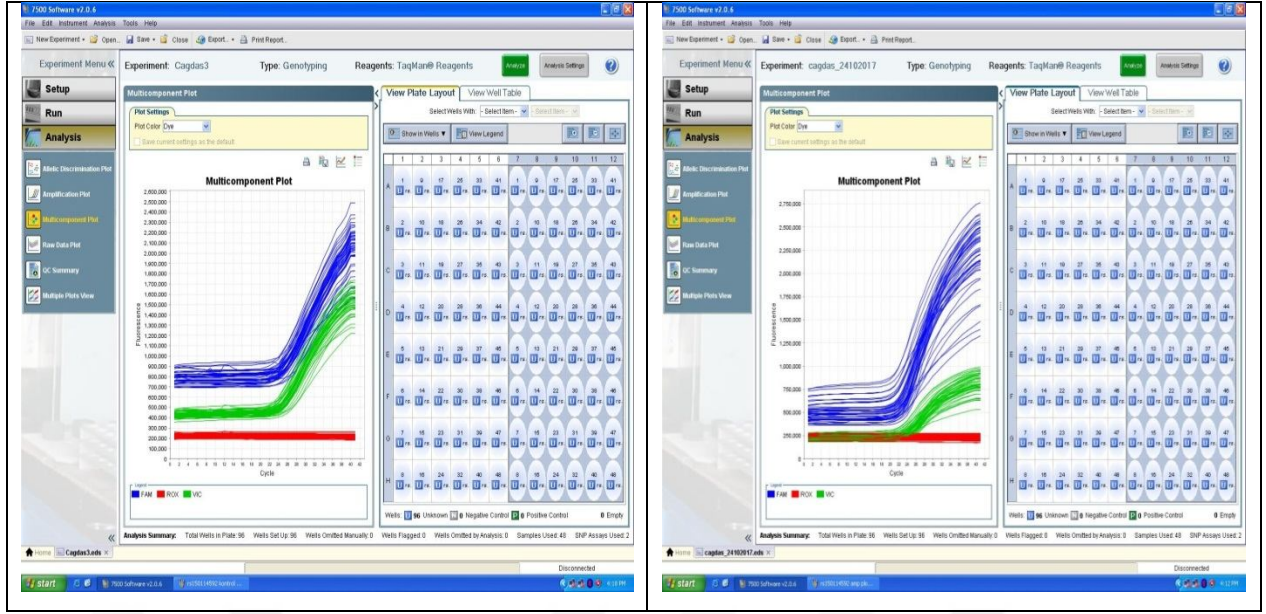
4.1. Tek Nokta Mutasyonu C/T (rs150114592)

Şekil 4.1’de analizleri yapılan bütün örneklerde sol tarafta C/T olarak tek nokta mutasyonu heterozigot allel olarak Pembe ve yeşil renklerin çoğalma eğrilerini gösterdiği ve her iki allelinde çoğaldığı görülmektedir.Yine sağ tarafta ki görselde mor ve mavi renklerin çoğalma eğrilerini gösterdiği ve her iki allelinde çoğaldığı görülmektedir.



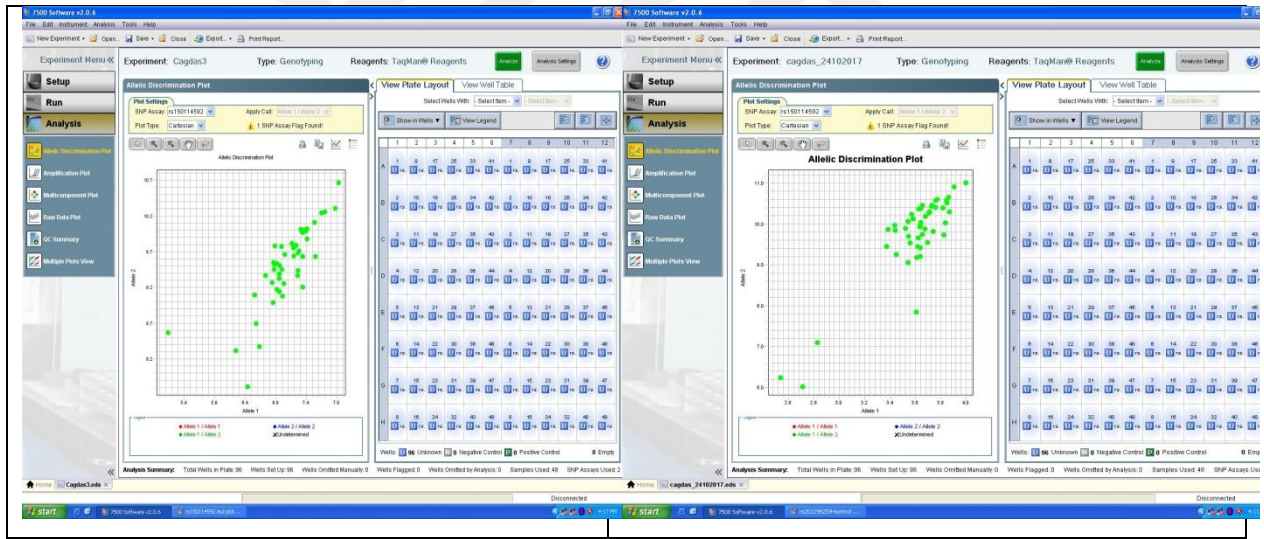
Şekil 4.1. Sağlam ve hasta örneklerine ait çoğalma eğrileri

