



İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA TEZİ

ANTİFOSFOLİPİD SENDROMUNDA ADAMTS-13 GENİNİN
ANLATIMINDA VE PROTEİNİNİN PLAZMADAKİ MİKTARI
İLE AKTİVİTESİNDEKİ FARKLILIKLARIN ARAŞTIRILMASI

Uzm.Bio.Veyssel Sabri HANÇER
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman
Prof.Dr. Ayşegül TOPAL-SARIKAYA

Ekim, 2009

İSTANBUL

Bu çalışma 06/10/2009 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Moleküler Biyoloji ve Genetik programında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

Prof.Dr.Ayşegül TOPAL- SARIKAYA(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof.Dr.Güler TEMİZKAN
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof.Dr. Ayşe ÖZER
Marmara Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Prof.Dr. Nazlı ARDA
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi

Prof.Dr. Reyhan DİZ-KÜÇÜKKAYA
İstanbul Bilim Üniversitesi
Tıp Fakültesi

Bu alışma, 1454 sayılı proje ile T.C. İstanbul Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücülüğü tarafından desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Doktora tezi çalışmamda her türlü imkanı sağlayan değerli Bölüm Başkanım Sayın Prof.Dr. Güler TEMİZKAN'a,

Danışmanım olması ile her zaman kendimi çok şanslı hissettiğim, bilimsel olaylara çok farklı açılardan bakarak yorum yapmayı öğreten, bilimsel ve etik açıdan çok şey öğrenerek kendime örnek aldığım, çalışmalarımda bana her zaman tam destek veren ve sürekli olarak pozitif yönde teşvik eden danışmanım Sayın Prof.Dr. Ayşegül TOPAL-SARIKAYA'ya,

Çalışma kriterlerine uyan hastaları bu proje için sağlayan, yıllardır bilimsel kazanımlarını benimle paylaşan, bilimsel düşünme tarzını öğreten, lisans öğrenimimden sonraki tüm bilimsel aktivite ve çalışmalarımda sonsuz emeği olan, kendisinden hem bilimsel hem de sosyal hayatta çok şey öğrendiğim ve kendime örnek aldığım Sayın Prof.Dr. Reyhan DİZ-KÜÇÜKKAYA'ya

Tez izleme komitemde yer alan, görüş ve önerileri ile çalışmamı şekillendiren ve cesaretlendiren Sayın Prof.Dr. Ayşe ÖZER'e

Gerek bu tez projesi, gerekse diğer tamamlanmış ve devam eden projeler için her türlü imkanı sağlayan ve tam destek veren Hematoloji Bilim Dalı Başkanım Sayın Prof.Dr. Meliha NALÇACI'ya

Çalışma ile ilgili görüş ve yorumlarını esirgemeyen Sayın Doç.Dr. A.Selim YAVUZ'a, doktora eğitimim süresince sürekli görüş alış verişini yaptığım Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü'ndeki değerli tüm asistan arkadaşlarıma, çalışma alanım dışında bana moral ve destek veren dostlarıma,

Tüm hayatım boyunca maddi manevi koşulsuz destek kaynağım olan sevgili annem ve babama, doktora eğitimim boyunca bana anlayış gösteren, bu süre dahilinde yetiştiremeyeceğimi düşündüğüm her konuda bana yardımcı olarak üstesinden gelmemi sağlayan sevgili eşim Demet HANÇER'e,

Çalışmamın son aşamasında dünyaya gelen, bana ek bir moral ve motivasyon sağlayan biricik kızım İpek HANÇER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ekim, 2009

Veysel Sabri HANÇER

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	i
İÇİNDEKİLER	ii
ŞEKİL LİSTESİ	iv
TABLO LİSTESİ	v
SEMBOL LİSTESİ	vi
DENKLEM LİSTESİ	vii
ÖZET	viii
SUMMARY	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL KISIMLAR	3
2.1. AFS'DE TROMBOZ	4
2.2. AFS'DE OTOANTİKORLA İLİŞKİLİ TROMBOZ MEKANİZMALARI	6
2.3. ADAMTS-13	8
3. MALZEME VE YÖNTEM	16
3.1. MALZEME	16
3.2. YÖNTEM	18
3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu	18
3.2.2. Genomik DNA'nın Kalitatif Tayini	19
3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	19
3.2.3.1. Primerler ve Enzimler	20
3.2.3.2. DNA Polimeraz Enzimi ve Tamponu	21
3.2.3.3. PZR Karışımları	21
3.2.3.4. PZR Programları	23
3.2.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi	23
3.2.3.6. Restriksiyon Enzim Kesimi Analizi (REKA)	24
3.2.4. DNA Dizi Analizi	25
3.2.4.1. Saflaştırma Aşaması	25
3.2.4.2. Döngü Dizileme (Cycle Sequencing)	25

3.2.4.3. NaAc İle Saflaştırma	26
3.2.4.4. Dizileme Cihazına Yükleme	27
3.2.5. ADAMTS-13 Geninin Anlatım Düzeyinin Belirlenmesi	27
3.2.5.1. Total RNA İzolasyonu	27
3.2.5.2. Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi	27
3.2.5.3. cDNA Sentezi	28
3.2.5.4. ADAMTS-13 Geni İçin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu	29
3.2.6. ADAMTS-13 Enziminin Plazma Aktivitesi ve Miktarının Saptanması	30
3.2.6.1 Aktivite Tayini	30
3.2.6.2. Miktar Tayini	31
3.2.7. İstatistik Analizler	32
4. BULGULAR.....	33
4.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU	33
4.1.1. DNA'nın Kalitatif Tayini	33
4.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZLERİ.....	34
4.3. RESTRİKSİYON ENZİM KESİMİ ANALİZİ (REKA).....	35
4.4. DNA DİZİ ANALİZİ VERİLERİ.....	37
4.5. ADAMTS-13 GENİNİN ANLATIMI.....	38
4.5.1. Total RNA İzolasyonu ve Kalitatif Tayini	38
4.5.2. cDNA Sentezi ve Kalitatif Tayini	39
4.5.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Q RT-PCR) Analizleri.....	40
4.5.4. ADAMTS-13 Aktivitesi ve Miktar Tayini	43
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	50
6. KAYNAKLAR	60
7. ÖZGEÇMİŞ.....	68

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. ADAMTS ailesinin filogenetik ağacı	9
Şekil 2.2. ADAMTS-13 proteini	10
Şekil 2.3. Plazmada vWF	11
Şekil 2.4. Plazmada vWF'ün kesildiği ve kesilmediği durumlar	12
Şekil 2.5. ADAMTS-13 mutasyonları ve polimorfizmlerinin yerleri	14
Şekil 2.6. ADAMTS-13 domenlerini gösteren bir model	15
Şekil 3.1. ADAMTS-13 enziminin plazmadaki aktivitesi ve miktarının ölçümünü gösteren özet	32
Şekil 4.1. Genomik DNA'ların %1.5 (w/v)'luk agaroz jeldeki görüntüleri	33
Şekil 4.2. ADAMTS-13 geninin 10+11 ve 13+14. eksonlarına ait PCR ürünlerinin % 2,5 (w/v)'luk agaroz jel görüntüsü	34
Şekil 4.3. Onikinci eksonun çoğaltılması ile oluşan PZR ürünlerinin % 2,5 (w/v)'luk agaroz jel görüntüsü	35
Şekil 4.4. 10+11 eksonların PZR ile çoğaltılması sonrasında Alw21I enzimi ile kesim ürünlerinin % 2,5 (w/v)'luk agaroz jel görüntüsü	36
Şekil 4.5. Onikinci eksonun PZR ile çoğaltılması sonrasındaki FspBI enzimi ile kesim ürünlerinin % 3 (w/v)'lük agaroz jel görüntüsü	36
Şekil 4.6. Onikinci eksonun PZR ile çoğaltılması sonrasında Eco130I enzimi ile kesim ürünlerinin % 3 (w/v)'lük agaroz jel görüntüsü	37
Şekil 4.7. Ekson 13+14'ün dizileme sonucu	38
Şekil 4.8. Total RNA örnekleri	39
Şekil 4.9. cDNA sentezi ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görünüşleri	39
Şekil 4.10. Kontrol bireylerinde ADAMTS-13 cDNA miktarları	40
Şekil 4.11. PAFS hastalarında ADAMTS-13 cDNA miktarları	41
Şekil 4.12. Kontrol bireylerinde referans gen HPRT1'in cDNA miktarları	41
Şekil 4.13. PAFS hastalarında HPRT1'in cDNA miktarları	42
Şekil 4.14. Aktivite tayini için oluşturulan standart grafik	43
Şekil 4.15. Miktar tayini için oluşturulan standart grafik	44

TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. 1998’de belirlenen Sapporo Kriterleri.....	4
Tablo 2.2. AFS’de Klinik Tablolar.....	5
Tablo 2.3. AFS’de otoantikörle ilişkili tromboz mekanizmaları.....	7
Tablo 3.1. Hasta grubuna ait demografik veriler.....	17
Tablo 3.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Solüsyonu.....	19
Tablo 3.3. ADAMTS-13 eksonlarına özgün primer baz dizileri ve restriksiyon endonükleaz enzimleri.....	20
Tablo 3.4. Ekson 10+11’in çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı.....	21
Tablo 3.5. Ekson 12’nin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı.....	22
Tablo 3.6. Ekson 13+14’ün çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı.....	22
Tablo 3.7. 10+11 ve 13+14. eksonların çoğaltılmasında kullanılan PZR programı... ..	23
Tablo 3.8. 12. eksonun çoğaltılmasında kullanılan PZR programı.....	23
Tablo 3.9. C365del mutasyon tayini için gerçekleştirilen enzim kesimi koşulu.....	24
Tablo 3.10. Q449stop kodonu mutasyon tayini için gerçekleştirilen enzim kesimi koşulu.....	24
Tablo 3.11. P475S mutasyon tayini için gerçekleştirilen enzim kesimi koşulu.....	25
Tablo 3.12. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler.....	28
Tablo 3.13. Gerçek Zamanlı PZR için PZR Bileşenleri.....	29
Tablo 3.14. ADAMTS-13 transkript varlığının belirlenmesinde kullanılan Gerçek Zamanlı PZR programı.....	30
Tablo 4.1. Kontrol grubundaki çalışma sonuçları	44
Tablo 4.2. Hasta grubundaki çalışma sonuçları.....	46
Tablo 4.3. Tromboz (+) ve Tromboz (-) alt gruplarının yüzde cinsinden ortalama verileri.....	48
Tablo 4.4. Yaş gruplarına göre enzim aktivitesinin dağılımı.....	48
Tablo 4.5. Cinsiyete göre enzim aktivitesinin dağılımı.....	49

SEMBOL LİSTESİ

ADAMTS-13	: “A disintegrin like and metalloprotease with thrombospondin type1-13”, dolaşımında vWF’ü parçalayan metalloproteaz
AFS	: Antifosfolipid Sendromu
AKA	: Anti kardiyolipin antikor
BÇ	: Baz çifti
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksi nükleotit tri fosfat
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	: “Enzyme Linked Immunosorbent Assay”
HPRT-1	: Hipoksantin fosforiboziltransferaz 1
HIV	: Edinilmiş bağışıklık sistemi yetmezliği virüsü
Ig G	: İmmün globulin G
Ig M	: İmmün globulin M
ISTH	: Uluslar arası tromboz ve hemostaz topluluğu
LA	: Lupus antikoagulanı
MOPS	: Morfolino propan sülfonik asit
PAFS	: Primer antifosfolipid sendromu
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Q RT-PCR	: Nicel gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu
REKA	: Restriksiyon enzim kesimi analizi
RNA	: Ribonükleik asit
SLE	: Sistemik lupus eritematozus
SNP	: Tek nükleotit polimorfizmi
TBE	: Tris-borik asit-EDTA
TMB	: Tetrametilbenzidin
TNF	: Tümör nekroz faktörü
TTP	: Trombotik trombositopenik purpura
UV	: Ultraviyole
vWF	: vonWillebrand Faktör

DENKLEM LİSTESİ

Denklem 4.1. Pfaffl denklemi.....	42
--	----

ÖZET

ANTİFOSFOLİPİD SENDROMUNDA ADAMTS-13 GENİNİN ANLATIMINDA VE PROTEİNİNİN PLAZMADAKİ MİKTARI İLE AKTİVİTESİNDEKİ FARKLILIKLARIN ARAŞTIRILMASI

ADAMTS-13 geni insanda 37 kb uzunluğundadır. 9. kromozomun q34 bölgesinde yerleşik olup, 1427 amino asitten oluşan proteini kodlamaktadır. von Willebrand Faktör (vWF)'ün Tyr842-Met843 amino asitleri arasındaki peptit bağı, dolaşımında ADAMTS-13 tarafından kesilir. Çok miktarda ve beklenmeyen büyüklükte vWF varlığı gibi patofizyolojik durumlarda bu multimerler ile platelet etkileşimleri sonucunda pıhtı oluşumunun meydana geldiği düşünülmektedir. Ailesel trombotik trombositopenik purpura (TTP) hastalarının genomik DNA örneklerinin incelenmesi ile ADAMTS-13 genindeki bazı mutasyonların enzimde işlev bozukluğuna yol açtığı saptanmıştır. TTP'deki trombozların şekilleri ve yerleri benzer bir hastalık olan antifosfolipid sendromu (AFS)'nda görülenlere benzemektedir. Bu nedenle, bu çalışmada ADAMTS-13 enziminin TTP patogenezindeki rolünden yola çıkarak AFS gelişiminde ADAMTS-13 genindeki mutasyonların katkısının olup olmadığının araştırılması, gen anlatım düzeyinin ve enziminin miktar ve aktivitesindeki değişikliklerin mutasyonlar varlığında değerlendirilmesi amaçlandı.

Bu kapsamda, 70 Primer Antifosfolipid Sendromu (PAFS) hastası ve 70 sağlıklı kontrol bireyinde ADAMTS-13 geninin, C365del, Q449stop kodonu, P475S mutasyonları restriksiyon enzim kesimi analizi (REKA) ile, C508Y mutasyonu ise DNA dizileme yöntemi ile analiz edildi. Hedef gen ADAMTS-13 ve referans gen HPRT-1'e ait mRNA'lar cDNA'ya çevirilip Q RT-PZR ile çoğaltılarak transkripsiyon aşaması, enzimin plazmadaki aktivite ve miktarı ise ELISA temelli bir yöntem kullanılarak analiz edildi.

Hasta ve kontrol grubundaki bireylerin hiçbirinde çalışılan mutasyonlar saptanmadı. ADAMTS-13 mRNA miktarının hasta grubunda, kontrol grubundakinin yarısı kadar olduğu saptandı. ADAMTS-13 enzim aktivitesi açısından kontrol ve hasta grubu arasında anlamlı bir bağlantı bulunmazken, enzim miktarı açısından oldukça anlamlı bir fark saptandı ($p < 0.0001$). Hasta ve kontrol grubu bireylerinde enzim aktivitesi ile yaş arasında anlamlı bir fark olmadığı, fakat kontrol grubunda aktivite ile cinsiyet arasında anlamlı bir fark olduğu tespit edildi ($p = 0.0038$). Enzim miktarı ile aktivitesi arasında korelasyon olmadığı, aynı miktar enzime sahip bireylerde aktivitenin değişkenlik gösterdiği belirlendi.

Sonuç olarak, PAFS ile ADAMTS-13 mutasyonları arasında bağlantı bulunmadı. ADAMTS-13 mRNA miktarının hasta grubunda kontrol grubuna göre yarısı kadar olması ve plazmadaki miktarının % 40 az oluşu, ADAMTS-13 geninin transkripsiyon aşamasında negatif düzenlendiği ya da promotör bölgede mutasyon/lar olduğunu veya epigenetik bir etki varlığını düşündürmektedir. Bundan başka, cinsiyetin enzim aktivitesi için önemli bir kriter olduğu da öngörülmektedir.

SUMMARY

THE INVESTIGATIONS ON THE DIFFERENCES OF ADAMTS-13 GENE EXPRESSION AND ITS PROTEIN PLASMA LEVEL AND THE ACTIVITY IN ANTIPHOSPHOLIPID SYNDROME

ADAMTS 13 gene encodes an enzyme consisting of 1427 amino acids in human. It is 37 kb long and locates on the q34 site of the 9th chromosome. The peptide bond between Tyr842-Met843 of von Willebrand factor (vWF) is physiologically cleaved by ADAMT-13 in the circulation. Under pathophysiological conditions, such as in the presence of excess amounts of unusually large vWF molecules, interaction between these multimers and platelets is thought to be caused microthrombi formation in the circulation. Analysis of the genomic DNA of patients with familial Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP) showed that some mutations on ADAMTS-13 gene are to lead to functional defects for the enzyme. The form of thrombus and their localizations in TTP patients are similar with those in antiphospholipid syndrome (APS) as a disease like TTP. For this reason, in this study was aimed to investigate whether mutations on ADAMTS-13 gene are related or not with APS and to evaluate gene expression levels and amount and activity of ADAMTS-13 in the presence of mutations.

In this context, C365del, Q449stop codon, P475S mutations of ADAMTS-13 gene were analyzed by restriction enzyme digestion technique and C508Y mutation was analyzed by DNA sequencing in 70 PAPS patients and 70 healthy control subjects. mRNA transcripts of ADAMTS-13 and reference gene HPRT-1 were directed to cDNA and amplified. Transcription step was analyzed by Q RT-PCR. The activity and the amount of enzyme were analyzed by an ELISA base technique.

Mutations tested in this study were not found in both patient and healthy control group. In the patient group, amount of ADAMTS-13 mRNA was found to be half of the amount of the healthy control group. In terms of ADAMTS-13 enzyme activity, although a significant association was not detected between the patient and the control group, a very significant association was detected for the amount of enzyme ($p < 0.0001$). In the control group, activity of ADAMTS-13 enzyme was found related with gender ($p = 0.0038$) but not related with age. There was no correlation between the amount of enzyme and activity which was detected variable in subjects that had the same amount of enzyme .

As a result, no association was detected between PAPS and ADAMTS-13 mutations. Existence of half mRNA amount of ADAMTS-13 resulted in to 40 % less amount of ADAMTS-13 in the patients. This data is thought to be that ADAMTS-13 gene is negative regulated on transcription step or mutation/s may present in the promotor region or there may be an epigenetic effect. Furthermore, gender was found to be an important criteria for the enzyme activity.

1. GİRİŞ

Antifosfolipid sendromu (AFS), arteriyel ve venöz tromboz eğilimi, tekrarlayan düşükler ve antifosfolipid antikorlarının (AFA) varlığı ile karakterize olup, edinsel trombofili nedenleri arasında ilk sırada yer almaktadır. Sendromun patogenezi tam olarak aydınlatılamamakla birlikte, klinik tablodan negatif yüklü fosfolipidler ve fosfolipid-protein komplekslerine karşı oluşmuş olan antifosfolipid antikorlarının (Lupus antikoagülanı-LA ve antikardiyolipin antikorları-AKA) sorumlu olduğu düşünülmektedir. Trombotik komplikasyonlar hastaların morbidite ve mortalitesini etkileyen en önemli faktördür. Trombotik olaylar erken yaşta gelişir, hem arteriyel hem de venöz sistemde olabilir ve tekrarlama riski yüksektir. von Willebrand Faktör (vWF), faktör VIII'in taşıyıcı proteini olup, vasküler endotel hücrelerinden büyük multimerler halinde plazmaya salınır (Goodnight, 1994). ADAMTS-13 bir metalloproteazdır ve bilinen tek substratı vWF'dür. Plazmaya salınan vWF multimerlerinin 842. amino asiti Tirozin ile 843. amino asiti Metiyonin arasındaki peptid bağ ADAMTS-13 ile kesilir (Wilson ve diğ.,1999; Meroni ve diğ.,1994; Miyakis ve diğ., 2006). AFS ile benzer otoimmün bir hastalık olan Trombotik trombositopenik purpura (TTP)'da plazmada ADAMTS-13 aktivite eksikliği saptanmıştır (Cal ve diğ., 2002; Zheng ve diğ., 2001; Tao ve diğ., 2005; Majerus ve diğ., 2005). R268P, C365del, Q449stop, P475S, C508Y mutasyonları (Levine ve diğ.,2002), inhibitör otoantikorlar (Knitter ve Gorelick, 1994; Greaves, 1999a; Hanly, 2003; Harris, 1990; Greaves ve diğ., 2000; Greaves, 1999b; Petri, 2000) veya diğer etiyolojiler bu hastalıkta ADAMTS-13 enziminde işlevsel bozukluğa neden olmaktadır. Bunun sonucunda plazmada beklenmeyen büyüklükte vWF multimer varlığı görülür (Hanley, 2003). Bu tez projesinde ADAMTS-13 enziminin, TTP patogenezindeki rolünden yola çıkılarak AFS'de de tromboz gelişimindeki etkisinin araştırılması planlanmıştır.

Bu çalışmada AFS'li hastalarda ADAMTS-13 geninin mutasyonları, anlatımı, enzimin plazmadaki miktar ve aktivitesi ile tromboz gelişimi arasındaki ilişki araştırıldı. Tanı öncesinde Antikardiolipin antikorları ELISA yöntemiyle, lupus antikoagülanı ise aktive parsiyel tromboplastin zamanı ve kaolin pıhtılaşma zamanı kullanılarak çalışılmış idi. Çalışmada hasta ve kontrol grubu 3 bölümde incelendi. Birinci grupta arteriyel ve venöz tromboz geçirmiş AFS hastaları (n=37), ikinci grupta antifosfolipid antikorları pozitif

olan ancak trombotik atağı olmayan hastalar (n=33), üçüncü grupta trombozsuz normal bireyler (n=70) yer aldı. Hasta ve kontrol grubundan DNA, RNA ve plazma örnekleri toplandı. ADAMTS-13 aktivitesi ve miktarı ELISA temelli bir yöntem ile, transkripsiyon analizi Q-RT PCR yöntemiyle gerçekleştirildi. Mutasyon analizleri için konvansiyonel PZR ve DNA dizileme metodları kullanıldı. Sonuçta hem antifosfolipid antikorlarının alt grupları ve miktarlarıyla; hem de klinik bulgularla (düşük, arteriyel tromboz, venöz tromboz) ADAMTS-13 mutasyonları ve genin anlatımı arasındaki ilişki incelendi. Çalışma, İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, Hematoloji BD, Moleküler Hematoloji ve Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü laboratuvarlarında gerçekleştirildi.

2. GENEL KISIMLAR

Wasserman (1906) konjenital sifilizli fetüslerin karaciğer ekstrelerini kullanarak bir sifiliz tarama testi geliştirdi (Wasserman reaksiyonu) (Landsteiner ve diğ., 1907). Mary Pangborn (1941) bu testin antijenik unsurunun bir fosfolipid (kardiyolipin) olduğunu gösterdi. Spesifik sifiliz testleri yaygınlaştıkça, bazı kişilerde yalancı pozitif sonuçlandığı dikkati çekti (Pangborn, 1942). 1952’de sifiliz testi yalancı pozitif olan Sistemik Lupus Eritematozus (SLE)’lu iki hastanın plazmalarında in vitro olarak pıhtılaşma testlerini uzatan bir madde olduğu bulundu (Moore ve diğ., 1952). Donald Feinstein ve Samuel Rappaport (1972) bu maddeye ‘lupus antikoagülanı’ (LA) adını verdi. Bowie ve diğ. (1963) LA ile tromboz arasında ilişki olduğunu ileri sürdüler. Firkin ve diğ. (1980) LA ile tekrarlayan düşükler arasında ilişki olduğunu bildirdi. İngiliz romatolog Graham Hughes ve diğ. (1983) lupus antikoagülanının tekrarlayan düşükler, tromboz ve serebral hastalıklar ile ilişkisi olduğunu bildirdiler (Boey ve diğ., 1983). Aynı yıl, Harris ve diğ. solid faz radyoimmüno ölçüm (RIA) yöntemi ile antikardiyolipin antikörlerini tanımladılar, ardından Hughes ve diğ. (1986) ‘Antifosfolipid (Antikardiyolipin) Sendromu (AFS) tanımını ortaya attılar. Harris ve diğ. (1987) tarafından ELISA yöntemiyle AKA testi geliştirildi. SLE veya benzeri hastalıklara eşlik etmeyen olgular ‘primer AFS’ olarak tanımlandı (Asherson, 1988). Birbirinden bağımsız olarak iki grup; McNeil ve diğ. (1990), Galli ve diğ. (1990) antifosfolipid antikörlerini saf olarak elde ettiler ve bunların doğrudan kardiyolipine bağlanmadığını gösterdiler. Daha sonra, AKA’nın kardiyolipine bağlanabilmesi için β -2 glikoprotein-I (B-2 GPI) adlı bir kofaktörle bağlanması gerektiği iki farklı grup tarafından gösterildi (Oosting ve diğ., 1992; Roubey ve diğ., 1992). Bazı vakalarda ise lupus antikoagülanı etkisi yaratan antikörlerin kofaktör olarak protrombini kullandığı saptandı (Bervers ve diğ., 1991). Asherson (1992) antifosfolipid sendromununun ölümcül bir tipini tanımladı.

1998’de Japonya’nın Sapporo kentinde toplanan ‘8. Uluslararası Antifosfolipid Antikörleri Sempozyumu’nda AFS sınıflama kriterleri değiştirildi (Wilson ve diğ., 1999). Bu kriterler Tablo 2.1.’de verildi.

