

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KARDİYOYASKÜLER HASTALIKLARDA FRAGMAN
ANALİZİ YÖNTEMİNE DAYALI GENETİK YATKINLIK TANI
KİTİ GELİŞTİRİLMESİ

SELİN GÜL ÜNSAL

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

EKİM 2024

T.C.
GEBZE TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

KARDİYOYASKÜLER HASTALIKLARDA FRAGMAN
ANALİZİ YÖNTEMİNE DAYALI GENETİK
YATKINLIK TANI KİTİ GELİŞTİRİLMESİ

SELİN GÜL ÜNSAL

DOKTORA TEZİ
MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

EKİM 2024

T.R.
GEBZE TECHNICAL UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL

**DEVELOPMENT OF GENETIC PREDISPOSITION
DIAGNOSIS KIT BASED ON FRAGMENT ANALYSIS
METHOD IN CARDIOVASCULAR DISEASES**

SELİN GÜL ÜNSAL

A THESIS OF DOCTORATE
DEPARTMENT OF MOLECULAR BIOLOGY AND
GENETICS

ADVISOR: PROF. DR. YELDA ÖZDEN ÇİFTÇİ

OCTOBER 2024



DOKTORA JÜRİ ONAY FORMU

GTÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun 07/10/2024 tarih ve 2024/56 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından 09/10/2024 tarihinde tez savunma sınavı yapılan Selin Gül ÜNSAL'ın tez çalışması Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ

ÜYE

(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ

ÜYE

: Prof. Dr. Tamer YAĞCI

ÜYE

: Prof. Dr. Sedef TUNCA GEDİK

ÜYE

: Prof. Dr. Neslihan TURGUT KARA

ÜYE

: Prof. Dr. Ercan ARICAN

ONAY

Gebze Teknik Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun

...../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

DNA polimorfizminin en yaygın türü olan tek nükleotid polimorfizimleri (SNP) yaygın hastalıkların genetik temellerini oluşturabilmekte ve bireyleri hastalıklara daha yatkın hale getirebilmektedir. SNP'lerin sebep olduğu allel varyantlarının tespiti genetik tanıda önemli bir araç olan SNP genotiplemesi yöntemi ile gerçekleştirilebilmektedir. Bu sayede, hastalıklara yönelik genetik risklerin tanımlanması mümkün olmaktadır. Uygulanan genetik testler, hastalığa genetik yatkınlığı olan kişilerin tanımlanması, hastalıkların yönetimi ve önlenmesi için klinisyenlere hasta için en uygun tedavi ve desteği seçmede rehberlik eder. SNP'leri hedefleyen genotipleme panelleri, kardiyovasküler hastalıkların da dahil olduğu, yaygın hastalıklara yatkınlığı araştırmak için kullanılan güçlü araçlardır.

Bu çalışmada amaç, kardiyovasküler hastalıklara genetik yatkınlığın teşhisi için faydalı ve özgün bir SNP genotipleme kiti geliştirmektir. Günümüzde, kardiyovasküler hastalıklarla bağlantılı olduğu bilinen, klinik açıdan anlamlı 23 SNP bu tez kapsamında geliştirilen tanı paneli içeriğine dahil edilmiştir. Bu yöntemeye dayalı olarak, yapılan tez çalışmasında kapiler elektroforez cihazında çalışmaya uygun, fragman analizi yöntemine dayalı, kullanımı hızlı ve kolay bir teşhis kiti geliştirilmesine odaklanılmıştır. Mevcut tez çalışmasında Değişken Fragman Uzunluğu Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu (VFLASP) ve Amplifikasyona Dirençli Mutasyon Sistemi (ARMS) yöntemleri, allelik varyasyonları tespit etmek için güvenilir yöntemler olarak seçilmiştir. Her iki tekniğin etkinliğini artırmak için yeni ve özgün bir strateji geliştirilerek VFLASP-ARMS adı ile sunulmuştur.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, bu tez kapsamında yenilikçi bir yöntem olarak sunulan VFLASP-ARMS yönteminin SNP genotipleme analizlerine dahil edilebilecek etkin ve verimli bir tasarım metodolojisi ortaya çıkardığını göstermiştir.

Tasarlanan bu kitin uzun vadede ticari faaliyetler ile ulusal ve uluslararası profesyonel kullanıcılara ulaştırılması ve Türkiye'de yerli üretime katkıda bulunması hedeflenmiştir.

Anahtar Kelimeler: SNP Genotipleme, Kardiyovasküler Hastalık, Genetik Tanı Kiti, Fragman Analizi, VFLASP-ARMS

ABSTRACT

The most common type of DNA polymorphism, single nucleotide polymorphisms (SNPs), can form the genetic basis of common diseases and make individuals more susceptible to these diseases. The detection of allele variants caused by SNPs can be performed using SNP genotyping, an important tool in genetic diagnosis. Through this method, it is possible to identify genetic risks for diseases. The applied genetic tests guide clinicians in selecting the most appropriate treatment and support for patients, aiding in the identification of individuals genetically predisposed to diseases, and in the management and prevention of these diseases. Genotyping panels targeting SNPs are powerful tools used to investigate susceptibility to common diseases, including cardiovascular diseases.

The aim of this study is to develop a useful and specific SNP genotyping kit for diagnosing genetic susceptibility to cardiovascular diseases. Currently, the diagnostic panel developed within the scope of this thesis includes 23 clinically significant SNPs known to be associated with cardiovascular diseases. Based on this method, the thesis focused on developing a diagnostic kit suitable for use with a capillary electrophoresis device, based on the fragment analysis method, and designed for quick and easy use. In this thesis study, the Variable Fragment Length Allele Specific Polymerase Chain Reaction (VFLASP) and Amplification Refractory Mutation System (ARMS) methods were selected as reliable techniques for detecting allelic variations. A new and original strategy was developed to enhance the efficiency of both techniques, presented under the name VFLASP-ARMS.

The results obtained in the study demonstrated that the VFLASP-ARMS method, presented as an innovative approach within the scope of this thesis, revealed an effective and efficient design methodology that can be incorporated into SNP genotyping analyses. It is aimed that this kit, designed for long-term commercial activities, will reach national and international professional users and contribute to domestic production in Turkey.

Keywords: SNP Genotyping, Cardiovascular Disease, Genetic Diagnosis Kit, Fragment Analysis, VFLASP-ARMS

TEŞEKKÜR

2016-2024 yılları arasında yüksek lisans ve doktora eğitimimde danışman hocam olarak desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, kariyer gelişimim için aldığım her kararda bana yol gösteren ve her zaman arkamda olduğunu hissettiren çok değerli hocam Prof. Dr. Yelda ÖZDEN ÇİFTÇİ'ye saygılarımı sunarım.

Doktora tezimin deney tasarımı, kurulumu ve gerekli bütçenin sağlanmasına değerli katkıları bulunan Dr. Umut BÜYÜK'e teşekkür ederim.

Omuz omuza çalışmanın değerini tarifsiz şekilde hissettiğim çok değerli ekip arkadaşım Oğuzhan YENİ, MSc'ye doktora tezimin ve bilimsel yayının her aşamasında verdiği emek ve destekler için teşekkür ederim.

Bu tez çalışmasının bilimsel yayına dönüştürülme aşamasında dil desteği veren ve görüşleri ile katkılarda bulunan çok değerli çalışma arkadaşım Dr. Maria BATOOL'a teşekkür ederim.

Eşsiz destekleri için aileme teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
TABLolar DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1. Literatür Özeti	1
1.1.1. Mendel Genetiği	1
1.1.2. Mendel Bozuklukları ve Genetik Hastalıkların Sınıflandırılması	2
1.1.2.1 Tek Gen Bozuklukları	3
1.1.3. Genetik Bozuklukların Esasları	5
1.1.4. Kardiyovasküler Hastalıkların Monogenik Formları	6
1.1.5. Kardiyovasküler Hastalıkların Mendel Poligenik Formları	6
1.1.6. Genetik Polimorfizm	7
1.1.7. Kardiyovasküler Hastalıkların Genetik Altyapısı	8
1.1.8. Kardiyovasküler Hastalıklarla İlgili Genlerin Keşfi	9
1.1.8.1. Kardiyovasküler Hastalıklarla İlişki Genler	10
1.1.9. Kardiyovasküler Hastalıkların Kalıtılabilirliği	20
1.1.10. Kardiyovasküler Hastalıklarda Klinik Riskler ve Genetik Tanı	22
1.1.11. Dünya’da ve Türkiye’de Kalp ve Damar Hastalıkları	23
1.1.12. Genetik Hastalıklara Neden Olan Mutasyonların Tespit Yöntemleri	26
1.1.12.1. ARMS-PCR	30
1.1.12.2. VFLASP	33
1.1.12.3. Kardiyovasküler Hastalık Riskleriyle İlişkili SNP’lerin Tanı Yöntemi: Kapiler Elektroforez	34
1.1.13. Genetik Tanı Testleri	37
1.1.13.1. Genetik Tanı Testlerinin Önemi	37
1.1.14. KVH’larla İlişkili Yapılan Çalışmalar	38
1.2. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği	42
2. MATERYAL METOD	44
2.1. Sentetik Allel Dizilerinin Oluşturulması	45
2.2. SNP Genotipleme Kiti İçin Unipleks Mikslerinin Oluşturulması	50
2.2.1. Primer Prob Tasarımı	50
2.2.2. PCR Optimizasyonu Çalışmaları	57
2.2.3. Unipleks Kapiler Elektroforez Uygulamaları	60
2.3. SNP Genotipleme Kiti İçin Multipleks Mikslerinin Oluşturulması	60
2.3.1. Multipleks Kapiler Elektroforez Uygulamaları	61
2.4. Tekrarlanabilirlik, Tekrar Üretilbilirlik Çalışmaları	64

3. BULGULAR	65
3.1. Sentetik Allel Dizilerinin Eldesi	65
3.2. Unipleks VFLASP-ARMS Optimizasyon Sonuçları	66
3.3. Multipleks VFLASP-ARMS Optimizasyon Sonuçları	70
3.4. Tekrarlanabilirlik, Tekrar Üretilebilirlik Sonuçları	72
4. TARTIŞMA	75
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	79
 KAYNAKLAR	 81
ÖZGEÇMİŞ	94
TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR	95



SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
<	: Küçük
μ	: Mikro
μ_{eof}	: Kılcal Damarda İhmal Edilebilir Elektroozmotik Hareketlilik
μ_{ep}	: Numune Moleküllerinin Hareketliliği
μl	: Mikrolitre
μM	: Mikromolar
$^{\circ}C$	: Santigrad Derece
Q_{inj}	: Enjekte Edilen DNA Miktarı
Λ	: Lambda
Π	: Pi
πr^2	: Pi r Kare (Kılcal Açıklık Alanı)
A	: Adenin
ABI	: Applied Biosystems
ACE	: Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim
AGT	: Anjiyotensinojen
AGTR	: Anjiyotensin II Reseptör
APC	: Aktive Protein C
APCR	: Aktive Protein C Direnci
APO B	: Apolipoprotein B
APO E	: Apolipoprotein E
Ark	: Arkadaşları
ARMS	: Amplifikasyona Dirençli Mutasyon Sistemi
AS-PCR	: Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu
bç	: Baz çifti
CDKN2A	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2 A
CDKN2B	: Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör 2 B
ClinVar	: Klinik Varyant Veritabanı
dATP	: Deoksiadenozintrifosfat
dbSNP ID	: Tek Nükleotid Polimorfizmi Veritabanı Kimlik Numarası
dbSNP	: Tek Nükleotid Polimorfizm Veritabanı
dCTP	: Deoksisitozintrifosfat
DGGE	: Denatüre Edici Gradyan Jel Elektroforezi
dGTP	: Deoksiguanosintrifosfat
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid Trifosfat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
dTTP	: Deoksimidintrifosfat
E	: Elektrik alanı
eNOS	: Endotelial Nitrik Oksit Sentaz
ExoSAP	: Ekzonükleaz I Shrimp Alkalın
faktör Va	: Aktifleştirilmiş Faktör V Formu
G	: Guanin
GWAS	: Genom Çapında İlişkilendirme Çalışmaları
HLA	: İnsan Lökosit Antijenleri
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

JAK2	: Janus Kinaz 2
JAK-STAT	: Janus Kinaz-Sinyal Dönüştürücü ve Transkripsiyon Aktivatörü
KAH	: Koroner Arter Hastalığı
kB	: Kilobaz
KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
LDL	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
LDLR	: LDL Reseptörü
LTA	: Lymphotoxin Alpha
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
MLPA	: Multiplik Ligasyon Bağımlı Prob Amplifikasyonu
mM	: Milimolar
MTHFR	: Metilentetrahidrofolat Redüktaz
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
ng	: Nanogram
Nm	: Nanomolar
no	: Numara
NO	: Nitrik Oksit
NOS	: Nitrik Oksit Sentaz
NOS3	: Nitrik Oksit Sentaz 3
PAI1	: Plazminojen Aktivatör İnhibitörü Tip 1
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PROCR	: Endotelyal Protein C Reseptörü
r	: Yarıçap
RAAS	: Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi
RFLP	: Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği
RNA	: Ribonükleik asit
rs	: Referans Tek Nükleotid Polimorfizm
RT-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
s	: Saniye
SNP	: Tek Nükleotid Polimorfizmi
SSCP	: Tek Zincirli Konformasyon Polimorfizmi
T	: Timin
TBE	: Tris Borik Asit Edta
TÜİK	: Türkiye İstatistik Kurumu
UTR	: Translasyonu olmayan bölge
VFLASP	: Değişken Fragman Uzunluğu Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1: Soyağacı dizisi, otozomal baskın, otozomal resesif, X'e bağlı ve mitokondriyal kalıtım için olağan kalıtım modellerini özetlemektedir. Kareler erkekleri, daireler kadınları temsil etmektedir [Marian et al., 2011'den alıntı].	3
Şekil 1.2: Kardiyovasküler hastalıklar genetiğine özet bir bakış [Muse et al 2021'dan alıntıdır].	22
Şekil 1.3: Kalp içindeki koroner arterlerin konumunu ve arter duvarındaki aterosklerozun bir kesitini gösteren şema [Braund, 2015'ten alıntıdır].	26
Şekil 1.4: Little 1995'e göre normal ve mutant alleller için tasarlanan ARMS primer tasarlama stratejisinin gösterimi. A. Mutasyona özgü ARMS primeri ile eşleşen mutant dizi ve eşleşmeyen normal dizi. B. Normal diziye özgü ARMS primeri ile eşleşen normal dizi ve eşleşmeyen mutant dizi. Kırmızı renkte işaretlenmiş bazlar, SNP'yi göstermektedir. Mavi renkte işaretlenmiş bazlar, ARMS PCR yöntemi için spesifik olarak tasarlanan, sondan 1 ile 5. bazda yer alabilen, ek uyumsuz bazları ifade etmektedir. C. ARMS primer tasarlama stratejisinin şematik gösterimi. Kırmızı renkte işaretlenmiş bazlar, SNP'yi göstermektedir.	32
Şekil 1.5: Tóth ve ark. Tarafından geliştirilen VFLASP genotipleme yönteminde değişken uzunluktaki primerlerin tasarım stratejisi.	34
Şekil 1.6: ABI Prism 310 Genetic Analyzer ile allellerin ayrılmasının ve saptanmasının şematik gösterimi [Butler et al., 2004'ten alıntıdır].	36
Şekil 1.7: VFLASP-ARMS tekniğinde kullanılan allel spesifik rekabetçi primer tasarım stratejisi. Kırmızı renkle gösterilen baz kasıtlı uyumsuzluğu ifade etmektedir.	41
Şekil 2.1: SNP veritabanlarının website görünümleri. A) NCBI veri tabanına ait arama görseli. B) SNPedia veri tabanına ait arama görseli. C) Ensembl veritabanına ait arama görseli.	46
Şekil 2.2: NCBI veritabanından SNP'lere erişim. A) ClinVar veritabanından hedef bölgeyi arama B) ClinVar veritabanından hedef bölge hakkında bilgilere erişim. C) Varyasyon görüntüleyiciye erişim. D) SNP'yi içeren bölgenin hedeflenmesi ve ilgili dizinin dizi görüntüleyici ile görüntülenmesi.	47
Şekil 2.3: Bin set dosyasının oluşturulması. A) Bin set dosyasının manuel olarak tanımlanması. B) Tepe pik noktalarına binlerin eklenmesi. C) Mutant alleller için binlerin tanımlanması eklenmesi. D) Normal alleller için binlerin tanımlanması ve eklenmesi.	64
Şekil 3.1: Sanger sekanslama sonuçları. Kırmızı çerçeve ile gösterilen bazlar hedef SNP'lerdir.	66

- Şekil 3.2:** VFLASP-ARMS-PCR formülasyon optimizasyon çalışma sonuçları: A) Primer konsantrasyonu ve MgCl₂ konsantrasyonu formülasyon optimizasyonları. B) DNA konsantrasyonu formülasyon optimizasyonları. Kullanılan marker: HibriGen 50bç ladder. 67
- Şekil 3.3:** VFLASP-ARMS PCR ürünlerinin kapiler elektroforez sonuçları. A) Apolipoprotein E dbSNP ID'nin elektroferogramı: rs429358 heterozigot T/C alleli (solda), homozigot C/C alleli (sağda), mavi etiketli tepe piki noktaları ile floresan kanal FAM 495-520nm dalga boylarında ölçülmüştür B) Metilentetrahidrofolat redüktazın (MTHFR) elektroferogramı dbSNP ID: rs1801131 heterozigot A/G alleli (solda), homozigot G/G alleli (sağda) yeşil etiketli tepe pik noktalarına sahip floresan kanal Yakima Yellow 531-549 nm dalga boylarında ölçülmüştür. C) CDKN2B dbSNP ID'nin elektroferogramı: rs1333049 heterozigot C/G (solda), homozigot C/C alleli (sağda) kırmızı etiketli tepe pik noktalarına sahip floresan kanal ATTO565 570-591 nm dalga boylarında ölçülmüştür. D) Anjiyotensin II reseptör tip 1 A1166C dbSNP ID'nin elektroferogramı: rs5186 heterozigot (sol), homozigot A/A alleli (sağ), siyah etiketli tepe pik noktalarına sahip floresan kanal TAMRA546-579nm'nin dalga boylarında ölçülmüştür. 69
- Şekil 3.4:** GeneMapper Software 5 ile analiz edilen panel sonuçlarından örnekler. A. Mavi etiketli pik noktalarına sahip floresan kanal FAM (495-520 nm)'da ölçülen temsili test sonuçları rs867186 PROCR A>G, rs1801133 MTHFR C677T C>T, rs1799963 FII G>A, rs1800790 FGB -463G>A G>A, rs699 AGT C4072T C>T, rs429358 APOE T>C. B. Yeşil etiketli pik noktalarına sahip floresan kanal Yakima Yellow (531-549nm)'da ölçülen temsili test s sonuçları rs1799889 PAI-1 5G/4G A>G, rs5918 PIA1/A2 T1565C T>C, rs9574 EPCR C>G, rs1801131 MTHFR A1298C A>C, rs2383207 CDKN2B-AS1 A>G. C. Kırmızı etiketli pik noktalarına sahip floresan kanal ATTO565 (570-591nm)'da ölçülen temsili test s sonuçları rs6025 FV G>A, rs5742904 APOB C>A C>T, rs1041981 LT-α C804A C>A, rs10974944 JAK2 V617F C>G, rs1333049 G>C. D. Siyah etiketli pik noktalarına sahip floresan kanal TAMRA (546-579nm)'da ölçülen temsili test sonuçları rs1799983 NOS3 G894T G>T, rs10757274 CDKN2B-AS1 A>G, rs5186 AGTR-1 A1166C A>C, rs2070744 NOS3 -786T>C T>C, rs118203906 Factor V Cambridge C>G, rs5985 FXIII V34L C>A, rs7412 APOE C>T. 71
- Şekil 3.5:** GeneMapper Software 5 ile FAM kanalında analiz edilen panel sonuçlarından örnekler. 73
- Şekil 3.6:** GeneMapper Software 5 ile Yakima Yellow kanalında analiz edilen panel sonuçlarından örnekler. 73

- Şekil 3.7:** Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik deneyleri çalışma sonuçları: GeneMapper Software 5 ile TAMRA kanalında analiz edilen panel sonuçlarından örnekler 74
- Şekil 3.8:** Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik deneyleri çalışma sonuçları: GeneMapper Software 5 ile ATTO565 kanalında analiz edilen panel sonuçlarından örnekler. 74



TABLÖLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 1.1: Artmış KVH'lerin majör risk faktörleri [Braund, 2015'ten modifiye edilmiştir].	25
Tablo 1.2: Genetik sendromlarda sıklıkla kullanılan moleküler test yöntemleri.	29
Tablo 2.1: MTHFR C677T C>T (rs1801133) dönüşümü için T allelini (mutant) içeren sentetik allel dizilerine özgü primer çiftlerinin tasarlanma yöntemi. Altı çizili kırmızı bazlar SNP'yi, kalın siyah bazlar ortak dizi bölgesini temsil etmektedir.	49
Tablo 2.2: SNP genotiplleme kiti için VFLASP-ARMS yöntemine göre tasarlanan primer ve problemler. Altı çizili bazlar allel spesifik bölgeler olan SNP'leri ifade etmektedir. Turuncu ile işaretlenen bazlar fragman analizi için farklı uzunlukta ampliconların eldesi için eklenmiştir. Mavi ile işaretlenen bazlar, ek kasıtlı uyumsuzluğu ifade etmektedir.	52
Tablo 2.3: Allel spesifik PCR için gerçekleştirilen, farklı primer konsantrasyonları için optimizasyon çalışmaları.	58
Tablo 2.4: Allel spesifik PCR için gerçekleştirilen, farklı kalıp konsantrasyonları için optimizasyon çalışmaları.	59
Tablo 2.5: Multipleks allel spesifik PCR uygulamalarında kullanılan paneller ve içerdikleri SNP bölgeleri.	62

1. GİRİŞ

Epidemiyolojik çalışmalar, insan sağlığının genetiğinin araştırılması için belirli hastalıklarla ilişkili genetik varyantların belirlenmesi ve tanımlanmasında anahtar rol oynamaktadır. Bununla birlikte, çoğu hastalığın çok faktörlü doğası nedeniyle yalnızca ilgili genleri belirleyerek hastalık durumunu tayin etmek oldukça zordur. Artmış risk taşıyan bir genetik mutasyon mevcut olsa bile, hastalık çeşitli çevresel maruziyetlerden, alışkanlıklardan ve diğer genlerden etkilenebilir ve etiyolojik faktörler arasında etkileşim meydana gelebilir. Tüm bunların yanında, genetik yatkınlık testleri, bir klinik sorunun doğrudan araştırılmasına veya yönetilmesine önemli derecede yardımcı olmakta, belirli müdahaleler için hasta adaylarını belirleyebilmekte, tanı veya prognostik bilgiler sağlayabilmektedir. Genetik testler, ilgili hastalığa genetik yatkınlığı olan kişilerin belirlenmesi yoluyla hastalıkların yönetilebilmesi ve advers ilaç reaksiyonlarının önlenmesi için önemli fırsatlar sağlamaktadır. Son yirmi yılda, artan genetik bilginin bir sonucu olarak klinisyenlere giderek artan sayıda genetik test panelleri sunulmaktadır [Burke et al., 2002]. Bu testler, klinisyenlere hasta için en uygun tedaviyi ve desteği seçmede rehberlik ederken, iyi gözetim ve erken müdahale hastanın hayatını kurtarabilmektedir.

1.1. Literatür Özeti

1.1.1. Mendel Genetiği

Genetik bilimi, 19. yüzyılda Gregor Mendel tarafından yapılan titiz çalışmalarla doğmuştur. Mendel, nesiller boyunca görülebilen özelliklerin kalıtımını açıklayan üç yasa önermiştir. Mendel'in yasaları 1) Baskınlık ve Tekdüzelik Yasası, 2) Ayrışma Yasası, 3) Bağımsız Çeşitlilik Yasasıdır.

Baskınlık ve Tekdüzelik Yasası, aynı kromozomal lokusta veya konumda bulunan belirli bir genin varyantları olan bazı allellerin, genin diğer allelleri üzerinde baskın olduğunu belirtir. Organizmada baskın allelin etkisi ve fenotipi görülür [Panoutsopoulou and Wheeler, 2018].

Ayrışma Yasası, gametogenez sırasında her gen için iki allelin birbirinden ayrıldığını, böylece ebeveynin yavrusuna yalnızca tek bir allel geçirebileceğini açıklar. Bu nedenle yavru her zaman her bir ebeveyninden yalnızca bir allel alabilir [Gayon, 2016].

Bağımsız Çeşitlilik Yasası, farklı genlerin allellerinin gametogenez sırasında birbirinden bağımsız olarak ayrıldığını ve bir sonraki nesilde birbirinden bağımsız olarak dağıtıldığını belirtir [Gayon, 2016].

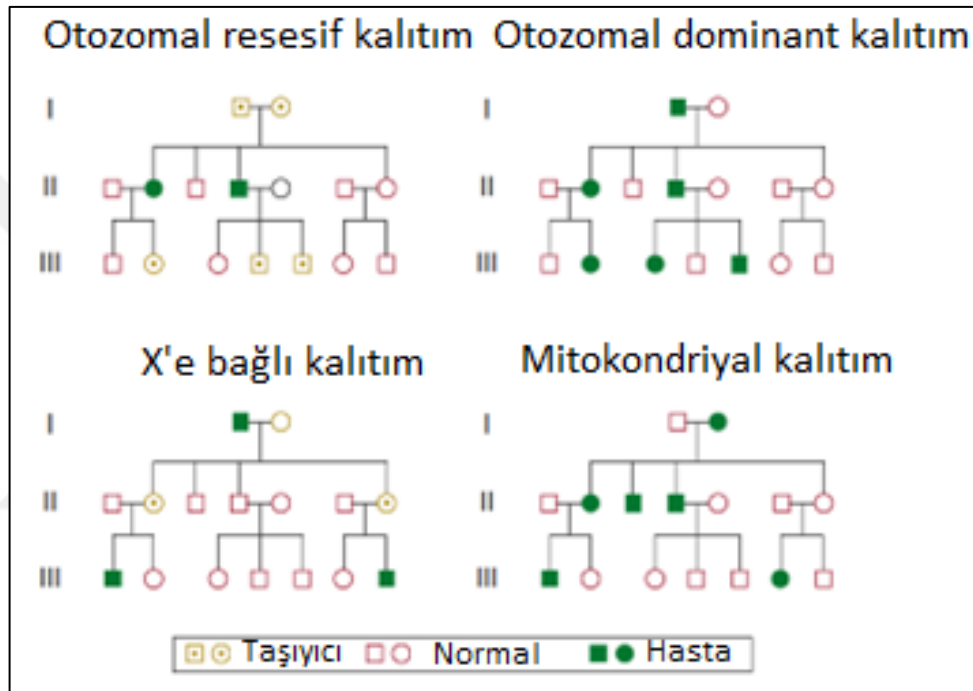
1.1.2. Mendel Bozuklukları ve Genetik Hastalıkların Sınıflandırılması

Genel olarak, DNA nükleotid dizileri, yavrulara aktarım sırasında stabil kalmaktadır. Bununla birlikte, DNA replikasyonu esnasındaki nadir hata oranı nedeniyle, ara sıra baz değişiklikleri meydana gelir. Bunlara dizi varyantları veya polimorfizmler veya mutasyonlar denir. Mutasyonlar, DNA’da oluşan kararlı, kalıtsal değişiklikleri temsil eder. Somatik hücrelerde oluşması durumunda mutasyonlar kalıtsal değilken, germ hücrelerinde oluşması durumunda kalıtsaldır. Mutasyonlar, kromozomun bir kısmının silinmesi veya yer değiştirmesi (kromozomal anormallikler) gibi değişikliğini veya DNA dizisinde tek nükleotid değişikliğini içerebilir. Mutasyonlar, üç geniş kategoride sınıflandırılır: (1) kromozomal anormallikler, (2) tek gen veya monogenik bozukluklar ve (3) poligenik bozukluklar. Mendel yasaları, insan patolojileri içinde tek gen veya monogenik bozukluklar şeklinde ortaya çıkar [Marian et al., 2011]. Bir genin DNA dizisindeki hatalardan kaynaklanan tek gen bozuklukları, otozomal baskın, otozomal çekinik, X’e bağlı çekinik, X’e bağlı baskın ve mitokondriyal bozukluklardır [Mahdieh and Bahareh, 2013].

Çoğu insan hastalığı, aynı fenotip ile ilişkili farklı genlerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklı genetik heterojenite sergiler. Heterojenlik, bir gendeki (allel heterojenliği) veya iki veya daha fazla gendeki (lokus heterojenliği) çoklu mutasyonlardan kaynaklanabilir. Herhangi bir aile içinde, etkilenen tüm üyelerde bir nedensel gen ve mutasyon vardır. Nadiren, belirli bir ailede aynı hastalık için aktarılan iki farklı nedensel mutasyona veya gene rastlanır. Bu duruma en iyi örnek ailesel hipertrofik kardiyomiyopatidir. Bu hastalık, her birinde çoklu mutasyonlar (allel heterojenlik) bulunan farklı genler (lokus heterojenitesi) içerir. Genlerdeki mutasyonlar, zararlı etkilerini, fonksiyonel sonuçları olan proteinin yapısal değişikliği yoluyla gösterirler [Marian et al., 2011].

1.1.2.1 Tek Gen Bozuklukları

Tek gen bozukluğu, tek bir gendeki bir mutasyonun neden olduğu kalıtsal bir hastalıktır. Yalnızca tek bir nükleotidi içeren mutasyonlar, nokta mutasyonları olarak bilinir ve tüm tek gen bozukluklarının %70' inden daha fazlasından sorumludurlar. Kardiyovasküler bozuklukların sadece küçük bir kısmı tek gen bozukluğundan kaynaklanır (monojenik). Ailelerde meydana gelen tek gen bozuklukları, Mendel kalıtım kalıpları ile karakterize edilir (Şekil 1.1) [Marian et al., 2011].



Şekil 1.1: Soyağacı dizisi, otozomal baskın, otozomal resesif, X'e bağlı ve mitokondriyal kalıtım için olağan kalıtım modellerini özetlemektedir. Kareler erkekleri, daireler kadınları temsil etmektedir [Marian et al., 2011'den alıntı].

- Otozomal Baskın Kalıtım

Baskın bozukluklar, heterozigot bireylerde fenotipi gösteren bozukluklardır. Erkekler ve dişiler eşit olarak etkilenir. Monogenik hastalıkların çoğu, otozomal baskın bir kalıtım şekli sergiler. Şekil 1.1'de otozomal baskın kalıtımın karakteristik özellikleri gösterilmektedir [Marian et al., 2011].

Mendel'in Baskınlık ve Tekdüzelik Yasası'na göre, bir bireyin hastalıktan etkilenmesi veya fenotipinde göstermesi için hastalık geninde yalnızca bir baskın allel gereklidir. Ebeveynlerden biri heterozigot olarak otozomal baskın (Aa) bir hastalığa sahipken

diğer ebeveyn homozigot (aa) ise yavruların %50'si bir baskın allel sahip olacak (heterozigot (Aa)) ve hastalıktan etkilenecek, diğer %50'si ise çekinik allellere sahip olacak (homozigot (aa)) ve hastalıktan etkilenmeyecektir. Bahsi geçen otozomal baskın kalıtım bozukluğu, bireyde hastalığı oluşturan gen için en az bir baskın allel sahip olduğunda ortaya çıkmaktadır. Her iki ebeveyn de heterozigot olarak otozomal baskın (Aa) bir hastalığa sahipken, yavruların %75'i dominant allelin kalıtımı ile hastalıktan etkilenme şansına sahiptir. Ebeveynlerden biri homozigot olarak otozomal baskın (AA) bir hastalığa sahip ise yavruların tümü baskın allelin kalıtımı yoluyla hastalıktan etkilenme şansına sahip olmaktadır [Lewis and Simpson, 2020]. Otozomal baskın hastalıkların erken teşhisi, morbidite ve mortaliteyi azaltmak için esastır. Ancak doğru teşhis, yeterli aile öyküsüne ve kapsamlı genetik testlere dayanmaktadır [Bernhardt et al., 2011].

- Otozomal Çekinik Kalıtım

Otozomal çekinik fenotipler, hastalıktan sorumlu lokusta iki mutant allel (yani homozigot) taşıdığında klinik olarak belirgin hale gelmektedir (Şekil 1.1). Hastalığa neden olan gen, 22 otozomdan birinde bulunur. Böylece hem erkekler hem de kadınlar eşit olarak etkilenir. Klinik verilere göre hastalık başlangıcı genellikle yaşamın erken dönemlerinde ortaya çıkar. Resesif bozukluklar çocukluk yaşlarında baskın hastalıklardan daha sık teşhis edilebilmektedir [Marian et al., 2011].

- X'e Bağlı Kalıtım

X'e bağlı kalıtsal bozukluklara, X kromozomunda bulunan genlerdeki kusurlar neden olur. İki X kromozomuna sahip oldukları için dişiler mutant alleli ya heterozigot ya da homozigot taşıyabilirler. Bu nedenle mutasyondaki özellik, baskın veya çekinik ifade gösterebilir. Erkeklerde ise anormal geni maternal kalıtıldığında sendromu göstermesi beklenir. Bu nedenle, X'e bağlı baskın ve X'e bağlı çekinik terimleri yalnızca genin dişilerdeki ifadesi için geçerlidir. X'e bağlı bozukluklarda erkekten erkeğe bulaşma gerçekleşmezken, erkekten tüm kız çocuklarına geçer. Mutasyon majör bir proteini içeriyorsa, mutasyonun etkisi baskın olabilir ve dişiler klinik fenotip sergileyebilir. **Şekil 1.1**, X'e bağlı kalıtımın karakteristik özelliklerini şematize etmektedir [Marian et al., 2011].

- Mitokondriyal Kalıtım

Bir embriyodaki tüm mitokondriyal DNA, oositin sitoplazmasında mevcut olan mitokondrilerden türetilir. Spermatositler, zigota ya çok az mitokondri katkısında bulunur ya da hiç katkıda bulunmazlar. Bu nedenle mitokondriyal DNA mutasyonlarının neden olduğu fenotipler yalnızca anneden kalıtımı gösterir (Şekil 1.1). Mitokondriyal kalıtılan bir DNA mutasyonu, kodlanmış proteinin karşılık gelen amino asitlerinde bir değişikliğe yol açabilir ve zararlı etkilerini fonksiyonel değişiklikler yoluyla ortaya çıkarabilir. Proteinin kritik bir alanında yer alan bir amino asitte bile bir değişiklik ya işlev kazancı mutasyonu ya da klinik fenotipte eşlik eden fonksiyon kaybı mutasyonu olarak karşımıza çıkar [Marian et al., 2011].