Şekil 4.2’de örneklere ait çoklu prob eğrileri verilmiştir.Bu eğrilerde cihazın tespit ettiği problemlerin artan miktarları verilmiştir.



Şekil 4.2. Sağlam ve hasta örneklerine ait çok bileşenli prob çoğalmaları

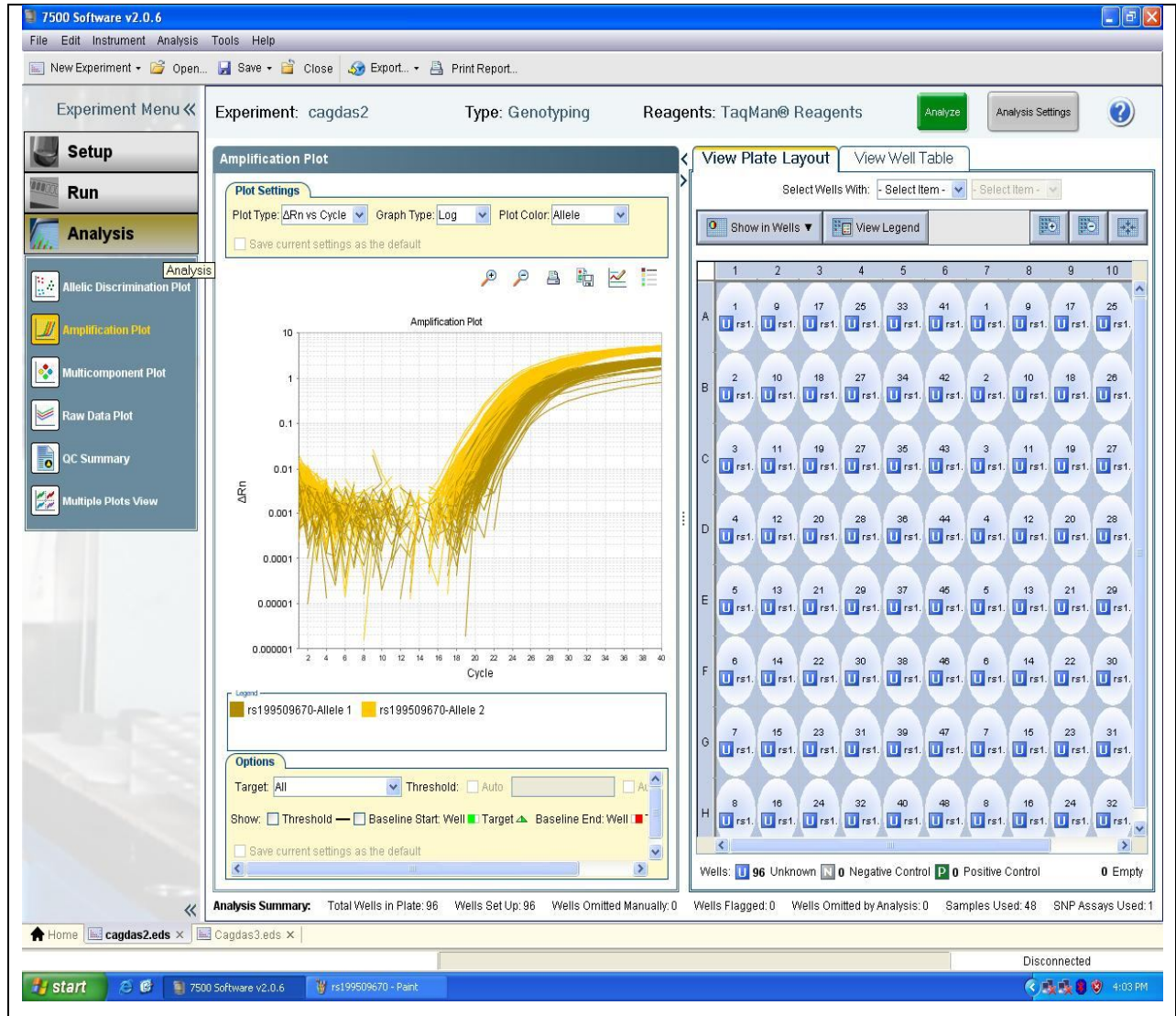
Şekil 4.3’de çalışılan örneklerin ayrılma tabloları verilmiştir. Yeşil renk ile gösterilen bütün örnekler heterozigot olarak görülmektedir.