Tablo 2.1. 1998'de belirlenen Sapporo Kriterleri

<p><i>Klinik Kriterler*</i></p> <p>1. Tromboz: Herhangi bir doku veya organda arteriyel, venöz veya küçük damar trombozuna yol açan bir veya daha fazla klinik atak olması,</p> <p>2. Gebelik morbiditesi:</p> <p>a. 10. gestasyon haftası ve daha ileri dönemde, morfolojik olarak normal olduğu ultrason veya doğrudan muayene ile gösterilmiş bir veya daha fazla sayıda fetüs kaybı,</p> <p>b. Ağır preeklampsi, eklampsi veya plasental yetersizlik nedeniyle 34. gestasyon haftası veya daha ileri dönemde, morfolojik anomalisi olmayan, bir veya daha fazla prematüre doğum olması,</p> <p>c. 10. gestasyon haftasından önce açıklanmayan üç veya daha fazla sayıda spontan düşüklerin olması (kromozom anomalisi, annede hormonal veya anatomik bir patoloji saptanmamalı)</p>
<p><i>Laboratuvar Kriterleri</i></p> <p>1. Orta veya yüksek titrede antikardiolipin IgG veya IgM antikorlarının pozitifliği** Testlerin $\beta 2$ GPI'e bağımlı standart ELISA yöntemiyle araştırılması gereklidir.</p> <p>2. Lupus antikoagülanı pozitifliği** . Uluslararası Tromboz ve Hemostaz Topluluğu (ISTH) kriterlerine göre:</p> <p>a) Fosfolipide bağımlı pıhtılaşma testlerinin (Tarama testleri: aktive parsiyel tromboplastin zamanı, kaolin pıhtılaşma zamanı, sulandırılmış Russell's viper venom zamanı, sulandırılmış protrombin zamanı, textarin zamanı) uzamış olması</p> <p>b) Tarama testinin, trombositten fakir normal plazma ile karışım yapıldığında düzelmemesi,</p> <p>c) Tarama testinin fosfolipid ekleme testi ile kısalması veya normalleşmesi,</p> <p>d) Başka koagülopatilerin (Örneğin FVIII inhibitörü veya heparin kullanımı) dışlanması gereklidir.</p>

*Tanı için en az bir klinik ve bir laboratuvar kriter olmalıdır, **En az 6 hafta arayla, 2 veya daha fazla ölçümde pozitif bulunmaları gereklidir.

2006 yılında 11. Uluslararası Antifosfolipid Sempozyumunda AFS kriterleri yeniden tanımlandı. Buna göre, klinik kriterler aynı kalırken, laboratuvar kriterleri değişti. Anti-beta 2- glikoprotein-I, immünglobulin G ve M proteinleri laboratuvar kriterlerine eklendi. Antifosfolipid antikorlarının 12 hafta arayla en az iki kez pozitif olması ve 40 ünitenin üzerindeki değerlerin pozitif kabul edilmesi gerektiği belirtildi.

2.1. AFS'DE TROMBOZ

AFS'de mortaliteyi ve morbiditeyi etkileyen en önemli faktör trombo-embolik komplikasyonlardır. Trombozlar hem arteriyel, hem de venöz sistemi tutabilmekte ve

her doku ve organda olabilmektedir (Meroni ve diğ., 1994). Trombozların tekrarlama eğiliminde olması ve genellikle birbirini izleyen trombotik komplikasyonların aynı sistemi tutma riskinin yüksek olması (örneğin daha önce arteriyel trombozu olan olguda, nükste yine arteriyel tromboz görülmesi) dikkat çekicidir (Barbui ve diğ., 1994). Yaklaşık 2/3'ünde venöz tromboembolizm, 1/3'ünde arteriyel tromboz görülmektedir. Venöz trombozda ilk sırada derin ven trombozu ve pulmoner embolizm, arteriyel trombozda ise ilk sırada iskemik serebral atak yer alır. Bunu miyokard infarktüsü ve parmak trombozları izler (Barbui ve diğ., 1994). AFS'de alışılmadık bölgelerde tromboz (üst ekstremitte venlerinde, batin içi venlerde, kafa içi venlerde tromboz) sıktır (Feinstein ve Rapaport, 1972; Harris, 1990; Meroni ve diğ., 1994, Greaves, 1999a; Greaves ve diğ., 2000; Levine ve diğ., 2002; Hanly, 2003). Bu nedenlerle, tromboza bağlı çok çeşitli klinik tablolar ortaya çıkabilmektedir (Tablo 2.2.).

Tablo 2.2. AFS'de Klinik Tablolar

Sistem	Semptom ve Klinik Bulgular
Arteriyel sistem	Küçük, orta, büyük boyutlu arterlerde trombozlar görülebilir
Venöz sistem	Küçük, orta, büyük boyutlu venlerde trombozlar görülebilir
Kardiovasküler	Akut miyokard infarktüsü (AMI), angina pectoris, kalp kapak anomalileri, kalp kapaklarında vejetasyonlar, bakteri kökenli olmayan trombotik (Libman Sacks) endokarditi, ateroskleroz, periferik damar hastalığı, miyokardit, aralıklı topallama
Pulmoner	Pulmoner emboli, pulmoner hipertansiyon, pulmoner alveoler kanama, sıkıntılı solunum sendromu, fibrozan alveolit
Hematoloji	Trombositopeni, otoimmün hemolitik anemi, trombotik trombositopenik purpura, hemolitik üremik sendrom
Nörolojik	Geçici iskemik atak, serebrovasküler olay (SVA), kore, konvülsiyon, vasküler bunama, transvers miyelit başta olmak üzere spinal sendromlar, ensefalopati, migren, Sneddon sendromu, pseudo-tümör serebri, serebral venöz tromboz, sinir güçsüzlüğü, geçici ani görme kaybı
Oftalmolojik	Retinal arter trombozu, retinal ven trombozu
Obstetrik	Gebelik kaybı, uterus içi büyüme-gelişme geriliği, HELLP (hemolyse elevated liver enzymes low platelets) sendromu, amniyon sıvı azalması, preeklampsi (gebelikte yüksek tansiyon ve ödem), eklampsi, utero-plasental yetersizlik, infertilite
Gastrointestinal	Budd-Chiari sendromu, hepatik nekroz, intestinal nekroz, iskemik kolit,

	pankreatit, intestinal veno-oklüzif hastalık, hepatik veno-oklüzif hastalık
Endokrin	Adrenal yetersizliği, testis infarktüsü, prostat infarktüsü, hipofiz nekrozu ve yetersizliği
Dermatolojik	Reynaud fenomeni, livedo retikularis, yüzeysel tromboflebit, tırnak altı kanamalar, bacak ülserleri, ciltaltı nodüller, mavi parmak sendromu, cilt nekrozları
Diğer	Psikoz, bilişsel bozukluklar, kemik nekrozları, avasküler nekroz

AFS’de tromboz tedavisi tam olarak netleşmemiştir. AFS’de tromboz ve diğer klinik bulguların mekanizmalarının ortaya konması tedavi sürecini de belirleyecektir. Şu andaki yaklaşım her hastaya göre diğer risk faktörlerini değerlendirerek buna uygun tedavi verilmesi yönündedir (Harris, 1990; Meroni, 1994; Greaves, 1999a; Greaves, 1999b; Greaves ve diğ., 2000; Levine ve diğ., 2002; Hanly, 2003). Tedavinin süresi konusunda farklı görüşler bulunmaktadır. Risk faktörü olmayan hastalarda 6 ay oral antikoagülan tedavi önerilmektedir. Tekrarlayan tromboz gelişen olgularda, tedavi ömür boyu sürdürülmelidir. Oral antikoagülan altında tromboz gelişen olgulara aspirin eklenmesi önerilir. AFS’de antifosfolipid antikoru (AFA) sürekli pozitif olduğu halde trombotik atakların düzensiz oluşu, bazı hastalarda tromboz olmadan tekrarlayan düşükler veya trombositopeni ile seyretmesi, bazılarında ağır arteriyel veya venöz tromboz atakları olması, bazılarında ise antikor pozitifliği yıllarca devam ettiği halde hiçbir klinik bulgunun olmaması, tromboz gelişimini etkileyen başka faktörlerin de olduğunu düşündürmektedir.

2.2. AFS’DE OTOANTİKORLA İLİŞKİLİ TROMBOZ MEKANİZMALARI

Antifosfolipid sendromunda yaygın olarak kabul edilen görüş otoantikörlerin pıhtılaşma bozukluğunu doğrudan tetiklediğidir (Chu ve diğ., 1988; Exner ve Kouts, 1988; Kapiotics ve diğ.,1991; Gingsburg ve diğ., 1992; Santoro, 1994; Simioni ve diğ. 1996; Nojima ve diğ., 1997, Male ve diğ., 2001; Pierangeli ve diğ., 2001). AFS’de klinik bulguların çeşitliliği birden fazla patofizyolojik sürecin rol aldığını düşündürmektedir. Örneğin hastaların bir kısmında venöz tromboza neden olurken, diğerlerinde arteriyel tromboza neden olmaktadır. Çok çeşitli prokoagülan mekanizmalardan en önemlileri

Tablo 2.3.'de gösterilmiştir. Otoantikörler ilk olarak hücre membranındaki hemostatik mekanizmaları bozarlar (Chu ve diğ., 1988; Exner ve Kouts, 1988; Gingsburg ve diğ., 1992; Santoro, 1994; Simioni ve diğ. 1996). Prokoagülan ve antikoagülan reaksiyonları oluşturan enzimler, kofaktörleri ve bunların substratları, spesifik fosfolipid membran üzerinde denge halindedirler. Otoantikörler membran proteinlerine bağlanarak, bu reaksiyonların kinetiklerini belirgin olarak değiştirirler. Bu etkilerini proteinlerin membrandan ayrılmalarını yavaşlatarak, proteinlerin etkileşimlerini bloke ederek veya diğer proteinlerin fosfolipid membrana erişimini engelleyerek gerçekleştirirler. Otoantikörler belirli hücreleri uyararak çeşitli moleküllerin anlatım ve salgılanmasını değiştirir (Chu ve diğ., 1988; Exner ve Kouts, 1988; Kapiotics ve diğ.,1991; Gingsburg ve diğ., 1992; Santoro, 1994; Simioni ve diğ. 1996; Nojima ve diğ., 1997, Male ve diğ., 2001; Pierangeli ve diğ., 2001; Zhang ve diğ., 2007).

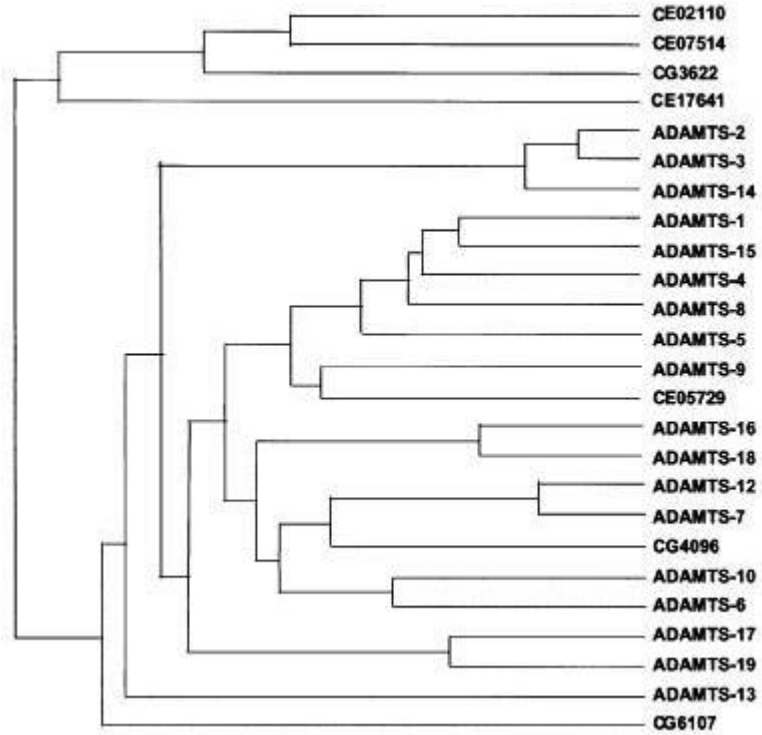
Tablo 2.3. AFS'de otoantikörle ilişkili tromboz mekanizmaları

Antikoagülan reaksiyonların inhibisyonu
Protein C yolunun inhibisyonu
Protein C aktivasyonunun inhibisyonu
Aktif protein C'nin inhibisyonu
Antitrombin aktivitesinin inhibisyonu
Anneksin 5'in yer değiştirmesi
B2GPI antikoagülan aktivitesinin inhibisyonu
Hücre aracılı olaylar
Monositlerde doku faktörü anlatımı
Endotelial hücrelerde prokoagülan aktivitenin artması
Doku faktörünün anlatımı
Adhezyon moleküllerinin anlatımı
Eikozanoidler (prostoglandin, tromboksan, lökotrien hormonları)'deki bozulma
Endotelial hücrelerde prostosiklin üretiminin azalması
Trombositlerdeki tromboksan A2 üretiminin artması
Trombositlerde aktivasyon/ agregasyon artışı

2.3. ADAMTS-13

ADAMTS-13 ya da diğ er adı ile “von Willebrand Faktör parçalayıcı enzim” bir proteazdır. ADAMTS kısaltması “**A** disintegrin like **and metallo**protease with thrombospondin type 1” ‘den türetilmiştir. ADAMTS’lar metallopeptidazların M12B adamalisin alt ailesinin bir kolunu oluşturular. ADAMTS’lar büyüme faktörü ve adhezyon reseptörlerini de içeren hücre yüzey moleküllerinin aktivasyonunda rol alan ADAM (“**A** disintegrin **and metallo**proteinase”) proteinleri ile yakın ilişkilidir. ADAM proteinleri bir Pro- domen, metalloproteaz, disintegrin benzeri, sisteince zengin, epidermal büyüme faktörü (EGF) benzeri, transmembran ve sitoplazmik domenlerden oluşur. ADAM ailesi üyesi proteinler şimdiye kadar çeşitli memeli dokularında, *Xenopus laevis*, *Drosophila melanogaster* ve *Caenorhabditis elegans*’ın da dahil oldukları farklı ökaryotik organizmalarda saptanmıştır (Cal ve diğ., 2002). Fakat bitkilerde ve bakterilerde saptanmamıştır. ADAMTS-13, C- uç bölgesinde birkaç trombospondin benzeri tekrar içeren ADAM proteinlerine benzer fakat transmembran domeni bulunmaz. ADAMTS proteinlerinden tanımlanan ilkinde ADAMTS-1 ismi verilmiştir. ADAMTS üyelerinin metalloproteinaz domenleri, yılan venom metalloproteinazlarına (reprolisin) çok benzemektedir. Yılan venom distegrinlerinde, arginin-glisin-aspartik asit (RGD) integrin tanımlama bölgesi bulunmaktadır fakat hiçbir ADAMTS üyesi, disintegrin domeninde RGD dizisi içermeyiz. Bu nedenle ADAMTS’ların integrinler ile ilişkili olduğuna dair kanıt yoktur. Tüm ADAMTS’lar önce inaktif pro enzim halinde sentezlenir. Her birinde bir sinyal peptid, bir prodomen ve bir metalloproteinaz katalitik domen bulunur. ADAMTS’lar dizi benzerliği ve hedef substratlar göz önüne alındığında, filogenetik analiz sonucu 7 gruba ayrılabilir (Şekil 2.1.). ADAMTS-13, 2 adet tamamlayıcı CUB [C1r/C1s (serin proteazlar), Uegf (denizkestanesinde epidermal büyüme faktörü), Bmp1(kemik morfogenetik protein 1) tamamlayıcılarından oluşan protein motifi] domeniine sahip olması ile diğ erlerinden ayrılır (Zhang ve diğ., 2007; Tao ve diğ., 2005; Zheng ve diğ., 2003; Tsai, 1996; Dong, 2007). CUB domenleri enzimin salınımı sürecinde kritik role sahiptir. CUB domenindeki mutasyonlar, enzimin hücre dışında saklanması sırasındaki yıkım oranını etkilemektedir.

1. ADAMTS- 1,4,5,8,15
2. ADAMTS- 2,3,14
3. ADAMTS- 9,20
4. ADAMTS- 7,12,6,10
5. ADAMTS- 16
6. ADAMTS- 17,19
7. ADAMTS-13

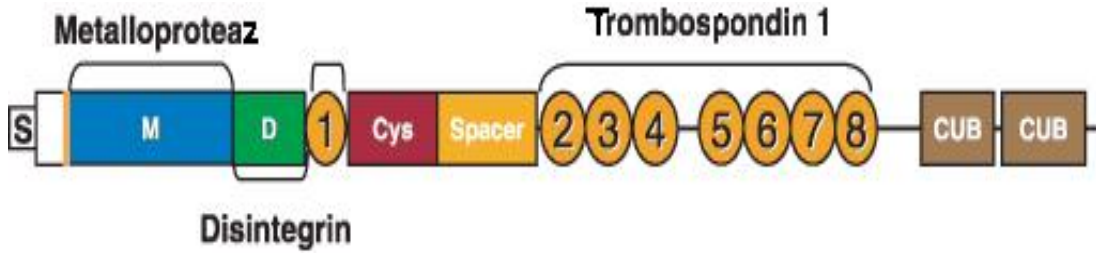


Şekil 2.1. ADAMTS ailesinin filogenetik ağacı. (Cal ve diğ., 2002). İnsan, *Caenorhabditis elegans* ve *Drosophila melanogaster* ADAMTS proteinlerinin metalloproteaz domenlerindeki amino asit dizilerinin sıralanışı, biyopolimer yapı analizi için geliştirilmiş Gene-Bee yazılımı ile gerçekleştirilmiştir (www.genebee.m-su.su). CE02110, CE07514, CE05729 ve CE17641 *C. elegans* genomundaki ADAMTS'lara giriş için erişim numaralarıdır. CG2622, CG4096 ve CG6107 ise *D. melanogaster* için geçerlidir.

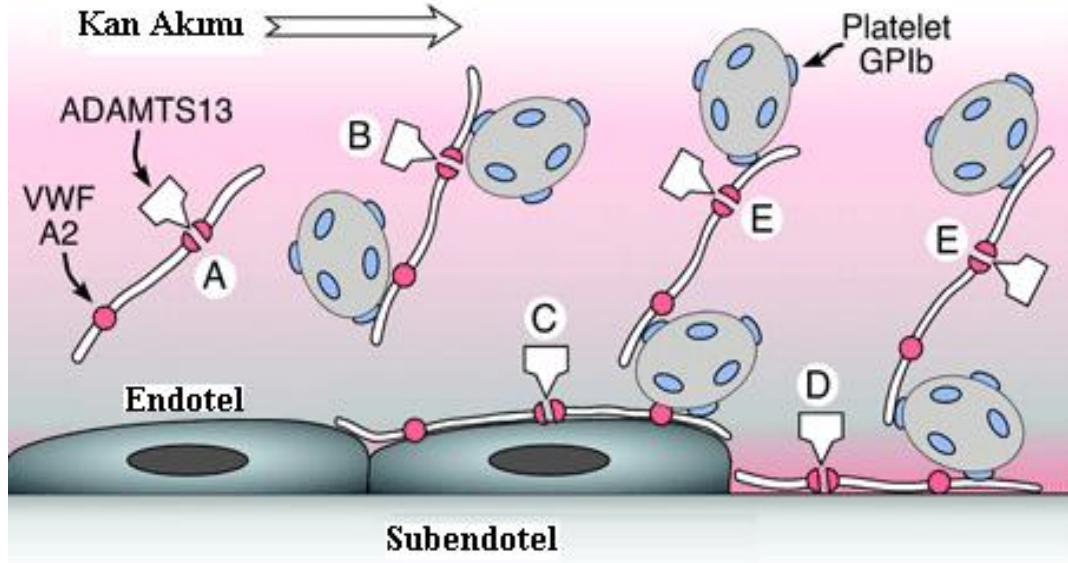
Ondokuz üyeli ADAMTS enzim ailesinin üyesi olan ADAMTS-13, amino uçtan karboksi uca doğru : metalloproteaz, disintegrin, trombospondin-1 benzeri, sisteince

zengin, ayrıca, 7 adet ek trombospondin-1 benzeri bölge (Şekil 2.2.) ve 2 adet eş olmayan CUB bölgesinden oluşur (Zheng, 2001; Tao, 2005).

ADAMTS-13 Zn^{+2}/Ca^{+2} bağımlı, *in vivo* yarı ömrü 2-3 gün olan kararlı bir metalloproteazdır (Tao, 2005; Furlan ve diğ.,1999) (Şekil 2.3.). Bilinen tek substratı faktör VIII'in taşıyıcı proteini olan ve vasküler endotel hücrelerinin Weibel-Palade cisimciklerinden, trombositlerin α granüllerinden büyük multimerler halinde plazmaya salınan von Willebrand Faktör (vWF)'dür (Majerus ve diğ., 2005; Tao ve diğ., 2005).

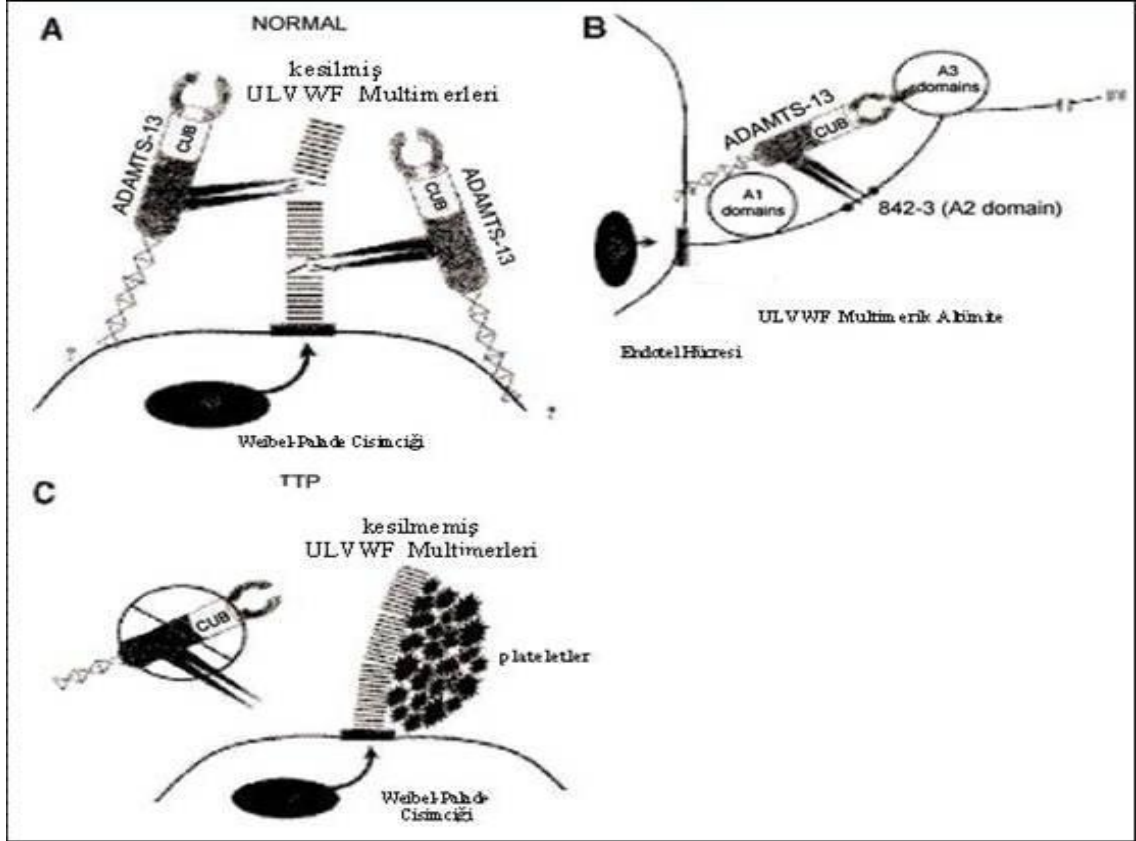


Şekil 2.2. ADAMTS-13 proteini. (Zheng ve diğ., 2001). Metalloproteaz domen, yılan zehiri metalloproteazları ve ADAM ailesi üyelerinin paylaştığı katalitik bölgede HEXGHXXGXXHD ile mükemmel eşleşen korunmuş diziyi içermektedir. Northern blot analizleri sonucu ADAMTS-13 mRNA'sı yaklaşık 4.7 kb uzunluğunda karaciğerde, 2.3 kb uzunluğunda göbek kordonunda saptanmıştır. Bu veriler ADAMTS-13 anlatımının primer olarak karaciğerden türevlendiğini düşündürmektedir. Farklı dokularda da değişik miktarlarda saptanmıştır. ADAMTS-13'ün glikozillenmemiş kütesinin yaklaşık 150 kDa olduğu tahmin edilmektedir [53]. Akciğer ve kalp gibi vasküler dokularda transkript bulunmaması ADAMTS-13 anlatımı için vasküler endotelin, primer bölge olmayabileceğini düşündürmektedir.



Şekil 2.3. Plazmada vWF. (Sadler, 2005). vWF endotel hücrelerinden multimerler halinde plazmaya salınır (A,B), veya endotel hücre yüzeyine yapışır (C). vWF aynı zamanda vasküler bir hasar durumunda açığa çıkan bağ dokuya da bağlanır (D). Daha önceden birbirine yapışmış plateletlere yeni plateletler eklenişini sağlayabilir (E). vWF'ün altbiriminin A2 domenindeki Tirozin-Metiyonin arasındaki peptid bağın kesimi, vWF'ün kan sıvısı içinde bulunduğu durumda (A) yavaştır. Plateletlerin vWF'e bağlandığı durumda (B) veya yüzeylerde bulunduğu durumlarda bu reaksiyon hızlı gerçekleşir.

Plazmaya salınım, P selektin ile birlikte olmaktadır ve bunu sağlayanlar ise Şiga toksin, TNF-alfa, histamin, interlökin 6 ve interlökin 8'dir (Zhang ve diğ., 2007). vWF disülfid bağları ile bağlanmış dimerlerden oluşan büyük bir polimerdir. provWF dimerlerini oluşturmak amacı ile vWF peptitleri endoplazmik retikulumda karboksil uçtan birbirine bağlanır. Dimerler, golgi kompleksine ve depo granüllere geçerler. Burada ön dizi parçalanır ve disülfid bağları amino uçtan ortaya çıkar. vWF dolaşımında ağırlığı 500 ile 20.000 kDa arasında değişen, eş alt birimlerden oluşmuş bir multimer halinde bulunur. Bu çok büyük olan vWF'ün, monomerik alt ünitelerinin A2 domenindeki 842. amino asiti Tirozin ve 843. amino asiti Metiyonin arasındaki peptid bağın ADAMTS-13 enzimi ile kesilmesi ile (Şekil 2.4.) daha küçük multimerleri oluşur (Tsai, 1996; Zheng ve diğ., 2003; Tao ve diğ., 2005; Dong, 2007; Zhang ve diğ., 2007).