1.1.3. Genetik Bozuklukların Esasları

Bir genin her iki allelindeki mutasyonlar, kusurun otozomal çekinik bir bozuklukta ortaya çıkmasına neden olmak için gereklidir. Bu durum fonksiyon kaybına yol açar [Mahdieh and Bahareh, 2013].

Mendel'in ikinci yasasına göre, ayrı kromozomlar üzerinde bulunan iki allelin her biri bağımsız olarak ayrılır ve değişmeden yavrulara aktarılır. Böylece annenin allelini babaninkine karşı kalıtım yoluyla alma şansı %50'dir. Mendel'in üçüncü yasası, aynı kromozom üzerindeki genlerin, kromozom segmentleri arasında çapraz geçiş süreci yoluyla kendilerini bağımsız olarak öne sürdüklerini belirtir. İki lokus arasındaki mesafe ne kadar büyükse, genetik aktarım sırasında ayrılma olasılıkları o kadar fazladır. 22 otozomal çiftin herhangi birinde veya iki cinsiyet kromozomunda bulunan mutant genler, sırasıyla otozomal (baskın veya çekinik) veya X'e bağlı olarak sınıflandırılan kalıtsal fenotipler üretebilir [Marian et al., 2011]. X'e bağlı bir bozuklukta, mutasyona uğramış gen, X kromozomunda bulunur. Resesif bir mutasyon hastalığa yol açabilir. Bu duruma neden olmak için X kromozomundaki genin mutasyona uğraması gerekir; bu nedenle, genellikle erkekleri etkilerken, X'e bağlı çekinik bir bozukluk kadınlar tarafından taşınır [Mahdieh and Bahareh, 2013].

Baskın kalıtım ve çekinik kalıtım terimleri fenotipin özelliklerini ifade eder. Baskın kalıtım, mutant allelin bir kopyasına ve normal allelin bir kopyasına sahip olan bir kişinin mutant allel ile ilişkili fenotipi geliştirdiği anlamına gelir. Çekinik özellikler

ise bir fenotip üretmek için her iki allelin de mutant olmasını gerektirir [Marian et al., 2011].

Bazı genetik koşullar, yukarıda bahsedilen kalıtım modellerinin hiçbirini izlemez. Bu sebeple Mendel olmayan veya geleneksel olmayan kalıtım modeline sahiplerdir [Mahdich and Bahareh, 2013].

1.1.4. Kardiyovasküler Hastalıkların Monogenik Formları

Çok faktörlü ve karmaşık yapısı nedeniyle kardiyovasküler hastalıkların çoğunluğu, majör bir etkiye sahip olan bir genin sorumlu olduğu Mendel kalıtımına uymaz. Ancak yalnızca bazı nadir durumlarda (<0,1) Mendel monogenik kalıtım eksikliği var olmakla beraber, otozomal baskın veya otozomal resesif Mendel segregasyon paterni altında KVH fenotipini indüklemek için yeterli olan tek gen mutasyonları tanımlanmıştır. Bu ilgili gen otozomal resesif kalıtılıyorken bireyde risk alleli her iki kopyasıyla homozigot ise hastalıktan etkileneceği anlamına gelir.

KVH'lere neden olan ve risk faktörlerini etkileyen Mendel tek gen bozuklukları bugüne kadar KVH biyolojik yollarına ilişkin önemli bilgiler sağlamıştır. LDLR geninde hastalığa neden olan 600'den fazla mutasyonun tanımlandığı ailesel hiperkolesterolemi tek gen bozukluğuna verilebilecek en iyi örnektir [Marian et al., 2011].

1.1.5. Kardiyovasküler Hastalıkların Mendel Poligenik Formları

Koroner arter hastalığı (KAH) ve sistemik arteriyel hipertansiyon gibi poligenik bozukluklar, genetik ve çevresel faktörlerin rastgele etkileşimlerinden kaynaklanır. Bu durumda, tek bir varyantın varlığı bir hastalığa neden olmak için yeterli değilken, yokluğu da hastalığın gelişmesini engellemez.

Ateroskleroz, hipertansiyon ve periferik arter hastalığı dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalıkların çoğu poligenik bozukluklardan kaynaklanır. Karmaşık hastalıklarla ilişkili genetik varyantlar, tipik olarak tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) olarak da adlandırılan tek nükleotid varyantlarıdır. Her genom yaklaşık 4 milyon tek nükleotid varyantı içerir. Bu varyantların büyük çoğunluğu ihmal edilebilir biyolojik etkilere sahip olduklarından klinik olarak önemsizdir. Ancak bazıları yaygın karmaşık hastalıkların patogeneze katkıda bulunup fonksiyonel etkiye sahiptirler

[Marian et al., 2011]. Bir hastalıktan etkilenen bireylerin oluşturduğu popülasyonda, bir risk alleli veya genotipinin sıklığının artmış olması, ilgilenilen varyantın belirli bir hastalık riskini arttırdığı sonucuna varılmasına yol gösterebilir [Fiatal and Ádány 2018].

1.1.6. Genetik Polimorfizm

Bir topluluktaki bireyler, DNA dizilerinde %99,9'a kadar benzerlik gösterebilirken, genetik varyasyonlar popülasyon yapısı ve işlevi üzerinde büyük bir etkiye sahip olabilirler [Shastry, 2002]. Genetik polimorfizm, bir polimorfizm için tipik olan gen dizileri, kromozom yapısı veya bir fenotip bakımından en az iki varyantın varlığıdır [Daly, 2010]. İnsan genomunun nispeten büyük boyutundan dolayı polimorfik DNA'ya rastlama olasılığı oldukça yüksektir. Genetik çeşitlilik, tek baz çifti değişimi, birçok baz çifti değişimi, transpozonlar (Alu tekrarları), yapısal değişiklikler, kopya sayısı değişimleri ve çeşitli sayılarda tekrarlanan dizilerden (minisatellitler ve mikrosatellitler) oluşan çok çeşitli varyasyonları içerir. Polimorfizmler çekirdek veya mitokondri düzeyinde gerçekleşebilir. Polimorfizm ya rekombinasyon ile ya da tesadüfi süreçlerle sonuçlanabilen veya radyasyon gibi dış etkenler tarafından indüklenmek suretiyle meydana gelebilir [Buckingham, 2012].

Polimorfizm türleri; DNA tekrarları, serpiştirilmiş tekrarlar veya tandem tekrarlar olarak sınıflandırılan polimorfik tekrarlayan diziler, yapısal ve kopya sayısı varyasyonları, spesifik bir nükleotit dizisinin eklendiği veya silindiği bir DNA varyasyonu olan ekleme/delesyon polimorfizmleri ve tek nükleotid polimorfizmleri olarak ayrılabilir. Tek nükleotid polimorfizmleri, insan genomundaki yüksek yoğunluklu doğal dizi varyasyonlarıdır [Xu et al., 2009]. SNP'ler en yaygın genomik değişkenlik türüdür ve genomda neredeyse ortalama 1000 bç'de 1 meydana gelir [Shastry, 2002]. İnsan genomundaki bollukları nedeniyle insanlarda en yaygın görülen genetik varyasyon türüdür. Genomun bazı bölgeleri SNP'ler açısından diğer bölgelerden daha zengindir. SNP'ler çoğunlukla genomun kodlamayan bölgelerinde bulunur ve bireyin fenotipi üzerinde çoğunlukla doğrudan bilinen bir etkiye sahip değildir, ancak şimdiye kadarki rolleri belirsizdir ve SNP'lerin nerede meydana geldiğine bağlı olarak fenotipik düzeyde farklı sonuçları olabilir [İsmail 2012]. Tek nükleotid polimorfizmleri, bollukları ve yüksek verimli analiz teknolojilerinin mevcudiyeti nedeniyle, genetik haritalar oluşturmak ve hastalıklarla ilgili

ilişkilendirme çalışmalarını yürütmek için önemli genetik belirteçlerdir [Xu et al., 2009]. SNP'ler insan genomundaki önemli varyasyon kaynaklarıdır ve DNA dizileme teknolojileri ile uygulanabilirlikleri sayesinde insan hastalıklarının, popülasyon genetiğinin ve evrimsel çalışmaların haritalanması için mükemmel genetik belirteçler olarak hizmet ederler. Bu nedenle, tüm genomu veya belirli ilgi bölgesini kapsayan ve sistematik bir taramaya izin veren SNP'lerle oluşturulmuş genotipleme panelleri, kardiyovasküler hastalıklar dahil yaygın hastalıklara duyarlılığı araştırmak için kullanılan güçlü genetik belirteç kaynaklarıdır [Abbate et al., 2008].

Genetik varyasyonlar işlevsel olarak patojenik, olası patojenik, önemi belirsiz, olası iyi huylu ve iyi huylu olarak sınıflandırılabilir. Genetik varyasyonların büyük çoğunluğunun önemli biyolojik etkileri yoktur. Büyük fenotipik etkilere neden olan genetik varyasyonlar, genellikle Mendel kalıtım kalıpları sergileyen tek gen bozukluklarından sorumludur. Poligenik bozukluklar, her biri küçük, ayırt edilemez etkilere sahip, ancak bir araya geldiklerinde ve ayrıca genetik olmayan faktörlerle etkileştiklerinde, fenotip riskini etkileyen genetik varyasyonlardır. Poligenik bozuklukların en önemlisi, Dünya çapında geniş ölçekte ölümlere sebebiyet verdiği için koroner arter hastalığıdır. Koroner arter hastalığı dahil tüm kardiyovasküler hastalıklara hem genetik hem de çevresel faktörler neden olmaktadır. Çevre ile olan etkileşim fenotipi derinden etkiler. Genetik kardiyovasküler durumlar yaşa bağlı olarak görülebilir. Bu nedenle bireyler belirli bir yaşa kadar veya çevresel koşullar sebebiyle yaşam tarzı faktörleri hastalığın fiziksel belirtilerini hızlandırana kadar hastalığın belirtilerini göstermeyebilirler. Bu duruma genellikle hızlı somatik büyüme dönemlerinde erken ergenlik döneminde ortaya çıkan hipertrofik kardiyomiyopati örnek verilebilir [Laing et al., 2019].

1.1.7. Kardiyovasküler Hastalıkların Genetik Altyapısı

KVH'lerin 50 yaşından önce nadiren görülen bir hastalık olması sebebiyle, fenotip üzerinde hastalık veya taşıyıcılık durumunun üreme başarısı üzerinde bir etkisi olmayacağı, dolayısıyla ilişkili genlerin doğal seçilimin baskılarından etkilenmesinin olası olmadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, KVH duyarlılığını etkileyebilecek veya KVH'lere karşı koruyabilecek genetik varyantlar geçmişte muhtemelen nötr bir şekilde evrimleşmiş olacaktır. Bu açıdan bakıldığında KVH'lerle ilişkili genler geniş bir frekans yelpazesinde görünebilmektedir [Braund, 2015]. Bu düşünce, yaygın

karmaşık bozukluklara asıl katkıda bulunanların % 1-5'in üzerinde bir sıklıkta görülen ortak genetik varyantlar olduğunu belirten "yaygın hastalık/ortak varyant" hipotezinin temelidir. Hipoteze göre ilişkili genlerin 100.000 yıl boyunca, ata popülasyonlarında çok az seçime tabi tutuldukları veya hiç seçilmedikleri için nispeten istikrarlı oldukları kabul edilmektedir [Lander, 1996]. Bu hipoteze alternatif olarak, "yaygın hastalık/nadir varyant" hipotezi de ileri sürülmüştür. Bu hipoteze göre, yaygın hastalığın ana nedeni olan allelik heterojenite veya çoklu lokuslara sahip çok sayıda büyük etkili nadir genetik varyant (<%1) vardır. Bunların zararlı yapıları nedeniyle nadir oldukları kabul edilir [Pritchard, 2001].

Genetik kardiyovasküler hastalıklar; kromozomal bozukluklar (doğuştan kalp kusurları, doğuştan kalp hastalığı), tek gen veya monogenik hastalıklar (kardiyomiyopatiler, kalıtsal aort hastalıkları) ve multigenik/multifaktöriyel bozuklukları (iskemik kalp hastalığı, ateroskleroz, diyabet) içerir. KVH'ler yalnızca kalbi veya damarları etkileyebilmelerinin yanı sıra sendrom olarak çok daha kompleks bir şekilde ortaya çıkabilirler [Arbustini et al., 2011].

1.1.8. Kardiyovasküler Hastalıklarla İlgili Genlerin Keşfi

Genetik faktörler hemen hemen tüm kardiyovasküler hastalıklarda önemli rol oynamaktadır. Bu faktörler, ateroskleroz ve hipertansiyon gibi yaygın karmaşık fenotiplere yatkınlık yaratır. Genetik kusurlar, insan doğum kusurlarının en büyük oranını oluşturan kalp ve kan damarlarının malformasyonlarından sorumludur. Doğuştan kalp hastalığının tahmini insidansı, tüm canlı doğumların yaklaşık % 1'dir.

Moleküler genetik çalışmalar başta kalp-damar hastalıkları olmak üzere birçok bozukluğun genetik temeli ve patogenezinin açıklanmasına olanak sağlamaktadır. Kardiyovasküler hastalıkların genetik temelinin kısmen açıklanması, çeşitli hastalıklar için rutin genetik testlerin yapılmasına olanak sağlayarak, doğru bir genetik temelli teşhis ve müdahaleye olanak tanımıştır [Marian et al., 2011].

KVH'lerle ilişkili genlerin keşfi için iki ana yaklaşım olan bağlantı analizi ve genetik ilişkilendirme yöntemleri kullanılmıştır. KVH'lerin Mendel formları için yapılan DNA dizilimleri ve bağlantı analizleri ilişkili genleri ve mutasyonları başarılı bir şekilde tespit etmiştir [Laing et al., 2019]. Lehrman ve ark. (1985), yaptıkları bir çalışmada homozigot ailesel hiperkolesterolemiye sahip bir hastada LDL reseptör

genini dizilemiş ve Mendel yasalarına uygun olan KVH için bir mutasyonda birkaç ekzonu ortadan kaldıran 5 kB'lık bir delesyonu tespit etmiştir. Geisterfer-Lowrance ve ark. (1990), yaptıkları bir çalışmada hipertropik kardiyomyopati ile ilgili bir genin kromozomal lokasyonunu tespit etmek için bağlantı analizi yöntemini kullanmıştır. 1980'li yıllardan beri tek gene bağlı oluşan KVH'lardan sorumlu genler için çok sayıda keşif yapılmıştır.

Yeni nesil dizileme yöntemleri ile KVH'lerin çeşitli Mendel formları için ilişkili yeni genleri tanımlamak için tüm ekzom dizileme ve tüm genom dizileme yöntemleri başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Moleküler biyoloji alanındaki teknolojik avantajlar, genetik nedensellik hakkında bilgi sağlasa da patojenitenin tahmini ve oluşan bir genetik varyantın klinik sonuçlarının yorumlanması bu yöntemlerle oldukça zordur. Bu sebeple klinik fenotipi ve mekanizmayı karakterize etmek için en uygun olan yöntem hayvan modellerinden elde edilen *in vivo* verilerdir. Bu sayede yapılan fonksiyonel değerlendirmeler ile hastalık patofizyolojisine aday bir varyantın rolünü açıklamak için en güçlü ve iyi doğrulanmış strateji uygulanmış olur. Bu yöntem sayesinde genetik varyantlar ile hastalık ilişkileri ortaya konmuştur [Bournele et al 2016]. Bunun yanında, hayvan modellerinin insan fenotipini tam olarak tanımlamakta başarısız olması sebebiyle son yıllarda KVH'larla ilişkili gen varyantları ve hastalık ilişkisini tespit etmek amacıyla kök hücreler ve programlanmış hücreler kullanılmaktadır [Laing et al 2019]. Ek olarak Zebra balığı, KVH'lerle alakalı gen araştırmalarında deneysel model organizma olarak kullanılmaktadır. Kalp gelişimleri ve kalp hastalıkları ile ilgili araştırmalarda kullanılmak için ideal organizmalardır. Zebra balığı kalp gelişimleri hızlı ilerler ve döllenmeden sonraki 48 saat içinde iki odacıklı kalpleri oluşur. Bu sebeple gen nakavtlarının araştırılmasında hızlı sonuç almak mümkündür. İnsan ve zebra balığında kalp hastalıklarına sebep olan genlerin %84'ü ortaktır. Zebra balığı kalpleri yaşamları boyunca yenilenme yeteneklerini koruduklarından insan kalp yenilenmesini anlamak için doğru bilgiler sağlar [Ntusi et al., 2016].

1.1.8.1 Kardiyovasküler Hastalıklarla İlişki Genler

- MTHFR C677T Mutasyonu dbSNP ID: rs1801133 ve A1298C dbSNP ID: rs1801131

MTHFR, homosisteinin metionine remetilasyonu için metil grupları sağlayan ve DNA metilasyonunun sürdürülmesi için ortak metil donörü olan, S-adenosil metionin sağlayan folatın dolaşımdaki baskın formu olan 5-metil-tetrahidrofolattan sorumludur. Yani, 5-metiltetrahidrofolat, vitamin B-12'ye bağımlı enzim metionin sentaz tarafından homosisteinin metionine remetilasyonu için metil donörü görevi görür. Düşük hücre içi homosistein konsantrasyonları, sisteine transsülfürasyon veya metionine remetilasyon yoluyla korunur.

MTHFR hem kanser hem de kardiyovasküler hastalıkta rol oynar. Şimdiye kadar, araştırma grupları plazma total homosistein konsantrasyonları ile serebral, koroner, periferik ve venöz tromboz dahil olmak üzere çeşitli vasküler hastalıklar arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. Artan plazma total homosistein konsantrasyonları, B-12 vitamini, folik asit veya B-6 vitamini eksikliklerinden ve başlıca iki enzim olan MTHFR ve sistatyonin b-sentazdaki genetik kusurlardan kaynaklanabilir.

MTHFR geni, kromozomal bölge 1p36.3 ile eşlenmiştir. MTHFR geninde meydana gelebilecek iki varyant (form) mutasyonu vardır; C677T ve A1298C. MTHFR (metilentetrahidrofolat redüktaz) geninin 677. nükleotidindeki C>T değişikliği, MTHFR aktivitesinin azalmasına neden olarak homosistein düzeyinde artışa neden olabilmektedir. MTHFR'de oluşan mutasyon, kardiyoserebrovasküler hastalıklar için önemli risk faktörlerinden hiperhomosisteinemi ve homosisteinüri oluşumuna neden olmaktadır [Stern et al., 2000]. Bu durum, nöral tüp defektleri, tromboembolizm, ateroskleroz veya koroner arter hastalığına sebebiyet verebilmektedir.

Homosistein, metabolizması iki metabolik yolun (transsülfürasyon ve remetilasyon) kesiştiği noktada olan kükürt içeren bir amino asittir. Transsülfürasyon sırasında, enzim sistatyonin b-sentaz, bir kofaktör olarak vitamin B-6 kullanarak homosistein ve serinin sistatyonine geri dönüşümsüz bir yoğunlaşmasını katalize eder. Remetilasyonda, homosisteinin metionine dönüşümü için metil donörü, 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) enzimi tarafından 5,10-metilen-tetrahidrofolatın 5-metil-tetrahidrofolata indirgenmesiyle sağlanır [Andreassi et al., 2003], [D'Angelo & Selhub, 1997], [Bakker and Brandjes, 1997], [Mayer et al., 1996], [Selhub et al., 1995], [Andreassi et al., 2003].

CC (Alanin/Alanin) homozigot normal, CT (Alanin/Valin) heterozigot ve TT (Valin/Valin) homozigot mutant genotipler görülebilmektedir [Ozdemir et al., 2012].

Çeşitli popülasyonlar üzerinde yapılan bazı araştırmalar, MTHFR C677T mutasyonu için TT homozigotluk ile tromboz riskinin 2-3 kat artması, erken ateroskleroz riskinin artması, nöral tüp kusurları ile komplike olan gebelikler dolayısıyla erken evrelerde tekrarlayan gebelik kayıpları ve venöz tromboz arasında bir ilişki olduğunu göstermiştir. T/T genotipi, kardiyovasküler hastalık için ortak bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir [Friedman et al.,1999].

MTHFR (metilentetrahidrofolat redüktaz) geninin 1298. nükleotidindeki A>C değişikliği, MTHFR aktivitesinin azalmasına neden olarak plazma homosistein konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki heterozigot A1298C ve heterozigot C677T polimorfizmlerini birlikte bulunduran bireylerde homosistein düzeyleri yükselmektedir [van der Put et al., 1998], [Weisberg et al., 1998].

- Faktör V G1691A G>A (Leiden) Mutasyonu dbSNP ID: rs6025

Aktive protein C (APC), koagülasyon mekanizmasında faktör Va ve faktör VIIIa'yı inaktive etmektedir. Faktör V Leiden'in oluşumuna neden olan G1619A mutasyonun bulunduğu bölge, APC'nin Faktör Va'yı yıktığı üç kesim noktasından birisidir. Faktör V mutasyonu varlığında bu inhibisyon gerçekleşmemekte, APC'ye rezistans gelişmekte böylece trombin üretimi ve pıhtı oluşumu artmaktadır. Faktör V Leiden, Faktör Va'ya göre 10 kat yavaş yıkılır. GA heterozigot taşıyan bireylerin venöz tromboz riski 3-8 kat artarken, hamilelik sürecinde venöz tromboz riski 8 kat, gebelik kaybı, fetal büyüme gerilikleri ve preeklampsi riski 2-3 kat, plasental ablasyon 5 kat artmaktadır. Mutasyonu homozigot taşıyanlarda venöz tromboz riski 9-80 kat, gebeliğe bağlı gelişen venöz tromboz riski 20-40 kat artmaktadır [Rosendaal and Reidsma 2009], [Robertson et al., 2006], [Martinelli et al., 2001].

Aktive Protein C Dirençliliği (APCR), protein C, faktör V Leiden, protrombin20210 G>A mutasyonu, antitrombin III ve protein S yetersizlikleri vasıtasıyla artan lipoprotein seviyesi kaynaklı doğumsal trombofilik kusurları, venöz tromboz riski için yaygın risk faktörleri arasındadır [Junker et al., 1999]. Faktör V Leiden, protrombin20210 G>A ve MTHFR mutasyonlarının arteriyal trombotik hastalıklar için yaygın risk faktörleri oldukları ortaya konmuştur [Price and Ridker, 1997].

- Faktör V C306G C>G Cambridge dbSNP ID: rs118203906

Faktör V Cambridge mutasyonu ise, 306. pozisyondaki kodonda arginin amino asidinin (AGG) tirozin amino asidine (ACG) değişimini içermekte ve bu durum APC'ye neden olmaktadır. Thr306 ile ilişkili APC direncinin derecesi, Gln506 mutasyonundan kaynaklanan durum ile aynıdır. Trombin üretimi, protrombinaz kompleksinin bir fosfolipid yüzeyinde toplanmasına bağlıdır. Aktifleştirilmiş faktör V formu (faktör Va), kompleksin bir bileşenidir. Aktifleştirilmiş protein C tarafından faktör Va'nın bölünmesi, protrombinaz aktivitesini ve dolayısıyla trombin oluşumunu sınırlar. Faktör Va'nın etkisizleştirilmesi, Arg506'da APC tarafından ardışık bölünme yoluyla meydana gelir, ardından kofaktör aktivitesinin kaybıyla Arg306 ve Arg679 tarafından takip edilir. Arg306'daki bölünme, bu aktivitenin yaklaşık %70'inin kaybından sorumluyken, Arg679'daki bölünme, yaklaşık %30'unun kaybından sorumludur. Faktör V Cambridge mutasyonu yaygın bir polimorfizm değildir ve APC direncinin nadir rastlanan bir sebebidir [Kalafatis et al., 1995], [Heeb et al., 1995], [Aparicio et al., 1996].

- Faktör II G20210A G>A (Protrombin) dbSNP ID: rs1799963

rs1799963, çok daha yaygın olarak protrombin F2 geninin G20210A mutasyonu olarak bilinen bir SNP'dir. Karşılık gelen proteinin Faktör V proteini ile etkileşimleri nedeniyle, bu iki pıhtılaşma faktörü SNP'leri genellikle birlikte incelenir. Özellikle, rs1799963 sıklıkla rs6025 ile incelenir. Mutasyonu homozigot taşıyanlarda tromboz riski 7 kat, serebral inme riski 2-20 kat artmaktadır. Mutasyonu heterozigot taşıyanlarda tromboz riski 2.8 kat artarken serebral inme riski normale göre artmaktadır [Web9].

- Anjiyotensin C4072T C>T dbSNP ID: rs699

Renin anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS) arter basıncının ana düzenleyicisidir ve önemli bir endokrin ve parakrin sistem olarak hipertansiyonun patogenezinde anahtar rol oynar. Araştırmalar, RAAS kodlayan genlerin genetik varyasyonlarının, hipertansiyon ve antihipertansif tedavinin genetik temeli ile güçlü bağlantıları olduğunu göstermiştir. Artmış hipertansiyon riski, anjiyotensinojen (AGT), anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) ve anjiyotensin II reseptörü 1 (AGTR1) ile ilişkilendirilmiştir. Anjiyotensinojen, karaciğer tarafından salgılanan ve plazmanın α 2-globulin fraksiyonunda bulunan bir proteindir. Renin enzimi, AGT'yi keserek anjiyotensin I oluşturur ve ACE geni tarafından kodlanan dipeptidil karboksipeptidaz

olarak ACE veya kinaz II, aktif hormon anjiyotensin II'yi üretir. AGT genindeki M235T polimorfizmi, beyaz ırkta hipertansiyon ile ve T alleli için homozigot olan bireylerde plazma anjiyotensinojen düzeylerinde %10-20'lik bir artış ile ilişkilendirilmiştir. rs699 fonksiyonel bir değişikliği kodlayan anjiyotensin AGT genindeki bir SNP'dir. C alleli treonin varyantını kodlamakta ve sonuçta yüksek kan basıncı, hipertansiyon ile ilişkili bozukluklar için artan riske yol açmaktadır. CC Mutasyonu homozigot taşıyanlarda ve CT mutasyonu heterozigot taşıyanlarda hipertansiyon riski artmaktadır.

ACE, hem vasküler endotel hücrelerinin yüzeyinde zara bağlı bulunan hem de kan plazmasında dolaşıp kan basıncının düzenlenmesinde ve elektrolit dengesinde rol alan kritik bir enzimdir. AGTR1 geni tarafından kodlanan anjiyotensin 2 reseptörü tip 1, anjiyotensin II'nin majör kardiyovasküler etkilerine aracılık eder ve vazokonstriksiyon, artmış arteriyel kan basıncı ve miyokardiyal kontraktilite gibi etkilere yol açar [Simonyte et al., 2017].

- Apolipoprotein B (APO B) R3500Q C>A C>T dbSNP ID: rs5742904

APOB geni, kanda yağları ve kolesterol gibi yağ benzeri maddeleri taşıyan parçacıklar olan apolipoprotein B-48 ve apolipoprotein B-100 yapmak için talimatlar sağlar. Karaciğerde üretilen Apolipoprotein B-100, diğer birçok lipoprotein türünün bir bileşenidir. Spesifik olarak, çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (VLDL'ler), orta yoğunluklu lipoproteinlerin (IDL'ler) ve düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL'ler) bir yapı taşıdır. Bu moleküllerin tümü, kan dolaşımında yağları ve kolesterolü taşır. Bunlardan biri olan LDL'ler, kandaki kolesterolün birincil taşıyıcıları olup Apolipoprotein B-100 ile ilişkilidir. Apolipoprotein B-100, LDL'lerin hücrelerin yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanmalarına aracılık eder. Bağlanmanın ardından reseptörler LDL'leri hücreye taşır ve burada kolesterolü serbest bırakmak için parçalanırlar. Kolesterol daha sonra hücre tarafından kullanılır, depolanır veya vücuttan çıkarılırlar [Web10].

ApoB LDL reseptörü ile etkileşime girme yeteneği hem genin dizisine hem de konformasyonuna bağlıdır. Uygun dizi ve konfügrasyon, insanlarda plazma kolesterolünün düzenlenmesi için esastır. APOB genindeki mutasyonlardan insan sağlığını etkileyen iki genetik lipid metabolizması bozukluğundan biri ailesel

hipobetalipoproteinemi (OMIM: 107730) diğeri ailesel ligand kusurlu apoB-100'dür (OMIM: 107730) [Whitfield et al., 2004].

Ailesinde hiperkolesterolemi öyküsü olan bazı hastalarda, reseptörü bağlayan düşük yoğunluklu lipoprotein bileşeni olan apolipoprotein B geninde kusur vardır. Bu ligand kusuruna ailesel kusurlu apoB denir. Genin yaygın bir mutasyonu, orta ve batı Avrupa'da 1/7001/1000 kişide meydana gelen R3500Q'dur. Bu mutasyona sahip kişilerde koroner hastalık riski, genel popülasyona göre yedi kat daha fazladır. Etkilenen bireylerdeki kolesterol konsantrasyonları, LDL reseptör geninde anormallikleri olan ailelerdeki konsantrasyonlara kıyasla, zaman içinde aile üyeleri arasında ve bireyler içinde daha fazla değişiklik gösterme eğilimindedir [Day et al, 2001]. Apolipoprotein B gen mutasyonu, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörüne kusurlu bağlanmaya ve hiperkolesterolemiye neden olur. Bu mutasyon lipid metabolizmasında anormalliğe neden olup, ateroskleroz riskini artırır [Raj et al., 2015].

- Anjiyotensin II reseptör tip 1 A1166C A>C dbSNP ID: rs5186

rs5186, AT2R1 veya AT1R olarak da bilinen anjiyotensin II reseptör tip 1 geni AGTR1'in 3' UTR bölgesinde bulunur. CC Homozigot mutant allel taşıyıcısı olan hamile kadınların hamileliğe bağlı hipertansiyon geliştirmesi olasıdır. AC heterozigot mutant allel taşıyan bireylerde hipertansiyon görülme olasılığı 2 kat daha fazladır [Web11].

- Fibrinojen -463G>A G>A dbSNP ID: rs1800790

rs1800790 polimorfizmi fibrinojen seviyelerinde artışa neden olmakta ve miyokard enfarktüsü ile felç gibi arteriyal hastalıklarla ilişkilendirilmektedir. Homozigot 455 A>A durumunun gebelik kaybı riskinin arttığı gözlemlenmiştir [Zöller et a 1994], [Scarabin 2003].

- Janus Kinaz 2 V617F C>G dbSNP ID: rs10974944

JAK2 geni içinde rs10974944 olarak adlandırılan tek bir nükleotid polimorfizminin, JAK2 V617F dönüşümüne temel oluşturan haplotipin bir parçası olduğu bildirilmiştir. JAK2 rs10974944 SNP, JAK2 V617F pozitif miyeloproliferatif neoplazmaların gelişimine yakınlıkla ilişkilidir. Bu mutasyonu, JAK-STAT sinyal yolunun aktivasyonuna ve dolayısıyla miyeloid öncülerinin sürekli çoğalmasına yol açar. Bu mutasyonda C alleli ortak allelken, G alleli varyanttır [Trifa et al 2010].

- Apolipoprotein E T>C dbSNP ID: rs429358, C>T dbSNP ID: rs7412

Apolipoprotein E (apoE), hücre yüzeyi apoE reseptörlerine bağlanarak plazmada kolesterol ve diğer lipidleri taşıyan ve veren çok işlevli bir proteindir. LDL reseptörü için bir ligand görevi görür ve kolesterolden zengin lipoproteinlerin plazmadan temizlenmesinde önemli bir role sahiptir [Day et al 2001]. İnsan ApoE geni rs429358 ve rs7412 kombinasyonları ile polimorfik yapıdadır. Bu polimorfizmler 3 ana izoform ($\epsilon 2$, $\epsilon 3$ ve $\epsilon 4$) oluşturur. Bu izoformlar ise plazma lipidleri ve lipoproteinleri güçlü bir şekilde etkiler. ApoE geninin $\epsilon 4$ allelinin taşıyıcıları, taşıyıcı olmayanlara göre daha yüksek toplam lipoprotein ve düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol seviyelerine sahiptir. Bu nedenle, $\epsilon 4$ alleli genel popülasyonda kalp hastalığı için güçlü bir genetik risk faktörüdür [Zhen et al., 2017]. $\epsilon 4$ alleli, genel popülasyonun yaklaşık %30'unda bulunur ($\epsilon 3$ en yaygın alleldir). $\epsilon 3/\epsilon 4$ allellerine sahip heterozigotlar, $\epsilon 3/\epsilon 3$ homozigotlarından ortalama %10 daha yüksek kolesterol konsantrasyonlarına sahiptir. Bu fark, koroner olaylara kadar uzanır, ancak $\epsilon 4$ alleli ile ilişkili risk, kolesterol seviyeleri üzerindeki etkisinden belirtilenden daha büyük görünmektedir. $\epsilon 2/\epsilon 2$ genotipi vasküler hastalık riskini artırırken, yüksek koroner ve periferik vasküler hastalık riski ile ilişkili olan ve popülasyonun %0.010.02'sinde görülen tip III disbetalipoproteinemi ile sonuçlanır. $\epsilon 3/\epsilon 3$ genotipi tekrarlayan gebelik kayıpları için koruyucu faktör görevindedir [Day et al 2001]. $\epsilon 4/\epsilon 4$ genotipinin ise kardiyovasküler hastalığa sahip bireylerde ölüm riskini %40 arttırdığı gösterilmiştir [Zhen et al 2017].

- Protein C Reseptör A>G dbSNP ID: rs867186, C>G dbSNP ID: rs9574

Birçok genetik ve kazanılmış faktör, doğal antikoagülasyon sürecini engellemekte ve bu da hiper pıhtılaşma durumuna ve nihayetinde trombüs oluşumuna neden olmaktadır. Protein C sistemi, bu faktörlerden etkilenen, trombin-trombomodulin kompleksi tarafından aktive edilen, doğal olarak oluşan en önemli antikoagülanlardan biridir. Bu aktivasyon, bir endotelial hücre yüzeyi reseptörü olan EPCR tarafından güçlendirilir. PROCR geni, 20q11.2 kromozomunda yer alan ve dört ekzon ve 3 introndan oluşan bu reseptörü kodlar. Yapılan çalışmalar, EPCR'yi engellemenin trombüs gelişimini hızlandırabileceğini raporlamıştır. Birçok çalışma, PROCR geninin ekzon 4'ünde rs867186 polimorfizminin varlığı ile venöz tromboz riski arasında bir ilişki olduğunu bildirirken, bazı çalışmalar da 3'UTR polimorfizmi (rs9574) ile azalmış tromboz riski arasında bir ilişki olduğunu raporlamıştır [Abuagla et al., 2016].

