T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(YÜKSEK LİSANS)

TÜRK POPÜLASYONUNDA FLAVİN İÇEREN MONOOKSİJENAZ 3 (FMO3) POLİMORFİZMİ

PINAR TOPAL

DANIŞMAN
DOÇ. DR. GÜL ÖZHAN

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI

FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2010

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yülsek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

21 / 09 / 2010

Prof.Dr.Tamer DEMİRALP
Müdür

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Program Adı : Farmasötik Toksikoloji
Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
Anabilim Dalı : Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı
Tez Sahibi : Pınar Topal
Tez Başlığı : Türk Popülasyonunda Flavin İçeren Monooksijenaz 3 (FMO3) Polimorfizmi
Sınav Yeri : İ.Ü. Eczacılık Fakültesi B Blok Seminer Salonu
Sınav Tarihi : 03 / 09 / 2010

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı) İmzası

1.Prof. Dr. Buket Alpertunga (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı)

2.Doç. Dr. Münevver Açıkkol (İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü)

3.Doç. Dr. Gül Özhan - Danışman (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı)

4.Doç. Dr. Serap Aslan (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı)

5.Yard. Doç. Dr. Sibel Özden (İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

PINAR TOPAL

İTHAF

Anneme, babam ve kardeşime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her basamağında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bana bilimsel çalışma şeklini öğreten, sabırlı olmayı öğütleyen, yüksek lisans eğitimim süresince danışmanlığımı üstlenen, değerli hocam Sayın Doç. Dr. Gül ÖZHAN'a ,

Yüksek Lisans eğitimim süresince araştırma ve bilimsel düşünme ruhunu aşılayan, desteğini her zaman hissettiren, bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, Prof. Dr. Buket Alpertunga'ya,

Lisansüstü eğitimim ve tez çalışmalarım süresince, yardım ve desteklerinden, çalışmalarım süresince gösterdikleri yakın ilgiden dolayı Anabilim Dalımız öğretim üye ve elemanlarına,

Desteklerini her zaman hissettiğim yakın arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca bana her türlü desteği sağlayan, her zaman yanımda olan çok sevgili aileme,

Teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4422

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI ..... İİ
BEYAN ..... İİİ
İTHAF ..... İV
TEŞEKKÜR V
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ ..... Vİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Vİİİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... İX
ÖZET ..... Xİİ
ABSTRACT ..... Xİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
3. GEREÇ VE YÖNTEM 22
4. BULGULAR 43
5. TARTIŞMA 50
KAYNAKLAR 55
FORMLAR 65
ETİK KURUL KARARI 66
ÖZGEÇMİŞ 67

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1. İnsan FMO3 genindeki varyasyonlar ve amino asid değişiklikleri.....13

Tablo 2-2. Proje kapsamında çalışılan SNP'lere ait bazı bilgiler……..…..14

Tablo 3-1. Gönüllü bireyler için doldurulan anket formu örneği ……..……..22

Tablo 4-1. Çalışma grubunun genel özellikleri …….…....….43

Tablo 4-2. Çalışma grubuna dahil her birey için ayrıntılı bilgi ve genotip analizi çalışma.....…….....44-46

Tablo 4-3. FMO3 V257M varyasyonuna ait frekanslar …….…....47

Tablo 4-4. FMO3 E158K varyasyonuna ait frekanslar……..……..47

Tablo 4-5. FMO3 E308G varyasyonuna ait frekanslar…….…….....48

Tablo 4-6. FMO3 genine ait 3 adet SNP için alel frekansları…….....49

Tablo 4-7. Çalışılan örneklerde tespit edilen haplotipler ……....49

Tablo 5-1. Bazı popülasyonlarda FMO3 gen frekanslarının dağılımı ve çalışma sonuçları ile kıyası …….……52

Tablo 5-2. FMO3' ait 3 adet SNP (sırasıyla, E158K, V257M ve E308G) için farklı popülasyonlardaki haplotip sıklıkları …….53

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1. PCR ile DNA amplifikasyonu ……..….4
Şekil 2-2. PCR-RFLP yöntemi ile genotip tayini…….…..5
Şekil 2-3. FMO katalitik siklusu……..……..…6
Şekil 2-4. Metamizol metabolizmasında FMO'nun katalitik etkisi ……..…7
Şekil 2-5. FMO genine ait alt üniteler……..……...10
Şekil 2-6. İnsan FMO3 enziminin yapısı……..…...11
Şekil 2-7. FMO3 geninin 1. kromozom üzerindeki lokasyonu……..….12
Şekil 2-8. Sulindakın insanda in vivo şartlarda oksidatif ve redüktif biyotransformasyonu……..……..…17
Şekil 2-9. Kafeinin N-demetilasyonunda CYP450 ve FMO3 aktivasyonu ……..….19
Şekil 3-1. Kullanılan bazı cihazlar ……..…..25
Şekil 3-2. 50 ve 1000 bç'lik DNA göstergelerinin baz içerikleri 27
Şekil 3-3. FMO3*1 geninde polimorfizmin görüldüğü bölge 30
Şekil 3-4. FMO3*2 geninde polimorfizmin görüldüğü bölge 31
Şekil 3-5. FMO3*3 geninde polimorfizmin görüldüğü bölge 32
Şekil 3-6. FMO3 genine ait çalışılan 3 adet SNP için elde edilen PCR ürünlerinin agaroz yatay jel elektroforezi ile elde edilen görüntüleri 34
Şekil 3-7. FMO3 genine ait çalışılan 3 adet SNP için RFLP ürünlerinin akrilamid dikey jel elektroforezi ile elde edilen görüntüleri 37
Şekil 3-8. FMO3*1 için; dizi analizine gönderilerek RFLP sonucu konfirme edilen 1 numaralı heterozigot örneğe (G/A) ait DNA sekans analiz sonucu 38
Şekil 3-9. FMO3*1 için; dizi analizine gönderilerek RFLP sonucu konfirme edilen 33 numaralı homozigot (G/G) örneğe ait DNA sekans analiz sonucu 39
Şekil 3-10. FMO3*2 için; dizi analizine gönderilerek RFLP sonucu konfirme edilen 13 numaralı homozigot (G/G) örneğe ait DNA sekans analiz sonucu.....40
Şekil 3-11. FMO3*3 için; dizi analizine gönderilerek RFLP sonucu konfirme edilen 77 numaralı homozigot (A/A) örneğe ait DNA sekans analiz sonucu 41

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

A: Adenin

Arg: Arginin

Asp/D: Aspartik asit

bç: Baz çifti

BMI: Vücut kütle indeksi

C: Sitozin

CYP450: Sitokrom oksidaz P450

CO_2: Karbondioksid

Cys: Sistein

DCVC: S-(1,2-diklorovinil)-L-sistein

DNA: Deoksiribonükleik asit

dk: Dakika

dATP: Deoksiadenozin tri fosfat

dCTP: Deoksisitozin tri fosfat

dGTP: Deoksiguanozin tri fosfat

dNTP: Deoksinukleotid tri fosfat

dTTP: Deoksitimidin tri fosfat

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

FAD: Flavin adenin dinükleotid

FAP: Familyal adenomatöz polip

G: Guanin

g: Gram

Glu/E: Glutamik asit

Gly/G: Glisin

HCl: Hidroklorik asit

H_2O_2: Hidrojen peroksid

H_2O: Su

kg: Kilogram

Km: Reaksiyon denge sabiti

Lys: Lisin

Met/ M: Metionin

mg: Miligram

$MgCl_2$: Magnezyum klorür

mL: Mililitre

n: Örnek sayısı

$NADP^+$: Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

NADPH: İndirgenmiş Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat

nm: Nanometre

NO: Nitrik oksit

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RFLP: Restiriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi

rpm: Dakikadaki dönüş sayısı

rs: Referans numarası

SNP: Tek Nükleotid Polimorfizmi

T: Timin

TEMED: Tetra etil metilen diamin

TBE: Tris-Borik asit-Etilen Diamin Tetra Asetat

Trizma baz: Tris-hidroksil metil amino metan

UV:	Ultraviyole
Val:	Valin
µL:	Mikrolitre

ÖZET

Topal, P. (2010). Türk popülasyonunda flavin içeren monooksijenaz 3 (FMO3) polimorfizmi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Toksikoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Flavin monooksijenazlar (FMO), ksenobiyotik ve ilaç metabolizmasından sorumlu olmakla beraber organizmanın en önemli monooksijenaz enzim grubudurlar. Azot, kükürt ve fosfor içeren birçok ksenobiyotiğin monooksijenasyonu FMO geni tarafından katalizlenir. Morfin, kokain, nikotin, klorpromazin, imipramin, tamoksifen ve simetidin gibi birçok ilaç; forat, aldikarb gibi kimyasallar ve sistamin, metionin, trimetilamin gibi endojen maddeler, FMO substratlarına örnek olarak verilebilirler. FMO enzim grubunun yetişkin karaciğerinde sentezlenen en önemli formu FMO3'tür. 40 genetik FMO3 varyantının 13'ü Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism, SNP)'dir ve bu varyasyonların aktivitelerinin daha düşük olduğu tespit edilmiştir. FMO3 fonksiyonu üzerinde etkili olan 3 adet SNP'in (E158K, V257M ve E308G) alel frekansları farklı etnik popülasyonlarda değişiklikler göstermektedir. Bu çalışmada Türk popülasyonuna ait sağlıklı gönüllülerden sağlanan DNA örneklerinde Polimeraz Zincir Reaksiyonu bağlantılı Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (PCR-RFLP) yöntemi kullanılarak, FMO3 polimorfizmi ve haplotip frekansı belirlendi. Elde edilen sonuçlar, farklı popülasyonların sonuçlarıyla karşılaştırıldı. FMO3 alelleri üzerinde yapılan bu çalışmanın, Türk popülasyonunda FMO3 genine ait üç SNP için genotip ve haplotip dağılımının anlaşılmasına yardımcı olması beklenmektedir.

Anahtar kelimeler: Flavin monooksijenaz, PCR-RFLP analizi, Haplotip analizi, FMO3, Tek Nükleotid Polimorfizmi, SNP

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 4422

ABSTRACT

Topal P. (2010). Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3) Gene Polymorphism in Healthy Turkish Population. Program of Pharmaceutical Toxicology, Faculty of Pharmacy, Istanbul University. Master Thesis. Istanbul.

Flavin-containing monooxygenases (FMOs), one of the most important monooxygenase systems, are involved in xenobiotics metabolism and variability in drug response. FMO gene catalyzes the monooxygenation of numerous N-, P- and S-containing xenobiotics. Substrates of FMO include many drugs (morphine, cocaine, nicotine, chlorpromazine, imipramine, tamoxifen, cimetidine *etc*), chemicals (phorate, aldicarb *etc*) and endogenous substrates (cysteamine, methionine, trimethylamine *etc*). FMO3 is associated with the majority of FMO-mediated adult hepatic metabolism. In the adult human liver, FMO3 is the prominent form and other FMOs are not expressed or are expressed at very low levels. 13 of totally 40 genomic FMO3 variants are Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) which cause low function. Allele frequencies of three functional SNPs (E158K, V257M and E308G) vary greatly among different ethnic populations with distinct genetic backgrounds. In the current study, genotyping and haplotyping analysis for FMO3 were determined by Polymerase Chain Reaction (PCR)-Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) methods in DNA samples obtained from participants belonging to Turkish population. According to the results obtained from the study, it was enable to show interindividual differences and compare to other populations.

Keywords: Flavin monooxygenase, PCR-RFLP analysis, Haplotype analysis, FMO3, Single Nucleotide Polymorphism, SNP

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No: 4422

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sosyal yaşamda sıklıkla maruz kalınan ilaç, alkol, sigara ve çevre kirleticileri gibi ksenobiotiklerin metabolizmasından sorumlu enzim sistemlerinin önemli bir kısmının genetik polimorfizm göstermesi, bu maddelere maruziyet durumunda kişisel reaksiyonların nasıl olacağının anlaşılmasında etnik ve bireysel genetik farklılıkların bilinmesinin ne derece önemli olduğunu açıkça göstermektedir (Lang ve ark. 1998, Treacy ve ark. 1998). Sitokrom oksidazlardan (CYP450) sonra en önemli monooksijenaz sistemi olan flavin monooksijenazlar (FMO), azot, kükürt, selenyum ve fosfor gibi nükleofilik heteroatom içeren ilaçlar ve diğer ksenobiotikler ile endojen substratları da içine alan oldukça geniş bir kimyasal madde grubunun indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH)– ve O_2– bağımlı faz I oksidasyonlarından sorumludurlar. Karbon oksidasyonu yapmazlar. FMO, CYP450'den farklı olarak moleküler oksijeni substrat bağlanmadan önce bağlar. Ksenobiotiklerin karaciğerdeki esas metabolizmalarından sorumlu olan FMO formu, FMO3'tür (Adali ve ark. 1998). Diğer formlar ya çok düşük düzeylerde değişik dokularda bulunmuş ya da ekspresyonları tespit edilememiştir (Lattard ve ark. 2003).

"Türk popülasyonunda flavin içeren monooksijenaz 3 (FMO3) polimorfizmi" başlıklı yüksek lisans tez çalışması kapsamında, çevresel ksenobiyotiklere hassasiyet ve advers ilaç reaksiyonları ile ilgili olarak FMO3 geninin popülasyon bazlı değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, 3 adet Tek Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotid Polymorphism, SNP) için Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) bağlantılı Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) yöntemi kullanılarak 123 sağlıklı gönüllüden alınan DNA örnekleri üzerinde genotipleme yapılacaktır. Seçilen SNP'ler (FMO3*1 (rs1736557), FMO3*2 (rs2266782), FMO3*3 (rs2266780)), özellikle FMO3 enzim aktivitesinde farklılık göstermeleri ve yaygın olarak bulunmaları sebebiyle önemli olan polimorfik değişimleri kapsamaktadır. FMO3 geni, birçok popülasyonda araştırılmış olmasına rağmen ülkemizde henüz araştırılmamıştır. Bu sebeple çalışmadan elde edilen verilerin, Türk popülasyonu ile diğer ırklar arasında FMO3 geni açısından farklılık bulunup bulunmadığının değerlendirilmesine ve FMO3 ekspresyonundaki bireysel farklılıkların aydınlatılmasına katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Genetik polimorfizm

Herhangi bir popülasyondaki iki farklı birey arasında, DNA'nın yaklaşık 1000 baz çifti uzunluğundaki herhangi bir kısmı, ortalama sadece bir baz çifti değişimi içerir. Bir genin belli bir lokusta yer alan alternatif kopyalarından her birine "alel" denir ve alellerin genel popülasyonda %1 den fazla bulunması "genetik polimorfizm", %1'den daha az sıklıkta bulunması ise "mutasyon'' olarak isimlendirilir. Genetik polimorfizm, hem kodlanan (ekzon) hem de kodlanmayan (intron) DNA dizilerinde meydana gelebilir. İntronlarda ve genler arasındaki DNA dizilerinde meydana gelen değişikliklerin genellikle etkisi yoktur. Ancak intron bölgelerindeki bazı polimorfizmlerin gen ekspresyonunu etkileyerek fenotipik değişiklikler meydana getirebileceği de belirtilmektedir. Genlerin ekzon bölgelerindeki polimorfizmler protein fonksiyonuna etki ederken promotor bölgede meydana gelen polimorfizmler transkripsiyon düzeyinde değişikliğe neden olabilirler (Sumbul 2008).

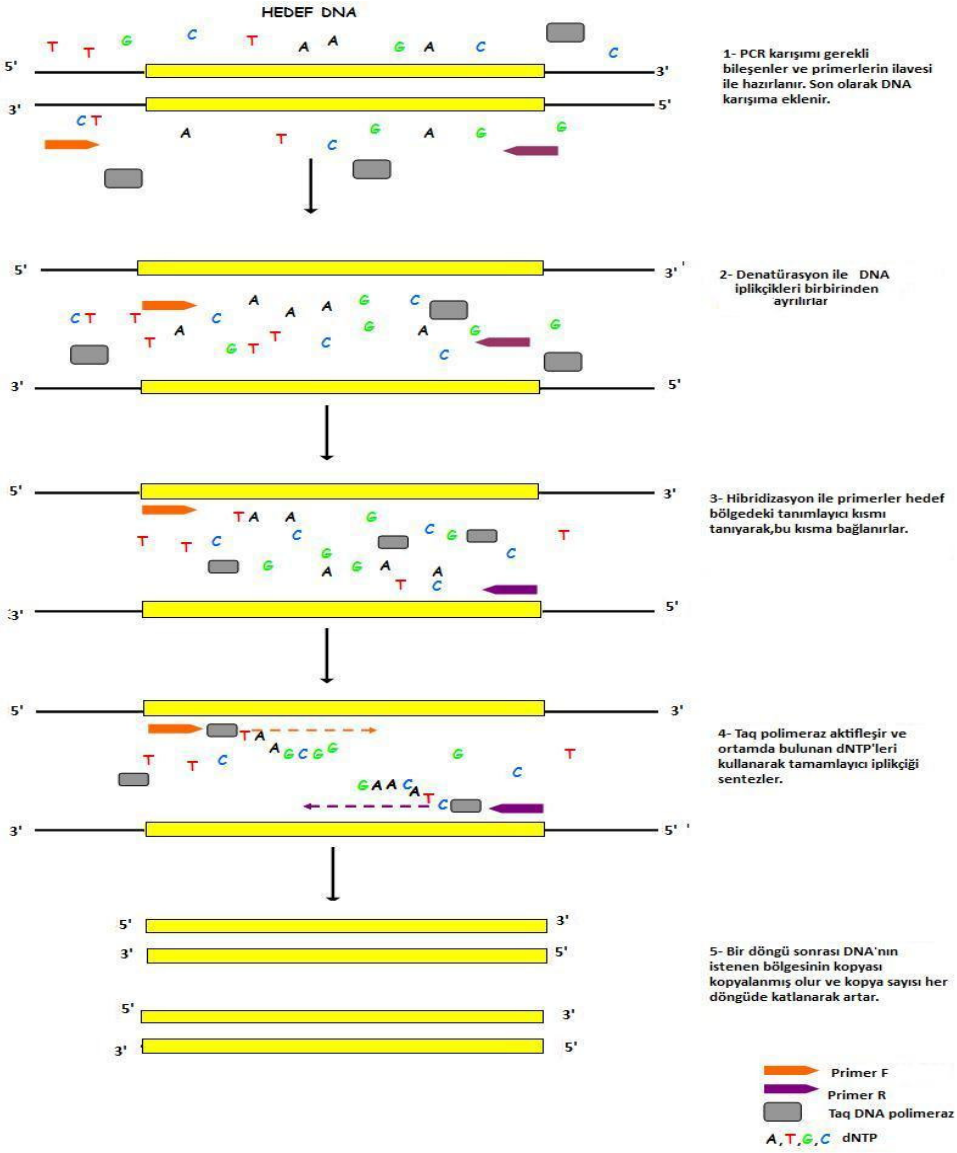
Polimorfik değişiklikler çok çeşitli tiplerde olabilir. SNP, insan genomundaki en basit ve en yaygın genetik polimorfizm çeşitidir ve genomda spesifik bir bölgedeki tek bir bazda meydana gelen degişikliktir. Örneğin, A**A**GGCTAA şeklindeki DNA dizisi A**T**GGCTAA şekline değişebilir. Varyasyonun SNP olduğunun düşünülebilmesi için, popülasyonun en az %1'inde bulunması gerekmektedir. SNP'ler, 3 milyar bazlık insan genomunda her 100-300 bazda bir meydana gelebilir ve insan genetik varyasyonlarının %90'ını oluştururlar. SNP'ler aminoasit değişimine neden olmayacağı gibi değişime neden olup protein fonksiyonuna etki ederek fenotip üzerinde etki de meydana getirebilirler. Günümüzde SNP analizlerinde sıklıkla PCR – RFLP yöntemi kullanılmaktadır (Devrim ve Kaya 2004).

2.2. PCR – RFLP yöntemi

PCR, herhangi bir DNA örneğinde istenen bölgenin çoğaltılmasını (amplifikasyon) sağlayan hızlı bir in vitro yöntemdir. İn vitro olarak genin ya da belli DNA dizisinin çok sayıda kopyasının elde edilmesi için rekombinant DNA yöntemleri ile DNA'nın klonlaması yönteminden ziyade PCR yöntemi tercih edilmektedir.

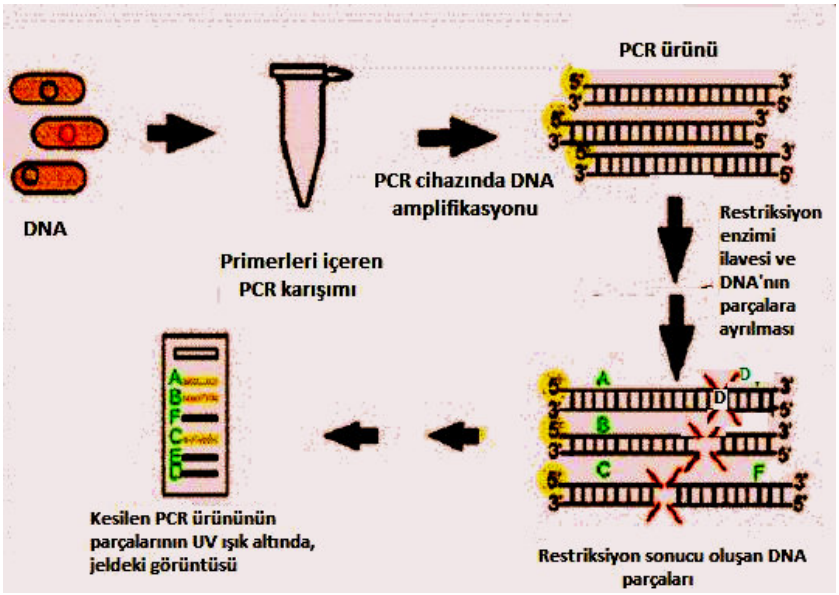
Seçilen bölgenin çoğaltılması için öncelikle uygun bir çift primerin belirlenmesi gerekir. Eklenen oligonükleotid primerler, denatüre edilen kalıp DNA içerisinde

tamamlayıcı dizilere bağlanırlar. Uygun bir polimeraz enzimi ve dört çeşit deoksinükleozid trifosfatın (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) yeterli miktarda bulunması halinde, primerler hedef DNA komplementerinin sentezlenmesini sağlarlar. PCR, termal döngü cihazında gerekli koşulların oluşturulması ile istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur. Her döngü sırasıyla; DNA'nın iki zincirinin yüksek sıcaklıkta birbirinden ayrılması (denatürasyon-denaturation); sentetik oligonükleotidlerin hedef DNA'ya bağlanması (hibridizasyon-annealing) ve zincirin yeni çift zincirli DNA'lar oluşturacak şekilde uzaması (polimerizasyon-extension) aşamalarından meydana gelir (www.drzeydanlı.com.tr) (Şekil 2-1).