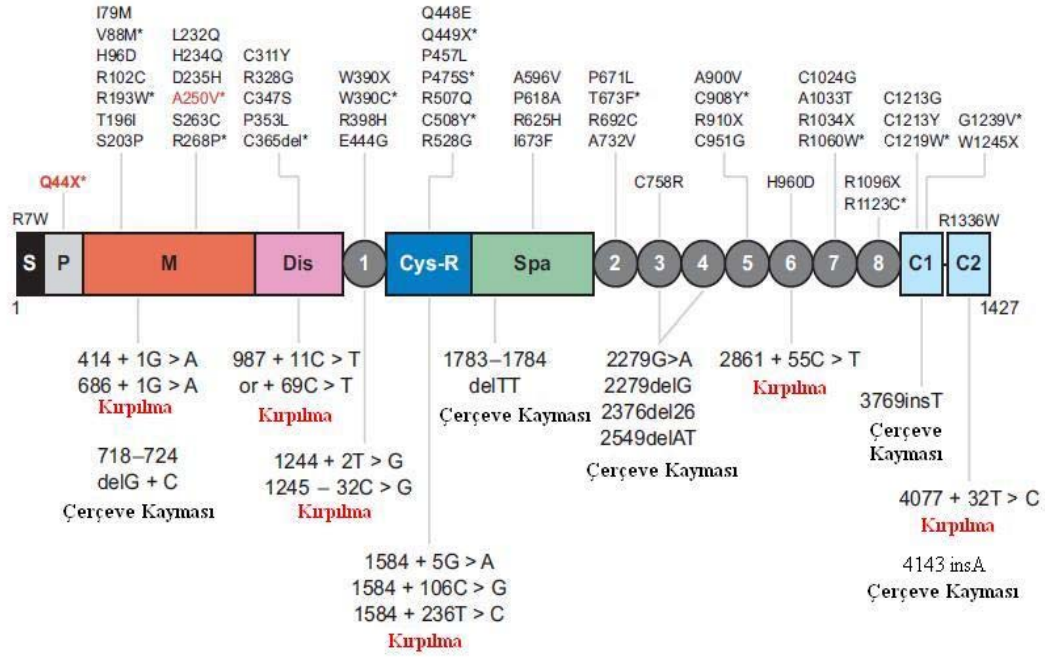
Şekil 2.4. Plazmada vWF'nin kesildiği ve kesilmediği durumlar. (Moake, 2004). Normal bir durumda 842 ve 843. amino asitler arasında kesimi (A), kesim yeri A1 ve A3 domenleri arasında gerçekleşir (B), TTP hastalığında görülen kesilmemiş çok büyük vWF multimerleri (C).

ADAMTS-13, proteoliz ve glikolizasyondan oluşan posttranslasyonel kontrol işlemlerine uğrar. ADAMTS-13 zimojen olarak sentezlenmekte ve inaktif propeptidin parçalanması ile aktif hale gelmektedir (Gerritsen ve diğ., 2001). ADAMTS-13'ün aktivitesi Zn^{+2} ve Ca^{+2} düzeylerine bağlıdır. Enzim pH 7-11 aralığında aktif olup optimum aktiviteyi pH 6-8 aralığında göstermektedir. Birçok metal bağlayıcılara dirençli olması, plazmadaki uzun yarı ömrünü açıklamaktadır (Tsai, 1996; Romero ve diğ., 1997; Gerritsen ve diğ., 2001; Zheng ve diğ., 2001; Dong, 2007). Etilendiamintetraasetik asetik asit (EDTA), etilenbistetraasetik asetik asit (EGTA) ve 1,10 fenantrolin içeren divalent ajanlar ile inhibe edilir (Tsai, 1996; Furlan ve diğ., 1998). ADAMTS-13'ün işlevsel bozukluğu, genetik mutasyonlar (Kokame ve diğ., 2001; Antoine ve diğ., 2003; Assink ve diğ., 2003; Savasan ve diğ., 2003; Schneppenheim ve diğ., 2003; Matsumoto ve diğ., 2004; Donadelli ve diğ., 2006), inhibitör otoantikolar veya diğer etiyolojiler, plazmada beklenmeyen büyüklükte vWF multimer varlığına neden olurlar (Scheiflinger ve diğ., 2003; Shelat ve diğ., 2006). Bu multimerlere kolayca bağlanan trombositler, küçük

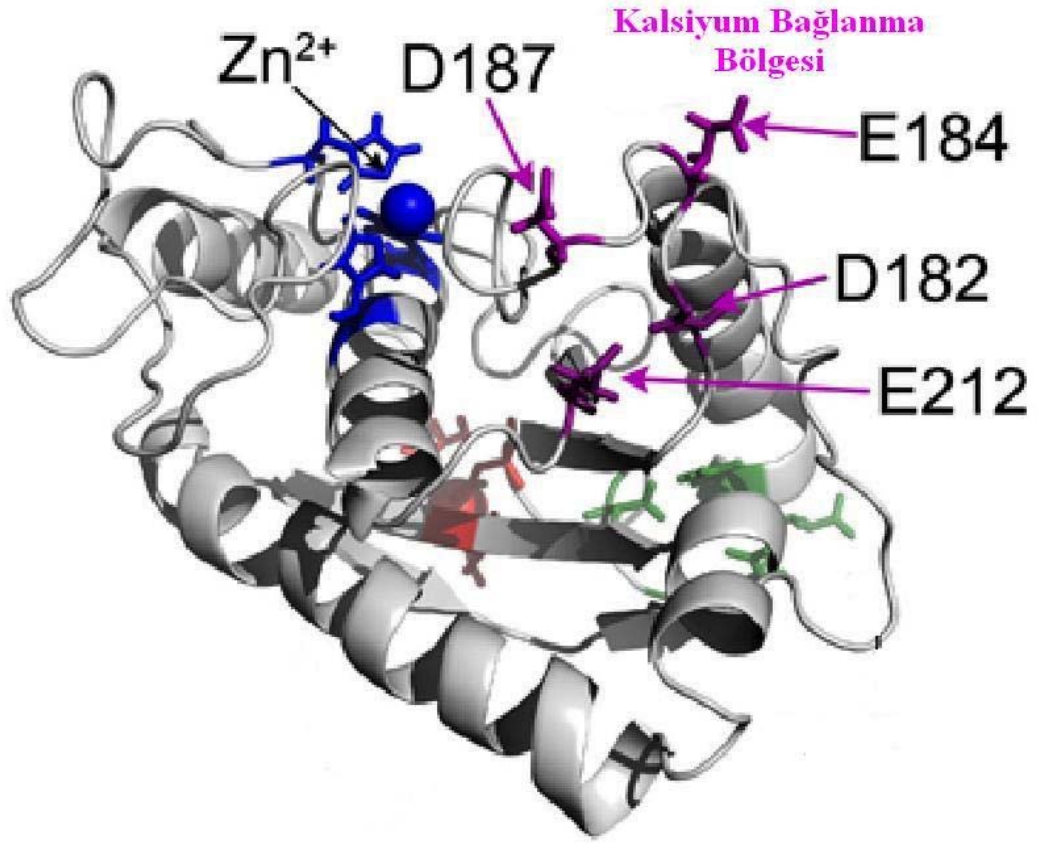
damarlarda trombüslerin oluşmasına yol açar. Trombotik trombositopenik purpura (TTP) hastalığında plazmada ADAMTS-13 eksikliği söz konusudur (Antoine ve diğ., 2003; Savasan ve diğ., 2003; Scheiflinger ve diğ., 2003; Schneppenheim ve diğ., 2003). Mortalitesi çok yüksek olan bu hastalıkta, plazmada büyük vWF multimerleri artmıştır. Mikrodolaşımdaki trombüsler nedeniyle buradan geçen eritrositlerin parçalanması sonucu mikroanjiopatik hemolitik anemi gelişir. Çocukluk çağı olgularında ADAMTS-13 mutasyonları tanımlanmış olup, bu mutasyonların doğuştan gelen TTP'ye neden olduğu saptanmıştır (Furlan ve diğ., 1998; Levy ve diğ., 2001; Antoine ve diğ., 2003; Savasan ve diğ., 2003; Schneppenheim ve diğ., 2003; Furlan ve diğ., 2004; Sadler, 2005). Konjenital TTP (Upshaw-Schulman sendromu) hastalarında mutasyonlar sonucunda oluşan ADAMTS-13 aktivite eksikliği (<5-10) görülmektedir (Levy ve diğ., 2001). İdiyopatik TTP'de de aktivite eksikliği söz konusudur fakat nedeni, mutasyonlardan çok ADAMTS-13 aktivitesine karşı gelişen otoantikordır. Gebelik, otoimmün hastalık, edinilmiş bağışıklık sistemi yetmezliği virüsü (HIV) enfeksiyonu, hematopoetik progenitör hücre transplantasyonu, kanser, kemoterapi ve diğer ilaç kullanımının (Siklosporin A, FK 506, mitomisin ve klopidrojel) gerçekleştiği idiyopatik olmayan TTP hastaları normal ya da düşük ADAMTS-13 aktivitesine sahiptir (Shelat ve diğ., 2006). Trombosit agregasyonunu inhibe eden bir ilaç olan Tiklopidin ile ilişkili TTP (aktivite çok düşüktür ve otoantikör görülebilir) dışında idiyopatik olmayan TTP'de ADAMTS-13 eksikliği yaygın değildir. Erişkinlerde birçok TTP olgusunda ADAMTS-13'e karşı oluşmuş otoantikörler saptanmaktadır. Kimi çalışmalarda bu otoantikörlerin aktiviteyi sonlandırdığı (Gao ve diğ., 2004; Zheng ve diğ., 2004; Shelat ve diğ., 2006), kimisinde ise aktiviteyi etkilemediği bildirilmiştir (Vesely ve diğ., 2003).

ADAMTS-13 geni 9q34'te yerleşik olup 29 eksondan oluşur, 37 kb uzunluğundadır ve 1427 amino asitten oluşan proteini kodlar. RT-PCR analizleri ve cDNA'nın klonlanması sonucu, 17. eksonda bir alternatif kırılmanın meydana geldiği saptanmıştır (Gen bankası erişim numarası AF 414400) (Levy ve diğ., 2001). Bu kırılma sonucunda C-uçtaki 6 adet TSP1 tekrarının eksik olduğu, 842 amino asitten oluşan proteinin kısa formu meydana gelir. ADAMTS-13 mutasyonlarından 5'inin (R268P, C365del, Q449stop, P475S, C508Y) TTP'de ADAMTS-13'ün aktivitesini sonlandırdığı

saptanmıştır (Kokame ve diğ., 2001; Levy ve diğ., 2001; Antoine ve diğ., 2003; Assink ve diğ., 2003; Savasan ve diğ., 2003; Schneppenheim ve diğ., 2003; Matsumoto ve diğ., 2004; Donadelli ve diğ., 2006). Günümüze kadar tanımlanan mutasyonlar ve polimorfizmler Şekil 2.5.'te , proteinin çinko ve kalsiyum bağlanma bölgeleri ise Şekil 2.6.'da belirtildi.



Şekil 2.5. ADAMTS-13 mutasyonları ve polimorfizmlerinin yerleri. (Zheng ve Sadler, 2008). Tek nükleotid değişimleri ve stop kodonları (X ile gösterilmiştir) ADAMTS-13 domen yapısının üzerinde gösterilmiştir. ADAMTS-13 mRNA'sının alternatif kırılmasını yada çerçeve kaymalarına neden olan mutasyonlar domen yapısının alt kısmında listelenmiştir. Hücre kültüründe rekombinant proteinlerin anlatımına katkıda bulunan mutasyonlar * işareti ile gösterilmiş, ADAMTS-13 salınımını bozanlar siyah, enzimin katalitik aktivitesini bozanlar ise kırmızı yıldız işareti ile gösterilmiştir. S: sinyal peptidi, P: propeptid, M: metalloproteaz, Dis: disintegrin domeni, 1: İlk trombospondin tip 1 (TSP-1) tekrarı, Cys-R: Sisteince zengin domen, Spa: Ayraç (Spacer) domen, 2-8: İkiden 8'e kadar TSP-1 tekrarları, C1 ve C2: CUB1 ve 2 domenleri.



Şekil 2.6. ADAMTS-13 domenlerini gösteren bir model. (www1.imperial.ac.uk/medicine/about/divisions/is/haemo/co, 2009). Çinko iyonu ile koordinasyonda olan aktif bölge mavi ile, fonksiyonu etkileyen kalsiyumun bağlanma bölgeleri mor renk ile gösterilmiştir.

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. MALZEME

Çalışma grubu İstanbul Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Hematoloji Bilim Dalı tarafından takip edilen olgular arasından seçildi. Bu çalışma, İstanbul Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından onaylandı (2007/2194), aynı zamanda İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından tez projesi kapsamında desteklendi (No: 1454). Olgulardan çalışma öncesi bilgilendirilme onayı alındı.

Bu çalışmaya Sapporo kriterlerine göre (Wilson ve diğ., 1999) kesin primer AFS tanısı konmuş 19'u erkek (14'ü trombozlu, 5'i trombozsuz) 51'i kadın (24'ü trombozlu, 27'si trombozsuz) 70 olgu dahil edildi. Hasta grubuna ait demografik veriler Tablo 3.1.'de verildi. Hasta grubunun yaş aralığı 20-58 olup ortalama yaş 38 olarak hesaplandı. Hastaların % 44'ünde lupus antikoagulan antikorunun (LA) pozitif olduğu saptandı. Antikardiyolipin antikor G (AKA-G) ortalaması 43,11 GPL-U/ml (7->100), antikardiyolipin antikor M (AKA-M) ortalaması 21,78 GPL-U/ml (2-100) olarak hesaplandı. Kadın hastaların 29'u düşük yaşamıştı (1-5 kez).

Kontrol ve hasta grubunu oluşturan bireyler (n=70) yaş ve cinsiyet bakımından uyumlu olarak seçildi. Bilgilendirilip onay formu imzalatılan kontrol bireyleri herhangi bir hastalığı olmayan sağlıklı bireylerden seçilerek oluşturuldu.

Hasta grubu, İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji BD polikliniğince trombotik komplikasyonların doppler ultrasonografi, ventilasyon perfüzyon sintigrafisi, venografi, splenoportografi, manyetik rezonans anjiyografi, göz anjiyografi, koroner anjiyografi, periferik anjiyografi ile doğrulanmış olan kesin AFS tanısı konmuş olgulardan oluşturuldu.

Tablo 3.1. Hasta grubuna ait demografik veriler

NO	YAŞ	C	LA	AKA-G	AKA-M	DŞK	T.PENİ	TROMB	TROMB LOK.
H1	35	E	(-)	100	46	YOK	YOK	VENÖZ	Derin ven trombozu (DVT)
H2	39	E						VENÖZ	
H3	38	K	(-)	8	100	2	YOK	A+V	DVT- Pulmonar emboli (PE)
H4	40	K	(-)	45	12	5	YOK	VENÖZ	DVT
H5	59	K	(-)	72	15	YOK	YOK	ARTER	RENAL
H6	38	E	(-)	100	46	YOK	YOK	VENÖZ	DVT
H7	31	K	(-)	40	40	3	YOK	YOK	
H8	34	K	(+)	15	8,1	YOK	10000	YOK	
H9	54	E	(+)	40	40	YOK	YOK	ARTER	AMI, SOL KROTS art.
H10	42	K	(+)	29	5,4	1	YOK	ARTER	SVA
H11	36	K	(-)	30	8	1	YOK	YOK	
H12	44	K	(-)	28	6	2	YOK	ARTER	P.EMBOLİ
H13	30	K	(-)	7	50	5	YOK	YOK	
H14	48	E	(-)	31	30	YOK	YOK	ARTER	CVA
H15	40	K	(+)	35	5,0	YOK	65000	A+V	SST, DİGİTAL ARTER
H16	36	E						VENÖZ	
H17	31	K	(-)	25	6	2	YOK	YOK	
H18	27	K	(-)	28	8	YOK	2	VENÖZ	DVT
H19	45	K	(+)	50	100,0	1	YOK	ARTER	MI(Miyokardinfarktüsü)
H20	38	K						YOK	
H21	42	K	(+)	121	18		YOK	YOK	
H22	20	E						ARTER	RETİNAL ARTER
H23	33	K	(-)	36	48	YOK	YOK	YOK	
H24	43	K	(-)	23	8	2	YOK	ARTER	P.EMBOLİ
H25	35	K	(+)	40	40	YOK	100.000	VENÖZ	R BACAK DVT
H26	29	K	(-)	36	14	YOK	YOK	VENÖZ	DVT
H27	44	K	(-)	5	40	YOK	YOK	VENÖZ	SAG DVT
H28	38	K	(-)	40	5	3	YOK	YOK	
H29	46	K	(-)	28	12	4	YOK	YOK	
H30	35	E	(+)	101	15,0	YOK	YOK	VENÖZ	DVT+PE
H31	45	K	(-)	44	17	3	YOK	ARTER	SVA
H32	44	K	(+)	36	30	2	YOK	YOK	
H33	38	K	(-)	59	5	2	YOK	YOK	
H34	42	E	(+)	16	4	YOK	YOK	ARTER	SVA
H35	40	K	(+)	35	5,0	YOK	65000	A+V	SST, DİGİTAL ARTER
H36	52	K	(+)	32	18,0	4	30.000	YOK	
H37	39	K	(-)	18	47	YOK	YOK	ARTER	CVA
H38	50	K	(+)	30	25,0	YOK	95.000	YOK	
H39	43	E	(+)	83	8			YOK	
H40	50	K	(+)	>100	8	4	YOK	ARTER	CVA
H41	46	K	(-)	69	11	3	YOK	YOK	
H42	34	K	(+)	10	7,0	YOK	YOK	VENÖZ	SST
H43	28	K	(-)	25	8	2	50000	YOK	
H44	36	K						YOK	
H45	40	K	(+)	23	6	1	YOK	VENÖZ	SER.VEN TR
H46	36	E	(+)	105	2	YOK	YOK	ARTER	

H47	38	E						YOK	
H48	43	K	(+)	22	12,0	YOK	YOK	VENÖZ	RVT
H49	58	K	(-)	72	39,0	YOK	YOK	VENÖZ	DVT
H50	36	K	(-)	43	13	3	YOK	ARTER	
H51	29	E	(+)	50	19	YOK	36.000	VENÖZ	İLİAKVT ,İNF VCT, FMVT
H52	37	E	(+)	40	10,0	YOK	YOK	VENÖZ	SST+DVT
H53	38	E	(+)	>100	>100	YOK	YOK	ARTER	SVA
H54	29	K	(+)	40	40	YOK	100.000	VENÖZ	DVT-PE- VCI
H55	31	K	(-)	13	61	2	YOK	YOK	
H56	27	K	(-)	18	15	2	YOK	YOK	
H57	24	K	(-)	>100	6	4	YOK	YOK	
H58	35	K	(-)	179	38		YOK	YOK	
H59	36	K	(-)	41	5	3	YOK	YOK	
H60	37	K	(-)	32,2	13,2	5	YOK	YOK	
H61	19	E	(-)	25	5,1	YOK	YOK	VENÖZ	RVT
H62	40	K	(+)	28	12	2	YOK	YOK	
H63	37	K						ARTER	P.EMBOLİ
H64	36	K	(+)	27	5,0	2	49.000	YOK	
H65	35	E						YOK	
H66	36	K						YOK	
H67	38	E						YOK	
H68	38	K						YOK	
H69	39	K						YOK	
H70	41	E						YOK	

H: Hasta, C: Cinsiyet, LA: Lupus antikoagulanı, AKA-G: Antikardiyolipin antikor G, AKA-M: Antikardiyolipin antikor M, Dşk: Düşük, T.peni: Trombositopeni, Tromb: Tromboz, Tromb.Lok: Tromboz lokalizasyonu

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Genomik DNA İzolasyonu

Yetmiş kontrol ve 70 hasta bireyden (38 trombozlu, 32 trombozsuz) DNA izolasyon kiti (Roche, High Pure PCR Template Preparation kit) kullanarak genomik DNA izolasyonu gerçekleştirildi. 1,5 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarılan 200 µl periferik kan örneği üzerine 200 µl bağlanma tamponu ve 40 µl proteinaz K (20mg/ml) eklenip çalkalamalı karıştırıcıda 15 saniye karıştırılıp 72 °C'de 10 dakika bekletildi. 100 µl izopropanol eklenip çalkalandıktan sonra karışım, toplama tüpünün içine oturtulmuş olan filtreli tüpe aktarılıp oda sıcaklığında 8.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Filtreden toplama tüpüne geçen sıvı atıldıktan sonra, filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu I eklenerek 8.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldıktan sonra, filtreli tüpe 500 µl yıkama tamponu-II eklenip 8.000 dev./dak. hızda 1

dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldıktan sonra tüpler 13.000 dev./dak. hızda 2 dakika santrifüjlendi. Filtreli tüp, 1.5 ml'lik boş bir santrifüj tüpünün içine oturtulduktan sonra önceden 70 °C'ye ısıtılmış 200 µl çözücü tampon eklenip (Tris EDTA) 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Santrifüj tüpüne geçen ve genomik DNA içeren sıvı analiz zamanına kadar +4 °C'de saklandı.

3.2.2. Genomik DNA'nın Kalitatif Tayini

0.5 g agaroz 50 ml 0.5X TBE (Tris-Borik Asit –EDTA) tamponunda ısıtarak çözdürüldü. Soğuduktan sonra üzerine 2.5 µl (10 mg/ml) etidyum bromür eklendi ve jel küvetine döküldü. Jel katılaştıktan sonra, tank 0.5X TBE çözeltisi ile dolduruldu (Tablo 3.2.). 3-4 µl DNA, 4 µl 6X'lık yükleme tamponu ile karıştırılarak jeldeki kuyucuklara aktarıldı. Örnekler, 20 dk süre ile 45 mA ve 120 V elektrik akımına maruz bırakıldı. Elektroforez tamamlandıktan sonra jel morötesi ışık (UV) altında incelenerek genomik DNA'nın kalitesi analiz edildi.

Tablo 3.2. Agaroz Jel Elektroforezinde Kullanılan Tampon ve Solüsyonu

TAMPON/SOLÜSYON ADI	İÇERİK	SON KONSANTRASYON
5X TBE Tamponu pH=8.0	Tris baz	445 mM
	EDTA	10 mM
	Borik asit	445mM
Elektroforez Yükleme Solüsyonu	Bromofenol mavisi	2.5 mg/ml
	%10 SDS	%1 (w/v)
	Gliserol	% 87 (v/v)

3.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

Mutasyon analizleri için, genin bu değişimleri kapsayan 7, 10+11 (aradaki intron ile birlikte), 12, 13+14. (aradaki intron ile birlikte) eksonları uygun primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı.

3.2.3.1. Primerler ve Enzimler

ADAMTS-13 geninin 7., 10+11., 12. ve 13+14. eksonlarının PZR yöntemi ile çoğaltılması sırasında kullanılacak olan özgün primerler ile mutasyonların saptanmasında kullanılacak uygun restriksiyon enzimleri, “CLC Bio 3.0” yazılımıyla belirlendi (Tablo 3.3.). Programın, çoğaltılmak istenen bölgelere en uygun önerdiği primerler nedeniyle 10 ve 11. ekson gibi , 13 ve 14. eksonlar da birlikte çoğaltıldı.

Tablo 3.3. ADAMTS-13 eksonlarına özgün primer baz dizileri ve restriksiyon endonükleaz enzimleri

Ekson No, Primer Adı	Primer Dizisi	Çoğaltılan Gen Bölgesi (bç)	Primerin Baz Sayısı	Enzim
7, R268P 1	5 ¹ GGGTCGACCCGGGTCGGA AAA3 ¹	382	21	-
7, R268P 2	5 ¹ AGAGAGAGGTGGCGCTGG CGG3 ¹	382	21	-
10+11, C365del 1	5 ¹ GGGATCCCTATGGGTGAG TT3 ¹	561	20	Alw21I
10+11 ,C365del 2	5 ¹ CCTGGTGTGAACCACAGA TG 3 ¹	561	20	Alw21I
12,Q449stop1	5 ¹ GTGCCATGTAGTCTCCCA GTGACAACACC3 ¹	327	29	FspBI
12,Q449stop2	5 ¹ CCAGAGCCTGAACCACTT TGCCC AGTGC3 ¹	327	28	FspBI
12, P475S 1	5 ¹ GTGCCATGTAGTCTCCCA GTGAC AACACC3 ¹	327	29	Eco130I
12, P475S 2	5 ¹ CCAGAGCCTGAACCACTT TGCCCAGTGC3 ¹	327	28	Eco130I
13+14, C508Y 1	5 ¹ CCCAGATGCAAAGGATGA AG3 ¹	839	20	-
13+14, C508Y 2	5 ¹ ATCCAGGGCTGAGTGAGT GT3 ¹	839	20	-

3.2.3.2. DNA Polimeraz Enzimi ve Tamponu

PZR tamponu olarak $MgCl_2$ içermeyen 500 mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH 8.8) ve % 0.8 Nonidet P-40 içeren 10X tampon ve Taq DNA polimeraz enzimi (5U/ μ l) kullanıldı. (Fermentas Life Sciences, Roche expand long tamplate PCR system)

3.2.3.3. PZR Karışımları

Tüm PZR deneyleri, ince çeperli 0.2 ml hacimli polistiren tüpler içinde ABI 2720 PZR cihazı (Applied Biosystems) kullanılarak gerçekleştirildi.

Eksonların çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımları Tablo 3.4., 3.5. ve 3.6.'da verildi.