- CDKN2B dbSNP ID: rs1333049, CDKN2B-AS1 A>G dbSNP ID: rs2383207, CDKN2B-AS1 : İtron Varyantı A>G dbSNP ID: rs10757274

9p21 yerleşik polimorfizmi, rs1333049 ve rs2383207'nin KAH veya KAH şiddeti ile ilişkisi farklı popülasyonlarda doğrulanmıştır [Ashok-Kumar et al., 2011], [Ye et al., 2008]. CDKN2B geni, rs1333049 SNP numarasıyla kromozomal bölge 9p21.3 ile eşlenmiştir [Leu et al., 2019]. Kromozom 9p21 lokusu, koroner arter hastalığı riski için majör bir lokus olarak tanımlanmıştır. CDKN2B-AS1, vasküler endotelial hücrelerde ve koroner düz kas hücrelerinde eksprese edilir. CDKN2B-AS1'in genetik varyantları KVH ile ilişkilidir. Önceki çalışmalar, CDKN2B-AS1 polimorfizmlerinin beyin hastalıkları, gut, miyokard enfarktüsü ve kanserler dahil olmak üzere birçok hastalığa duyarlılıkla ilişkili olduğunu göstermiştir [Kashyap et al., 2018]. Kromozom 9p21.3 üzerindeki tek nükleotid polimorfizmi rs1333049, KAH ve miyokard enfarktüsü ile güçlü bir şekilde ilişkilendirilmiştir. Artmış arteriyel sertliğin 9p21 polimorfizmi ile artmış kardiyovasküler risk arasındaki bağlantı olabileceği düşünülmektedir [Phababpha et al., 2013]. Mutasyonu homozigot taşıyanlarda koroner arter hastalık riski 2 kat artarken, mutasyonu heterozigot taşıyanlarda kardiyovasküler hastalık riski 1,5 kat artmaktadır.

CDKN2B-AS1 gen bölgesi 9p21 kromozomunda CDKN2B-CDKN2A gen kümesi içinde yer alır. Bu bölge, kardiyovasküler hastalık için önemli bir genetik yatkınlık bölgesi olmakla birlikte, erken miyokard enfarktüsünün en güçlü genetik belirleyicisidir. Bu bölgedeki SNP'ler ayrıca inme, abdominal aort anevrizması ve intrakraniyal anevrizma riskinin artmasıyla da ilişkili olmaktadır. Heterozigot ve mutant homozigot bireylerde kalp hastalıkları riski yaklaşık 1,3 kat artmaktadır [Web13], [Web14].

- Faktör XIII V34L C>A dbSNP ID: rs5985

Fibrin, bir kan pıhtısının ana bileşenidir. Kan pıhtılaşmasının son aşamasında, trombin fibrinopeptid A ve B'yi fibrinojenden ayırarak fibrin oluşturur ve fibrin monomerlerinin liflere polimerizasyonunu başlatır. Faktör XIII-A, ana fizyolojik işlevi fibrin polimerlerini güçlendirmek ve onları fibrinolitik mekanizma tarafından ani bozulmadan korumak olan bir transglutaminazdır. Birçok çalışma, FXIII-A gen polimorfizmlerinden Val34Leu (rs5985) ile miyokard enfarktüsüne yatkınlık arasındaki ilişkiye odaklanmıştır [Chen et al., 2014]. En dikkat çekici olanı Chen ve

ark. 2014'te yaptıkları çalışma sonucuna göre FXIII Val34Leu polimorfizminin miyokard enfarktüsü için koruyucu bir faktör olduğunun tespit edilmesidir. Bu mutasyon trombinin FXIII üzerinde proteolitik aktivite gösterdiği bölgeyi etkileyerek FXIII'ün aktive edilmesini engellemektedir **[Balogh et al., 2000]**. L34 varyantının göze çarpan bir özelliği, FXIII'nin daha hızlı aktivasyonuna yol açan trombin tarafından geliştirilmiş bölünmesidir. Yapılan çalışmalarda, L34 varyantının trombin tarafından daha yaygın V34'ten daha verimli bir şekilde hidrolize edildiğini doğrulanmıştır **[Anokhin, 2018]**.

- İntegrin Beta (ITGB veya HPAI a/b İnsan Trombosit Antijeni 1) T1565C T>C dbSNP ID: rs5918

Trombosit membran yapışkan protein reseptör kompleksi GP IIb/IIIa'nın beta alt birimi, ITGB3 geni tarafından kodlanan, hücre yüzeyi aracılı sinyalleşmeye ve hücre yapışmasına katılan bir yüzey proteindir **[Khatami and Heidari, 2016]**. İntegrin Beta Trombosit agregasyonunda rol oynamaktadır **[Ye et al., 2006]**. Ekson 2 bölgesindeki (T1565C, dbSNP ID: rs5918) polipeptit zincirinin 33 pozisyonunda oluşan bir mutasyon (PIA1/A2) miyokard enfarktüsü, koroner kalp hastalığı, tip 2 diyabet, astım, kolon, dahil birçok hastalık türünün risk faktörüdür. Normal allel A1 (a) olarak ifade edilir **[Gerhardt et al., 2014]**. A2 alleli tek başına özellikle kalp hastalığında rol oynarken, PAI1 geninin 4G alleli olan rs1799889 mutasyonu ile kombinasyon halinde olursa miyokard enfarktüsü riski 4 kat artmaktadır **[Khatami and Heidari, 2016]**.

- Plazminojen Aktivator İnhibitor Tip 1 (PAI-1) 4G/5G dbSNP ID: rs1799889

Tip 2 diyabet, genetik heterojenitesi olan, genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi olan bir hastalıktır. PAI-1 geni diyabetle ilişkili komplikasyonları başlatır. Bu role ek olarak, hücre dışı matris bozulmasında da engelleyici bir rol oynar. Artan PAI-1 ekspresyonu, ekstrasellüler matriks birikimine neden olarak böbrek hastalığının gelişmesine yol açabileceğinden diyabetik nefropatinin patogenezinde de önemli bir rol oynar. PAI-1 geni, kromozom 7'de bulunur ve 9 ekzon ve 8 intron içerir. 4G/5G (rs1799889) polimorfizmi, PAI-1 gen promotör bölgesinde bulunur ve ekleme/silme varyasyonundan kaynaklanır. Son yıllarda, birçok çalışma, öncelikle diyabetik koroner arter hastalığı, diyabetik nefropati üzerinde yoğunlaşarak, PAI-1 geninin rs1799889 polimorfizmi ile diyabet ve diyabetik komplikasyon riski arasındaki ilişkiyi

göstermiştir [Bayramoğlu et al., 2020]. Bayramoğlu ve ark. 2020 yılında Doğu Karadeniz Türk popülasyonu ile yaptıkları çalışmada PAI-1 geni rs17999889 polimorfizminin Tip 2 Diyabet ile ilişkili olduğu ve bu polimorfizm Doğu Karadeniz Türk popülasyonunda Tip 2 Diyabetin genetik biyobelirteci olarak kullanılabileceği sonucuna varmışlardır. Benzer olarak Xu ve ark. (2016) yaptığı bir çalışmada PAI-1 rs17998889 polimorfizminin diyabet gelişimi ve ilerlemesi ile ilgili olduğu sonucuna varmıştır. 2008 ve 2013 yıllarında sırasıyla Saely ve ark. tarafından ve Zhao ve ark. tarafından tip 2 diyabet hastaları ile yapılan başka çalışmalarda da rs17999889 polimorfizminin tip 2 diyabet ile ilişkili olduğunu bildirilmiştir.

- Lenfotoksin- α C804A C>A dbSNP ID: rs1041981

Lenfotoksin- α , damar iltihabının erken evrelerinde üretilen, arteriyel ateroskleroz oluşumunda ve koroner kalp hastalığının gelişiminde rol oynayan önemli bir sitokindir. LTA üretimini kodlayan gende meydana gelen mutasyonlar, koroner kalp hastalığının gelişimini olumsuz yönde etkiler [Shmidt et al., 2018]. Shmidt ve ark. (2018), LTA genindeki (rs1041981) A alleli ve A/A genotip polimorfizminin, beş yıllık gözlem boyunca olumsuz kardiyovasküler olayların gelişimi ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. AA genotipli hastalarda, Lymphotoxin- α genindeki rs1041981 polimorfizmi, AC veya CC genotipi olan hastalara kıyasla kardiyovasküler olaylarda 3,8 kat artış ve daha yüksek miyokard enfarktüsü riski ile ilişkilendirilmiştir.

- Nitrik Oksit Sentaz -786T>C T>C dbSNP ID: rs2070744, G894T G>T dbSNP ID: rs1799983

L-argininin Nitrik Oksite (NO) oksidasyonu Nitrik Oksit Sentazlar (NOS'lar) tarafından katalize edilir. NO üreten enzimlerin bir izoformu, endotel hücrelerinde yapısal olarak eksprese edilen endotelyal Nitrik Oksit Sentaz'dır (NOS3). Bu enzimin hem vaskülogenez hem de anjiyogenezde önemli bir rol oynadığı bulunmuştur. Nitrik oksit sentazlar, kromozom 7q35-q36 üzerinde bulunan NOS3 geni tarafından kodlanır. NOS3 geni, eNOS olarak bilinen NOS3'ü kodlar [Förstermann and Sessa, 2011].

Endotelyal nitrik oksit sentaz (eNOS) enzimi. üç farklı gen tarafından kodlanan üç farklı izoformdan oluşur: nöronal (nNOS veya NOS-1), indüklenebilir (iNOS veya NOS2) ve endotelyal (eNOS veya NOS-3) [El-Lebedy, 2018]. L-argininin L-sitrüline dönüşümünü içeren, nikotinamid adenin dinükleotit fosfat tarafından sağlanan beş elektronun transferini içeren bir reaksiyon yoluyla yapısal olarak nitrik oksidi

sentezler. Sentezlenen nitrik oksit depolanmadan hızlıca salınır. Nitrik oksit üretimi, eNOS enziminin ekspresyonu veya aktivitesindeki değişiklikler veya aktive edici kofaktörlerin veya endojen inhibitör moleküllerinin mevcudiyetindeki değişiklikler yoluyla düzenlenir. Endotelden gelen nitrik oksit, önemli bir ateroprotektif aracı olarak kabul edilir ve nitrik oksit oluşumunda kazanılmış mutasyonlar, kardiyovasküler risk faktörlerindeki artışlarla ilişkilidir [Casas et al., 2006].

Endotelyal nitrik oksit mevcudiyeti sentez düzeyinde düzenlendiğinden, eNOS'u kodlayan gen, kardiyovasküler hastalık için bir adaydır. NOS3 genindeki fonksiyonel varyasyonlar henüz tam olarak tanımlanmamıştır. İşlevsel olduğu varsayılan üç varyant (-786T>C (rs2070744)), intron 4 27-baz çifti tekrarı ve Glu298Asp (rs1799983) tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar neticesinde -786C (s2070744) varyantı olan kişilerde daha düşük eNOS mRNA ve serum nitrit/nitrat seviyeleri bulunmuştur [Casas et al., 2006]. Glu298Asp (G894T, rs1799983), 894. nükleotidinde G'den T'ye dönüşümden kaynaklanan, 7q35-36 kromozomu üzerinde bulunan NOS-3 geninin klinik olarak en önemli polimorfizmlerinden biridir. Bu polimorfizm, azaltılmış NO üretimi ile ilişkili olup, yapılan çalışmalarda hipertansiyon, ateroskleroz ve KVH gelişiminde rol oynadığı gösterilmiştir [El-Lebedy,2018]. Bu SNP'yi homozigot CC taşıyan bireylerde romatoid artrit görülme olasılığı artarken, TT taşıyan bireylerde kardiyovasküler mortalite söz konusu olmaktadır [Web12].

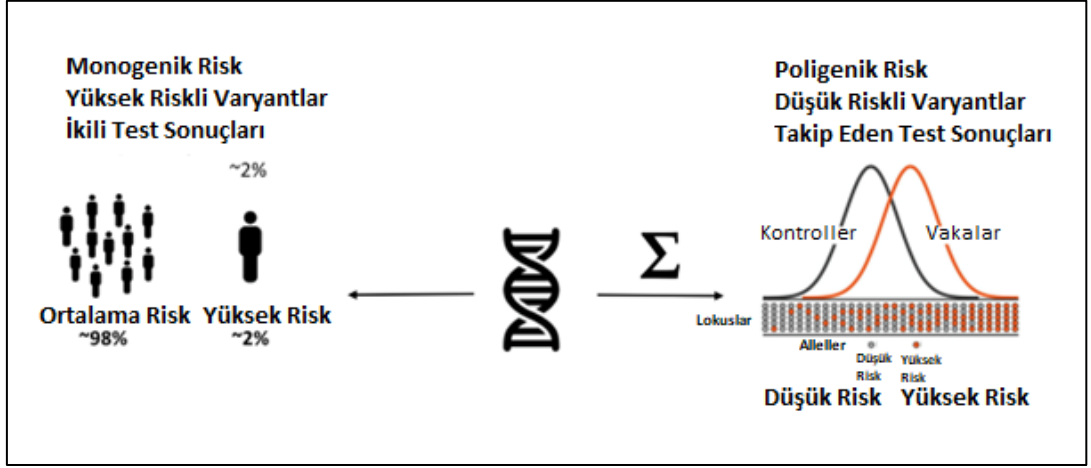
1.1.9. Kardiyovasküler Hastalıkların Kalıtılabilirliği

Kalıtılabilirlik, tamamen genetik etkilerden kaynaklanan hastalık fenotipindeki varyasyon miktarı olarak tayin edilebilir. Son yıllarda KVH'lerin moleküler temeli ve spesifik gen mutasyonları ve varyantlarının etkileri ile aile öyküsünün birlikte değerlendirilmesi anlayışı gelişmiştir. Bu gelişmeler sayesinde, genler ve biyoloji arasındaki bağlantı, birincil risk tahmini, hastalık teşhisi ve terapötik hedefleme için yeni bir genomik tıp çağını başlatmıştır.

KVH'ler tek gen bozukluğu veya poligenik bir durum olarak ortaya çıkabilir. Aragam ve ark. (2020) poligenik skorların genom boyunca >6 milyon ortak tek nükleotid polimorfizmine (SNP) dayalı olduğunu ve bu polimorfizmlerin genel popülasyonda koroner arter hastalığı riskini güçlü bir şekilde tahmin ettiğini ve KVH' nin önlenmesi

için faydalı olabileceğini bildirmiştir. Kardiyovasküler özelliklerle ilişkili birkaç genetik lokus, aday gen ve bir dizi genetik varyantı test eden genom çapında ilişkilendirme çalışmaları tarafından, özellikle farklı atalara ve etnik kökene sahip popülasyonlarda vaka kontrol çalışmalarında tanımlanmıştır. Bu amaçla gerçekleştirilen ikiz çalışmaları, KVH ile ilgili olarak kalıtsallığın anlaşılmasında büyük ölçekte yardımcı olmuştur. 21.004 monozigotik veya dizigotik İsveç ikizini takip eden İsveç İkizleri Kayıt Defterinden elde edilen sonuçlar, kalıtım ve erken KVH arasındaki bağlantıyı açıkça göstermiştir [Marenberg et al., 1994]. Burada, tek yumurta ikizlerinden birinin 55 yaşına gelmeden KVH'dan ölmesi durumunda, tek yumurta ikizleri için %8.1 dizigotik ikizler için %3.8'lik bir ölüm oranı tespit edilmiştir. Dönüm noktası olan Framingham Kalp Çalışmasının bir parçası olan Framingham Offspring Study, ikizlerin ötesinde, ebeveyleerin erken KVH öyküsüyle ilişkili olarak aile öyküsünün, KVH'nin gelecekteki gelişimi için bağımsız ve ileriye dönük bir risk faktörü olduğunu göstermiştir [Lloyd-Jones et al., 2004].

Ailesel hiperkolesterolemi gelişiminde düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörünü kodlayan LDLR mutasyonlarında olduğu gibi, hastalığa sebebiyet verecek derecede kodlanmış ürünün işlevini değiştiren spesifik tek gen mutasyonları vardır. Ancak koroner arter hastalığı gibi yaygın karmaşık hastalıklar, çoğu zaman, her biri küçük bir etkiye sahip olan birden fazla gen varyantının kümülatif etkilerinin sonucudur. Ancak bu durum, gen varyantları biriktikçe daha yüksek genetik hastalık riski oluşturabilmektedir. Bunlar poligenik hastalıklardır. KVH'ler hem monogenik hem de poligenik kökenlere sahiptir. **Şekil 1.2'**de özetlendiği gibi, KVH'ler ve diğer birçok yaygın hastalık için genetik riskler monogenik ve poligenik olarak ikiye ayrılarak incelenebilir. Monogenik risk varyantları, genetik riske büyük etkileri olan, az sayıda genetik mutasyon ile oranlıdır. Poligenik risk varyantları ise, bireylerde genetik riske daha az etkileri olan ancak monogenik risk etkilerinden daha önemli olabilecek kümülatif etkilere yol açarlar. Poligenik KVH durumunda, genetiğin rolünün, ortalama bir bireyin genel hastalık riskinin %50'sini oluşturduğu, diğer yarısının yaşam tarzına ve çevreye atfedildiği düşünülmektedir [Muse et al., 2021].



Şekil 1.2: Kardiyovasküler hastalıklar genetiğine özet bir bakış [Muse et al 2021’den alıntıdır]

Genom boyunca polimorfik DNA markörlerini kullanan bağlantı çalışmaları ve genom çapında bağlantı analizleri, kardiyovasküler hastalıklarla ilgili genlerin tanımlanması için yararlı bir yöntem sağlar. Genom çapında birçok bağlantı çalışması, KVH patogenezinde yer alan değişkenleri etkileyen nicel genetik lokusların belirlenmesine katkıda bulunmuştur. Genetik çalışmaların meta-analizleri, ilişkilendirme çalışmalarının ölçüsünü sağlar, böylece hastalığa yatkınlığı etkileyebilecek aday genlerin belirlenmesine katkıda bulunur. Aday genler, lipid metabolizması (APOE), fibrinolitik proteinler (PAI-1), renin-anjiyotensin sistemi (ACE) ve homosistein metabolizması (MTHFR) ile ilgili olarak araştırılmıştır. Son zamanlarda, genom boyunca yayılmış SNP’lerin kullanımına dayanan ortak tek nükleotid polimorfizmlerinin genom çapında panelleri de mevcut hale gelmektedir. Bu yaklaşım, KVH’lardaki gen-gen ve gen-çevre etkileşimlerini ince bir şekilde araştırmaya ve ilaç yanıtında genetik polimorfizmlerin katılımını aramaya katkıda bulunur [Abbate et al., 2008].

1.1.10. Kardiyovasküler Hastalıklarda Klinik Riskler ve Genetik Tanı

Ailede kalp hastalığının olup olmadığını belirlemek için yapılan ilk işlem bir tıbbi genetik doktoru tarafından kişiye özel soyağacı çizmektir. Aile üyelerinin tıbbi geçmişi hakkında bilgiler edinilir, üyelerden hangilerinin hastalık belirtilerine sahip olduğu işaretlenir, böylece kalıtım modeli belirlenerek kimlerin hastalık riski altında olduğu belirlenmiş olur. Bu işlemlerden sonra risk altındaki kişiler genetik testlere

yönlendirilir. Bu amaçla kişilerden genellikle kan örneği alınarak DNA dizisi incelenip ilgilenilen hastalıkla ilgili patojenik mutasyonlar taranır.

Kalıtımsal kalp hastalıkları riskinin taranması için genetik testler şu amaçlarla uygulanır:

- Kalıtsal kalp hastalığı olan veya olduğundan şüphelenilen bir kişide tanının netleştirilmesi
- Bir ailede kalp hastalığının nedeninin belirlenmesi
- Hangi aile üyelerinin, ailenin kalp rahatsızlığını geliştirme riski altında olduğunun tahmin edilmesi
- Hastalığa neden olan bir mutasyonun çocuklara geçmesini önlemek için preimplantasyon genetik tanı dahil aile planlaması için seçeneklerin değerlendirilmesi [Cirino and Ho, 2013].

Genetik test sonucunun hastaya bildirilmesine, test sonrası genetik danışmanlık eşlik eder. Test sonucunda, hastalıkla ilişkili genlerde bir veya birden fazla varyant ortaya çıkarsa, varyantların hastalığa neden olma olasılıklarına göre yorumlanması gerekir. Yorumlamada standardizasyonu sağlamak için ACMG ve Moleküler Patoloji Derneği, varyantları 5 kategoride sınıflandıran bir varyant yorumlama bilgisi yayınlamıştır: iyi huylu (benign), büyük olasılıkla iyi huylu (likely benign), önemi belirsiz (uncertain significance), olası patojenik (likely pathogenic) ve patojenik (pathogenic) [Richards et al., 2015].

1.1.11. Dünya’da ve Türkiye’de Kalp ve Damar Hastalıkları

Koroner kalp hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar, konjenital kalp hastalıkları, periferik arter hastalığı, hipertansiyon, romatizmal kalp hastalıkları, kalp yetmezliği ve kardiyomiyopati kalp ve damar hastalıkları grubuna dahil edilen, Dünya çapında yaygın ve bulaşıcı olmayan hastalık tipleridir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 2018 verilerine göre Dünya genelinde bulaşıcı olmayan hastalıklardan kaynaklanan erken yaşta ölüm sayısı (30-70 yaş arası) 15 ile 20 milyon arasında tanımlanmıştır. Ölüm oranının en büyük payını ise kardiyovasküler hastalıklar oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü’nün güncel verilerine göre kardiyovasküler hastalıklar (KVH), küresel

ölümlerin üçte birini oluşturmaktadır. Dünya çapında tüm KVVH ölümlerinin yüzde seksen beşi miyokard enfarktüsü ve felç sebebiyle olmaktadır [Web10].

2009 yılı Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) verilerine göre Türkiye’de görülen dolaşım sistemi hastalıkları %39,8 değerindeyken, 2010 – 2019 yılları arasında sırasıyla %39,6, %38,8, %37,9, %39,6, %40,4, %40,1, %39,8, %39,5, %38,4 ve %36,8 ile her yıl ülke genelindeki tüm ölüm nedenleri arasında ilk sırada yer almıştır. Bu hastalık kaynaklı ölümlerin görüldüğü ilk dört şehir sırasıyla Aydın (%47,2), Denizli (%47), Kırıkkale (%46,2) ve Çanakkale (%44,2)’dir [Web3], [Web4], [Web5], [Web6], [Web7].

Kardiyovasküler hastalıklar genetik, çevresel ve yaşam tarzı bileşenlerini içeren çok faktörlü bir hastalıktır. Bu hastalıkların gelişim ve seyrinde; tütün kullanımı, alkol kullanımı, sağlıksız besleme, obezite, fiziksel hareketsizlik gibi davranış tarzları ve bunlara ek olarak diyabet (Tip I ve Tip II), hipertansiyon, yüksek kan kolesterolü gibi hastalıklar yer almaktadır. Olumsuz davranış tarzları ve bazı hastalıklara ek olarak yaş, cinsiyet, düşük doğum ağırlığı, çocukluk çağı alışkanlıkları ve hatta küreselleşme ve şehirleşmenin de etkisi önemsenecek derecededir [Web10]. KVVH’lerin başlangıç yaşı ve şiddeti **Tablo 1.1**’deki risk faktörlerine bağlıdır. Yaşam tarzındaki küçük bir değişiklik bile bireyin ve toplumun genel durumunda iyileşmeye yol açabilmekle beraber, KVVH riskini azaltıp kardiyovasküler morbidite ve mortaliteyi azaltmaya yardımcı olacaktır.

Tablo 1.1: Artmış KVH'lerin majör risk faktörleri [Braund, 2015'ten modifiye edilmiştir]

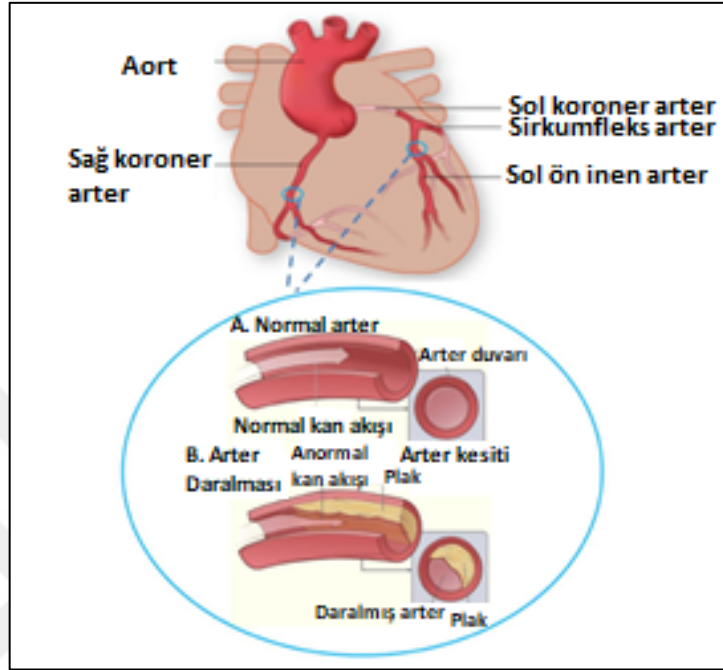
Kardiyovasküler Hastalık Risklerini Artıran Faktörler ve Kahtım Skorları		
Önlenebilir Risk Faktörleri		Önlenemez Risk Faktörleri
Sağlıksız beslenme Aşırı alkol tüketimi (%35-60) Stres Enfeksiyon Sigara içmek (%49-56) Hava kirliliği Fiziksel aktivite eksikliği (%25-60)	Hipertansiyon Yüksek total kolesterol ve yüksek LDL (%40-75) Tip 2 Diyabet (%40-80) Obezite Böbrek Hastalıkları Total trigliserid (%40-80) Uyku apnesi Metabolik Sendromlar Trombotik Semptomlar Hipertrigliseridemi, Homosistein seviyesi (%45)	Yaş, Vücut kütle index (%25-60) Fibrinjen (%20-50) Cinsiyet (Erkek bireylerde risk fazladır) Hastalıkla ilişkili aile öyküsü Etnik faktörler

Kardiyovasküler hastalıkların çoğu yukarıda bahsi geçen davranışsal risk faktörlerinin kontrol altına alınması yoluyla uygulanacak toplumsal stratejiler sayesinde önlenabilir [Web10].

Kardiyovasküler hastalıklar uzun yıllar boyunca veya bireyin tüm yaşamı boyunca asemptomatik olabilir. Klinik olarak belirgin olduğunda genellikle angina pectoris, miyokard enfarktüsü, kalp yetmezliği veya ani kardiyak ölüm sendromlarından biri veya daha fazlası olarak ortaya çıkmaktadır [Regieli et al., 2007].

En sık görülen kardiyovasküler hastalık türü koroner arter hastalığıdır [Braund, 2015]. Koroner arter hastalığı, bir kişinin bireysel, çevresel, yaşam tarzı ve genetik faktörlerinin karmaşık etkileşiminden kaynaklanır. Bu hastalık kısaca, koroner arterlerin (kalp kasını besleyen kan damarları) kalp kasının işlevi için sürekli ihtiyaç duyduğu oksijen ve besin açısından zengin kanla besleyen arterlerin aterosklerozu olarak tanımlanır. Bu, koroner arter kan damarı duvarlarının lipid yüklü plaklar tarafından yavaş yavaş daralmasıyla sonuçlanan, on yıllarca süren kademeli bir süreçtir. Bir plak tarafından oluşturulan kan akışının engellenmesi, miyokardiyal enerji taleplerini aştığında hastalığın belirtileri ortaya çıkar. Bu, arz-talep uyumsuzluğu eşliğine ulaşıldığında kan damarı daralması veya aterotrombotik tıkanmanın olduğu bir durum olan, kalp kasında oksijen (miyokard) ve besin kaynağı eksikliğine neden olan iskemi semptomlarına yol açar ve nihayetinde göğüs ağrısına veya aylar içerisinde

aşamalı olarak eforla nefes darlığına yol açabilir veya akut kalp krizi ile sonuçlanarak hızlı ve öngörülemeyen bir şekilde ilerleyebilir (Şekil 1.3) [Muse et al., 2021, Braund, 2015].



Şekil 1.3: Kalp içindeki koroner arterlerin konumunu ve arter duvarındaki aterosklerozun bir kesitini gösteren şema [Braund, 2015’ten alıntıdır].

KVH kaynaklı ölümlerin %75’inden fazlası düşük ve orta gelirli ülkelerde görülmektedir., yüksek gelir düzeyindeki ülkelerde azalmaktadır. Yüksek gelir düzeyindeki ülkelerde hem toplumsal hem de bireysel müdahalelerin birlikte kullanımı ile son 20 yılda kalp ve damar hastalıklarından kaynaklanan mortalitenin düştüğü ve risk faktörlerini azaltma çalışmalarının etkili olduğu görülmektedir [WHO, 2013].

1.1.12. Genetik Hastalıklara Neden Olan Mutasyonların Tespit Yöntemleri

Genomun ve potansiyel gen tedavilerinin daha doğru anlaşılması için yeni teknolojilerin geliştirilmesiyle mutasyonların tespiti, genetik hastalıkların tanısı, preimplantasyon genetik tanı, doğum öncesi tanı, presemptomatik testler, doğrulayıcı tanı ve adli/kimlik testleri dahil olmak üzere genetik tanının çeşitli alanlarında giderek daha kritik bir role sahip olmaktadır. Genetik sendromlarında tespitinde farklı

moleküler test yöntemleri kullanılmaktadır (Tablo 1.2). Teşhis için doğrudan yaklaşım, esas olarak hastalıktan sorumlu olan genetik varyasyonların saptanmasına bağlıdır. Moleküler teşhis yöntemleri ile DNA varyasyonları belirlenerek bozuklukların genetik nedenlerinin yanı sıra bir hastalığa yatkınlık veya tedavi seçenekleri ortaya çıkarılabilmektedir. Mutasyon tespiti için çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Uygun bir yöntemin seçilmesi için nükleik asit türü (DNA veya RNA), numune türü (tükürük, kan, doku gibi), mutasyon sayısı ve yöntemin güvenilirliği gibi kriterlerin karşılanması gerekmektedir [Mahdieh and Bahareh, 2013]. Bilinen mutasyonları tanımlamak için birçok farklı yaklaşım kullanılabilir. Genellikle polimeraz zincir reaksiyonu ile başlayarak, mutasyon tipine bağlı olarak ek adımlar gerçekleştirilir.

Genetik tanıda önemli bir araç olan SNP genotiplemesi günümüzde farklı patolojilerin teşhisi için oldukça değerli bir yöntemdir. Genotipleme yöntemi, ilgilenilen hedef SNP'ler için allel-spesifik ürünlerin çeşitli yöntemler ile üretilmesini ve farklı analiz metodları ile saptanabilmesini içerir [Etlik et al., 2011].

Araştırma ve tanı amaçlı kullanımda genotipleme yöntemleri güvenilir ve uygun maliyetli olmasının yanında çok sayıda örneğin test edilmesine izin verecek kadar hızlı olmalıdır. Bu amaçla kullanılacak her yöntemin maliyet, güvenilirlik, çözünürlük, duyarlılık, kesinlik, doğruluk, uygunluk, iş akışı ve otomasyonun duyarlılığı ile avantajları ve dezavantajları göz önüne alınmalıdır [Etlik et al., 2011].

SNP'leri incelemek için mevcut yöntemlerin bazı sınırlamaları vardır. Örneğin, Sanger dizileme çok sayıda mutasyonu hızla tarayamazken, yeni nesil dizileme yöntemi günümüzde hala pahalılığını korumaktadır. Bir diğer inceleme yöntemi olan PCR-RFLP ise klinikte rutin hasta sonucu vermek için oldukça zaman alıcıdır ve spesifik değildir [Shastri, 2002], [Matsuda, 2017], [Yang et al., 2018]. Bunların yanında Little'ın 1995 yılında yayınladığı ARMS-PCR tekniği, klinikte nokta mutasyonları ve polimorfizmleri saptamak için diğer yöntemlere kıyasla oldukça etkin bir yöntemdir [Bai and Wong, 2004], [Makanga et al., 2015]. Bu yöntemde özel olarak uygulanan allel spesifik primerlerin kullanımı ile heterozigot ve homozigot gen lokusları etkin bir şekilde tespit edilebilmektedir.

Tóth ve ark. 2023'te literatüre kattığı, allel spesifik primerlerin kullanımının floresans PCR yöntemine uyarlandığı VFLASP ise en güncel SNP genotipleme yöntemi olarak sunulmaktadır.

Çoklu allellerin özelliğe katkıda bulunduğu çok sayıda karmaşık hastalıkta, herhangi bir genin veya lokusun etkisi nispeten az olabilir; yine de bu değişiklikler bireyleri yaygın hastalıklara yatkın hale getirebilir. Genomdaki SNP'lerin tespiti ve organizma üzerindeki etkilerinin önemi, insan hastalıklarına yönelik artan riskle bağlantılı allellerin belirlenmesinden [Eberle et al. 2007], gen haritalamasına katkıda bulunmaya [Wang ve Liu, 2006] ve çeşitli türler arasındaki evrimsel benzerliklerin araştırılmasına kadar [Hillier et al., 2007] uzanır. Bugüne kadar, genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) [Ohnishi et al., 2001], [Jiang et al., 2016], mikrodizi [Gunderson et al., 2005], rekabetçi allel spesifik PCR (KASP) [Coggins et al., 2017], TaqMan problemleri [Francisco et al., 2005], kilitli nükleik asit problemleri (LNA) [Johnson et al., 2004] gibi birçok SNP genotipleme metodolojisi geliştirilmiştir. Allel spesifik PCR (AS-PCR) [He et al., 2022], tetra amplifikasyon dirençli mutasyon sistemi (TETRA-ARMS) PCR [Rahaman et al., 2021], rastgele çoğaltılmış polimorfik tespit (RAPD) [Babu et al., 2021], Fosfat- metillenmiş oligonükleotidler [Li et al., 2019], allele özgü oligonükleotid döngü aracılı izotermal amplifikasyon (ASO-LAMP) [Yamanaka et al., 2018], allele özgü döngü aracılı izotermal amplifikasyon (AS-LAMP) [Malpartida et al., 2018], [Liu et al., 2018], [Yongkiettrakul et al., 2017], kısıtlama fragmanı uzunluğu polimorfizmi (RFLP) ve tek iplikli konformasyon polimorfizmi (SSCP) [Hashim ve Al-Shuhaib, 2019] yöntemleri kullanılmıştır. Tek bir genotipleme yöntemi tüm uygulamalar için mükemmel uyumlu olmasa da farklı çalışmalarda kendine özgü avantajları ile tercih edilen genotipleme yöntemleri kullanılmaktadır. Bugüne kadar geliştirilen yöntemlere ek olarak, yeni veya kombine metodolojilerin eklenmesi, test çalışmalarının etkin kullanımı için oldukça önemlidir. SNP'lere dayalı genotipleme çalışmalarının verimli, güvenilir, doğru ve hızlı bir şekilde yürütülmesi için doğruluğu arttırılmış yeni yaklaşımlar zorunludur.