Şekil 2-1. PCR ile DNA amplifikasyonu - www.drzeydanlı.com.tr

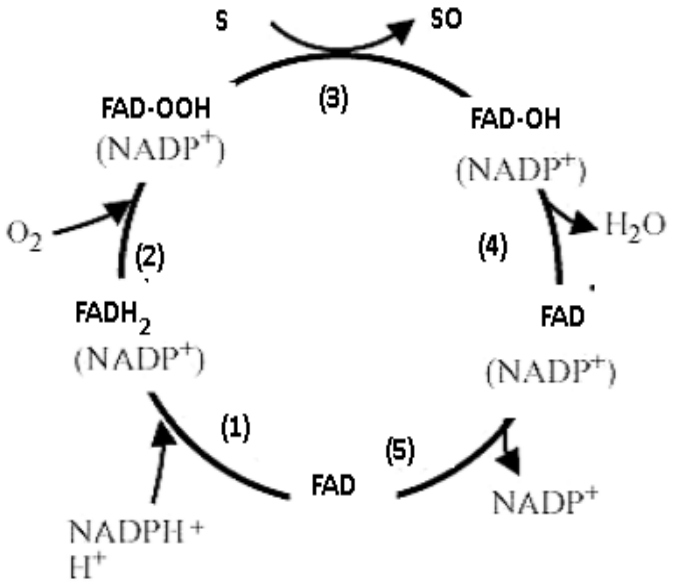
SNP'ler DNA dizisinde restriksiyon enzim kesim bölgesi meydana getirebilir ya da mevcut kesim bölgesini ortadan kaldırabilir ki bu değişimler restriksiyon enzimlerince DNA'nın farklı uzunlukta kesilmesine yol açar. Oluşan DNA bantlarının uzunluğu ve sayısı kıyaslanarak elde edilen çeşitliliğe RFLP denir. Genel olarak PCR-RFLP yönteminde; polimorfik bölgeyi içine alan primerler kullanılarak PCR aracılığıyla çoğaltılan bölge, uygun restriksiyon enzimi ile kesilir, ardından elde edilen parçalar jel elektroforezinde yürütülür ve SNP'ler analiz edilir (Eroglu 2008) (Şekil 2-2).



Şekil 2-2. PCR-RFLP yöntemi ile genotip tayini - Eroğlu (2008)'den.

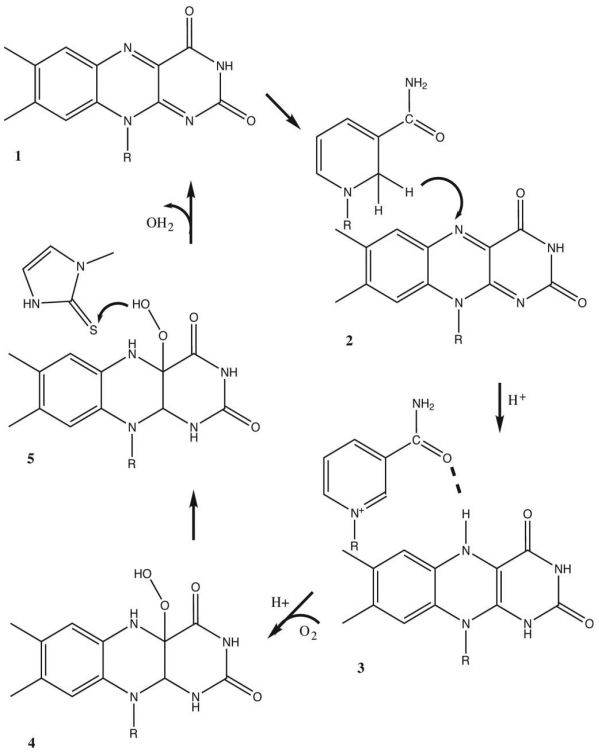
2.3. FMO'nun Yapı ve Fonksiyonları

FMO ve CYP450, karaciğer, böbrek ve akciğerlerin endoplazmik retikulumunda bulunan ve ksenobiotiklerin metabolizmasında rol oynayan en önemli iki mikrozomal proteindir. FMO ve CYP450'lerin ana fonksiyonları, lipofilik yapıdaki ksenobiotiklere moleküler oksijen ilave ederek detoksifikasyonlarını gerçekleştirmek, polar ve oksijenlenmiş bu yapılara kazandırdıkları hidrofilik özellik sayesinde atılımlarını hızlandırmaktır. Prostetik grubu FAD (flavin adenin dinükleotid) olan FMO'nun kofaktörü NADPH, kosubstratı ise moleküler oksijendir (Eswaramoorthy ve ark. 2006; Alfieri ve ark. 2008). CYP450'lerden sonra en önemli monooksijenaz sistemi olan FMO, azot, kükürt, selenyum ve fosfor gibi nükleofilik heteroatom içeren ilaç, ksenobiotik ve endojen substratları içine alan oldukça geniş bir kimyasal madde grubunun NADPH– ve O_2– bağımlı faz I oksidasyonlarından sorumludur. Karbon oksidasyonu yapmaz. İnaktif FMO ve CYP450 karaciğerin aynı bölgesinde lokalizedirler. FMO, oksijen ve NADPH varlığında CYP450'den farklı olarak moleküler oksijeni substrat bağlanmadan önce bağlayan eşsiz bir katalitik mekanizmaya sahiptir (Şekil 2-3) (Philips ve Shephard 2008).



Şekil 2-3. FMO katalitik siklusu - Krueger ve Wiliams (2005)'den. 1) FAD, NADPH tarafından redükte edilir (hızlı). 2) Redükte edilen FAD, hızlı bir şekilde moleküler oksijen ile reaksiyona girer ve nükleofilik yapıdaki substratlar ile reaksiyona girebilecek elektrofilik yapıya sahip hücredeki FMO formu olan stabil flavin hidroperokside dönüşür (hızlı). 3) Nükleofilik yapıdaki substrat ile FAD-OOH reaksiyona girer. Bu basamakta substrat bağı gerekli değildir. 4) Bünyesindeki oksijenin bir molekülü suya diğeri ise substrata gider (son derece yavaş). 5) Son adımda $NADP^+$ FAD'den ayrılır (yavaş)

Şekil 2-4'de metamizol metabolizmasında FMO'nun katalitik etkisi görülmektedir (Eswaramoorthy ve ark. 2006).



Şekil 2-4. Metamizol metabolizmasında FMO'nun katalitik etkisi - Eswaramoorthy ve ark. (2006).'dan (3.adım protein-kofaktör kompleksi, 5.adım ise metamizol-protein kompleksidir)

FMO'nun başlıca endojen substratları tiramin, trimetilamin, metionin, farnesilsistein, katekolamin, sisteamin vb'dir (Adali ve ark. 1998, Lattard ve ark. 2003). Bunun yanı sıra FMO, esas olarak klinik açıdan önemli ilaçların yaklaşık %1–2'sinin metabolizmasından sorumludur. Başlıca substratı olan ilaçlar; tamoksifen, morfin, itoprid, kokain, olapatidin, nikotin, ksanomelin, klorpromazin, benzidamin, imipramin, sulindak, perazin, ketakonazol, klozapin, metamizol, simetidin, ranitidindir. Diğer substratlara aldikarb, fention, fonofos, forat gibi pestisidler, nikotin örnek olarak verilebilir (Lang ve Rettie 2000; Borbas ve ark. 2006; Zhou ve Stephard 2006; Kousba ve ark. 2007).

Endüstride yaygın kullanımları yanı sıra, nörotransmitter fonksiyonları ile insan fizyolojisi ve hücre homeostazında önemli rol oynayan kuvvetli nükleofilik primer, sekonder ve tersiyer aminlerin N–oksidasyonu sonucu potansiyel toksik etkili hidroksilaminlere ve oksimlere dönüşümü, FMO katalizörlüğünde gerçekleşmektedir (Formül 2-1) (Lin ve ark. 1996). Oksimler, aldehit ve ketonların hidroksilaminle reaksiyonları sonunda oluşan, karbon–azot çifte bağı taşıyan bileşiklerdir. Oksim metabolizması sonucu oluşan toksisite hakkında her ne kadar bilgiler sınırlı da olsa CYP450 ve ferrokelataz enzimlerini inhibe ederek protoporfriaya sebep oldukları bilinmektedir (Cashman ve ark. 1999; Lin ve ark. 1996).

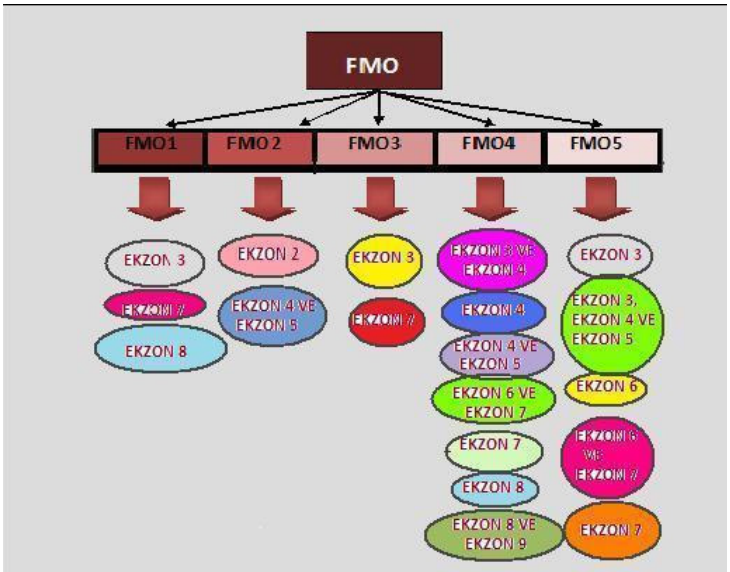
Formül 2-1. FMO'ların aminler üzerine etkisi ve toksik metabolit oluşumu - Lin ve ark. (1996)'dan.

Dikkat eksikliği, hiperaktivite ve kilo kontrolünde iştah açıcı olarak kullanılan stimülanlar amfetamin ve metamfetamin bileşikleri, FMO katalizörlüğünde N-oksidasyonuna uğrarlar ve hidroksilaminlerine dönüşürler. Her iki hidroksilamin bileşiği de aynı şekilde FMO substratıdırlar ve FMO tarafından fenilpropan oksim metabolitlerine dönüşürler. Hidroksilamin formları biyojenik amin taşıyıcıları için substratken, fenilpropan oksim formları bu taşıyıcılar ile reaksiyona girmezler. Amfetamin ve metamfetaminin polimorfik FMO enzimi ile metabolize olması ve toksik

etkili olan hidroksilamin formlarının oluşumu bir çeşit biyoaktivasyon prosesi gösterirken, oksim formları bir detoksifikasyon prosesi sergilemektedir (Cashman ve ark. 1999). Bununla birlikte FMO katalizörlüğünde tiyoeter içeren bazı pestisitilerin de biyoaktivasyona uğraması, FMO enziminin detoksifikasyon rolünün yanı sıra biyoaktivasyona da sebep olmasına örnek olarak verilebilir (Hajjar ve Hodgson 1980; Ziegler Skylakakis ve ark. 1998).

Hormonal ve gelişimsel faktörler (diabet, hamilelik, yaş, cinsiyet vb) FMO gen ekspresyonunu değiştirebilir, ancak fenobarbital ve benz(a)piren gibi ilaç veya ksenobiotiklere maruziyet durumunda CYP450 enzimlerinde olduğu gibi herhangi bir indüksiyon veya inhibisyon gerçekleşmez (Adali ve ark. 1998; Cashman ve ark. 1999; Yauk ve ark. 2010;).

FMO'nun kataliz edici aktivitesi ilk olarak 1964'te keşfedilmiş ve 1972'de domuz karaciğerinde saflaştırılmıştır (Itagaki ve ark. 1996; Lattard ve ark. 2002). 1990'da ise pulmoner ve hepatik FMO'ların farklı genlerle kodlandığı tespit edilmiştir (Siddens ve ark. 2008). Bugüne kadar insanda 6 adet FMO geninin (FMO1–6) yapısı açıklanmış olup bunlardan sadece 5'i fonksiyonel olarak aktif bulunmuştur (Yamazaki ve ark 2007) (Şekil 2-5). 6 FMO formu, aminoasit dizilimi olarak aynı tür içinde %52–57 benzerlik göstermektedir (Akerman ve ark. 1999b). Belirli tür ve dokulara spesifik olan FMO alt ünitelerinin fonksiyonel özellikleri hakkında bilgiler sınırlıdır (Cashman ve Zhang 2002). Ancak, FMO gen polimorfizmine bağlı olarak ortaya çıkan aktivite değişikliklerinin, enzimin substratı olan ilaçlara bağlı advers reaksiyonların ve ilaç dışı ksenobiotiklerin toksik etki potansiyellerinin oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir (Cashman 2004).

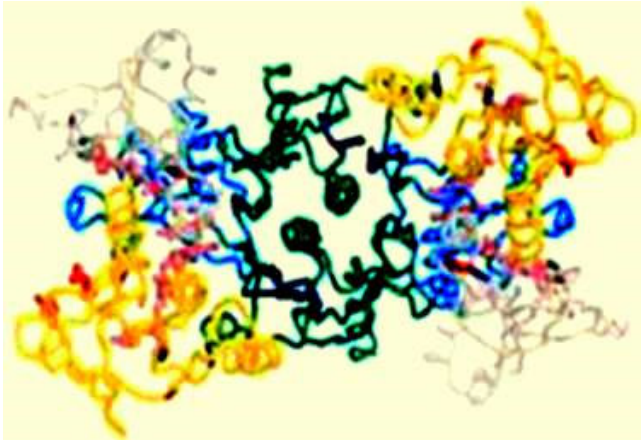


Şekil 2-5. FMO genine ait alt üniteler - Cashman ve ark. (2004)'den.

İnsanda ilaç ve diğer ksenobiotiklerin karaciğerdeki esas metabolizmalarından sorumlu olan FMO formu, FMO3'tür (Adalı ve ark. 1998). Diğer formlar, mRNA analizleri sonucunda ya çok düşük düzeylerde değişik dokularda bulunmuş ya da ekspresyonları tespit edilememiştir (Lattard ve ark. 2003). FMO1 ve FMO2, sıçan ve diğer hayvan karaciğerinde bol miktarda bulunurken, insan karaciğerinde tayin edilememiştir. Fetal mikrozomlarında ise FMO1'in oldukça aktif olduğu görülmüştür (Overby ve ark. 1997). İnsan böbrek ve bağırsaklarında bulunan FMO1, aminlerin N-oksidasyonuna sebep olur. Bu sebeple bu bölgedeki reaksiyonlardan sorumlu tutulabilir. FMO2, beyaz ırkta gözlenmezken Afroamerikanlar[1]'da gözlenme oranı %26 kadardır. Karaciğerde FMO3 yanı sıra FMO5 de bulunmaktadır. FMO3 ve FMO5 ekspresyonları arasında az da olsa bir bağlantı tespit edilmiş, fakat enzim ve mRNA düzeyleri arasında bir ilişki bulunamamıştır. FMO5 aktivitesi, düşük substrat affinitesi nedeniyle FMO3 kadar önem taşımaz. FMO4 transkripsiyonu insan karaciğerinde tespit edilmesine rağmen protein ekspresyonu için herhangi bir bulguya rastlanmamıştır (Overby ve ark. 1997). FMO3 ekspresyon seviyesi açısından bireyler arasında 20 kat farklı varyasyon

[1] Afroamerikan: Siyah Amerikalı, kökeni Afrika'daki siyah nüfusa dayanan Amerika Birleşik Devletleri vatandaşı.

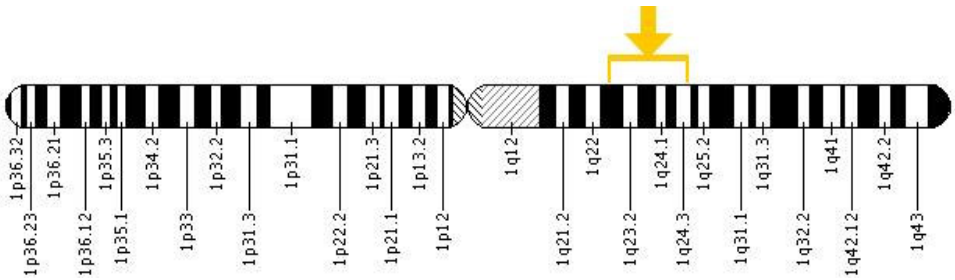
görülmüş ve FMO3 ile ilgili çalışmalara ilgi giderek artmıştır (Adalı ve ark. 1998, Cashman ve ark. 1999, Kousba ve ark. 2007) (Şekil 2-6).



Şekil 2-6. İnsan FMO3 enziminin yapısı: kırmızı bölgeler enzim fonksiyonunu etkileyen mutasyonları, beyaz, sarı, yeşil ve mavi bölgeler enzimin yapıca farklı olan kısımlarını, mor bölgeler ise enzimin etkinliği için gerekli olan kısımları belirtmektedir (Christensen, D. (1999). What's That Smell. The Weekly Newsmagazine of Science, (1999), 20:1. (15.08.1999), www.sciencenews.org/sn_arc99/5_15_99/p317.jpg.).

Hepatik endoplazmik retikulum membranında bulunan, insan majör karaciğer FMO'su olan FMO3, fetusta ve çoğu yeni doğanda yoktur. Genelde 1. ile 12. aylar arasında ekspresyonu tayin edilebilir. 1 ile 11 yaş arasında ortalama bir değere yükselirken pubertede cinsiyet farkı oluşmaksızın artış gösterir. 18 yaşına kadar da yetişkin seviyesine ulaşır (Klick ve ark. 2008). Yetişkin karaciğer metabolizmasında belirgin bir role sahip olmasının yanı sıra FMO3'ün beyinde de tespiti, antipsikotik ve diğer SSS ilaçlarının metabolizması ve farmakokinetiğinde rol oynamaları açısından önemlidir (Adalı ve ark. 1998; Störmer ve ark. 2000; Lattard ve ark. 2004)**.**

FMO3, 1 numaralı kromozomun uzun kolunda (1q23–q25) lokalizedir (Şekil 2-7). 532–538 adet aminoasit ile kodlanır. Translasyon başlangıç kodonu 2. ekzonun başlangıç bölgesindedir. FMO3, 1 adet kodlanmamış (intron 1) ve 8 adet kodlanmış (ekzon 1-8), büyüklükleri 80 ve 705 baz çifti arasında bölgeler içerir. Hayvan ve insan FMO ekzon ve intronları benzerlik göstermektedir (Treacy ve ark. 1998; Cashman ve ark. 2001; Cashman ve ark. 2002).



Şekil 2-7. FMO3 geninin 1. kromozom üzerindeki lokasyonu (Sitogenetik lokasyon: 1q23-q25; Moleküler lokasyon: 171.060.035 - 171.086.958).- (http://ghr.nlm.nih.gov/gene/FMO3)

Günümüze kadar FMO3 için 40 genetik varyasyon karakterize edilmiştir (Allerston ve ark. 2009; Shimizu ve ark. 2008; Hao ve ark. 2007). Bunlardan bazıları sadece tek nükleotid değişikliğidir ve bir kısmının enzim aktivitesi üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir (Cashman ve Zhang 2002) (Tablo 2-1)**.**

Tablo 2-1. İnsan FMO3 genindeki varyasyonlar ve amino asid değişiklikleri - Cashman ve Zhang (2002)'den.

Aminoasit Değişikliği*	Nükleotid Değişikliği	Varyantın Fonksiyonel Aktivitesi	Kaynaklar
K158E	A > G	azalır	Cashman ve ark., 1997
M66I	G > T	inaktif	Cashman ve ark., 1997
P153L	C > T	inaktif	Cashman ve ark., 1997; Dolphin ve ark.,1997
V257M	G > A	azalır	Treacy ve ark. 1998; Dolphin ve ark. 2000; Cashman ve ark. 2000
E305X	G > G	inaktif	Treacy ve ark. 1998
E308G	A > G	azalır	Treacy ve ark. 1998; Kang ve ark. 2000
R492W	C > T	inaktif	Akerman ve ark. 1999a
G148X	G > T	inaktif	Park ve ark. 1999
A52T	G > T	azalır	Akerman ve ark. 1999a
E314X	G > T	inaktif	Akerman ve ark. 1999a
R387L	G > T	inaktif	Akerman ve ark. 1999a
M82T	T > C	azalır	Murphy ve ark. 2000
N61S	A > G	azalır	Dolphin ve ark. 2000
D132H	G > C	azalır	Furnes ve ark. 2002
I199N	T > C	azalır	Cashman ve ark. 2002
E362Q	G > T	azalır	Cashman ve ark. 2002

K: Lizin, E: Glutamik asit, M: Metionin, I: İzolösin, P: pirolin, L: Lösin, V: Valin, G: Glisin, R:arjinin, W: Triptofan, D: Aspartik asit, H: Histidin, N:Aspargine, Q: Glutamin

İnsan FMO3 enziminin fonksiyonel FAD^- ve $NADP^+$ bölgeleri 2. ve 5. ekzonlar tarafından kodlanmaktadır (Dolphin ve ark. 1997a;1997b). FMO3'ün bu bölgelerine yakın olan kısımlarındaki mutasyonlar, normal olmayan fonksiyonel aktivite veya kodlanan proteinin dayanıklılığı ve gen ekspresyonundaki azalmadan sorumludurlar (Hernandez ve ark. 2003, Zhang ve ark. 2003).