Tablo 3.4. Ekson 10+11'in çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı

PZR BİLEŞENLERİ	μ l/TÜP	SON KONSANTRASYON
Steril ultra saf su	16.7	-
10X PZR tamponu	2.0	1X
$MgCl_2$ (25mM)	1.0	0.25 mM
dNTP karışımı (25mM)	1.5	1.5 mM
Primer 1 (10 pmol/ μ l)	0.8	0.8 pmol
Primer 2 (10 pmol/ μ l)	0.8	0.8pmol
Taq DNA polimeraz (5U/ μ l)	0.2	1U
DNA	2	-
Toplam hacim	25	

Tablo 3.5. Ekson 12'nin çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı

PZR BİLEŞENLERİ	$\mu\text{l}/\text{TÜP}$	SON KONSANTRASYON
Steril ultra saf su	16.7	-
10X PZR tamponu	2.0	1X
MgCl ₂ (25mM)	1.0	0.25 mM
dNTP karışımı (25mM)	1.5	1.5 mM
Primer 1 (10 pmol/ μl)	0.8	0.8 pmol
Primer 2 (10 pmol/ μl)	0.8	0.8pmol
Taq DNA polimeraz (5U/ μl)	0.2	1U
DNA	2	-
Toplam hacim	25	

Tablo 3.6. Ekson 13+14'ün çoğaltılmasında kullanılan PZR karışımı

PZR BİLEŞENLERİ	$\mu\text{l}/\text{TÜP}$	SON KONSANTRASYON
Steril ultra saf su	16.5	-
10X PZR tamponu	2.5	1X
MgCl ₂ (25mM)	1.0	0.25 mM
dNTP karışımı (25mM)	1.2	1.2 mM
Primer 1 (10 pmol/ μl)	0.8	0.8 pmol
Primer 2 (10 pmol/ μl)	0.8	0.8pmol
Taq DNA polimeraz (5U/ μl)	0.2	1U
DNA	2	-
Toplam hacim	25	

3.2.3.4. PZR Programları

Tablo 3.7.'de 10+11 ve 13+14. eksonların çoğaltılmasında kullanılan PZR programı, Tablo 3.8.'de ise 12. eksonun çoğaltılmasında kullanılan PZR programı gösterilmektedir.

Tablo 3.7. 10+11 ve 13+14. eksonların çoğaltılmasında kullanılan PZR programı

Program Türü	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	3 dk	-
Denatürasyon	95	40 sn	35
Bağlanma	57	45 sn	
Uzama	72	40 sn	
Son Uzatma	72	2 dk	-

Tablo 3.8. Onikinci eksonun çoğaltılmasında kullanılan PZR programı

Program Türü	Sıcaklık (°C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	5 dk	-
Denatürasyon	95	40 sn	35
Bağlanma	65	45 sn	
Uzama	72	45 sn	
Son Uzatma	72	5 dk	-

3.2.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez yürütme tamponu olarak hazırlanan 5X TBE stok, dH₂O ile 1/10 oranında sulandırıldı. Hazırlanan %2.5 (w/v)'luk agaroz jele, 5-6 µl PZR ürünü, 2-3 µl yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi ve 120V'da 20 dakika yürütüldükten sonra jel, UV ışık altında incelenerek ADAMTS-13 geninin C365del, Q449stop, P475S ve C508Y mutasyon noktalarını içeren DNA birimlerinin çoğaltılıp çoğaltılmadığı incelendi.

3.2.3.6. Restriksiyon Enzim Kesimi Analizi (REKA)

PZR sonucunda, mutasyon bölgelerinin restriksiyon enzim kesimi analizinde, çalışılan bölgelerin içinde kesim noktası olduğu bilinen enzimler kullanıldı. 10. Eksondaki C365del mutasyonunu incelemek amacı ile Alw21I restriksiyon endonükleaz enzimi, 12. eksondaki Q449stop mutasyonu için FspBI ve aynı eksondaki P475S mutasyonu için ise Eco130I restriksiyon endonükleaz enzimi kullanıldı. Kullanılan restriksiyon endonükleaz enzimleri için uygulanan enzim kesimi koşulları Tablo 3.9., 3.10. ve 3.11.'de verilmektedir. Örnekler bu koşullarda 4 saat süre ile inkübe edildi.

Tablo 3.9. C365del mutasyon tayini için gerçekleştirilen enzim kesimi koşulu

İÇERİK	MİKTAR
PZR ürünü	9 µl
Alw21I A A 5'-G T G C T [^] C-3' 3'-C [^] A C G A G-5' T T	0.5 µl (10U/ µl)
10X Tampon 0 (Fermentas)	2 µl
Distile su	8.5 µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 3.10. Q449stop kodonu mutasyon tayini için gerçekleştirilen enzim kesimi koşulu

İÇERİK	MİKTAR
PZR ürünü	9 µl
FspBI 5'-C [^] T A G-3' 3'-G A T [^] C-5'	0.5 µl (10U/ µl)
10X Tampon 0 (Fermentas)	2 µl
Distile su	8.5 µl
Toplam hacim	20 µl

Tablo 3.11. P475S mutasyon tayini için gerçekleştirilen enzim kesimi koşulu

İÇERİK	MİKTAR
PZR ürünü	9 µl
Eco130I A A 5'-C^C T T G G-3' 3'-G G A A C^C-5' T T	0.5 µl (10U/ µl)
10X Tampon 0 (Fermentas)	2 µl
Distile su	8.5 µl
Toplam hacim	20 µl

3.2.4. DNA Dizi Analizi

“Sanger’in dideoksi yöntemi” temeli ile çalışan bir cihaz ile (Applied Biosystems ABI 310 Genetic Analyzer) çalışılarak dizileme ile 13. eksondaki C508Y mutasyon tayini gerçekleştirildi. İlk olarak, incelenmesi istenen hedef bölge (ekson13+14) Tablo 3.6.’daki PZR programı kullanılarak çoğaltıldı. PZR’de çoğaltımın gerçekleşip gerçekleşmediği ürünün 5 µl’si %2.5 (w/v)’luk agaroz jele yüklenerek kontrol edildi. Sonrasında, 4 basamaktan oluşan DNA dizileme işlemi gerçekleştirildi.

3.2.4.1. Saflaştırma Aşaması

Elde edilen PZR ürünleri kolon temelli çalışan bir kit ile (Invisorb, Spin PZRRapid) saflaştırıldı. PZR ürünü üzerine 130 µl P tamponu eklenip, içerik filtrelili tüpe aktarıldı. 10.000 rpm’de 30 saniye santrifüjlendi. Kolonlar temiz alt tüplere aktarılıp üzerlerine 700 µl yıkama tamponu eklenip 10.000 rpm’de 30 saniye santrifüjlendi. Kolonlar tekrar temiz alt tüplere aktarılıp 3 dakika boyunca en yüksek hızda santrifüjlendi. Son olarak kolonlar 1.5 ml’lik mikrosantrifüj tüplerine oturtulup üzerlerine çözücü tampon solüsyonundan 30 µl eklenip oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. 10.000 rpm’de 1 dakika santrifüjlenip, solüsyonun mikrosantrifüj tüpüne aktarımı sağlandı. Saflaştırılan örnekler %2 (w/v)’lik agaroz jelde kontrol edildi. Jelde görünmeyen ürünler için yeniden PZR uygulandı.

3.2.4.2. Döngü Dizileme (Cycle Sequencing)

Saflaştırılan örnekler aynı gün içinde döngü dizileme işlemine tabi tutuldu. Döngü dizileme protokolü, kitin (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied

Biosystems) içindeki hazır bulunan ve floresans işaretli 4 farklı dideoksi nükleotitleri de içeren “hazır reaksiyon karışımı” kullanılarak PZR cihazı ile aşağıda belirtilen protokole göre gerçekleştirildi.

Hazır reaksiyon karışımı: 8 µl
Primer (3.2 pmol) : 4 µl
DNA örneği : 2-5 µl
dH₂O : 3-6 µl
Toplam hacim : 20 µl

Döngü dizilemede, PZR aşamasında kullanılmış olan ileri ve geri primerler ayrı ayrı kullanılarak dizileme karışımı hazırlandı ve aşağıda belirtilen program uygulandı.

96 °C’de 10 saniye
50 °C’de 5 saniye 25 döngü
60 °C’de 4 dakika
4 °C’de sınırsız

3.2.4.3. NaAc İle Saflaştırma

Döngü dizileme sonrasında, ürünleri artıklardan temizlemek için yeniden bir saflaştırma işlemi gerçekleştirildi. PZR ürünü üzerine 2 µl mM pH 4.6 olan NaAc eklendi. Üzerine 50 µl % 95 (v/v)’lik etil alkol eklendi. Karışım, 1.5 ml’lik tüplere aktarılıp hafifçe el ile vurularak karıştırılıp buz üzerinde 15 dakika inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 13.000 rpm hızda 20 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı pipet ile çekilip üzerine % 70 (v/v)’lik etil alkolden 250 µl eklenip yine el ile hafifçe karıştırıldı. 13.000 rpm’de 5 dakika santrifüjlendikten sonra üst sıvı tamamen atılıp, örnekler kurumaya bırakıldı. Kurutma işlemi oda ısısında gerçekleştirildi. Liyofilize hale gelen DNA örnekleri ya hemen cihaza (ABI Prism 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems) yüklendi ya da daha sonra analiz edilecekler ise -20 °C’de 1 hafta süre ile saklandı.

3.2.4.4. *Dizileme Cihazına Yükleme*

Liyofilize durumdaki DNA örneklerine 20 µl formamid eklenerek çalkalandı. Örnekler 95 °C'de 5 dakika süre ile denatüre edilip hemen buz üzerine alındı. 1-2 dakika buz üzerinde bekletilen örnekler cihaza ait örnek tüplerine sıra ile pipetlendi. Cihaz ile ilgili gerekli kontroller yapıldıktan sonra, çalıştırılıp bir süre beklenerek örneklerin kapiller boru içine girip girmediği gözlemlendi.

3.2.5. ADAMTS-13 Geninin Anlatım Düzeyinin Belirlenmesi

3.2.5.1. *Total RNA İzolasyonu*

Total RNA izolasyonu, periferik kandan izolasyon yapılmasına olanak sağlayan özel filtre tüplerini içeren ve DNaz I uygulamasını da kapsayan ticari bir kit (Roche, High Pure RNA isolation kit) kullanılarak 70 kontrol bireyi ile 70 hasta (38 trombozlu, 32 trombozsuz) birey için gerçekleştirildi. Periferik kandan eritrosit parçalama tamponu ya da fikol solüsyonu kullanarak lökositler ayrılıp, 1.5 ml'lik bir santrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 400 µl bağlanma tamponu eklenip çalkalamalı karıştırıcıda 15 saniye karıştırıldı. Karışım, toplama tüpünün içine oturtulmuş olan filtreli tüpe aktarıldıktan sonra, oda sıcaklığında 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Filtreden toplama tüpüne geçen sıvı atılıp, filtreli tüpe 90 µl DNaz I inkübasyon tamponu ve 10 µl DNazI içeren karışım eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra filtreli tüpe 500 µl Yıkama Tamponu-I eklenip 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldıktan sonra, filtreli tüpe 500 µl Yıkama Tamponu-II eklendi ve 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Toplama tüpüne geçen sıvı atıldıktan sonra filtreli tüpe 250 µl Yıkama Tamponu-II eklenip 13.000 dev./dak. hızda 4 dakika santrifüjlendi. Filtreli tüp, 1.5 ml'lik boş bir santrifüj tüpünün içine oturtulduktan sonra 50 µl çözücü tampon eklenip ve 10.000 dev./dak. hızda 1 dakika santrifüjlendi. Santrifüj tüpüne geçen ve total RNA çözeltisini içeren yaklaşık 25-30 µl sıvı -70 °C'de saklandı.

3.2.5.2. *Formaldehit Agaroz Jel Elektroforezi*

RNA moleküllerinin kalitesi denatüre edici ortamda, formaldehit ile hazırlanmış %1 (w/v)'lik agaroz jelde kontrol edildi. 0.5g agaroz 36 ml distile su içinde ısıtılarak çözüldürüldü. Çözelti 60 °C'ye soğutulduktan sonra, yürütme tamponu olan MOPS

(Morfolinopropan sülfonikası)'dan 5 ml ve %37'lik formaldehitden 9 ml eklendi. Son olarak etidyum bromür eklendi. 75 °C'de 10 dakika ısıtılıp buz üzerine alınan total RNA örnekleri, jel katılaştıktan sonra kuyucuklara yüklendi. 28 ve 18S rRNA'lar yoğunluklarından dolayı, tipik iki bant olarak görüldü.

10X MOPS hazırlanışı:

0.4 M MOPS, pH 7.0

0.1 M sodyum asetat

0.01 M EDTA

3.2.5.3. cDNA Sentezi

Total RNA örneklerinden cDNA elde etmek için ticari bir kit (Fermentas, RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit) kullanıldı ve işlemler, üretici firmanın önerdiği şekilde gerçekleştirildi. 20 µl'lik sentez reaksiyonu için eklenen bileşenler, miktarları ve hazırlanma şekli Tablo 3.12.'de verildi.

Tablo 3.12. cDNA sentezi için kullanılan bileşenler

Nükleazsız DEPC'li steril su	Reaksiyon hacmi 20 µl'ye tamamlandı
Oligo-dT primer 100µM	1 µl
Total RNA	1 µg
0,5 ml'lik PZR tüpünde karıştırıldıktan sonra 70 °C'de 5 dakika bekletildi ve tüpler hemen buza alındı. Karışımın üzerine aşağıda belirtilen maddeler eklendi.	
Reaksiyon tamponu 10mM	4 µl
dNTP karışımı	1 µl
Ribonükleaz inhibitörü (20U/µl)	1 µl
Pipet ile karıştırılıp 37 °C'de 5 dakika bekletildi. Karışımın üzerine 1 µl M-MuLV ters transkriptaz (20U/µl) eklendi ve 42°C'de 1 saat bekletildi. Ardından 70 °C'de 10 dakika bekletilerek reaksiyon sonlandırıldı. Buzda soğutulan örnekler -20 °C'de saklandı.	

Elde edilen cDNA örneklerinden 5'er µl alınıp % 1.5 (w/v)'luk agaroz jelde cDNA'ların varlığı ve kalitesi kontrol edildi (Şekil 4.9.).

3.2.5.4. ADAMTS-13 Geni İçin Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Hedef gen olan ADAMTS-13 geninin periferik kandaki anlatım düzeyini belirlemek için ADAMTS-13 cDNA'sına özgün primerler (AGTACAGAGTGGCCCTCACC ve CCATACCGCCTGTAAACCTG) ve FAM (6-karboksifloresein) işaretli prob, "Probe Finder 2.36" yazılımı ile tasarlandı (NM_139025.2) ve sentezletirildi. Referans gen Hipoksantin fosforiboziltransferaz 1 (HPRT1) için de primer ve prob tasarlanıp (NM_000194.1) sentezletirildi. Tablo 3.13.'de belirtilen PZR bileşenleri ile hazırlanan 20 µl'lik reaksiyon karışımına Tablo 3.14'de verilen çoğaltım programı "LightCycler 1.5" (Roche) cihazı kullanılarak uygulandı.

Tablo 3.13. Gerçek Zamanlı PZR için PZR Bileşenleri

PZR Bileşenleri	µl/Tüp
Nükleazsız steril distile su	10.3 µl
10X Taq tamponu	2 µl
dNTP karışımı (25mM)	1 µl
ADAMTS-13F primer (10pmol/µl)	1 µl
ADAMTS-13R primer (10pmol/µl)	1 µl
ADAMTS-13 prob (15pmol/ µl)	1 µl
MgCl ₂ (25mM)	1.5 µl
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0.2 µl
cDNA	2 µl
Toplam Hacim	20 µl

Tablo 3.14. ADAMTS-13 transkript varlığının belirlenmesinde kullanılan Gerçek Zamanlı PZR programı

Program Türü	Sıcaklık (⁰ C)	Zaman	Döngü Sayısı
İlk denatürasyon	95	5 dk	-
Denatürasyon	95	10 sn	45
Bağlanma	55	30 sn	
Uzama	72	2 sn	

Her deneyde, yaklaşık miktarları önceden bilinen kontrol cDNA'ları da kullanılarak PZR verimi hesaplandı. Hedef ve referans gene (HPRT1) ait çoğaltılan cDNA'ların miktar değerlendirilmesi yapıldı (Şekil 4.10.-4.13.) farklılık oranları nicel olarak ortaya koyuldu.

3.2.6. ADAMTS-13 Enziminin Plazma Aktivitesi ve Miktarının Saptanması

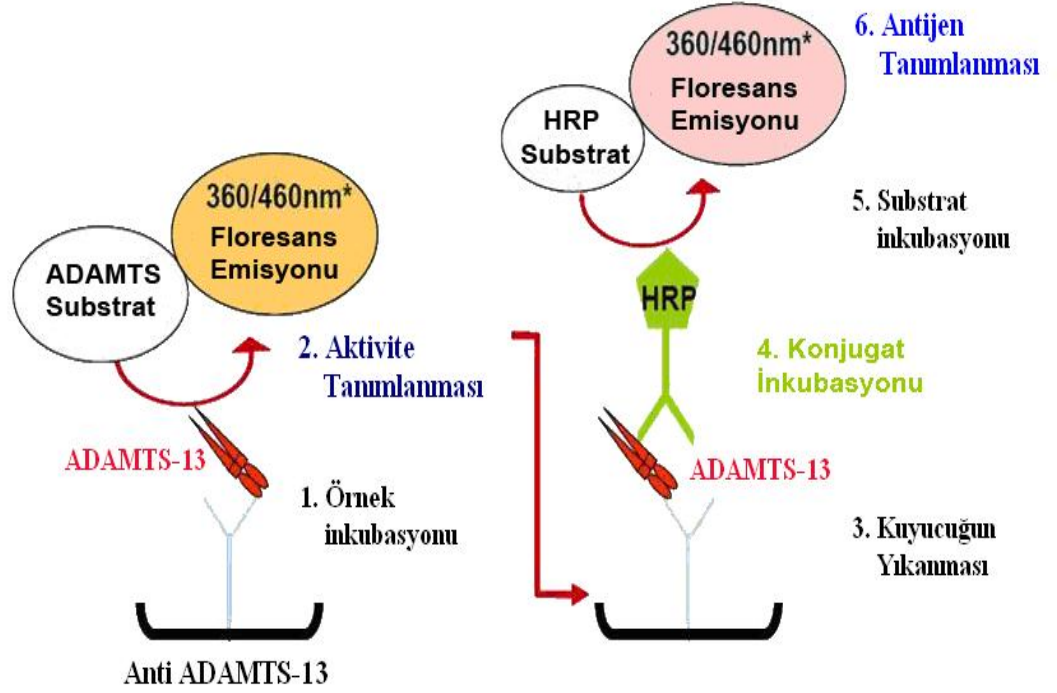
3.2.6.1. Aktivite Tayini

DNA ve RNA izolasyonu yapılan 70 kontrol ve 70 hasta (37 trombozlu, 33 trombozsuz) bireyden plazma örneği ayrılıp, analiz zamanına dek -70°C'de saklandı. Aktivite ve miktar tayini için floresans rezonans elektron transferi (FRET) ve ELISA temelli çalışan bir kit (Technozym ADAMTS-13 ELISA, Technoclon, Austria) kullanıldı. CUB domenine spesifik olan monoklonal Anti-ADAMTS-13 ile kaplanmış yüzeye 50 µl plazma örneği eklendikten sonra 2 saat süre ile karanlık ortamda inkübe edildi. Bu süre içinde plazmadaki ADAMTS-13, anti ADAMTS-13'e bağlandı (Şekil 3.1.). Kuyucuklar 3 kez 200 µl yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra aktivite substratı olarak kuyucuğa 50 µl floresans işaretli rekombinant vWF eklendi. Rekombinant vWF'ün kesimi sonucunda florokrom maddelerin birbirinden ayrılması ile floresans miktarında artış meydana geldi. 30°C'de spektrofloreometrede (Bio-tek, Flx 800) dakikada 1 ölçüm olmak üzere toplam 15 dakika boyunca 360 nm ve 460 nm dalga boyunda eksitasyon ve emisyon değerlerindeki değişimler kinetik okuma ile izlendi. "KC Junior" yazılımı ile her örnek için değişken floresans miktarı belirlendi. Elde edilen bu 15 farklı değer, Technoclon firmasından satın alınan "Technozym ADAMTS-13" yazılımına aktarılarak

her örneğin görelî floresans miktarı hesaplatıldı. Kit içeriğinde bulunan aktivite ve miktarı önceden tanımlanmış olan 5 ayrı kontrol örneği için de aynı şekilde elde edilen bu floresans miktarları ve aktivite değerleri ile bir X-Y dağılım grafiğı (standart grafik) oluşturuldu. Grafikteki formülasyona göre, her örnek için floresans değeri yazılarak aktivite yüzdesi hesaplandı.

3.2.6.2. *Miktar Tayini*

Açığa çıkan floresans miktarı kinetik biçimde ölçülen plazma örnekleri 3 kez 200 µl yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 50 µl streptavidin-yabanturpu peroksidazının (HRP) bağı olduğı, biotinillenmiş tavşan anti-insan ADAMTS-13 antikoru (Conjugate working solution) kuyucuğa eklendi ve 60 dakika inkübasyon zamanı süresince, zeminde yakalanmış olan ADAMTS-13'e bağılandı. Kuyucuklar 3 kez 200 µl yıkama tamponu ile yıkandı. Kuyucuklara substrat olarak 50 µl perborat tetrametilbenzidinin (TMB) eklenip 15 dakika 30 °C'de inkübasyona bırakıldı. Kuyucuklara 50 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu. HRP ile tepkime sonucu oluşan mavi rengin 360/460nm'de absorpsiyon değeri ölçülerek standart eğriye göre yorumlanıp miktar değerleri saptandı.



Şekil 3.1. ADAMTS-13 enziminin plazmadaki aktivite ve miktarının ölçümünü gösteren özet.

3.2.7. İstatistik Analizler

Elde edilen verilerin karşılaştırılması için ticari bir istatistik yazılım programı olan Graphpad Prism Version 5.0 kullanıldı. Elde edilen "p" değeri 0.05'den küçük ise istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

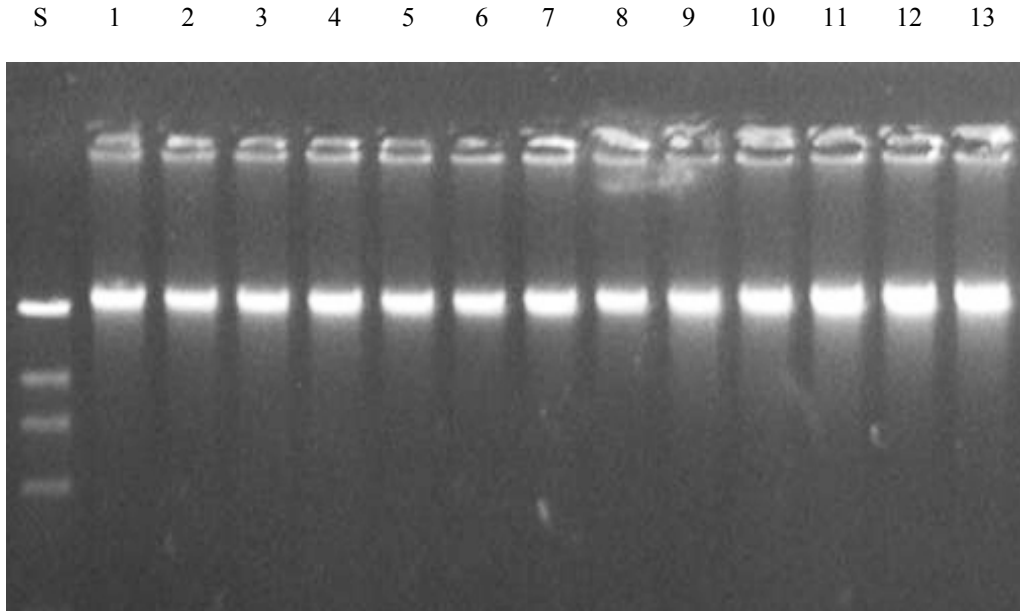
4. BULGULAR

4.1. GENOMİK DNA İZOLASYONU

Genomik DNA izolasyonu, 70 PAFS hastasına ve 70 sağlıklı kontrolden oluşan kontrol grubuna ait periferik kan örneklerinden Malzeme ve Yöntem bölümünde 3.2.1. 'de belirtilen yönteme göre yapıldı.

4.1.1. DNA'nın Kalitatif Tayini

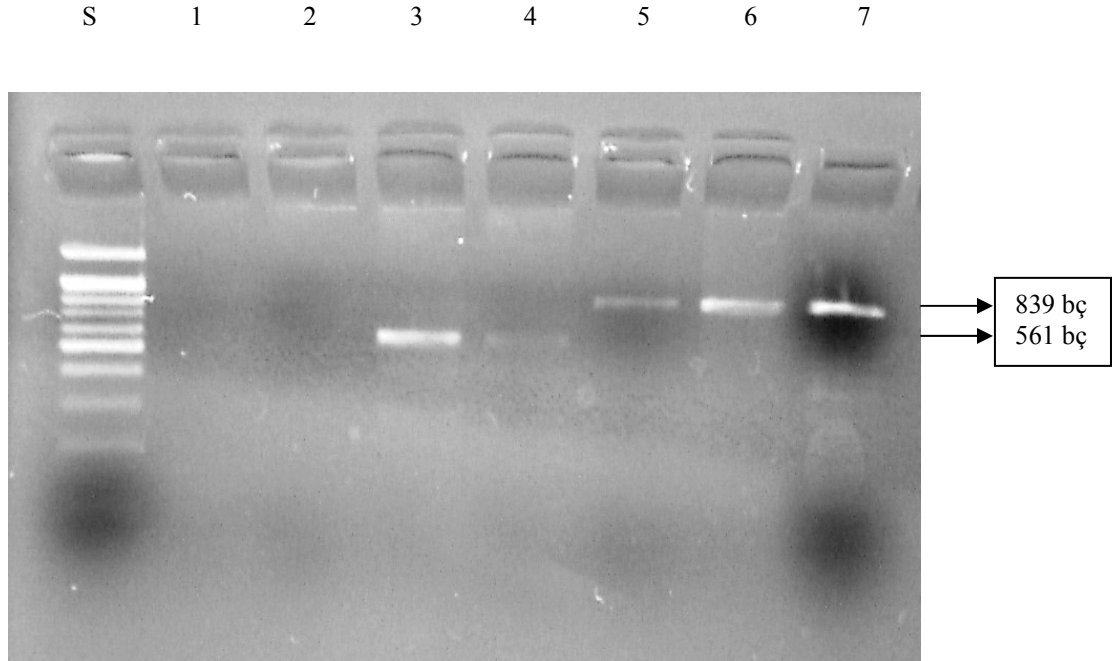
İzole edilen genomik DNA'lar %1.5 (w/v)'luk agaroz jel elektroforezinde analiz edildi. Genomik DNA'lara ait bantlar UV ışık altında parlak, net ve keskin tekli bantlar halinde gözlemlendi (Şekil 4.1.).