Tablo 1.2: Genetik sendromlarda sıklıkla kullanılan moleküler test yöntemlerine örnekler.

Yöntem	Açıklama	Avantaj/dezavantaj	Mutasyon Tipi
Dizi Analizi	Nükleotid baz diziliminin belirlenmesi yöntemidir.	Kopya sayısı tespitinde başarısızdır. Hedef diziye ait baz dizilimi kesin olarak belirlenir.	Bilinen veya bilinmeyen
Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)	Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA molekülünün farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması ve elde edilen DNA parçalarının jel elektroforez tekniği ile görüntülenmesi yöntemidir.	Mutasyonun restriksiyon bölgesinde olması mutlak şarttır.	Bilinen
Multipleks PCR	Çok sayıda hedef bölgenin aynı anda amplifiye edildiği yöntemidir.	Zaman ve iş gücü kazancı sağlar. Düşük duyarlılık ve hassasiyete sahiptir.	Bilinen
Değişken Parça Uzunluğu Allel Spesifik PCR (VFLASP)	Allele özgü qPCR genotiplendirilme yöntemidir.	Analiz kolaylığı ve güvenilir sonuçlar sağlar. Tek bir testle hedeflenebilen SNP sayısı sınırlıdır. Yalnızca FAM floresans boyası ile test edilmiştir.	Bilinen
Amplifikasyona Dirençli Mutasyon Sistemi (ARMS-PCR)	Mutant ve normal allellerin allel spesifik amplifikasyonu ile kişinin genotipinin saptanmasına dayalı yöntemdir.	Yüksek hassasiyete sahiptir. Herhangi bir bilinen mutasyonu tespit etmek mümkündür.	Bilinen
Nested PCR	İki ardışık PCR içerir. Bu yöntem, numunelerde düşük kopya sayılarıyla şablonları çoğaltmak için kullanılır.	Spesifik olmayan amplifikasyonlar oluşmaz. Artmış duyarlılık ve özgüllük söz konusudur.	Bilinen
Ters Transkriptaz PCR	RNA zinciri ters transkriptaz enzimi kullanılarak tamamlayıcı DNA'sına ters olarak kopyalanır ve PCR ile amplifiye edilir. RNA düzeyinde mutasyonları incelemek için uygun bir yöntemdir.	Tüm RNA tipleri amplifiye olur. Yüksek maliyetlidir.	Bilinen
Gerçek Zamanlı PCR	Hedefin amplifikasyonu, saptanması ve kantifikasyonu için kullanılan yöntemdir.	Artmış özgüllük söz konusudur. Yüksek maliyetlidir.	Bilinen veya bilinmeyen
Multiplex Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA)	Delesyonlar ve duplikasyonların saptanması için kullanılan yöntemdir.	Denatürasyon, Hibridizasyon, Ligasyon, PCR, kapiler elektroforez işlemlerinden dolayı zaman alıcıdır. Kopya sayısının belirlenmesinde oldukça hassastır.	Bilinen veya bilinmeyen
Denatüre Gradient Jel Elektroforez (PCR-DGGE)	Gradient jel elektroforezinde migrasyona bağlı ayrımı sağlayan yöntemdir.	Nokta mutasyonlarının yaklaşık %100'ü tespit edilir.	Bilinmeyen
Tek Zincir Konformasyon Polimorfizmi (SSCP)	Jel elektroforezinde migrasyona bağlı ayrımı sağlayan yöntemdir.	Nokta mutasyonlarının %80-90'ı tespit edilir.	Bilinmeyen

1.1.12.1 ARMS-PCR

Newton ve ark. 1989 yılında, SNP'leri saptamak için, allel-spesifik primerlerin 3' ucunda ek uyumsuz nükleotidlerine sahip olduğu bir PCR yöntemini literatüre kazandırmıştır. Allelleri saptamak için kullanılan diğer tekniklerin aksine, bu yöntem, kesim enzimlerinin kullanımını veya PCR ürünlerinin dizisinin belirlenmesini gerektirmemektedir [Bai and Wong, 2004]. DNA'nın allel spesifik primerler tarafından amplifiye edildiği bir PCR uygulaması olarak SNP genotiplemesi için oldukça verimli bir tekniktir [Gen & Ahmed, 2018], [Little, 1995]. ARMS, tek baz değişiklikleri veya küçük delesyonlar içeren herhangi bir mutasyonu tespit etmek için basit, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Yalnızca hedef allel numune içinde bulunduğu test DNA'sının amplifikasyonuna izin veren ve hedef olmayan allel amplifikasyonuna izin vermeyen diziye özgü PCR primerlerinin kullanımına dayanmaktadır. İncelenen örnek, mutasyonu homozigot taşıyor ise sadece mutant allele özgü PCR ürünü oluşmakta, mutasyonu taşımıyor ise sadece normal allele özgü PCR ürünü oluşmaktadır [Little, 1995]. ARMS-PCR ürününün varlığı veya yokluğu, hedef allelin varlığı veya yokluğunu ifade eder [Little, 1995], [Mahdich & Bahareh, 2013].

İki farklı PCR reaksiyonunda iki alleli çoğaltan geleneksel yöntemlerin aksine, ARMS-PCR tekniği tek bir tüp PCR reaksiyonunda hem yabani tip hem de mutant allelleri çoğaltabilecek teknolojidedir [Etlik et al., 2011].

ARMS-PCR yönteminin multiallelik genotipleme sistemlerine uygulanmasını kolaylaştırmak için Multipleks-ARMS yöntemi geliştirilmiştir. Multipleks-ARMS yönteminde, her biri belirli bir allel için spesifik olan bir dizi ARMS primeri, tek bir tüpte tek bir reaksiyona dahil edilir. Farklı allellere karşılık gelen PCR ürünleri daha sonra uzunluk gibi fiziksel bir özellik sayesinde ayırt edilir [Lo, 1998].

Allel özgüllüğü, amplifikasyon sırasında bağlanma sıcaklığına bağlıdır. 55°C'lik bir bağlanma sıcaklığı ile optimizasyona başlanır ve 3°C'lik sıcaklık artırımları ile optimizasyon sağlanır. Primer bağlanma sorunlarını çözmek için sıcak başlama (Hot start) tekniği önerilir. dATP, dCTP, dGTP ve dTTP' nin her biri için 100 µM'lık bir dNTP konsantrasyonu, çoğu ARMS primeri için uygun konsantrasyon değeridir. Reaksiyon koşullarının yanında döngü koşulları da ARMS-PCR için oldukça önemlidir. 25 döngüde allel spesifikliğı gösteren bir ARMS primeri, 40 döngüde

spesifiktesini kaybedebilir. Ayrıca, kullanılan DNA kalıbının miktarı ARMS-PCR temelli genotipleme çalışmalarının tekrarlanabilirliği için sabit bir değerde tutulmalıdır [Lo, 1998].

- ARMS-PCR Yönteminde Allel Spesifik Primer Tasarımı

PCR primeri tasarılmanın genel ilkeleri, ARMS primerleri için de geçerlidir. Ancak ek tasarım stratejileri kullanılır. **Şekil 1.4** ARMS primerlerinin tasarımına örnek teşkil etmektedir. Kırmızı renk ile gösterilen baz SNP'yi gösterir, allel spesifik bazdır. Mavi renk ile gösterilen baz, ARMS primeri tasarlanırken oluşturulan kasıtlı uyumsuzluktur.

Tasarlanacak ARMS-PCR primerleri aşağıdaki özel özelliklere sahip olmalıdır:

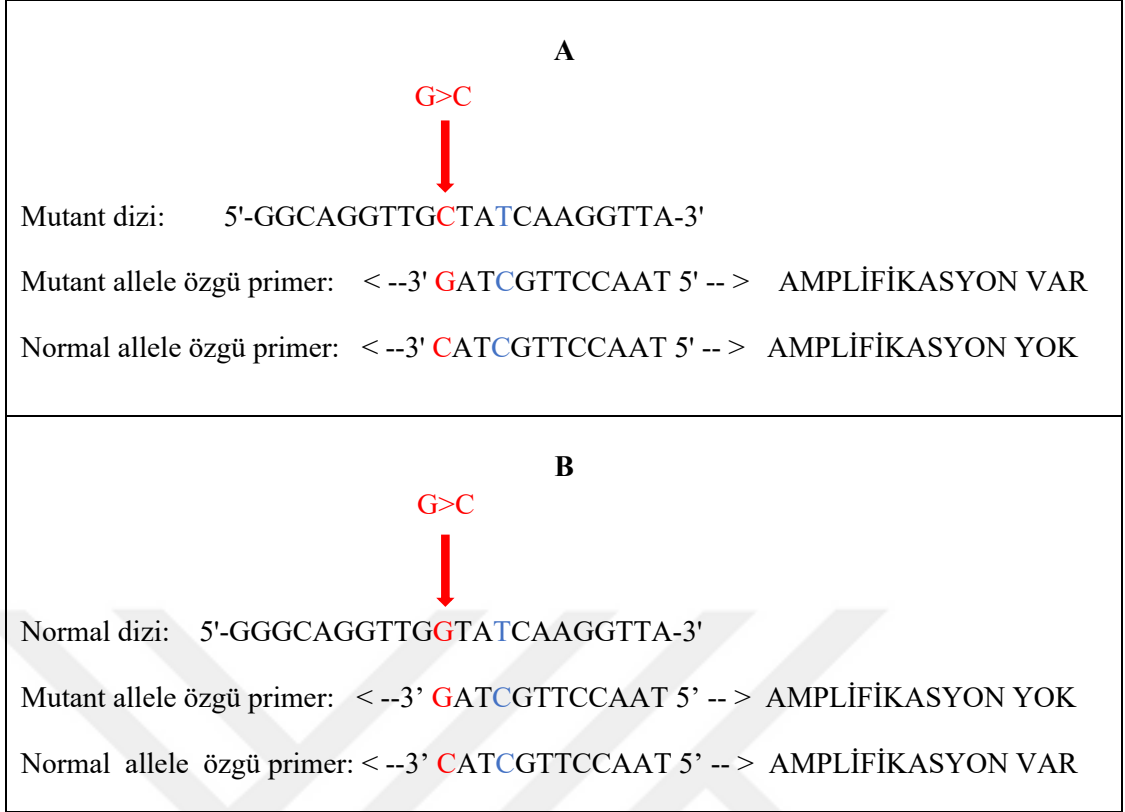
- Primerler genellikle 30 baz uzunluğundadır. Bu uzunluktaki primerler, yüksek bir T_m ve bağlanma sıcaklığına sahip olduklarından hedef bölgeye daha spesifiktir.

- Primerin 3' ucundaki nükleotit, hedef nükleotide tamamlayıcı olmalıdır. 3' ucunda ek bir uyumsuzluk kasıtlı olarak gerçekleştirilir. Bu kasıtlı uyumsuzluk, özgünlüğü ve spesifikliğı önemli ölçüde artırır. Kasıtlı uyumsuzluk için seçilecek bazlarda dikkat edilmesi gereken unsurlar vardır. A:G, G:A ve C:C uyumsuzlukları amplifikasyon için en güçlü ket vurucu uyumsuzluklarken, diğer uyumsuzluklar değişken derecelerde etkilere sahiptir.

- ARMS primerinin son beş nükleotidinden birinde gerçekleştirilecek ek uyumsuzluk, hedefe özgüllüğünü daha da artırır.

- ARMS-PCR reaksiyonlarına ilgilenilen genin mutasyon içermeyen bölgesini amplifiye etmek için tasarlanan PCR kontrolünün dahil edilmesi tercih edilebilir. Hem kontrol bölgesinin amplifikasyonu hem de ARMS primeri tarafından amplifikasyonun gerçekleşmemesi durumunda yapılan çalışma geçersiz sayılır. Bu durum, yanlış negatif sonuç olarak adlandırılır. Bu durumun birkaç nedeni olabilir. Bunlar; çok az veya çok fazla DNA, düşük kaliteli DNA kalıbı, gerekli reaktiflerin eklenememesi veya reaksiyon ortamında PCR inhibitörlerinin varlığıdır.

- Bir ARMS reaksiyonunun duyarlılığı ve özgüllüğü, sınırlandırıcı reaksiyon koşullarının belirlenmesi ile kontrol edilebilir. Yanlış sonuçların önlenmesinde kalıp tasarımının iyi yapılması, daha yüksek bağlanma sıcaklığı ve döngü sayısının sınırlandırılması önemlidir. Reaksiyonda kullanılacak döngü sayısını gereksiz yere artırmak yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir [Gen & Ahmed, 2018].



Şekil 1.4: Little 1995'e göre normal ve mutant alleller için tasarlanan ARMS primer tasarlama stratejisinin gösterimi. A. Mutasyona özgü ARMS primeri ile eşleşen mutant dizi ve eşleşmeyen normal dizi. B. Normal diziyeye özgü ARMS primeri ile eşleşen normal dizi ve eşleşmeyen mutant dizi. Kırmızı renkte işaretlenmiş bazlar, SNP'yi göstermektedir. Mavi renkte işaretlenmiş bazlar, ARMS PCR yöntemi için spesifik olarak tasarlanan, sondan 1 ile 5. bazda yer alabilen, ek uyumsuz bazları ifade etmektedir.

Mutant allele özgü primer için, ARMS primerinin 3' terminal ucu mutasyonu tamamlayıcı olmalıdır; normal allele özgü primer için, 3' terminaldeki baz, karşılık gelen normal diziyeye tamamlayıcı olmalıdır. ARMS reaksiyonunun özgülüğünü artırmak için ARMS primerinin tercihen sondan bir önceki bazına veya genellikle son beş nükleotitten birine ek kasıtlı uyumsuzluklar eklenebilir. PCR'da primerin 3' ucundaki bu uyumsuzluk, amplifikasyonun gerçekleşme olasılığını önemli ölçüde azaltır. Bunun nedeni, Taq polimerazın 3'-5' eksonükleaz düzeltme-okuma aktivitesinin olmamasıdır. Bu nedenle bu aktiviteye sahip olan yüksek kaliteli DNA polimerazlar ARMS-PCR reaksiyonunda kullanılamaz [Gen & Ahmed 2018], [Little, 1995]. Nokta mutasyonlarının veya polimorfizmlerin tanımlanması için son derece kullanışlı bir yöntemdir. İki primerin dahil olduğu tek tüpteki reaksiyona ortak bir karşı primerin dahil edilmesi sayesinde mutant ve normal alleller için reaksiyonlar aynı tüpte gerçekleştirilebilir.

Allel özgüllüğünü artırmak için her iki tip primerin 3' uçlarındaki son beş nükleotitten birine kasıtlı bir uyumsuzluk gerçekleştirildiği için ARMS-PCR tabanlı yöntemler, diğer allel spesifik genotipleme yöntemleriyle karşılaştırıldığında benzersizdir [Etlik et al., 2011].

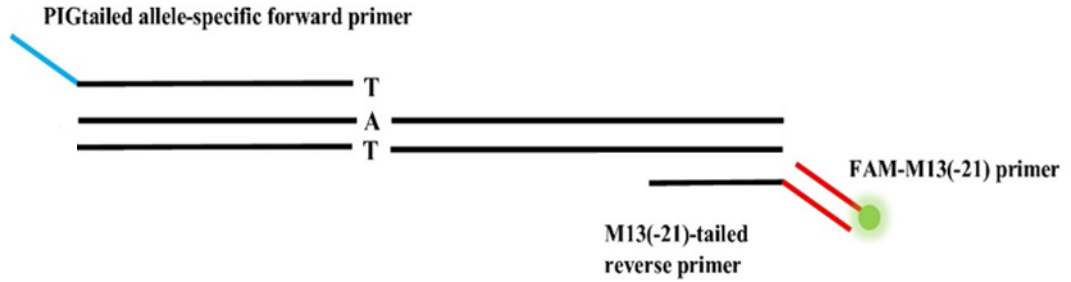
1.1.12.2 VFLASP

Değişken Parça Uzunluğu Allel Spesifik PCR (VFLASP), 2023'te Tóth ve ark. tarafından geliştirilen, temelde PCR yöntemine dayalı, allele özgü SNP genotiplemesinin güncel bir yaklaşımıdır. VFLASP yönteminde, rekabetçi allel spesifik primerlerin bağlanması ile üretilen floresan sinyal sayesinde varyantlar arasındaki farklılaşma, ampikon uzunluklarına bağlı olarak ortaya çıkar. Genotipleme, kapiler elektroforez cihazında DNA fragmanlarındaki farklılıkların analiz edilmesiyle gerçekleştirilir. Yöntem için özel olarak tasarlanan allel spesifik primerler kullanılır. Primerlerin yalnızca 3' ucundaki son baz, SNP dizisine göre farklılık gösterir. Bu yöntemde tek bir boya (FAM) kullanılır ve allele özgü primerlerin her biri farklı uzunlukta bir ampikon üretir. PCR tamamlandıktan sonra genotip belirlenmesi, fragman analizi yöntemi ile okunup, fragman uzunluğuna dayalı olarak hangi primerin amplifiye edildiği analiz edilerek gerçekleştirilir. Tóth ve ark. bu yöntemi 2023 yılında insan modellerinde doğrulamış ve SNP genotiplemesinde yöntemin genel kullanılabilirliğini kanıtlamak için olası altı baz varyantının tümü çalışmalarında test edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre çalışmalarında güvenilir başarı ve yüksek analiz kolaylığı bildirmişlerdir. VFLASP yönteminin avantajı, genotipleme sonuçlarının yorumlanması kolay olmasıdır. Ancak bu yöntemde, tek bir testle yalnızca bir SNP tespit edilebilmektedir.

- VFLASP Yönteminde Allel Spesifik Primer Tasarımı

Yöntemin çalışma prensibi **Şekil 1.5**'te gösterilmektedir. Bu yöntemde, farklı uzunluklarda iki forward primer ve bir reverse primer dizisi kullanılmaktadır. İki forward primer, ilgilenilen SNP'nin bulunduğu 3' ucundaki son bazda değişiklik gösterir. Mavi renkle gösterilen PIGtail, PCR'ın özgüllüğünü arttırmak için 2 forward primerin 5' ucuna eklenen bir adaptördür. Buna ek olarak reverse primerin 5' ucuna M13(-12) dizisi eklenir. Kırmızı renkle gösterilen, FAM-M13(-21) primeri, bu reverse primerin sahip olduğu ek diziye komplementer olarak tasarlanmış ve FAM floresans

boyası ile işaretlenmiş bir oligonükleotid dizisidir. PCR sonuçları, hedef dizinin genotipine bağlı olarak kapiler elektroforezde farklı parça uzunlukları olarak gözlenir.



Şekil 1.5: Tóth ve ark. tarafından geliştirilen VFLASP genotipleme yönteminde değişken uzunluktaki primerlerin tasarım stratejisi.

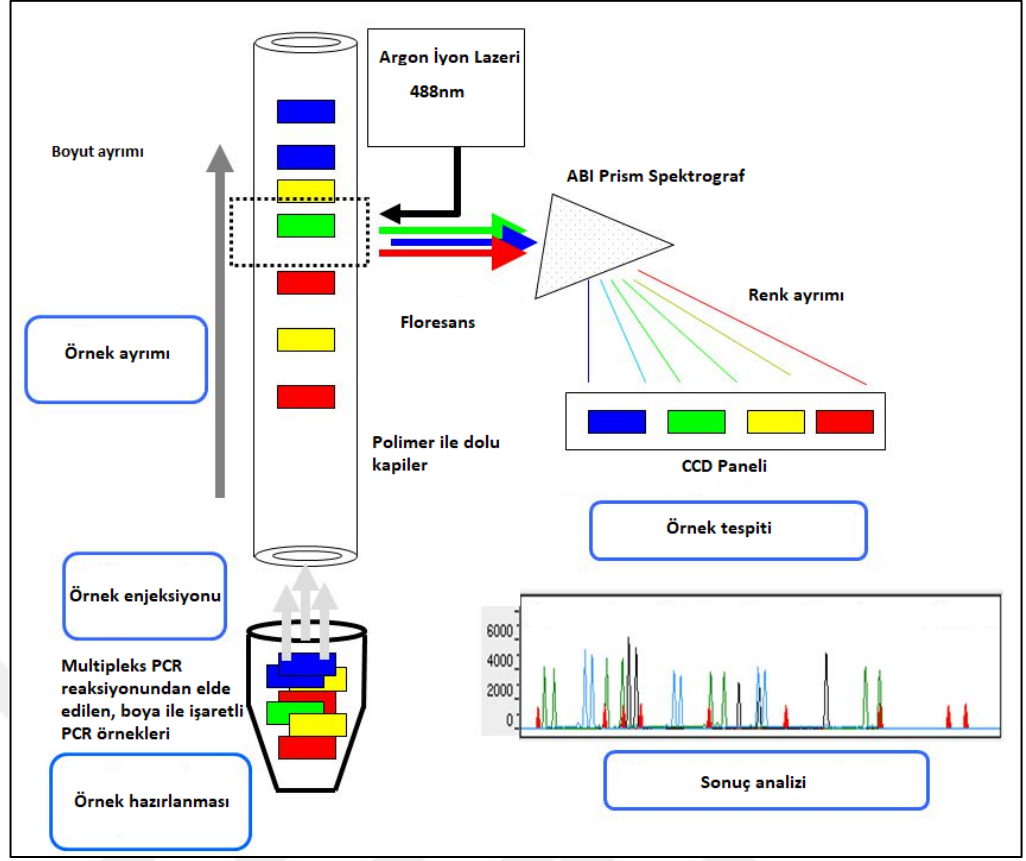
1.1.12.3 Kardiyovasküler Hastalık Riskleriyle İlişkili SNP'lerin Tanı Yöntemi: Kapiler Elektroforez

Günümüzde klinik tanıda DNA sekanslama, çoğu hastalığa neden olan mutasyonların hedef bölgelerde belirlenmesine odaklanmaktadır. Bazı SNP'ler hastalığa neden olan bir sekansla yakın ilişki içindedir. Dolayısıyla SNP'nin varlığı, hastalığın varlığı veya artan bir hastalık geliştirme riski ile ilişkilidir [Rothberg et al., 2011]. SNP'leri kullanarak, belirli bir hastalığı geliştirmenin genetik riskini tahmin etmek, bir hastalığı daha doğru teşhis edebilmek ve hatta bir ilaca verilen terapötik yanıtı tahmin etmek mümkündür. Bu tanı yöntemlerinde asıl amaç, hastaların bireysel genetik profilini dikkate alan tedaviler geliştirmektir. Bu amaçla polimorfizmleri, mutasyonları veya DNA dizisini belirlemeye yönelik bir yöntem olan kapiler elektroforez yönteminde DNA fragmanları farklı mobilitelerine göre bir elektrik alanında ayrılırlar. Ayırma işleminin gerçekleştirildiği kapiler, içerdiği eleme matrisi sayesinde fragmanlar farklı uzunluklarına göre ayrılabilirler. Parça uzunluklarındaki farklılıklar polimorfizmleri ve mutasyonları saptamak için veya diziyi sekanslamak için kullanılabilir. Genetik tanı merkezlerinde kullanımı amaçlanan büyük ölçekteki genetik analizlerin yapılması için yüksek verimli analitik yöntemler gereklidir. Kapiler elektroforez sistemleri yüksek verim analizine uygun olduğundan, ayrıca işletme maliyetleri düşük, yüksek derecede hızlı ayırma yeteneklerine sahip ve kolay kullanılabilir olduğundan bu amaçla kullanım için tüm gereksinimleri karşılamaktadır [Kleparnik & Bocek, 2007].

Kapiler elektroforez, nükleik asitlerin jel bazlı elektroforezinin yerini alabilen güçlü bir analitik tekniktir. Bu yöntemin temeli, yüklü moleküllerin elektrik akımı içerisinde bir solüsyon boyunca hareketidir. DNA fragmanlarını boyutlarına göre ayırmak için kullanılır. Kapiler elektroforezde ayırma işlemi, iç çapı 50-100 mm olan bir kapiler içinde gerçekleşir. Bu değerler arasındaki dar kapilerlerin kullanımı sayesinde yüksek elektrik alanları ile hızlı çalışma süreleri mümkün olmaktadır.

Cihazın kullanımı, 4 adede kadar farklı floresans boya ile işaretlenmiş DNA fragmanlarının birleştirilerek dikey, dar bir kılcal kapiler damar üzerinde tek şeritte yüklenmesini gerektirir. Bu özellik hem DNA sekanslama hem baz çiftlerinde moleküler boyutlandırma hem de moleküler kantitasyon çalışmalarında çalışma sürelerinin ve numune çözünürlüğünün analiz tipine göre optimize edilmesine izin verir. Numuneler yüklendikten sonra voltaj uygulanır. Böylece fragmanlar kapiler boyunca elektroforez yaparak boyutlarına göre ayrılır. Bu esnada bir lazer ışını kılcal kapiler damar boyunca sürekli tarama yapar. Lazer ışını, fragmanlara bağlı floresans boyaları uyarır ve her boya için belirli bir dalga boyunda ışık yayarlar.

ABI Genetic Analyzer cihazı, kapiler elektroforez ile floresans işaretli DNA fragmanlarının analizi için tasarlanmış otomatik bir cihazdır. Günümüzde genetik tanı için en yaygın kullanılan sistemdir. DNA örneklerinin boyut ve renk ayrımları yoluyla işlenmesine yönelik adımlar **Şekil 1.6'** da gösterilmiştir [Butler et al., 2004].



Şekil 1.6: ABI Prism 3110 Genetic Analyzer ile allellerin ayrılmasının ve saptanmasının şematik gösterimi [Butler et al., 2004'ten alıntıdır].

Çoğu kapiler elektroforez sistemi, yüklü molekülleri numuneden kılcal damara taşımak için belirli bir süre boyunca voltajın uygulandığı elektrokinetik enjeksiyon kullanır. DNA negatif yüklü olduğundan, DNA moleküllerini kılcal damara çekmek için pozitif bir voltaj uygulanır [Butler et al 2004]. Numune iyonları farklı hareketliliklere sahip olduklarından, kılcal damardan farklı hızlarda geç ederler. Sonuç olarak, eğer yük/kütle oranındaki farklılıkları yeterince belirginse, iyonlar kılcal damardan nispi göçlerinde ayrılırlar. Bir numune iyonunun net göç hızı, elektroforetik hızının toplamı ile çözeltinin elektroozmotik hızının toplamıdır [Gstöttenmayr, 2011].

Bir kapiler elektroforez kolonuna enjekte edilen DNA miktarı ($[Q_{inj}]$), elektrik alanı (E), enjeksiyon süresi (t), numunedeki gerçek DNA konsantrasyonu ($[DNA_{örnek}]$), kılcal açıklık alanı (πr^2) ve numunenin ($\lambda_{örnek}$) tampona (λ_{tampon}) karşı iyonik gücünün bir fonksiyonudur.

$$[DNA_{inj}] = Et(\pi r^2)(\mu_{ep} + \mu_{eof})[DNA_{sample}](\lambda_{buffer} / \lambda_{sample}) \quad (2.1)$$

Burada r kılcal borunun yarıçapı, μ_{ep} numune moleküllerinin hareketliliği ve μ_{eof} kaplanmış bir kılcal damarda ihmal edilebilir olan elektroozmotik hareketlilik [Butler et al 2004].

Kapiler elektroforez teknolojisi, biyoteknoloji endüstrisi tarafından güvenilir, yüksek çözünürlüklü ve oldukça hassas bir araç olarak kabul edilmektedir. Bu teknoloji oligonükleotid analizi, DNA dizileme ve DNA fragman analizi gibi analizlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Lazer kaynaklı floresans ile kapiler elektroforez, hızlı, yüksek hassasiyetli ve yüksek çözünürlüklü DNA analizi için en güçlü analitik araçlardan biri olarak sayılmaktadır [Liu & Amirkhanian, 2003].

1.1.13. Genetik Tanı Testleri

Hastalıkla ilişkili aile öyküsünün olması durumunda, genetik bozuklukların tespiti için genetik testlerin yapılması önemlidir. Günümüzde yapılan genetik testler aşağıdaki gibidir:

- Taşıyıcı testi: Ebeveynlerin genetik bozukluklarla bağlantılı bir mutasyon taşıyıp taşımadığının tespitini sağlar. Aile öyküsü olmasa bile hamilelik durumu öncesi tüm ebeveynler için önerilir. Çalışma materyali kandan izole edilen DNA'dır.
- Doğum öncesi tarama testi: Hamile kadınlardan alınan kan numunesi ile doğmamış çocuğun bir kromozom rahatsızlığına sahip olma olasılığı tespit edilir. Çalışma materyali kandan izole edilen DNA'dır.
- Doğum öncesi tanı testi: Henüz doğmamış çocuğun belirli genetik bozukluklar için daha yüksek bir riskle karşı karşıya olup olmadığının tespit edildiği testtir. Doğum öncesi testler için çalışma materyali rahimden alınan sıvı örneğidir (amniyosentez).
- Yeni doğan tarama testi: Yeni doğan bebeğin olası genetik bozukluklarını yaşamın erken döneminde tespit etmek, gerektiğinde zamanında bakım ve tedavi almasına yardımcı olan testtir. Çalışma materyali yeni doğan kanından izole edilen DNA'dır [Web15].

1.1.13.1 Genetik Tanı Testlerinin Önemi

Genetik tanı testleri, şüphelenilen genetik hastalığın tanısı için kullanılır. Genetik hastalıklar için genetik testler doğru bir tanı koymanın yanı sıra ek gereksiz klinik araştırmalardan kaçınmanın tek yoludur. Genetik test, klinisyene hasta için en uygun

tedaviyi ve desteği seçmede rehberlik edebilir. Testlerin sonuçları kişinin sağlığının yönetilmesi ve/veya tedavi yöntemi ile ilgili karar verilmesine yardımcı olur.

Her bireyin genomunda ebeveynlerinden kalıtılan bilgiler mevcuttur. Bu bilgiler kişiyi anne ve babasıyla akraba yaparken, oluşan tüm varyasyonlar kişiyi anne babasından kalıtılan özelliklerden ayırır. Varyasyonlar, DNA dizisinde çoğu zaman etkisiz, ancak bazen de zararlı etkisi olan değişikliklerdir. Sadece bir bazın eklenmesi, silinmesi veya başka bir baz ile değişimi proteinin zarar görmesine, fazladan protein üretilmesi veya hiç protein üretilmemesine neden olabilmektedir. Bu durumlar kişinin sağlığına ciddi problemlere yol açabilir. Ailede belirli bir hastalık öyküsü olması, bu hastalığa kişinin genetik yatkınlığı olabileceğini gösterirken, varyasyonlar sebebiyle her bir bireyin genetik yapısı tek başına incelenmelidir [Web15]. Çoğu genetik kalp rahatsızlığı, otozomal baskın kalıtılır. Bu durumda baskınlık, her genin iki kopyasından birinin mutasyonlu olması ve mutasyonlu allelin normal allel baskın olup hastalığa yol açmasına sebep olur. Bu durum, bireyin heterozigot olması durumunda genetik hastalıktan etkilenmesine neden olur. Otozomal baskın genetik hastalıklar bazen kişiyi doğumundan itibaren etkilerken, bazen de yetişkinlik döneminde etkilemeye başlar. Kişinin hastalıktan etkilenmesi için sadece bir mutant alleli taşıması yeterlidir. Bu durum, kişinin %50 ihtimalle hastalıktan etkileneceği anlamına gelir. Ortalama olarak, otozomal baskın kalp rahatsızlığı olan bir ailenin üyelerinin yarısında hastalık gelişir. Mutant alleller düzeltilemez ve kişinin yaşamı boyunca kalıcıdır. Ebeveynlerde çocuğa geçen genlerin normal veya mutant olması rastgele meydana gelmektedir. Bu şans her bir hamilelikte aynı derece olmakla birlikte hem erkek çocuklar hem de kız çocuklar için aynıdır [Web16], [Cirino & Ho, 2013].

1.1.14. KVVH'larla İlişkili Yapılan Çalışmalar

Ailelerde açıkça Mendel ayrımı göstermeyen çok faktörlü ve nicel özellikler üzerinde iyi tanımlanmış etkileri olan belirli fonksiyonel varyantları bulmaya yönelik yaklaşım arayışlarının başlangıç noktası olarak HLA türleri ile ilk çalışmalar yapılmıştır. Belirli HLA türleri ve hastalıklar arasındaki güçlü ilişkilerin ilk keşifleri, bir hastalığın fonksiyonel temeline ilişkin bakış açısı kazanmak için popölasyon ve belirteç ilişkilendirme çalışmalarının kullanımının ilk örnekleridir. Bu çalışmalar, Genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının başlangıç noktasını oluşturmuş ve hastalık nedenselliğine ışık tutan çok daha güçlü belirteç-hastalık ilişkilerinin bulunacağı

umudunu artırmıştır **[Crouch & Bodmer, 2020]**. Genom çapında ilişkilendirme çalışmaları, DNA varyantlarına sahip özellikler veya hastalıklar arasındaki ilişkileri tanımlamayı amaçlayan ve örneklem büyüklüğünün artması ile çalışmanın gücünün arttığı deneysel bir tasarımıdır **[Musunuru & Kathiresan, 2019]**. 2005 yılından bu yana teknolojik gelişmeler, koroner arter hastalığı da dahil olmak üzere poligenik hastalıklara yatkın binlerce lokusun haritalandırılmasına yol açan genom çapında ilişkilendirme çalışmaları (GWAS) gerçekleştirme fırsatı sağlamıştır **[Marian et al., 2011]**. İlk olarak, her bir genetik varyantın düşük bir fenotipik penetrasyona sahip olduğu poligenik Mendel olmayan kalıtım modellerini araştırmak için, aday gen yaklaşımı ve genom çapında bağlantı çalışmaları olmak üzere iki geleneksel yaklaşım üstlenilmiştir. Daha sonraki yıllarda insan genomunun dizilenmesi vasıtasıyla genom çapında ilişkilendirme olarak adlandırılan çalışma ile birkaç milyon tek nükleotid polimorfizmi tanımlanmış ve bunlarla ilişkili bağlantı dengesizliklerinden türetilen haplotipler ortaya konmuştur. Bu yeni yaklaşım, geleneksel genetik yöntemlerle karşılaştırıldığında, hastalıkla ilişkili varyantları çok hızlı bir şekilde tanımlayabilmektedir. Yeni nesil dizilemenin maliyetinin düşmesi, yüksek verimli genotipleme ve gelişen istatistiksel metodoloji sayesinde sürekli gelişen SNP ve haplotip bilgileri ile KVH'larla ilişkili yeni varyantların keşfedilme hızı artmıştır **[Braund, 2015]**. Monogenik Mendel hastalıklarından farklı olarak, popülasyondaki KVH'lerin çoğunluğu, genom boyunca küçük etkilere sahip çok sayıda yaygın ve nadir varyantlara atfedilen poligenik kalıttan etkilenmektedir **[Musunuru & Kathiresan, 2019]**.