FMO3 genetik varyasyonları içerisinde alelik frekansları >%1 olan E158K, V257M ve E308G enzim aktivitesi üzerinde etkili olan SNP'lerdir. Özellikle, etnik popülasyonlar ve bireyler arasında oldukça farklılık gösteren bu SNP'lerin FMO3 enzim aktivitesinde farklılığa yol açmaları ve yaygın bulunmalarından dolayı araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Hao ve ark. 2006; Shimizu ve ark. 2007; Koukouritaki ve ark. 2007). Tez projesi kapsamında da çalışılan bu 3 adet SNP'e ait bazı bilgiler Tablo 2-2'de verilmiştir.

Tablo 2-2. Proje kapsamında çalışılan SNP'lere ait bazı bilgiler (Cashman ve ark. 2000; Treacy ve ark.1998; Dolphin ve ark. 2000; Park ve ark.1999)

SNP	Lokasyon	Pozisyon	Ekzon	Baz Değişikliği	Amino Asit Değişikliği
FMO3*1 (rs1736557)	169346704	18281	6	G>A	V257M
FMO3*2 (rs2266782)	169343590	15167	4	G>A	E158K
FMO3*3 (rs2266780)	169349866	21443	7	A>G	E308G

V257M aminoasit değişikliği N-oksidasyon aktivitesinde belirgin bir değişikliğe sebep olmazken S-oksidasyonunda azalmaya sebep olmaktadır (Shimizu ve ark. 2007).

2.4. FMO3 Polimorfizmi ve Trimetilaminüri Sendromu

İnsanda FMO3 polimorfizminin klinik önemi en açık olarak trimetilaminüri sendromu (Balık kokusu sendromu, Fish–odor sendromu) ile anlaşılmıştır. Metabolizma eksikliğinden kaynaklanan kalıtsal bir hastalık olan trimetilaminüri sendromu normal olmayan FMO3 enzim aktivitesi ile doğrudan ilişkili olduğunun bulunması üzerine dikkatleri üzerine çekmiş ve bu konu ile ilgili çok fazla çalışma yapılmıştır (Arseculeratne ve ark. 2007; Treacy ve ark. 1998; Akerman ve ark. 1999a;1999b). Sendromda, NADPH–bağımlı FMO3 eksikliği sebebiyle tersiyer trimetilamin (TMA), trimetilamin N–okside (TMAO) oksitlenememektedir. Normalde TMA metabolizması 5 (TMA) : 95 (TMAO) oranıyla yürür ve yaklaşık olarak günlük 18 µmol TMA / µmol kreatinin gibi düşük oranlarda idrarla atılır. Metabolik bir bozukluk durumunda bu oran 46 µmol TMA / µmol kreatinin değerine yükselir. TMA : TMAO oranı 80 : 20'lere

hatta daha yüksek değerlere ulaşır (Yeung ve ark. 2007). Bu sebeple bireylerin nefes, ter ve idrarları, metabolize olmamış amini atmalarından dolayı bozuk balık gibi kokmaktadır (Treacy ve ark. 1998; Dolan ve ark. 2005; Chalmers ve ark. 2006). Trimetilaminüri, sık görülen bir hastalık değildir ve bazı popülasyonlarda dağılımları oldukça düşüktür, ancak dünyada bazı bölgelerde, özellikle tropiklerde, sıklığında belirgin bir artış görülmektedir (Zhou ve Shephard 2006). FMO3 eksikliği olan ve trimetilaminüri tablosu bulunan bireylerde yüksek oranda endişe, öz güven eksikliği, depresyon, içe kapanma, paranoya, intihara eğilim ve madde bağımlılığı ile kendini gösteren rahatsızlıklar göze çarpmaktadır. Trimetilaminüri belirtilerinin çoğu santral ve sempatik sinir stimülasyonu ve bunun sonucunda ortaya çıkan anormal biyojen amin metabolizması ile açıklanmaktadır (Treacy ve ark. 1998; Cashman ve ark. 1999; Akerman ve ark. 1999a; Arseculeratne ve ark. 2007). Kadınlarda erkeklere oranla trimetilaminüri belirtileri daha şiddetlidir, hatta menopoz sırasında, oral kontraseptif alımından sonra, menstrual period öncesi ve esnasında, pubertede semptomlar şiddetlenir (Zhou ve ark. 2006). İdrardan atılan TMAO ve TMA miktarının ölçülmesi suretiyle yapılan fenotip tayininde E158K, V257M, E308G genotiplerinin düşük FMO3 metabolik kapasite (<%40) gösterdiği ispatlanmıştır (Shimizu ve ark. 2006; 2007; 2008; Yamazaki ve ark. 2007). FMO3 aktivitesinde azalmaya sebep olan 158K, 257M, 308G alelleridir (Shimizu ve ark. 2003; 2007, Yamazaki ve ark. 2007). Buna karşılık V257M genotipine bağlı olarak FMO3 aktivitesinin tayin edilmesi ile ilgili olarak trimetilaminürili bireyler üzerinde yapılan fenotip–genotip çalışmalarında trimetilaminin N–oksidasyonunda anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (Dolphin ve ark 1996; Cashman ve ark 2001; Shimizu ve ark 2003).

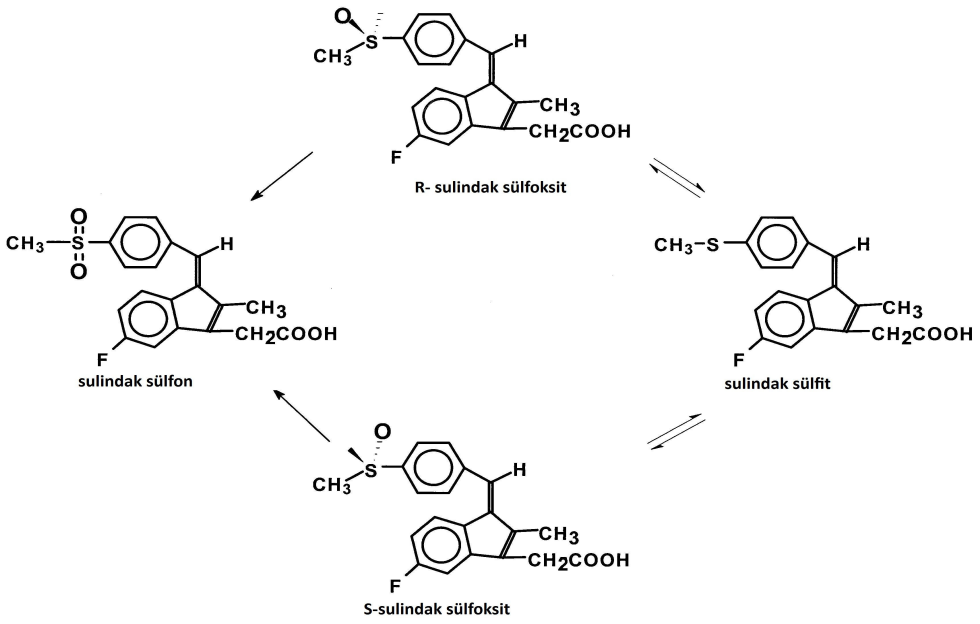
Akerman ve arkadaşları tarafından 4 yeni FMO3 mutasyonu (A52T, R387L, E314X ve K158-G308) tespit edilmiş, ancak enzim aktivitesi üzerine etkili olabilecekleri bildirilse de trimetilaminüri sendromu ile arasında ilişki tespit edilememiştir (Akerman ve ark. 1999a; 1999b). Benzer şekilde, *Fujieda ve arkadaşları*nın 27 trimetilaminürili Japon bireylerde yaptıkları bir diğer araştırmada 2 adet yeni SNP (21246T>A ve 21265C>T) bulunmuş, bu SNP'lerin trimetilaminüri oluşumu üzerinde etkili olabileceği bildirilse de bu konuda ilave çalışmaların yapılması gerektiği rapor edilmiştir (Chung ve Cha 1997).

Çocuklar üzerinde yapılan bir çalışmada, bozukluğun doğuştan geliyor olmasına rağmen, hastalığın etkilerinin çocuğun sütten kesilip yüksek miktarda kolin içeren, yumurta, karaciğer, sakatat gibi besinlerin ya da deniz ya da tuzlu su balıklarının alımı sonucu TMAO oluşumuyla kendini gösterdiği rapor edilmiş 6 adet trimetilaminürili çocukta metronidazol, amoksisilin, neomisin gibi antibiyotiklerin kullanımının, en fazla neomisin olmak üzere, TMA üretimini redüklediği ifade edilmiştir (Chalmers ve ark. 2006).

2.5. FMO3 Polimorfizmi ve Ksenobiotik Metabolizması

İlaç ve diğer ksenobiotiklere karşı gelişmesi olası advers reaksiyonlarda ve klinik cevaptaki farklılıklarda gen polimorfizminin ne kadar önemli olduğunun anlaşılması, geniş bir substrat yelpazesine sahip olan FMO3 enzim genine ait varyasyonların ksenobiotik metabolizması üzerine etkileri araştırmacılar tarafından ilgi görmüş ve bu konuda oldukça detaylı çalışmalar yapılmıştır (Zhou ve Shephard 2006). Esas olarak karaciğer metabolizma reaksiyonlarında rol oynayan FMO3, aynı zamanda beyin ve deride de bulunmaktadır. Bu sebeple santral sinir sistemini etkileyen ve topikal olarak uygulanan ilaçların metabolizması için de ayrıca önem taşımaktadır (Cashman ve Zhang 2002; Janmohamed ve ark. 2001).

FMO3 aktivitesinin tayin edildiği çalışmalarda genellikle nonsteroidal antiinflamatuar (NSAID) pro–drug olan sulindak kullanılmaktadır. Sulindakın aktif olan sülfit formu FMO3 katalizörlüğünde iki kere oksitlenerek önce inaktif sulfokside, sonra sülfon formuna dönüşür (Hamman ve ark. 2000, Hisamuddin ve ark. 2004, Hisamuddin ve ark. 2005) (Şekil 2-8).



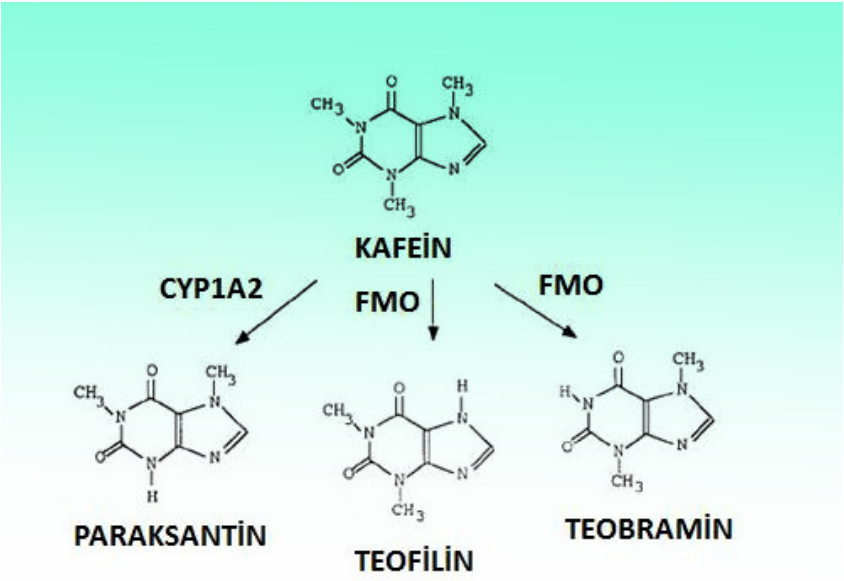
Şekil 2-8: Sulindakın insanda in vivo şartlarda oksidatif ve redüktif biyotransformasyonu
- Krueger ve Wiliams (2005)'ten.

FMO3 ve polimorfik yapılarının ilaç biyotransformasyonu üzerine etkilerinin araştırılmasında sülindak dışında başta metamizol, simetidin, tiramin, feniletilamin gibi ilaçlar olmak üzere oldukça geniş bir substrat yelpazesi kullanılmaktadır (Cashman 1995; Ziegler 1990; Lin ve Cashman 1997a; 1997b). FMO3 varyasyonlarının fenotiplemesinin yapılmasında ranitidin, simetidin, H_2 reseptör blokörleri, klozapin gibi bazı ilaçların N-oksidasyon reaksiyonlarının incelenmesi oldukça iyi sonuçlar vermiştir (Adali ve ark. 1998). FMO3 tarafından amfetamin ve metamfetamin N-oksidasyonunu, bioaktivasyon ve detoksifikasyon açısından değerlendiren *Cashman ve arkadaşları*, her iki bileşiğin N-oksidasyonu, hidroksil türevlerinin oluşumu (bioaktivasyon) ve hidroksil türevlerinin oksime detoksifikasyonu reaksiyonlarından FMO3'ün sorumlu olabileceğini bildirilmişlerdir (Cashman ve ark. 1999). *Kang ve arkadaşları* tarafından E158K ve E308G polimorfizmi ile ilgili olarak ranitidin kullanılarak fenotipleme yapılmış, FMO3 aktivitesinin göstergesi olarak değerlendirilen Lys^{158} ve Gly^{308} mutant alellerinin düşük ranitidin N-oksidasyonundan sorumlu olduğu Kore popülasyonunda ispatlanmıştır (Kang ve ark. 2000). *Sachse ve arkadaşlarının* yaptığı bir çalışmada ise klozapin N-oksidasyonu üzerine FMO3 aktivitesinin in vivo koşullarda etkili olmadığı görülmüş ve bu durum oksidasyon reaksiyonunun katalizi için Km değerinin yüksek olmasına bağlanmıştır (Sachse ve ark. 1999).

Demirdöğen ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada ise, koyun karaciğer mikrozomal FMO3 aktivitesi, metamizolün S-oksidasyon derecesinin tayini ile tespit edilmiş, imipramin ve klorpromazin kullanılması durumunda metamizol oksidasyonunun inhibe edildiği rapor edilmiştir (Demirdogen ve ark. 1998). *Zschocke ve arkadaşları* metamizol ve fenotiazin üzerinde yaptıkları çalışma sonucu E158K ve E308G polimorfizminin FMO3 enzim aktivitesinde farklılığa sebep olduğunu bildirmişlerdir (Zschocke ve ark. 1999). *Stormer ve arkadaşları* tarafından, kimyasal yapı olarak trifluperazin, perfenazin, flufenazin gibi fenotiazinlere benzeyen bir diğer fenotiazin grubu antipsikotik etkili ilaç olan perazin ve metabolizmadan sorumlu enzimlerin polimorfik yapıları üzerine bir araştırma yapılmış, CYP450 enzimleri kadar FMO3 enziminin de ilacın klirensi üzerinde etkili olduğu rapor edilmiştir (Stormer ve ark. 2000). *Rodriguez ve arkadaşları* tarafından yapılan bir diğer çalışmada, sıklıkla kullanılan geniş spektrumlu oral antifungal ilaç olan ketokonazol metabolizması üzerine FMO3 polimorfizminin etkisi incelenmiş ve ana metaboliti olan N-asetil ketokonazolün bireyler arası farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Rodriguez ve Miranda 2000). *Athanasiu ve arkadaşları* tarafından şizofren hastalıkları üzerine FMO3 gen varyasyonlarının etkilerinin incelendiği geniş çaplı Avrupa kohort çalışmasında 2663 hasta 13780 kontrol örnekte genotipleme yapılmış, fakat FMO3 ile anlamlı bir ilişki gözlemlenememiştir (Athanasiu ve ark. 2010).

Kafein ve nikotin, FMO3'ün primer amin yapısındaki substratlarıdır ve bunların FMO3 ile ilişkisi araştırmacılar tarafından ilgi görmektedir. *Chung ve Cha* tarafından kafein N-demetilasyon yolağı incelenmiş, FMO3 tarafından teobramin ve teofilin oluşurken paraksatin oluşumundan CYP1A2'nin sorumlu olduğu görülmüştür. Aynı zamanda FMO3 reaksiyonu için optimum pH belirlenmiş ve kafein metabolizasyonunda pH 8,6'de CYP1A2'nin aksine optimum aktivite değeri tespit edilmiştir. Optimum pH'da teobramin ve teofilin oranı artarken, paraksantin üretiminde düşüş gözlenmiştir. Bu pH derecesinde FMO3 substratı olan metimazol varlığı, teobramin ve teofilin oluşumunu %80-90 oranında azaltmıştır (Şekil 2-9) (Chung ve Cha 1997). *Mitchell ve arkadaşları* tarafından, kafein N-oksidasyonunun FMO3 fonksiyonunun belirlenmesinde in vivo gösterge olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Mitchell ve ark. 1999).

Yapılan bir diğer çalışmada ise nikotinin oral alımı sonucu oluşan durumu incelemek için sakız preparatı kullanılmış ve sonuçta nikotin N-1′-oksit metabolitinin idrardan atılımında trimetilaminürili kişilerde azalma olduğu tespit edilmiştir. (Ayesh ve ark. 1988). Bunun yanı sıra *Tricker* bir araştırmasında total nikotin metabolizmasında nikotinin N-oksidasyonunun etkin rol oynamadığını ve FMO3 yavaş metabolize edicilerin fenotiplemesinin değerlendirilemediğini belirterek FMO3 polimorfizminin sigara kullanımda bireysel farklılıklara sebep oluşturmayacağı görüşünü bildirmiştir (Tricker 2003).



Şekil 2-9. Kafeinin N-demetilasyonunda CYP450 ve FMO3 aktivasyonu - Chung ve Cha (1997)'den.

Birçok kimyasal ve elektrofilik metabolitin metabolize edilmesinde major rol oynayan glutatyon yolağında, enterohepatik siklus veya böbrekten geçişte glutatyon S–konjugatlarının oluşumu esnasında, sistein S–konjugatlar meydana gelir. Sistein S–konjugatlarının S–oksidasyonu ile sulfoksitlerine dönüşümü başta FMO3 olmak üzere FMO'ların sorumluluğundadır (Krause ve ark. 2003).

Katekolamin metabolizmasında da rol oynamasından dolayı FMO3 ile nörotransmitter ve diğer katekolaminler ile ilgili de çalışmalar yapılmıştır. FMO3 varyasyonlarının presinaptik stimülasyon ve dolayısıyla hipertansiyonla ilişkili

olduğunu savunan *Fung ve arkadaşlarının* aksine *Dolan ve arkadaşları* tarafından yapılan bir çalışmada, 387 sağlıklı ve 1649 kalp hastası üzerinde 3 adet FMO3 SNP'i (E158K, V257M, E308G) için genotipleme yapılmış, ancak hipertansiyon riski ile bu varyasyonlar arasında ilişki tespit edilememiştir (Dolan ve ark. 2005, Fung ve ark. 2008).

FMO'lar nükleofilik yapılara oksijen katıp onları daha polar ve zararsız hale dönüştürerek detoksifikasyonda rol alırlarken aynı zamanda toksikolojik açıdan aktif ürünlerin oluşumuna da sebep olabilirler (Cashman ve ark. 1995; 1999). Bilindiği üzere, endüstride yaygın olarak kullanılan muhtemel karsinojen trikloroetilenin böbrek kanseri oluşturma riskinin, insanlarda düşük, sıçanlarda yüksek olduğu rapor edilmiştir. Trikloroetilen metabolizmasında esas yolak CYP450 oksidasyonu ve glutatyon konjugasyonu reaksiyonlarıdır. Glutatyon konjugasyon yolağında S-(1,2-diklorovinil)-glutatyon ve dolayısıyla merkaptürik asit türevi oluşmaktadır. Böbreklerde γ-glutamil transpeptidaz ve sistein glisin dipeptidaz tarafından S-(1,2-diklorovinil)-L-sisteine (DCVC) dönüşür ve tekrar absorbe olarak dolaşıma katılır. DCVC, FMO3 için S-oksidasyon substratıdır. Oluşan metabolitin (DCVCS), dolaşıma dahil olduktan sonra böbreğe taşındığı ve reaktif elektrofilik özelliğinden dolayı in vivo şartlarda sıçanlarda nefrotoksik etki gösterdiği rapor edilmiştir (Barsteyn ve Elfarra 2007). Benzer şekilde, FMO3 tarafından gerçekleşen ve böbrek üzerine toksik etki oluşturan bir diğer biyoaktivasyon örneği olarak sarmısağın bileşimde bulunan ve alil halid metaboliti olarak bilinen S-alil-L-sistein verilebilir. S-alil-L-sistein, antioksidan, prostat ve melanoma kanser hücreleri üzerine antiproliferatif özelliklere sahiptir. Fakat FMO3 tarafından nefrotoksik etkili S-oksidasyon ile sülfoksit türevine dönüşmektedir (Krause ve ark. 2003).

2.6. FMO3 Polimorfizmi ve Kanser

Karsinojenez ve FMO3 aktivitesi arasındaki ilişki ilgi çekse de kesin kayıt için yeteri kadar çalışma bulunmamaktadır. *Hisamuddin ve arkadaşları* tarafından yapılan iki çalışmada, E158K ve E308G lokuslarındaki polimorfizmin sulindak metabolizmasında azalmaya ve dolayısıyla Familyal Adenomatöz Polip (FAP)'te poliplerin önlenmesinde etkinliğin artmasına sebep olduğu tespit edilmiş, sulindak ile tedavi edilen FAP'lı hastalarda E158K ve E308G alellerinin poliplere karşı koruyucu etkili olabileceği sonucuna varılmıştır (Hisamuddin ve ark. 2004; 2005). Benzer etkiyi

Castro ve arkadaşları prostat tümörlü hastalar üzerinde yaptıkları bir araştırmada gözlemlemişlerdir (Castro ve ark. 2002). *Bae ve arkadaşları*, kolorektal kanser ile MDR1, FMO3 ve CYP1A2 genetik polimorfizmi arasındaki ilişkiyi Kore popülasyonundan seçilmiş 111 kanserli hasta ve 93 sağlıklı gönüllüde sulindak kullananlarda, CYP1A2 ile kolorektal kanseri arasında anlamlılık olduğunu gözlemlemişlerdir (Bae ve ark. 2006).