Şekil 4.3. Sağlam ve hasta örneklerine ait rs150114592 için Allel Ayrılma Tabloları

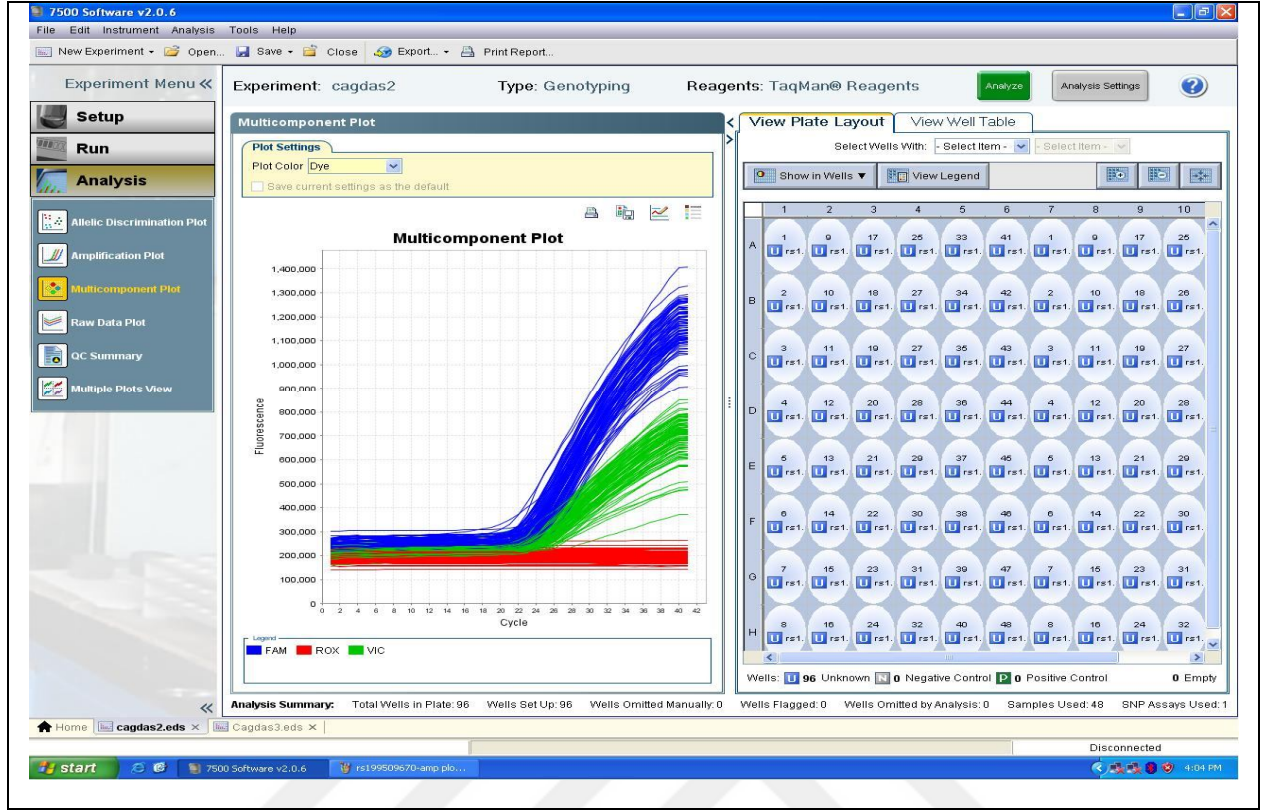
4.2. Tek Nokta Mutasyonu A/G (rs199509670)

Şekil 4.4’de analizleri yapılan bütün örneklerde A/G olarak tek nokta mutasyonu heterozigot allel olarak sarı ve kahverengi renklerin çoğalma eğrilerini gösterdiği ve her iki allelinde çoğaldığı görülmektedir.



