

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI



**HBF VEYA HBA₂ ANORMALİĞİ OLAN BİREYLERDE KRUPPEL-LİKE
FACTOR 1 VE HEMOGLOBİN SUBÜNİT DELTA GENLERİNDEKİ
MUTASYONLARIN GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Taner KARAKAYA

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Çanakkale/2019

T.C.

ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

**HBF VEYA HBA₂ ANORMALLIĞI OLAN BİREYLERDE KRUPPEL-LİKE
FACTOR 1 VE HEMOGLOBİN SUBÜNİT DELTA GENLERİNDEKİ
MUTASYONLARIN GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Taner KARAKAYA

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Çanakkale/2019

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı uzmanlık eğitimi
çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Arş.Gör.Dr. Taner KARAKAYA'nın Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 05/07/2019

TEZ KONU BAŞLIĞI

"HbF veya HbA₂ anormalliği olan bireylerde Kruppel-like factor 1 ve Hemoglobin subunit delta genlerindeki mutasyonların genotip-fenotip ilişkisinin incelenmesi"

Tez Danışmanı: Prof.Dr. Öztürk ÖZDEMİR

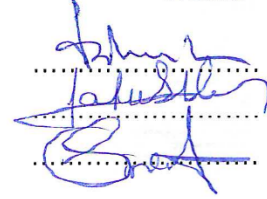
Tez Jürisi Üyeleri:
Adı Soyadı

Prof.Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Prof.Dr. Fatma SILAN


Dr.Öğr.Üyesi Sinem ATIK YALÇINTEPE

İmzası



ONAY:

Bu tez Anabilim/Bilim Dalı Akademik Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulunun 11.07.2019 tarih ve 2019.23-4 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.


Prof.Dr. Tamer DEMİR
Dekan

TEŞEKKÜR

Tıbbi Genetik uzmanlık eğitimim ve tez çalıőmalarım boyunca, her konuda bana sundukları destek ve değerli tavsiyeleri için ÇOMÜ Tıbbi Genetik Anabilim Dalı öğretim üyesi hocalarıma çok teşekkür ederim.

Tez çalıőmalarımın laboratuvar kısmında bana yardımlarını esirgemeyen ÇOMÜ Genetik Tanı ve Tedavi Merkezinin değerli çalıőanlarına da ayrıca teşekkür ederim.

Teőekkürlerin en büyüğüne layık olan, bugünlere gelmemde üzerimde karőılıksız emeği bulunan, beni koőulsuz seven değerli aileme, hayat ve yol arkadaőım biricik eőim Pelin KARAKAYA'ya ve dünyaya gelmesiyle bana eşsiz babalık duygusu yaőatan canımdan çok sevdiğim sevgili oğlum Poyraz Enes KARAKAYA'ya çok ama çok teşekkür ederim, iyiki varsınız...

Dr. Taner KARAKAYA

Temmuz 2019

**HBF VEYA HBA₂ ANORMALLIĞI OLAN BİREYLERDE KRUPPEL-LİKE
FACTOR 1 VE HEMOGLOBİN SUBUNİT DELTA GENLERİNDEKİ
MUTASYONLARIN GENOTİP-FENOTİP İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ
ÖZET**

GİRİŞ ve AMAÇ: Hemoglobinopatiler; hemoglobin proteininin biyokimyasal yapısını oluşturan globin zincirlerinden herhangi birisinin yapısının ya da sentezinin bozulduğu, tek gen hastalıklarının en sık görülenidir. Hemoglobinopatilerden birisi olan β -talasemi; β -globin zincir sentezinin yetersiz ya da olmaması ile karakterize, Türkiye'nin de içerisinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinde sık görülen önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dolayısıyla talasemi prevalansının yüksek olduğu bölgelerde talasemi önleme programlarının yürütülmesi oldukça önemlidir. Talasemi taramasında günümüzde ilk basamak yaklaşım; olguların tam kan sayımı analizlerinin yapılması, hematolojik parametrelerinde anormallik saptananların (örneğin; hipokromi, mikrositik anemi, eritrositoz gibi) ise takiben otomatize HPLC ya da kapiller elektroforez cihazı ile hemoglobin fraksiyonlarının analiz edilmesinden oluşur.

Talasemi taşıyıcılığı tespitinde hemoglobin elektroforezinin yeri çok önemli olmakla birlikte pek çok klinik durumda ölçülen HbF ve HbA₂ seviyelerinin değişiklik gösterdiği ve mevcut klinik durumla bu hemoglobin fraksiyon seviyelerinin uyumsuz olduğu rapor edilmiştir. HbA₂ seviyesini düşüren bu klinik sebeplerden bir tanesi de δ -globin (*HBD*) gen değişiklikleridir. *HBD* genindeki mutasyonların herhangi bir klinik Şikayet ya da hematolojik bulgu oluşturduğu bildirilmemiştir; ancak HbA₂ seviyesini düşürerek β -talasemi taşıyıcılarında yanlış tanıılara sebep olabilmektedir. Ayrıca demir eksikliği anemisi ya da α -talasemi taşıyıcılığı gibi düşük HbA₂ seviyesine neden olan durumların yanında *HBD* genindeki mutasyonların da sorumlu olduğu bilinmektedir.

HbF ve HbA₂ seviyeleri üzerine etkisi olan genlerden bir diğer de Kruppel-like factor 1 (*KLF1*) genidir. *KLF1* genindeki mutasyonların persiste HbF

yüksekliği ya da β -talasemi minör fenotipinden sorumlu olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur. Özellikle borderline seviyede HbA₂ yüksekliği olan bireylerde *HBB* geni intakt ise mutlaka *KLF1* geninin analiz edilmesi önerilmektedir.

Mevcut araştırmada, HPLC sonrası HbF yüksekliği ya da HbA₂ seviyesi anormalliği bulunan olgularda *KLF1* ya da *HBD* genlerinin olası bir rolünün olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM: Araştırma Mart 2013-Ağustos 2018 yılları arası Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genetik Tanı ve Tedavi Merkezine *HBB* geni analizi için başvurmuş toplam 100 kişi ile yürütülmüştür. Olgu grubu 20'şer kişiden oluşan dört alt gruba ayrılmıştır; HPLC ile yapılan hemoglobin elektroforezinde yalnızca HbF yüksekliği saptananlar Grup A, yalnızca borderline HbA₂ yüksekliği saptananlar Grup B, yalnızca borderline seviyesi üzerinde HbA₂ yüksekliği saptananlar Grup C ve yalnızca HbA₂ düşüklüğü saptananlar Grup D olarak tanımlanmıştır Araştırmada kontrol grubu olarak kendisinde ve/veya birinci derece akrabalarında talasemi öyküsü olmayan sağlıklı toplam 20 kişiye ait laboratuvarımızda mevcut olan DNA rnekleri kullanılmıştır. Araştırmaya dahil edilen olgu ve kontrol bireyelerine ait toplam 100 adet DNA rneği kullanılarak hedef *KLF1* ve *HBD* genleri analiz edilmiş ve karşılaştırılmıştır. Bunun için, hedef her bir gen için spesifik primer çifti kullanılarak PCR rnleri ağaltılmış ve bu ürünler sanger dizi analizi yöntemiyle dizilenerek mutasyon analizleri yapılmıştır. Genlere ait elde edilen baz profilleri yardımcı software programlar yardımıyla değerlendirilmıştir.