Bazı araştırmacılar tarafından, yabancı etkenlere karşı sitotoksik etki gösteren, nörotransmitter ve immünomodülatör olarak görev yapan, oldukça aktif nitrik oksit (NO) ile FMO arasında bir bağlantı olabileceği rapor edilmiştir. *Ryu ve arkadaşları* tarafından yapılan bir çalışmada inflame karaciğerde S-nitrosilasyon ürünü olan inflamasyondan sorumlu NO'nun aşırı üretildiği, bunun yanı sıra karaciğerde FMO ve CYP450 enzimlerinin baskılandığı gözlemlenmiştir (Ryu ve ark. 2004). Benzer şekilde, 2 ayrı çalışmada da viral hepatit veya kronik karaciğer hastalarında NO değerleri artarken FMO aktivitesinde azalma görülmüştür (Majano ve ark. 1998; Mitchell ve ark. 1999). *Park ve arkadaşları* tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise aksi sonuçlar elde edilmiş ve genellikle NO'nun CYP450 gibi prostatik grup olarak 'hem' içeren proteinler ile reaksiyona girdiği fakat FMO'lar gibi prostatik grubu FAD olan proteinler ile reaksiyona girmediği bildirilmiştir (Park ve ark. 1999; Yamazaki ve ark. 2007).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Seçilen Örneklerin Tanımı ve Eldesi

Çalışmada kullanılan örnek grubu, 123 sağlıklı bireyden alınan ve steril EDTA'lı tüplere aktarılan 10'ar mL'lik periferik kandan oluşturuldu. 20 yaşından küçük ve 65 yaşından büyük bireyler, hamileler, zihinsel engelliler, sistematik hastalığı olanlar, sürekli ilaç kullananlar ve kan verme engeli olan bireyler çalışma grubuna dahil edilmedi. Bireylerin her birinin yazılı olarak rızası alındı, kan alma işlemi sırasında herhangi bir rahatsızlık veya riskle karşılaşılmadı. Çalışma grubuna dahil edilen bireylerin aralarında akrabalık ilişkisi bulunmamaktadır. Türk toplumundaki FMO3 gen frekansını en doğru şekilde belirlemek için Türkiye'nin her bölgesinden ve olabildiğince eşit sayıdaki gönüllüler arasında dağılımda denge kurulmaya çalışıldı [2]. Çalışmanın etik kurul onayı, İstanbul Tıp Fakültesi Yerel Etik kurulu'nun 04.11.2009 tarihli 2009/2733-59 protokol numaralı yazısı ile alındı. Tez çalışmasındaki deneyler İstanbul Üniversitesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı Laboratuvarında yapıldı. Her çalışılan örnek için yaş, kilo, meslek, sigara, alkol, uzun süreli ilaç kullanımı vs olmak üzere ayrıntılı olarak bilgi toplandı (Tablo 3-1).

Tablo 3-1. Gönüllü bireyler için doldurulan anket formu örneği

Adı, Soyadı:		Medeni hali:	
Yaşı:		Yaşadığı şehir:	
Ağırlığı (kg):		Boyu (m):	
Mesleği:		Sigara kullanımı:	
Alkol kullanımı:		İlaç kullanımı:	
Kendisi ve aile bireylerinin geçirdiği kronik hastalıklar:			

[2] Çalışmaya davet edilen, gönüllü olarak kan verme işlemine katılan tüm katılımcılara ve katılımcıların çalışma ile ilgili sorularına cevap vermeyi, işlem sırasında gelişebilecek her türlü sağlık problemi karşısında katılımcılara ve bize yardımcı olmayı kabul eden Dr. Selim Bölükbaşı'na, çalışmaya olan katkılarından dolayı teşekkür ederim.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Absolü Alkol	Sigma 32221
Agaroz	Sigma A5093
Akrilamid/Bis-akrilamid (29:1)	Sigma A2792
Amonyum persülfat	Sigma 248614
Borik asid	Sigma B6768
Brom fenol mavisi	Merck 8122
DNA göstergesi (50 bç)	Fermentas SM0371
DNA göstergesi (1kb)	Fermentas SM0311
DNA izolasyon kiti	Roche 11796828001
dNTP set	Fermentas R0181
Etidyum bromür	Sigma E8751
Etilendiamin tetra asetik asid (EDTA)	Sigma E-5134
Formamid	Merck 2463595
Gliserol	Merck K32593693
Hidroklorik asid	Merck K2385617
İsopropil Alkol	Merck
Kloroforom	Riedel 24216
Ksilen siyanol	Sigma X 4126
Magnezyum klorür	Merck TA588232
Magnezyum klorür (25 mM)	Fermentas R0971
PCR master mix	Fermentas K1071
Restriksiyon enzimleri:	
BsrGI	Fermentas ER0931
MboII	Fermentas ER0821
PpuMI	Fermentas ER0761

Sakkaroz	Fluka 84100
Sodyum dodesil sülfat	Sigma L5750
Sodyum klorür	LaChema 30423
Sodyum perklorat	Fluka 71852
Taq DNA polimeraz	Fermentas EP0401
Tetra etil metilen daimin (TEMED)	AppliChem A1148
Triton X-100	Sigma T8787
Trizma baz (Tris-hidroksilmetilaminometan)	Merck 8382B007

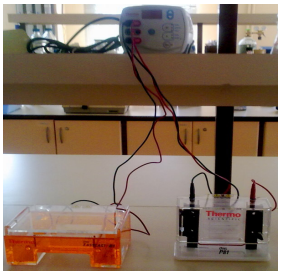
3.3. Alet ve Cihazlar

Ayarlanabilir otomatik pipetler (0,2-2 µL; 1-10 µL; 1-20 µL; 50-200 µL; 100-1000 µL)	Gilson
Blok ısıtıcı	Multi Blok Lab-Line
Çalkalayıcı	Kottermann
Derin dondurucu (-20 °C)	Arçelik
Dikey elektroforez tankı	Thermo (OW P81 ve OWL P8DS)
Elektronik hassas terazi	Precisa (XB 220 A)
Etüv	Nüve
Jel elektroforez güç kaynağı	Thermo (EC 300 XL)
Jel görüntüleme sistemi	Quantum-ST4
Mikrodalga fırın	Beko
Mikrosantrifüj aleti	Hettich (Mikro 200R)
Otoklav	Hirayama (HV-50L)
pH metre	Hana
Saf su cihazı	Millipore
Soğutmalı santrifüj aleti	Hettich (Universal 32 R)
Spektrofotometre	Shimadzu UV-1200

Su banyosu	Memmert (WB14)
Spin santrifüj	Labnet (C1301B)
Termal döngü cihazı	Applied Biosystems (ABI 9700)
Termal döngü cihazı	Axygen (Gradient Therm-1000)
UV transilluminator	UVP (Bencthop 3UV)
Vorteks	IKA
Yatay elektroforez tankı	Thermo (OWL B1)

Çalışma süresince kullanılan başlıca cihazlara ait fotoğraflar şekil 3-1'de gösterilmiştir.

(A)

(B) 

(C)

(D)

Şekil 3.1: Kullanılan bazı cihazlar.

A) Altın blok termal döngü cihazı (ABI) ve Gradient termal döngü cihazı (Axygen) (sırasıyla).

B) Elektroforez sistemi C) UV transilluminator D) Jel görüntüleme sistemi

3.4. Kullanılan Çözeltiler

Reaktif A (Eritrosit Parçalama Tamponu): 109.5 g Sakroz, 1g $MgCl_2$ tartıldı. 1M Tris HCl (pH = 8) çözeltisinden 10 mL ilave edilerek 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı. Otoklavda 120 °C'de 15 dk sterilize edildikten sonra, sıcakken içine 10 mL Triton X-100 ilave edilerek +4 °C'de saklandı.

Reaktif B (Lökosit Parçalama Tamponu): 48.5 g Trizma baz, 22.3 g EDTA, 8.8 g NaCl tartılarak 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı. HCl ile PH'sı 8'e ayarlanan çözelti otoklavda 120 °C'de 15 dk sterilize edildi. Sıcakken 10g SDS ilave edilerek oda sıcaklığında saklandı.

1 M Tris HCl Çözeltisi: 121.1 g Trizma baz tartılarak 800 mL distile suda çözündürüldü. 1 N HCl ile pH 8'e ayarlandı ve hacmi distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Otoklavda 120 °C'de 15 dk sterilize edildi.

Agaroz Jel Yükleme Tamponu: 0.25 g Brom fenol mavisi, 0.25 g ksilen siyanol tartıldı. 30 mL Gliserol ve 70 mL distile su ilave edilerek karıştırıldı. Oda sıcaklığında saklandı.

Akrilamid Jel Yükleme Tamponu: % 95 Formamid, 20 mM EDTA, % 0.05 brom fenol mavisi, % 0.05 ksilen siyanol olacak şekilde 10 mL hazırlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

5 M Sodyumperklorat Çözeltisi: 70.2 g Sodyum perklorat tartılarak 100 mL'ye distile su ile tamamlandı. Otoklavda 120 °C'de 15 dk sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

Tris-EDTA Tamponu: 10 mL 1M Tris HCl çözeltisi ve 20 mL 0.5M EDTA karışımı distile su ile 1000 mL'ye tamamlandı. Otoklavda 120 °C'de 15 dk sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

0.5 M EDTA: 29.2 g EDTA, 160 mL distile su içerisinde çözüldü ve hacim 200 mL'ye tamamlandı. pH'nın 8 olması için yaklaşık 4 g NaOH pelleti ilave edildi. Otoklavda 120 °C'de 15 dk sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

10X TBE Çözeltisi: 108 g Trizma baz, 55 g borik asit, 9.3 g EDTA tartılarak 1000 mL'ye distile su ile tamamlandı. Otoklavda 120 °C'de 15 dk sterilize edildi. Oda sıcaklığında saklandı.

EBr Çözeltisi: 10 mg EBr, 1mL bidistile suda çözüldü.

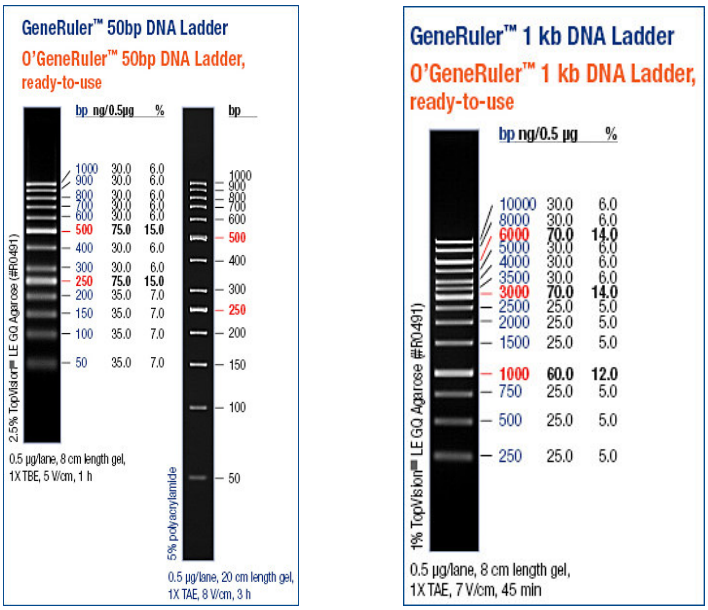
1X TBE Çözeltisi: 10X TBE tamponundan 100 mL alınıp 1000 mL'ye steril distile su ile tamamlandı.

10 µM'lık ileri (forward) primer çözeltisi: Planlanan dizaynda sentez ettirilen 100 µM konsantrasyonundaki ileri primer ana stoğundan 6 µL alınıp, 54 µL steril su ilave edilerek hazırlandı.

10 µM'lık geri (reverse) primer çözeltisi: Planlanan dizaynda sentez ettirilen 100 µM konsantrasyonundaki geri primer ana stoğundan 6 µL alınıp, 54 µL steril su ilave edilerek hazırlandı.

10 mM dNTP Karışımı: 100 mM konsantrasyonundaki dATP, dTTP, dCTP, dGTP stok çözeltilerinin her birinden 10 µL alınarak, 60 µL steril su ilave edildi. Santrifüjle karıştırılıp –20 °C' de saklandı.

DNA göstergeleri: Çalışmada 50 ve 1000 bç (baz çifti)'lik DNA göstergeleri kullanıldı (Şekil 3-2). 4 µL DNA göstergesi, 1 µL 6X DNA yükleme tamponu ve 1 µL steril su uygun hacimli eppendorfda karıştırıldı. +4 °C' de saklandı.



Şekil 3-2. 50 ve 1000 bç'lik DNA göstergelerinin baz içerikleri.

3.5. Yöntemler

3.5.1. Periferik Kan Örneklerinden Alkolle Çöktürerek DNA İzolasyonu

- 5-10 mL Periferik kan örneği EDTA'lı tüpe alındı ve aynı gün içerisinde izole edildi (örnekler eğer aynı gün içinde izole edilemiyorsa 1 haftaya kadar +4°C' de, daha uzun süreli bekletilme durumunda da -20°C' de saklandı).
- Örnek, soğuk Reaktif A'dan 35 mL ilave edilmiş 50 mL'lik falkona boşaltıldı ve alt üst edilerek iyice karıştırıldı.
- 10 dk 3000 rpm'de santrifüj edildi ve süpernatant atıldı
- Pellet üzerine Reaktif B'den 2 mL ilave edildi.
- Reaktif B'li pellet, 0.5 mL 5 M sodyum perklorat çözeltisi konulmuş temiz falkon tüpüne aktarılarak 15 dk alt üst edildi.
- 65 °C'de 30 dk etüvde inkübe edilen tüpe 2 mL soğuk kloroform ilave edildi.
- 10 dk alt üst edildikten sonra 10 dk 1400 rpm'de santrifüj edildi.
- Üst fazın hepsi temiz 15 mL'lik falkon tüplerine aktarıldı.
- Üzerine 5 mL soğuk absolü alkol ilave edildi.
- Tüp iyice alt üst edilerek, DNA sarmalının oluşumu gözlendi.
- Steril bioloop ile oluşan DNA sarmalı alındı ve kuruması için eppendorfa aktarılarak 5-10 dk bekletildi.
- Kuruyan DNA eppendorf içine aktarıldı ve DNA'nın büyüklüğüne göre yaklaşık 200 µL steril distile su ilave edildi.
- 60 °C'de 1 gece su banyosunda inkübe edildi.
- Çözünen DNA +4 °C'de saklandı.

3.5.2. Periferik Kan Örneklerinden Kit Kullanarak DNA İzolasyonu

Kit İçeriği:

1.Tampon: 6 M Guanidin HCl / 10 mM üre / 10 mM Tris HCl / % 20 Triton-X 100 (v/v) (pH 4.4)

2.Tampon: 5 M Guanidin HCl / 20 mM Tris HCl / alkol (pH 6.6)

3.Tampon: 2 mM Tris HCl / alkol (pH 7.5)

4.Tampon: 4 M üre / 200 mM Tris / 20 mM NaCl / 200 mM EDTA (pH 7.4)

- Yaklaşık 1 mL periferik kan örneği EDTA'lı tüpe alındı ve aynı gün içerisinde izole edildi (örnekler eğer aynı gün içinde izole edilemiyorsa 1 haftaya kadar +4°C' de, daha uzun süreli bekletilme durumunda da -20°C' de saklandı).
- 200 µL kan örneği üzerine 200 µL 1.tampon ve 40 µL proteinaz K konarak karıştırıldı.
- Karışım 10 dk 70 °C'de inkübe edildi.
- Üzerine 100 µL isopropil alkol eklenerek kartuşa ilave edildi.
- Kartuj altında tüpü ile birlikte 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası tüpteki sıvı atıldı.
- Kartuş üzerine 500 µL 2. Tampon eklenerek 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası tüpteki sıvı atıldı.
- Kartuş zerine 500 µL 3.tampon eklenip, 1 dk 13000 rpm'de santrifüj edildi.
- Santrifüj sonrası tüpteki sıvı atıldı.
- Bu işlem ikinci kez gerçekleştirildi.
- Yeni bir eppendorf tüp, alttaki tüpün yerine konuldu ve kartuşa önceden 70 °C'ye getirilmiş 4.tampon 200 µL eklendi.
- 1 dk 8000 rpm'de santrifüj edildi.
- Kartuşdan elüe eldilen DNA +4 °C'de saklandı.

3.5.3. DNA Saflık ve Miktar Tayini

DNA örneklerinin saflık derecelerinin belirlemek için, optik dansiteleri spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boylarında ölçüldü. Kör örnek olarak DNA'ların içinde çözüldüğü steril distile su kullanıldı. Her 15 µL DNA örneği 1485 µL su bulunan eppendorfa konup pipetleme ile karıştırılıp kuartz küvetlerde spektrofotometrede ölçüldü. 260 / 280 nm değerleri 1.8 ± 0.1 olan örnekler PCR için

uygun olarak belirlendi. Ölçümleri yapılan DNA örneklerinin konsantrasyonları µg/mL olarak "A_{260} x seyreltme faktörü x 50" formülü ile hesaplandı.

3.5.4. Genotipleme

İstenilen gen bölgesinin çoğaltılması (DNA amplifikasyonu) için; 1 µL (~200 ng) DNA örneği, 0.2 mL'lik steril tüpteki 25 µL PCR karışımına ilave edildi. Kısa süreli santrifüjleme yapıldı. Daha önceden 94 ^{0}C'ye çıkarılan PCR cihazına (termal döngü cihazı) tüm örnekler yerleştirilerek PCR işlemi başlatıldı. PCR karışımının hazırlanması, örneklerin ilave edilmesi işlemlerinin tümü soğukta, buz üzerinde, yapıldı.

3.5.4.1. FMO3*1 Gen Amplifikasyonu

FMO3*1 V257M SNP'nin bulunduğu bölge Şekil 3-3'te gösterilmiştir.

ATGGTCACTA ATTTCATGGT TGAATTGGTG TTTTTTAAGG TCATGATCAG
TTCCAGAAGT GGCTCCTGGG TGATGAGCCG GGTCTGGGAC AATGGTTATC
CTTGGGACAT GCTGCTCGTC ACTCGATTTG GAACCTTCCT CAAGAACAAT
TTACCGACAG CCATCTCTGA CTGGTTGTAC
R (A/G)
TGAAGCAGAT GAATGCAAGA TTCAAGCATG AAAACTATGG CTTGATGCCT
TTAAATGGGT AATGCAGAGC TAAACGTGAT ATGCCTGCTG GCTTTTAGTT
CAGTGTCAAC AACCCTTAAT GTCCTGTAAG CCCAAAACAA ATCAAAGTAT
TAGCAATCAC AACTCATATA TCAGAAGATA AAGAACTGCA CAAATTAAGA

Şekil 3-3. FMO3*1 geninde polimorfizmin görüldüğü bölge (kullanılan primerler yeşil, SNP ise kırmızı gösterilmiştir).

Kullanılan primer dizileri;

İleri primer (Primer F): TGTTTTTTAA GGTCATGATC A

Geri primer (Primer R): TTGTGATTGC TAATACTTTG A

PCR karışımı;

PCR master mix	12.5 µL
10 µM Primer F	0.5 µL (0.2 µM)

10 µM Primer R	0.5 µL (0.2 µM)
Steril su	11.5 µL

Amplifikasyon koşulları;

94 ^{0}C'de 5 dk

94 ^{0}C'de 45 sn

54 ^{0}C'de 45 sn } 30 döngü

72 ^{0}C'de 45 sn

72 ^{0}C'de 7 dk

3.5.4.2. FMO3*2 Gen Amplifikasyonu

FMO3*2 E158K SNP'nin bulunduğu bölge Şekil 3-4'de gösterilmiştir.

GGGATGGTAA AAAAGAATCG GCTGTCTTTG ATGCTGTAAT GGTTTGTTCC
GGA**CATCATG TGTATCCCAA CCTACCAA(g) AA**
R (A/G)
AGTCCTTTCC AGGTAAGGCC AAAATTTAAG CTGCTAGCCA CATAACTGAC
AAAAATGAAT ATCTTGATAA TGTCTTCTTT TTTCTAAAAG TATAAGCAGG
TTAAATTAAA ATATACTTCT GTTATATCTA ATATGCTTGG TGTGTTAAAA
TAGCACATTA TTGTGACTGC ATCTATTCAC AAGGTCGCTT CTGTTAAAGT

Şekil 3-4. FMO3*2 geninde polimorfizmin görüldüğü bölge (kullanılan primerler yeşil, SNP ise kırmızı olarak gösterilmiştir).

Kullanılan primer dizileri;

İleri primer (Primer F): CATCATGTGT ATCCCAACCT ACCAGAA

Geri primer (Primer R): GTGAAAAGTG AGAAATACAT GGCAG

PCR karışımı;

Steril su	18.0 µL
10 mM dNTP	0.2 µL (0.08 mM)

10 µM Primer F	0.2 µL (0.08 µM)
10 µM Primer R	0.2 µL (0.08 µM)
25 mM $MgCl_2$	1.5 µL (1.5 mM)
10X Tampon çözeltisi (KCl'lü)	2.0 µL
Taq DNA polimeraz (5 U / µL)	0.1 µL (0.5 U)

Bu çalışmada Hao ve arkadaşlarının uyguladığı PCR-RFLP yöntemi şartlarda değişiklik yapılarak kullanılmıştır (Hao ve ark. 2006).

Amplifikasyon koşulları;

94 ^{0}C'de 5 dk

94 ^{0}C'de 45 sn
55 ^{0}C'de 45 sn
72 ^{0}C'de 30 sn
} 30 döngü

72 ^{0}C'de 7 dk

3.5.4.3. FMO3*3 Gen Amplifikasyonu

FMO3*1 E308G SNP'nin bulunduğu bölge Şekil 3.5'te gösterilmiştir.

TTCCTTCCTT ATCAATTTAT ATATGGACCA ATAAAACAAG AGGGAAATAT
TACACTTCCA ATAATTGTCT CTGTTTTCCA TACAGAGTCC TGAGGAAAGA
GCCTGTATTT AACGATGAGC TCCCAGCAAG CATTCTGTGT GGCATTGTGT
CCGTAAAGCC TAACGTGAAG GAATTCACAG
R (A/G)
GACCTCGGCC ATTTTTGAGG ATGGGACCAT ATTTGAGGGC ATTGACTGTG
TAATCTTTGC AACAGGGTAT AGTTTTGCCT ACCCCTTCCT TGATGAGTCT
ATCATCAAAA GCAGAAACAA TGAGATCATT TTATTTAAAG GAGTATTTCC
TCCTCTACTT GAGAAGTCAA CCATAGCAGT GATTGGCTTT GTCCAGTCCC

Şekil 3.5. FMO3*3 geninde polimorfizmin görüldüğü bölge (kullanılan primerler yeşil, SNP ise kırmızı olarak gösterilmiştir).