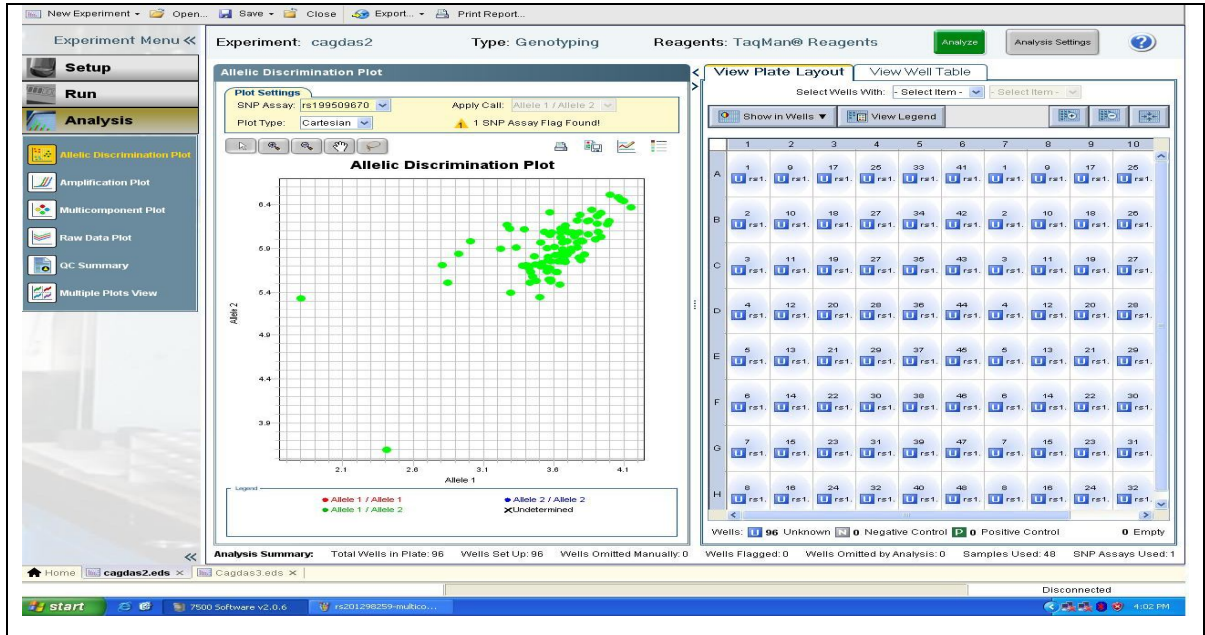
Şekil 4.4. Sağlam ve hasta örneklerine ait çoğalma eğrileri

Şekil 4.5’ de örneklere ait çoklu prob eğrileri verilmiştir. Bu eğrilerde cihazın tespit ettiği problemlerin artan miktarları verilmiştir.



Şekil 4.5. Sağlam ve hasta örneklerine ait çok bileşenli prob çoğalmaları

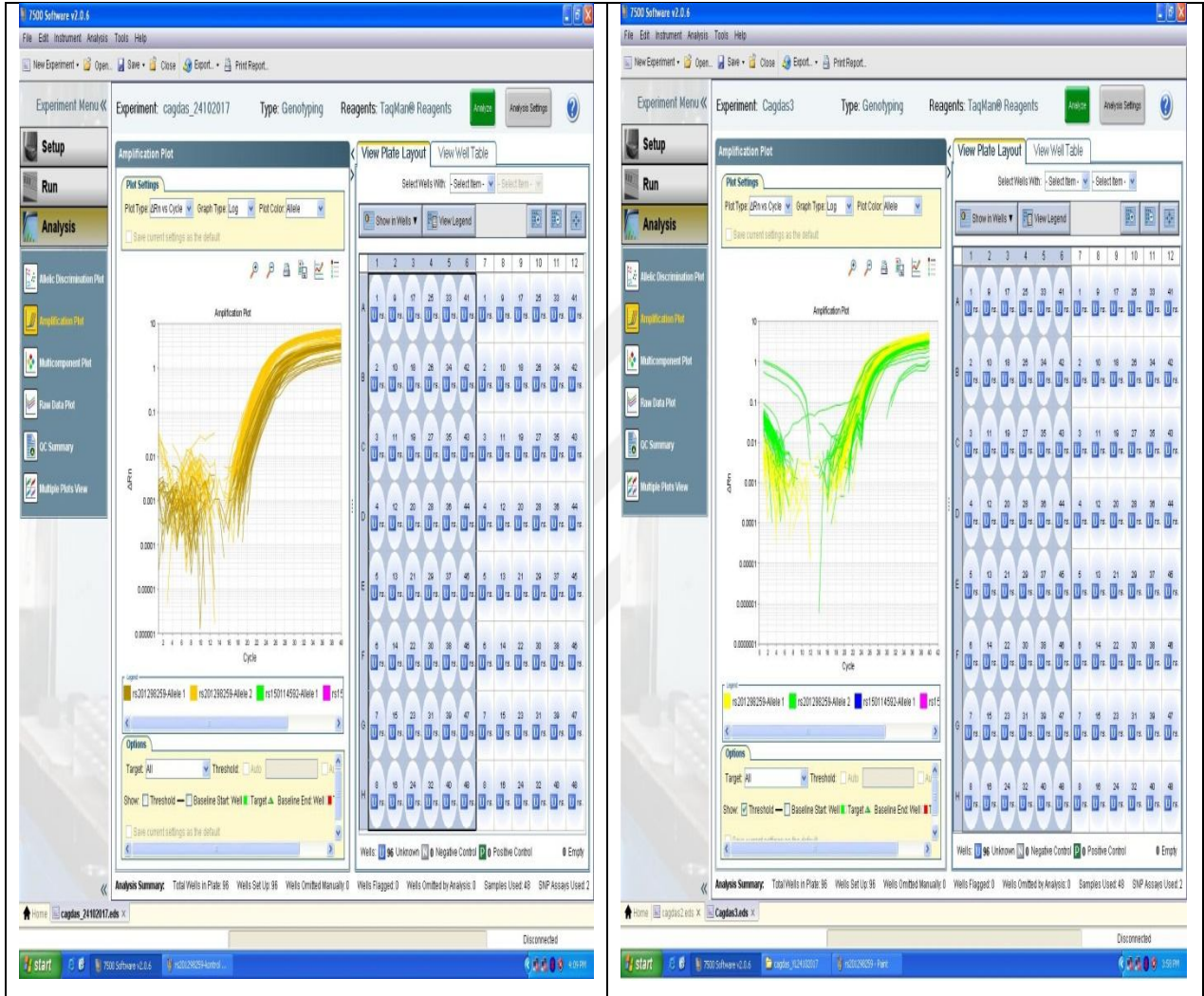
Şekil 4.6’de çalışılan örneklerin ayrılma tabloları verilmiştir. Yeşil renk ile gösterilen bütün örnekler heterozigot olarak görülmektedir.