BULGULAR: Araştırma sonunda elde edilen veriler *KLF1* geni açısından değerlendirildiğinde; çalışılan olgu grubu bireyelerin 43'nde (%53,75; n=80) *KLF1* geninde mutasyon saptanırken (4 olguda *KLF1* geninde iki mutasyon birlikte saptanmıştır), 37'sinin (%46,25) normal yapıda oldukları ortaya konmuştur. Olgu grubunda saptanan beş farklı nokta mutasyon sırasıyla 41 kişide S102P mutasyonu (36'sı heterozigot, 5'i homozigot), bir olguda M39L heterozigot

mutasyonu, bir olguda P109S heterozigot mutasyonu, üç olguda F182L heterozigot mutasyonu ve bir olguda R268L heterozigot mutasyonudur. Kontrol grubunda altı kişide S102P heterozigot mutasyonu (%30; n=20) ve bir kişide P109S heterozigot mutasyonu (%5) saptanmıştır. Araştırma sonunda elde edilen veriler *HBD* geni açısından değerlendirildiğinde; Olgu grubunda 19 olguda (%23,75; n=80) dört farklı varyasyon tespit edilmiş; bunların üçü daha önce literatürde tanımlanmıştır [(12 olguda (%15; n=80) HbA2-Yialousa, beş olguda (%6,25) HbA2-Bornova ve bir olguda (%1,25) HbA2-Yokoshima)]. Araştırmamız kapsamında çalışılan olgulardan sadece birisinde saptanan "Delta 10(A7) Ala-->Val; HBD:c.32C>T" nokta mutasyonu ilk kez bu araştırmada tanımlanmıştır. *HBD* geninde mutasyon sadece Grup D olgu grubunda saptanmıştır.

TARTIŞMA ve SONUÇ: β -talasemi taşıyıcılığı nedeniyle tanısız yükselmesi beklenen HbA₂ seviyesi; δ -talasemi nedeniyle normal sınırlara inebilmekte ve bu bireylerin β -talasemi taşıyıcısı olduğu bilenen başka bir bireyle evliliği sonrası β -talasemi majorlu çocukları doğabilmektedir. Normal HbA₂ piki nedeniyle göz ardı edilen; ileri değerlendirmeye yönlendirilmeyen bireylerin $\delta\beta$ -talasemi olabileceği unutulmamalıdır. Hb elektroforez sonucu normal sınırlarda olsa bile β -talasemi taşıyıcılığı saptanmış bireylerin partnerleri mutlaka DNA analiz yöntemleri ile β -talasemi taşıyıcılığı açısından değerlendirilmelidir ve eşlik edebilecek δ -talasemi açısından mutlaka *HBD* geni genotiplendirmesi akılda tutulmalıdır. Nitekim sınırlı sayıda olgunun dahil edildiği mevcut araştırma sonucuna göre elektroforez profilleri anormal olan şüpheli olgularda çalışılan iki gen açısından kayda değer oranda nokta mutasyonların eşlik ettiği ortaya konmuştur. Mevcut araştırmada olguların %53,75'inde *KLF1* geninde ve %23,75'inde *HBD* geninde mutasyon saptanmıştır. Bulgularımız literatürdeki diğer araştırma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Borderline seviyede HbA₂ seviyesine sahip olan kişiler de mutlaka ayrıntılı olarak değerlendirilmelidir. Nutrisyonel eksikliklerin, sessiz β -talasemi mutasyonlarının, β -talasemi taşıyıcılığı ile δ -talasemi birlikteliğinin, α -gen

triplikasyonu/kuadriplikasyonunun yanında *KLF1* gen mutasyonlarının da borderline seviyede HbA₂ seviyesine neden olabileceği unutulmamalıdır. MCV ve MCH değerleri normal ya da hafif düşük olgularda görülebilen HbF yüksekliği ya da borderline seviyede HbA₂ yüksekliği *KLF1* genindeki mutasyondan kaynaklanıyor olabilir; ya da fenotipik olarak tipik talasemi minör ile uyumlu bulguları olan ancak *HBB* geninin intakt olarak saptandığı olgularda mutlaka *KLF1* genotiplendirmesi de akılda tutulmalıdır.

Mevcut araştırma sonucunda saptanan HBD:c.32C>T mutasyonu yeni bir hemoglobin HbA₂ varyantı olarak değerlendirilmiş ve HbA2-Canakkale ismiyle literatüre kazandırılmıştır. Varyantın "HbVar" veritabanına eklenmesi ve ilgili mutasyonun görüldüğü tek nükleotid polimorfizminin (referans SNP) "rs" numarası alması hedeflenmiştir. Araştırmamız ayrıca, bilindiği kadarıyla, HbA2-Bornova varyantına sahip olgulardan oluşmuş bir serinin (n=5) sunulduğu ilk çalışmadır. Yine araştırmamız *KLF1* geni mutasyonları ile HbA₂ seviyesi arasındaki ilişkiyi değerlendiren Türkiye'deki ilk çalışma olması özelliğini de taşımaktadır.

Türkiye'de *KLF1* ve *HBD* genleri ile ilgili çalışmalar, bilindiği kadarıyla, oldukça azdır. Genotipik çeşitlilik açısından eşsiz bir yelpazeye sahip olan ülkemizde bu genlerle ilgili bilgi ve tecrübelerimiz arttıkça literatüre daha önce girmemiş varyantların ve fenotipik etkilerinin ortaya konulmasının da önü bu şekilde açılmış olacaktır. Sonuç olarak, hemoglobin elektroforez anormalliklerinin moleküler etyolojik sebepleri araştırılırken *KLF1* ve *HBD* gibi globin proteini üreten ya da üretimi üzerinde etkisi bulunan diğer alternatif genlerin olası varyasyonlar açısından genotiplendirilmesinin kesin tanı açısından önemli olduğu önerilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Borderline HbA₂ yüksekliği, δ -talasemi, *HBD*, HbA₂ düşüklüğü, Hemoglobin elektroforezi, HPLC, *KLF1*.