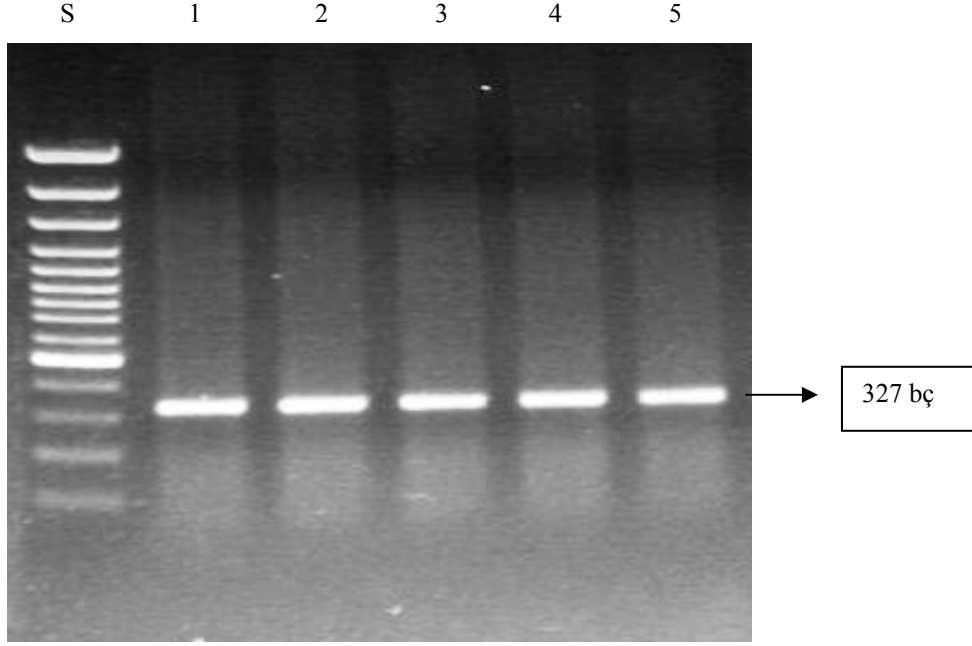
Şekil 4.1. Genomik DNA'ların %1.5 (w/v)'luk agaroz jeldeki görüntüleri. S: Lambda HindIII DNA standardı (yukarıdan sıra ile 23130, 9416, 6557 ve 4361 bp) 1-13 : hasta bireylere ait genomik DNA'lar.

4.2. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU ANALİZLERİ

ADAMTS-13 geninin restriksiyon enzim kesimi analizi yapılacak olan C365del mutasyonu için ekson 10+11 (561bç), Q449stop ve P475S mutasyon noktalarını içeren ekson 12 (327bç) ve C508Y mutasyon noktasını içeren ekson 13+14 (839 bç) Malzeme ve Yöntem bölümü 3.2.3.'de belirtilen PZR yöntemi ile çoğaltıldı ve %2.5 (w/v)'luk agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Ekson 10+11 ve 13+14'e ait agaroz jel görüntüsü Şekil 4.2.'de, ekson 12'ye ait agaroz jel görüntüsü ise Şekil 4.3'de verildi. Yedinci eksonun PZR ile çoğaltılması işlemi, çok sayıda örnek ile denenmesine karşın gerçekleştirilemedi. Farklı primerler kullanılarak farklı PZR karışımları, bağlanma ısıları, PZR yöntemleri ve farklı DNA polimeraz türleri denendi, fakat olumlu sonuç alınamadı.



Şekil 4.2. ADAMTS-13 geninin 10+11 ve 13+14. eksonlarına ait PZR ürünlerinin % 2,5 (w/v)'luk agaroz jel görüntüsü. S: 100 bç'lik DNA standartı. (1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bç) 1,2: Negatif kontrol 3,4: Kontrol bireylerine ait ekson 10+11 (561bç), 5-7: hasta bireylere ait ekson 13+14 (839bç).



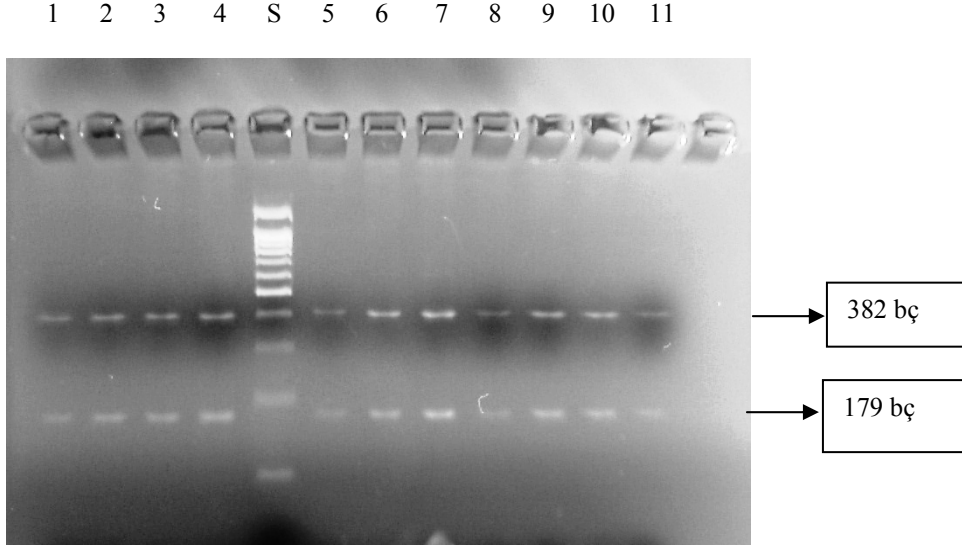
Şekil 4.3. Onikinci eksonun çoğaltılması ile oluşan PZR ürünlerinin % 2,5 (w/v)'luk agaroz jel görüntüsü. S: 100 bç'lik DNA standardı (2686, 2000, 1500, 1200,1000,900,800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bç). 1-5: kontrol bireyelerine ait ekson 12 (327bç).

4.3. RESTRİKSİYON ENZİM KESİMİ ANALİZİ (REKA)

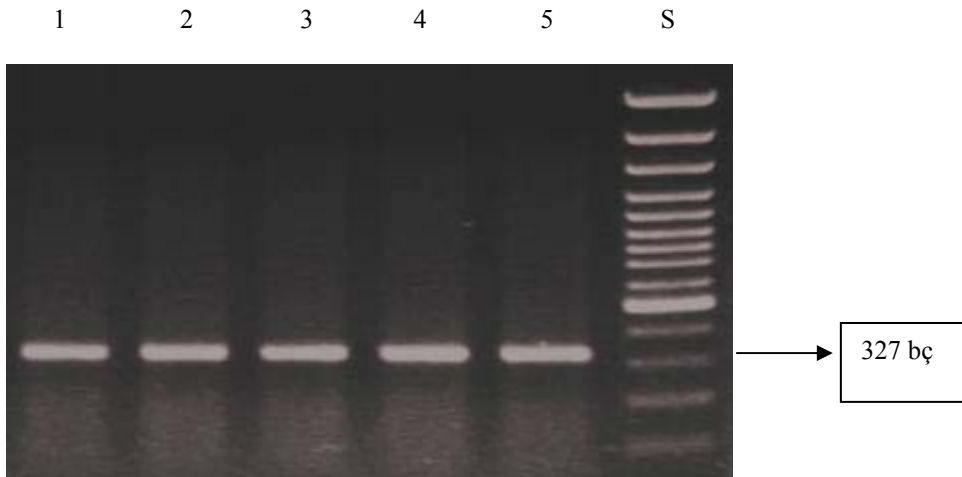
ADAMTS-13 geninin 10+11. eksonlarını içeren 561 bç'lik bölgesi Malzeme ve Yöntem Bölümü 3.2.3.6.'da belirtilen REKA yöntemi uygulanarak %2.5 (w/v)'luk agaroz jel elektroforezi ile incelendi.

ADAMTS-13 geninin C365del mutasyonunun incelendiği, PZR ürününün Alw21I restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak 37 °C'de 4 saat inkübasyonu ile kesimi sonucu, enzim mutasyona sahip olmayan bireylere ait PZR ürünlerini tek noktadan kesti. Beklendiği gibi, enzim kesimi ürünleri 382 ve 179 bç'lik DNA parçaları şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.4.).

Q449stop kodonu mutasyonunun incelendiği, PZR ürününün FspBI restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak 37 °C'de 4 saat inkübasyonu ile kesimi sonucu, enzim mutasyona sahip olmayan bireylere ait PZR ürünlerini kesmedi ve normal tip bireylerde DNA parçalarının boylarının 327 bç olarak kaldığı gözlemlendi (Şekil 4.5.).

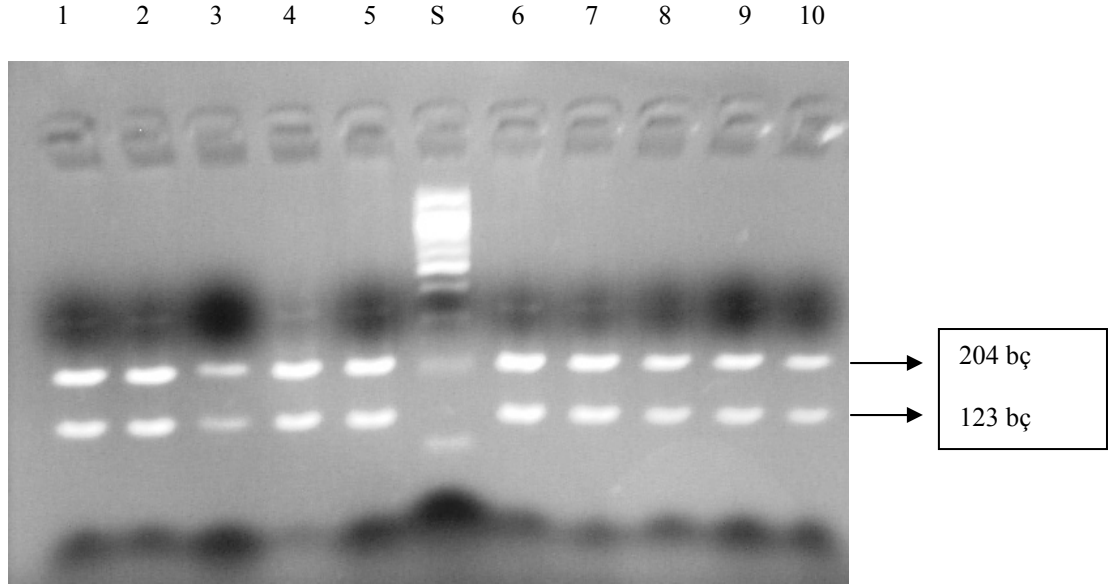


Şekil 4.4. 10+11 eksonların PZR ile çoğaltılması sonrasında Alw21I enzimi ile kesim ürünlerinin % 2,5 (w/v)'luk agaroz jel görüntüsü. 1-4: Hasta bireylere ait C365del negatif örnekler (382, 179 bç), S: 100 bç'lik DNA standardı. (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bç), 5-11: Hasta bireylere ait C365del negatif örnekler.



Şekil 4.5. Onikinci eksonun PZR ile çoğaltılması sonrasındaki FspBI enzimi ile kesim ürünlerinin % 3 (w/v)'lük agaroz jel görüntüsü. 1-3: Hasta bireylere ait, 4,5: kontrol bireylere ait Q449stop negatif örnekler (327 bç). S: 100 bç'lik DNA standardı. (2686, 2000, 1500, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bç).

P475S mutasyonunun incelendiği, PZR ürününün Eco130I restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak 37 °C'de 4 saat inkübasyonu ile kesimi sonucu enzim mutasyona sahip olmayan bireylere ait PZR ürünlerini tek noktadan kesti. Beklendiği gibi, enzim kesimi ürünleri 204 ve 123 bç'lik DNA parçaları şeklinde gözlemlendi (Şekil 4.6.).



Şekil 4.6. Onikinci eksonun PZR ile çoğaltılması sonrasında Eco130I enzimi ile kesim ürünlerinin % 3 (w/v)'lük agaroz jel görüntüsü. 1-5: Hasta bireylere ait P475S negatif örnekler (204, 123 bç), S: 100 bç'lik DNA standardı. (1500, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 ve 100 bç), 6-10: Kontrol bireyelerine ait P475S negatif örnekler.

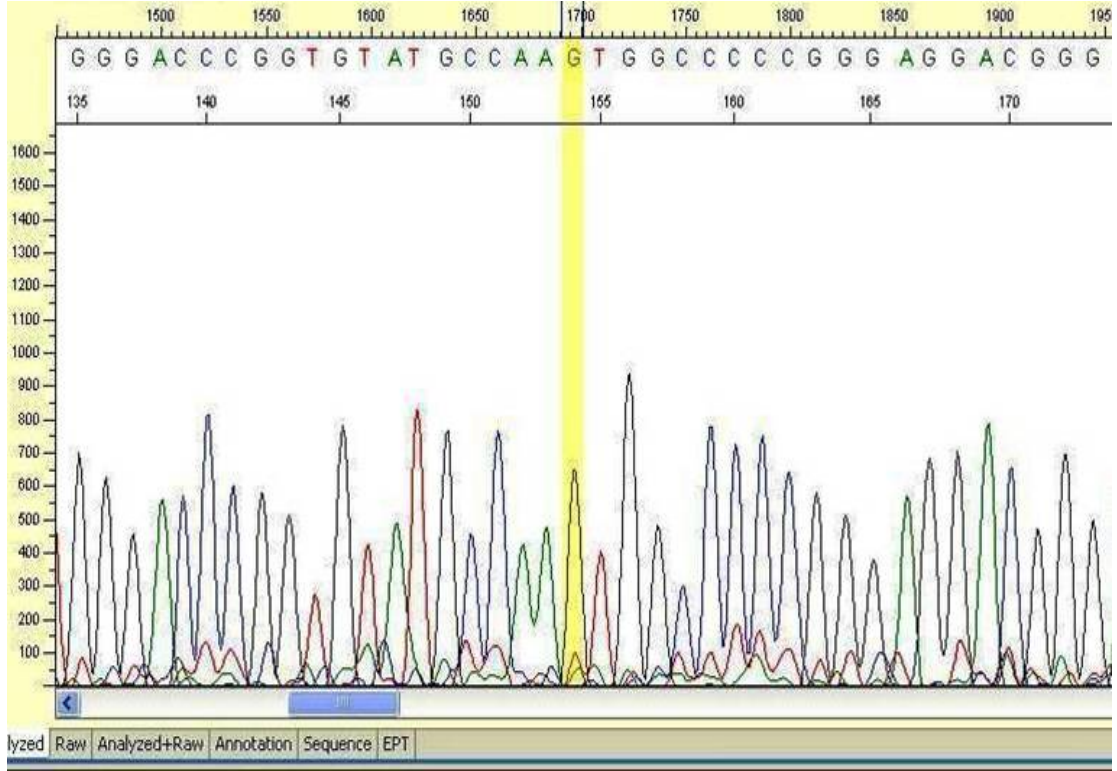
Hasta ve kontrol grubunu oluşturan bireylerin hiçbirinde C365del, Q449stop, P475S mutasyonları saptanmadı.

4.4. DNA DİZİ ANALİZİ VERİLERİ

ADAMTS-13 geninin 13+14. eksonları Malzeme ve Yöntem Bölümü 3.2.4.'de belirtilen yöntem uygulanarak doğrudan dizilenip C508Y (1523 G>A) mutasyon varlığı tarandı. Otomatik şekilde çalışan cihaz çalışmasını bitirdiğinde, kendine bağlı olan bilgisayardaki yazılımı ile her nükleotidin farklı renkte bir eğri oluşturduğu ham veriler elde edildi (Şekil 4.7.). Elde edilen bu dizilerin, insan genomunda ADAMTS-13 genine ait 13. ve 14. eksonlara ait olup olmadığı Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH)'ne

ait temel lokal dizi arama motoru (Basic Local Alignment Search Tool= BLAST) kullanılarak doğrulandı (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Dizi analizi sonucunda ne hasta grubunda ne de sağlıklı kontrol grubunda C508Y mutasyonu saptanmadı.

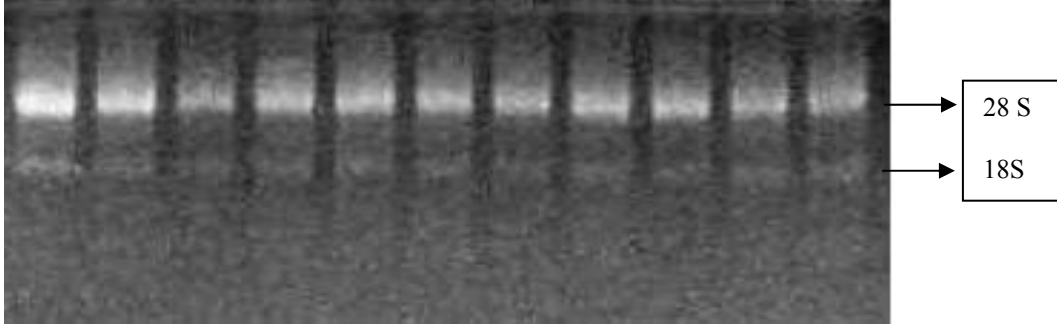


Şekil 4.7. Ekson 13+14'ün dizileme sonucu. Sarı ile işaretlenen nükleotit, mutasyonun yerini göstermektedir.

4.5. ADAMTS-13 GENİNİN ANLATIMI

4.5.1. Total RNA İzolasyonu ve Kalitatif Tayini

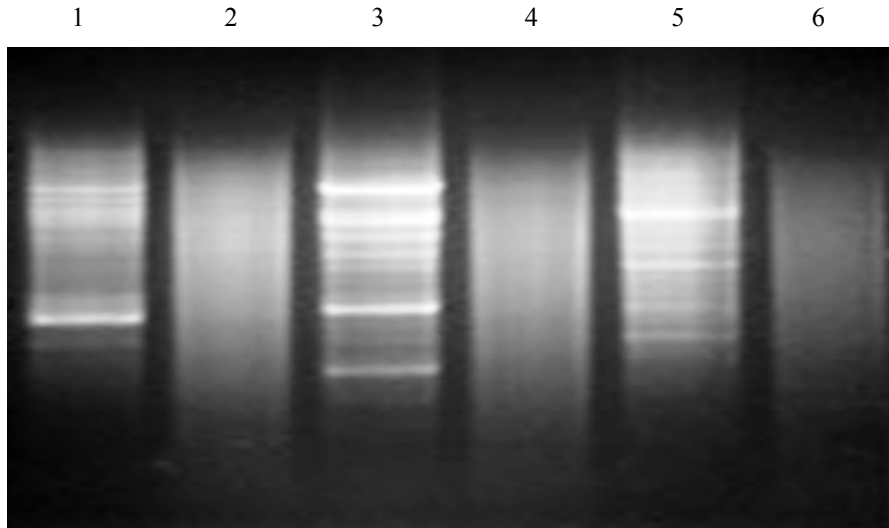
Total RNA izolasyonu, 70 PAFS hastasına ve 70 sağlıklı kontrolden oluşan kontrol grubuna ait periferik kan örneklerinden Malzeme ve Yöntem bölümünde 3.2.5.1.'de belirtilen yönteme göre gerçekleştirildi. Total RNA'nın parçalanmadan izole edilmesinin kanıtı olan 28S ve 18S'lik ribozomal RNA'lara ait bantlar formaldehit agaroz jel elektroforezinde parlak ve keskin şekilde gözlemlendi (Şekil 4.8.).



Şekil 4.8. Total RNA örnekleri. Fotoğrafta 28S ve 18S'lik rRNA'lar görülmektedir.

4.5.2. cDNA Sentezi ve Kalitatif Tayini

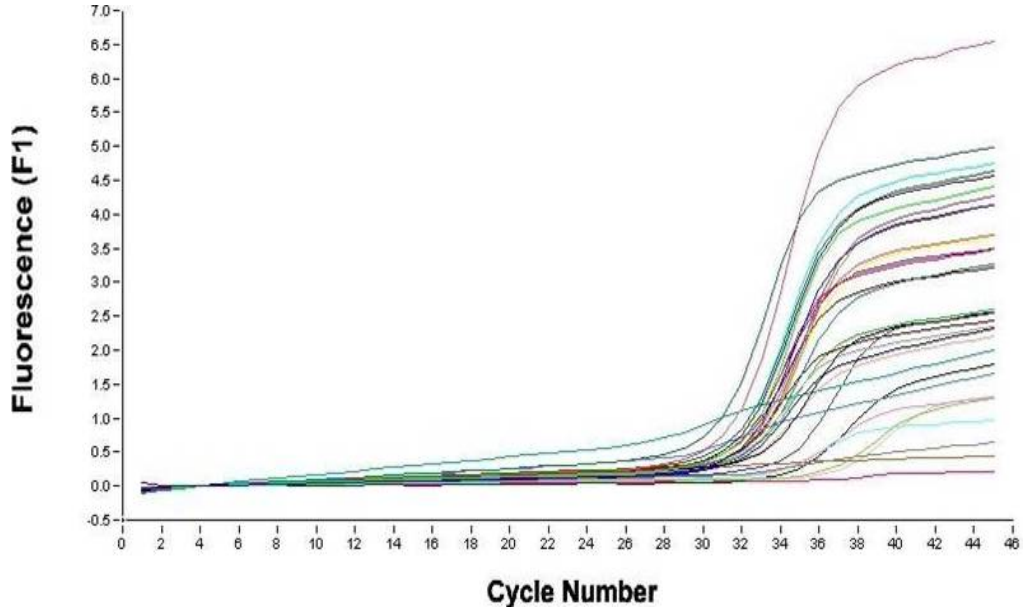
Total RNA örneklerinden cDNA sentezi, Malzeme ve Yöntem Bölümü 3.2.5.3'de belirtilen yönteme göre yapıldı. Elde edilen cDNA örneklerinden 5'er μ l alınıp %1,5 (w/v)'luk agaroz jelde analizi yapıldı. cDNA'lara ait bantlar UV ışık altında gözlemlendi (Şekil 4.9.).



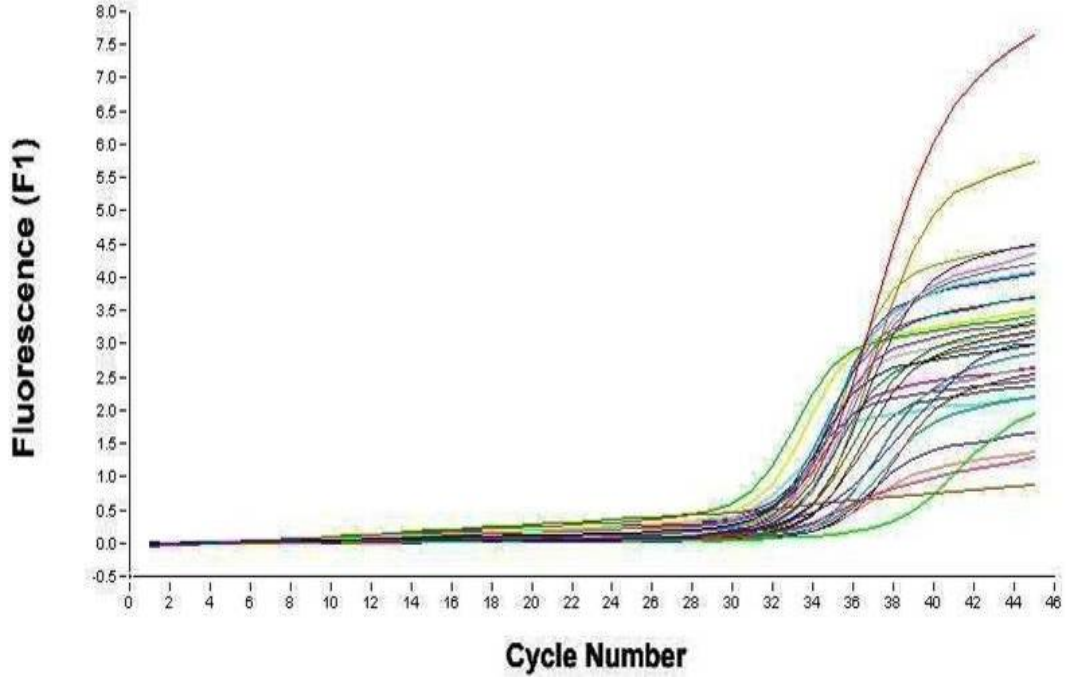
Şekil 4.9. cDNA sentezi ürünlerinin agaroz jel elektroforezindeki görünüşleri. 1-6 cDNA örnekleri.