Şekil 4.6. Sağlam ve hasta örneklerine ait rs199509670 için Allel Ayrılma Tabloları

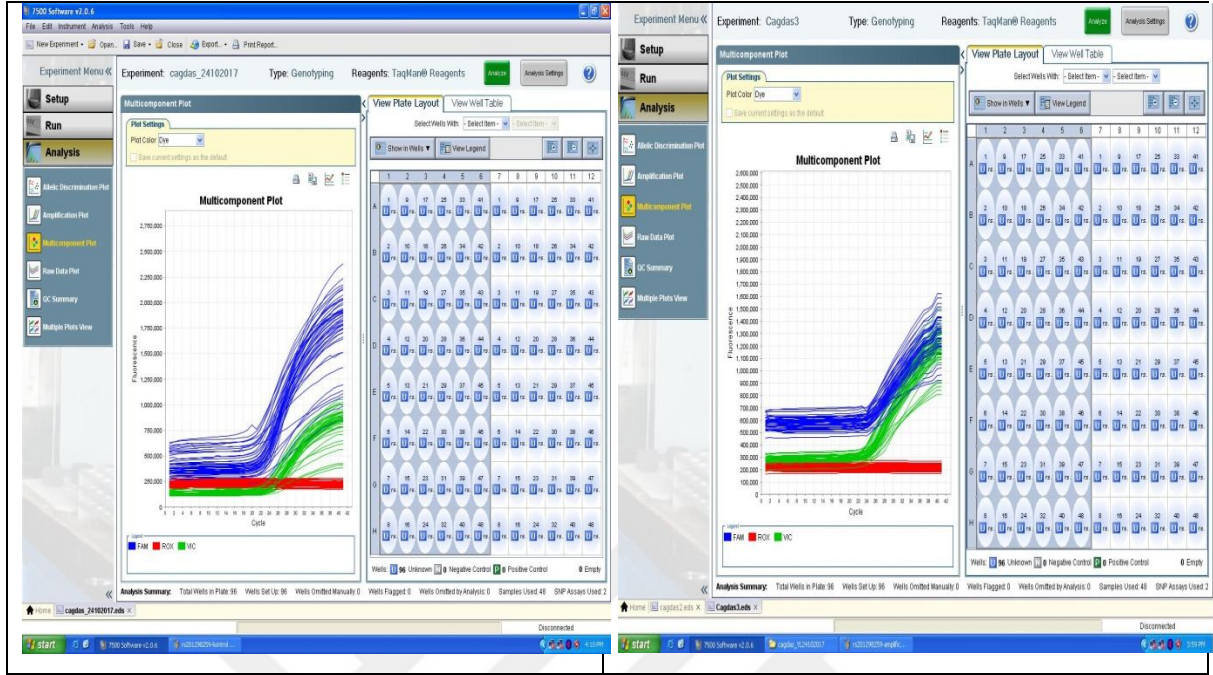
4.3. Tek Nokta Mutasyonu C /T (rs201298259)

Şekil 4.7’ de analizleri yapılan bütün örneklerde sol tarafta C/T olarak tek nokta mutasyonu heterozigot allel olarak sarı kahverengi renklerin çoğalma eğrilerini gösterdiği ve her iki allelinde çoğaldığı görülmektedir. Yine sağ tarafta ki görselde sarı ve yeşil renklerin çoğalma eğrilerini gösterdiği ve her iki allelinde çoğaldığı görülmektedir.