Kullanılan primer dizileri;

İleri primer (Primer F): TTTTCCATAC GAGTCCTGA

Geri primer (Primer R): CTGCTTTTGA GATAGACTC

PCR karışımı;

PCR master mix	12.5 µL
10 µM Primer F	0.5 µL (0.2 µM)
10 µM Primer R	0.5 µL (0.2 µM)
Streil su	11.5 µL

Amplifikasyon koşulları;

94 ^{0}C'de 5 dk

94 ^{0}C'de 45 sn
56 ^{0}C'de 60 sn
72 ^{0}C'de 55 sn
} 30 döngü

72 ^{0}C'de 7 dk

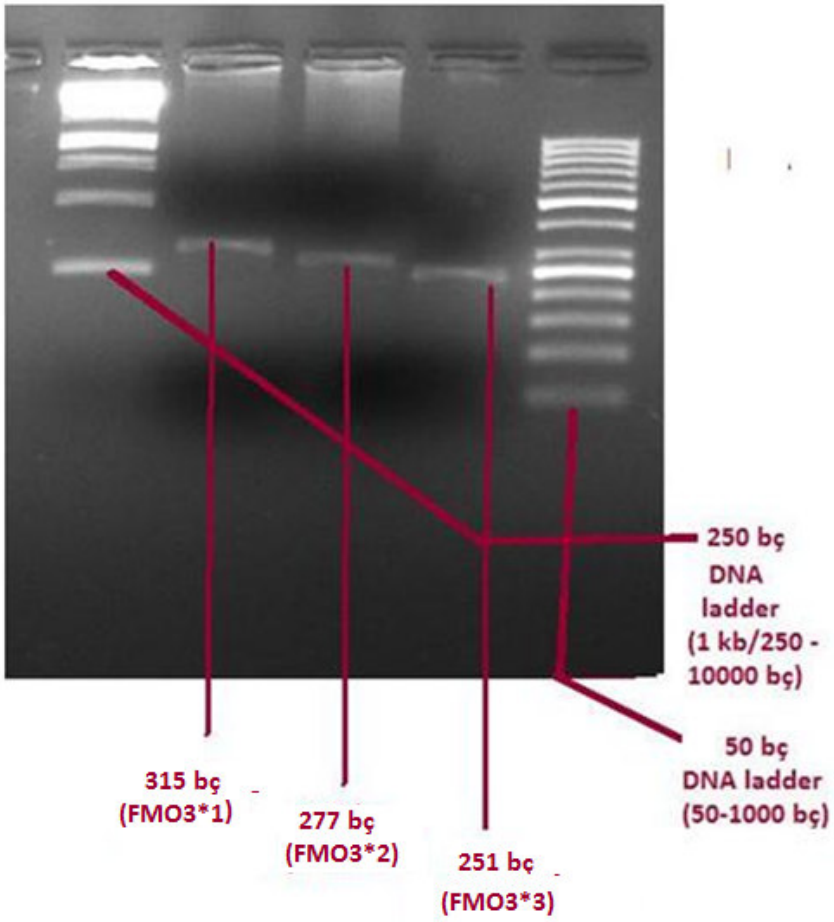
3.5.4.4.PCR Ürünlerinin Agaroz Yatay Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

Enzim amplifikasyonunun başarılı bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek amacı ile örnekler, PCR işlemi bitiminde %1.5'lik rutin agaroz jellere tatbik edildi.

Agaroz jel (%1.5'lik) hazırlanışı: 0.75 g Rutin agaroz tartılıp 50 mL TBE (1X) tamponu ilave edildi ve mikrodalga içerisinde kaynatılarak çözünmesi sağlandı. Tamamen soğumadan önce çözelti üzerine 10 µL etidyum bromür ilave edildi ve homojen dağılması için karıştırıldı. Ilık olan karışım, uygun taraklar yerleştirilmiş olan 10x10 cm boyutundaki yatay elektroforez tepsisine hava kabarcığı kalmayacak şekilde döküldü. Jellerin donması için 15 dk beklendi. Taraklar çıkartılarak jeller +4 ^{0}C'de saklandı.

Agaroz jele uygulama: Her 7 µL PCR ürününe 2 µL agaroz jel yükleme tamponu ilave edilerek karıştırıldı. Jel, TBE tamponu (1X) içeren elektroforez tankına alındı. Yükleme tamponlu PCR ürünleri, tarak dişleri sayesinde oluşan boşluklara teker teker

uygulandı. Oluşan ürünün büyüklüğünü ölçebilmek için gerekli olan DNA göstergeleri uygulandı. Amplifikasyon ürünleri direkt olarak 7 V akım varlığında 20 dk elektroforeze tabi tutuldu ve işlem sonunda amplifikasyon ürünleri UV transilluminatörde kontrol edildi (Şekil 3-1). FMO3 geninin spesifik bantları (315, 277, 251 bç) şekil 3-6'da görülmektedir.



Şekil 3-6. FMO3 genine ait çalışılan 3 adet SNP için elde edilen PCR ürünlerinin agaroz yatay jel elektroforezi ile elde edilen görüntüleri (1. Kuyu: 1 kb/250 – 10000 bç' lik DNA göstergesi; 2. kuyu: FMO3*1 (315 bç); 3. kuyu: FMO3*2 (277 bç); 4. kuyu: FMO3*3 (251 bç); 5. kuyu 50 - 1000 bç'lik DNA göstergesi).

3.5.4.5. Genotiplerin PCR–RFLP Yöntemi ile Belirlenmesi

Amplifiye edilmiş DNA örneklerinde çalışılan SNP'lerin tespiti için; gerekli miktardaki restriksiyon enzimi, uygun tampon ile birlikte ~25 µL ürün içeren her bir

PCR tüpüne uygulandı ve 37 ^{0}C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı. Kullanılan restriksiyon enzim çözeltileri ve oluşan ürünler aşağıda bildirilmiştir;

- FMO3*1 V257M için;

Restriksiyon karışımı: 1 µL BsrGI ve 2 µL tampon çözeltisi

BsrGI restriksiyon enzimi tanımlama bölgesi: 5'...**T↓G T A C A**...3'

3'...**A C A T G↑T**...5'

Oluşan ürünler: FMO3*1.1/*1.1 (G/G : V257V) - 315 bç

FMO3*1.1/*1.2 (G/A : V257M) - 148, 167 ve 315 bç

FMO3*1.2/*1.2 (A/A : M257M) - 148 ve 167 bç

- FMO3*2 E158K için;

Restriksiyon karışımı: 0.5 µL MboII ve 2 µL tampon çözeltisi

MboII restriksiyon enzimi tanımlama bölgesi: 5'...**G A A G A (N)8↓**...3'

3'...**C T T C T (N)7↑**..5'

Oluşan ürünler: FMO3*2.1/*2.1 (G/G : E158E) - 37 ve 240 bç

FMO3*2.1/*2.2 (G/A : E158K) - 37, 240 ve 277 bç

FMO3*2.2/*2.2 (A/A : K158K) - 277 bç

- FMO3*3 E308G için;

Restriksiyon karışımı: 1 µL PpuMI ve 2 µL tampon çözeltisi

PpuMI restriksiyon enzimi tanımlama bölgesi: 5'...**R G**↓**G W C**↑**C Y**...3'

3'...**Y C**↓**C W G**↑**G R**...5'

Oluşan ürünler: FMO3*3.1/*3.1 (G/G : E308E) - 61 ve 190 bç

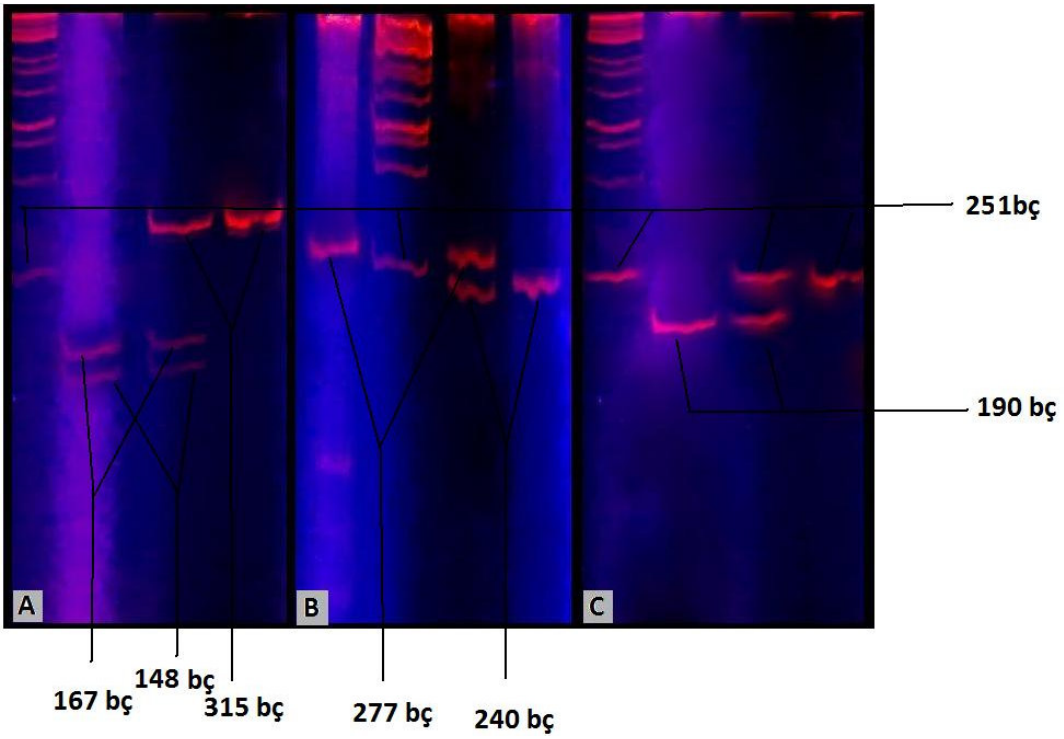
FMO3*3.1/*3.2 (G/A : E308G) - 61, 190 ve 251 bç

FMO3*3.2/*3.2 (A/A : G308G) - 251 bç

İnkübasyon sonrasında enzim kesim ürünlerine ait fragmanlar, %8'lik akrilamid dikey jel elektroforezi ile belirlendi.

Akrilamid jel (%8'lik) hazırlanışı: 3214 µL poliakrilamid : bisakrilamid (29 : 1) ve 1000 µL TBE (10X) 15 mL'lik falkona konulduktan sonra hacim bidistile su ile 10 mL'ye tamamlandı. Üzerine 150 µL amonyum persülfat (%50) ve 25 µL TEMED ilave edildi. Manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Çözelti enjektör ile iki cam arasına döküldü ve uygun tarak yerleştirildi. Hazırlanan jel donduktan sonra su ile yıkanarak kuyucuklarda arda kalan polimerleşmemiş çözeltinin ve hava kabarcıklarının giderilmesi sağlandı. Jel, tanka yerleştirildi ve tank, TBE (1X) çözeltisi ile dolduruldu. Jelin donması için 15 dk beklendi. Tarağı çıkartılan jel, restriksiyon ürünlerinin uygulanması için $+4^0$C'de saklandı.

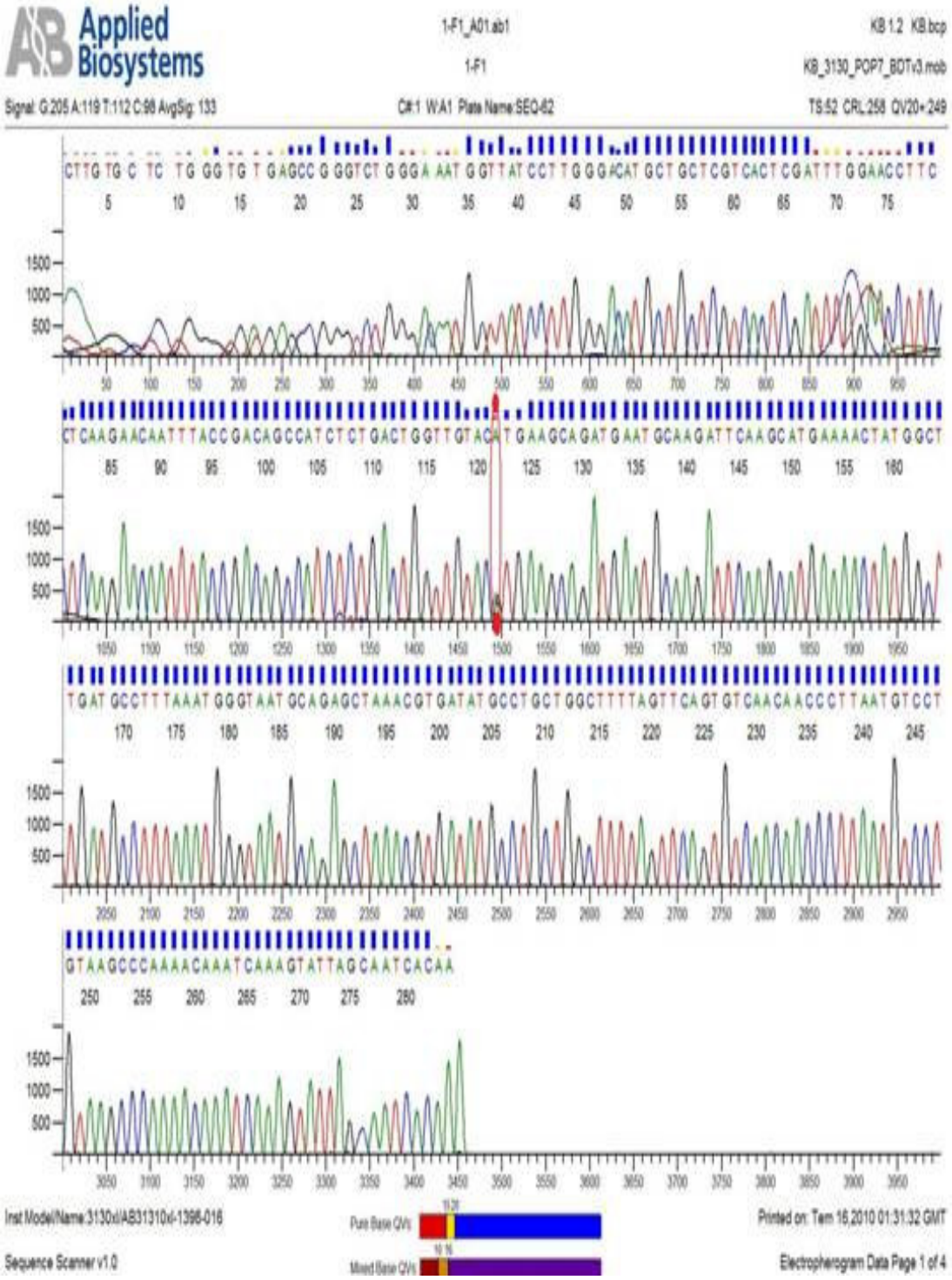
Akrilamid jele uygulama: Yaklaşık 20 µL'lik enzim kesim ürünlerinin üzerine 5 µL jel yükleme tamponu ilave edildi. Çözelti jeldeki kuyucuklara yüklendi. Her jel için bir kuyucuğa uygun büyüklükteki DNA göstergeside tatbik edildi. Örnekler 200 W, 70 V'lık akımda yürütüldü. Elektroforez işlemi tamamlandıktan sonra jel, 100 mL suya 20 µL etidyum bromür ilavesiyle hazırlanmış olan solüsyonda 15 dk süre ile çalkalandı ve UV altında görüntülendi. DNA göstergesindeki bantlarla genotipleme yapılan DNA fragmanının verdiği bantlar kıyaslandı (Şekil 3-7).



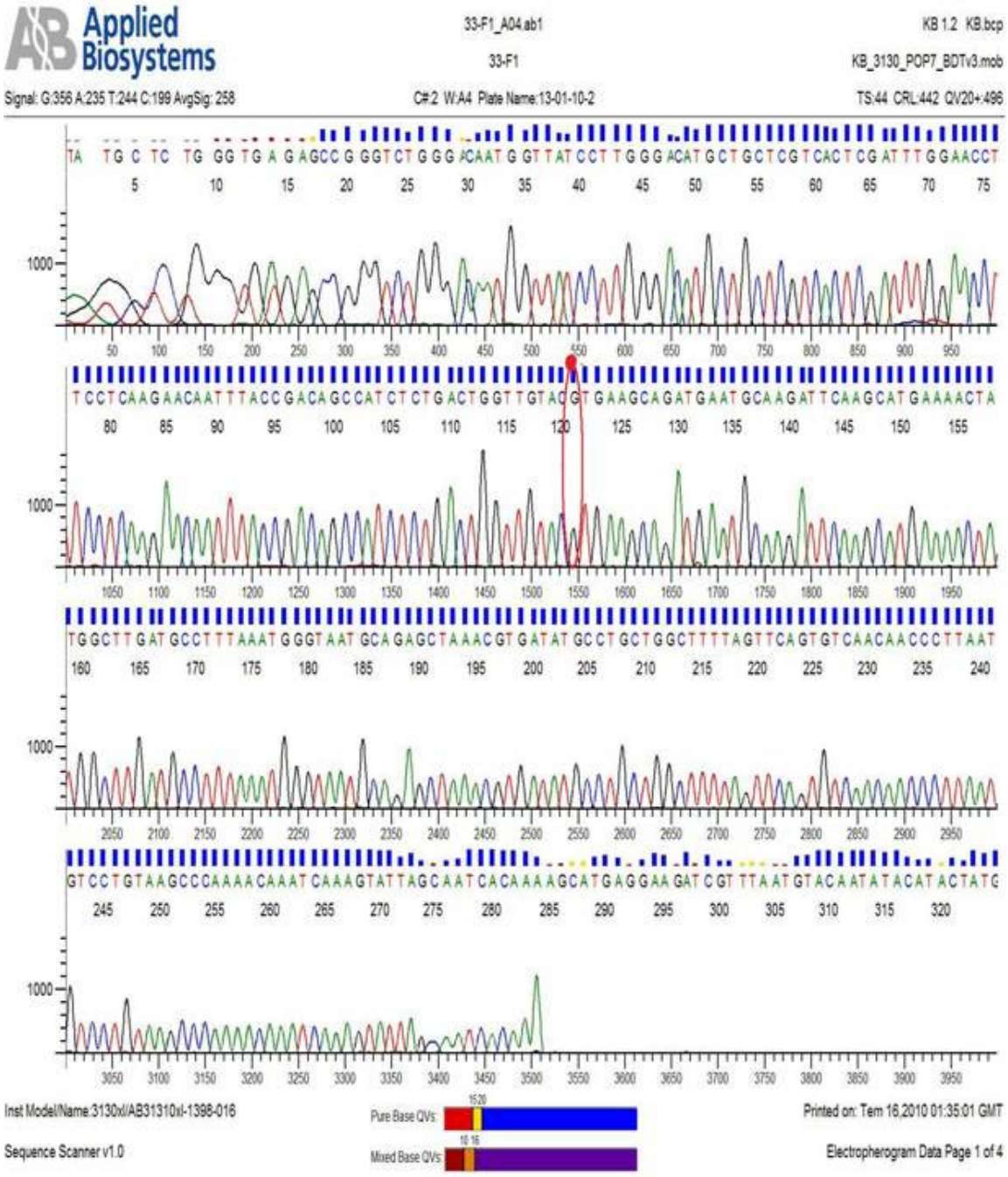
Şekil 3-7. FMO3 genine ait çalışılan 3 adet SNP için RFLP ürünlerinin akrilamid dikey jel elektroforezi ile elde edilen görüntüleri; (A) 1.kuyu 10000 bç'lik DNA göstergesi, 2. kuyu FMO3*1 G/G , 3. kuyu FMO3*1 G/A, 4.kuyu FMO3*1 A/A (B) 1. kuyu FMO3*2 A/A , 2.kuyu 10000 bç'lik DNA göstergesi, 3. kuyu FMO3*2 G/A, 4.kuyu FMO3*2 G/G (C) 1.kuyu 10000 bç'lik DNA göstergesi, 2. kuyu FMO3*3 G/G , 3. kuyu FMO3*3 A/G, 4.kuyu FMO3*3 A/A

3.5.5. PCR-RFLP Yöntemi ile Elde Edilen Genotipleme Sonuçlarının Konfirmasyonu

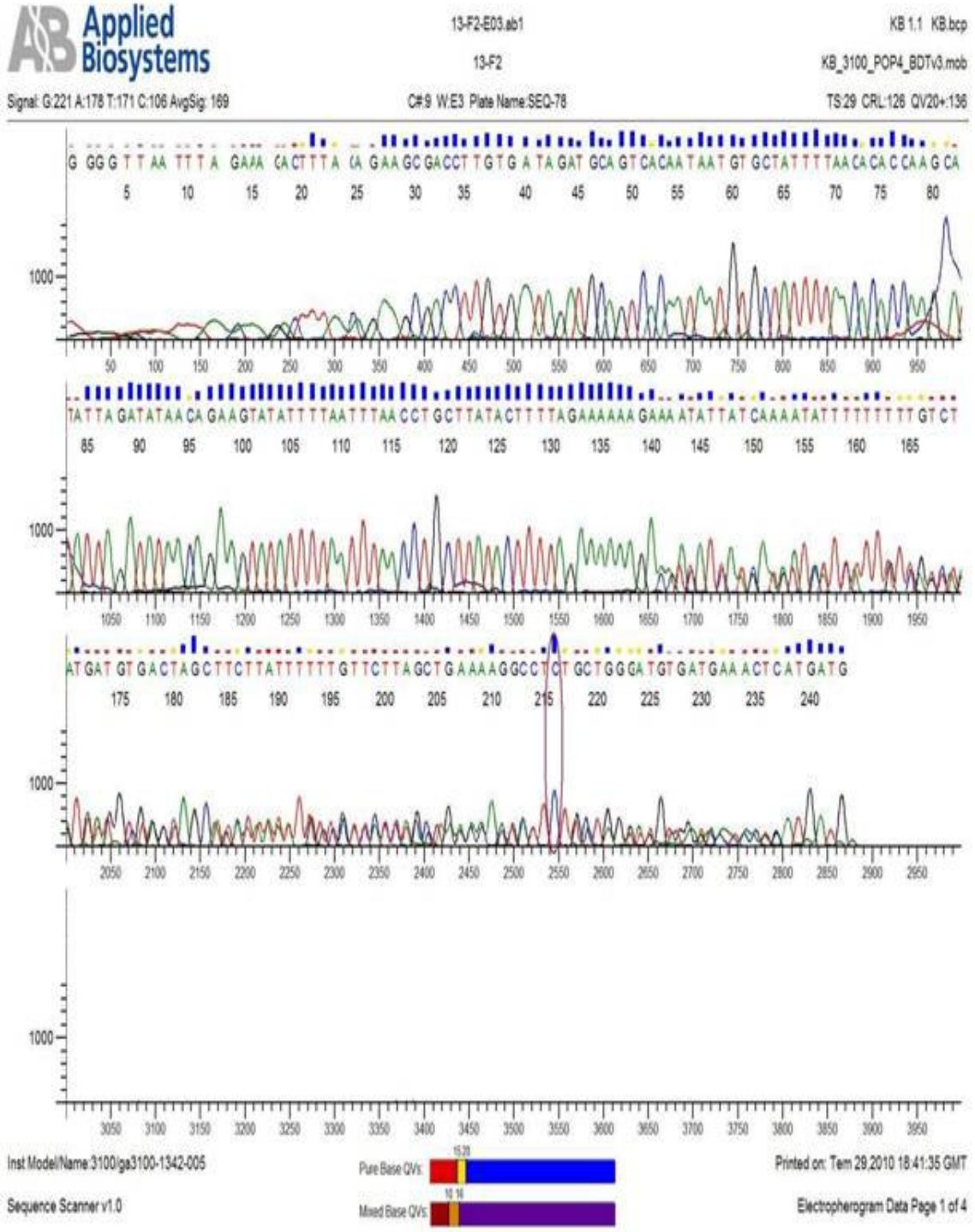
PCR-RFLP yöntemi ile elde edilen genotipleme sonuçlarından konfirmasyon için DNA dizi analizine gönderildi. Dizi analizleri Refgen Gen Araştırmaları ve Biyoteknoloji Ltd. Şti'ne tarafından yapıldı. Her SNP için belirlenen farklı alelik bireylerin sonuçları aşağıda verilmiştir (Şekil 3-8, 3-9, 3-10, 3-11).