**INVESTIGATION OF THE GENOTYPE-FENOTYPE RELATIONSHIP
BETWEEN THE MUTATIONS OF KRUPPEL-LIKE FACTOR 1 AND
HEMOGLOBIN SUBUNIT DELTA GENES IN PATIENTS WITH HbF OR HbA₂
ABNORMALITIES**

ABSTRACT

INTRODUCTION and AIM: Hemoglobinopathies are the most common single-gene disorders, which the structure or synthesis of the any globin chains that design the biochemical structure of hemoglobin protein is impaired. β -thalassemia, one of the hemoglobinopathies, is characterized by inadequate or lack of globin chain synthesis and poses a significant public health burden in Turkey as being one of the Mediterranean countries. Thus, it is very substantial to conduct thalassemia prevention programs in regions where the prevalence of thalassemia is high. The first step approach in the screening of thalassemia comprises complete blood count analysis of the cases and then followed by analysis of hemoglobin fractions with an automated HPLC or capillary electrophoresis device for those with abnormalities in hematologic parameters (e.g. hypochromia, microcytic anemia, erythrocytosis).

The role of hemoglobin electrophoresis in the detection of thalassemia trait is very important but HbF and HbA₂ levels measured in many clinical conditions have been reported to vary and these hemoglobin fraction levels are incompatible with the current clinical condition. One of the clinical manifestations that decrease HbA₂ level is δ -globin gene (*HBD*) mutations. Mutations in the *HBD* gene have not been reported as having any clinical consequences or hematological findings; but, it may lead to misdiagnose the β -thalassemia carriers by decreasing HbA₂ levels. It is also known that mutations in the *HBD* gene are also responsible for low levels of HbA₂, such as also due to iron deficiency anemia or α -thalassemia trait.

Another gene that affects HbF and HbA₂ levels is the Kruppel-like factor 1 (*KLF1*) gene. There are studies implicating that mutations in the *KLF1* gene are responsible for hereditary persistence HbF or β -thalassemia minor phenotype. Especially in individuals with borderline HbA₂ levels, it is recommended to analyze the *KLF1* gene if *HBB* gene is intact.

In the present study, it was aimed to determine whether *KLF1* or *HBD* genes have a possible role in patients with HbF elevation or HbA₂ level abnormalities performed by HPLC.

MATERIALS and METHODS: The study was conducted between March 2013-August 2018 with 100 subjects who were referred for the *HBB* gene analysis in Canakkale Onsekiz Mart University Medical Faculty Hospital Genetic Diagnosis and Treatment Center. The case group was divided into four sub-groups of 20 individuals. In hemoglobin electrophoresis performed by HPLC, only those with high HbF levels were identified as Group A, only those with borderline HbA₂ levels were defined as Group B, only those with HbA₂ levels above the borderline level were identified as Group C and only those with low HbA₂ levels were identified as Group D. DNA samples present in our laboratory belonging to 20 healthy individuals who have and/or first degree relatives have no history of thalassemia are used as control group for the study. A total of 100 DNA samples from patient and control subjects recruited in the study were analyzed for target *KLF1* and *HBD* genes and compared. For this purpose, PCR products were used by using specific primer pair for each gene and these products were sequenced by sanger sequence analysis and mutation analyzes were performed. The base profiles obtained from genes were evaluated with the help of analysis softwares.

RESULTS: The data obtained at the end of the study were evaluated in terms of the *KLF1* gene; mutations in the *KLF1* gene were detected in 43 subjects (two mutations both were detected in four cases) (53,75%; n=80) and 37 subjects (46,25%) were found to be normal. As *KLF1* gene mutations in the case groups, five different point mutations were detected; S102P mutation in 41 subjects (36

heterozygous, 5 homozygous), M39L heterozygous mutation in one case, P109S heterozygous mutation in one case, F182L heterozygous mutation in three cases, and R268L heterozygous mutation in one case were found respectively. In control group, S102P heterozygous mutation in six individuals (30%; n=20) and P109S heterozygous mutation in one individual (5%) were detected. As *HBD* gene mutations; four different variations were detected in 19 cases (23,75%; n=80). Three of these were previously described in the literature (HbA₂-Yialousa in 12 cases (15%; n=80), HbA₂-Bornova in five cases (6,25%), and HbA₂-Yokoshima in one case (1,25)). "Delta 10(A7) Ala-->Val; HBD:c.32C>T" mutation described in only one of the cases was determined in this study for the first time. Mutations in the *HBD* gene was found only in Group D.

DISCUSSION and CONCLUSION: The level of HbA₂, which is expected to be elevated due to β -thalassemia trait, may fall into normal limits because of coexistence of δ -thalassemia, and children with β -thalassemia major may be born after a marriage with another person who is known to be a carrier of β -thalassemia. It should be kept in mind that individuals who are ignored and are not directed to the further evaluation due to normal HbA₂ levels may have $\delta\beta$ -thalassemia. Even if the hemoglobin electrophoresis result is within normal limits, partners of individuals known to be β -thalassemia trait should be necessarily evaluated in terms of the carrier of β -thalassemia by DNA analysis methods and should be noted *HBD* gene genotyping in case of δ -thalassemia coexistence. As a matter of fact, according to the results of the current study, where a limited number of patients were included, it was revealed that significant numbers of point mutations observed in the two target genes with suspected cases of abnormal electrophoresis profiles. In the present study, 53,75% of the subjects had a mutation in the *KLF1* gene and of 23.75% had in *HBD* gene. Our findings are similar to those of other studies in the literature.

Individuals with borderline HbA₂ levels should also be considered in detail. It should be kept in mind that nutritional deficiencies, silent β -thalassemia

mutations, coexistence of β -thalassemia trait and δ -thalassemia, α -gene triplication/quadruplication as well as *KLF1* gene mutations may cause borderline HbA₂ levels. In cases having normal or slightly low MCV and MCH values with high HbF or borderline HbA₂ level or in cases with phenotypic findings consistent with thalassemia minor but in which *HBB* gene is detected intact may be caused by mutations in the *KLF1* gene.

The "HBD:c.32C>T" mutation detected as a result of the present study is evaluated as a new hemoglobin HbA₂ variant and is introduced to the literature under the name of HbA₂-Canakkale. It is also aimed to be deposited to the "HbVar" database and to get a new "rs number" of that single nucleotide polymorphism (SNP). Our study is also, to the best of our knowledge, the first study in which a series of cases with HbA₂-Bornova (n=5) is presented. Our study also bears the distinction of being the first study in Turkey by evaluating the relationship between *KLF1* gene mutations and HbA₂ levels.

Studies with *KLF1* and *HBD* genes in Turkey, as far as is known, is quite limited. As our knowledge and experience on these genes increase in our country, which has a unique spectrum in terms of genotypic diversity, it will be opened in such a way to reveal the new variants of these genes that have not entered the literature before and their phenotypic effects. In conclusion, the molecular etiology of hemoglobin electrophoresis abnormalities has been suggested to be important in terms of definitive diagnosis of genotyping of variants, such as in *KLF1* and *HBD* genes which are essential in producing globin proteins or controlling the process of globin synthesis.