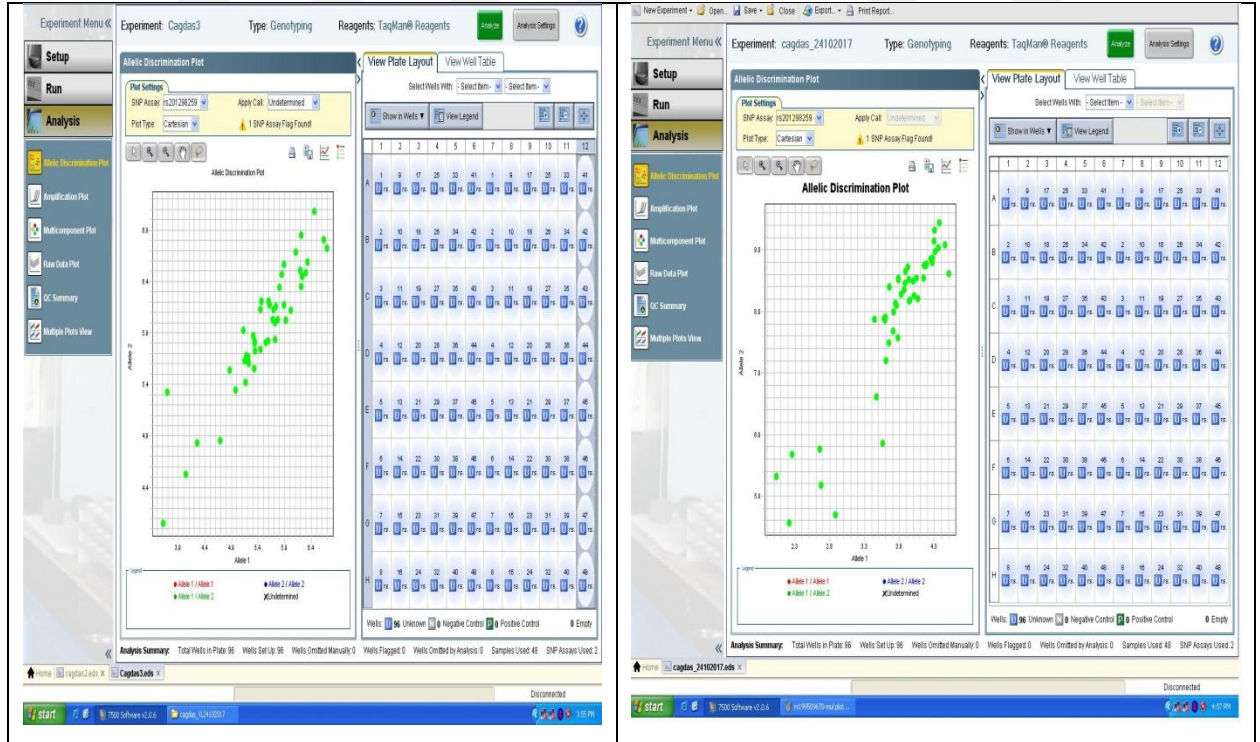
Şekil 4.7 Sağlam ve hasta örneklerine ait çoğalma eğrileri

Şekil 4.8’ de örneklere ait çoklu prob eğrileri verilmiştir.Bu eğrilerde cihazın tespit ettiği problemlerin artan miktarları verilmiştir.



Şekil 4.8 Sağlam ve hasta örneklerine ait çok bileşenli prob çoğalmaları

Şekil 4.9’da çalışılan örneklerin ayrılma tabloları verilmiştir.Yeşil renk ile gösterilen bütün örnekler heterozigot olarak görülmektedir.



Şekil 4.9 Sağlam ve hasta örneklerine ait rs201298259 için Allel Ayrılma Tabloları

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapmış olduğumuz çalışmada sonuç olarak FMF mutasyonlarına sahip olan 50 örneklik hasta grubu ve mutasyona sahip olmayan 50 örneklik sağlıklı bireylerden oluşan kontrol grubunda rs201298259 C/T; rs150114592 C/T ve rs199509670 A/G polimorfizmleri açısından anlamlı bir farklılık gözlenmezken, elde edilen sonuçların tamamı heterozigot allel şeklinde bulunmuştur. Bu SNP noktalarının daha önce çalışılmadığını göz önüne alırsak farklı bir popülasyonla veya etnik grupla karşılaştırma şansımız bulunmamaktadır. Gelecek çalışmalara veri sağlamak daha güvenilir sonuçlar elde edebilmek adına olgu ve kontrol gruplarının örneklem sayısının attırıldığı çalışmalara gereksinim vardır.

Yapmış olduğumuz çalışmada MDR1 genine ait üç farklı polimorfizm incelenmiştir. Seçmiş olduğumuz tek nokta mutasyonlarına ait yapmış olduğumuz araştırmalar ve literatür taramalarında, makale ve yayınlarda daha önce yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

MDR1 geni 26. Ekzonda 3435. amino asite ait gerçekleşen tek nokta mutasyonu Sitozin/Timin (C-T) sessiz bir mutasyon olup herhangi bir protein değişimine sebep olmamaktadır. Bu gene ait en sık görülen mutasyonlardan bir tanesidir. Cascorbi ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada beyaz ırka ait gen polimorfizm sıklığı Sitozinde % 46,1; Timin de % 53,9 olarak kayda geçmiştir. Bir başka araştırmacı Ameyaw ve ekibinin yapmış olduğu çalışmada yine beyaz ırka ait bireylerde C/T allellerinin frekansları eşit oranlarda % 50 olarak tespit edilmiştir (Cascorbi ve ark., 2001 ; Ameyaw ve ark., 2001).