4.5.3. Nicel Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Q RT-PCR) Analizleri

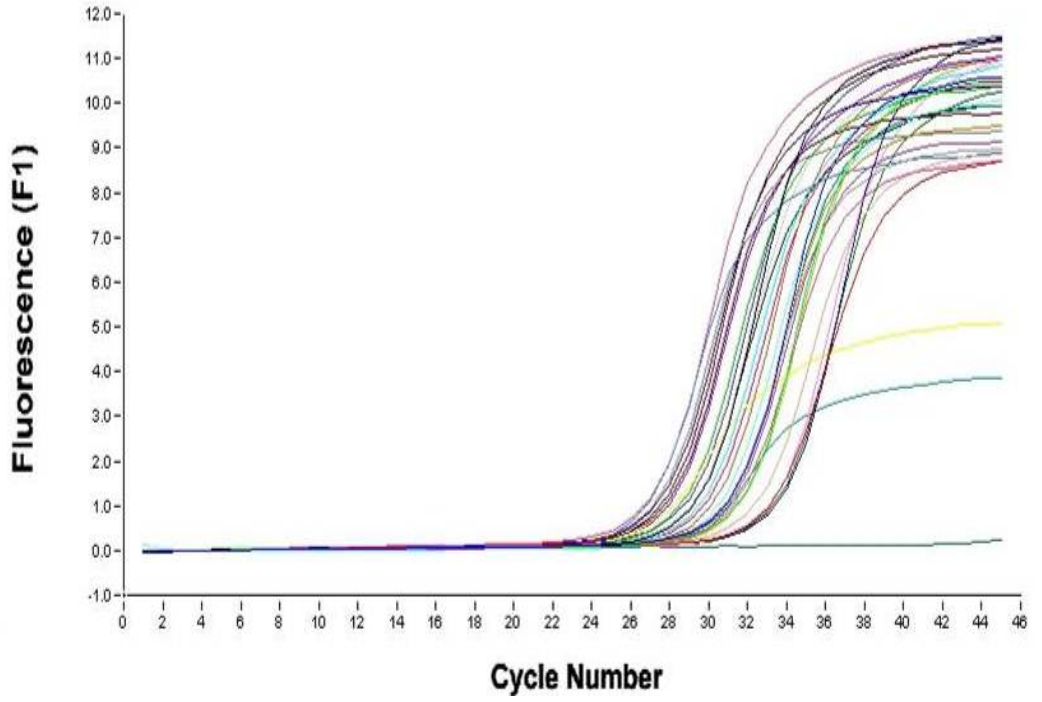
İzole edilen total RNA örneklerinden ADAMTS-13 genine ait olan mRNA'ları belirlemek için Malzeme ve Yöntem Bölümü 3.2.5.4.'de belirtildiği gibi gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirildi. Kontrol ve hasta bireylere ait hedef gen olan ADAMTS-13 ve referans gen olan HPRT1'e ait eşik değerlere göre belirlenen cDNA miktarları Şekil 4.10., 4.11., 4.12. ve 4.13.'de verildi.



Şekil 4.10. Kontrol bireylerinde ADAMTS-13 cDNA miktarları.

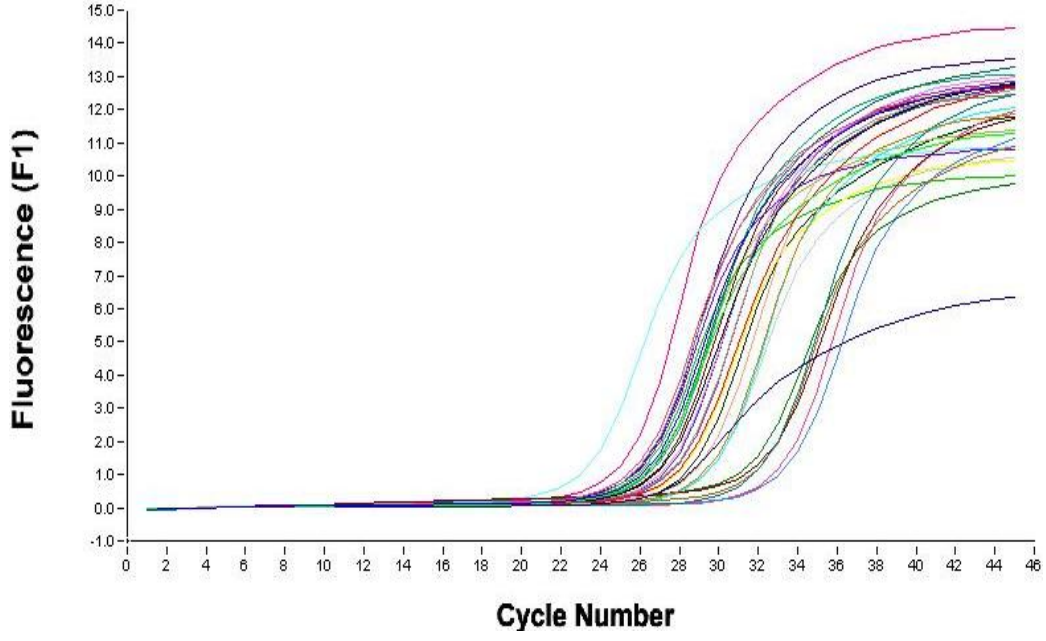


Şekil 4.11. PAFS hastalarında ADAMTS-13 cDNA miktarları.



7

Şekil 4.12. Kontrol bireylerinde referans gen HPRT1'in cDNA miktarları.



Şekil 4.13. PAFS hastalarında HPRT1'in cDNA miktarları.

Q- RT PZR sonucu elde edilen mRNA miktar verileri ile Pfaffl denklemi kullanılarak hesaplama yapıldı.

Denklem 4.1. Pfaffl denklemi.

$$\text{Oran} = \frac{(E_{\text{hedef}})^{\Delta ED_{\text{Hedef (kontrol-hasta)}}}}{(E_{\text{referans}})^{\Delta ED_{\text{referans (kontrol-hasta)}}}}$$

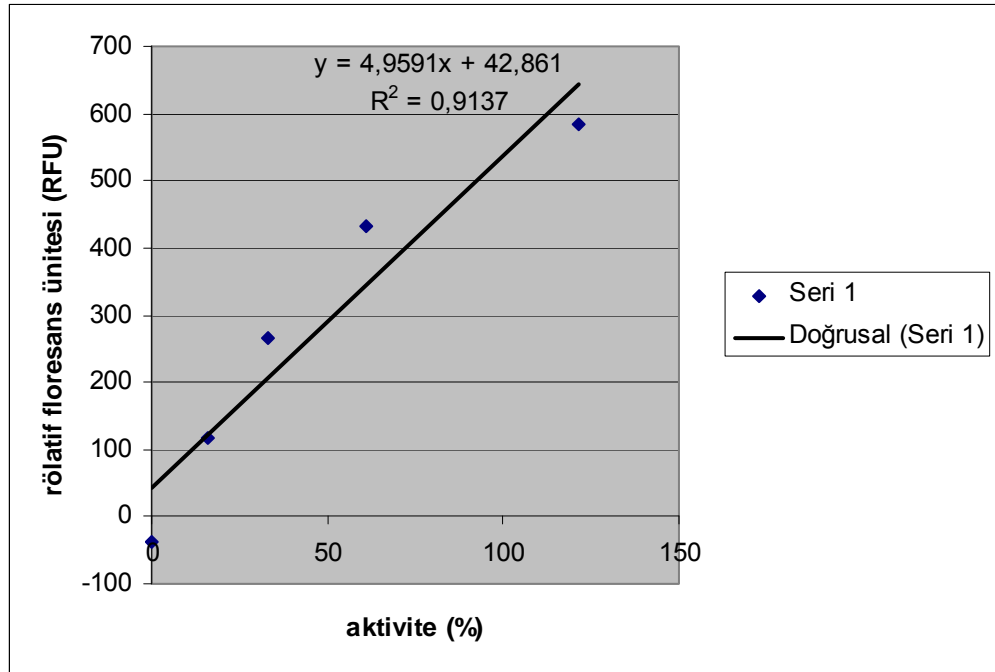
$$\text{Oran} = \frac{1,978^{-1,48}}{1,964^{-0,38}} = 0.5$$

E: PZR verimi, ED: Eşik değeri, Q- RT PZR sırasında her örneğin logaritmik faza girdiği döngü numarası.

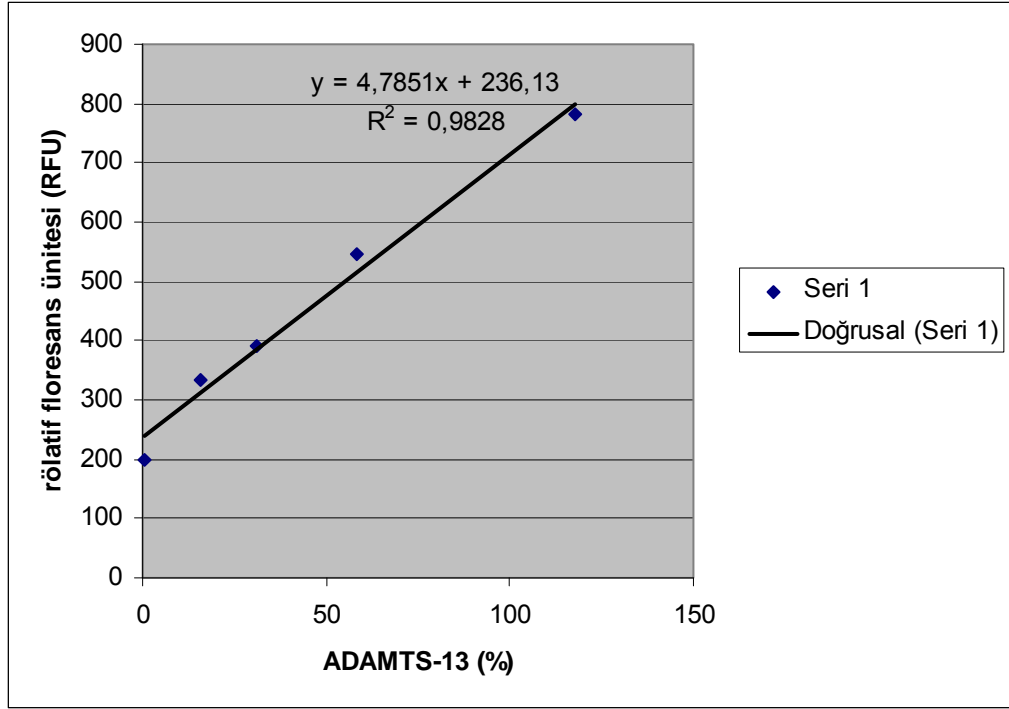
Hedef gen/ referans gen sonucu 0,5 olarak bulundu. Buna göre hedef gen olan ADAMTS-13 mRNA miktarının PAFS grubunda kontrol grubunun yarısı kadar olduğu belirlendi.

4.5.4. ADAMTS-13 Aktivitesi ve Miktar Tayini

ADAMTS-13 enziminin plazmadaki aktivitesi ve miktar tayini Malzeme ve Yöntem Bölümü 3.2.6'daki yönteme göre gerçekleştirildi. Aktivite ve miktar tayini için oluşturulan standart grafikler Şekil 4.14. ve Şekil 4.15.'de verildi.



Şekil 4.14. Aktivite tayini için oluşturulan standart grafik .



Şekil 4.15. Miktar tayini için oluşturulan standart grafik.

PAFS grubunda ortalama enzim aktivitesi % 92,55 (% 62,32-% 124,36), ortalama enzim miktarı ise % 64,88 (% 40,14-% 106,8) olarak hesaplandı.

Kontrol grubunda ise ortalama enzim aktivitesi % 92,72 (% 68,11-% 124,46), ortalama enzim miktarı ise % 98,2 (% 55,98-% 159,47) olarak hesaplandı. Kontrol ve hasta gruplarına ait sonuçlar Tablo 4.1. ve 4.2’de verildi.

Tablo 4.1. Kontrol grubundaki çalışma sonuçları

NO	YAŞ	C	C365del	Q449stop	P475S	C508Y	A13 ED	HPRT1 ED	MİKTAR	AKTİVİTE
K1	35	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,56	36,25	92,97	88,83
K2	39	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,01	30,17	94,22	88,2
K3	38	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,95	36,92	88,16	81,79
K4	40	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,61	27,85	76,04	94,4
K5	59	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,56	27,99	125,99	90,17
K6	38	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,09	26,16	133,72	90,25
K7	31	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,52	27,78	104,46	80,63
K8	34	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,3	31,2	56,4	82,7
K9	54	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,3	26,23	63,08	124,46
K10	42	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,15	26,07	117,63	89,05
K11	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,83	26,44	104,46	90,91
K12	44	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,11	26,98	58,7	85,68
K13	30	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,21	35,62	101,1	94,1

K14	48	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	30,9	26,42	101,9	84,57
K15	40	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,29	34,48	111,9	100,58
K16	36	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,45	25,18	135,3	100,18
K17	31	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,16	34,61	110,1	88,12
K18	27	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,8	30,51	160,47	94,76
K19	45	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,33	34,94	83,9	131,2
K20	38	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,89	35,05	53,26	86,59
K21	42	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,65	36,78	55,98	104,65
K22	20	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,11	35,22	90,46	124,36
K23	33	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,74	35,7	114,7	142,97
K24	43	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	36,45	33,17	79,59	87,44
K25	35	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,91	36,05	113,4	115,72
K26	29	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,84	33,11	111,56	96,02
K27	44	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,31	27,28	102,58	82,33
K28	38	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,78	27,6	142,7	96,11
K29	46	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,54	29,11	97,77	76,9
K30	35	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,87	30,08	101,53	86,07
K31	45	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,76	29,45	113,45	87,94
K32	44	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,27	26,31	83,56	99,21
K33	38	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,3	36,48	90,25	74,76
K34	42	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,7	27,76	85,44	82,74
K35	40	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,07	28,49	110,9	100,58
K36	52	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,21	31,53	136,3	99,18
K37	39	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,31	29,06	111,1	98,12
K38	50	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,57	30,29	159,47	90,76
K39	43	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,65	28,88	82,9	135,2
K40	50	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,85	28,89	54,26	86,59
K41	46	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,59	29,69	81,59	87,44
K42	34	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,71	26,08	111,4	110,72
K43	28	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,82	28,69	110,56	100,02
K44	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,87	27,12	103,58	70,33
K45	40	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,54	26,97	139,7	68,11
K46	36	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,62	34,81	100,77	94,9
K47	38	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,49	27,3	104,53	80,07
K48	43	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,53	27,26	110,45	90,94
K49	58	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,5	28,5	87,56	96,21
K50	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	30,78	30,51	86,25	72,76
K51	29	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,88	32,16	85,44	64,74
K52	37	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,12	27,23	91,87	88,83
K53	38	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	30,06	27,23	95,32	98,22
K54	29	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,82	29,49	84,26	91,79
K55	31	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,83	27,14	80,14	94,4
K56	27	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	30,45	32,07	125,99	90,17
K57	24	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,44	30	113,72	100,05
K58	35	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	29,31	30,71	104,46	80,63
K59	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	28,99	31,47	56,4	92,7
K60	37	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,89	30,03	73,08	94,46
K61	19	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,5	25,74	117,63	89,25
K62	40	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,71	30,88	104,46	90,91
K63	37	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	30,59	28,03	68,7	95,48
K64	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,48	29,89	99,57	96,9

K65	35	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,43	32,17	99,53	86,07
K66	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,46	28,06	103,65	87,94
K67	38	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,57	29,49	93,76	89,21
K68	38	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,42	27,19	90,25	94,76
K69	39	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,69	32,06	95,24	92,74
K70	41	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,1	27,68	100,9	90,58

K:Kontrol, C: Cinsiyet, A13 ED: ADAMTS-13 için eşik değeri, HPRT1 ED: HPRT1 için eşik değeri

Tablo 4.2. Hasta grubundaki çalışma sonuçları

NO	YAŞ	C	C365del	Q449stop	P475S	C508Y	A13ED	HPRT1ED	MİKTAR	AKTİVİTE
H1	35	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,27	31,64	65,04	91,05
H2	39	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	29,56	29,55	108,53	131,5
H3	38	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,57	31,79	84,4	0
H4	40	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,65	32,92	51,47	98,6
H5	59	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,76	32,1	60,57	100,5
H6	38	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,27	31,54	50,22	77,16
H7	31	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,29	29,95	60,11	119,41
H8	34	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	36,36	31,26	79,08	109,65
H9	54	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,7	30,51	66,33	109,47
H10	42	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,7	30,9	79,08	99,19
H11	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,73	30,62	50,3	64,34
H12	44	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,32	32,44	55,08	79,72
H13	30	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,76	30,54	50,1	62,32
H14	48	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,01	31,12	51,2	72,02
H15	40	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,61	30,48	73,4	102,3
H16	36	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,57	30,23	55,83	72,34
H17	31	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,72	31,02	57,33	88,96
H18	27	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,63	32,14	44,48	93,29
H19	45	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	30,71	31,48	83,35	92,28
H20	38	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,71	30,45	50,22	67,04
H21	42	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	37,79	30,6	75,62	104,24
H22	20	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,66	30,52	50,32	66,07
H23	33	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,87	28,58	56,81	91,66
H24	43	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,15	29,81	86,04	94,54
H25	35	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,68	31,53	76,82	124,36
H26	29	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,21	30,47	51,44	71,26
H27	44	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,7	30,24	50,42	74,55
H28	38	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	36,43	31,06	81,26	104,63
H29	46	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,87	33,13	43,44	93,96
H30	35	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,96	33,55	76,82	84,61
H31	45	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,6	28,13	40,36	66,04
H32	44	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,59	29,72	66,84	84,73
H33	38	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,11	29,66	59,74	104,28
H34	42	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,36	30,25	43,23	99,04
H35	40	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,61	30,48	40,14	68,42

H36	52	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	26,68	30,91	73,11	106,4
H37	39	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	29,33	28,28	102,8	136,57
H38	50	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	29,48	26,42	86,07	104,08
H39	43	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	28,93	29,49	85,82	96,33
H40	50	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,02	31,82	81,89	103,1
H41	46	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,16	31,65	54,09	106,7
H42	34	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	29,63	27,27	59,11	91,57
H43	28	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,73	29,62	51,17	136,9
H44	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,74	29,69	82,61	102,01
H45	40	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,11	31,26	54,93	87,14
H46	36	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,31	27,6	54,3	73,98
H47	38	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,84	29,24	74,37	99,17
H48	43	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,58	30,87	50,36	72,01
H49	58	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,02	26,97	81,05	96,21
H50	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	36,11	30,88	40,3	85,06
H51	29	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,79	31,48	106,8	80,18
H52	37	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	36,89	32,92	50,75	104,7
H53	38	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,78	29,26	91,5	104,6
H54	29	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,8	28,15	50,28	64,22
H55	31	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	36	31,03	62,04	84,38
H56	27	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	36,79	33,64	50,54	104,8
H57	24	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,04	30,06	71,65	96,51
H58	35	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,87	32,1	49,29	97,26
H59	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,77	30,81	65,38	109,1
H60	37	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,48	30,76	29,91	103,97
H61	19	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	35,15	30,83	90,32	121,23
H62	40	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,99	27,67	84,54	85,16
H63	37	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,72	30,42	106,5	81,73
H64	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,54	31,12	84,97	81,76
H65	35	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	34,28	29,46	26,91	116,1
H66	36	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	32,86	29,89	55,83	79,99
H67	38	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	30,45	28,67	51,33	81,5
H68	38	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	31,54	30,53	84,11	114,98
H69	39	K	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,12	28,54	62,47	63,8
H70	41	E	Negatif	Negatif	Negatif	Negatif	33,71	30,42	74,9	0

H: Hasta, C: Cinsiyet, A13 ED: ADAMTS-13 için eşik değeri, HPRT1 ED: HPRT1 için eşik değeri

Hasta grubu, tromboz geçirmiş bireyler tromboz(+), tromboz geçirmemiş bireyler ise tromboz (-) isimleri verilerek iki alt gruba ayrıldı. Tromboz (+) grup 14'ü erkek 23'ü ise kadın , yaş ortalamaları 39 olan 37 bireyden oluştu. Tromboz (-) grup, 5'i erkek 28'i kadın, yaş ortalamaları 37 olan 33 bireyden oluştu. İki grup arasında benzer sonuçlar alındı. Bu iki alt gruba ait elde edilen veriler Tablo 4.3.'de özetlendi.

Kontrol ve hasta grubu enzim miktarı açısından t-test uygulaması ile istatistik açıdan incelendiğinde p değerinin 0.0001'den küçük olduğu, dolayısı ile aradaki farkın çok anlamlı olduğu saptandı. Bu analizde, % 95 güven aralığı(GA) 26.917-40.9401, standart hata (SH) ise 3,546 hesaplandı.

Kontrol ve hasta grubu enzim aktivitesi açısından t-test uygulaması ile istatistik açıdan incelendiğinde ise anlamlı bir fark olmadığı saptandı. $p=0.4369$, % 95 GA 26.917-40.9401, SH ise 3,287 hesaplandı.

Tablo 4.3. Tromboz (+) ve Tromboz (-) alt gruplarının yüzde cinsinden ortalama verileri

Alt grup	A13 Aktivitesi	A13 Miktarı	AKA-G	AKA-M	A13ED	HPRT1 ED
Tromboz (+)	88,39	66,63	47,09	26,8	33,96	30,59
Tromboz(-)	92,91	63,39	44,1	18,97	33,43	30,25

AKA-G: Antikardiyolipin antikor G, AKA-M: Antikardiyolipin antikor M, A13 ED: ADAMTS-13 için eşik değeri, HPRT1 ED: HPRT1 için eşik değeri

Tromboz (+) ve tromboz (-) alt grupları enzim miktarı açısından karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (t-test, $p=0.4686$, % 95 GA: -5.6339-12.1165, SH: 4,448). Aktivite karşılaştırmasında da benzer sonuçlar alındı (t-test, $p=0.4291$, % 95 GA: -15.8507-6.815, SH: 5,679).

Kontrol grubunda yaş ve enzim aktivitesi (Tablo 4.4.) arasındaki ilişkiyi belirlemek amacı ile Spearman'ın sıralama korelasyon testi uygulandı. Korelasyon sonucu -0.038633, t-test sonucu ise -0.3188 hesaplandı. Dolayısı ile kontrol grubunda yaş ve enzim aktivitesi arasında korelasyon olmadığı saptandı.

Hasta grubunda da benzer sonuçlar alındı. Korelasyon 0.24762, t-test sonucu ise 0.2038 hesaplandı. Aktivite ile bireylerin yaşları arasında korelasyon olmadığı saptandı.

Tablo 4.4. Yaş gruplarına göre enzim aktivitesinin dağılımı

Yaş	Kontrol Grubunda Aktivite	Hasta Grubunda Aktivite
30-40	n=44 % 92,23	n=44 % 91,81
41-50	n=20 % 93,52	n=20 % 84,05
51-60	n=6 % 97,89	n=6 % 103,85

Kontrol grubunda cinsiyet ile enzim aktivitesi (Tablo 4.5.) karşılaştırıldığında, istatistik olarak çok anlamlı bir sonuç elde edilirken (t-test, $p=0.0038$, % 95 GA: -17.8301-3.5801, SH: 3.571) hasta grubunda aynı karşılaştırma sonucu anlamlı bir fark gözlenmedi (t-test, 0.419, % 95 GA: -16.0208-6.7462, SH: 5.703).

Tablo 4.5. Cinsiyete göre enzim aktivitesinin dağılımı

Cinsiyet	Kontrol Grubunda Aktivite %	Hasta Grubunda Aktivite %
Erkek	n=19 85,28	n=19 88,48
Kadın	n=51 95,99	n=51 91,28

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antifosfolipid sendromu arteriyel ve venöz tromboz eğilimi, tekrarlayan düşükler ve antifosfolipid antikorlarının (AFA) varlığı ile karakterize olan otoimmün bir hastalıktır. Bu sendromun patogenezi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. AFS’de trombotik olaylar erken yaşta gerçekleşebilir, hem arteriyel hem de venöz sistemde olabilir ve tekrarlama riski yüksektir. AFS ile benzer bir otoimmün hastalık olan TTP’ye sahip bireylerin plazma örneklerinde ADAMTS-13 aktivite eksikliği saptanmıştır (Zheng ve diğ., 2001; Cal ve diğ., 2002; Majerus ve diğ., 2005; Tao ve diğ., 2005). Genetik mutasyonlar (Levine ve diğ., 2002), inhibitör otoantikorlar (Harris, 1990; Knitter ve Gorelick, 1994; Greaves, 1999a; Greaves, 1999b; Greaves ve diğ., 2000; Petri, 2000; Hanly, 2003) veya diğer etiyolojiler bu hastalıkta ADAMTS-13 enziminde işlevsel bozukluğa neden olmaktadır. Bunun sonucunda plazmada beklenmeyen büyüklükte vWF multimer varlığı görülür (Hanly, 2003). TTP’de görülen trombozların şekilleri ve yerleri AFS’de görülenlere oldukça benzemektedir.

2001 yılında vWF’ü kesen proteazın ADAMTS-13 olarak adlandırılması ve bu enzimi kodlayan genin detaylı şekilde gösterilmesinden sonra, enzimin normal ve patolojik durumlardaki fonksiyonuna ilgi artmıştır. Günümüze kadar geçen 8 yılda birbiri ardına yeni mutasyon ve polimorfizmler tanımlanmış, bu genetik değişimlerin işlevsel etkileri araştırılmıştır.

Aktivite saptanması için öncü olan çalışma Furlan ve diğ. (1996) tarafından gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, bir Türk TTP hastasının plazmasında saptadıkları kırılmamış vWF temel alınarak, bu kesim işlemini gerçekleştiren proteazın “von Willebrand Faktörü kesen proteaz (vWF-CP)” olduğu tanımlanmıştır.

EDTA’nın enzim aktivitesini bloke ettiğinin bildirilmesinden dolayı (Gerritsen ve diğ., 2001), bu tez çalışmasında aktivite ve miktar tayini için kullanılan yöntemde, hasta ve kontrol bireylerine ait kan örnekleri EDTA içermeyen, sitratlı vakumlu tüplere alındı. Furlan ve diğ. (1996) serum örneklerinden yapılan aktivite ölçümünün, plazma örnekleri ile yapılanlardan bir farklılık göstermediğini bildirmelerine karşın, serum ile yapılan çalışmada pıhtılaşma faktörlerinin bulunması ve bu faktörler ile vWF’ün

etkileşebileceği düşünülerek, içinde antikoagulan olmayan tüplere kan örneği alınarak serum örneklerinden ölçümleme benimsenmedi.