Son 10 yılda KVH riskinin genetik taraması/genetik testinin potansiyel klinik ve halk sağlığı uygulamalarına yönelik araştırmalar da hız kazanmıştır. KVH'lardaki ilk genom çapında ilişkilendirme çalışması, 2007'de bağımsız gruplar tarafından eş zamanlı olarak rapor edilmiş ve 9p21 kromozomu üzerinde KVH ile ilişkili bir bölge tanımlanmıştır **[Helgadottir et al., 2007]**, **[Samani et al., 2007]**. Birlikte ele alındığında bu raporlar, KVH'lere sahip vakalar olarak 11.000' den fazla kişiyi ve kalp hastalığı olmayan kontroller olarak 37.000 kişiyi içermektedir. 9p21'deki varyantların, belirli bir protein ürünü veya düzenleyici bölge için kodlama yapmayan bir bölgede bulunduğu ve varyantın hastalık riskini ~%50 oranında artırdığı tespit edilmiştir. Bununla birlikte bazı çalışmalarda KVH gelişiminde trigliseritlerin rolünü vurgulayan LDL olmayan yolları etkileyen nadir ve düşük frekanslı varyantları tanımlamak için

tam genom veya ekzom dizilimi kullanılmıştır **[Global Lipids Genetics Consortium, 2013]**, **[Do et al., 2015]**. Bu perspektifte yapılan çalışmalar ile KVVH'larla ilişkili yaklaşık 20 ek varyant ve daha önce ilişkilendirilmiş varyantların bağımsız doğrulaması yapılmıştır **[Coronary Artery Disease Genetics Consortium, 2011]**, **[Schunkert et al., 2011]**.

2013'te, 63.746 KVVH vakası ve 130.681 kontrolün dahil edilmesiyle, o zamana kadar gerçekleştirilen en büyük KVVH'lerin genom çapında ilişkilendirme meta-analizi, KVVH'larla ilişkili ek 15 lokus bildirmiştir. KVVH'ler ile ilişkili gözlemlenen lokusların toplam sayısı böylece 46'ya yükselmiştir **[Deloukas et al., 2013]**. Bu varyantlardan 17'si kan basıncı ve kan lipidleri ile ilgili yollarda yer almakta idi. Bu veriler, geleneksel klinik risk faktörlerinin dışında bile genom verilerinin KVVH riski üzerindeki etkisini daha da desteklemiş ve KVVH'lerin karmaşık biyolojisinin anlaşılmasına daha da yardımcı olmuştur. Bu erken meta-genom çapında ilişkilendirme çalışmalarının KVVH risk varyantı keşfi ve doğrulamasındaki başarısı ve yeni veri kümeleri KVVH'larla ilişkili varyantların sayısını 160'tan fazla bağımsız lokusa çıkarmıştır **[The CardiogramplusC4D Consortium, 2015]**, **[Howson et al., 2017]**. Yakın zamanda, KVVH'ler ile ilişkili yeni lokusların keşfi için yapılan bugüne kadarki en büyük meta-analiz ile 25.892 KVVH vakasını ve 142.336 kontrolü birleştirerek, KVVH ile ilişkili ek 40 yeni lokus tanımlamıştır **[Koyama et al., 2020]**.

Kardiyovasküler risk tanısı için son yıllarda ticari amaçlı geliştirilen genom çapında yaygın polimorfizm panelleri mevcuttur (Multiplex real-time PCR Anyplex™ Thrombosis SNP Panel Assay kit TS7600X, Multiplex real-time PCR Seeplex® ApoE ACE Genotyping, immunoassay NT-proBNP Assay Kit T1701W Sichuan Xincheng Biological Co., LTD vb). Bu testler, kalp ve damar hastalıklarına yatkınlığın belirlenmesi için kullanımının yanı sıra tekrarlayan gebelik kayıpları olan çiftlerde ilgili doktorlar tarafından sıklıkla talep edilmektedir.

Genetik ve çevresel faktörlerin etkileşimi, kardiyovasküler hastalık vakalarının çoğunluğunu açıklayabilir **[Peyser, 1997]**. KVVH'lerin ortaya çıkmasında ve gelişmesinde genetik faktörler hayati bir rol oynamaktadır **[Cunnington et al., 2010]**, **[Roberts, 2014]**. SNP'ler tek başlarına değerlendirilirken, fenotipte açığa çıkan etkinin tam olarak anlaşılmasının çoğu zaman mümkün olmaması sebebiyle düşük etkiye sahip SNP'lerin bir arada test edilip değerlendirilmesi, etki boyutunun araştırılması ve anlaşılması için en uygun yöntemdir. En yaygın ve en güçlü genetik

risk belirteçlerinin eşzamanlı olarak kullanımı ile hasta ve sağlıklı bireylerin ayırımın doğruluğu, tek başlarına kullanımlarına kıyasla daha ideal bir yoldur [Fialat & Ádány 2018].

Bu amaçla kardiyovasküler hastalıklarla bağlantılı olduğu düşünülen ve klinik açıdan anlamlı olduğu bildirilmiş SNP'lerin tespiti bu tez çalışmasının konusunu oluşturmaktadır. Hedeflenen 23 SNP'ye ait varyant genotiplendirilmesi, bu tez çalışmasında özgün olarak geliştirilen ve literatüre yenilikçi bir metodoloji olarak sunulan VFLASP-ARMS yöntemine dayandırılmaktadır. Bu yöntem, 1995'te Little'dan ve 2023'te Tóth ve arkadaşlarından ilham alan yenilikçi bir metodolojidir. Her iki yöntemin avantajlarını birleştiren VFLASP-ARMS (Şekil 1.7), bu çalışmanın amacına uygun olarak birden fazla SNP'yi eş zamanlı olarak analiz etmek için kullanılmıştır.



Şekil 1.7: VFLASP-ARMS tekniğinde kullanılan allel spesifik rekabetçi primer tasarım stratejisi. Kırmızı renkle gösterilen baz kasıtlı uyumsuzluğu ifade etmektedir.

Allel spesifik ARMS-PCR primerlerinin 3' ucundaki ilk baz ilgili alleleline tamamlayıcı olarak tasarlanmıştır. Reaksiyon sırasında bu tamamlayıcılık sayesinde yalnızca 1 uyumsuz baza sahip olan primer, ilgili allelele bağlanacaktır. Ancak 2 uyumsuz baza sahip olan, diğer allelele spesifik olan primer bu allelele bağlanamayacaktır. 3' ucunda hedefle uyumsuz olan (SNP'ye özgü olan) ARMS primerleri uzamanın önlenmesi için yeterli değildir. Buna karşın bir önceki bazda yapılan ek uyumsuzluk, iki bitişik uyumsuzluğa sebep olup, polimerazın sentezini engeller. Bunun nedeni, Taq polimerazın 3'-5' eksonükleaz düzeltme-okuma aktivitesinin olmamasıdır. Bu yöntemle VFLASP-ARMS allel spesifik rekabetçi primerlerden yalnızca ilgili allelele spesifik olanı amplifikasyonu başlatmaktadır.

ARMS yönteminden ilham alınan allel spesifik primer tasarım tekniği, VFLASP tekniğinin floresan PCR yöntemi ile birleştirilmiş ve sonuçlar, kapiler elektroforez

yoluyla ampikon uzunluğu farkına dayanarak fragman analizi yöntemiyle analiz edilmiştir. Floresan PCR’da allele özgü amplifikasyonun ardından, PCR fragmanının boyutuna dayalı olarak kapiler elektroforez ile allelik ayrımcılığın elde edilmesi hedeflenmiştir. Reaksiyondaki DNA polimeraz, primerin yalnızca 3' ucuna mükemmel tamamlayıcılık gösterdiğinde sentezleme işlemini gerçekleştirebilir. Bu da yöntemin tek bir allel için ayırt edici ve spesifik olmasını sağlamaktadır.

1.2. Tezin Amacı, Katkısı ve İçeriği

Ülkemizde genetik tanı kitlerinin kullanımı ve tedariki açısından karşılaşılan en büyük problem kitlerin temininde ithalata bağımlı olup, yüksek maliyetler ve uzun süren tedarik süreleri ile her iki açıdan büyük kayıplara uğranılmasıdır. Bu bağlamda bu tez çalışmasında özellikle Türk popülasyonuna özgü, kardiyovasküler hastalıklara yatkınlık ile ilişkilendirilmiş, klinik öneme sahip 23 gen bölgesinin allel varyasyonlarını tarayan, yüksek doğrulukta çalışan genetik tanı kiti tasarlanması ve optimizasyon çalışmalarının gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu tez ile ortaya konulacak ticari öneme sahip genetik tanı kiti sayesinde yerli üretime katkı sağlanması amaçlanmıştır. Kit tasarımı, ilk kez bu tez çalışmasıyla geliştirilmiş olan VFLASP-ARMS (Değişken Fragman Uzunluğu Allel Spesifik Polimeraz Zincir Reaksiyonu-Amplifikasyona Dirençli Mutasyon Sistemi) metodolojisine dayandırılmıştır. Tasarlanan genetik tanı kiti, kardiyovasküler hastalıklara yatkınlıkla ilişkilendirilmiş 23 tek nükleotid polimorfizmi (SNP) bölgesini simultane bir şekilde 4 panelde tespit edebilme özelliğine sahiptir. Söz konusu tanı kitinin uzun vadede ulusal ve hedef SNP içeriğindeki modifikasyonlarla uluslararası profesyonel kullanıcılara satışı hedeflenmektedir.

Tezin amacı doğrultusunda, kardiyovasküler hastalıkların tanısı, önlenmesi, yönetimi, tedavi ve bakım kalitesinin iyileştirilmesi aşamalarında klinisyenlere oldukça fayda sağlayacak olan ticari genetik test kiti tasarlanmıştır. Tasarlanan tanı kitinin uygulaması ülkemizde tüm genetik tanı merkezlerinde bulunan Applied Biosystems marka Genetic Analyzer cihazlarının tüm modellerine uyumlu olarak, fragman analizi yöntemine dayandırılmıştır. Tez kapsamında tasarlanıp formülizasyon çalışmaları yapılan kitin profesyonel kullanıcılar için kolay kullanımlı, hızlı ve yüksek hassasiyet ve özgüllükte olması hedeflenmiştir. Tasarlanan kitin optimizasyon ve validasyon deneylerinde insan veya hayvan klinik örnekleri kullanılmamış olup, tüm testler

sentetik olarak üretilen pozitif kontrol sekansları ile gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen kitin bu tez çalışmasının tamamlanmasının ardından hasta örnekleri üzerinde denenerek tüm etkinlik ve validasyon deneyleri tamamlandıktan sonra ülkemizde yerli üretime katkıda bulunması ve hem şüpheli hem de hastanede yatan kardiyovasküler hastalık vakalarının hızlı laboratuvar tanısına yüksek ölçekte katkı sağlayacak olması hedeflenmektedir.

Bu tez çalışması, Little 1995'ten ve Tóth ve ark. 2023'ten ilham alan, ancak bu iki metodun geliştirilmiş ve modifiye edilmiş bir kombine metodolojisi olarak sunulan VFLASP-ARMS yöntemine dayandırılmıştır. Her iki yöntemin avantajlarını birleştiren yöntem, literatürde ilk kez bu tez çalışmasında uygulanmıştır. Ayrıca, bilgimiz dahilinde KVH'larla ilişkilendirilmiş 23 gen bölgesini tek seferde tespit eden, fragman analizi yöntemine ve floresans problara dayalı yerli/yabancı bir ticari kit bulunmamaktadır. Bu açılardan değerlendirildiğinde, mevcut tez çalışması özgün ve yenilikçidir.

2. MATERYAL METOD

Geliştirilen VFLASP-ARMS SNP genotipleme genetik yatkınlık tanı paneli içeriğine dahil edilen SNP'ler: Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) C677T C>T dbSNP ID: rs1801133, A1298C A>C dbSNP ID: rs1801131 [Zeng & Zeng, 2019]; Faktör V (Leiden) G1691A G>A dbSNP ID: rs6025 [Romic et al., 2017]; Faktör V (Cambridge) C306G C>G dbSNP ID: rs118203906 [Williamson et al., 1998]; Faktör II G20210A G>A (Protrombin) dbSNP ID: rs1799963 [Sejrup et al., 2020]; Anjiyotensin C4072T C>T dbSNP ID: rs699 [Junusbekov et al., 2020]; Apolipoprotein B (APO B) R3500Q C>A C>T dbSNP ID: rs5742904 [Ahmad et al., 2012]; Anjiotensin II reseptör tip 1 A1166C A>C dbSNP ID: rs5186 [Junusbekov et al., 2020]; Fibrinojen -463G>A G>A dbSNP ID: rs1800790 [Sakowicz et al., 2013]; Nitrik Oksit Sentaz -786T>C T>C dbSNP ID: rs2070744, G894T G>T dbSNP ID: rs1799983 [Li et al., 2019]; Janus Kinaz 2 V617F C>G dbSNP ID: rs10974944 [Trifa et al., 2010]; Apolipoprotein E (APO E) T>C dbSNP ID: rs429358, C>T dbSNP ID: rs7412 [Pereira et al., 2018]; Protein C Reseptörü A>G dbSNP ID: rs867186, C>G dbSNP ID: rs9574 [Abuagla 2016]; CDKN2B G>C dbSNP ID: rs1333049 [Olson et al., 2018]; CDKN2B-AS1 A>G dbSNP ID: rs2383207 [Huang et al., 2018]; CDKN2B-AS1:Intron Variant A>G dbSNP ID: rs10757274 [Arbiol-Roca et al., 2017]; Faktör XIII V34L C>A dbSNP ID: rs5985 [Do et al., 2016]; İntegrin Beta (ITGB veya HPAI a/b İnsan Trombosit Antijeni 1) T1565C T>C dbSNP ID: rs5918 [Grinshtein et al., 2018]; Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip 1 5G/4G dbSNP ID: rs1799889 [Huang et al., 2019]; Lenfotoksin Alfa C804A C>A dbSNP ID: rs1041981 [Okser et al., 2010].

Çalışma dört alt bölümden oluşmaktadır;

- I. Sentetik Allel Dizilerinin Oluşturulması
- II. SNP Genotipleme Kiti İçin Unipleks Mikslerinin Oluşturulması
- III. SNP Genotipleme Kiti İçin Multipleks Panel Mikslerinin Oluşturulması
- IV. Tekrarlanabilirlik, Tekrar Üretilbilirlik Çalışmaları

2.1. Sentetik Allel Dizilerinin Oluşturulması

Seçilen SNP'ler Türk popülasyonuna özgü kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili bir çalışma grubunu temsil etmektedir. SNP hedefleri olarak seçilen genlerin rs kodları ve SNP bilgileri, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) veritabanı (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>), SNPedia (<https://www.snpedia.com>) ve Ensembl Genomu (<https://www.ensembl.org>) veritabanlarından elde edilmiştir. Klinik öneme sahip olan SNP bölgeleri karşılaştırmalı olarak üç veritabanından incelendikten sonra (şekil 2.1) NCBI veritabanından dizi bilgileri elde edilmiştir (şekil 2.2). ClinVar veritabanından hedef bölge hakkında klinik bilgilere erişimin ardından varyasyonlar tespit edilip SNP'yi içeren bölgeler hedeflenmiştir. Varyant bölgelerine özgü pozitif kontrol DNA'ları sentetik olarak üretilmek üzere oligonükleotidlerin ve ilgili primerlerin tasarımları gerçekleştirilmiştir.

[illegible]

Tasarım stratejisinin başlangıç noktası olarak, uzunluğu 500 ila 650 baz çifti arasında değişen hedef oligonükleotid dizileri NCBI veri tabanından elde edilmiştir. Hedeflenen her bir SNP'nin yaklaşık olarak hedef dizinin orta noktasına konumlandırılmasına özellikle dikkat edilmiştir. Hedef dizi, ilgili SNP'nin dahil edilmesini sağlamak için 2-7 bazın örtüşmesiyle Oligo 1 ve Oligo 2 olarak etiketlenen iki parça halinde MacroGen (Kore) tarafından sentezlenmiştir. Bu işlemi kolaylaştırmak için sol ve sağ primerler, her iki oligonun SNP'siz uçlarına özgü olacak şekilde tasarlanmıştır. İzlenen adımlar **Tablo 2.1**'de MTHFR C677T C>T (rs1801133) hedef dizisi örnek verilerek şematize edilmiştir. Burada normal dizide ilgili baz C iken, mutant dizide T'ye dönüşmüştür. T içeren mutant diziyi sentetik olarak elde edebilmek için tasarlanan primerlerin ve bu primerlerin birleştirme PCR'ı için kritik öneme sahip olan ortak dizileri gösterilmektedir.

Tablo 2.1: MTHFR C677T C>T (rs1801133) dönüşümü için T allelini (mutant) içeren sentetik allel dizilerine özgü primer çiftlerinin tasarlanma yöntemi. Altı çizili kırmızı bazlar SNP'yi, kalın siyah bazlar ortak dizi bölgesini temsil etmektedir.

Gen İsmi / SNP No	MTHFR C677T C>T (rs1801133) Polimorfizm Bölgesine Ait Hedef Diziler	
MTHFR C677T C>T (rs1801133)	Yabani Tip/Normal Dizi	
	TTGGAAGGTGCAAGATCAGAGCCCCAAAGCAGAGGACTCTCTGCCCAGTCCCTGTGGTCTCTTCATCCCTCGCCTTGAACAGGTGGAGGCCAGCCTCTCCTGACTGTCATCCCTATTGGCAGGTT ACCCCAAAGGCCACCCCGAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAAGGAGAAGGTGCTGCGGGAGCGCGATTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGAGGCTGACACATTCTCCGC TTTGTGAAGGCATGCACCGACATGGGCATCACTTGCCCCATCGTCCCCGGGATCTTTCCCATCCAGGTGAGGGGCCAGGAGAGCCATAAGCTCCCTCCACCCCACTCTCACCGACCGTCTCGCA CAGGCTGGGGGCTCTGGGTGGAGTGCTGAGTTCGCTGAGTTCTCCAGATCTCCTCTCAGGTCCAGAACTTGACAGCGTTGCTTGCCACCCCATTTTGGTTACCTCTAATTTCCCCCAAACCC AGCAACAGTGTCTGTTGAGGGGTTTGTGTACTTTGGCCAACAAGCATCACAAAAGGGATTCTAATTCTATTACAAATCCTGCTTAAATCAGTGTTCCTCAAAGGTGGCT	
	Mutant Dizi	
	TTGGAAGGTGCAAGATCAGAGCCCCAAAGCAGAGGACTCTCTGCCCAGTCCCTGTGGTCTCTTCATCCCTCGCCTTGAACAGGTGGAGGCCAGCCTCTCCTGACTGTCATCCCTATTGGCAGGTT ACCCCAAAGGCCACCCCGAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAAGGAGAAGGTGCTGCGGGAGTCGCGATTTCATCATCACGCAGCTTTTCTTTGAGGCTGACACATTCTCCGC TTTGTGAAGGCATGCACCGACATGGGCATCACTTGCCCCATCGTCCCCGGGATCTTTCCCATCCAGGTGAGGGGCCAGGAGAGCCATAAGCTCCCTCCACCCCACTCTCACCGACCGTCTCGCA CAGGCTGGGGGCTCTGGGTGGAGTGCTGAGTTCGCTGAGTTCTCCAGATCTCCTCTCAGGTCCAGAACTTGACAGCGTTGCTTGCCACCCCATTTTGGTTACCTCTAATTTCCCCCAAACCC AGCAACAGTGTCTGTTGAGGGGTTTGTGTACTTTGGCCAACAAGCATCACAAAAGGGATTCTAATTCTATTACAAATCCTGCTTAAATCAGTGTTCCTCAAAGGTGGCT	
	Tasarlanan oligonükleotidler (5'-3')	Tasarlanan primerler (5'-3')
	Oligo 1: TTGGAAGGTGCAAGATCAGAGCCCCAAAGCAGAGGACTCTCTGCCCAGTCCCTGTGGTCTCT TCATCCCTCGCCTTGAACAGGTGGAGGCCAGCCTCTCCTGACTGTCATCCCTATTGGCAGGTTACC CCAAAGGCCACCCCGAAGCAGGGAGCTTTGAGGCTGACCTGAAGCACTTGAAAGGAGAAGGTGTC TGC GG GAG CG Oligo 2: CGCGCTAAAGTAGTAGTGCGTGAAAAAGAACTCCGACTGTGTAAGAAGGCGAAACACTTCCGT ACGTGGCTGTACCCGTAGTGAACGGGTAGCAGGGGCCCTAGAAAGGGTAGGTCCACTCCCCGG GTCCTCTCGGGTATTGAGGGAGGTGGGGTGAGAGTGGCGTGGCAGGAGCGTGTCCGACCCCG AGACCCACTCACGACTCAAGCGACTCAAGAAGGGTCTAGAGGAGAGTCCAGGTCTTGAACGTG TCGCAACGAACCGGTGGGGTAAACCAATGGAGATTAAGGGGGGTTTGGGTGCGTTGTCACA GACAACTCCCCAAACAATGAAACCGTTGTTGCTAGTGGTTTTCCCTAAGATTAAGAGTAATG TTTAGGACGAAATTAGTCACAAAGGGTTTCCACCGA	Left primer: AACCTTCCACGTTCTAGTCTC Right primer: TCGGTGGAAACCCTTTGTGACTAAA

İki oligonun uçuca birleştirilmesini hedefleyen bir PCR kurulmuştur. Bu reaksiyon için PCR Master Mix (2x) (K0171, Thermo, ABD) kullanılmıştır. PCR, 2x PCR ana karışımı, her sol ve sağ primerden 120 µM ve ilgili her oligodan 1 µl içeren 25 µl'lik toplam hacimde gerçekleştirilmiştir. PCR döngüleri, 30 s için 95 °C, 20 s için 65 °C ve 50 s için 72 °C'den oluşan 25 döngü ile gerçekleştirilişi ve 72°C'de 10 dakika süreyle son uzatma yapılmıştır. Gerçekleştirilen deneyler, her hedef SNP bölgesinin yabani tip ve mutant bazlarının her birini hedefleyerek, homozigot allel dizileri ile sonuçlanan ayrı reaksiyon tüplerinde gerçekleştirilmiştir. Spesifik SNP'lerle ilişkili sentetik heterozigot alleller, ilgili homozigot allel PCR ürünlerinin 1:1 oranında karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Üretimi yapılan allel varyantlarına ait sentetik allel dizileri, Sanger dizileme metodu ile dizilenerek doğrulanmıştır. 5 µL PCR ürünü üzerine 2 µL ExoSAP (NucleogeneNSapx) eklenmiş ve 30 dakika 37°C, 15 dk 80°C'de inkübasyon gerçekleştirilmiştir. Saflaştırılan ürün 1/10 oranında dilue edilmiştir. Dilue edilen ürünün 3ul'si üzerine 1 µL Bigdye Terminator (Applied Biosystems, ABD), 1 µL 10 µM forward primer, 1 µL 5x buffer (Applied Biosystems, ABD) ve 4 µL su eklenmiştir. 96°C 1 dk, 25 döngü 96 10 sn, 50°C 5 sn, 60°C 4 dk programında PCR işlemi gerçekleştirilmiştir. 1,5 g Sephadex ve 13,5 ml nükleaz içermeyen saf su karışımından 700'şer µL kolonlara eklenmiştir. 2 dk 5200 rpm'de santrifüjlenmiştir. Kolon temiz tüpe aktarılıp üzerine PCR ürünün tamamı yüklenmiş ve 2 dk 5200 rpm'de santrifüj yapılmıştır. 10 µL formamid ile karıştırılarak ürünün tamamı plate'e yüklenmiştir. Sekanslama ABI 3100XL Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, ABD) cihazında gerçekleştirilmiştir. Doğrulamadan geçen PCR ürünleri bir sonraki adım olan allel spesifik uygulamalarda sentetik allel dizileri olarak kullanılmıştır.

2.2. SNP Genotipleme Kiti İçin Unipleks Mikslerinin Oluşturulması

2.2.1. Primer Prob Tasarımı

Çalışmaya dahil edilen SNP hedeflerinin NCBI veri setinden eldesini takiben, ampikon fragman uzunlukları 100-400 bp ile sınırlandırılmıştır. Allelik bantların oranı 1.01-1.04'e ayarlanarak Primer3 Plus (www.primer3plus.com) ile allel spesifik

primerler tasarlanmıştır (Tablo 2.2). Tasarlanan primerlerde çeşitli modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir: i) Little 1995'e göre, allele özgü bazların, SNP uyumlu primerlerin 3' ucuna eklenmesi; ii) Kasıtlı uyumsuzluk için SNP uyumlu primerin 3' ucunun sondan bir önceki konumunda uyumsuzluk gerçekleştirilmesi; iii) Tóth ve ark., 2023'e göre, 5' ucuna orijinal sekansa tamamlayıcı olmayan 3 baz (TTA) eklenmesi. Farklı olarak allele özel tasarlanan bazı primerlerde optimizasyon çalışmalarına göre 5' ucuna üç yerine altı baz (TTATTA) eklenmiştir. G ve C yerine T ve A bazlarının eklenmesi, primerlerin Tm derecelerinde radikal değişikliklerden kaçınılması sebebiyledir. Bu tasarım özelliği sayesinde fragman analizinde allel ayrımcılığı ampliconların baz farklılıkları sayesinde mümkün olmuştur. iv) Primerlerin 5' ucuna PIG kuyruğu veya M13(-21) adaptör dizisi eklenmemiştir. Bunun yerine, bu çalışmada prob olarak adlandırılan SNP uyumlu olmayan primerlerin 5' ucunu etiketlemek için farklı floresan boyalar (FAM, TAMRA, ATTO565, YAKIMA YELLOW) kullanılmıştır. Bu modifikasyonların tümü, ön optimizasyon sonuçlarına göre anlamlı veya karşıt anlamlı DNA zincirinde yapılmıştır.

Tablo 2.2: SNP genotiplleme kiti için VFLASP-ARMS yöntemine göre tasarlanan primerler ve probalar. Altı çizili bazlar allel spesifik bölgeler olan SNP'leri ifade etmektedir. Turuncu ile işaretlenen bazlar fragman analizi için farklı uzunlukta ampliconların eldesi için eklenmiştir. Mavi ile işaretlenen bazlar, ek kasıtlı uyumsuzluğu ifade etmektedir.

SNP Adı (rs kodu)	Varyant Tipi	DNA İpliği	Primer İsmi	Primer ve Prob (*) Dizisi (5' -3')
MTHFR (rs1801133)	C>T	Anlamlı	F:	* 5' FAM-CCTATTGGCAGGTTACCCCAAAG
			R1(C):	TTAAGCTGCGTGATGATGAAATCAG
			R2(T):	TTATTAAGCTGCGTGATGATGAAATCAA
MTHFR (rs1801131)	A>C	Karşıt anlamlı	F1(C):	GGAGGAGCTGACCAGTGAATC
			F2(A):	TTAGGAGGAGCTGACCAGTGAATA
			R:	* 5' YakimaYellow-TAGGGAGGCAAAGACAGGCT
Factor V (Leiden) (rs6025)	G>A	Anlamlı	F:	* 5' ATTO565-CGCCTCTGGGCTAATAGGAC
			R1(G):	TTAACTTCAAGGACAAAATACCTGTATTCCTC
			R1(A):	ACTTCAAGGACAAAATACCTGTATTCCTI
Factor V Cambridge (rs118203906)	C>G	Karşıt anlamlı	F1(C):	TTATGCTCACGAGTTATTTCTTAAGATTCC
			F2(G):	TGCTCACGAGTTATTTCTTAAGATTCCG
			R:	* 5'TAMRA-TGCCTTTTCTGGATGCCACTTA
Factor II (Prothrombin) (rs1799963)	G>A	Anlamlı	F:	* 5' FAM-CAGAAGGTCATTGATCAGTTTGGGA
			R1(G):	TTACACTGGGAGCATTGAGGCTC
			R2(A):	CACTGGGAGCATTGAGGCTI
Angiotensin (rs699)	C>T	Karşıt anlamlı	F1(T):	TTAGAAGACTGGCTGCTCCCTGCT
			F2(C):	GAAGACTGGCTGCTCCCTGCC
			R:	* 5' FAM-AGCCACTTCCCCACTTCTCAA

Tablo 2.2: SNP genotiplleme kiti için VFLASP-ARMS yöntemine göre tasarlanan primerler ve probalar. Altı çizili bazlar allel spesifik bölgeler olan SNP'leri ifade etmektedir. Turuncu ile işaretlenen bazlar fragman analizi için farklı uzunlukta amplikonların eldesi için eklenmiştir. Mavi ile işaretlenen bazlar, ek kasıtlı uyumsuzluğu ifade etmektedir. (devam)

SNP Adı (rs kodu)	Varyant Tipi	DNA İpliği	Primer İsmi	Primer ve Prob (*) Dizisi (5' -3')
Apolipoprotein B (rs5742904)	C>A C>T	Karşıt anlamlı	F1(C):	TTATT ACCTGCAGCTTCACTGAAGAC CC
			F2(A):	TTA CCCTGCAGCTTCACTGAAGAC CA
			F3(T):	CCTGCAGCTTCACTGAAGAC CT
			R:	* 5' ATTO565 -CAAAGGAGATGTCAAGGGTTCG
Angiotensin II receptor type (rs5186)	A>C	Karşıt anlamlı	F1(A):	TTAC AGCACTTCACTACCAAATGAG AA
			F2(C):	CAGCACTTCACTACCAAATGAG AC
			R:	* 5'TAMRA -AATGCAAAATGTGGCTTTGCTTTG
Fibrinogen (rs1800790)	G>A	Anlamlı	F:	* 5' FAM -GGACAAAATATTAAAGCTATTTCAGCACA
			R1(G):	TTAT GCATAATTCTATTTCAAAAGGGG CC
			R2(A):	TGACATAATTCTATTTCAAAAGGGG CT
Lymphotoxin alpha (rs1041981)	C>A	Karşıt anlamlı	F1(C):	TTA ATGCATCTTGCCACAGCT CT
			F2(A):	ATGCATCTTGCCACAGCT TA
			R:	* 5' ATTO565 -TAGGAGTGGGCTCCCTCTGT
Plasminogen Activator Inhibitor Type I 5G/4G (rs1799889)	A>G	Anlamlı	F:	* 5' YakimaYellow -GCACACCTCCAACCTCAGC
			R1(4G):	TTA CTCCGATGATACACGGCTGAC CT
			R2(5G):	CTCCGATGATACACGGCTGAC CC

Tablo 2.2: SNP genotipleme kiti için VFLASP-ARMS yöntemine göre tasarlanan primerler ve probalar. Altı çizili bazlar allel spesifik bölgeler olan SNP'leri ifade etmektedir. Turuncu ile işaretlenen bazlar fragman analizi için farklı uzunlukta ampliconların eldesi için eklenmiştir. Mavi ile işaretlenen bazlar, ek kasıtlı uyumsuzluğu ifade etmektedir. (devam)

SNP Adı (rs kodu)	Varyant Tipi	DNA İpliği	Primer İsmi	Primer ve Prob (*) Dizisi (5' -3')
Nitric Oxide Synthase (rs2070744)	T>C	Anlamlı	F:	* 5' TAMRA-GCCCAGCTAGTGGCCTTTCT
			R1(C):	TTATTACTGAGGCAGGGTCAGC <u>AG</u>
			R2(T):	TTACTGAGGCAGGGTCAGC <u>AA</u>
Nitric Oxide Synthase (rs1799983)	G>T	Anlamlı	F:	* 5' TAMRA-GGAAACGGTCGCTTCGACGTGCT
			R1(G):	TTATCGGGGGGCAGAAGGAAGAGTTCTGGGG <u>AC</u>
			R2(T):	TCGGGGGGGCAGAAGGAAGAGTTCTGGGG <u>AA</u>
Factor XIII (rs5985)	C>A	Anlamlı	F:	* 5' TAMRA-GAACCCACAGTGGAGACAGAG
			R1(C):	TTAGCCACAGTGGAGCTTCAGGG <u>CG</u>
			R2(A):	GCCACAGTGGAGCTTCAGGG <u>CT</u>
Janus Kinase 2 (rs10974944)	C>G	Anlamlı	F:	* 5' ATTO565-CCAGGCTGGAATGCAGAAATACTA
			R1(G):	TTAACCCCTTGATAAATGTGGCT <u>CT</u>
			R2(C):	ACCCCTTGATAAATGTGGCT <u>GT</u>

Tablo 2.2: SNP genotiplleme kiti için VFLASP-ARMS yöntemine göre tasarlanan primerler ve probalar. Altı çizili bazlar allel spesifik bölgeler olan SNP'leri ifade etmektedir. Turuncu ile işaretlenen bazlar fragman analizi için farklı uzunlukta ampliconların eldesi için eklenmiştir. Mavi ile işaretlenen bazlar, ek kasıtlı uyumsuzluğu ifade etmektedir. (devam)

SNP Adı (rs kodu)	Varyant Tipi	DNA İpliği	Primer İsmi	Primer ve Prob (*) Dizisi (5' -3')
Integrin Beta-3 (rs5918)	T>C	Karşıt anlamlı	F1(T):	TTATTATTCTCTTTGGGCTCCTGTCTTACTCCGGGGTGCCTAT
			F2(C):	TTCTCTTTGGGCTCCTGTCTTACTCCGGGGTGCCTAC
			R:	* 5' YakimaYellow - GCTGTCTCCAGAGCCCTTGT
Protein C Receptor (rs867186)	A>G	Anlamlı	F:	5' FAM - CATGTTCTGCAGGGAGCCAAA
			R1(A):	TTAGCCACACCAGCAATGATGAAAAT
			R2(G):	GCCACACCAGCAATGATGAAAAC
Protein C Receptor (rs9574)	C>G	Anlamlı	F:	* 5' YakimaYellow - GACTCCTTGGGGGCCTATTC
			R1(G):	TTATTAGCCAGCCTCCATCAATCCTCGGGGTTCTGCG
			R2(C):	GCCAGCCTCCATCAATCCTCGGGGTTCTGCC
Apolipoprotein E (rs7412)	C>T	Anlamlı	F:	* 5' TAMRA - ACTGTGCGACACCCTCCC
			R1(C):	CCTGGTACACTGCCAGGCG
			R2(T):	TTATTACCTGGTACACTGCCAGGCA

Tablo 2.2: SNP genotiplleme kiti için VFLASP-ARMS yöntemine göre tasarlanan primerler ve probalar. Altı çizili bazlar allel spesifik bölgeler olan SNP'leri ifade etmektedir. Turuncu ile işaretlenen bazlar fragman analizi için farklı uzunlukta ampliconların eldesi için eklenmiştir. Mavi ile işaretlenen bazlar, ek kasıtlı uyumsuzluğu ifade etmektedir. (devam)

SNP Adı (rs kodu)	Varyant Tipi	DNA İpliği	Primer İsmi	Primer ve Prob (*) Dizisi (5' -3')
Apolipoprotein E (rs429358)	T>C	Karşıt anlamlı	F1(T):	TGTGCGGCCCGCCTGGTGAT
			F2(C):	TTATGTGCGGCCCGCCTGGTGAC
			R:	* 5' FAM - AGGCGCTTCTGCAGGTCAT
rs1333049	G>C	Anlamlı	F:	* 5' ATTO565 - GAATGGGCTGCTGACTCTGAA
			R1(C):	TTACTCTGCGAGTGGCTGCTTTGG
			R2(G):	CTCTGCGAGTGGCTGCTTTGC
CDKN2B-AS1 (rs2383207)	A>G	Karşıt anlamlı	F1(A):	TTATTACTCCTGTTCGGATCCCTTAA
			F2(G):	TTACTCCTGTTCGGATCCCTTAG
			R:	* 5' Yakima Yellow - CCCTGGCTCATCTCCATACCT
CDKN2B-AS1:Intron Variant (rs10757274)	A>G	Karşıt anlamlı	F1(A):	TTATTAACCCCGTGGGTCAAATCTATCGACTGTGTTGA
			F2(G):	CCCCCGTGGGTCAAATCTATCGACTGTGTTGG
			R:	* 5' TAMRA - TCCCAGATGCACTGTATTGTTG

2.2.2. PCR Optimizasyonu Çalışmaları

Optimizasyon çalışmaları PCR Master Mix (2x) (K0171, Thermo, ABD) kullanılarak toplam 25 µL hacimde gerçekleştirilmiştir. Primer konsantrasyonlarının (120 µM ile 330 µM arasında değişen) (Tablo 2.3), şablon konsantrasyonlarının (0,05 µg ile 0,35 µg arasında değişen) (Tablo 2.4) ve MgCl₂ konsantrasyonlarının (2 mM ile 4 mM arasında değişen) (Tablo 2.3) parametreleri, 60°C ve 63° bağlanma sıcaklıklarında değerlendirilmiştir. PCR döngüleri, 95 °C'de 4 dakikalık bir başlangıç denatürasyon adımı, ardından 95 °C'de 30 saniyelik denatürasyon, 60-63 °C'de 30 saniye bağlanma, 72 °C'de 50 saniye uzatma içeren 35 döngü ile ve 72°C'de 12 dakika son uzatma ile gerçekleştirilmiştir. 10 ul PCR ürünü ve 2 ul 6X DNA Jel Yükleme Boyası (R0611, Thermo, ABD), 10.000X SYBR™ SafeDNA Gel Dye (S33102, Invitrogen, ABD) ile boyanmış %3 agaroz jel üzerinde yürütülmüştür. Gözlemlenen bant yoğunluklarına dayanarak, her hedef SNP için en verimli PCR formülasyonu optimize edilmiştir.