Hoffmeyer ve arkadaşları; P-gp ekspresyonunun MDR1 geni ile olan ilişkisinin incelendiği bir araştırma yapmış olup bu çalışma sonucunda TT varyantına ait allellere sahip bireylerin CC varyantına sahip bireylere göre ince bağırsaklarında iki kat düşük ekspresyon olduğunu gözlemlemişlerdir. Benzer bir çalışmada Siegsmund ve ekibinin insana ait böbrek dokuları üzerinde yapmış olduğu araştırmada CC genotipine sahip bireylerin; TT genotipine sahip bireylere oranla bir buçuk kat daha fazla P-gp ekspresyonu olduğunu tespit etmişlerdir (Johne ve ark., 2001).

MDR1 geni 21. Ekzonda 2677. amino asite ait gerçekleşen tek nokta mutasyonu iki farklı mutasyona sahip olup Guanin bazı Timine ve Guanin bazı Adenin e dönüşmektedir. Bu değişimlerde yine sırasıyla Alanin proteini Serine veya Treonin proteinine dönüşmektedir. Cascorbi ve ekibinin yapmış olduğu araştırmada bu üç allele ait frekanslar

guanin,timin ve adenin sırasıyla % 56.5, % 41.6 ve % 1.9 şeklinde tespit edilmiştir(Cascorbi ve ark.; 2001)

Çalışma da toplam 50 FMF mutasyonu taşıyan birey ile 50 adet FMF mutasyonu taşımayan birey olmak üzere toplam 100 bireyin kan örneklerinden MDR1 gen polimorfizmine ait üç adet SNP noktası incelenmiştir. Bu SNP noktaları rs201298259 C/T; rs150114592 C/T ve rs199509670 A/G ‘ ydı. %100 oranında bütün örnekler heterozigot allel olarak tespit edilmiştir. Kontrol grubu ve hasta grubu arasında korelasyon bağlamında bir yakınlık veya uzaklık belirlenememiştir.



KAYNAKLAR

- Aldemir, O.S. ve Uçan,U.S. 2001. Polimeraz Zincir Reaksiyonu, Temel Prensipler. Hayvancılık Araştırma Dergisi, 11 (1): 53-59
- Ameyaw MM, Regateiro F, Li T, Liu X, Tariq M, Mobarek A, Thornton N, Folayan GO, Githang'a J, Indalo A, Ofori-Adjei D, Price-Evans DA ve McLeod HL. 2001 MDR1 pharmacogenetics: frequency of the C3435T mutation in exon 26 is significantly influenced by ethnicity, Pharmacogenetics. 11(3), 217-21
- Arda, M. 1980. Hastalıkların Teşhisinde Biyoteknolojik Yöntemlerin Kullanılması. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları No: 1, Ankara
- Bakkaloğlu A. 2003. 'Familial Mediterranean fever', Pediatr Nephrol. 18:853-859
- Ben-Chetrit E., Levy N. 1998. Colchicine: Update, Seminars in Arthritis and Rheumatism, ;Vol 28, No 1: 48-59
- Birben, E. 2006. Polimeraz Zincir Reaksiyonu. Astım Allerji İmmünoloji, 4(2):92- 94
- Caner, V. ve Çarlı, K.T. 2001.Polimeraz Zincir Reaksiyonu Ve Bazı Tavuk İnfeksiyonlarındaki Yeri. U. Ü. J. Fac. Vet. Med., 20: 137-145
- Cascorbi I, Gerloff T, Johne A, Meisel C, Hoffmeyer S, Schwab M, Schaeffeler E, Eichelbaum M, Brinkmann U ve Roots I. 2001.Frequency of single nucleotide polymorphisms in the P-glycoprotein drug transporter MDR1 gene in white subjects, Clin Pharmacol Ther. 69(3), 169-74
- Cerquaglia C., Diaco M., Nucera G. 2005.Pharmacological and Clinical Basis of Treatment of Familial Mediterranean Fever (FMF) with Colchicine or Analogues: An Update, Current Drug Targets - Inflammation & Allergy; Vol. 4, No. 1: 117-124
- Chinn L.W., Kroetz D.L. 2007. ABCB1 pharmacogenetics: Progress, pitfalls, and promise. Clinical Pharmacology and Therapy 81, 265–269.
- Dong Q., Xu B., Tan Y. 2008.The genetic variability of MDR1 C3435T polymorphisms in four Southern Chinese populations. Biomed Pharmacother.
- El-Shanti H.,Abdel Majeed H., El-Khateeb M. 2006. 'Familial Mediterranean fever in Arabs', Lancet 367: 1016–24