KEY WORDS: Borderline HbA₂ level, δ -thalassemia, *HBD*, Hemoglobin electrophoresis, HPLC, Low HbA₂ level, *KLF1*.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	viii
İÇİNDEKİLER	xii
KISALTMALAR ve SİMGELER.....	xiv
TABLolar	xvii
ŞEKİLLER	xix
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	11
2.1. Hemoglobin tanım, tarihçe ve biyokimyasal yapısı	11
2.2. Globin genlerinin organizasyonu.....	14
2.3. Globin genlerinin gelişimsel süreçte ekspresyon özellikleri ve "globin switching"	16
2.4. Gelişimsel süreçte β -Gen ailesi genleri ekspresyonunun regülasyonu- Lokus kontrol bölgesi.....	17
2.5. Hemoglobinopatiler	18
2.5.1. Hemoglobin yapısal varyantları	19
2.5.2. Anormal hemoglobin örnekleri	20
2.5.3. Alfa talasemiler	25
2.5.4. Beta talasemiler	26
2.6. Hemoglobin elektroforezi	27
2.6.1. Selüloz asetat ile Hb elektroforezi.....	27
2.6.2. Sitratağar veya asidik agaroz jel ile Hb elektroforezi	27
2.6.3. Yüksek basınçlı ya da yüksek performanslı sıvı kromatografisi.....	28
2.6.4. İzoelektrik odaklama (Elektrofokus yöntemi)	30
2.6.5. Kapiller zon elektroforezi	31
2.7. Mutasyon tanımı, tipleri ve yorumlanması.....	33
3. GEREÇ ve YÖNTEM	37
3.1. Kişilerin bilgilendirilmesi, aydınlatılmış onam ve etik kurul onayı	37

3.2.	Olgu gruplarının seçimi	38
3.3.	Kontrol grubunun seçimi	39
3.4.	Yöntem	41
3.4.1.	Genetik analiz	41
3.4.1.1.	PCR ile amplifikasyon ve DNA dizi analizi.....	41
3.4.1.1.1.	Kullanılan cihazlar	42
3.4.1.1.2.	Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar	43
3.4.1.1.3.	Spektrofotometre ile DNA konsantrasyon ve kalitesi.....	44
3.4.1.1.4.	<i>KLF1</i> ve <i>HBD</i> genlerinin PCR ile amplifikasyonu	45
3.4.1.1.5.	Jel elektroforezinde ampikonların kontrolü	47
3.4.1.1.6.	PCR ürünlerinin enzimatik temizlenmesi.....	48
3.4.1.1.7.	İşaretleme reaksiyonu (İkinci PCR reaksiyonu) bileşenleri ve ikinci PCR koşulları	49
3.4.1.1.8.	İkinci PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	49
3.4.1.1.9.	Örneklerin kapiller elektroforez cihazına yüklenmesi	50
3.4.1.1.10.	Elektroforez sonuçlarının değerlendirilmesi.....	50
3.5.	İstatistiksel analiz	51
4.	BULGULAR	51
4.1.	Demografik veriler	52
4.2.	Hematolojik veriler	57
4.3.	Saptanan mutasyonlar	61
4.3.1.	<i>KLF1</i> geninde saptanan mutasyonlar	61
4.3.2.	<i>HBD</i> geninde saptanan mutasyonlar	64
4.3.2.1.	<i>HBD</i> geninde saptanan bilinen mutasyonlar.....	64
4.3.2.2.	<i>HBD</i> geninde ilk kez saptanan mutasyon	66
5.	TARTIŞMA.....	74
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	91
7.	KAYNAKLAR	95
8.	EKLER	117
9.	ÖZGEÇMİŞ.....	120

KISALTMALAR ve SİMGELER

ANOVA	Varyans Analizi (Analysis of variance)
bç	Baz çifti
BCL11A	B hücreli lösemi/lenfoma 11A (B-Cell CLL/Lymphoma 11A)
C°	Santigrat (Celsius)
CBC	Tam kan sayımı (Complete blood count)
ÇOMÜ	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ddNTP	Dideoksi nükleotit trifosfat
dNTP	Deoksi nükleotit trifosfat
EKLF	Eritroid kruppel-like factor
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit
ExAC	The Exome Aggregation Consortium
GWAS	Genom boyu ilişkilendirme çalışmaları (Genome-wide association study)
gnomAD	The Genome Aggregation Database
g	Gravite
Hgb, Hb	Hemoglobin
HGMD®	The Human Gene Mutation Database
HPLC	Yüksek performanslı/basınçlı sıvı kromatografisi (High-performance/pressure liquid chromatography)
HBA1	Hemoglobin alfa lokus-1
HBA2	Hemoglobin alfa lokus-2
HBB	Hemoglobin subunit beta
HBD	Hemoglobin subunit delta

HBE1	Hemoglobin subunit epsilon-1
HBG1	Hemoglobin subunit gama-1
HBG2	Hemoglobin subunit gama-2
HBZ	Hemoglobin zeta lokus
In(Lu)	Lutheran kan grubu sisteminde "lutheran inhibitör kan grubu" fenotipi (The Lutheran inhibitor blood group phenotype)
KLF1	Kruppel-like factor 1
kb	Kilobaz
LCR	Lokus kontrol bölgesi (Locus control region)
Maks	Maksimum
MCV	Ortalama eritrosit hacmi (Mean corpuscular volume)
MCH	Ortalama eritrosit hemoglobini (Mean corpuscular hemoglobin)
MgCl₂	Magnezyum klorür
Min	Minimum
nm	Nanometre
p değeri	Olasılık değeri (Probability value)
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase chain reaction)
pH	Hidrojen potansiyeli (Potential of hydrogen)
Polyphen-2	Polymorphism phenotyping v2
RBC	Kırmızı kan hücresi (Red blood cell)
RNA	Ribo nükleik asit
TBE	Tris/Borat/EDTA
SIFT	Sorting Intolerant From Tolerant
SNP	Tek nükleotid polimorfizmi (Single nucleotide polymorphism)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
Ss	Standart sapma

TDBK	Total demir bağlama kapasitesi
Tm	Erime sıcaklığı (Melting temperature)
UIBC	Doymamış demir bağlama kapasitesi (Unsaturated Iron Binding Capacity)
UTR	Translasyon olmayan bölge (Untranslated region)
V	Voltage, Volt
ZBTB7A	Zinc Finger and BTB Domain-Containing Protein 7A
ZPP	Çinko protoporfirin (Zinc protoporphyrin)