Gerritsen ve diğ. (1999) tarafından daha sonraki birçok çalışmada kullanılacak olan vWF'ün yüksek moleküler ağırlıklı formlarının kollajene bağlanmasını temel alan ADAMTS-13 aktivite saptama deneyi geliştirilmiştir. Bianchi ve diğ. (2002) tarafından trombositopeni gelişmiş toplam 68 hasta ile yapılan çalışmada hastaların 20'sinde ADAMS 13 aktivitesi % 10- % 30 aralığında saptanmıştır. Böhm ve diğ. (2002) tarafından ADAMTS-13 enziminin aktivite ölçümü için, vWF multimer büyüklüğü ve Ristosetin ko-faktör aktivitesi (vWF:RCo) arasındaki pozitif korelasyona dayalı yeni bir yöntem izlenmiştir. Bu yöntem, güvenilir ve basit olduğu için ADAMTS-13 aktivitesinin belirlenmesi amacıyla kullanılabilirliği rapor edilmekle beraber dolaylı bir yöntem olması nedeniyle dezavantajlıdır.

Enzim aktivitesinin saptanması için farklı bir çalışma Whitelock ve diğ. (2004) tarafından gerçekleştirilmiştir. İnsan vWF cDNA'sı kalıp olarak kullanılarak PZR ile vWF A2 peptidini kodlayan nükleotit dizisi çoğaltılarak seyreltik plazma örnekleri ile karıştırılmıştır. Aktivite tayini, seyreltik plazma örneklerine rekombinant vWF eklenen ve eklenmeyen durumlardaki optik yoğunluk değerlerinin bir formülasyonda kullanılması ile belirlenmiştir.

Daha sonra Kokame ve diğ. (2005) tarafından yeni bir ADAMTS-13 aktivite ölçüm yöntemi geliştirilmiştir. Bu tez çalışmasında da kullanılan bu yöntemin temeli, vWF'e ait 73 amino asitten oluşan enzimin kesim noktasını içeren floresans özellikli ADAMS13'ün yapay substratının (FRETs-vWF73) kesilmesidir. Enzim aktivitesi, ADAMTS-13'ün kesim noktası iki floroforun arasında olduğundan, vWF kesildiğinde değişen floresans miktarı 450 nm dalga boyunda emisyon değerindeki artış ile gösterilmiştir. Floresans miktarındaki artış, ortama bir proteaz inhibitör karışımı (serin proteazlar, sistein proteazlar, amino peptidazlar ve asit proteazlara karşı etkili inhibitörler) eklendiğinde durmamıştır. Fakat EDTA ile tamamen inhibe edilmiştir. Diğer yandan trombin ya da plazminin floresans miktarını artırdığı saptanmıştır. Bu çalışmanın önemli sonuçlarından biri de enzimin aktivitesinin yaş ve cinsiyet ile ilişkili olduğudur. Hem yaş hem de cinsiyet açısından istatistiksel olarak son derece anlamlı

farklılıklar saptanmıştır. Enzim aktivitesinin kadınlarda erkeklere göre daha fazla olduğu bildirilmiştir. 40'lı yaşlardan itibaren enzim aktivitesinin azaldığı da bildirilmektedir. Bu verilerden bazıları bu tez projesinden çıkan sonuçlar ile örtüşmektedir. Kokame ve diğ.nin sonuçlarına benzer şekilde, kontrol grubunda cinsiyet ve aktivite arasında anlamlı bir ilişki saptanmıştır (t test, p=0.0038). Kadın bireylerde enzim aktivitesinin erkeklere göre % 10 daha fazla olduğu gözlenmiştir. Hasta grubunda ise % 3'lük bir fark gözlenirken bu farkın istatistik ölçümlerde anlamlı olmadığı saptanmıştır (t test, p=0.419). Kokame ve diğ. (2005)'den farklı olarak, yaş ile enzim aktivitesi arasında ise bir ilişki saptanmamıştır.

Amoura ve diğ. (2004)'nin 20 PAFS hastası içeren çalışmalarında ADAMTS-13 aktivitesi immünoradyometrik deney ile saptanmıştır (Jang ve diğ., 2008). Hastaların biri dışında enzim aktivitesi (% 44) “normal” olarak tanımlanmıştır. Hasta grubunun ortalama enzim aktivitesi %116 (% 44-% 250) , normal aralık ise % 50-% 150 olarak bildirilmiştir. Hiçbir hastada ağır aktivite eksikliği (< %5) saptanmamıştır.

Austin ve diğ.(2007)'nin 66 AFS hastası ile yaptıkları çalışmada 21 hastada ADAMTS-13 aktivitesinin düşük olduğu (ortalama % 36, % 4-% 64) bildirilmiştir. Aktivite tayini Gerritsen ve diğ. (1999)'ne göre “kollajene bağlanma deneyi” ile gerçekleştirilmiştir.

Aynı çalışma grubu, hasta sayılarına 2 birey ekleyerek (n=68) yaptıkları çalışmanın devamında (Austin ve diğ., 2008), ADAMTS-13 aktivitesinin 22 hasta bireyde normal aralığın (% 66-% 126) altında, 9 hastada % 25'ten az, 3 hastada ise % 10'dan az olduğu bildirilmiştir. Altmışsekiz kişilik hasta grubu, 52 AFS hastası ve AFS olduğu şüpheli olan 16 bireyden oluşturulmuştur. 46 kişi PAFS olarak tanımlanmış, 6 kişi ise hem AFS hem de SLE hastası olmaları nedeni ile sekonder AFS olarak bildirilmiştir. vWF yarı ömrünün hasta bireylerde normal bireylerden anlamlı biçimde fazla olduğu (p=0.0009) bildirilmiştir. Bu nedenle, düşük ADAMTS-13 aktivitesinin vWF'ün miktar çokluğu ile ilgisinin olmadığı rapor edilmiştir. Fakat bu çalışmada % 66 ve buna yakın değerlerin de “düşük aktivite” olarak nitelendirildiği görülmektedir. Bu tez çalışmasından elde edilen verilere göre PAFS grubunda enzim aktivitesi ortalama % 92,55 (% 62,32 - % 124,36), kontrol grubunda ise % 92,72 (% 68,11 - % 124,46)'dir. Enzim aktivitesi açısından bu sonuçlar, Austin ve diğ.'nin verileri ile uyuşmamaktadır.

ADAMTS-13 aktivitesinin tanımlanmasında, doğrudan ve dolaylı testler arasında bir uyumsuzluk olduğu görülmektedir (Shelat ve diğ., 2006). Kollajene bağlanma, GST-vWF73 ve FRET-vWF73 aktivite ölçüm yöntemleri 40 TTP hastasına uygulandığında, en yakın korelasyon FRET-vWF73 ve kollajen bağlanma testi arasında saptanmıştır ($r=0.83$). GST-vWF73 ile kollajen bağlanma testi arasında ise daha düşük korelasyon tespit edilmiştir ($r=0.62$). Hem ağır enzim eksikliği olan TTP hastalarında, hem de idiyoPATİK TTP hastalarında bu 3 yöntem kıyaslandığında, enzim aktivitesini belirlemek için en uygun yöntemin bu tez projesinde de kullanılan FRET-vWF73 yöntemi olduğu bildirilmiştir (Shelat ve diğ., 2006). Çalışmamızda kontrol grubu ve hasta grubu arasında enzim miktarı açısından istatistik olarak çok anlamlı bir fark (t test, $p<0.0001$) gözlenmiştir. İki grup arasında aynı istatistik analiz enzim aktivitesi için gerçekleştirildiğinde ise anlamlı bir fark gözlenmemiştir (t test, $p=0.436$). Bu nedenle, ADAMTS-13 enziminin bir hastalık ile ilişkisi araştırılması amaçlanıyor ise, enzim miktarını belirlemenin anlamlı olmayacağı doğrudan enzimin aktivitesinin ölçülmesi gerekliliği öngörülebilir.

Bu tez çalışmasında TTP hastalarında enzimin aktivitesini azalttığı bildirilmiş olan R268P, Q449stop, P475S, C508Y mutasyonlarının çalışılması hedeflenmiştir. Bunlardan 7. eksonda bulunan R268P için farklı PZR metodları, PZR koşulları, farklı DNA polimerazlar kullanılmasına karşın 7. ekson çoğaltılamamıştır. Farklı çalışmalarda mutasyon analizi sürecinde, hedef DNA bölgesinin PZR ile çoğaltılmasından sonra dizileme yolu ile sonuca gidilmiştir (Levy ve diğ., 2001; Kokame ve diğ., 2002; Schneppenheim ve diğ., 2003; Pimanda ve diğ., 2004; Uchida ve diğ., 2004). Bu tez çalışmasında ise kolay uygulanabilmesi, ucuz olması ve tekrarlanma sürecinin daha az zaman alacağı düşünülerek hedef bölgelere özgün primerler tasarlanıp, PZR sonrasında mutasyon noktasını tanıyabilecek restriksiyon endonükleazlar belirlenmiştir. C508Y mutasyonu için ise uygun restriksiyon enzimi bulunamadığından ve çoğaltılan bölgenin kırılma noktasına yakın olmasından dolayı muhtemel farklı bir mutasyon saptanabileceği düşünülerek çoğaltılan DNA parçaları dizilenmiştir.

Pimanda ve diğ. (2004) tarafından konjenital TTP'li bir hastada T196I, Q448E ve 4143-4144insA mutasyonları gösterilmiştir. PZR temelli mutagenез ile ADAMTS-13 cDNA'sında 4143insA mutasyonu gerçekleştirilip, normal tipteki ve mutant yapılar bir

memeli anlatım vektörü olan pCXN'ye klonlanıp COS-7 hücrelerinde anlatımı sağlanmıştır. Transfekte COS-7 hücrelerinin kültür ortamında, hücrelerden salınan ADAMTS-13 enzim miktarının normal tipin % 14'ü kadar olduğu tespit edilmiştir. Bu az miktarda salınan enzimin aktivitesi ise % 85 hesaplanmıştır. Bu veriler ile bu tez çalışmasından elde edilen sonuçlar örtüşmektedir. Çalışmamızda enzimin miktarı ve aktivitesi arasında bir korelasyon olmadığı görülmüştür. Birçok çalışmada aktivite belirlenmesi için kullanılan yöntemler standart değildir. Bu nedenle bu tez çalışmasında CE ve IVD belgesine sahip bir kit kullanılmış ve tüm örneklerin aktivitesi ve miktarı ayrı ayrı hesaplanmıştır. ADAMTS-13 miktarı kontrol grubunda % 99, PAFS grubunda ise % 64 olarak belirlenmiştir. Enzimin aktivitesinin ise kontrol grubunda % 92,72, PAFS grubunda % 92,55 olduğu tespit edilmiştir. Hasta grubu, tromboz (+) ve tromboz (-) olarak 2 alt gruba ayrıldığında tromboz (+) grupta enzim miktarı % 66 iken aktivitenin % 88 olduğu hesaplanmıştır. Tromboz (-) grubun plazmadaki ortalama enzim miktarı % 63, aktivitesi ise % 92 olarak saptanmıştır.

Levy ve diğ. (2001) tarafından ADAMTS-13 geninin yaklaşık 37kb uzunluğunda 29 eksondan oluştuğu ve 1427 amino asit uzunluğunda bir proteini kodladığı saptanmıştır. Klonlanmış cDNA dizileri ve RT PZR sonuçları ile C uçtaki 6 TSP1 tekrarının olmadığı, proteinin 842 amino asitlik bir kısa formunun olduğu ve 17. eksonda bir alternatif kırılmanın varlığı gösterilmiştir (Gen bankası erişim numarası AF414400). Fare genomik dizileri ile karşılaştırmalı analiz yapıldığında, kodlama yapan dizilerin oldukça korunmuş olduğu gözlenmiştir. Konjenital TTP'ye sahip bireylerin olduğu 7 aile ile yaptıkları taramalarda 12 adet mutasyon tanımlanmış ve bunların ikisinin çerçeve kayması (Ekson 19'da 26 bç'lik delesyon ve ekson 27'de tek T insersiyonu) türünde olduğu gösterilmiştir. Bir ailede tek bir kırılma mutasyonu saptanmıştır (1584+5G>A). Bu değişimin 13. intronun kırılma oranını azalttığı, ayrıca 23 kodon insersiyonu ile sonuçlanan +70'de ek bir kırılma bölgesini aktifleştirdiği belirtilmiştir. Kalan 9 mutasyonun (H96D, R102C, T196I, R398H, R528G, R692C, C951G, C1024G, C1213Y) hepsinin oluşum yerlerinin insan ve fare genleri arasında mükemmel biçimde korunmuş olduğu bildirilmiştir. Çalışmalarında kullandıkları 10 hastanın hepsinde saptadıkları, düşük ADAMTS-13 aktivite düzeyleri ile uyumlu olarak ADAMTS-13'ün tam eksikliğinin öldürücü olabileceği ileri sürülmüştür. TTP taşıyıcıları ile ADAMTS-13 enzim aktivite düşüklüğünün hemen hemen mükemmel bir korelasyona sahip olduğu

bildirilmiştir. vWF'ü kesen proteazın ADAMTS-13 olduğunu net şekilde ortaya koymakla beraber ADAMTS-13'ün bu işlevi doğrudan mı yoksa başka bir proteazla etkileşerek mi yaptığı konusuna açıklık getirilememiştir. Rekombinant ADAMTS-13 üretiminin, günümüzde uygulanan plazma-değişim terapisinin yerini alarak daha güvenli ve daha etkili bir yol olacağını belirtmişlerdir. Sonraki birçok çalışmada da aynı düşünce tekrarlanmıştır.

Kokame ve diğ. (2002) de TTP'li iki ailede Levy ve diğ.'nin (2001) belirttiği 5 adet sessiz mutasyonu (420T>C, 546C>T, 1716G>A, 2280 C>T ve 4221C>A) saptamakla beraber bu mutasyonlar enzimin yapı ve işlevi ile ilişkilendirilmemiştir. Fakat, anlatım düzeyinde özellikle transkripsiyon aşamasında ya da RNA sürecinde etkili olma ihtimallerinin bulunduğu belirtilmiştir. Bunlara ek olarak, bir ailede 4 yanlış anlamlı ve farklı bir ailede 1 anlamsız olmak üzere 5 yeni mutasyon daha tanımlanmıştır. Bunlar arasındaki 1342 C>G mutasyonu (Q448E) daha önce Levy ve diğ. (2001) tarafından SNP olarak tanımlanmış fakat aktiviteye etkisi araştırılmamıştır. Kokame ve diğ. (2002) tarafından Q448E'ye ek olarak 4 yeni mutasyonun da (R268P, Q449stop, P475S, C508Y) aktiviteye etkisi TTP hastalığına sahip 2 ailedeki 7 bireyde araştırılmıştır. Bir ailede R268P, Q448E, P475S, C508Y mutasyonlarının hepsi heterozigot durumda saptanmış, bu bireylerde bunların dışında bir mutasyon saptanmadığı bildirilmiştir. R268P mutasyonunun Q449stop ve C508Y'de olduğu gibi ADAMTS-13 aktivitesini tamamen ortadan kaldırdığı, P475S mutasyonunun ise aktiviteyi azalttığı rapor edilmiştir. Diğer bir ailede, probandin (hastalığın görüldüğü birey) % 3'ten az, probandin annesinin % 60 babasının ise % 45 enzim aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir. Bu ailede yalnızca Q449stop mutasyonu saptanmıştır. Ebeveynler mutasyonu heterozigot durumda taşıırken, probandin homozigot olduğu tespit edilmiştir. Buradan elde edilen veriden, Q449stop mutasyonunun enzim aktivitesini ciddi biçimde etkilediği sonucuna varılmıştır. Tanımlanan mutasyonların işlevsel etkilerini doğrulamak amacı ile normal ve mutant ADAMTS-13 formları HeLa hücrelerine sokulup anlatımları sağlanmıştır. İmmunokimyasal saptama için C- uca etiket eklenmiştir. Kültür ortamında normal ADAMTS-13'ün moleküler kütlesi yaklaşık 230 kDa olan tek bir band halinde gözlenirken transfeksiyon yapılmayan hücrelerde band görülmediğinden, bu bandın beklenen ürün olduğu sonucuna varılmıştır. Q448E ve P475S mutantlarını taşıyan hücrelerin kültür ortamından izole edilen protein özütlerinde de aynı band saptanmıştır.

Q449stop mutantlarını taşıyan hücrelerden kültür ortamından 54 kDa'luk tek band izole edilmiştir. Bu bulgu ile Q449stop mutasyonuna sahip enzimin hücreden salındığı sonucuna varılmıştır. Q449stop veya P475S mutasyonlarına sahip enzimin hücreden salındığı fakat enzimin plazmadaki aktivitesinin az olması nedeni ile, enzimin aktivitesinin çalışılmasının miktarının belirlenmesinden daha önemli olduğu sonucu çıkarılmıştır. R268P ve C508Y mutantlarını taşıyan hücre kültürü ortamına ait örneklerde ise herhangi bir band görülmediği için muhtemelen proteinin katlanma ve kararlılığındaki değişiklikler sonucu hücreden salınmadığı yorumu getirilmiştir. Q448E mutasyonuna sahip olan enzim tamamen aktif, P475S mutasyonuna sahip olan enzimde aktivitenin azaldığı ama işlev gördüğü, Q449stop mutasyonuna sahip enzimin ise oldukça az aktiviteye sahip olduğu, R268P ve C508Y mutasyonlarına sahip olan enzimin hücreden salınmadığı için, aktivitesinin de olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu 5 mutasyonun frekansları TTP hastası olmayan 364 Japon bireyinde hesaplanmış, bunlardan Q448E (% 19,4) ve P475S'nin (% 5,1) yaygın olduğu saptanmıştır. Kontrol grubunun oluşturulduğu 364 bireyin TTP hastalığına sahip olmayan fakat farklı hastalıklara sahip olan ve Japon Ulusal Kardiyovasküler Merkezinin Hipertansiyon ve Nefroloji Bilim Dalı'nda takip edilen bireyler olması, bu çalışmada bildirilen allel frekanslarının, sağlıklı kontrollerden farklı olabileceği düşüncesini ortaya çıkarmaktadır. Bu nedenle Kokame ve diğ. (2002) tarafından polimorfizm olarak tanımlanan P475S değişimi, bu tez çalışmasında sağlıklı ve hasta bireyler dahil hiçbir örnekte rastlanmadığı için bu çalışma kapsamında mutasyon olarak adlandırılmıştır.

Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre, ADAMTS-13 mRNA kalıplarının yarısı cDNA'ya çevrilmektedir. Ya da sağlıklı bireylere göre yarısı kadar mRNA üretilmektedir. Bunun nedeni mutasyon/lar veya epigenetik olabilir. Enzimin plazma miktarının araştırılması sonucu elde edilen değerler de bu veriyi doğrulamıştır.

Antoine ve diğ. (2003)'nin bir çalışmalarında TTP hastası iki kardeş ve aileleri araştırmaya dahil edilmiştir. R7W, Q448E, P618A değişimleri polimorfizm, Q44stop, A732V ve R1336W amino asit değişimleri ise mutasyon olarak değerlendirilmiştir. Çocuklardan birinin bu amino asit değişimlerinin hepsini heterozigot durumda taşıdığı, diğerinin ise R7W dışında hepsini heterozigot durumda taşıdığı tespit edilmiştir. İki çocuğun da ADAMTS-13 aktivitesi % 3'den az hesaplanmıştır. Babalarının ise yalnızca

Q44stop mutasyonuna sahip olduğu saptanmıştır. Annede Q44stop dışındaki amino asit değişimlerinin hepsinin heterozigot pozitif olduğu rapor edilmiştir. Annenin plazma ADAMTS-13 aktivitesindeki çok az düşüşün, annenin sahip olduğu mutasyonlar sonucu meydana gelmiş olabileceği belirtilmiştir. Babada da benzer şekilde aktivitede hafif bir azalma saptanmış, bunun nedeni ise babanın sahip olduğu tek mutasyon olan Q44stop ile açıklanmıştır.

Schneppenheim ve diğ. (2003)'nin çalışmalarında hasta grubu 50 ITP, 8 TTP, 24 hemolitik üremik sendrom (HUS) ve 1 Evans sendromlu birey ile oluşturulmuştur. HUS hastalarının hiçbirinde enzim aktivitesinin % 62'nin altında saptanmadığı bildirilmiştir (ortalama % 103). TTP hastalarının tümünde aktivite % 5 ya da daha az hesaplanmıştır. Bianchi ve diğ.(2002)'nin sonuçlarına benzer şekilde tüm ITP hastalarının % 33 ya da daha fazla enzim aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır (ortalama % 59). PZR ile tüm eksonlar çoğaltılıp dizilerek 8 adet yeni mutasyon tanımlanmıştır. Bunlar, L232Q, S263C, P353L, W390X, R910X, R1034X, 2549delAT, 4143insA'dır. 4143insA mutasyonunun nispeten yaygın saptandığı, aynı zamanda hastaların 4'ünde bileşik heterozigot ("compound heterozygote") olarak bulunduğu bildirilmiştir, bu hastalarda aktivite % 5'in altında hesaplanmıştır. Yalnızca 4143insA mutasyonunu taşıyan bireylerde ise enzim aktivitesinin normal olduğu rapor edilmiştir. Üç yanlış anlamalı mutasyon saptanmış, bunlardan biri L232Q, biri S263C diğeri ise P353L'dir. 50 sağlıklı kontrol bireyinin hiçbirinde bu farklı 8 mutasyon saptanmamıştır. L232Q mutasyonu bir Türk hastada homozigot saptanmış ve bu durum akraba evliliğine bağlanmıştır. L232Q mutasyonunu homozigot durumda taşıyan bu hastada aktivitenin % 2-6 arasında hesaplandığı bildirilmiştir. R910X mutasyonunu taşıyan bireylerde enzimin aktivitesi % 50, 4143insA mutasyonuna sahip bireylerde % 21-55 iken bu 2 mutasyonu birlikte taşıyan bir bireyde aktivitenin % 2'den az olduğu rapor edilmiştir.

Uchida ve diğ. (2004) tarafından TTP hastası bir Japon bireyde plazma ADAMTS-13 aktivitesini azaltan yeni bir mutasyon tanımlanmıştır. ADAMTS-13 aktivitesinin % 3'ten daha az olduğu hesaplanmıştır. Hastanın anne ve babasının her ikisinin de ADAMTS-13 enzim aktivitesinin % 46 olduğu belirlenmiştir. Hasta bireyin ve annesinin örnekleri incelendiğinde, 2 adet yeni mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan birinin metalloproteaz domende bulunan, 7. eksondaki yanlış anlamalı bir mutasyon olan

A250V olduğu saptanmış, diğerinin ise 3. intronun 5' ucunda yer alan Guanin-Adenin değişimi olduğu tespit edilmiştir. Hastanın her iki mutasyonu da heterozigot durumda taşıdığı rapor edilmiştir. A250V mutasyonu 66 sağlıklı bireyde taranmış ve mutasyon saptanmadığı bildirilmiştir. İntron 3 G/A mutasyonu için 772 sağlıklı birey taranmış ve mutasyona rastlanmadığı rapor edilmiştir. A250V mutasyonuna sahip hücrelerin lizatında normal tip ile aynı miktarda ADAMT-13 olduğu saptanmış, diğer yandan kültür ortamında mutasyonun proteinin salınma yada kararlılığını etkilediğini açıklar biçimde A250V mutasyonuna sahip ADAMT-13 miktarının normal tipten daha az olduğu gösterilmiştir. Normal ve A250V mutasyonuna sahip enzimlerin aktiviteleri araştırıldığında, A250V mutasyonuna sahip olan enzimin aktivitesi normal tipe göre oldukça düşük bulunmuştur. A250V mutasyonunun, çinkonun bağlanma bölgesinde yapı değişikliği yaratarak enzimin aktivitesinde azalmaya neden olduğu öngörülmüştür.

R1060W mutasyonu için literatürde farklı sonuçlar bulunmaktadır. Tao ve diğ. (2006) tarafından daha önce rapor edilmemiş iki adet mutasyon C365del ve C3178T (R1060W) bildirilmiştir. 18 bç'lik delesyon yaratan C365del ve disintegrin bölgesindeki R1060W mutasyonları TTP'li bir hastada heterozigot durumda saptanmıştır. C365del mutasyonunu taşıyan enzimin aktiviteye sahip olmadığı, R1060W mutasyonuna sahip enzimin ise aktif olduğu bildirilmiştir. Tao ve diğ. (2006)'den farklı olarak, Camilleri ve diğ. (2008) tarafından 6 TTP hastasında R1060W mutasyonu gösterilmiş fakat bu mutasyona sahip bireylerde enzim aktivitesinin % 5'ten az olduğu bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında araştırılan mutasyonlardan biri olan C365del mutasyonu kontrol bireylerinin yanında, hasta bireylerde de saptanmadığından Camilleri ve diğ. (2008)'nin sonuçları ile karşılaştırılamamıştır.

P475S (C1423T) mutasyonunun 250 kontrol bireyinde tarandığı bir çalışmada (Jang ve diğ., 2008) Güney Kore için ön veriler elde edilmiş aynı zamanda ADAMT-13 aktivitesi de ölçülmüştür. T allel frekansı % 4 hesaplanmıştır CT genotipine sahip bireylerin ortalama enzim aktivitesi % 107 iken CC genotipine sahip bireylerinki % 118 olarak rapor edilmiştir. İstatistik hesapla bu farkın anlamlı olduğu bildirilmiştir. Japonlarda % 51 (Kokame ve diğ., 2002), Çinlilerde % 15 (Ruan ve diğ., 2004), Avrupalı beyaz ırkda % 0 (Bongers ve diğ., 2005), Korelilerde ise % 4 (Jang ve diğ.,

2008) saptanmıştır. P457S mutasyonuna Avrupalı beyaz ırkta rastlanmaması, ülkemiz için elde edilen veri ile örtüşmektedir.