- Ergüven M., Üçel R., Cebeci N., Pelit M. 2006., 'Ailevi Akdeniz Ateşi'nin demografik, klinik ve genetik özellikleri ile tedaviye yanıtı: 120 vakalık tek merkez deneyimi' *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 49:283-290
- Erlich, H.A., Gelfand, D. And Sninsky, J., 1991. Recent Advances İn The Polymerase Chain Reaction. *Science*, 252: 1643-1651.
- Gök, E.2006., 'Ailevi Akdeniz Ateşi Tanısı İle İzlenen Prepubertal Çocuklarda Kemik Mineral İçeriğinin Değerlendirilmesi', Uzmanlık Tezi, Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul
- Gonzalez, M.J., Aguilar, M.V., Martinez, M.C. 1997. Mechanisms Of Absorption Of As₂O₅ From Rat Small İntestine: The Effect Of Different Parameters. *J Trace Elem Med Bio.*; 11: 239-47
- Grimaldi M., Candore G., Vasto S., Caruso M., Caimi G., Hoffmann E., Colonna Romano G., Lio D., Shinar Y., Franceschi C., Caruso C. 2006., 'Role of the pyrin M694V (A2080G) allele in acute myocardial infarction and longevity: a study in the Sicilian population' *Journal of Leukocyte Biology*
- Gümüş-Akay G., Rüstemoğlu A., Karadağ A. et al. 2008. Genotype and allele frequencies of MDR1 gene C1236T polymorphism in a Turkish population. *Genetics and Molecular Research* 7 (4), 1193-1199
- Johne A, Kopke K, Gerloff T, Mai I, Rietbrock S, Meisel C, Hoffmeyer S, Kerb R, Fromm MF, Brinkmann U, Eichelbaum M, Brockmoller J, Cascorbi I ve Roots I. 2002. Modulation of steady-state kinetics of digoxin by haplotypes of the P-glycoprotein MDR1 gene, *Clin Pharmacol Ther.* 72(5), 584-94
- Kavak U.S., Özen S. 2003., 'Ailesel Akdeniz Ateşi', Hacettepe Ü. Tıp Fak. Çocuk Sag. ve Hast. AD. Nefroloji Ün., *sted* 12, 4, 137
- Krivulcik T., Sedlak J., Bartosova Z. 2009. Frequency of the three most common polymorphisms in the MDR1 gene in Slovak population. *jeoplasma.* 56(2), 101-7.
- Majeed HA, Barakat M. 1989. 'Familial Mediterranean Fever in children: analysis of 88 cases', *Eur. J Pediatr* 148:636-41
- Marzolini, C., Paus, E., Buclin, T., Kim, R.B. 2004. Polymorphismi in human MDR1 (P-glycoprotein): Recent advances and clinical relevance *Clin. Pharmacol. Therapeutics*; 75(1): 13-33

- Sakaeda, T. 2005. MDR1 genotype-related pharmacogenetics: Fact or fiction? *Drug Metab.Pharmacokinet*; 20: 391-414
- Schwab, E.M., Fromm, M.F. 2003. Genetic polymorphisms of the human MDR1 drug transporter. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*; 43: 285-307
- Sinués B., Vicente J., Fanlo A. 2008. CYP3A5 3, CYP3A4 1B and MDR1 C3435T genotype distributions in Ecuadorians. *Dis Markers*. 24(6), 325-31
- Strachan, T., READ, A.P. 1999. Human Molecular Genetics 2, 2nd Edition, Bios Scientific Publishers, Ltd., Oxford, UK.
- Tang, K., Ngog, S.M., Gwee, P.C. 2002. Distinct haplotype profiles and strong linkage disequilibrium at the MDR1 multidrug transporter gene locus in three ethnic Asian populations. *Pharmacogenetic*; 12: 437-450
- Tekin M, Yalçinkaya F, Turner N, et al. 1999. 'Familial Mediterranean fever and acute rheumatic fever: A pathogenetic relationship?' *Clin Rheumatol* 18:446- 449.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : İsmail Çağdaş ÇİMENLER

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 12.03.1984 / Adana

Medeni hali : Evli

Telefon : 05301564789

e-posta : cagdascimenler@hotmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ/Fen Bilimleri Enstitüsü/Biyomühendislik Bilimleri	2019
Yüksek Lisans	Çukurova Üni. Orta Öğretim Alan Öğretmenliği	2009
Lisans	Çukurova Üniversitesi /Biyoloji Bölümü	2008
Lise	Adana Danişment Gazi Anadolu Lisesi	2002

Yabancı Dil İngilizce

Yayınlar

Ulusal Biyokimya Kongresi 2015

Metabolomik ve pestisid toksisitesi konulu sözlü bildiri