Tablo 2.3: Allel spesifik PCR için gerçekleştirilen, farklı primer konsantrasyonları için optimizasyon çalışmaları.

[illegible]

Tablo 2.4: Allel spesifik PCR için gerçekleştirilen, farklı kalıp konsantrasyonları için optimizasyon çalışmaları.

İçerik	1. Formülasyon	2. Formülasyon	3. Formülasyon	4. Formülasyon	5. Formülasyon	6. Formülasyon
Son Konsantrasyon						
PCR Master Mix (2x) (K0171, ThermoFisher Sci, USA)	1x	1x	1x	1x	1x	1x
Allele Özgü Primer F/R	160 mM	160 mM	160 mM	160 mM	160 mM	160 mM
Allele Özgü Primer F/R	160 mM	160 mM	160 mM	160 mM	160 mM	160 mM
Floresan Boyalı Ortak Primer F/R	120 mM	120 mM	120 mM	120 mM	120 mM	120 mM
MgCl ₂ Konsantrasyonu	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM	2 mM
Homozigot Mutant Pozitif Kontrol Dizisi	0.05 µg	0.15 µg	0.2 µg	0.25 µg	0.30 µg	0.35 µg
Nükleaz içermeyen su	25 µL'ye tamamlanır	25 µL'ye tamamlanır	25 µL'ye tamamlanır	25 µL'ye tamamlanır	25 µL'ye tamamlanır	25 µL'ye tamamlanır

2.2.3. Unipleks Kapiler Elektforez Uygulamaları

SNP genotipleme kiti için unipleks mikslerin oluşturulması çalışmalarının son adımı olarak kapiler elektforez çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Konvansiyonel PCR yöntemi ile optimize edilmiş olan formülasyonlara bağlı kalınarak 23 SNP bölgesi için ayrı ayrı reaksiyonlar kurulmuştur. Kapiler elektforez yönteminde 1:10 oranında nükleaz içermeyen su ile dilue edilen PCR ürününün 1 µl'si ile 10 µl Formamid ve 0.3 µl LIZ karıştırılarak 96'lık plate kuyucuklarına yüklenmiştir. Hazırlanan plate ABI PRISM® Genetic Analyzer cihazına yerleştirilmiş ve okuma başlatılmıştır. Örneklerin fragman analizleri GeneMapper Software 5 (Applied Biosystems, ABD) programı kullanılarak yapılmıştır.

2.3. SNP Genotipleme Kiti İçin Multipleks Mikslerinin Oluşturulması

Multipleks allel spesifik panel çalışmaları için fragman uzunlukları 100 – 400 baz aralığında değişen hedef SNP bölgeleri bu tez çalışmasına özgü olarak 4 ayrı grupta sınıflandırılmıştır. Panel karışımları, karşılık gelen SNP bölgelerinde beklenen allellerin parça uzunluklarına dayalı olarak tasarlanmıştır. Bu karışımlar, her biri sırasıyla FAM, YAKIMA YELLOW, ATTO565 ve TAMRA floresan boylarıyla etiketlenmiş 6, 5, 5 ve 7 farklı SNP hedefinden oluşmaktadır. Her bir hedef SNP bölgesine ait, farklı allel varyasyonları için hedeflenen benzer büyüklükteki fragmanlar farklı boylarla boyanmış ve böylece eş zamanlı analizlerine imkân sağlanmıştır. Multipleks allele özgü PCR, optimize edilmiş PCR koşullarına bağlı olarak **Tablo 2.5**'te sunulan SNP gruplamasına göre gerçekleştirilmiştir: allele özgü primer konsantrasyonu 160 µM (rs1799983, rs10757274, rs5186, rs2070744, rs118203906, rs5985 ve rs7412130 için 130 µM), 120 µM floresan boyalı primer konsantrasyonu (rs1799983, rs10757274, rs5186, rs2070744, rs118203906, rs5985, rs7412130 için 100 µM), 2 mM MgCl₂ konsantrasyonu ve 60°C bağlanma sıcaklığı. Tasarlanan multipleks allele özgü VFLASP-ARMS testi, toplamda 23 floresan etiketli primer (prob) ve 47 etiketsiz primer (hedeflenen SNP'lerin tüm varyantlarını kapsayan) içeren 4 bağımsız PCR tüpünde gerçekleştirilmiştir.

2.3.1. Multipleks Kapiler Elektroforez Uygulamaları

Her bir SNP bölgesi için ayrı ayrı kurulan unipleks reaksiyonların kapiler elektroforez sonuçları doğrulandıktan sonra **Tablo 2.5**'te sunulan panel içerik tablosuna bağlı kalınarak multipleks panel çalışmaları yürütülmüştür. Kapiler elektroforez yönteminde 1:10 oranında nükleaz içermeyen su ile dilue edilen PCR ürününün 1 µl'si ile 10 µl Formamid ve 0.3 µl LIZ karıştırılarak 96'lık plate kuyucuklarına yüklenmiştir. Allele özgü multipleks PCR ürünleri, ABI 3130XL Genetik Analiz Cihazı (Applied Biosystems, ABD) kullanılarak kapiler elektroforezde çalıştırılmış ve numunelerin fragman analizleri, Gene Mapper Software 5 (Applied Biosystems, ABD) ile gerçekleştirilmiştir. Yapılan deneylerde, hedeflenen gen bölgelerine ait 3-6 baz çifti uzunluk farkına sahip allelleri ifade eden pikler üretmek amaçlanmıştır. İlgili sentetik homozigot ve heterozigot allel şablonları kullanılarak her hedef SNP ve multipleks SNP genotipleme testi için doğrulama testleri yapılmıştır. Yöntemin tekrarlanabilirliği her bir allele özgü reaksiyonlarda belirlenmiştir. Gerçekleştirilen deneylerde, hedeflenen gen bölgelerindeki 3-6 baz çifti uzunluk farkına sahip allelleri temsil eden tepe pik noktaları oluşturmak amaçlanmıştır.

Tablo 2.5: Multipleks allel spesifik PCR uygulamalarında kullanılan paneller ve içerdikleri SNP bölgeleri.

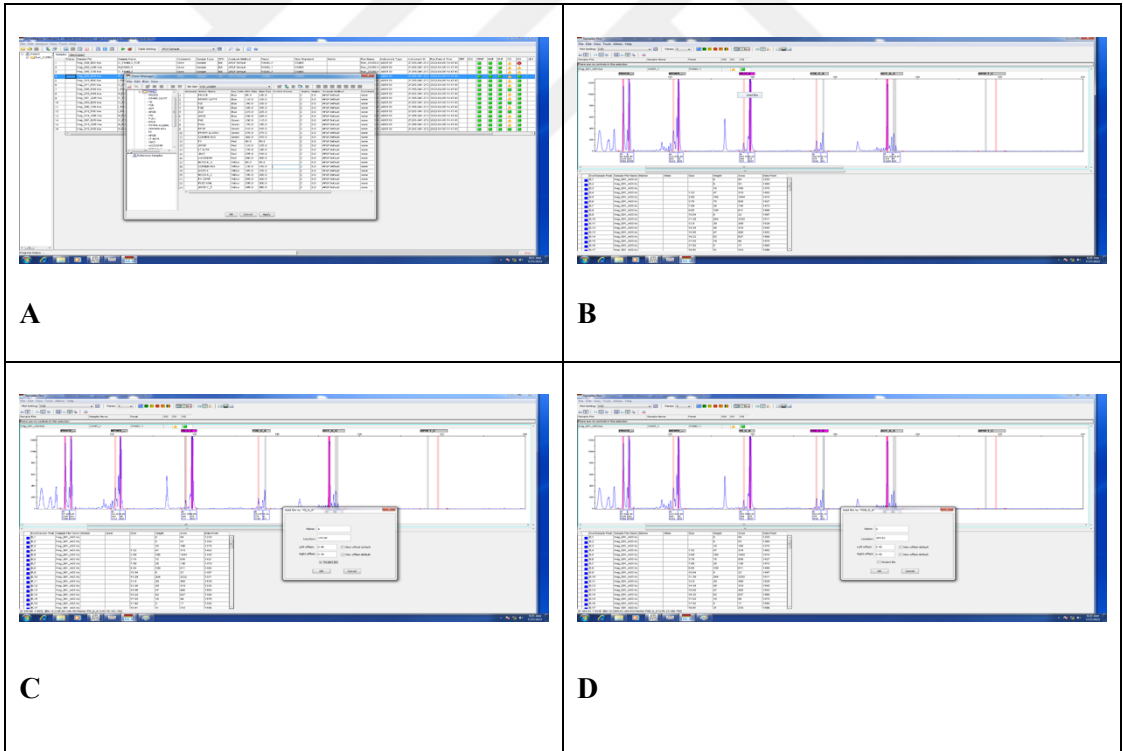
Miks	SNP	DNA İpliği	Floresan Kanal	Beklenen Dizi Uzunluğu (bp)			
				Adenin (A)	Guanin (G)	Sitozin (C)	Timin (T)
1	rs867186 PROCR A>G	Anlamli	FAM (495-520nm)	91	88		
	rs1801133 MTHFR C677T C>T	Anlamli				114	117
	rs1799963 FII G>A	Anlamli		146	149		
	rs1800790 FGB -463G>A G>A	Anlamli		181	184		
	rs699 AGT C4072T C>T	Karşıtl anlamli				216	219
	rs429358 APOE T>C	Karşıtl anlamli				263	260
2	rs1799889 PAI-1 5G/4G A>G	Anlamli	YAKIMA YELLOW/ (531-549nm)	106	103		
	rs5918 PIA1/A2 T1565C T>C	Karşıtl anlamli				170	176
	rs9574 EPCR C>G	Anlamli			217	211	
	rs1801131 MTHFR A1298C A>C	Karşıtl anlamli		273		270	
	rs2383207 CDKN2B-AS1 A>G	Karşıtl anlamli		365	362		

Tablo 2.5: Multipleks allel spesifik PCR uygulamalarında kullanılan paneller ve içerdikleri SNP bölgeleri. (devam)

Miks	SNP	DNA İpliği	Floresan Kanal	Beklenen Dizi Uzunluğu (bp)			
				Adenin (A)	Guanin (G)	Sitozin (C)	Timin (T)
3	rs6025 FV G>A	Anlamli	ATTO565 (570-591nm)	85	88		
	rs5742904 APOB C>A C>T	Karşıtl anlamli		125		128	122
	rs1041981 LT-α C804A C>A	Anlamli		177		180	
	rs10974944 JAK2 V617F C>G	Anlamli			232	229	
	rs1333049 G>C	Anlamli			290	287	
4	rs1799983 NOS3 G894T G>T	Anlamli	TAMRA (546-579nm)		83		80
	rs10757274 CDKN2B-AS1 A>G	Karşıtl anlamli		137	131		
	rs5186 AGTR-1 A1166C A>C	Karşıtl anlamli		151		148	
	rs2070744 NOS3 -786T>C T>C	Anlamli				195	192
	rs118203906 Factor V Cambridge C>G	Karşıtl anlamli			255	258	
	rs5985 FXIII V34L C>A	Anlamli		297		300	
	rs7412 APOE C>T	Anlamli				346	350

2.4. Tekrarlanabilirlik, Tekrar Üretilirlik Çalışmaları

Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik deneyleri, sentetik olarak üretilen allel dizileri kalıp olarak kullanılarak, farklı lot numaralı reaktif setleri ile altı kez test edilmiş ve testler başarıyla sonuçlandırılmıştır. Tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucunda elde edilen tutarlı sonuçlar sayesinde bin set dosyası marker (gen) ismi, floresans boya ismi, minimum ve maksimum baz çifti aralıklarını içerecek şekilde oluşturulmuştur (Şekil 2.3). Tekrarlanabilirlik deneylerinde beklenen sonuç, hedeflenen gen bölgelerine ait allelleri ifade eden piklerin aşağı yukarı aynı baz çifti aralığında gelmesidir. Farklı üretim lot numaraları ile yapılan çok sayıda deney tekrarı sonucunda her bir mutant ve normal allelin binleri manuel olarak tek tek eklenmiştir. Mutant alleller için binlerin rengi kırmızı, normal alleller için ise binlerin rengi gri olarak atanmıştır. Kırmızı ve gri renkler ile görsel olarak ifade edilen binler marker görevi görüp, bu sayede kullanıcıya analiz kolaylığı sağlanması hedeflenmiştir.



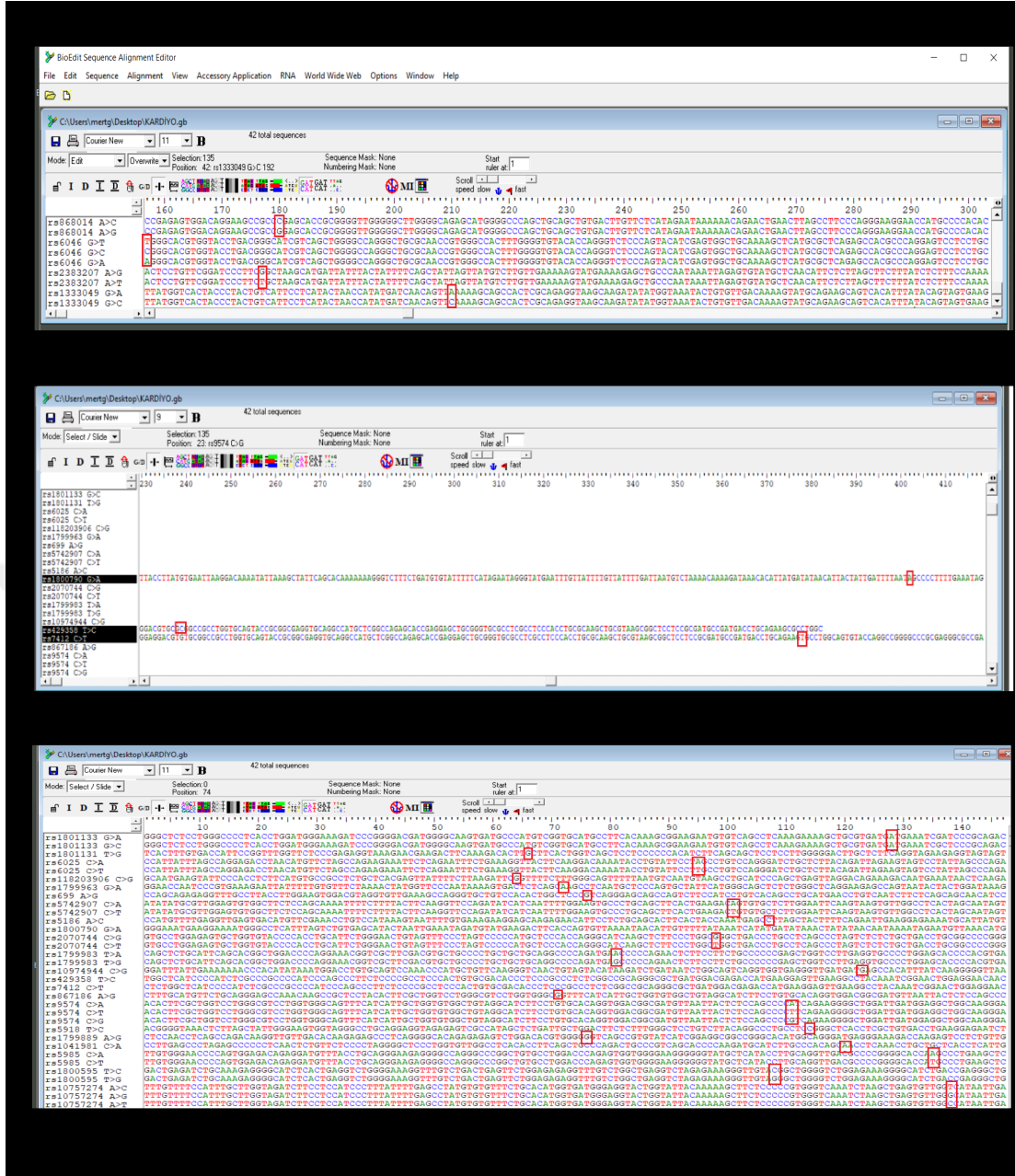
Şekil 2.3: Bin set dosyasının oluşturulması. A) Bin set dosyasının manuel olarak tanımlanması. B) Tepe pik noktalarına binlerin eklenmesi. C) Mutant alleller için binlerin tanımlanması eklenmesi. D) Normal alleller için binlerin tanımlanması ve eklenmesi.

3. BULGULAR

3.1. Sentetik Allel Dizilerinin Eldesi

Hedeflenen bölgelere özgü üretilen sentetik allel dizileri Sanger sekanslama yöntemi ile tek yönlü okuma yapılarak tespit edilmiştir (Şekil 3.1). İlgilenilen 23 SNP'ye ait klinik önemi bildirilen tüm allel varyasyonlarına ait dizilerin homozigot yabani tip/normal, homozigot mutant ve heterozigot mutant versiyonları doğrulanmıştır. Elde edilen sentetik allel dizileri sonraki aşamalarda kalıp diziler olarak kullanılmıştır.



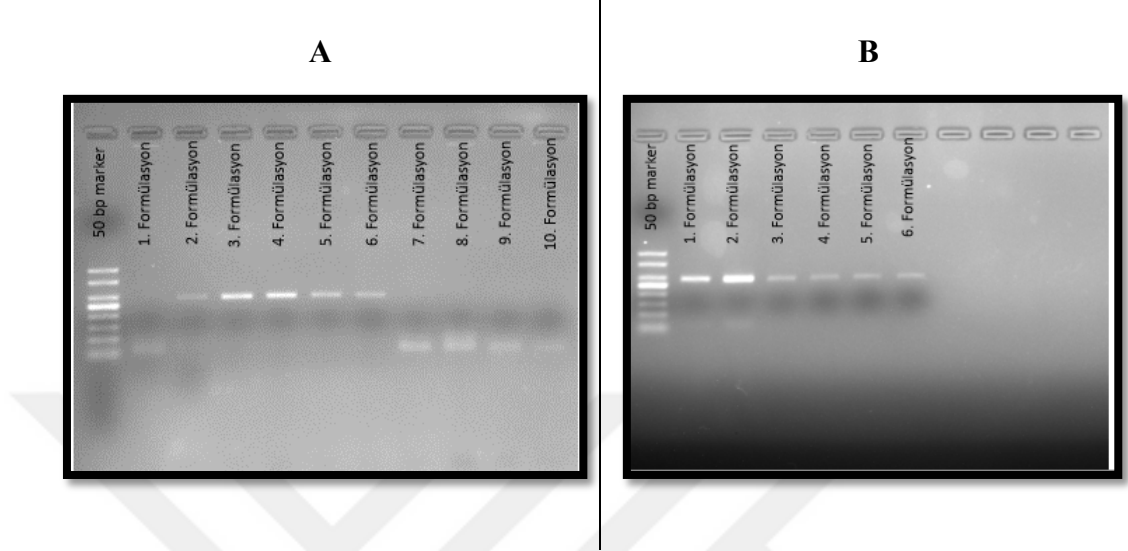


Şekil 3.1: Sanger sekanslama sonuçları. Kırmızı çerçeve ile gösterilen bazlar hedef SNP’lerdir.

3.2. Unipeks VFLASP-ARMS Optimizasyon Sonuçları

Tablo 2.3 ve **Tablo 2.4**’e göre gerçekleştirilen formülasyon optimizasyonu çalışmaları ile en etkin PCR karışımı formülasyonu seçilmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin %3 agaroz jelde görüntüleri **Şekil 3.2**’de sunulmuştur. Elde edilen jel sonuçlarına göre ilk formülasyon çalışmasında 3 numaralı formülasyonda en parlak bant gözlenmiş, bu sebeple primer konsantrasyonu 160 nM, MgCl₂ konsantrasyonu ise 2mM değerlerinde optimize edilmiştir (Şekil 3.2.A). Kalıp dizi konsantrasyonu için ise 6 farklı

formülasyonu ile optimizasyon çalışması yapılmıştır. **Şekil 3.2B**'de sunulan agaroz jel sonuçlarına göre en parlak bant 2. formülasyonda elde edilmiş ve sonraki PCR çalışmalarında kullanılmak üzere kalıp DNA miktarı 0.15 µg olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.2: VFLASP-ARMS-PCR formülasyon optimizasyon çalışma sonuçları: A) Primer konsantrasyonu ve MgCl₂ konsantrasyonu formülasyon optimizasyonları. B) DNA konsantrasyonu formülasyon optimizasyonları. Kullanılan marker: HibriGen 50bç ladder.

Yapılan formülasyon optimizasyonu çalışmalarının ışığında, ilgilenilen 23 gen bölgesi için homozigot yabani tip/normal, homozigot mutant ve heterozigot mutant sentetik allel diziler kalıp olarak kullanılarak sonraki VFLASP-ARMS-PCR çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

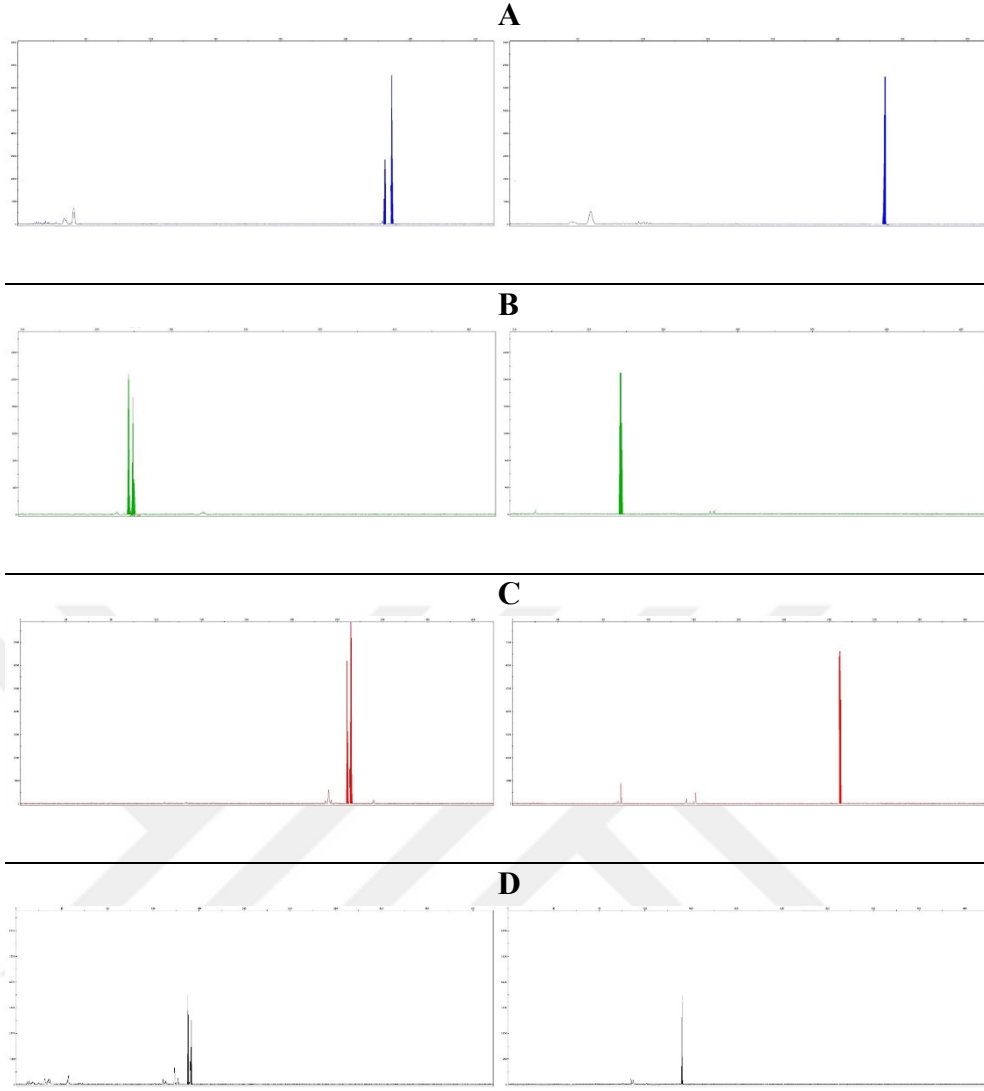
Apolipoprotein E dbSNP ID: rs429358 için allele özgü primer seti, DNA'nın karışık anlamlı zincirinden tasarlanmış ve FAM floresan boya ile etiketlenmiştir. 495 nm'de bir uyarılma piki ve 520 nm'de bir emisyon piki sağlamıştır. PCR ürün uzunluğu, C alleli (mutant) için 263 bç ve T alleli (yabani tip) için 260 bç idi (Şekil 3.3A). Homozigot C allelinin varlığında PCR ürünü, 263 bç'de pik vermiştir. Bu ürün yalnızca C alleleline özgü ürünü içerirken, T allelini amplifiye etmeyerek testten yanlış pozitif sonuç alınmadığını ispatlamıştır. FAM floresan kanalındaki aynı panel içeriğinde yer alan Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) dbSNP ID: rs1801133, Faktör II (Protrombin) dbSNP ID: rs1799963, Fibrinogen dbSNP ID: rs1800790, Anjiyotensin dbSNP ID: rs699 ve Protein C reseptörü dbSNP ID: rs867186 SNP'leri için de aynı şekilde güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. PCR ürün uzunluğu mutant allel için

sırasıyla 117, 146, 181, 219 ve 88 bç iken yabani allel için sırasıyla 114, 149, 184, 216 ve 91 bç idi.

Metilentetrahidrofolat redüktaz (MTHFR) dbSNP ID: rs1801131 için allele özgü primer seti, DNA'nın karşıt anlamlı zincirinden tasarlandı ve 531 nm'de bir uyarılma piki ve 549 nm'de bir emisyon piki ile YAKIMA YELLOW floresan boya ile etiketlenmiştir. PCR ürün uzunluğu, C alleli (mutant) için 270 bç ve A alleli (yabani tip) için 273 bç idi (Şekil 3.3B). Yakima Yellow floresan kanalındaki aynı panel içeriğinde yer alan Integrin Beta dbSNP ID: rs5918, Protein C reseptörü dbSNP ID: rs9574, Plazminojen Aktivatör İnhibitör Tip 1 dbSNP ID: rs1799889 ve CDKN2B-AS1 dbSNP ID: rs2383207 SNP'leri için de aynı şekilde güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. PCR ürün uzunluğu mutant allel için sırasıyla 170, 217, 103 ve 362 bç iken yabani allel için sırasıyla 176, 211, 106 ve 365 bç idi.

CDKN2B dbSNP ID: rs1333049 için allele özgü primer seti, DNA'nın anlamlı zincirinden tasarlanmıştır ve 570 nm'de bir uyarılma piki ve 591 nm'de bir emisyon piki içeren ATTO565 floresan boya ile etiketlendi. PCR ürün uzunluğu, C alleli (mutant) için 287 bç ve G alleli (yabani tip) için 290 bç idi (Şekil 3.3C). ATTO565 floresan kanalındaki aynı panel içeriğinde yer alan Apolipoprotein B (APO B) dbSNP ID: rs5742904, Lymphotoxin Alpha dbSNP ID: rs1041981, Janus kinase 2 dbSNP ID: rs10974944 ve Faktör V Leiden G1691A dbSNP ID: rs6025 SNP'leri için de aynı şekilde güvenilir sonuçlar elde edilmiştir. PCR ürün uzunluğu mutant allel için sırasıyla 122-125, 177, 232 ve 85 bç iken yabani allel için sırasıyla 128, 180, 229 ve 88 bç idi.

Benzer şekilde Anjiyotensin II reseptör tip 1 A1166C dbSNP ID: rs5186 için allele özgü primer seti, DNA'nın karşıt anlamlı zincirinden tasarlandı ve TAMRA floresan boyası ile etiketlendi; 546 nm'de bir uyarılma piki ve 579 nm'de bir emisyon piki sergiledi. PCR ürün uzunluğu, C alleli (mutant) için 148 bç ve A alleli (yabani tip) için 151 bç idi (Şekil 3.3D). Homozigot ve heterozigot vahşi tip veya mutant allellerin tüm örneklerinde, PCR ürünü, spesifik olmayan allel amplifikasyonunun varlığı olmaksızın yalnızca spesifik allel ürününü içermiştir. CDKN2B-AS1: İntron Varyant dbSNP ID: rs10757274, Anjiyotensin II reseptör tip 1 A1166C dbSNP ID: rs5186, Nitrik oksit sentaz dbSNP ID: rs2070744, Nitrik oksit sentaz dbSNP ID: rs1799983,



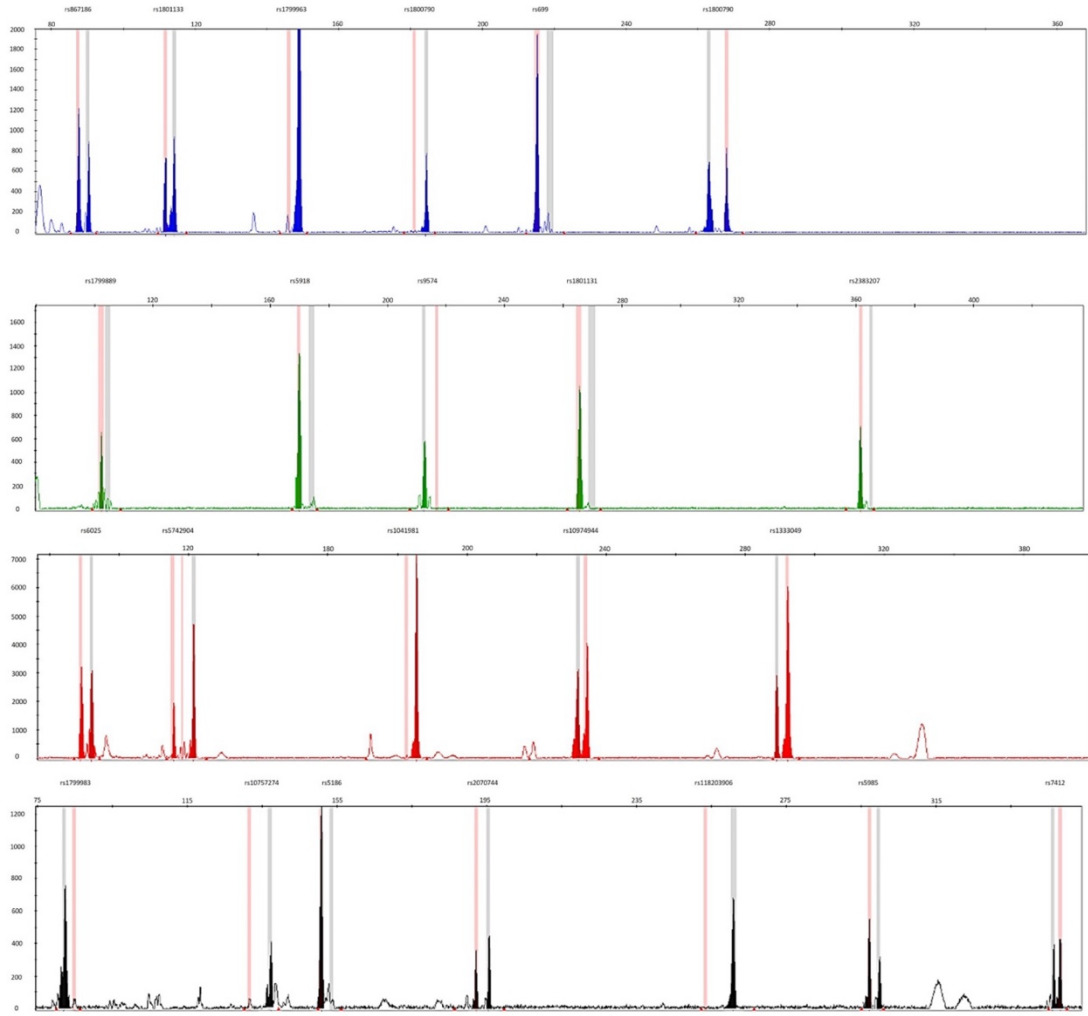
Şekil 3.3: VFLASP-ARMS PCR ürünlerinin kapiler elektroforez sonuçları. A) Apolipoprotein E dbSNP ID'nin elektroferogramı: rs429358 heterozigot T/C alleli (solda), homozigot C/C alleli (sağda), mavi etiketli tepe piki noktaları ile floresan kanal FAM 495-520nm dalga boylarında ölçülmüştür B) Metilentetrahidrofolat redüktazın (MTHFR) elektroferogramı dbSNP ID: rs1801131 heterozigot A/G alleli (solda), homozigot G/G alleli (sağda) yeşil etiketli tepe pik noktalarına sahip floresan kanal Yakima Yellow 531-549 nm dalga boylarında ölçülmüştür. C) CDKN2B dbSNP ID'nin elektroferogramı: rs1333049 heterozigot C/G (solda), homozigot C/C alleli (sağda) kırmızı etiketli tepe pik noktalarına sahip floresan kanal ATTO565 570-591 nm dalga boylarında ölçülmüştür. D) Anjiyotensin II reseptör tip 1 A1166C dbSNP ID'nin elektroferogramı: rs5186 heterozigot (sol), homozigot A/A alleli (sağ), siyah etiketli tepe pik noktalarına sahip floresan kanal TAMRA546-579nm'nin dalga boylarında ölçülmüştür.