TABLolar

Tablo 1.1. Hemoglobin fraksiyonlarının seviyeleri.	2
Tablo 1.2. <i>EKLF</i> geni mutasyonları ile ilişkili hematolojik bozukluklar	9
Tablo 2.1. Gelişimsel süreçte saptanan hemoglobin tipleri	14
Tablo 2.2. Temel hemoglobin elektroforez yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	32
Tablo 2.3. Patojenik varyant diyebilmek için gerekli kriterler.....	35
Tablo 2.4. Benign varyant diyebilmek için gerekli kriterler.....	36
Tablo 2.5. Mutasyonların yorumlanması.....	36
Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar.	42
Tablo 3.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar.	43
Tablo 3.3. Araştırmada kullanılan primer dizileri.	45
Tablo 3.4. Hedef bölge amplifikasyonu (Birinci PCR) reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.	46
Tablo 3.5. Birinci PCR koşulları.....	46
Tablo 3.6. Jel elektroforezi için kullanılan kimyasallar.....	47
Tablo 3.7. Kullanılan primer çiftleri sonrası amplifiye edilen fragmanların uzunlukları.....	48
Tablo 3.8. PCR ürünlerinin enzimatik temizlenmesi.	48
Tablo 3.9. İşaretleme reaksiyonu (İkinci PCR reaksiyonu) bileşenleri.	49
Tablo 3.10. İkinci PCR tepkime koşulları.....	49
Tablo 4.1. Araştırmaya dahil edilen kişilerin genel ve grup içi yaş ortalamaları \pm Ss, minimum-maksimum ve medyan değerleri.....	53
Tablo 4.2. Sonuçlarına ulaşılabilen kişilerin toplamda ve gruplar arası hematolojik verileri (RBC sayısı, Hb, MCH ve MCV değerleri) ortalamaları.	57
Tablo 4.3. Araştırmada <i>KLF1</i> geninde saptanan mutasyon türleri, dağılımları ve bu mutasyona sahip kişilerin HbF ve HbA ₂ seviyeleri.	63
Tablo 4.4. Araştırmada <i>HBD</i> geninde saptanan mutasyonlar.	68
Tablo 4.5. Grup A olgularının demografik ve hematolojik verileri, hemoglobin elektroforez sonuçları.....	69
Tablo 4.6. Grup B olgularının demografik ve hematolojik verileri, hemoglobin elektroforez sonuçları.....	70

Tablo 4.7. Grup C olgularının demografik ve hematolojik verileri, hemoglobin elektroforez sonuçları.....	71
Tablo 4.8. Grup D olgularının demografik ve hematolojik verileri, hemoglobin elektroforez sonuçları.....	72
Tablo 4.9. Kontrol grubu kişilerinin demografik ve hematolojik verileri, hemoglobin elektroforez sonuçları.	73
Tablo 5.1. Talaseminin laboratuvar tanısında karşılaşılan zorluklar.....	75
Tablo 5.2. Talasemi-demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısında kullanılan formüller	76
Tablo 5.3. <i>KLF1</i> Uzlaşı Çalışma Grubu'na göre <i>KLF1</i> genindeki varyasyonların fonksiyonel sınıfları	87



ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Ontogenik ekspresyon paternine göre 11. kromozomda yerleşmiş β -globin genleri kümesi	2
Şekil 1.2. İnsan δ -globin geninin tüm nükleotit sekansı	3
Şekil 1.3. β - ve δ -globin genlerinin promoter bölgelerinin karşılaştırılması	4
Şekil 1.4. KLF protein ailesi.....	5
Şekil 1.5. EKLF'nin megakaryosit-eritroid progenitör aşamasında eritroid seri olarak sürecin devamını sağlaması	6
Şekil 1.6. Kırmızı hücre terminal matürasyonunda KLF1'in rolü.....	6
Şekil 1.7. KLF1'in "globin switch"deki rolü.....	7
Şekil 1.8. <i>KLF1</i> geni ve eksprese ettiği KLF1 proteininin fonksiyonel kısımları ..	8
Şekil 2.1. Hemoglobin proteinin moleküler yapısı.....	12
Şekil 2.2. α - ve β -globin zincirlerinin karşılaştırılması.....	13
Şekil 2.3. β - ile δ -globin genlerinin birbirlerinden farklı kodladığı aminoasitler .	15
Şekil 2.4. Gelişimsel aşamada hemoglobin sentezi	16
Şekil 2.5. "Globin switching" süreci	17
Şekil 2.6. Lokus kontrol bölgesi lokalizasyonu	18
Şekil 2.7. Hb Lepore yapısı örnekleri	24
Şekil 2.8. α -talasemi genotipik prezentasyonu	25
Şekil 2.9. α - ve β -talasemi klinik formları.....	26
Şekil 2.10. Alkali ve asidik ortamda yapılan Hb elektroforezi bant paternleri ...	28
Şekil 2.11. HPLC çalışma prensibi	29
Şekil 2.12. HPLC yöntemi ile yapılmış hemoglobin elektroforezi örneği.....	30
Şekil 2.13. İzoelektrik odaklama yönteminde hemoglobin yapılarının bant paternleri	31
Şekil 3.1. Araştırmamızın dizaynı.....	40
Şekil 4.1. Araştırmaya dahil edilen kişilerin genel cinsiyet dağılımı.....	52
Şekil 4.2. Gruplar arası cinsiyet dağılımı.....	52
Şekil 4.3. Ki-kare testi; gruplar arası kadın-erkek dağılımı açısından istatistiksel değerlendirme.	53

Şekil 4.4. Levene's testi; yaş dağılımları açısından gruplar arası varyans homojenliğinin değerlendirilmesi.	54
Şekil 4.5. Normallik testleri (Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk); yaş dağılımları açısından gruplar arası normal dağılımın değerlendirilmesi.	54
Şekil 4.6. Yaş dağılımı açısından gruplar.....	55
Şekil 4.7. Kruskal-Wallis testi; gruplar arası yaş açısından değerlendirme.	55
Şekil 4.8. Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden "Tukey HSD" testi; yaş açısından farklılığın hangi grup tarafından kaynaklandığını değerlendirme.	56
Şekil 4.9. Levene's testi; hematolojik veriler açısından gruplar arası varyans homojenliğinin değerlendirilmesi.	58
Şekil 4.10. Normallik testleri (Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk); hematolojik veriler açısından gruplar arası normal dağılımın değerlendirilmesi.	58
Şekil 4.11. Kruskal-Wallis testi; gruplar arası hematolojik veriler açısından istatistiksel değerlendirme.....	59
Şekil 4.12. Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden "Bonferroni" testi; hematolojik veriler açısından farklılığın hangi grup tarafından kaynaklandığını değerlendirme.	59-60
Şekil 4.13. <i>KLF1</i> geni ekzon 2 S102P mutasyonu sanger dizi analiz profilleri.	61
Şekil 4.14. <i>KLF1</i> geni ekzon 2 M39L mutasyonu sanger dizi analiz profili.	62
Şekil 4.15. <i>KLF1</i> geni ekzon 2 P109S mutasyonu sanger dizi analiz profili.	62
Şekil 4.16. <i>KLF1</i> geni ekzon 2 F182L mutasyonu sanger dizi analiz profili.	62
Şekil 4.17. <i>KLF1</i> geni ekzon 2 R268L mutasyonu sanger dizi analiz profili.	62
Şekil 4.18. Kruskal-Wallis testi; gruplar arası <i>KLF1</i> geni S102P mutasyonu saptanma sayısı açısından istatistiksel değerlendirme.	63
Şekil 4.19. Kruskal-Wallis testi; gruplar arası <i>HBD</i> geninde mutasyon saptanması açısından istatistiksel değerlendirme.....	64
Şekil 4.20. HbA2-Yialousa.	65
Şekil 4.21. HbA2-Bornova.....	65
Şekil 4.22. HbA2-Yokoshima.....	65
Şekil 4.23. İlk kez saptanan <i>HBD</i> geni mutasyonu.....	66
Şekil 4.24. Araştırmamızdaki <i>HBD</i> geni mutasyonlarının saptanma sıklıkları. .	67
Şekil 5.1. Kriptik donör splice site alanı.....	79
Şekil 5.2. δ -globin varyantları açısından değerlendirme.....	80

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Elektroforez; elektro+forez (migrasyon, göç) kelime köklerinden oluşmuş "elektriksel ortamda hareket" yönteminin adıdır. DNA, RNA, protein ve karbonhidrat gibi yüklü moleküllerin; büyüklük, şekil ve topolojik özelliklerine göre birbirlerinden elektriksel ortamda ayrılmalarını sağlar.