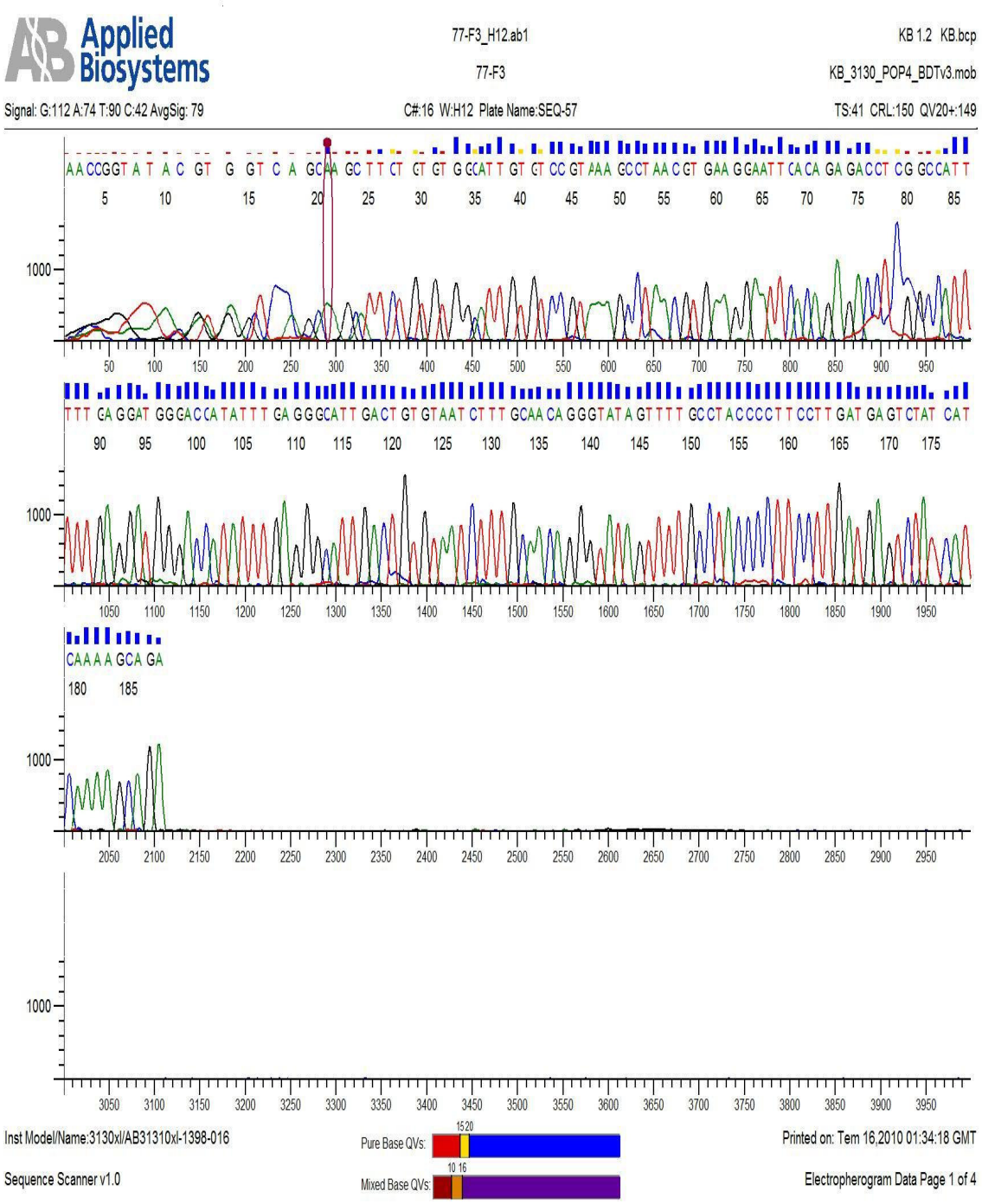
Şekil 3-8. FMO3*1 için; dizi analizine gönderilerek RFLP sonucu konfirme edilen 1 numaralı heterozigot örneğe (G/A) ait DNA sekans analiz sonucu.



Şekil 3-9. FMO3*1 için; dizi analizine gönderilerek RFLP sonucu konfirme edilen 33 numaralı homozigot (G/G) örneğe ait DNA sekans analiz sonucu.



Şekil 3-10. FMO3*2 için; dizi analizine gönderilerek RFLP sonucu konfirme edilen 13 numaralı homozigot (G/G) örneğe ait DNA sekans analiz sonucu.



Şekil 3-11. FMO3*3 için; dizi analizine gönderilerek RFLP sonucu konfirme edilen 77 numaralı homozigot (A/A) örneğe ait DNA sekans analiz sonucu.

İstatiksel analiz, Statistical Package for Social Sciences-SPSS (versiyon 13.0, Chicago, IL) paket programı kullanılarak yapıldı. Genotip frakansları ve seçim dengesi Hardy-Weinberg eşitliği[3] ile değerlendirildi. Alel frekansı gen sayma yöntemi, genotip ve alellerin görülme sıklıklarının Hardy-Weinberg eşitliğine uyumu ki-kare (χ^2, Chi-square) testi, gruplar arası farklılıkların değerlendirilmesi ise Student T-testi kullanılarak hesaplandı. İstatiksel değerlendirme sonunda, $p<0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Aynı zamanda haplotip[4] analizi ile sonuçlar yorumlandı ve haplotip sıklıkları genotip dataları kullanılarak Bayesian algoritmasını baz alan PHASE (versiyon 2) programı ile hesaplandı.

[3] İngiliz Matematikçi G.H.Hardy ve Alman fizikçi W.Weinberg birbirinden bağımsız olarak ideal bir popülasyonda gen sıklıklarının ilk kuşaktan beri sabit kaldığını ve böyle bir popülasyonun dengeli popülasyon olduğunu ileri sürmüşlerdir. Dünya popülasyonlarının çoğu ideal popülasyon kriterlerine uymasalar da Hardy-Weinberg dengesindeymiş gibi davranırlar .

[4] kromozom üzerinde alellerin sıralanış düzeni.

4. BULGULAR

Enzim aktivitesi üzerinde etkili ve çeşitli popülasyonlarda yaygın olarak görülen FMO3 genine ait 3 adet SNP'in Türk popülasyonundaki sıklığının tayin edildiği çalışmada, 123 sağlıklı gönüllüden alınan periferik kan örneklerinden izole edilen DNA'lar üzerinde PCR-RFLP yöntemi kullanılarak genotipleme yapıldı. Çalışma grubu bireylerine ait genel özellikler Tablo 4-1'de verilmiştir. Her bir bireye ait bilgi ve genotipleme sonuçları ayrıntılı olarak Tablo 4-2'de bildirilmiştir.

Tablo 4-1. Çalışma grubunun genel özellikleri.

Karakteristikler	Çalışma grubu (n=123), n (%)
Cinsiyet	
Erkek	**85 (69.1)**
Kadın	**38 (30.9)**
Yaş Ortalama (Yıl ± SD)	**32.09 ± 10.3**
Vücut kitle indeksi	**22.50**
Sigara Kullanımı	
Kullanıyor	**47 (38.2)**
Kullanmıyor	**76 (61.8)**

Tablo 4-2. Çalışma grubuna dahil her birey için ayrıntılı bilgi ve genotip analiz sonuçları.

ÖRN.NO.	AD/SOYAD	CİNSİYET	YAŞ	KİLO	BOY (m)	BMI*	FMO3*1	FMO3*2	FMO3*3
1	NB	K	24	52	1,60	20,3	A/G	A/G	A/A
2	FB	K	24	53	1,64	19,7	A/G	G/G	A/A
3	OEÇ	E	23	66	1,75	21,6	G/G	G/G	A/G
4	EŞ	E	23	73	1,88	20,7	G/G	A/G	A/A
5	SÖ	E	23	73	1,80	22,5	G/G	G/G	A/A
6	AD	E	25	65	1,75	21,2	G/G	G/G	A/A
7	NŞ	E	26	89	1,70	30,8	G/G	A/G	A/A
8	MY	E	27	82	1,72	27,7	A/A	G/G	A/A
9	SŞ	E	23	78	1,81	23,8	A/G	A/G	A/G
10	KK	E	24	50	1,70	17,3	G/G	A/G	A/A
11	MV	E	25	70	1,84	20,7	G/G	G/G	A/A
12	GY	E	23	97	1,85	28,3	G/G	G/G	A/A
13	Aİ	E	25	78	1,78	24,6	G/G	G/G	A/A
14	SB	K	23	48	1,60	18,8	G/G	G/G	A/A
15	EF	E	24	70	1,83	20,9	G/G	A/A	A/A
16	SÖ	K	22	58	1,62	22,1	G/G	–	A/A
17	AG	K	23	52	1,63	19,6	G/G	G/G	A/A
18	TT	E	23	80	1,84	23,6	G/G	A/G	A/A
19	BA	E	23	89	1,77	28,4	G/G	A/A	A/A
20	HG	K	22	64	1,72	21,6	G/G	G/G	A/A
21	SA	E	25	65	1,67	23,3	G/G	A/G	A/A
22	MD	E	24	82	1,87	23,4	G/G	A/G	A/A
23	ET	E	22	75	1,75	24,5	G/G	A/G	A/A
24	SY	E	25	83	1,80	25,6	A/G	G/G	A/A
25	MS	K	23	54	1,64	20,1	–	G/G	A/A
26	SH	K	23	55	1,63	20,7	G/G	G/G	A/A
27	AB	K	23	60	1,65	22,0	G/G	A/G	A/A
28	MK	E	26	63	1,74	20,8	G/G	G/G	A/A
29	AA	E	24	68	1,76	22,0	A/A	G/G	A/A
30	YS	E	26	73	1,75	23,8	A/A	A/G	A/A
31	PT	K	24	45	1,67	16,1	G/G	A/G	A/A
32	CA	E	25	61	1,60	23,8	A/A	A/G	A/G
33	RA	E	23	95	1,84	28,1	A/G	A/G	A/A
34	AFM	E	22	88	1,84	26,0	G/G	A/G	A/A
35	AE	E	23	71	1,74	23,5	G/G	A/G	A/G
36	GÖ	K	22	44	1,55	18,3	G/G	A/G	A/A
37	İE	E	24	76	1,72	25,7	G/G	A/G	A/A
38	NY	K	22	46	1,6	18,0	G/G	A/G	A/A
39	İG	E	23	73	1,77	23,3	G/G	A/G	A/A
40	FÖ	K	23	50	1,58	20,0	G/G	G/G	A/A
41	EÖ	E	25	75	1,7	26,0	A/A	G/G	A/G
42	EOÖ	E	23	83	1,86	24,0	G/G	G/G	A/A
43	EÇ	K	22	47	1,64	17,5	G/G	G/G	A/A
44	MS	E	23	91	1,84	26,9	A/G	G/G	A/A
45	EK	E	23	76	1,91	20,8	G/G	–	A/A

***BMI (Body Mass Index, Vücut Kitle İndeksi) : kg/m^2**

Tablo 4-2'nin devamı.

ÖRN.NO	AD/SOYAD	CİNSİYET	YAŞ	KİLO	BOY (m)	BMI*	FMO3*1	FMO3*2	FMO3*3
46	GS	K	23	62	1,65	22,8	A/G	G/G	A/A
47	YG	K	22	55	1,66	20,0	G/G	G/G	A/A
48	NC	E	23	66	1,82	19,9	G/G	G/G	A/A
49	NC	E	23	65	1,73	21,7	G/G	G/G	A/A
50	MK	E	24	80	1,7	27,7	A/G	G/G	A/A
51	OM	E	23	64	1,8	19,8	G/G	G/G	A/A
52	AK	E	24	72	1,81	22,0	A/G	A/A	A/A
53	UA	E	23	65	1,79	20,3	G/G	G/G	A/A
54	HT	E	23	77	1,84	22,7	G/G	G/G	A/A
55	İHG	E	24	76	1,85	22,2	G/G	A/G	A/A
56	MTA	E	24	71	1,67	25,5	G/G	A/G	A/A
57	RFA	E	25	84	1,84	24,8	G/G	A/G	A/A
58	TY	E	25	76	1,85	22,2	G/G	G/G	A/A
59	BMT	E	25	73	1,73	24,4	–	G/G	A/A
60	ZNÇ	K	22	65	1,66	23,6	–	G/G	A/A
61	DÇ	E	25	79	1,78	20,3	G/G	G/G	A/G
62	YA	E	22	75	1,83	22,4	G/G	G/G	A/A
63	HS	K	24	56	1,64	20,8	G/G	G/G	A/A
64	EK	E	24	61	1,68	21,6	G/G	G/G	A/A
65	SK	K	20	56	1,57	22,7	–	G/G	A/G
66	ZT	K	22	42	1,6	16,4	G/G	G/G	A/A
67	AC	E	22	65	1,75	21,2	G/G	G/G	A/G
68	FT	K	22	49	1,63	18,4	G/G	A/G	A/A
69	VE	E	22	58	1,71	19,8	G/G	G/G	A/A
70	BKÇ	E	25	88	1,85	25,7	G/G	G/G	A/A
71	AEL	E	24	88	1,85	25,7	G/G	G/G	A/A
72	OB	E	24	80	178	0,0	G/G	G/G	A/A
73	RA	E	23	78	178	0,0	A/G	G/G	A/A
74	MYD	E	24	89	1,87	25,5	A/G	G/G	A/A
75	RŞ	E	25	73	1,73	24,4	G/G	A/G	A/A
76	VT	E	23	73	1,73	24,4	G/G	G/G	A/A
77	BK	E	27	87	1,8	26,9	G/G	A/G	A/A
78	AA	E	23	78	1,7	27,0	G/G	G/G	A/A
79	HD	E	22	65	1,7	22,5	G/G	G/G	A/A
80	MG	E	23	90	1,8	27,8	G/G	A/G	A/A
81	BK	E	25	77	1,78	24,3	G/G	G/G	A/A
82	RU	K	65	50	1,5	22,2	G/G	A/G	A/A
83	AHE	E	33	60	1,72	20,3	G/G	A/G	A/A
84	GKK	K	25	56	1,6	21,9	G/G	G/G	A/G
85	GS	K	26	55	1,65	20,2	G/G	–	A/A
86	EG	E	30	70	1,7	24,2	G/G	G/G	A/A
87	ZT	K	35	64	1,65	23,5	G/G	G/G	A/A
88	ŞE	E	65	90	1,85	26,3	G/G	A/G	A/G
89	YO	E	34	70	1,75	22,9	G/G	A/G	A/G
90	SÖ	E	50	80	1,75	26,1	G/G	A/G	A/G

***BMI (Body Mass Index, Vücut Kitle İndeksi) : kg/m^2**

Tablo 4-2'nin devamı.

ÖRN.NO	AD/SOYAD	CİNSİYET	YAŞ	KİLO	BOY (m)	BMI*	FMO3*1	FMO3*2	FMO3*3
91	DI	E	46	80	1,7	27,7	G/G	G/G	A/A
92	DA	E	45	80	1,7	27,7	G/G	A/G	A/A
93	AK	E	65	85	1,75	27,8	G/G	A/G	A/A
94	DEK	K	65	60	1,6	23,4	G/G	A/G	A/A
95	FN	K	60	60	1,65	22,0	–	–	A/A
96	YN	E	49	70	1,9	19,4	G/G	A/G	A/G
97	FB	E	46	80	1,85	23,4	G/G	–	A/A
98	HE	E	40	75	1,85	21,9	G/G	G/G	A/A
99	HA	E	48	90	1,9	24,9	G/G	–	A/G
100	MA	E	62	56	1,7	19,4	A/G	G/G	A/A
101	MA	E	55	75	1,7	26,0	G/G	G/G	A/A
102	ZG	K	50	65	1,55	27,1	G/G	G/G	A/A
103	PK	K	30	52	1,6	20,3	G/G	–	A/A
104	BÇ	K	65	70	1,65	25,7	G/G	A/G	G/G
105	VT	E	56	80	1,8	24,7	G/G	A/G	A/G
106	BK	E	35	70	1,75	22,9	G/G	G/G	A/A
107	EK	E	65	65	1,85	19,0	G/G	A/G	A/G
108	MB	E	65	95	1,9	26,3	G/G	A/G	A/A
109	ÖS	E	57	68	1,8	21,0	G/G	A/G	A/A
110	EÇ	K	31	43	1,67	15,4	G/G	A/G	A/A
111	OD	E	32	80	1,95	21,0	A/G	G/G	A/G
112	YZB	K	65	70	1,72	23,7	G/G	A/G	A/A
113	NB	K	50	60	1,62	22,9	A/G	G/G	A/A
114	BT	K	52	64	1,65	23,5	G/G	G/G	A/A
115	MK	K	45	50	1,5	22,2	G/G	–	A/G
116	KŞ	K	52	54	1,65	19,8	G/G	A/G	A/G
117	ÖB	K	23	55	1,64	20,4	G/G	A/G	G/G
118	RB	E	54	81	1,6	31,6	G/G	G/G	A/G
119	FB	E	65	80	1,8	24,7	G/G	A/G	A/G
120	HA	E	65	75	1,78	23,7	G/G	–	A/A
121	ŞE	E	65	65	1,9	18,0	G/G	G/G	A/A
122	SŞ	E	65	60	1,86	17,3	G/G	A/G	A/A
123	MN	K	29	65	1,5	28,9	G/G	A/G	A/A

***BMI (Body Mass Index, Vücut Kitle İndeksi) : kg/m^2**

SNP'ler için Hardy-Weinberg Eşitliği kullanılarak gözlenen ve beklenen değerler belirlendi ve genotip frekanslarının eşitliğe uygunluğunu kontrol etmek için ki-kare testi kullanıldı. Gözlenen genotip dağılımlarının Hardy-Weinberg dengesinde olup olmadığı incelendiğinde, FMO3 genine ait her 3 SNP içinde popülasyonun dengede olduğu saptanmıştır. Serbestlik derecesi 1 iken p=0.05 seviyesi için verilen kritik değer 4'tür. Buna göre ki-kare testi analiz sonuçları her 3 SNP içinde <4 olduğundan gözlenen ve beklenen genotip sıklıkları arasındaki farkların istatistiksel olarak önemli olmadığı tespit edilmiştir (Tablo 4-3, 4-4, 4-5).

Tablo 4-3. FMO3 V257M varyasyonuna ait frekanslar

FMO3 V257M	Gözlenen frekans n (%)	Beklenen frekans n (%)	χ^2	p
***1.1/*1.1 (Val/Val) (G/G)**	99 (83.2)	95.3 (79.83)	0.223	0.075
***1.1/*1.2 (Val/Met) (G/A)**	15 (12.6)	22.04 (18.52)		
***1.2/*1.2 (Met/Met) (A/A)**	5 (4.2)	19.3 (1.2)		

Tablo 4-4. FMO3 E158K varyasyonuna ait frekanslar.

FMO3 E158K	Gözlenen frekans n (%)	Beklenen frekans n (%)	χ^2	p
***2.1/*2.1 (Glu/Glu) (G/G)**	63 (54.8)	66.4 (57.74)	0.543	0.122
***2.1/*2.2 (Glu/Liz) (G/A)**	49 (42.6)	41.8 (36.4)		
***2.2/*2.2 (Liz/Liz) (A/A)**	3 (3)	6.6 (5.7)		

Tablo 4-5. FMO3 E308G varyasyonuna ait frekanslar.