3.3. Multipleks VFLASP-ARMS Optimizasyon Sonuçları

Uniplex VFLASP-ARMS allele özgü PCR çalışmalarında elde edilen yüksek verimli sonuçlar, farklı floresan boyalarla etiketlenmiş probalar kullanılarak multipleks VFLASP-ARMS SNP genotipleme testine başarıyla uyarlanmıştır. Bu çalışmada hedeflenen toplam 23 SNP, farklı floresan boyalarla (FAM, YAKIMA YELLOW, ATTO565, TAMRA) etiketlenmiş ve 4 ayrı gruba ayrılmıştır (Tablo 3.5). Gruplama yapılırken her SNP'nin farklı parça boyutları göz önüne alınmıştır. 1. karışımında hedeflenen SNP'ler için beklenen amplifikasyon ürün uzunlukları 88 ile 260 bp arasında, 2. karışım için 103 ile 365 bp arasında, 3. karışım için 80 ile 290 bp arasında ve 4. karışım için 80 ile 345 bp arasında olacak şekilde tasarlanmıştır. Her allelin tepe pik noktasında verdiği sonuca göre ampikon uzunluğu yazılım tarafından otomatik olarak hesaplanmıştır. Hesaplama sonuçlarına göre, beklenen değerlerden maksimum 3 bp'lik bir fark gözlenmiştir. Ancak bu fark tüm aleller arasında tutarlı olduğundan aleller arasında beklenen fark uzunlukları sabit kaldı. Gözlemlenen parça analizi sonuçlarına dayanarak, multipleks VFLASP-ARMS metodolojisi, tek bir tüpte 7'ye kadar farklı hedef SNP'yi başarıyla tespit etmiştir.

Multipleks alele özgü PCR sonuçları, PCR reaksiyonlarının aynı koşullar altında tekrarlanmasıyla doğrulanmış ve tüm sentetik kalıplar için tutarlı sonuçlar elde edilmiştir. Multipleks primer karışımlarının her biri için, her hedef SNP'ye yönelik en az bir aday allele özgü primer seti tanımlanmıştır.

Bu sonuçlar göz önüne alındığında, multipleks allele özgü VFLASP-ARMS yönteminde floresan boyaların kullanılması, hedeflenen her SNP bölgesindeki farklı allel varyasyonlarını hedefleyen benzer boyuttaki parçaların eş zamanlı analizini mümkün kılmıştır. Uniplex VFLASP-ARMS sonuçları ile benzer şekilde, test edilen tüm multipleks analizler, her sentetik pozitif kontrol sekansı için güvenilir ve tekrarlanabilir genotipleme sonuçları sağlamıştır. Tasarlanan multipleks SNP genotipleme testinin etkinliğini ve güvenilirliğini doğrulayan testlerin temsili sonuçları **Şekil 3.4**'te sunulmaktadır.

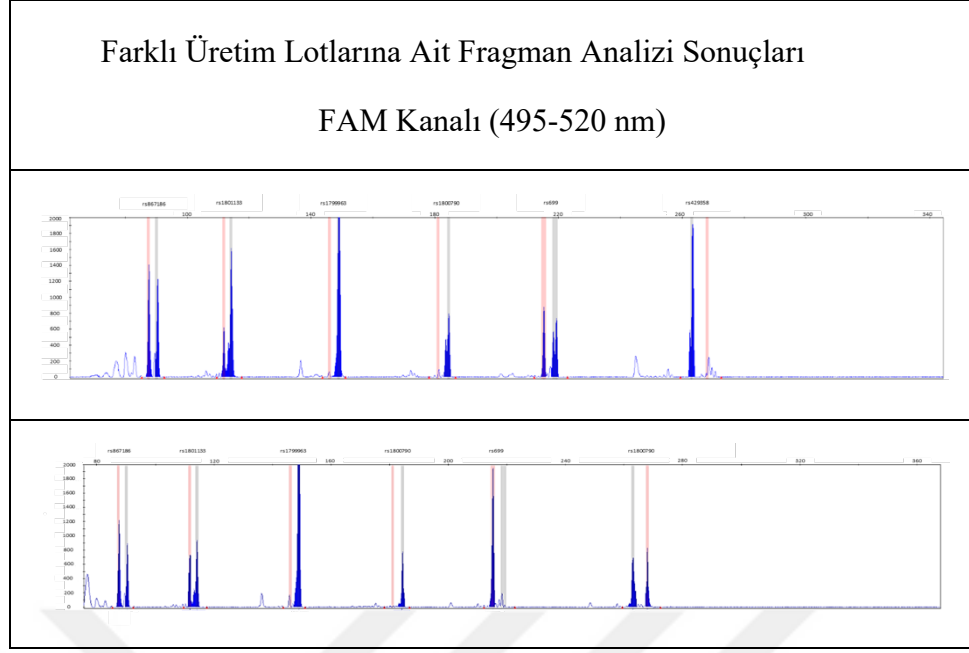


Şekil 3.4: GeneMapper Software 5 ile analiz edilen panel sonuçlarından örnekler. A) Mavi etiketli pik noktlarına sahip floresan kanal FAM (495-520 nm)'da ölçülen temsili test sonuçları rs867186 PROCR A>G, rs1801133 MTHFR C677T C>T, rs1799963 FII G>A, rs1800790 FGB -463G>A G>A, rs699 AGT C4072T C>T, rs429358 APOE T>C. B) Yeşil etiketli pik noktlarına sahip floresan kanal Yakima Yellow (531-549nm)'da ölçülen temsili test s sonuçları rs1799889 PAI-1 5G/4G A>G, rs5918 PIA1/A2 T1565C T>C, rs9574 EPCR C>G, rs1801131 MTHFR A1298C A>C, rs2383207 CDKN2B-AS1 A>G. C) Kırmızı etiketli pik noktlarına sahip floresan kanal ATTO565 (570-591nm)'da ölçülen temsili test s sonuçları rs6025 FV G>A, rs5742904 APOB C>A C>T, rs1041981 LT- α C804A C>A, rs10974944 JAK2 V617F C>G, rs1333049 G>C. D) Siyah etiketli pik noktlarına sahip floresan kanal TAMRA (546-579nm)'da ölçülen temsili test sonuçları rs1799983 NOS3 G894T G>T, rs10757274 CDKN2B-AS1 A>G, rs5186 AGTR-1 A1166C A>C, rs2070744 NOS3 -786T>C T>C, rs118203906 Factor V Cambridge C>G, rs5985 FXIII V34L C>A, rs7412 APOE C>T.

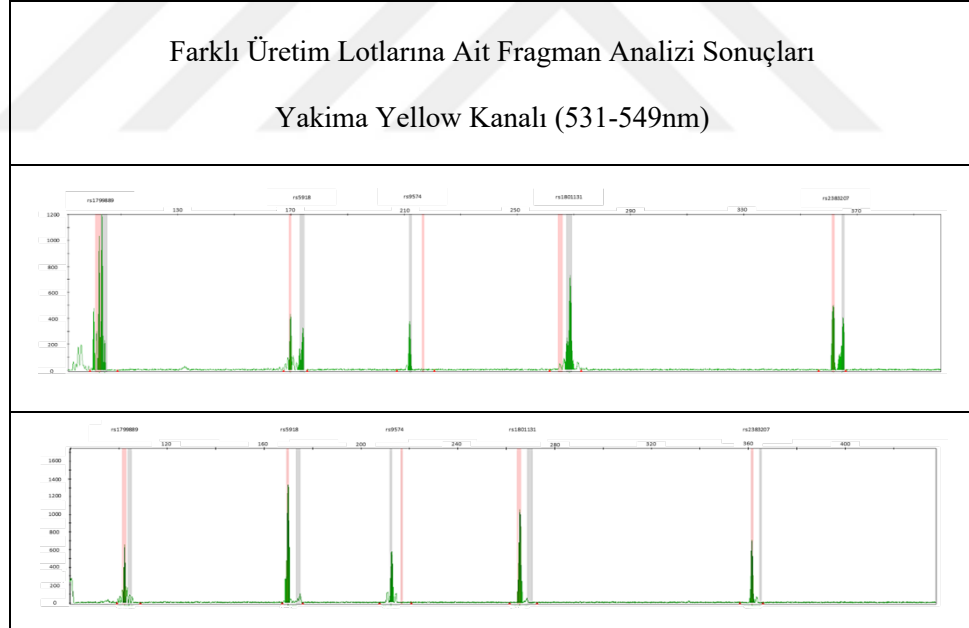
3.4. Tekrarlanabilirlik, Tekrar Üretilirlik Sonuçları

Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik deneyleri, sentetik olarak üretilen pozitif kontrol dizileri kullanılarak, farklı lot numaralı reaktif setleri kullanılarak test edilmiştir. FAM, Yakima Yellow, TAMRA, ATTO565 kanallarından elde edilen sonuçlar sırasıyla **Şekil 3.5**, **Şekil 3.6**, **Şekil 3.7** ve **Şekil 3.8**'de sunulmuştur.





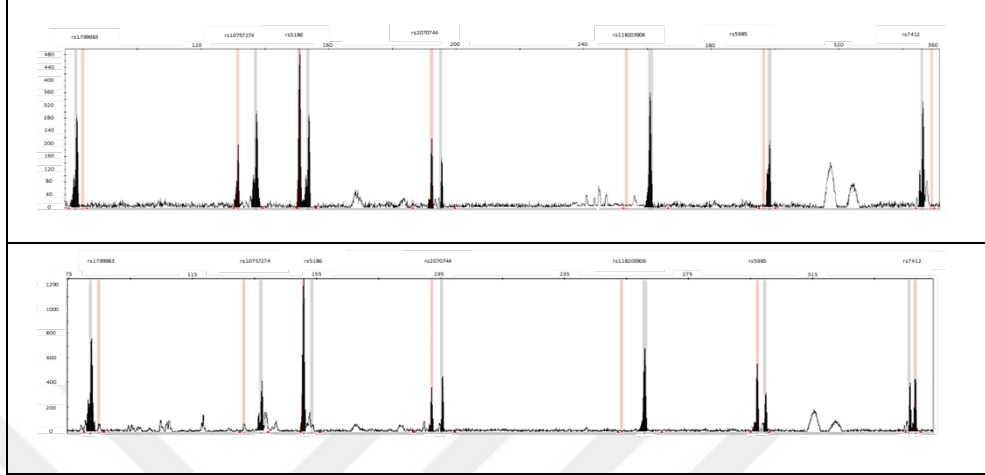
Şekil 3.5: Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik deneyleri çalışma sonuçları: GeneMapper Software 5 ile FAM kanalında analiz edilen panel sonuçlarından örnekler.



Şekil 3.6: Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik deneyleri çalışma sonuçları: GeneMapper Software 5 ile Yakima Yellow kanalında analiz edilen panel sonuçlarından örnekler.

Farklı Üretim Lotlarına Ait Fragman Analizi Sonuçları

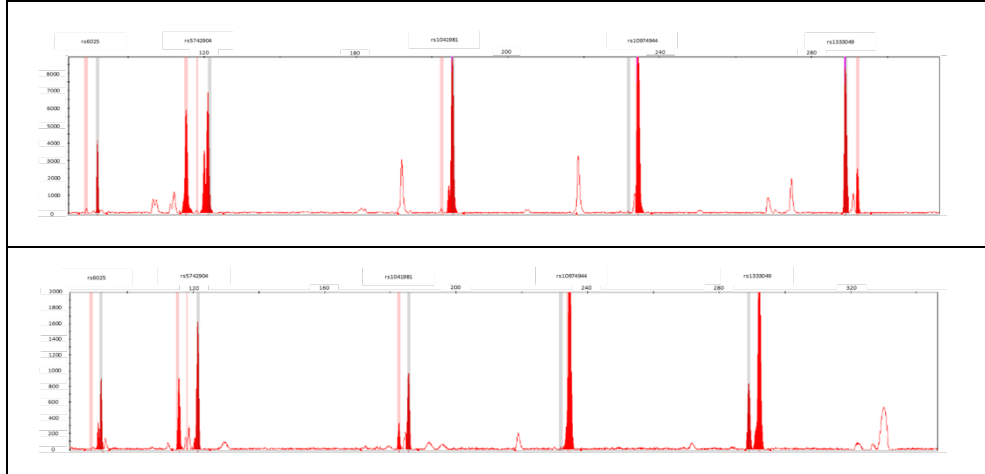
TAMRA Kanalı (546-579nm)



Şekil 3.7: Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik deneyleri çalışma sonuçları: GeneMapper Software 5 ile TAMRA kanalında analiz edilen panel sonuçlarından örnekler.

Farklı Üretim Lotlarına Ait Fragman Analizi Sonuçları

TAMRA Kanalı (546-579nm)



Şekil 3.8: Tekrarlanabilirlik, tekrar üretilebilirlik deneyleri çalışma sonuçları: GeneMapper Software 5 ile ATTO565 kanalında analiz edilen panel sonuçlarından örnekler.

4. TARTIŞMA

İnsan genomunda meydana gelebilecek herhangi bir değişiklik, hücre içi biyolojik yollar üzerinde önemli farklılıklara ve ciddi anormalliklere sebep olabilir. Temel olarak genetik bozuklukların moleküler tanısı, DNA ve/veya RNA örneklerinde patojenik mutasyonların saptanması yoluyla gerçekleştirilir. DNA ve/veya RNA dizisinde meydana gelen bir değişiklik, böyle bir etkiye sahipse patojeniteye sebep olabilir. Bu durumda doğru teşhis için hastalığın genetik temelini karakterizasyonu gereklidir. Çok az miktarda DNA'yı çoğaltabilen, güçlü ve hassas bir teknik olan PCR tekniğinin çeşitli alanlarda birçok uygulaması olduğu gibi, DNA düzeyinde kalıtsal hastalıkların teşhisi için kullanılmaktadır. PCR yöntemi ile hastalar için hassas sınıflandırmalar yapıp, klinikte prognoz ve genetik hastalıkların teşhis ve tedavisine yön vererek kolaylaştırılmaktadır. Kalıtsal bozuklukların çoğu çocukluk çağındaki kişileri etkilediğinden, çocuk doktorlarının genetik test metodolojisine ve bu testlerin klinikteki uygulamalarına aşina olmaları doğru tanı için önemlidir. Klinisyenler, hastalığın teşhisi için uygun bir genetik test sunabilmeleri için genetik bozuklukları ve etkilenen hastaları semptom ve bulgular temelinde kromozomal veya tek gen bozukluklarının alt tiplerine göre tanıyabilmeli ve kategorize edebilmelidir.

Farklı genetik test türleri arasında preimplantasyon öncesi testler, her yaşta tanı testleri, taşıyıcı testleri, semptomlar öncesi testler, ölüm sonrası testler, farmakogenomik testler, risk tahmin testleri ve doğrudan tüketiciye yönelik testler yer alır. Bu noktada önemli olan, tüm genetik testler dikkatli vaka tanımına ve doğru fenotiplemeye dayanmalıdır. Ailesel hastalığı olduğundan şüphelenilen hastalarda ilk adım genellikle kalıtım modelini ifade eden bir aile soyağacı oluşturmaktır. Soyağacı bir Mendel kalıtım modeli öneriyorsa (örneğin otozomal baskın, otozomal çekinik veya X'e bağlı çekinik), kademeli klinik tarama önerilmektedir. Bilgilendirilmiş onam ve nitelikli bir profesyonel tarafından kapsamlı bir danışmanlık sürecinden sonra, genetik test için hastadan kan veya tükürük numunesi alınmalıdır. Hastalıkla ilişkili bir genetik varyant tespit edilirse KVH'lere yatkınlığı olan veya olduğundan şüphelenilen bir kişide tanıyı netleştirmek, ailede KVH'nın nedenini belirlemek, bir sonraki neslin etkilenmesini önlemek için preimplantasyon öncesi genetik teşhis dahil aile planlaması için seçenekler sağlamak, etkilenmemiş aile üyelerine öngörücü testler

sunarak hangi aile üyelerinin KVH geliştirme riskinin yüksek olduğunu tahmin etmek gibi önemli faydalar sunulmuş olacaktır. Mutasyona sahip olan aile üyeleri için yüksek KVH geliştirme riski altında olduklarından yakın tıbbi takip süreci gerekli olacaktır. Bu bağlamda klinisyenlerin genetik testlerin yeteneklerini ve sınırlamalarını anlamaları ve bunları klinik uygulamaya uyarlamaları oldukça önemlidir.

Yaygın KVH'lerin genom tabanlı tahmini genel olarak üç yolla uygulanmaktadır: Tek gen ilişkileri, genom çapında ilişkiler, genetik ve genetik olmayan faktörleri kullanan tahmin modelleri. KVH'lerin teşhisi için doğrudan ve dolaylı genetik yatkınlık yaklaşımların mevcudiyeti ve yaygın kullanımları, genetik testler ile tespit edilmesi, önlenmesi, popülasyon taraması, farmakogenetik ve farmakogenomik gibi kardiyoloji alanlarında geniş çaplı çalışmalar yapılmasını mümkün kılmıştır. Günümüzde onkoloji alanında olduğu gibi, yakın gelecekte spesifik genotiplere dayalı özeleştirilmiş tedavileri kullanma yeteneği ve spesifik tek gen bozuklukları için gen tedavisi uygulamaları KVH'ler alanında da yaygınlaşacaktır. Bu ilerlemelerin genel kardiyolojide uygulanmasının önündeki engeller arasında, genetik testlerin sonuçlarının yorumlanmasındaki yetersizlikler, uygun danışmanlık hizmeti alınamaması ve risk olasılıklarının zayıf anlaşılması vardır. Kişiselleştirilmiş tıbbın uygulanması amacıyla çeşitli genetik değişiklikleri tanımlamak için genetik tanı merkezlerinde rutin vaka tespitini hassas, spesifik, düşük maliyetli ve uygulaması kolay olarak yapılabilmesine olanak sağlayacak, yerli üretim ve özgün tasarıma sahip test kitlerine ihtiyaç vardır.

Ülkemizdeki bu eksikliklerin giderilebilmesi için bu çalışma kapsamında tasarlanan ve pilot üretimi yapılan genetik yatkınlık tanı kiti ile hem deneysel kullanım kolaylığı sağlanmış hem de kit ile sağlanan prospektüs ile sonuçların yorumlanmasında önemli bir yol haritası oluşturulmuştur. Mevcut kitler klinik önemi olan yalnızca birkaç genin tespitine odaklanırken, bu tez çalışmasında piyasada var olan kitlerin içerdiği tüm mutasyonlara ek gen bölgeleri ve Türk popülasyonuna özgü gen bölgeleri de dahil edilmiştir.

SNP genotipleme analizlerinin geliştirilmesi günümüzde hala tasarım kısıtlamalarıyla karşı karşıya kalmaya devam etmektedir. Bu anlamda, hasta örnekleriyle yapılan testlere ek olarak sentetik pozitif kontrol kalıplarının ticari test kitlerine dahil edilmesi ve bunun yanında, test parametreleriyle mükemmel şekilde uyum sağlamasına yönelik strateji geliştirme ihtiyaçları devam etmektedir. Bu çalışmada sentetik allel dizileri,

ilgili SNP'ler için yüksek frekanslarda homozigotluk ve heterozigotluk sergileyen allellere yönelik klinik verilere dayanarak özel olarak tasarlanmıştır. Bu sentetik kontrol dizileri, biyolojik numunelere ihtiyaç duyulmadan test malzemeleri olarak başarılı bir şekilde kullanılmıştır.

Bu tez çalışması kapsamında kardiyovasküler hastalıklara yatkınlık ile ilgili gen mutasyonlarını tespit etmek için hassas ve spesifik bir aday tanı testi geliştirilmiştir. Bu test, geri dönüş süresi ve maliyetler açısından otomatik dideoksi dizilemesinden daha üstündür. VFLASP-ARMS testi yöntemi ile tasarlanan, kapiler elektroforez cihazı ile fragman analizi yöntemine bağlı olarak analizi gerçekleştirilen, kardiyovasküler hastalıklara yatkınlıkla ilgili gen mutasyon testi, genetik tanı laboratuvarları tarafından kolaylıkla uygulanabilir.

Geliştirilen bu kitin ticarileştirilmesi aşamasında hasta örnekleri ile ve tükürük, kan, doku gibi farklı numune tipleri ile çalışılıp doğruluk, hassasiyet, güvenilirlik, tekrarlanabilirlik deneylerinin sürdürülmesi ve desteklenmesi gerekmektedir.

VFLASP-ARMS tekniğine dayalı geliştirilen bu kitte, mutant ve yabani tip spesifik PCR amplifikasyonları aynı reaksiyon tüpünde yer alır ve böylece çok sınırlı şablonlara bağlanma için rekabet etmelerine izin verilir. Mutasyonunun saptanması için duyarlılığı artırmak amacıyla her bir hedef gen bölgesi için kullanılan 3 primerin oranı, yapılan detaylı çalışmalar ile optimize edilmiş ve çalışmaların sonucunda her bir primerin 160mM'lik kombinasyonunun en güçlü fragman pikleri ile sonuçlandığı bulunmuştur.

Tasarlanan test kitinin geliştirilmesi amacıyla yapılabilecek sonraki çalışmalar için yanak mukozası, EDTA veya heparin ile antikoagüle edilmiş kemik iliği, taze izole edilmiş veya depolanmış, formalinle sabitlenmiş, parafine gömülmüş dokular ve amniyotik sıvılar gibi çeşitli kaynaklardan izole edilen DNA örneklerinden de başarılı amplifikasyon sonuçları elde etmek amacıyla gerekli çalışmalar yapılmasına temel nitelikte olanak sağlamaktadır. Geliştirilen bu test kiti ile yapılacak çalışmalar, numunenin alınmasından sonra 2,5 - 3 saat içinde tamamlanabilir. Bu süre, hastalara sonuç raporu verilmesi için laboratuvarında yapılacak çalışmalar için makul ve hatta mevcut testlerden çok daha kısa bir süredir.

Geliştirilen kitin dizileme yöntemi ile maliyet kıyaslaması yapıldığında 23 gen bölgesinin tek yönlü dizilenmesi durumunda dizi analizi için üretilecek kit maliyeti

günümüzde 115 \$ 'a ulaşırken, tasarlanan kit ile yapılacak çalışma 23 gen bölgesi için yaklaşık 2,8 \$ olmaktadır. Yapılan maliyet hesaplaması neticesinde geliştirilen kitin geleneksel dizileme yöntemine kıyasla 40 kattan daha düşük maliyetli olduğu hesaplanmıştır.

Ülkemizde yurtdışı menşeli üretici firmaların bulunmadığı için genetik tanı kitlerinin son kullanıcıya maliyetleri oldukça yüksek olmaktadır. Bu kitlerin tedarikinin yerel distribütör/ithalatçı firmalardan yapılması zorunluluğu, döviz cinsinden satın alımların yapılması gerekliliği, ithalat bedelleri, yurtdışı ve yurtiçi nakliye masrafları, her bir testin fiyatında ve maliyet değerinde ciddi ölçüde artışa neden olmaktadır. Bu kitlerin ülkemizde yerel üreticiler tarafından üretilmesi bu maliyet masraflarını önemli derecede azaltmaktadır. Bu sebeple bu tez kapsamında üretilen tanı kitinin ülkemizde üretimi ve satışı oldukça tasarruflu olacak olup, ülke ekonomisine katkıda bulunması hedeflenmektedir.

VFLASP-ARMS yöntemine dayalı tasarlanan bu aday tanı kiti, RT-PCR veya dizileme gibi yöntemlere kıyasla daha avantajlıdır. Çünkü bu teknik, hedef sekansa özgü yabani tip ve mutant allellerin aynı anda değerlendirilebilmesine olanak verir. Bu teknikte kesim enzimleri ile inkübasyon ihtiyacını ortadan kaldırdığı için geleneksel RFLP tekniğinden de hem zaman hem de iş gücü açısından daha avantajlıdır. Geliştirilen kit 0.15 µg DNA ile kullanımda güvenilir ve spesifik sonuçlar sağlar.

Benzersiz primer prob tasarımlarıyla özgül ve Türk popülasyonunda görülen mutasyonlara odaklanan bu aday test, halk sağlığı laboratuvarları tarafından onaylanmaya aday olup, genetik tanı merkezlerinde uzman kişiler tarafınca pratik kullanılabilirliği ve uygun fiyatlı oluşu sayesinde diagnostik kullanıma uygunluğu vaat etmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Klinisyenler, bu tez kapsamında tasarlanan aday kiti, uygunluk çalışmaları tamamlandıktan sonra klinik olarak anlamlı genetik değerlendirme araçlarını da kullanmak sureti ile, hastaları kişiselleştirilmiş temel genetik riskleri hakkında daha iyi bilgilendirebilirler.

Günümüzde, özellikle teşhis uygulamalarında, kapsamlı ve çok hedefli SNP genotipleme analizlerine nihai bir ihtiyaç vardır. Düşük maliyetli, hassas, tekrarlanabilir ve yenilikçi analiz geliştirme gerekliliği, ticari uygulama potansiyeli ile birleştiğinde, SNP genotiplemesi için yenilikçi bir yöntem olan VFLASP-ARMS yöntemini geliştirilme ihtiyacı doğurmuştur. Bu tezde geliştirilen test tasarımı metodolojisi, her bir testte insan hastalıklarıyla ilişkili karmaşık genetik yatkınlıkları kapsayan, ilgili hedeflerin tespiti için sınırsız potansiyel sunmaktadır. Bu çalışmada geliştirilen metodolojinin uyumluluğu, klinik öneme sahip SNP sayısının gelecekte artması durumunda bile hızlıca uyarlanabilir ve modifiye edilebilir olacaktır.

Bu çalışmada, hem VFLASP (analitik yaklaşımı) hem de ARMS (alele özgü primer tasarım özelliği) metodolojilerinin öne çıkan avantajları birleştirilmiş ve bunlar, klinik genetik araştırmalarında çoklu SNP genotipleme uygulamalarının taleplerini karşılayacak şekilde entegre edilmiştir. Kalıtsal hastalık testleri ve hastalık yatkınlık analizi alanlarında insan genetik çeşitliliğinin analizine yönelik artan bir talep vardır. Klinik uygulamalar için analiz tekniği basit ve güvenilir olmalı, aynı anda birden fazla mutasyonun analizine olanak sağlamalı ve tüm nokta mutasyonlarına uygun olmalıdır.

Tasarım ve geliştirme süreci esas olarak hedef ve hedef olmayan aleller arasında ayırım yapılmasını sağlayacak reaksiyon koşullarının belirlenmesinden oluşturulan VFLASP-ARMS tekniği, hastalığa yatkınlığın tespitinde rutin uygulamalar için uygundur. Bu tez çalışmasında geliştirilen bu metodolojinin tüm nokta mutasyonları için uygun olduğu görülmektedir.

VFLASP-ARMS yöntemi hem tek bir mutasyon hem de daha fazla mutasyon için çok sayıda örneğin eş zamanlı olarak analiz edilmesinin gerekli olduğu durumlarda özellikle avantaj sağlayıcıdır. Bu avantaj yalnızca zamandan tasarruf sağlamakla kalmıyor, aynı zamanda nispeten daha uygun maliyetli bir yaklaşım sunmaktadır.

Multipleks VFLASP-ARMS testlerinin geliştirilmesi, unipleks testlerden daha karmaşıktır, ancak bir kez optimize edildiğinde testlerin kullanımı basittir ve performansları güvenilirlerdir. Geliştirilen başarılı bir VFLASP-ARMS reaksiyonu, ARMS primerinin hedef olmayan allelden gelen amplifikasyonu en aza indirirken hedef alelden etkili amplifikasyona izin verir. Bu özelliğinden dolayı SNP tespiti için güvenilir bir yaklaşım sunmaktadır.

VFLASP-ARMS reaksiyonu için allel spesifik primerlerin tasarlanması anlamlı veya karşıt anlamlı diziye göre gerçekleştirilebilir. Yapılan tez çalışmasında tamamlanan optimizasyon çalışmaları ile, bu iki zincirin birbirine göre herhangi bir tasarım avantajı bulunmadığı tespit edilmiştir. Ancak, seçilen bir dizinin reaksiyon optimizasyonu esnasında karşılaşılabilecek zorlukların üstesinden gelebilmek için, allel spesifik primerlerin yönünün değiştirilmesi, test geliştirmede ikinci bir denemeye fırsat sunmaktadır.

Geliştirilen teşhis kitinde allel spesifik primerlerin tasarımları kadar, sentez işlemleri esnasındaki doğrulukları ve kaliteleri de oldukça önemlidir. Bu çalışmada veriler sunulmamasına rağmen, farklı primer sentez skalaları deneylerin en başında denenmiş olup, en iyi sonuçlar, sentez sonrası HPLC’de saflaştırılan primer ve probalar ile elde edilmiştir.

Optimizasyon çalışmaları tamamlanan bir VFLASP-ARMS tekniğine dayalı SNP genotipleme kiti ile rutinde çalışılırken, numune hazırlamadan analize kadar tüm süreç tek bir günde kolaylıkla gerçekleştirilebilir. Buna ek olarak bu tez çalışmasında kullanılan termal döngü cihazından daha hızlı çalışan termal döngüleyicilerin kullanılması, protokolün tamamlanması için gereken sürenin daha da azaltılmasına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Abbate R., Sticchi E., Fatini C., (2008), “Genetics of cardiovascular disease”, *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism*, 5(1): 63-66.

Abuagla H. A., (2016), “Relation between Endothelial Protein C Receptor Gene Polymorphisms rs867186 and rs9574, and the Risk of Deep Vein Thrombosis in Sudanese”, *Open Access Library Journal* 3(01), 1.

Ahmad Z., Adams-Huet B., Chen C., Garg A., (2012), “Low prevalence of mutations in known loci for autosomal dominant hypercholesterolemia in a multiethnic patient cohort”, *Circ Cardiovasc Genet*. 5(6):666-75.

Andreassi M., Botto N., Cocci F., Battaglia D., Antonioli E., Manfredi S., Colombo M., Biagini A., Clerico A., (2003), “Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T polymorphism, homocysteine, vitamin B12, and DNA damage in coronary artery disease”, *Human Genetics*, 112, 171–177.

Anokhin B., (2018), “Coagulation Faktör XIIIa: biochemical properties underlying physiological function”, *Doktora tezi*, University of Louisville.

Aparicio C., Dahlbäck B., (1996), “Molecular mechanisms of activated protein C resistance. Properties of Faktör V isolated from an individual with homozygosity for the Arg506 to Gln mutation in the Faktör V gene”, *Biochemical Journal*, 313(2), 467-472.

Aragam K. G., Dobbyn A., Judy R., Chaffin M., Chaudhary K., Hindy G., Cagan A., Finneran P., Weng L. C., Loos R. J. F., Nadkarni G., Cho J. H., Kember R. L., Baras A., Reid J., Overton J., Philippakis A., Ellinor P. T., Weiss S. T., Rader, D. J., Lubitz, S. A., Smoller J. W., Karlson E. W., Khera A. W., Kathiresan S., Do R., Damrauer S. M., Natarajan, P., (2020), “Limitations of contemporary guidelines for managing patients at high genetic risk of coronary artery disease”, *Journal of the American College of Cardiology*, 75(22), 2769-2780.

Arbiol-Roca A., Padró-Miquel A., Hueso M., Navarro E., Alía-Ramos P., González-Álvarez M. T., Rama I., Torras J., Grinyó J.M., Cruzado J.M., Lloberas N., (2017), “Association of ANRIL gene polymorphisms with major adverse cardiovascular events in hemodialysis patients”, *Clin Chim Acta.*, 466:61-67.

Arbustini E., Favalli V., Narula N., Disabella E., Grasso M., (2011), “Genetic Basis of Cardiovascular Disease” In: V. Fuster, R. A. Harrington, J. Narula, Z. J. Eapen, Editors, “Hurst's The Heart”, 14th Edition, McGraw Hill.

Ashok-Kumar M., Emmanuel C., Dhandapany P. S., Rani D. S., SaiBabu R., Cherian K. M., Thangaraj K., (2011), “Haplotypes on 9p21 modify the risk for coronary artery disease among Indians”, *DNA and Cell Biology*, 30(2), 105-110.

Babu K. N., Sheeja T. E., Minoo D., Rajesh M. K., Samsudeen K., Suraby E. J., & Kuma, I. P. V. (2021). "Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and derived techniques", *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols*, 219-247.

Bai R. K., Wong L. J. C., (2004), "Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: a single-step approach", *Clinical Chemistry*, 50 (6):996–1001.

Bakker R. C., Brandjes D. P., (1997), "Hyperhomocysteinaemia and associated disease", *Pharmacy world & science: PWS*, 19(3), 126-132.