Elektroforez; çözünmüş halde bulunan moleküllerin, elektrik yüklerinin moleküler ağırlıklarına oranıyla belirlenen hızlarda, elektriksel alanda göç etmeleri prensibine dayanmaktadır. Çalışılacak örnek destek ortamlarına konarak [selüloz, jel (agaroz, poliakrilamid)] belirli bir süre elektriksel ortamda yürütülür. Destek ortamları moleküller için elek görevi yapan porlu materyallerdir. Moleküler ağırlığı fazla olanlar az olanlara göre, hacimce büyük moleküller porlardan hacimce küçük moleküllere göre daha yavaş geçerler. Buna göre hacimce büyük-moleküler ağırlığı fazla olan moleküller kuyucuklara yakın yerlerde kalırken; küçükler daha uzakta yerleşir. Elektriksel hareket katottan (negatif elektrot) anoda (pozitif elektrot) doğru olduğu için yine pozitif yüklü olanlar, negatif yüklü olanlara göre daha geride kalmaktadırlar.

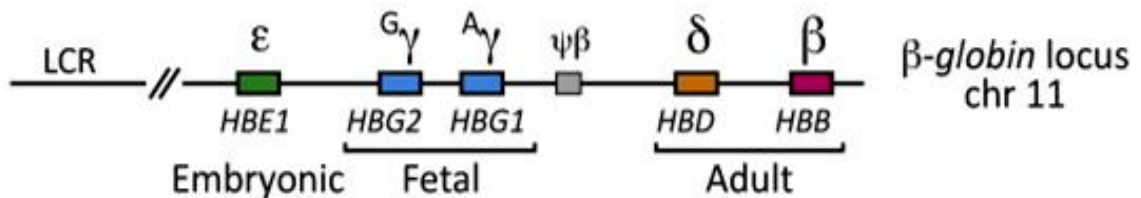
Hemoglobin; amfoterik yapıda bir proteindir. İçinde bulunduğu çözeltinin pH'sına bağlı olarak pozitif ya da negatif yüklenebilir. Hemoglobinozomların tespitinde kullanılan yöntemlerden birisi de "hemoglobin elektroforezi"dir. Selüloz asetat ile Hb elektroforezi (pH:8,2-8,6), sitrat agar veya asidik agaroz jel ile Hb elektroforezi (pH:6,0-6,2), izoelektrik odaklama (elektrofokus), yüksek basınçlı/yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC, high-performance liquid chromatography), kapiller zon elektroforezi gibi hemoglobin elektroforez yöntemleri mevcuttur. İnsanda normal hemoglobin elektroforez değerleri Tablo 1.1'de verilmiştir.

Tablo 1.1. Hemoglobin fraksiyonlarının seviyeleri. **A)** Yetişkinlerde hemoglobin normal seviyeleri. **B)** HbF'nin normal seviyeleri.

Hemoglobin Fraksiyonları	
HbA	: %95-98,
HbA ₂	: %2-3,
HbF	: <%2 (1-3).

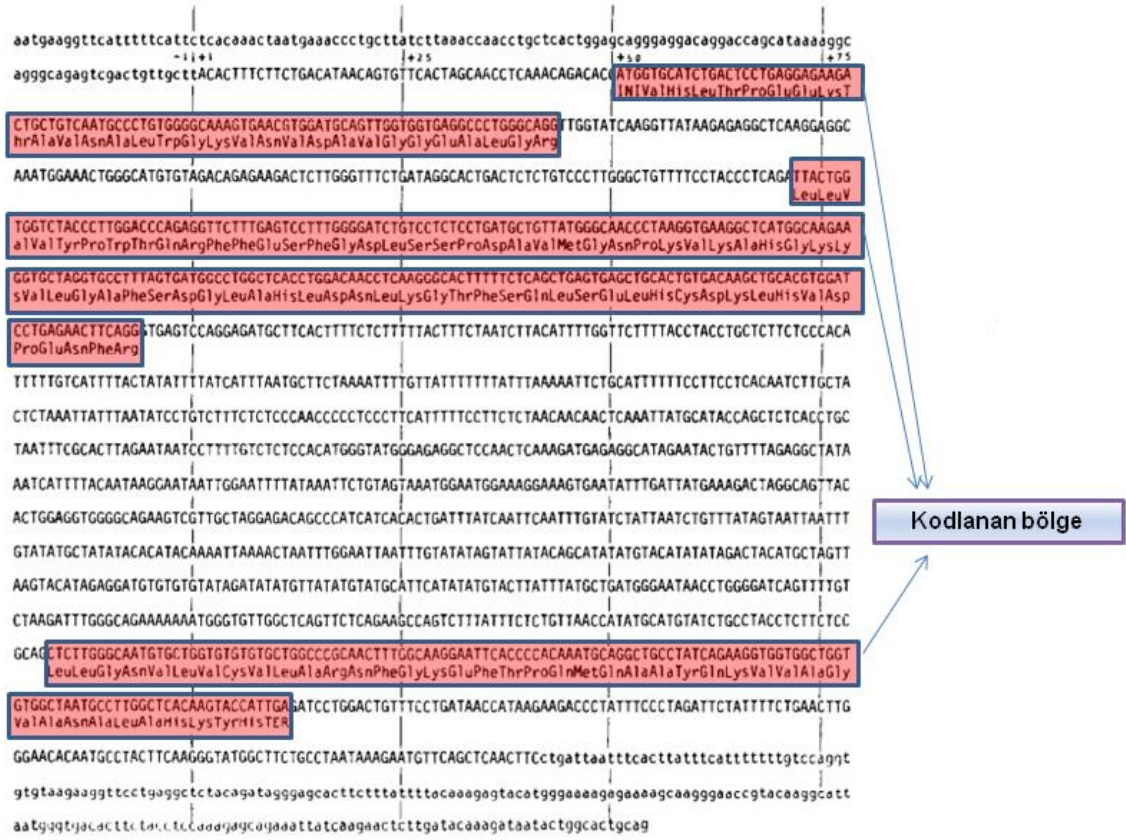
HbF Normal Seviyeleri	
Yenidoğan	: %50-80,
1 – 6 ay arası	: %8,
6 aydan büyükler	: %1-2.