FMO3 E308G	Gözlenen frekans n (%)	Beklenen frekans n (%)	χ^2	p
***3.1/*3.1 (Glu/Glu) (A/A)**	100 (81.5)	100.2 (80.8)	0.275	0.95
***3.1/*3.2 (Glu/Gli) (A/G)**	21 (16.9)	21.5 (18.2)		
***3.2/*3.2 (Gly/Gli) (G/G)**	2 (1.6)	1.3 (1.1)		

Yukarıda bildirilen tablolarda görüldüğü üzere, çalışma grubunda FMO3*1 için yaygın tip (wild) homozigot (G/G) genotipine %83.2; heterozigot (A/G) genotipine %12,6 oranında rastlanırken, nadir tip (mutant) homozigot A/A genotipi % 4.2 oranında tespit edilmiştir. FMO3*2 için ise heterozigot A/G genotipi %42.6, mutant tip homozigot olan A/A genotipi %0.3, wild tip homozigot olan G/G genotipi % 54.8 oranında gözlemlenmiştir. FMO3*3 için ise wild homozigot tip olan A/A genotipi %81.5, heterozigot A/G genotipi %16.9 ve mutant homozigot tip G/G genotipi % 1.6 oranında bulunmuştur.

Ayrıca her 3 SNP'in alel frekanslarının rapor edildiği Tablo 4-6'da da belirtildiği üzere FMO3 aktivitesinde azalmaya sebep olan 257M, 158K ve 308G alelleri Türk popülasyonundan oluşan çalışma grubundaki sıklıkları sırasıyla 0.105, 0.239 ve 0.101 olarak gözlemlenmiştir.

Tablo 4-6. FMO3 genine ait 3 adet SNP için alel frekansları.

	FMO3*1 V257M	FMO3*2 E158K	FMO3*3 E308G
Örnek sayısı ; n	119	115	123
Alel sıklığı ; n (%)			
A	25 (10.5)	55 (23.9)	221 (89.9)
G	213 (89.5)	175 (76.1)	25 (10.1)
Tayin edilemeyen	5	9	0

Son olarak, çalışılan örneklerde V257M, E158K ve E308G haplotipleri tespit edilmiş ve bu haplotipler sıklıklarıyla beraber Tablo 4-7'de açıklanmıştır. Buna göre çalışılan Türk popülasyonunda en sık görülen haplotip VEE (0.600 ± 0.008) haplotipi; en nadir görüleni ise MEG (0.010 ± 0.004) haplotipidir.

Tablo 4-7. Çalışılan örneklerde tespit edilen haplotipler (sırasıyla, V257M, E158K ve E308G) ve sıklıkları.

	Haplotip	Frekansı (±Standart sapma)
1	MKE	0.022 ± 0.006
2	MKG	0.030 ± 0.003
3	MEE	0.080 ± 0.006
4	MEG	0.010 ± 0.004
5	VKE	0.200 ± 0.009
6	VKG	0.030 ± 0.007
7	VEE	0.600 ± 0.008
8	VEG	0.060 ± 0.007

5. TARTIŞMA

Endojen substratlarının yanı sıra klinik açıdan önemli bazı ilaçların ve ksenobiyotiklerin metabolizmasından sorumlu olan FMO'lar, nükleofilik yapılara oksijen katarak onları daha polar ve zararsız metabolitlerine dönüştürürken aynı zamanda toksikolojik açıdan aktif ürünlerin oluşmasına da sebebiyet verebilirler. Bugüne kadar insanda yapısı açıklanan 6 adet FMO geninin (FMO1–6) 6. formu hariç diğerleri fonksiyonel olarak aktif bulunmuştur. Belirli tür ve dokulara spesifik olan FMO alt ünitelerinin fonksiyonel özellikleri hakkında bilgiler sınırlı olmasına rağmen, FMO gen varyasyonlarının polimorfizme bağlı olarak ortaya çıkan aktivite değişikliklerinin, enzim substratı olan ilaçlara bağlı advers reaksiyonların ve ilaç dışı ksenobiotiklerin toksik etki potansiyellerinin oluşumunda önemli rol oynadığı bilinmektedir.

İnsanda ilaç ve diğer ksenobiotiklerin karaciğerdeki esas metabolizmalarından sorumlu olan FMO formu, FMO3'tür. Günümüzde FMO3 için 40 genetik varyasyon karakterize edilmiş olup, bunlardan bazıları sadece tek nükleotid değişikliğidir ve bir kısmının enzim aktivitesi üzerine etkili olduğu tespit edilmiştir. FMO3 varyasyonları içerisinde, özellikle etnik popülasyonlar ve bireyler arasında oldukça farklılık gösteren alelik frekansları >%1 olan E158K, V257M ve E308G SNPleri enzim aktivitesi üzerinde etkilidirler.

Hao ve arkadaşları tarafından 250 Çinli ve 50 Afroamerikan bireyde gerçekleştirilen genotip analizinde minör alel frekanslar, Çinlilerde 0.229 (E158K), 0.203 (V257M) ve 0.148 (E308G) iken; Afroamerikanlarda 0.48 (E158K), 0.05 (V257M) ve 0 (E308G) olarak belirlenmiş, ilaç dozlarının ayarlanmasında ve hastalık proseslerinin değerlendirilmesinde bu genlerin göz önünde tutulması gerektiği vurgulanmıştır (Hao ve ark. 2007).

FMO3 enziminin fonksiyonel bölgeleri 2. ve 5. ekzonlar tarafından kodlandığından bu bölgelere yakın bölgelerdeki SNP varyasyonları enzim aktivitesi üzerinde etkilidir (Treacy ve ark. 1998, Cashman ve ark. 2001, Cashman ve Zhang 2002). Bu sebeple 6.ekzondaki V (Val) $\Rightarrow$ M (Met), 4.ekzondaki E (Glu) $\Rightarrow$ K (Lys), 7. ekzondaki E (Glu) $\Rightarrow$ G (Gly) varyasyonları aktif varyasyonlardır. *Shimizu ve arkadaşları* tarafından Japon popülasyonunda yapılan çalışmada 2 yeni SNP

(21254C>A, 24006 A>G) tespit edilmiş ve bu SNP'lerin 5. ve 6. ekzonlarda olması sebebiyle enzim aktivitesinde azalmaya sebep olacağı bildirilmiştir (Shimizu ve ark. 2006). *Shimizu ve arkadaşları* tarafından yapılan diğer bir çalışmada ise 5.ekzonda bulunan Asp158Glu ve Arg205Cys aminoasit değişiminin trimetilaminürili Japon bireylerde yüksek oranda bulunduğu tespit edilmiştir (Shimizu ve ark. 2003). Fakat aynı SNP'ler beyaz ırkta gözlemlenmemiştir (Dolphin ve ark. 1997a; Cashman ve Zhang 2002).

Türk popülasyonunda yaygın olarak görülen genotipler açısından çalışma sonuçları değerlendirildiğinde alel frekanslarıyla orantılı olarak, V257M için homozigot GG genotipinin, E158K için homozigot GG genotipinin, E308G için homozigot AA genotipinin; sırasıyla %83.2, %54.8 ve %81.5 görülme sıklıklarıyla en yaygın genotipler olduğu görülmüştür.

Çalışmada ayrıca, Türk popülasyonuna ait genotip frekanslarıyla bazı popülasyonlarda gerçekleştirilen genotipleme sonuçları karşılaştırılmıştır (Tablo 5-1). Türk popülasyonunun sadece FMO3*1 genotip frekansı açısından Asya popülasyonundan farklı olduğu, buna karşılık FMO3*3 genotip frekansı açısından gerek beyaz ırk gerekse de diğer popülasyonlarla aralarında bir farklılık olmadığı tespit edilmiştir. FMO3*2 varyasyonu için istatistiksel olarak sadece Asyalılara benzerlik gösterse de genel olarak bakıldığında gerek beyaz ırk gerekse de Asya ırkında Türk popülasyonunda olduğu gibi G (E158) aleli en sık, A (158K) aleli ise en nadir görülen formlardır.

Tablo 5-1. Bazı popülasyonlarda FMO3 gen frekanslarının dağılımı ve çalışma sonuçları ile kıyası – Cashman ve ark. (2001)'den

SNP	Popülasyon	Birey sayısı	Genotip frekansı			Çalışmadaki Türk popülasyonu			Anlamlı fark
			GG	AG	AA	GG	AG	AA	
FMO3*1	Beyaz ırk	179	0.86	0.13	0.01	0.83	0.13	0.04	yok
(V257M)	Afrikalı	90	0.87	0.13	0.00				yok
GTG -> ATG	Asyalı	66	0.61	0.39	0.00				var
Valin-Metionin	İspanyol	85	0.85	0.15	0.00				yok
V-M	Pasifik	48	0.75	0.25	0.00				yok
			GG	AG	AA	GG	AG	AA	
FMO3*2	Beyaz ırk	179	0.39	0.44	0.17	0.55	0.42	0.03	var
(E158K)	Afrikalı	90	0.33	0.52	0.14				var
GAG -> AAG	Asyalı	66	0.71	0.27	0.02				yok
Glutamat-Lösin	İspanyol	85	0.42	0.45	0.13				var
E-K	Pasifik	48	0.79	0.21	0.00				var
			AA	AG	GG	AA	AG	GG	
FMO3*3	Beyaz ırk	179	0.72	0.24	0.05	0.81	0.18	0.01	yok
(E308G)	Afrikalı	90	0.92	0.08	0.00				yok
GAG -> GGG	Asyalı	66	0.73	0.20	0.02				yok
Glutamat-Glisin	İspanyol	85	0.78	0.20	0.02				yok

*anlamlılık, student t-test (paired-samples t-test) ile belirlendi Gruplarda korelasyon >0,9 ve p<0,1 farklılık gözlenenler için "anlamlı fark var" olarak kaydedildi.

E158K, E308G ve V257M alelleri birbirleriyle ilişkili oldukları gibi aynı zamanda haplotipler içerisinde de sıklığın en yüksek olduğu rapor edilmiştir (Zhou ve Shephard 2006). Gerek birey bazında gerekse de popülasyon bazında, çevresel ksenobiotiklere ve advers ilaç reaksiyonlarına karşı hassasiyet durumlarının değerlendirilmesinde SNP'ler tek başlarına etkili olabildikleri gibi haplotipler de oldukça önemlidirler (Koukouritaki ve ark. 2005). *Koukouritaki ve arkadaşları* tarafından 201 Latin Amerikan, 201 Afroamerikan ve 200 Beyaz ırk üzerinde FMO3 genine ait SNP ve haplotip analiz çalışmasında; -2650C>G, -2543T>A ve -2177G>C den oluşan haplotipin FMO3 promotor aktivitesini 8 kat arttırdığı, 3 popülasyon için de FMO3 ekspresyonunda ve FMO3 tarafından metabolize olan ksenobiotiklerin metabolizmasında etkili oldukları rapor edilmiştir (Koukouritaki ve ark. 2007). *Hao ve arkadaşları* tarafından 256 adet Çinlide E158K, V257M ve E308G yaygın polimorflar için haplotip ve bağlantı analizi yapılmış ve elde edilen sonuçlar *Furnes ve arkadaşları* tarafından 50 kişilik Afroamerikalı grupta yapılan çalışma ile kıyaslanmıştır. EVE, KVE, EME, ve EVG

haplotipinin Çinlilerde, EVE ve KVE'nin Afroamerikalılarda major haplotip olduğunu bildirmişlerdir. Bu şekilde elde edilen verilerin, hastalık prosesleri ile ilişkinin belirlenmesinde, ilaç dozaj ayarı ve farmakogenetik çalışmalarda kullanımlarının yararlı olacağı vurgulanmıştır (Hao ve ark. 2006, Furnes ve ark. 2003). Benzer sonuçların elde edildiği *Cashman ve arkadaşları* tarafından yapılan çalışmadaki toplam 420 bireyde sırasıyla E158K, V257M ve E308G bölgelerindeki 3 polimorfizmin haplotip sıklığı tabloda belirtilmiştir (Tablo 5-2) (Cashman ve ark. 2001).

Tablo 5-2. FMO3' ait 3 adet SNP (sırasıyla, E158K, V257M ve E308G) için farklı popülasyonlardaki haplotip sıklıkları.

Haplotip*	Beyaz ırk (n=179)	Afrikalı (n=90)	Asyalı (n=66)	Latin (n=85)
EVE	0.534	0.522	0.652	0.571
KVE	0.229	0.372	0.008	0.235
EME	0.073	0.067	0.197	0.071
KVG	0.165	0.033	0.014	0.112
EVG	0	0.006	0	0.006

*Haplotiplerin isimlendirilmesinde örneğin; EVE haplotipi 158E-237V-308E ifade eder.

Türk popülasyonunda yapmış olduğumuz çalışmada sırasıyla V257M, E158K, E308G SNPleri için; VEE (GGA) yaygın haplotip olarak belirlenmiş ve diğer araştırmacılar tarafından elde edilen verilerle benzerlik göstermiştir (Cashman ve ark. 2001; Furnes ve ark. 2003; Hao ve ark 2006).

Çeşitli ırklar hatta alt popülasyonlar arasında bile farklılıklar gösteren FMO3 varyasyonları birçok ülkede araştırılmış olmasına rağmen Türk popülasyonunda henüz araştırılmamış olduğundan; çalışma ile elde edilen sonuçların bu konudaki eksiğin tamamlanmasına, Türk popülasyonu ile diğer ırklar arasında FMO3 geni açısından farklılık bulunup bulunmadığının değerlendirilmesine katkı sağlayacağı

düşünülmektedir. Ayrıca FMO3 promotor haplotiplerinin belirlenmesi FMO3 ekspresyonundaki bireysel farklılıkların aydınlatılmasına ve gelecekte polimorfik-spesifik hedef ilaç dizaynı ile ilgili çalışmalara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

Adali, O., Carver, G.C. ve Philpot, R.M. (1998). Modulation of human flavin-containing monooxygenase 3 activity by tricyclic antidepressants and other agents: Importance of residue 428. *Archives of Biochemistry and Biophyics,* ***358,*** 92–97.

Akerman, B.R., Lemass, H., Chow, L.M., Lambert, D.M., Greenberg, C., Bibeau, C. ve ark. (1999a). Trimethylaminuria is caused by mutations of the FMO3 gene in a North American cohort. *Molecular Genetics and Metabolism,* ***68,*** 24–31.

Akerman, B.R., Forrest, S., Chow, L., Youil, R., Knight, M. ve Treacy, S. (1999b). Two novel mutations of the FMO3 gene in a proband with trimethylaminuria. *Human Mutation*, ***13***, 376-379.

Alfieri, A., Malito, E., Orru, R., Fraaije, M.W. ve Mattevi, A. (2008). Revealing the moonlighting role of NADP in the structure of a flavin-containing monooxygenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, ***105***, 6572–6577.

Allerston, C.K., Vetti, H.H., Houge, G., Phillips, I.R., Shephard, E.A. (2009). A novel mutation in the flavin-containing monooxygenase 3 gene (FMO3) of a Norwegian family causes trimethylaminuria. *Molecular Genetics and Metabolism,* ***98****,* 198–202.

Athanasiu, L., Mattingsdal, M., Anna K., Brown, A., Gustafsson, O., Agartz, I. ve ark. (2010). Gene variants associated with schizophrenia in a Norwegian genome-wide study are replicated in a large Europ ean cohort. *Journal of Psychiatric Research,* baskıda.

Arseculeratne, G., Wong, A. K. C., Goudie, D.R., Ferguson, J. (2007). Trimethylaminuria (Fish-Odor Syndrome). *Archives of Dermatology,****143,*** 81-84

Ayesh, R., Al-Waiz, M., Crothers, M.J., Cholerton, S., Mitchell, S.C., Idle, J.R. ve ark. (1988). Deficient nicotine N-oxidation in two sisters with trimethylaminuria. *British Journal of Clinical Pharmacologyl.* ***25****, 664*-665.

Bae, S.Y., Choi, S.K., Kim, K.R., Park, C.S., Lee, S.K., Roh, H.K., Shin, D.W., Pie, J.E., Woo, Z.H., Kang, J.H. (2006). Effects of genetic polymorphisms of MDR1, FMO3 and CYP1A2 on susceptibility to colorectal cancer in Koreans. *Cancer Science*, ***97,*** 774–779.

Barshten, N. ve Elfarra, A.A. (2007). Formation of three *N*-acetyl-l-cysteine monoadducts and one diadduct by the reaction of *S*-(1,2-dichlorovinyl)-l-cysteine sulfoxide with *N*-acetyl-l-cysteine at physiological conditions: Chemical mechanisms and toxicological implications. *Chemical Reearch in Toxicology*, ***20***, 1563 -1569.

Borbas, T., Zhang, J., Cerny, M.A., Liko, I. ve Cashman, J.R. (2006). Investigation of structure and function of a catalytically efficient variant of the human flavin-containing monooxygenase form 3. *Drug Metabolism and Disposition, **34***, 1995–2002.

Cashman, J.R. (1995). Structural and catalytic properties of the mammalian flavin-containing monooxygenase. *Chemical Reearch in Toxicology*, ***8***, 166–181.

Cashman, J.R. (2004). The implications of polymorphisms in mammalian flavin-containing monooxygenases in drug discovery and development. *Drug Dicovery Today, **9**,* 575 - 581

Cashman, J.R., Akerman, B.R., Forrest, S.M. ve Treacy, E.P. (2000). Population-specific polymorphisms of the human FMO 3 gene: Significance for detoxication. *Drug Metabolism And Disposition*, ***28,*** 169-173.

Cashman, J.R., Bi. Y., Lin, J., Youil, R., Knight, M., Forrest, S. ve ark. (1997). Communication human flavin-containing monooxygenase form 3: cDNA expression of the enzymes containing amino acid substitutions observed in individuals with trimethylaminuria. *Chemical Reearch in Toxicology*, ***10,*** 837–841.

Cashman, J.R., Xiong, Y.N., Xu, L. ve Janowsky, A. (1999). N-oxygenation of amphetamine and methamphetamine by the human flavin-containing monooxygenase (form 3): Role in bioactivation and detoxication. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, ***288***, 1251-1260.

Cashman, J.R. ve Zhang, J. (2002). Interindividual differences of human flavin-containing monooxygenase 3: Genetic polymorphisms and functional variation. *Drug Metabolism and Disposition*, ***30***, 1043-1052.

Cashman, J.R., Zhang, J.L. ve Braun, A.J. (2001). Population distribution of human flavin-containing monooxygenase form 3: Gene polymorphisms. *Drug Metabolism And Disposition, **29***, 1629–1637.

Castro, G.D., Delgado de Layno, A.M., Constantini, M.H. ve Castro, J.A. (2002). Rat ventral prostate microsomal biotransformation of ethanol to acetaldehyde and 1-hydroxyethyl radicals: its potential contribution to prostate tumor promotion. *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenenesis*, **22**, 335–341.

Chalmers, R.A., Bain, M.D., Michelakakis, H., Zschocke, J. ve Iles, R.A. (2006). Diagnosis and management of trimethylaminuria (FMO3 deficiency) in children. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, ***29,*** 162–172.

Christensen, D. (1999). What's that smell. *The Weekly Newsmagazine of Science*, ***20***.

Chung, W. ve Cha, Y. (1997). Oxidation of caffeine to theobromine and theophylline is catalyzed primarily by flavin-containing monooxygenase in liver microsomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, ***235*****,** 685–688.

Demirdogen, B.C. ve Adali, O. (2005). Characterization and modulation by drugs of sheep liver microsomal flavin monooxygenase activity.*Cell Biochemistry and Function,* ***23***, 245–251

Devrim, A.K. ve Kaya, N. (2004). Polimeraz zincir reaksiyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi,* ***10*****,** 209 – 214.

Dolan, C., Shields, D.C., Stanton, A., O'Brien, E., Lambert, D.M., O'Brien, J.K. ve ark. (2005). Polymorphisms of the flavin containing monooxygenase 3 (FMO3) gene do not predispose to essential hypertension in caucasians. *BMC Medical Genetics,* ***6*****,** 1-27.

Dolphin, C.T., Cullingford, T.E., Shephard, E.A., Smith, R.L. ve Phillips, I.R. (1996). Differential developmental and tissue-specific regulation of expression of the genes encoding three members of the flavin-containing monooxygenase family of man, FMO1, FMO3 and FM04. *European Journal of Biochemistry*, **235**, 683–689.

Dolphin, C.T., Janmohamed, A., Smith, R.L., Shephard, E.A. ve Phillips, I.R. (1997a). Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. *Nature Genetics,* ***17,*** 491–494.

Dolphin, C.T., Janmohamed, A., Smith, R.L., Shephard, E.A. ve Phillips, I.R. (2000). Compound heterozygosity for missense mutations in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene in patients with fish-odour syndrome. *Pharmacogenetics,* ***10,*** 799–807.

Dolphin, C.T., Riley, J.H., Smith, R.L., Shephard, E.A. ve Phillips, I.R. (1997b). Structural organization of the human flavin-containing monooxygenase 3 gene (FMO3), the favored candidate for fish-odor syndrome, determined directly from genomic DNA. *Genomics,* ***46***, 260–267.

Eroglu F. (2008). Kutanöz leyişmanyozlu hastalarda etken türlerin PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanması. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Parazitoloji Anabilim Dalı, Adana.

Eswaramoorthy, S., Bonanno, J.B., Burley, S.K. ve Swaminathan, S. (2006). Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *New York Structural Biology Center Pharmaceuticals,* ***103***, 9832–9837.

Fujieda, M., Yamazaki, H., Togashi, M., Saito, T. ve Kamataki, T. (2003). Two novel single nucleotide polymorphisms of the FMO3 gene in Japanese. *Drug Metabolism and Disposition,* ***18****,* 333 – 335.

Fung, M.M., Nguyen, C., Mehtani, P., Salem, R.M., Brenda, B.P., Madhusudan Das, T. ve ark. (2008). Genetic Variation Within Adrenergic Pathways Determines In Vivo Effects of Presynaptic Stimulation in Humans. *Circulation* **, *117***, 517–525

Furnes, B., Feng, J., Sommer, S.S. ve Schlenk, D. (2003). Identification of novel variants of the flavin-containing monooxygenase gene family in African Americans. *Drug Metabolism and Disposition,* ***31****,* 187–93.

Hajjar, N.P. ve Hodgson, E. (1980). Flavin adenine dinucleotide–dependent monooxygenase: its role in the sulfoxidation of pesticides in mammals. *Science (Wash DC),* ***209***, 1134–1136.