Balogh I., Szöke G., Kárpáti L., Wartiovaara U., Katona E., Komáromi I., Pfliegler G., Mikkola H., Muszbek L., (2000), "Val34Leu polymorphism of plasma Faktör XIII: biochemistry and epidemiology in familial thrombophilia" *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 96(7), 2479-2486.

Bayramoglu A., Bayramoglu G., Guler H. I., (2020), "The role of rs1799889 genetic variation in Type 2 diabetes and Diabetic Nephropathy risk", *Erciyes Medical Journal*, 42(4), 441-447.

Bernhardt B. A., Zayac C., Pyeritz R. E., (2011), "Why is genetic screening for autosomal dominant disorders underused in families? The case of hereditary hemorrhagic telangiectasia", *Genetics in Medicine*, 13(9), 812-820.

Braund P. S., (2015), "Functional analysis of novel genetic markers of coronary artery disease identified by genome-wide association studies", *Doktora tezi, University of Leicester*.

Buckingham L., (2012) "Chromosomal structure and chromosomal mutation" In: L. Buckingham, Editor, "Molecular Fundamentals Methods and Clinical Applications", 2nd Edition, Philadelphia: F.A. Davis Company.

Burke W., Atkins D., Gwinn M., Guttmacher A., Haddow J., Lau J., Palomaki G., Press N., Richards C. S., Wideroff L., Wiesner G. L., (2002), "Genetic test evaluation: information needs of clinicians, policy makers, and the public", *American journal of epidemiology*, 156(4), 311-318.

Butler J. M., Buel E., Crivellente F., McCord B. R. (2004), "Forensic DNA typing by capillary electrophoresis using the ABI Prism 310 and 3100 genetic analyzers for STR analysis", *Electrophoresis*, 25(10-11), 1397-1412.

Casas J. P., Cavalleri G. L., Bautista L. E., Smeeth, L., Humphries S. E., Hingorani A. D., (2006), "Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and cardiovascular disease: a HuGE review", *American journal of epidemiology*, 164(10), 921-935.

Chen F., Qiao Q., Xu P., Fan B., Chen Z., (2014), "Effect of Faktör XIII-A Val34Leu polymorphism on myocardial infarction risk: a meta-analysis", *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 20(8), 783-792.

Cirino A. L., Ho C. Y., (2013), “Genetic testing for inherited heart disease”, *Circulation*, 128(1), e4-e8.

Coggins, N. B., Stultz, J., O’Geen, H., Carvajal-Carmona, L. G., & Segal, D. J. (2017). “Methods for scarless, selection-free generation of human cells and allele-specific functional analysis of disease-associated SNPs and variants of uncertain significance”, *Scientific Reports*, 7(1), 15044.

Coronary Artery Disease Genetics C., (2011), “A genome-wide association study in Europeans and South Asians identifies five new loci for coronary artery disease”, *Nature genetics*, 43(4), 339-344.

Crouch D. J., Bodmer W. F., (2020), “Polygenic inheritance, GWAS, polygenic risk scores, and the search for functional variants”, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(32), 18924-18933.

Cunnington M. S., Koref S. M., Mayosi B. M., Burn J., Keavney B., (2010), “Chromosome 9p21 SNPs associated with multiple disease phenotypes correlate with ANRIL expression”, *PLoS genetics*, 6(4), e1000899.

Daly A. K., (2010), “Pharmacogenetics and human genetic polymorphisms”, *Biochemical Journal*, 429(3), 435-449.

D'Angelo A, Selhub J., (1997), “Homocysteine and thrombotic disease”, *Blood*, 90(1), 1-11.

Day I. N. M., Wilson D. I., (2001), “Genetics and cardiovascular risk”, *BMJ*, 323, 1409–12.

Deloukas P., Kanoni S., Willenborg C., Farrall M., Assimes T. L., Thompson J. R., Wareham N., (2013), “Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease”, *Nature genetics*, 45(1), 25-33.

Do R., Stitzel N. O., Won H. H., Jørgensen A. B., Duga S., Angelica Merlini P., Kathiresan, S., (2015), “Exome sequencing identifies rare LDLR and APOA5 alleles conferring risk for myocardial infarction”, *Nature*, 518(7537), 102-106.

Eberle M. A., Ng P. C., Kuhn K., Zhou L., Peiffe, D. A., Galver L., ... & Murray S. S. (2007), “Power to detect risk alleles using genome-wide tag SNP panels”, *PLoS Genetics*, 3(10), e170.

El-Lebedy D., (2018), “Interaction between endothelial nitric oxide synthase rs1799983, cholesteryl ester-transfer protein rs708272 and angiopoietin-like protein 8 rs2278426 gene variants highly elevates the risk of type 2 diabetes mellitus and cardiovascular disease”, *Cardiovascular diabetology*, 17(1), 1-10.

Etlik O., Koksall V., Arican-Baris S. T., Baris I., (2011), “Development and validation of a cost-effective in-house method, tetra-primer ARMS PCR assay, in genotyping of seven clinically important point mutations”, *Molecular and cellular probes*, 25(4), 177-181.

Fiatal S., Ádány R., (2018), “Application of Single-Nucleotide Polymorphism-Related Risk Estimates in Identification of Increased Genetic Susceptibility to Cardiovascular Diseases: A Literature Review”, *Frontiers Public Health*, 5:358.

Förstermann U., Sessa W. C., (2012), “Nitric oxide synthases: regulation and function”, *European Heart Journal*, 33(7): 829-837.

Francisco M. D. L. V., Lazaruk K. D., Rhodes M. D., & Wenz M. H. (2005), “Assessment of two flexible and compatible SNP genotyping platforms: TaqMan® SNP Genotyping Assays and the SNPLEX™ Genotyping System”, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 573(1-2), 111-135.

Friedman G., Goldschmidt N., Friedlander Y., Ben-Yehuda A., Selhub J., Babaey S., Mendel M., Kidron M., Bar-On H., (1999), “A Common Mutation A1298C in Human Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene: Association with Plasma Total Homocysteine and Folate Concentrations”, *The Journal of Nutrition*, 129(9), 1656–1661.

Gayon J., (2016), “From Mendel to epigenetics: History of genetics”, *Comptes rendus biologiques*, 339(7-8), 225-230.

Geisterfer-Lowrance A. A., Kass S., Tanigawa G., Vosberg H. P., McKenna W., Seidman C. E., Seidman J. G., (1990), “A molecular basis for familial hypertrophic cardiomyopathy: a β cardiac myosin heavy chain gene missense mutation” *Cell*, 62(5), 999-1006.

Gen M., Ahmed H. I., (2018), “Amplification Refractory Mutation System (ARMS).” <http://grcpk.com/wp-content/uploads/2014/10/7.-ARMS.pdf> Erişim tarihi: 21/01/2023

Gerhardt A., Howe N., Krüssel J. S., Scharf R. E., Zotz R. B., (2014), “Elevated lipoprotein (a) levels and homozygous human platelet antigen 1b (HPA-1b) genotype are risk factors for intrauterine growth restriction (IUGR)”, *Journal of thrombosis and thrombolysis*, 37(2), 107-117.

Global Lipids Genetics Consortium, (2013), “Discovery and refinement of loci associated with lipid levels”, *Nature genetics*, 45(11), 1274-1283.

Grinshtein Y. I., Kosinova A. A., Grinshtein I. Y., Subbotina T. N., Savchenko A. A., (2018), “The prognostic value of combinations of genetic polymorphisms in the ITGB3, ITGA2, and CYP2C19* 2 genes in predicting cardiovascular outcomes after coronary bypass grafting”, *Genetic testing and molecular biomarkers*, 22(4), 259-265.

Gstöttenmayr D., (2011), “DNA separation by Capillary Electrophoresis: A literature overview”, *Lisans Tezi, University of South Bohemia*.

Gunderson K. L., Steemers F. J., Lee G., Mendoza L. G., & Chee M. S. (2005), "A genome-wide scalable SNP genotyping assay using microarray technology", *Nature Genetics*, 37(5), 549-554.

Hashim H. O., & Al-Shuhaib M. B. S. (2019), "Exploring the potential and limitations of PCR-RFLP and PCR-SSCP for SNP detection: A review", *Journal of applied biotechnology reports*, 6(4), 137-144.

He Q., Hu O., Chen M., Liang Z., Liang L., & Chen Z. (2022), "A novel and cost-efficient allele-specific PCR method for multiple SNP genotyping in a single run", *Analytica Chimica Acta*, 1229, 340366.

Heeb M. J., Kojima Y., Greengard J. S., Griffin J. H., (1995), "Activated protein C resistance: molecular mechanisms based on studies using purified Gln506-Factor V", *Blood*, 85(12), 3405-3411.

Helgadóttir A., Thorleifsson G., Manolescu A., Gretarsdóttir S., Blondal T., Jonasdóttir A., Stefansson, K., (2007), "A common variant on chromosome 9p21 affects the risk of myocardial infarction", *Science*, 316(5830), 1491-1493.

Hillier L. W., Miller R. D., Baird S. E., Chinwalla A., Fulton L. A., Koboldt D. C., & Waterston R. H. (2007), "Comparison of *C. elegans* and *C. briggsae* genome sequences reveals extensive conservation of chromosome organization and synteny", *PLoS Biology*, 5(7), e167.

Howson J. M., Zhao W., Barnes D. R., Ho W. K., Young R., Paul D. S., Saleheen D., (2017), "Fifteen new risk loci for coronary artery disease highlight arterial-wall-specific mechanisms" *Nature genetics*, 49(7), 1113-1119.

Huang Y., Jin H., Yang G., (2018), "WITHDRAWN: A meta-analysis on associations of CDKN2B-AS variants with atherosclerotic cardio-cerebral vascular diseases", *Life Sciences*, S0024-3205(18)30840-3.

Jiang Z., Wang H., Michal J. J., Zhou X., Liu B., Woods L. C. S., & Fuchs R. A. (2016), "Genome wide sampling sequencing for SNP genotyping: methods, challenges and future development", *International Journal of Biological Sciences*, 12(1), 100.

Johnson M. P., Haupt L. M., & Griffiths L. R. (2004), "Locked nucleic acid (LNA) single nucleotide polymorphism (SNP) genotype analysis and validation using real-time PCR", *Nucleic Acids Research*, 32(6), e55-e55.

Junker R., Koch H. G., Auberger, K., Münchow, N., Ehrenforth, S., Nowak-Göttl, U., (1999), "Prothrombin G20210A gene mutation and further prothrombotic risk Faktors in childhood thrombophilia", *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 19(10), 2568-2572.

Junusbekov Y., Bayoglu B., Cengiz M., Dirican A., Arslan C., (2019), "AGT rs699 and AGTR1 rs5186 gene variants are associated with cardiovascular-related phenotypes in atherosclerotic peripheral arterial obstructive disease", *Irish Journal of Medical Science*, 1-10.

Kalafatis M., Bertina R. M., Rand M. D., Mann K. G., (1995), "Characterization of the molecular defect in Faktör VR506A (*)", *Journal of biological chemistry*, 270(8), 4053-4057.

Kashyap S., Kumar S., Agarwal V., Misra D. P., Rai M. K., Kapoor A., (2018), "The association of polymorphic variants, rs2267788, rs1333049 and rs2383207 with coronary artery disease, its severity and presentation in North Indian population", *Gene*, 648, 89-96.

Khatami M., Heidari M. M., (2016), "Common rs5918 (PLA1/A2) polymorphism in the ITGB3 gene and risk of coronary artery disease", *Archives of Medical Science-Atherosclerotic Diseases*, 1(1), 9-15.

Kleparnik K., Bocek P., (2007), "DNA diagnostics by capillary electrophoresis", *Chemical reviews*, 107(11), 5279-5317.

Koyama S., Ito K., Terao C., Akiyama M., Horikoshi M., Momozawa Y., Matsunaga H., Ieki H., Ozaki K., Takahashi A., Nomura S., Morita H., Akazawa H., Kim C., Seo J., Higasa K., Iwasaki M., Yamaji T., Sawada N., Tsugane S., Koyama T., Ikezaki H., Takashima H., Tanaka K., Arisawa K., Kuriki K., Naito M., Wakai K., Suna S., Sakata Y., Sato H., Hori M., Sakata Y., Matsuda K., Murakami Y., Aburatani H., Kubo M., Matsuda F., Kamatani Y., Komuro I., (2020), "Population-specific and trans-ancestry genome-wide analyses identify distinct and shared genetic risk loci for coronary artery disease" *Nature genetics*, 52(11), 1169-1177.

Laing N., Kraus S. M., Shaboodien G., Ntusi N. A. B., (2019), "An overview of the genetic basis of cardiovascular disease", *South African Medical Journal*, 109(6), 364-370.

Lander E. S., (1996), "The new genomics: global views of biology" *Science*, 274(5287), 536-539.

Lehrman M. A., Schneider W. J., Südhof T. C., Brown M. S., Goldstein J. L., Russell D. W., (1985), "Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains", *Science*, 227(4683), 140-146.

Leu H. B., Chung C. M., Chen J. W., Pan W. H., (2019), "The Mediterranean diet reduces the genetic risk of chromosome 9p21 for myocardial infarction in an Asian population community cohort", *Scientific reports*, 9(1), 1-8.

Lewis R. G., Simpson B., (2021), "Genetics, Autosomal Dominant", StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).

Li X., Lin Y., Zhang R., (2019), "Associations between endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and the risk of coronary artery disease: A systematic review and meta-analysis of 132 case-control studies", *The European Journal of Preventive Cardiology*, 26(2):160-170.

Li, T. L., Wu, M. W., Lin, W. C., Lai, C. H., Chang, Y. H., Su, L. J., & Chen, W. Y. (2019), "Designed phosphate-methylated oligonucleotides as PCR primers for SNP discrimination", *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411, 3871-3880.

Little S., (1995), "Amplification-refractory mutation system (ARMS) analysis of point mutations", *Current protocols in human genetics*, 7(1), 9-8.

Liu M. S., Amirkhanian V. D., (2003), "DNA fragment analysis by an affordable multiple-channel capillary electrophoresis system", *Electrophoresis*, 24(1-2), 93-95.

Liu X., Zhang C., Zhao M., Liu K., Li H., Li N., ... & Cui, Y. (2018), "A direct isothermal amplification system adapted for rapid SNP genotyping of multifarious sample types", *Biosensors and Bioelectronics*, 115, 70-76.

Lloyd-Jones D. M., Nam B. H., D'Agostino Sr R. B., Levy D., Murabito J. M., Wang T. J., Wilson P. W. F., O'Donnell C. J., (2004), "Parental cardiovascular disease as a risk Faktör for cardiovascular disease in middle-aged adults: a prospective study of parents and offspring", *Jama*, 291(18), 2204-2211.

Lo Y. M. D., (1998), "The amplification refractory mutation system" In: Y. M. Dennis Lo, Editor, "Clinical applications of PCR", 1st Edition, Humana Press.

Mahdiah N., Bahareh R., "An overview of mutation detection methods in genetic disorders", *Iran. J. Pediatr.* 23(4) :375-88. PMID: 24427490; PMCID: PMC3883366

Makanga J. O., Christianto A., Inazu T., (2015), "Allele-specific real-time polymerase chain reaction as a tool for urate transporter 1 mutation detection. In: PCR primer design", Springer, 117–125.

Malpartida-Cardenas K., Rodriguez-Manzano J., Yu L. S., Delves M. J., Nguon C., Chotivanich K., ...& Georgiou P. (2018), "Allele-specific isothermal amplification method using unmodified self-stabilizing competitive primers", *Analytical Chemistry*, 90(20), 11972-11980.

Marenberg M. E., Risch N., Berkman L. F., Floderus B., de Faire U., (1994), "Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins", *New England Journal of Medicine*, 330(15), 1041-1046.

Marian A. J., Brugada R., Roberts1 R., (2011), "Mendelian Basis of Congenital and OtherCardiovascular Diseases", In: V. Fuster, R. A. Harrington, J. Narula, Z. J. Eapen, Editors, "Hurst's The Heart", 14th Edition, McGraw Hill.

Martinelli I., Legnani C., Bucciarelli P., Grandone E., De Stefano V., Mannucci P. M., (2001), "Risk of pregnancy-related venous thrombosis in carriers of severe inherited thrombophilia", *Thrombosis and haemostasis*, 86(09), 800-803.

Matsuda K., (2017), "PCR-based detection methods for single-nucleotide polymorphism or mutation: real-time PCR and its substantial contribution toward technological refinement", *Advances in Clinical Chemistry*, 80, 45-72.

Mayer E. L., Jacobsen D. W., Robinson, K., (1996), "Homocysteine and atherosclerosis", *Journal of the American College of Cardiology*, 27, 517-527.

Muse E. D., Chen S. F., Torkamani A., (2021), "Monogenic and Polygenic Models of Coronary Artery Disease", *Current Cardiology Reports*, 23(8): 1-12.

Musunuru K., Kathiresan S., (2019), "Genetics of common, complex coronary artery disease", *Cell*, 177(1), 132-145.

Newton C. R., Graham A., Heptinstall L. E., Powell S. J., Summers C., Kalsheker N., Markham A., (1989), "Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS)", *Nucleic acids research*, 17(7), 2503-2516.

Ntusi N. A., Shaboodien G., Badri M., Mayosi B. M., Gumede F., (2016), "Clinical features, spectrum of causal genetic mutations and outcome of hypertrophic cardiomyopathy in South Africans: cardiovascular topics", *Cardiovascular journal of Africa*, 27(3), 152-158.

Ohnishi Y., Tanaka T., Ozaki K., Yamada R., Suzuki H., & Nakamura Y. (2001), "A high-throughput SNP typing system for genome-wide association studies", *Journal of Human Genetics*, 46(8), 471-477.

Okser S., Lehtimäki T., Elo L. L., Mononen N., Peltonen N., Kähönen M., Juonala M., Fan Y. M., Hernesniemi J. A., Laitinen T., Lyytikäinen L. P., Rontu R., Eklund C., Hutri-Kähönen N., Taittonen L., Hurme M., Viikari J.S., Raitakari O.T., Aittokallio T., (2010), "Genetic variants and their interactions in the prediction of increased pre-clinical carotid atherosclerosis: the cardiovascular risk in young Finns study", *PLoS Genetics*, 6(9), e1001146.

Olson N. C., Raffield L. M., Lange L.A., Lange E. M., Longstreth W. T. Jr., Chauhan G., DeBette S., Seshadri S., Reiner A. P., Tracy R. P., (2018), "Associations of activated coagulation Faktor VII and Faktor VIIa-antithrombin levels with genome-wide polymorphisms and cardiovascular disease risk", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 16(1):19-30

Ozdemir O., Yenicesu G. I., Silan F., Köksal B., Atik S., Ozen F., Göl M., Cetin A., (2012), "Recurrent Pregnancy Loss and Its Relation to Combined Parental Thrombophilic Gene Mutations", *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 16(4), 279-286.

Panoutsopoulou K., Wheeler E., (2018), "Key concepts in genetic epidemiology", *Genetic Epidemiology*, 7-24.

Pereira A., Mendonça M.I., Borges S., Freitas S., Henriques E., Rodrigues M., Freitas A. I., Sousa A. C., Brehm A., Reis R. P. D., (2018), "Genetic Risk Analysis of Coronary Artery Disease in a Population-based Study in Portugal, Using a Genetic Risk Score of 31 Variants", *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 111(1), 50-61.

Peyser P. A., (1997), "Genetic epidemiology of coronary artery disease", *Epidemiologic reviews* 19(1), 80-90.

Phababpha S., Kukongviriyapan U., Pakdeechote P., Senggunprai L., Kukongviriyapan V., Settasatian C., Tatsanavivat P., Intharaphet P., Senthong V., Komanasin N., Settasatian N., Greenwald S. E., (2013), “Association of arterial stiffness with single nucleotide polymorphism rs1333049 and metabolic risk Factors”, *Cardiovascular Diabetology*, 12(1), 1-8.

Price D. T., Ridker P. M., (1997), “Factor V Leiden mutation and the risks for thromboembolic disease: a clinical perspective”, *Annals of Internal Medicine* 127(10): 895-903.

Pritchard J. K., (2001), “Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases?”, *American Journal of Human Genetics*, 69(1):124-37.

Rahaman M., Mukherjee M., & Chakravorty N., (2021), “Genetic Disorders, Genotyping Techniques and the Emerging Role of Tetra-ARMS-PCR as a Diagnostic Tool”, *Resonance*, 26, 1229-1240.

Raj R., Bhatti J. S., Badada S. K., Ramteke P. W., (2015), “Genetic basis of dyslipidemia in disease precipitation of coronary artery disease (CAD) associated type 2 diabetes mellitus (T2DM)”, *Diabetes/metabolism research and reviews*, 31(7), 663-671.

Regieli J. J., Nathoe H. M., Koerselman J., van der Graaf Y., Grobbee D. E., Doevendans P. A., (2007), “Coronary collaterals—insights in molecular determinants and prognostic relevance”, *International Journal of Cardiology*, 116(2), 139-143.

Richards S., Aziz N., Bale S., Bick D., Das S., Gastier-Foster J., Grody W. W., Hegde M., Lyon E., Spector E., (2015), “ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology”, *Genetics in Medicine*, 17:405–424.

Roberts R., (2014), “Genetics of coronary artery disease: an update”, *Methodist de Bakey cardiovascular journal*, 10(1), 7.

Robertson L., Wu O., Langhorne P., Twaddle S., Clark P., Lowe G. D. O., Walker I. D., Greaves M., Brenkel I., Regan L., Greer I. A., (2006), “Thrombophilia in pregnancy: a systematic review”, *British Journal of Haematology*, 132(2), 171–196.

Romac R., Barak O., Glavas D., Susilovic Grabovac Z., Lozo P., Roje I., Caljkusic K., Drmic-Hofman I., Davis J. T., Dujic Z., Lovering A. T., (2017), “Characterization of blood flow through intrapulmonary arteriovenous anastomoses and patent foramen ovale at rest and during exercise in stroke and transient ischemic attack patients”, *Echocardiography*, 34(5), 676-682.

Rosendaal F. R., Reitsma P. H., (2009), “Genetics of venous thrombosis.”, *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 7: 301-304.

Rothberg J. M., Hinz W., Rearick T. M., Schultz J., Mileski W., Davey M., Bustillo J., (2011), “An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing”, *Nature*, 475(7356), 348-352.

Saely C. H., Muendlein A., Vonbank A., Sonderegger G., Aczel S., Rein P., Risch L., Drexel H., (2008), “Type 2 diabetes significantly modulates the cardiovascular risk conferred by the PAI-1– 675 4G/5G polymorphism in angiographed coronary patients”, *Clinica Chimica Acta*, 396(1-2), 18-22.

Sakowicz A., Fendler W., Lelonek M., Sakowicz B., Pietrucha T., (2013), “Genetic polymorphisms and the risk of myocardial infarction in patients under 45 years of age”, *Biochem Genetics*, 51(3-4), 230-42.

Samani N. J., Erdmann J., Hall A. S., Hengstenberg C., Mangino M., Mayer B., Schunkert, H., (2007), “Genomewide association analysis of coronary artery disease”, *New England Journal of Medicine*, 357(5), 443-453.

Scarabin P. Y., Arveiler D., Amouyel P., Dos Santos C., Evans A., Luc G., Ferrières J., Juhan-Vague I., (2003), “Plasma fibrinogen explains much of the difference in risk of coronary heart disease between France and Northern Ireland”, *Atherosclerosis*, 166(1), 103-109.

Schunkert H., König I. R., Kathiresan S., Reilly M. P., Assimes T. L., Holm H., Cambien F., (2011), “Large-scale association analysis identifies 13 new susceptibility loci for coronary artery disease”, *Nature genetics*, 43(4), 333-338.

Sejrup J. K., Morelli V. M., Løchen M. L., Njølstad I., Mathiesen E. B., Wilsgaard T., Hansen J. B., Brækkan S. K., (2020), “Myocardial infarction, prothrombotic genotypes, and venous thrombosis risk: The Tromsø Study”, *Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis*, 4(2), 247-254.

Selhub J., Jacques P. F., Bostom A. G., D'Agostino R. B., Wilson P.W., Belanger A. J., O'Leary D.H., Wolf P. A., Schaefer E.J., Rosenberg I. H., (1995), “Association between plasma homocysteine concentrations and extracranial carotid-artery stenosis”, *The New England Journal of Medicine*, 332: 286-291.

Shasstry B. S., (2002), “SNP alleles in human disease and evolution”, *Journal of Human genetics*, 47(11), 561-566.

Shmidt E. A., Berns S. A. Zhidkova I. I., Makeeva O. A., Goncharova I. A., Nagirnyak O. A., Klimenkova A. V., Litvinova M. N., Barbarash O. L., (2018), “Association of a lymphotoxin- α variable site rs1041981 with development of long-term unfavorable outcomes in patients with acute coronary syndrome without ST-segment elevation”, *Medical Immunology (Russia)*, 20(1), 73-84.

Simonyte S., Kuciene R., Medzioniene J., Dulskiene V., Lesauskaite V., (2017), “Renin-angiotensin system gene polymorphisms and high blood pressure in Lithuanian children and adolescents”, *BMC Medical Genetics*, 18, 100.

Stern L. L., Bagley P. J., Rosenberg I. H., Selhub J., (2000), "Conversion of 5-Formyltetrahydrofolic Acid to 5-Methyltetrahydrofolic Acid Is Unimpaired in Folate-Adequate Persons Homozygous for the C677T Mutation in the Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene", *The Journal of Nutrition*, 130(9), 2238–2242.

The CardiogramplusC4D Consortium, (2015), "A comprehensive 1,000 Genomes-based genome-wide association meta-analysis of coronary artery disease", *Nature genetics*, 47(10), 1121–1130.

Tóth T., Csaba Á., Bokor A., & Ács N., (2023), "Variable fragment length allele-specific polymerase chain reaction (VFLASP), a method for simple and reliable genotyping", *Molecular and Cellular Probes*, 69, 101910.

Trifa A. P., Cucuianu A., Petrov L., Urian L., Militaru M. S., Dima D., Pop IV., Popp R. A., (2010), "The G allele of the JAK2 rs10974944 SNP, part of JAK2 46/1 haplotype, is strongly associated with JAK2 V617F-positive myeloproliferative neoplasms", *Annals of Hematology*, 89(10), 979-83.

Trifa A. P., Cucuianu A., Popp R. A., (2010), "Development of a reliable PCR-RFLP assay for investigation of the JAK2 rs10974944 SNP, which might predispose to the acquisition of somatic mutation JAK2V617F", *Acta Haematologica*, 123(2): 84-87.

Van der Put N. M., Gabreëls F., Stevens E. M., Smeitink J. A., Trijbels F. J., Eskes T. K., van den Heuvel L. P., Blom H. J., (1998), "A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects?", *The American Journal of Human Genetics*, 62(5), 1044-1051.

Wang C., & Liu Z., (2006), "Arabidopsis ribonucleotide reductases are critical for cell cycle progression, DNA damage repair, and plant development", *The Plant Cell*, 18(2), 350-365.

Web1, (2022), <https://www.genome.gov/About-Genomics/Introduction-to-Genomics#four>, (Erişim tarihi: 01/04/2022).

Web10, (2022), <https://medlineplus.gov/genetics/gene/apob/#references>, (Erişim tarihi: 02/07/2022).

Web10, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241514620>, (Erişim tarihi: 21/01/2023)

Web11, (2022), <https://www.snpedia.com/index.php/Rs5186>, (Erişim tarihi: 01/07/2022).

Web12, (2022), <https://www.snpedia.com/index.php/Rs2070744>, (Erişim tarihi: 03/03/2022).

Web13, (2022), <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/100048912>, (Erişim tarihi: 02/07/2022).

Web14, (2022), <https://www.snpedia.com/index.php/Rs10757274>, (Erişim tarihi: 02/07/2022).

Web15, (2022), <https://www.genome.gov/About-Genomics/Introduction-to-Genomics#four>, (Erişim tarihi: 01/07/2022).

Web16, (2022), <http://www.eurogentest.org/index.php?id=268>, (Erişim tarihi: 30/03/2022).

Web2, (2022), <http://www.eurogentest.org/index.php?id=268>, (Erişim tarihi, 04/04/2022).

Web3, (2022), <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Nedeni-Istatistikleri-2009-10713>, (Erişim tarihi: 02/07/2022).

Web4, (2022), <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Nedeni-Istatistikleri-2010,-2011-ve-2012-15847#:~:text=2012%20y%C4%B1l%C4%B1nda%20dola%C5%9F%C4%B1m%20sistemi%20hastal%C4%B1klar%C4%B1,8'i%20hipertansif%20hastal%C4%B1klar dan%20kaynaklanmaktad%C4%B1r>, (Erişim tarihi: 02/07/2022).

Web5, (2022), <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Nedeni-Istatistikleri-2014-18855#:~:text=%C3%96l%C3%BCm%20vakalar%C4%B1n%C4%B1n%202013%20y%C4%B1l%C4%B1nda%20%39,%20%2C7%20olarak%20hesapland%C4%B1>, (Erişim tarihi: 02/07/2022)

Web6, (2022), <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Nedeni-Istatistikleri-2016-24572>, (Erişim tarihi: 02/07/2022)

Web7, (2022), <https://data.tuik.gov.tr/Bulten/Index?p=Olum-Nedeni-Istatistikleri-2018-30626#:~:text=%C3%96l%C3%BCm%20nedenlerinde%20ilk%20%C3%BC%C3%A7%20s%C4%B1ra,ile%20solunum%20sistemi%20hastal%C4%B1klar%C4%B1%20izledi>, (Erişim tarihi: 02/07/2022).

Weisberg I., Tran P., Christensen B., Sibani S., Rozen R., (1998), “A second genetic polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity”, Molecular genetics and metabolism, 64(3), 169-172.

Whitfield A. J., Barrett P. H. R., Van Bockxmeer F. M., Burnett, J. R., (2004), “Lipid disorders and mutations in the APOB gene”, Clinical chemistry, 50(10), 1725-1732.

WHO, (2013), “Global action plan for the prevention and control of noncommunicable diseases 2013-2020”, World Health Organization.

Williamson D., Brown K., Luddington R., Baglin C., Baglin T., (1998), “Factor V Cambridge: a new mutation (Arg306-->Thr) associated with resistance to activated protein C”, Blood, 91(4),1140-4.

- Xu J. Y., Xu G. B., Chen S. L., (2009), "A new method for SNP discovery", *BioTechniques*, 46(3), 201-208.
- Xu, F., Liu, H., Sun, Y., (2016), "Association of plasminogen activator inhibitor-1 gene polymorphism and type 2 diabetic nephropathy", *Renal Failure*, 38(1), 157-162.
- Yamanaka E. S., Tortajada-Genaro L. A., Pastor N., & Maquieira A. (2018), "Polymorphism genotyping based on loop-mediated isothermal amplification and smartphone detection", *Biosensors and Bioelectronics*, 109, 177-183.
- Yang L., Ijaz I., Cheng J., Wei C., Tan X., Khan M. A., Fu J., (2018), "Evaluation of amplification refractory mutation system (ARMS) technique for quick and accurate prenatal gene diagnosis of CHM variant in choroideremia", *The Application of Clinical Genetics*, 11, 1.
- Ye S., Willeit J., Kronenberg F., Xu Q., Kiechl S., (2008), "Association of genetic variation on chromosome 9p21 with susceptibility and progression of atherosclerosis: a population-based, prospective study", *Journal of the American College of Cardiology*, 52(5), 378-384.
- Ye Z., Liu E. H., Higgins J. P., Keavney B. D., Lowe G. D., Collins R., Danesh J., (2006), "Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66 155 cases and 91 307 controls", *The Lancet*, 367(9511), 651-658.
- Yongkiettrakul S., Kampeera J., Chareanchim W., Rattanajak R., Pornthanakasem W., Kiatpathomchai W., & Kongkasuriyachai D., (2017), "Simple detection of single nucleotide polymorphism in *Plasmodium falciparum* by SNP-LAMP assay combined with lateral flow dipstick", *Parasitology International*, 66(1), 964-971.
- Zeng J., Zeng Q., (2019), "Correlations between methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and venous thromboembolism: A meta-analysis of 99 genetic association studies" *European Journal of Preventive Cardiology*, 26(2), 120-134.
- Zhao L., Huang P., (2013), "Plasminogen activator inhibitor-1 4G/5G polymorphism is associated with type 2 diabetes risk", *International journal of clinical and experimental medicine*, 6(8), 632.
- Zhen J., Huang X., Van Halm-Lutterodt N., Dong S., Ma W., Xiao R., Yuan L., (2017), "ApoE rs429358 and rs7412 polymorphism and gender differences of serum lipid profile and cognition in aging Chinese population", *Frontiers in Aging Neuroscience*, 9, 248.
- Zöller B., Svensson P. J., He X., Dahlbäck B., (1994), "Identification of the same Faktör V gene mutation in 47 out of 50 thrombosis-prone families with inherited resistance to activated protein C", *The Journal of clinical investigation*, 94(6), 2521-2524.

ÖZGEÇMİŞ

Selin Gül Ünsal, lisans derecesini İstanbul Kültür Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde (2009-2013) tamamlamıştır. Yüksek lisans derecesini Acıbadem Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, İlaç Endüstrisinde Yönetim Programında (2013-2015) ve ikinci yüksek lisansını Gebze Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde (2016-2018) tamamlamıştır. Doktora derecesini ise Gebze Teknik Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde (2018-2024) “Kardiyovasküler Hastalıklarda Fragman Analizi Yöntemine Dayalı Genetik Yatkınlık Tanı Kiti Geliştirilmesi” isimli tez çalışması ile tamamlamıştır.

Moleküler Biyoloji Birim Opeatörü olarak Düzen Laboratuvarları isimli firmada 2014 - 2015 yılları arasında, Teknik Aplikasyon Personeli olarak Farmasina Kimyevi Ürünler isimli firmada 2015 – 2017 yılları arasında, Uluslararası Araştırmacı olarak University of Rome Tor Vergata isimli üniversitede 2017 – 2019 yılları arasında, Moleküler Genetik Tanı Kitleri Üretim ve Ar-Ge Birim Sorumlusu olarak HibriGen Biyoteknoloji isimli firmada 2019-2022 yılları arasında, Uluslararası Araştırmacı Bursiyer olarak Institute of Human Genetics, Polish Academy of Sciences isimli enstitüde 2022 yılı içerisinde, Moleküler Genetik Tanı Kitleri Üretim ve Ar-Ge Birim Sorumlusu olarak Zet Biyoteknoloji isimli firmada 2022 – 2024 yılları arasında çalışmıştır.

TEZ METNİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR/SUNUMLAR

Ünsal S. G., Yeni O., Büyük U., & Çiftçi Y. Ö, (2024), “A novel method of multiplex SNP genotyping assay through variable fragment length allele-specific polymerase chain reaction: Multiplex VFLASP-ARMS”, Molecular and Cellular Probes, 75, 10196.