HBD (Hemoglobin subunit delta) geni; 11. kromozomun kısa kolunda (11p15.4) yerleşmiş beş β -globin aile üyesi genden birisidir. HbA₂ yapısını oluşturan δ -globin zincirinin sentezinden sorumludur. β -globin genleri kümesi; kromozom üzerinde ontogenik ekspresyon paternlerine göre 5'-epsilon(ϵ)(*HBE1*)-Ggamma(γ^G)(*HBG2*)-Agamma(γ^A)(*HBG1*)-delta(δ)(*HBD*)-beta(β)(*HBB*)-3' şeklinde konumlanmıştır (*HBE1*: Hemoglobin subunit epsilon-1, *HBG2*: Hemoglobin subunit gama-2, *HBG1*: Hemoglobin subunit gama-1, *HBB*: Hemoglobin subunit beta) (Şekil 1.1) (4).



Şekil 1.1. Ontogenik ekspresyon paternine göre 11. kromozomda yerleşmiş β -globin genleri kümesi-Wienert ve ark. (5)'ndan alınmıştır.

HBD geni üç ekzondan oluşmaktadır (Şekil 1.2). Gendeki mutasyonların tek başlarına herhangi bir klinik şikayet ya da hematolojik bulgu oluşturduğu bildirilmemiştir (6-14); ancak talasemi taşıyıcılarında HbA₂ seviyelerinde değişikliğe sebep olarak bireylerin normal olarak değerlendirilmeleri ya da herhangi bir klinik şikayeti olmayanların yanlış tanı almaları gibi bireylerin istenmeyen klinik yaklaşımlara maruz kalmalarına neden olabilmektedir (15). *HBD* geninde bugüne kadar 120'nin üzerinde varyant tanımlanmıştır (16).



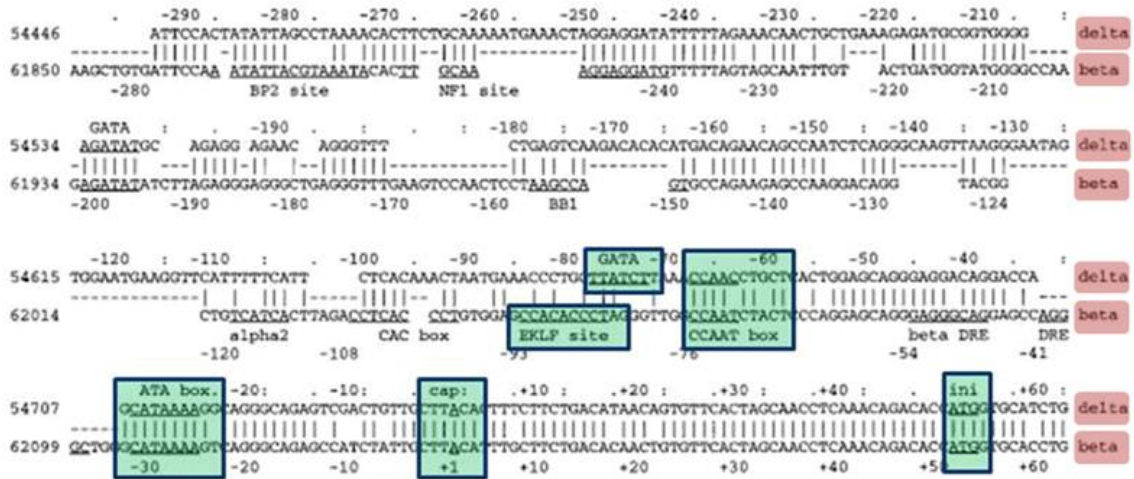
Şekil 1.2. İnsan δ-globin geninin tüm nükleotit sekansı-Spritz ve ark. (17)'ndan alınmıştır. Kırmızı kutucuklar *HBD* geninin kodlanan bölgesini göstermektedir.

Yetişkin kanında HbF ekspresyonu; kandaki total hücrelerin %2'sinden azını oluşturan ve "F" hücreleri denilen kan hücrelerince sağlanmaktadır. Bunun yanında HbA₂ sentezi ise panselülerdir. Dolayısıyla γ-globin geni çoğu eritroid hücrede inaktif kromatin konfigürasyonunda bulunurken; δ-globin geni aktif

kromatin yapısındadır ve düşük seviyelerde sentezlenebile tüm eritroid hücrelerde transkribe olabilmektedir (1).

HbA₂ sentezinin HbA'ya kıyasla daha az seviyede olmasının;

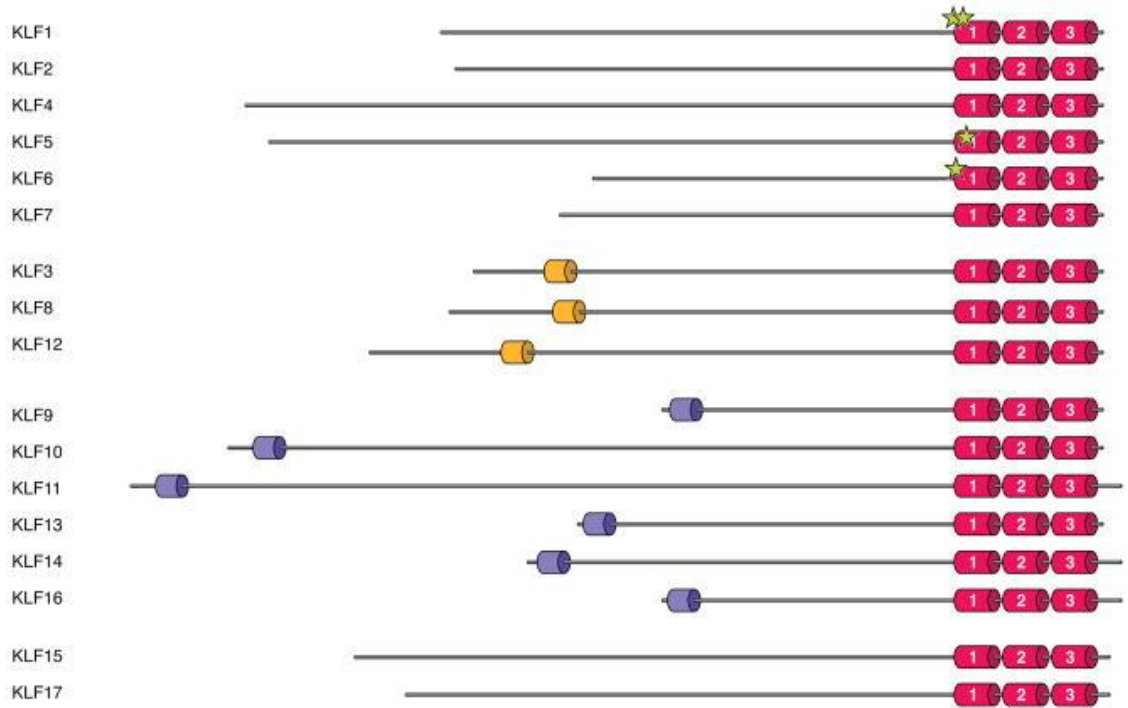
- β-globin geninin promoter bölgesinde bulunan ve 'KLF1' transkripsiyon faktörünün bağlanma alanı olan "CCACACCCT" yapısının (motifinin) δ-globin geninde mutasyona uğraması (Şekil 1.3),
- β-globin geninin promoter bölgesinde bulunan ve 'CP1' molekülünün bağlanma noktası olan "CCAAT" motifinin δ-globin geninde "CCAAC" şeklinde olması (Şekil 1.3),
- β-globin geninin IVS-II ve 3' downstream bölgesinde bulunan enhancer aktivitelerin δ-globin geninde bulunmaması ve
- δ-globin mRNA'larının anstabil olmaları gibi faktörlerin sorumlu olduğu söylenmektedir (2,13,18-24).