Sonuç olarak, taranan mutasyonlar açısından PAFS için literatürdeki ilk veriler elde edilmiştir. TTP'de ADAMTS-13 aktivitesini etkilediği gösterilen mutasyonlara PAFS hastalarının yanında sağlıklı bireylerde de rastlanmamıştır. Polimorfizm olarak tanımlanmış olan 12. eksondaki P475S değişimine hasta ve kontrol bireylerde rastlanmamış olması, bu değişimin mutasyon olarak değerlendirilmesi sonucunu ortaya çıkarmıştır. Ayrıca hasta grubundaki ortalama mRNA miktarının kontrollerin yarısı kadar olması ve plazmadaki enzim miktarı % 34 daha az olmasına karşın, enzimin aktivitesinde aynı oranda bir azalma olmadığı saptanmıştır. Buradan enzimin plazmadaki miktarı ile aktivitesi arasında bir korelasyon olmadığı sonucu çıkarılmıştır. Buna neden olarak, enzim miktarı açısından belirli bir eşik değeri aşıldığında aktivitenin gerçekleştiği sonucu öngörülmüştür. Farklı plazma örneklerinde, aynı miktarda enzim bulunmasına karşın farklı aktivite değerleri saptanmasına neden olan etkenin çinko veya kalsiyumun konsantrasyon farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmüştür. Ayrıca cinsiyetin enzim aktivitesi için önemli bir kriter olduğu saptanmıştır. Daha fazla sayıda hasta ve kontrol bireyi ile, promotör bölgede gen anlatımını etkileyebileceği düşünülen mutasyon ve metilasyon taramasının yapılması ve tez çalışmasına başlandıktan sonra bildirildiğinden dolayı bu teze dahil olmayan Q44stop ve A250V mutasyonlarının varlığı da araştırılarak 2 hastadaki aktivite kaybının açıklanmaya çalışılması, plazmadaki çinko ve kalsiyum konsantrasyonlarının enzim aktivitesine etkisinin araştırılması gerekliliği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

1. AMOURA, Z., COSTEDOAT-CHALUMEAU, N., VEYRADIER, A., WOLF, M., GHILLANI-DALBIN, P., CACOUB, P., MEYER, D., PIETTE, J.C., 2004, Thrombotic Thrombocytopenic Purpura With Severe ADAMTS-13 Deficiency in Two Patients With Primary Antiphospholipid Syndrome, *Arthritis & Rheumatism*, 10, 3260-3264.
2. ANTOINE, G., ZIMMERMANN, K., PLAIMAUER, B., GRILLOWITZER, M., STUDDT, J.D., LÄMMLE, B., SCHEIFLINGER, F., 2003, ADAMTS13 gene defects in two brothers with constitutional thrombotic thrombocytopenic purpura and normalization of von Willebrand factor-cleaving protease activity by recombinant human ADAMTS13, *Br J Haematol*, 20, 821-824.
3. ASHERSON, R.A., 1988, A 'primary' antiphospholipid syndrome?, *J Rheumatol*, 15, 1742-1746.
4. ASHERSON, R.A., 1992, The catastrophic antiphospholipid syndrome, *J Rheumatol* 19, 508-512.
5. ASSINK, K., SCHIPHORST, R., ALLFORD, S., KARPMAN, D., ETZIONI, A., BRICHARD, B., VAN DE KAR, N., MONNENS, L., VAN DEN HEUVEL, L., 2003, Mutation analysis and clinical implications of von Willebrand factor-cleaving protease deficiency, *Kidney Int*, 63, 1995-1999.
6. AUSTIN, S.K., STARKE, R.D., LAWRIE, A.S., COHEN, H., MACHIN, S.J., MACKIE, I.J., 2007, Decreased ADAMTS13 and anti-ADAMTS13 in the antiphospholipid syndrome (APS), *J Thromb Haemost*, 5, S2, PS529.
7. AUSTIN, S.K., STARKE, R.D., LAWRIE, A.S., COHEN, H., MACHIN, S.J., MACKIE, I.J., 2008, The VWF/ADAMTS13 axis in the antiphospholipid syndrome: ADAMTS13 antibodies and ADAMTS13 dysfunction, *Br J Haematol*, 4, 536-544.
8. BARBUI, T., FINAZZI, G., 1994, Clinical Trials on Antiphospholipid Syndrome: What is Being Done and What is Needed?, *Lupus*, 3, 303-307.
9. BEVERS, E.M., GALLI, M., BARBUI, T., COMFURIUS, P., ZWAAL, R.F., 1991, Lupus anticogulant IgG's (LA) are not directed to phospholipids only, but a complex of lipid bound human prothrombin, *Throm Haemost*, 66, 629-632.
10. BIANCHI, V., ROBLES, R., ALBERIO, L., FURLAN, M., LÄMMLE B., 2002, Von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) in thrombocytopenic disorders: a severely deficient activity is specific for thrombotic thrombocytopenic purpura, *Blood*, 100, 710-713.
11. BOEY, M.L., COLACO, C.B., GHARAVI, A.E., ELKON, K.B., LOIZOU, S., HUGHES, G.R., 1983, Thrombosis in Systemic lupus erythematosus: Striking

association with the presence of circulating lupus anticoagulant, *Br Med J* ,287, 1021-1023.

12. BONGERS, T.N., DE MAAT, M.P., DIPPEL, D.W., UITTERLINDEN, A.G., LEEBEEK, F.W., 2005, Absence of Pro475Ser polymorphism in ADAMTS-13 in Caucasians, *J Thromb Haemost*, 3,805.

13. BOWIE, E.J., THOMPSON, J.H., PASCUZZI, C.A., OWEN, C.A., 1963, Thrombosis in systemic lupus erythematosus despite circulating anticoagulants, *J Clin Invest*, 62, 416-430.

14. BÖHM, M., VIGH, T., SCHARRER, I., 2002, Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor-cleaving metalloprotease (ADAMTS13), *Ann Hematol*, 81, 430–435.

15. CAL, S., OBAYA, A.J., LLAMAZARES, M., GARABAYA, C., QUESADA, V., LOPEZ-OTIN, C., 2002, Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains, *Gene*, 283, 49-62.

16. CAMILERI, R.S., COHEN, H., MACKIE, I.J., SCULLY, M., STARKE, R.D., CRAWLEY, J.T., LANE, D.A., MACHIN, S.J., 2008, Prevalence of the ADAMTS-13 missense mutation R1060W in late onset adult thrombotic thrombocytopenic purpura, *J Thromb Haemost*, 6, 331–338.

17. CHU, P., PENDRY, K., BLECHER, T.E., 1988, Detection of lupus anticoagulant patients attending an anticoagulation clinic, *Br Med J*, 297, 1449.

18. DONADELLI, R., BANTERLA, F., GALBUSERA, M., CAPOFERRI, C., BUCCHIONI, S., GASTOLDI, S., NOSARI, S., MONTEFERRANTE, G., RUGGERI, Z.M., BRESIN, E., SCHEIFLINGER, F., ROSSI, E., MARTINEZ, C., COPPO, R., REMUZZI, G., NORIS, M., 2006, Invitro and in-vivo consequences of mutations in the von Willebrand factor cleaving protease ADAMTS13 in thrombotic thrombocytopenic purpura, *Thromb Haemost*, 96, 454–464.

19. DONG, J.F., 2007, Structural and funtional correlation of ADAMTS13, *Curr Opin Hematol*, 14, 270-276.

20. EXNER, T., KOUTS, J., 1988, Autoimmune cardiolipin - binding antibodies in oral anticoagulant patients, *Aust NZ J Med*, 18, 669-773.

21. FEINSTEIN, D.I., RAPPAPORT, S.I., 1972, Acquired inhibitors of blood coagulation. *Prog Haemost Thromb*,1, 75-95.

22. FIKRIN, B.G., HOWARD, M.A., RADFORD, N., 1980, Possible relationship between lupus inhibitor and recurrent abortion in young women, *Lancet*, 2, 366.

23. FURLAN, M., ROBLES, R., LAMMLE, B., 1996, Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis, *Blood*, 87, 4223–4234.
24. FURLAN, M., ROBLES, R., SOLENTHALER, M., LÄMMLE, B., 1998, Acquired Deficiency of von Willebrand Factor-Cleaving Protease in a Patient With Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, *Blood*, 91, 2839-2846.
25. FURLAN, M., ROBLES, R., MORSELLI, B., SANDOZ, P., LÄMMLE, B., 1999, Recovery and Half-Life of von Willebrand Factor-Cleaving Protease after Plasma Therapy in Patients with Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, *Thromb Haemost*, 81, 8-13.
26. FURLAN, M., 2004, Proteolytic cleavage of von Willebrand factor by ADAMTS-13 prevents uninvited clumping of blood platelets, *J Thromb Haemost*, 2, 1505–1509.
27. GALLI, M., COMFURIUS, P., MAASSEN, C., HEMKER, H.C., DE BAETS, M.H., VAN BREDA-VRIESMAN, P.J., BARBUI, T., ZWAAL, R.F., BEVERS, E.M., 1990, Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but a plasma protein cofactor, *Lancet*, 335:1544-1547.
28. GAO, W.Q., SU, J., BAI, X., WANG, Z.Y., RUAN, C.G., 2004, Evaluation of von Willebrand factor-cleaving protease activity in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura, *Chin Med J*, 117, 818-822.
29. GERRITSEN, H.E., TURECEK, P.L., SCHWARZ, H.P., LÄMMLE, B., FURLAN, M., 1999, Assay of von Willebrand Factor (vWF)-cleaving Protease Based on Decreased Collagen Binding Affinity of Degraded vWF, *Thromb Haemost*, 82, 1386–1389.
30. GERRITSEN, H.E., ROBLES, R., LAMMLE, B., FURLAN, M., 2001, Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease, *Blood*, 98, 1654–1661.
31. GINSBURG, K.S., LIANG, M.H., NEWCOMER, L., GOLDHABER, S.Z., SCHUR, P.H., HENNEKENS, C.H., STAMPFER, M.J., 1992, Anticardiolipin antibodies and the risk of ischemic stroke and venous thrombosis, *Ann Intern Med*, 117, 997-1002.
32. GOODNIGHT, S.H., 1994, Antiphospholipid Antibodies and Thrombosis, *Curr Opin Hematol*, 1, 354-361.
33. GREAVES, M., 1999, Autoimmune thrombophilic syndromes, *Haematologica* 84, 32-35.
34. GREAVES, M., 1999, Antiphospholipid antibodies and thrombosis, *Lancet*, 353,1348-1353.

35. GREAVES, M., COHEN, H., MACHIN, S.J., MACKIE, I., 2000, Guidelines on the investigation and management of the antiphospholipid syndrome, *Br J Haematol*, 109, 704-715.
36. HANLY, J.G., 2003, Antiphospholipid syndrome: an overview. *CMAJ*, 168,1675-1682.
37. HARRIS, E.N., GHARAVI, A.E., BOEY, M.L., PATE, L.B.M., MACKWORTH-YOUNG, C.G., LOIZOU, S., HUGHES, G.R., 1983, Anticardiolipin antibodies: detection by radioimmunoassay and association with thrombosis in systemic lupus erythematosus. *Lancet*, 2, 1211-1214.
38. HARRIS, E.N., BAGULEY, E., ASHERSON, R.A., HUGHES, G.R.V., 1987, Clinical and serological features of the antiphospholipid syndrome (APS). *Br J Rheumatol* 26 ,324-326.
39. HARRIS, E.N., 1990, Antiphospholipid antibodies. *Br J Haematol* 74,1.
40. HUGHES, G.R.V., 1983, Thrombosis, abortion, cerebral disease and the lupus anticoagulant, *Br Med J* , 287, 1088-1089.
41. HUGHES, G.R., HARIS, N.N., GHARAVI, A.E., 1986, The anticardiolipin syndrome, *J Rheumatol*, 13, 486-489.
42. JANG, M.J., KIM, N.K., CHONG, S.Y., KIM, H.J., LEE, S.J., KANG, M.S., OH, D., 2008, Frequency of Pro475Ser Polymorphism of ADAMTS13 Gene and Its Association with ADAMTS-13 Activity in the Korean Population, *Yonsei Med J*, 49, 405-408.
43. KAPIOTICS, S., SPESIER, W., PABINGER- FASCHING, I., KYRLE, P.A., LECHNER, K., 1991, Anticardiolipin antibodies in patients with venous thrombosis, *Haemostasis*, 21, 19-24.
44. KNITTER, S.J., GORELICK, P.B., 1992, Antiphospholipid antibodies and stroke: an epidemiological perspective, *Stroke*, 23,19-22.
45. KOKAME, K., MATSUMOTO, M., SOEJIMA, K., YAGI, H., ISHIZASHI, H., FUNATO, M., TAMAI, H., KONNO, M., KAMIDE, K., KAWANO, Y., MIYATA, T., FUJIMURA, Y., 2002, Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene Responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 11902-11907.
46. KOKAME, K., NOBE, Y., KOKUBO, Y., OKAYAMA, A., MIYATA, T., 2005, FRETS-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay, *Br J Haematol*, 129, 93-100.
47. LANDSTEINER, K., MULLER, R., POTZL, O., 1907, Studies on the complement

binding reaction in syphilis, *Wien Klin Wochenschr*, 50, 1565-1567.

48. LEVINE, J.S., BRANCH, D.W., RAUCH, J., 2002, The antiphospholipid syndrome. *N Eng J Med*, 346, 752-763.

49. LEVY, G.G., NICHOLS, W.C., LIAN, E.C., FOROUD, T., MCCLINTICK, J.N., MCGEE, B.M., YANG, A.Y., SIEMIENIAK, D.R., STARK, K.R., GRUPPO, R., SARODE, R., SHURIN, S.B., CHANDRASEKARAN, V., STABLER, S.P., SABIO, H., BOUHASSIRA, E.E., UPSHAW, J.D. JR, GINSBURG, D., TSAI, H.M., 2001, Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura, *Nature*, 413, 488-494.

50. MALE, C., MITCHELL, L., JULIAN, J., VEGH, P., JOSHUA, P., ADAMS, M., DAVID, M., ANDREW, M.E., 2001, Acquired activated protein C resistance is associated with lupus anticoagulants and thrombotic events in pediatric patients with systemic lupus erythematosus, *Blood*, 97, 844-849.

51. MAJERUS, E.M., ANDERSON, P.J., SADLER, J.E., 2005, Binding of ADAMTS13 to von Willebrand factor, *J Biol Chem*, 280, 21773–21778.

52. MATSUMOTO, M., KOKAME, K., SOEJIMA, K., MIURA, M., HAYASHI, S., FUJII, Y., IWAI, A., ITO, E., TSUJI, Y., TAKEDA-SHITAKA, M., IWADATE, M., UMEYAMA, H., YAGI, H., ISHIZASHI, H., BANNO, F., NAKAGAKI, T., MIYATA, T., FUJIMURA, Y., 2004, Molecular characterization of ADAMTS13 gene mutations in Japanese patients with Upshaw-Schulman syndrome, *Blood*, 103, 1305–1310.

53. MCNEIL, H.P., CHESTERMAN, C.N., KIRILIS, S.A., 1989, Anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants compose separate antibody subgroups with different phospholipid binding characteristics, *Br J Haematol*, 73, 506-513.

54. MCNEIL, P., SIMPSON, R., CHESTERMAN, C., KIRILIS, S., 1990, Antiphospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: β 2-GPI (apolipoprotein H), *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 4120-4124.

55. MERONI, P.L., TINCANI, A., BARCELLINI, W., DEL PAPA, N., GAMBINI, D., PIONA, A., LA ROSA L., BALESTRIERI G., 1994, What is the pathogenetic role of antiphospholipid antibodies?, *Clin Exp Rheumatol*, 10, 43-47.

56. MIYAKIS, S., LOCKSHIN, M.D., ATSUMI, T., BRANCH, D.W., BREY, R.L., CERVERA, R., DERKSEN, R.H., DE GROOT, P.G., KOIKE, T., MERONI, P.L., REBER, G., SHOENFELD, Y., TINCANI, A., VLACHOYIANNOPOULOS, P.G., KRILIS, S.A., 2006, International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS), *J Thromb Haemost*, 4, 295-306.

57. MOAKE, J.L., 2004, Von Willebrand Factor, ADAMTS-13 and Thrombotic Thrombocytopenic Purpura, *Semin in Hematol*, 41, 9-14.

58. MOORE, J.E., MOHR, C.F., 1952, Biologically false positive serological tests for syphilis. Type, incidence, and cause, *JAMA*, 150, 467-473.
59. NOJIMA, J., SUEHISA, E., AKITA, N., TOKU, M., FUSHIMI, R., TADA, H., KURATSUNE, H., MACHII, T., KITANI, T., AMINO, N., 1997, Risk of arterial thrombosis in patients with anticardiolipin antibodies and lupus anticoagulants, *Br J Haematol*, 96, 447-450.
60. OOSTING, J.D., DERKSEN, R.H., ENTJES, H.T., BOUMA, B.N., DE GROOT P.G., 1992, Lupus anticoagulant activity is frequently dependent on the presence of β -2 glycoprotein-I, *Thromb Haemost*, 67, 499-502.
61. PANGBORN, M.C., 1941, A new serologically active phospholipid from beef heart, *Proc Soc Exp Biol Med*, 48, 484-486.
62. PANGBORN, M.C., 1942, Isolation and purification of a serologically active phospholipid from beef heart., *J Biol Chem*, 143, 247-256.
63. PETRI, M., 2000, Epidemiology of antiphospholipid antibody syndrome. *J Autoimmun* 15, 145-151.
64. PIERANGELI, S.S., ESPINOLA, R.G., LIU, X., HARRIS, E.N., 2001, Thrombogenic effects of antiphospholipid antibodies are mediated by intercellular cell adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and P-selectin, *Circ Res*, 88, 245-250.
65. PIMANDA, J.E., MAEKAWA, A., WIND, T., PAXTON, J., CHESTERMAN, C.N., HOGG, P.J., 2004, Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in association with a mutation in the second CUB domain of ADAMTS13, *Blood*, 103, 627-629.
66. ROMERO, A., ROMÃO, M.J., VARELA, P.F., KÖLLN, I., DIAS, J.M., CARVALHO, A.L., SANZ, L., TÖPFER-PETERSEN, E., CALVETE, J.J., 1997, The crystal structures of two spermadhesins reveal the CUB domain fold, *Nat Struct Biol*, 783-788.
67. ROUBEY, R.A., PRATT, C.W., BUYON, J.P., WINFIELD, J.B., 1992, Lupus anticoagulant activity of autoimmune antiphospholipid antibodies is dependent upon β -2 glycoprotein-I, *J Clin Invest*, 90, 1100-1104.
68. RUAN, C., DAI, L., SU, J., WANG, Z., RUAN, C., 2004, The frequency of P475S polymorphism in von Willebrand factor cleaving protease in the Chinese population and its relevance to arterial thrombotic disorders, *Thromb Haemost*, 91, 1257-1258.
69. SADLER, J.E., 2005, von Willebrand factor: two sides of a coin, *J Thromb Haemost*, 3, 1702-1709.

70. SANTORO, S.A., 1994, Antiphospholipid antibodies and thrombotic predisposition: Underlying pathogenetic mechanisms, *Blood*, 83:2389-2391.
71. SAVASAN, S., LEE, S.K., GINSBURG, D., TSAI, H.M., 2003, ADAMTS13 gene mutation in congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with previously reported normal VWF cleaving protease activity, *Blood*, 101, 4449-4451.
72. SCHEIFLINGER, F., KNOEBL, P., TRATTNER, B., PLAIMAUER, B., MOHR, G., DOCKAL, M., DORNER, F., RIEGER, M., 2003, Non-neutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease(ADAMTS-13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP), *Blood*, 102, 3241–3243.
73. SCHNEPPENHEIM, R., BUDDE, U., OYEN, F., ANGERHAUS, D., AUMANN, V., DREWKE, E., HASSENPFUG, W., HÄBERLE, J., KENTOUCHE, K., KOHNE, E., KURNIK, K., MUELLER-WIEFEL, D., OBSER, T., SANTER, R., SYKORA, K.W., 2003, von Willebrand factor cleaving protease and ADAMTS13 mutations in childhood TTP, *Blood*, 101, 1845-1850.
74. SHELAT, S.G., SMITH, P., AI, J., ZHENG, X.L., 2006, Inhibitory autoantibodies against ADAMTS-13 in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura bind ADAMTS-13 protease and may accelerate its clearance in vivo, *J Thromb Haemost*, 4, 1707–1717.
75. SIMIONI, P., PRANDONI, P., ZANON, E., SARACINO, M.A., SCUDELLER, A., VILLALTA, S., SCARANO, L., GIROLAMI, B., BENEDETTI, L., GIROLAMI, A., 1996, Deep venous thrombosis and lupus anticoagulant, *Thromb Haemost*, 76, 187-189.
76. TAO, Z., PENG, Y., NOLASCO, L., CAL, S., LOPEZ-OTIN, C., LI, R., MOAKE, J.L., LÓPEZ, J.A., DONG, J.F., 2005, Recombinant CUB-1 domain polypeptide inhibits the cleavage of ULVWF strings by ADAMTS13 under flow conditions, *Blood*, 106, 4139–4145.
77. TAO, Z., WANG, Y., CHOI, H., BERNARDO, A., NISHIO, K., SADLER, J.E., LÓPEZ, J.A., DONG, J.F., 2005, Cleavage of ultra-large multimers of Von Willebrand factor by C-terminal truncated mutants of ADAMTS-13 under flow, *Blood*, 106, 141–143.
78. TAO, Z., ANTHONY, K., PENG, Y., CHOI, H., NOLASCO, L., RICE, L., MOAKE, J.L., DONG, J.F., 2006, Novel ADAMTS-13 mutations in an adult with delayed onset thrombotic thrombocytopenic purpura, *J Thromb Haemost*, 4, 1931–1935.
79. TSAI, H.M., 1996, Physiologic cleavage of von Willebrand factor by a plasma protease is dependent on its conformation and requires calcium ion, *Blood*, 87, 4235–4244.
80. UCHIDA, T., WADA, H., MIZUTANI, M., IWASHITA, M., ISHIHARA, H., SHIBANO, T., SUZUKI, M., MATSUBARA, Y., SOEJIMA, K., MATSUMOTO, M., FUJIMURA, Y., IKEDA, Y., MURATA, M., 2004, Identification of novel mutations in

ADAMTS13 in an adult patient with congenital thrombotic thrombocytopenic purpura, *Blood*, 104, 2081–2083.

81. VESELY, S.K., GEORGE, J.N., LAMMLE, B., STUDT, J.D., ALBERIO, L., EL-HARAKE, M.A., RASKOB, G.E., 2003, ADAMTS13 activity in thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome: relation to presenting features and clinical outcomes in a prospective cohort of 142 patients, *Blood*, 102, 60–68.

82. WASSERMAN, A., NEISSER, A., BRUCK, C., 1906, Eine serodiagnostische reaktion bei syphilis. *Dtsch Med Wochenschr*, 32, 745-746.

83. WHITELOCK, J.L., NOLASCO, L., BERNARDO, A., MOAKE, J. , DONG, J.F., CRUZ, M.A., 2004, ADAMTS-13 activity in plasma is rapidly measured by a new ELISA method that uses recombinant VWF-A2 domain as substrate, *J Thromb Haemost*, 2, 485–491.

84. WILSON, W.A., GHARAVI, A.E., KOIKE, T., LOCKSHIN, M.D., BRANCH, D.W., PIETTE, J.C., BREY, R., DERKSEN, R., HARRIS E.N., HUGHES, G.R., TRIPLETT, D.A., KHAMASHTA, M.A., 1999, International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome. *Arthritis and Rheum*, 42,1309-1311.

85. ZHANG, P., PAN, W., RUX, A.H., SACHAIS, B.S., ZHENG, X.L., 2007, The cooperative activity between the carboxyl-terminal TSP1 repeats and the CUB domains of ADAMTS13 is crucial for recognition of von Willebrand factor under flow, *Blood*,110, 1887–1894.

86. ZHENG, X., CHUNG, D., TAKAYAMA, T.K., MAJERUS, E.M., SADLER, J.E., FUJIKAWA, K., 2001, Structure of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura, *J Biol Chem*, 276, 41059–41063.

87. ZHENG, X., NISHIO, K., MAJERUS, E.M., SADLER, J.E., 2003, Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13, *J Biol Chem*, 278, 30136–30141.

88. ZHENG, X.L., RICHARD, K.M., GOODNOUGH, L.T., SADLER, J.E., 2004, Effect of plasma exchange on plasma ADAMTS13 metalloprotease activity, inhibitor level, and clinical outcome in patients with idiopathic and non-idiopathic thrombotic thrombocytopenic purpura, *Blood*, 103, 4043–4049.

89. ZHENG, X.L., SADLER, J.E., 2008, Pathogenesis of microangiopathies, *Annu Rev Pathol Mech Dis*, 3, 249-277.

90. www1.imperial.ac.uk/medicine/about/divisions/is/haemo/co

7. ÖZGEÇMİŞ

VEYSEL SABRİ HANÇER

31.05.1978 tarihinde, Sivas, Gürün'de doğdu. Kayseri Müncübe Cingilloğlu İlkokulu'ndan mezun oldu. Orta ve Lise öğrenimini İzmir Karşıyaka Lisesi'nde tamamladı. 1995 yılında Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji bölümüne başlayıp, 1999 yılında mezun oldu. Aynı yıl Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsüne kayıt yaptırıp 2001 yılında "Erken yaşta miyokard infarktüsü geçiren olgularda faktörXIII Val34Leu polimorfizminin katkısının araştırılması" başlıklı tez çalışmasını tamamladı. 2001 yılında merkezi sınav ile İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları AD, Hematoloji BD'na atandı. Eğitimine İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji ve Genetik doktora programında devam etmekte ve aynı zamanda İstanbul Tıp Fakültesi Hematoloji BD Moleküler Hematoloji Laboratuvarı şefliği görevini sürdürmektedir.