Hamman, M.A., Haehner-Daniels, B.D., Wrighton, S.A., Rettie, A.E. ve Hall, S.D. (2000). Stereoselective sulfoxidation of sulindac sulfide by flavin-containing monooxygenases comparison of human liver and kidney microsomes and mammalian enzymes. *Biochemical Pharmacology*, ***60***, 7–17.

Hao D.C., Sun J., Furnes, B., Schlenk, D., Hou, ZF., Zhang, Y.P. ve ark. (2006). Haplotype frequency distribution and linkage disequilibrium analysis of single nucleotide polymorphisms at the human FMO3 gene locus. *Biochemical Genetics*, ***44***, 391-407.

Hao, D., Sun, J., Furnes, B., Schlenk, D., Li M., Yang, S. ve ark. (2007). Allele and genotype frequencies of polymorphic FMO3 gene in two genetically distinct populations cell biochemistry and function. *Cell Biochemistry and Function*, ***25,*** 443–453.

Hernandez, D., Addou, S., Lee, D., Orengo, C., Shephard, E.A. ve Phillips, I.R. (2003). Trimethylaminuria and a human FMO3 mutation. *Human Mutation*, ***22***, 209-213.

Hisamuddin, I.M., Wehbi, M.A., Schmotzer, B., Easley, KA, Hylind, L.M., Giardiello, F.M. ve ark. (2005). Genetic polymorphisms of flavin monooxygenase 3 in sulindac-induced regression of colorectal adenomas in familial adenomatous polyposis. *Cancer Epidemiology Biomarkers*, ***14***, 2366–2369.

Hisamuddin, I.M., Wehbi, M.A., Hadley A.C., Hylind, W., Yang, F.M. ve Giardiello, V.W. (2004). Genetic polymorphisms of human flavin monooxygenase 3 in sulindac-mediated primary chemoprevention of familial adenomatous polyposis. *Clinical Cancer Research, **10**,* 8357–8362.

Itagaki, K.C., Geraldine, T.P. ve Richard, M. (1996). Expression and caracterization of a modified flavin-containing monooxygenase 4 from humans. *Journal of Biological Chemistry*, ***271***, 20102–20107.

Janmohamed, A., Dolphin, C.T., Phillips, I.R. ve Shephard, E.A. (2001). Quantification and cellular localization of expression in human skin of genes encoding flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450. *Biochemical Pharmacology*, ***62***, 777–786.

Kang, J.H., Chunga, W.G., Lee, K.H., Park, C.S., Kang, J., Shin, I. ve ark. (2000). Phenotypes of flavin-containing monooxygenase activity determined by ranitidine *N*-oxidation are positively correlated with genotypes of linked FMO3 gene mutations in a Korean population. *Pharmacogenetics, **10***, 67 – 68.

Klick, D.E., Shadley, J.D. ve Hines, R.N. (2008) Differential regulation of human hepatic flavin containing monooxygenase 3 (FMO3) by CCAAT/enhancer-binding protein b (C/EBPb) liver inhibitory and liver activating proteins. *Departments of biochemical pharmacology, **7 6,*** 268 - 278.

Koukouritaki, S.B., Poch, M.T., Cabacungan, E.T., McCarver, D.G. ve Hines, R.N. (2005). Discovery of novel flavin-containing monooxygenase 3 (*FMO3*) single nucleotide polymorphisms and functional analysis of upstream haplotype variants. *Molecular Pharmacology,* ***68***, 383 – 393.

Koukouritaki, S.B., Poch, M.T., Henderson, M.C., Siddens, L.K., Krueger, S.K., Vandyke, J.E. ve ark. (2007). Identification and functional analysis of common human flavin-containing monooxygenase 3 genetic variants. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, ***320***, 266-273.

Kousba, A., Soll, R.Y. ve Shiyin, M.M. (2007). Cyclic conversion of the novel SRC kinase inhibitor [7-(2,6- dichloro-phenyl)-5-methyl-benzo[1,2,4]triazin-3-yl]-[4-(2-pyrrolidin-1-yl-ethoxy)-phenyl]-amine (TG100435) and its *N*-oxide metabolite by flavin-containing monoxygenases and cytochrome P450 reductase. *Metabolism and Disposition,* ***35***, 2242–2251.

Krause, R.J., Lash, L.H. ve Elfarra, A.A. (2003). Human kidney flavin-containing monooxygenases and their potential roles in cysteine *S*-conjugate metabolism and nephrotoxicity. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics,* ***304***, 185–191.

Krueger, S.K. ve David, E.W. (2005). Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacology and Therapeutics,* ***106,*** 357– 387.

Lang, D.H., Yeung, C.K., Peter, R.M., Ibarra, C.,Gasser, R., Itagaki, K. ve ark. (1998). Isoform specicity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes. *Biochemical Pharmacology,* ***56,*** 1005-1012.

Lang, D.H. ve Rettie, A.E. (2000). In vitro evaluation of potential in vivo probes for human flavin-containing monooxygenase (FMO): metabolism of benzydamine and caffeine by FMO and P450 isoforms. *Journal of Clinical Pharmacology,* ***50,*** 311-314.

Lattard, V., Longin-Sauvageon, C., Lachuer, J., Delatour, P. ve Benoit, E. (2002). Cloning, sequencing, and tissue-dependent expression of flavin containing monooxygenase (FMO) 1 and FMO3 in the dog. *Drug Metabolism And Disposition,* ***30***, 119–128.

Lattard, V., Zhang, J., Tran, Q., Furnes, B., Schlenk ve Cashman J.R. (2003). Two new polymorphisms of the FMO3 gene in Caucasian and Africanamerican populations: Comparative genetic and functional studies. *Drug Metabolism and Disposition*, ***31***, 854-860.

Lattard, V., Zhang, J. ve Cashman, J.R. (2004). Alternative processing events in human *FMO* genes. *Moleculer Pharmacolog,*. ***65***, 1517–1525,

Lin, J., Berkman, C.E. ve Cashman, J.R. (1996). N-Oxygenation of primary amines and hydroxylamines and retroreduction of hydroxylamines by adult human liver microsomes and adult human flavin-containing monooxygenase 3. *Chemical Research Toxicology*, ***9*** , 1183-1193.

Lin, J. ve Cashman, J.R., (1997a). Detoxication of tyramine by the flavin-containing monooxygenases: Stereoselective formation of the trans-oxime. *Chemical Reearch in Toxicology, **10**,* 842–852

Lin, J. ve Cashman, J.R. (1997b). N-Oxygenation of phenethylamine to the trans-oxime by adult human liver flavin-containing monooxygenase and retroreduction of phenethylamine hydroxylamine by human liver microsomes. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, ***282**,* 1269–1279.

Majano, P.L., Garcia-Monzon, C., Lopez-Cabrera, M., Lara-Pezzi, E., Fernandez-Ruiz, E., Garcia-Iglesias, C. ve ark. (1998). Inducible nitric oxide synthase expression in chronic viral hepatitis. Evidence for a virus-induced gene upregulation. *Journal of Clinical Investigation*, **101,** 1343–1352.

Mitchell, S., Ayesh, R., Barrett, T. ve Smith, R. (1999). Trimethylamine and foetor hepaticus. *Scandinavian Journal of Gastroenterology, **34***, 524–528.

Murphy, H.C., Dolphin, C.T., Janmohamed, A., Holmes, H.C., Michelakakis, H., Shephard, E.A., ve ark. (2000). A novel mutation in the flavin-containing monooxygenase 3 gene, FMO3, that causes fish-odour syndrome: activity of the mutant enzyme assessed by proton NMR spectroscopy. *Pharmacogenetics* **10:**439–451.

Phillips, I.R. ve Shephard, E.A. (2008). Flavin-containing monooxygenases: mutations, disease and drug response. *Trends in Pharmacological Sciences, **29**,* 294 – 301.

Overby, L.H., Carver, G.C. ve Philot, R.M. (1997). Quantitation and kinetic properties of hepatic microsomal and recombinant flavin-containin monooxygenases 3 and 5 from humans. *Chemico-Biological Interactions,* ***106,*** 29 – 45.

Park, C.S., Baek, H.M., Chung, W.G., Lee, K.H., Ryu, S.D. ve Cha, Y.N. (1999). Suppression of flavin-containing monooxygenase by overproduced nitric oxide in rat liver. *Molecular Pharmacology,* ***56***, 507–514.

Rodriguez, R.J. ve Miranda, C.L. (2000). Isoform specificity *N*-deacetyl ketoconazole by human and rabbit flavin-containing monooxygenases. *Drug Metabolism and Disposition,* ***28,*** 1083–1086.

Ryu, S.D., Hyeon, G.Y., Cha, Y.N., Kang, J.H, Kang, J.S., Jeon, Y.C. ve ark. (2004). Flavin-containing monooxygenase activity can be inhibited by nitric oxide-mediated S-nitrosylation. *Life Sciences,****75***, 2559–2572.

Sachse, C., Ruschen, S., Dettling, M., Schley, J., Bauer, S., Muller-Oerlinghausen, B. ve ark. Flavin monooxygenase 3 (FMO3) polymorphism in a white population: allele frequencies, mutation linkage, and functional effects on clozapine and caffeine metabolism. (1999). *Clinical Pharmacology Therapeutics,* ***66***, 431–438.

Shimizu, M., Cashman, J.R. ve Yamazaki, H. (2007). Transient trimethylaminuria related to menstruation. *BMC Medical Genetic,* ***8,*** 1 – 4.

Shimizu, M., Fujita, H., Aoyama, T. ve Yamazaki, H. (2006). Three novel single nucleotide polymorphisms of the fmo3 gene in a Japanese population. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, ***21***, 245-247.

Shimizu, M., Murayama, N., Nagashima, S., Fujieda, M. ve Yamazaki, H. (2008). Complex mechanism underlying transcriptional control of the haplotyped flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene in Japanese: Different regulation between mutations in 5-upstream distal region and common element in proximal region. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, ***23***, 54–58.

Shimizu, T., Ochiai, H., Asell, F., Shimizu, H., Saitoh, R., Hama, Y. ve ark.. (2003) Bioinformatics research on inter-racial difference in drug metabolism I. Analysis on frequencies of mutant alleles and poor metabolizers on CYP2D6 and CYP2C19. *Drug Metab Pharmacokinet,* **18,** 48–70.

Siddens, L.K., Henderson, M.C., VanDyke, J. E., Williams, D.E. ve Krueger, S.K. (2008). Characterization of mouse flavin-containing monooxygenase transcript levels in lung and liver, and activity of expressed isoforms. *Biochemical pharmacology,* ***75****,* 570 – 579.

Stormer, E., Brockmöller, J., Roots, I. ve Schmider, J**.** (2000). Cytochrome P-450 enzymes and FMO3 contribute to the disposition of the antipsychotic drug perazine in vitro. *Psychopharmacology*, ***151***, 312–320

Sumbul, A.T. (2008). Hepatosellüler karsinomali hastalarda p53 kodon72 ve MDM2 SNP309 gen polimorfizimlerinin sikliği ve tümöre ait karakteristiklerle karşılaştırılması. Uzmanlık tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Adana.

Szöko, E., Tabi, T., Borbas, T., Dalmadi, B., Tihanyi, K. ve Kalman, M. (2004). Assessment of the *N*-oxidation of deprenyl, methamphetamine, and amphetamine enantiomers by chiral capillary electrophoresis: An *in vitro* metabolism study. *Electrophoresis,* ***25****,* 2866–2875.

Treacy, E.P., Akerman, B.R., Chow, L.M.L., Youil1, R., Bibeau, C., Lin, J. ve ark. (1998). Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Human Molecular Genetics,* ***7***, 839–84.

Tricker, A.R. (2003). Nicotine metabolism, human drug metabolism polymorphisms, and smoking behaviour. *Toxicology*, ***183***, 151-173.

Yamazaki, H., Fujita, H., Gunji, T., Zhang, J., Kamataki, T., Cashman, J.R. ve ark. (2007). Stop codon mutations in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene responsible for trimethylaminuria in a Japanese population. *Molecular Genetics and Metabolism,* ***90***, 58–63.

Yauk, C.L., Jackson, K., Malowany, M. ve Williams, A.(2010). Lack of change in microRNA expression in adult mouse liver following treatment with benzo(a)pyrene despite robust mRNA transcriptional response. *Mutation Environmental Health Sciences and Research,* baskıda.

Yeung, C.K., Adman, E.T. ve Rettie, A.E. (2007). Functional characterization of genetic variants of human FMO3 associated with trimethylaminuria. *Archives of Biochemistry and Biophysics,* ***464***, 251–259

Zhang, J., Tran, Q., Lattard, V. ve Cashman, J.R. (2003). Deleterious mutations in the flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) gene causing trimethylaminuria. *Pharmacogenetics,* ***13,*** 49–50.

Zhou, J. ve Shephard, E.A. (2006). Mutation, polymorphism and perspectives for the future of human flavin-containing monooxygenase 3. *Mutation Research,* ***612***, 165–171.

Ziegler, D.M. (1990). Flavin-containing monooxygenases: Enzymes adapted for multisubstrate specificity. *Trends in Pharmacological Sciences, 11*, **321–324.**

Ziegler-Skylakakis, K., Nill, S., Pan, J.F. ve Andrae, U. (1998). S-oxygenation of thiourea results in the formation of genotoxic products. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, **31**, 362–373.

Zschocke, J., Kohlmuelle, D., Qua, E., Meissner, T., Hoffmann, G.F. ve Mayatapek, E. (1999). Mild trimethylaminuria caused by common variants in *FMO3* gene. *Lancet,* ***354*** , 834–835.

FORMLAR

F.2. GÖNÜLLÜLERİN (SAĞLIKLI) BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR (RIZA) FORMU

- "Türk popülasyonunda flavin içeren monooksijenaz 3 (FMO3) polimorfizmi" başlıklı çalışmaya 100 adet sağlıklı gönüllü katılacaktır.
- Sağlıklı gönüllüden bir defaya mahsus olarak yaklaşık 10 mililitre kan örneği alınarak steril tüplere aktarılacaktır.
- Sağlıklı gönüllünün, damardan kan alma işlemi için şırınganın kola girmesi esnasında oluşabilecek rahatsızlık (enjeksiyon yerinde ödem, kızarıklık) dışında, herhangi bir rahatsızlık veya riskle karşılaşması söz konusu değildir.
- Sağlıklı gönüllünün çalışmaya katılma süreci sadece kan örneğinin alımı ile sınırlıdır.
- Alınan kan örneğinden DNA (*genetik şifreyi oluşturan yapı*) izolasyonu yapılacaktır.
- DNA izolasyonunun ardından 4 adet gen (h*er canlının kendine özgü tüm karakterlerinden sorumlu olan birim*) üzerinde kişiler arası olası farklılıklar (*polimorfizm*) araştırılacaktır.
- Araştırılacak genler, kişilerde alkol metabolizmasında rol oynayan ve alkolizme yatkınlıktan sorumlu olduğu düşünülen FMO3 (Flavin monooksijenaz 3)genidir.**.**
- Çalışmada kullanılacak yöntemler; PCR *(Polimeraz Zincir Reaksiyonu)* ve RFLP *(Restriksiyon Fragman Uzunluk Polimorfizmi)* teknikleri.
- Yapılacak bu çalışma kişinin alkolizme yatkınlığı ile ilişkili genetik yapıya sahip olup olmadığını göstermektedir.
- Tüm veriler toplandıktan sonra istatiksel olarak değerlendirilecektir.
- Çalışmanın öngörülen süresi 1 yıldır.
- Çalışmanın bilime ve tıbba katkısı: Çok sayıda ilaç ve kimyasal maddenin vücutta değişikliğe uğraması ve atılmasından sorumlu olan FMO3 enzimi bireyler arası farklılık göstermektedir. Genetik olarak incelenecek olan bu farklılıkların belirlenmesi bu maddelere karşı oluşabilecek hassasiyet ve olumsuz reaksiyonların önceden belirlenmesini sağlayacaktır. Ayrıca bu çalışmanın gelecekte spesifik hedef ilaç yapımına yardımcı olacağı düşünülmektedir.
- Çalışmada sadece sağlıklı gönüllünün kanı kullanılacak, gönüllü üzerinde başka herhangi bir çalışma yapılmayacaktır.
- Toplanan örnekler uygun koşullarda saklanacak ve bu çalışma dışında kullanılması söz konusu olduğunda gönüllünün izni bilgilendirmek suretiyle alınacaktır.
- Sağlıklı gönüllü çalışma esnasındaki araştırma giderleri ile ilgili olarak herhangi bir parasal sorumluluk altına girmeyecek, bağlı olduğu sosyal güvenlik kuruluşuna da bir araştırma gideri yüklenmeyecektir. Sağlıklı gönüllüye bu konu ile ilgili herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.
- Araştırma ile ilgili tüm mali ve hukuki sorumluluklar araştırıcı ve destekçiye aittir.
- Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence sağlıklı gönüllüye verilecektir (bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak sağlıklı gönüllü parasal bir yük altına girmeyecektir).
- Sağlıklı gönüllü araştırmaya katılmak zorunda değildir. Sağlıklı gönüllü araştırma esnasında herhangi bir nedenle çalışma programından çıkabilir.
- İmzalı onay formunun bir kopyası sağlıklı gönüllüye verilecektir.

Sayın **Ecz. PınarTOPAL** tarafından İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Toksikoloji Anabilim Dalı'nda tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler hem yazılı hem de sözlü olarak bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" (denek) olarak davet edildim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim.
Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; araştırma ile ilgili aklıma takılan herhangi bir soru olduğunda; herhangi bir saatte **Dr. Selim BÖLÜKBAŞI İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi- 05327007939** telefon numarasından arayabileceğimi biliyorum.
Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" (denek) olarak yer alma kararını aldım. Bu koşullarla söz konusu araştırmaya kendi rızamla hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum.

- Gönüllünün Adı-soyadı, İmzası, Adresi (varsa telefon no., faks no,...)
  Ayrıca benden alınan kan örneğinin sorumlu araştırmacının bu çalışma dışında kullanmasını
  Kabul ediyorum: €
  Kabul etmiyorum: €
- Açıklamaları yapan araştırmacının Adı-soyadı, İmzası:
  Yrd. Doç. Dr. Gül ÖZHAN
- Rıza alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı-soyadı, İmzası, Görevi:
  Dr. Selim BÖLÜKBAŞI

ETİK KURUL KARARI

T.C.
İSTANBUL TIP FAKÜLTESİ
İSTANBUL 2 NO'LU KLİNİK ARAŞTIRMALAR
ETİK KURUL TUTANAĞI

Toplantı Tarihi : 04/11/2009
Toplantı Yeri : Behçet Kütüphanesi Etik Kurul Toplantı Salonu
Toplantı Sayısı : 04

Sorumlu araştırıcılığını Üniversitemiz Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teksikoloji Anabilim Dal Öğretim Üyesi Yrd.Doç.Dr. Gül ÖZHAN'ın üstlendiği ve Yüksek Lisans Öğrencisi Eczacı Pınar TOPAL'ın yürütecegi 2009/2733-59 protokol numaralı "Türk popülasyonunda flavin içeren monooksijenaz 3 (FMO3) gen polimorfizmi" başlıklı tez çalışması kurulumuzda incelendi.

Etik yönden bir sakınca taşımadığı görüldü, uygulamaya konulabileceğine karar verildi.

Prof.Dr. A. Yağız ÜRESİN
İ.Ü. Farmakoloji ve Klinik Far. A.D.
Etik Kurul Başkanı

Prof.Dr. Ayşen BULUT
Halk Sağlığı (Emekli)

Prof.Dr. Berrin UMMAN
İ.Ü. Kardiyoloji A.D. (Bşk. Yardımcısı)

Doç.Dr. Tufan TÜKEK
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. İç Hast.

Prof.Dr. Ahmet GÜL
İ.Ü. İç Hastalıkları A. D.

Prof.Dr. Ünal KUZGUN
Şişli Etfa Eğitim ve Araş. Hst. Ortopedi

Prof.Dr. Oğuzhan ÇOBAN
İ.Ü. Nöroloji A. D.

Prof.Dr. Ahmet O. ARAMAN
İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Eczacı

Prof.Dr. Pınar SAİP
İ.Ü. Onkoloji Enstitüsü

Prof.Dr. Demir TİRYAKİ
Oftalmolog (Emekli)

Prof.Dr. Rukiye Eker ÖMEROĞLU
İ.Ü. Çocuk Sağ. ve Hast. A. D.

Av. Dilek TEMİZ ÖZBEK
İstanbul Üniversitesi

Uzm.Dr. Ahmet Rıza URAS
Vakıf Gureba E. ve Araş. Hst. Biyokimya

M. Kerim AKMAN
İİBF İktisat Bölümü (Özel)

Doç.Dr. H. Hanzade DOĞAN
İ.Ü. Cerrahpaşa T.F. Deontoloji

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	PINAR	**Soyadı**	TOPAL
Doğ.Yeri	SAMSUN	**Doğ.Tar.**	19.03.1986
Uyruğu	TC	**TC Kim No**	71131020588
Email	eczpinartopal@hotmail.com	**Tel**	05362453252

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mez. Yılı**
Doktora	-	-
Yük.Lis.	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ FARMASÖTİK TOKSİKOLOJİ ANABİLİM DALI	2010
Lisans	İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ ECZACILIK FAKÜLTESİ	2008
Lise	SAMSUN FEN LİSESİ	2004

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	MESUL MÜDÜR	MARMARA GALENOS ECZA DEPOSU KOŞUYOLU ŞUBESİ	2009 - ?
2.	MESUL MÜDÜR	SAMUR ECZANESİ/ BAĞCILAR	2008 - 2009
3.	YARDIMCI ECZACI	SEMA UYSAL ECZANESİ	2008 - 2008

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***	**ÜDS Puanı**	**(Diğer) Puanı**
İngilizce	Çok iyi	orta	iyi	65	-

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	87.165	80.684	84.293
(Diğer) Puanı			

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft word	Iyi
Microsoft excel	iyi
Microsoft power point	Iyi

Yayınları/Tebligleri Sertifikaları/Ödülleri

-

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Sinema, tiyatro, koşmak, yüzmek, internet, müzikle ilgilenmek,fotoğraf çekmek, latin dansları.