Şekil 1.3. β- ve δ-globin genlerinin promoter bölgelerinin karşılaştırılması-Tang ve ark. (18)'ndan alınmıştır. Yeşil kutucuklar her iki genin başlangıç kodonunu, mRNA'larının 5' başlık eklenme alanını, TATA kutucuğu varyantını, KLF1 transkripsiyon faktörünün β-globin genindeki bağlanma alanını, δ-globin geni proksimal GATA-1 bağlanma alanını ve CCAAT/CCAAC motiflerini göstermektedir.

HbA₂ proteininin aynı HbF gibi deoksi-HbS polimerizasyonunu oraklaşma karşıtı ajan (anti-sickling agent) gibi davranarak önlediği gösterilmiştir (25). Dolayısıyla teorik olarak *HBD* geninin in-vivo aktivasyonunun sağlanması talasemik vakalar için yeni terapötik yaklaşımlar arasında sayılmaktadır (1).

Kruppel-like faktörler; 17 üyesi olan, DNA'ya bağlanan transkripsiyonel regülatuarlardır (Şekil 1.4). Temel hücre faaliyetlerinin kontrolünde (proliferasyon, diferansiasyon ve migrasyon) görev yapmaktadırlar. Son zamanlarda kök hücrelerin kendini yenilemesi ve pluripotent özelliklerinin devamlılığında da görevlerinin olduğu saptanmıştır (26,27). İlk KLF(Kruppel-like faktör) 1993 yılında keşfedilmiş ve KLF1/EKLF(Erythroid kruppel-like factor) olarak isimlendirilmiştir.

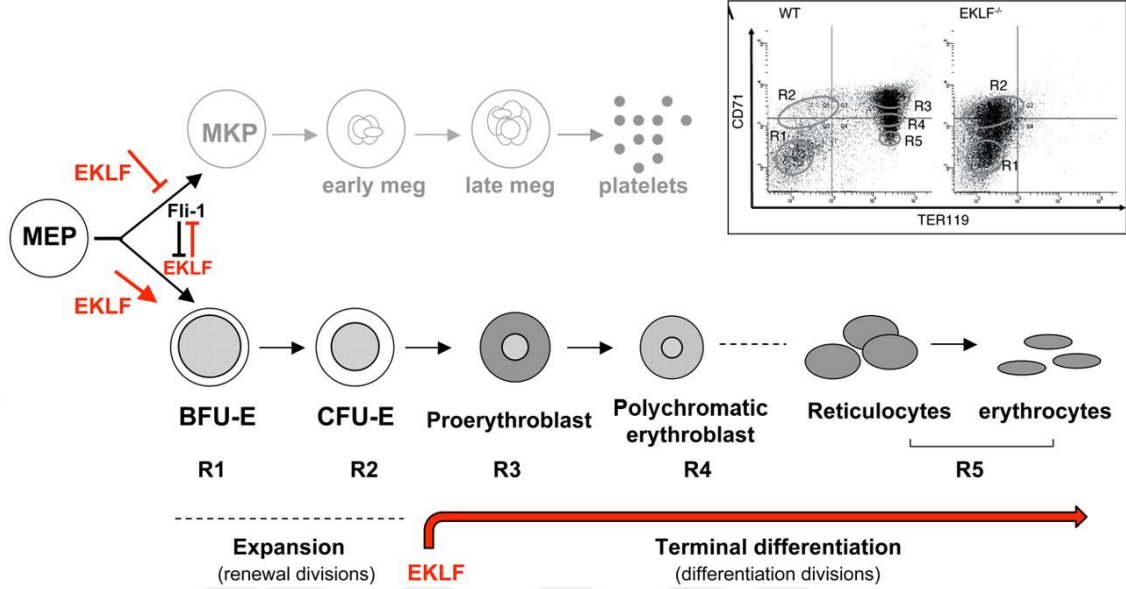


Şekil 1.4. KLF protein ailesi-McConnell ve ark. (28)'ndan alınmıştır.

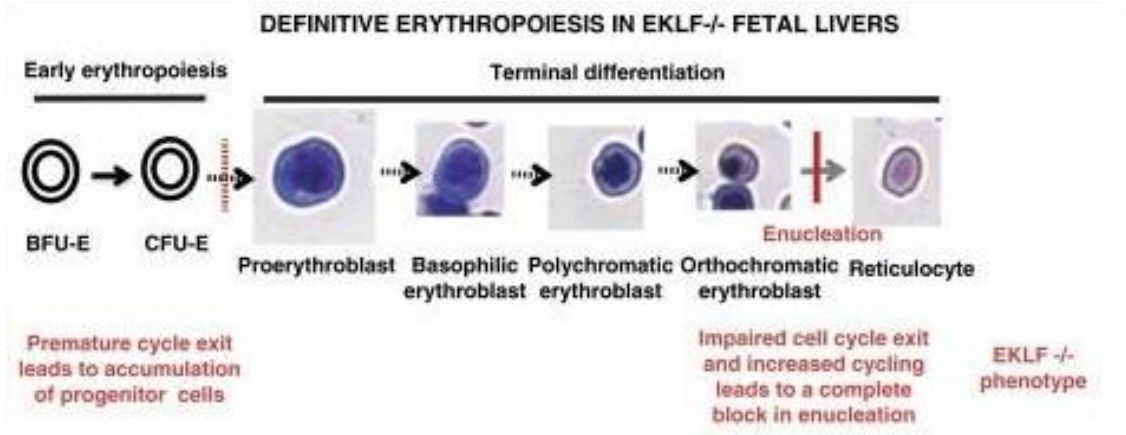
KLF1/EKLF eritropoezde 3 çok önemli aşamada rol almaktadır;

- Megakaryosit-eritroid progenitör aşamasında sürecin eritroid seri olarak devamını sağlamak (Şekil 1.5) (29),
- “Globin switching” de rol oynamak,

- Kırmızı hücrelerin terminal matürasyonunda hücre siklusu kontrolü sağlamak (Şekil 1.6) (30-32).



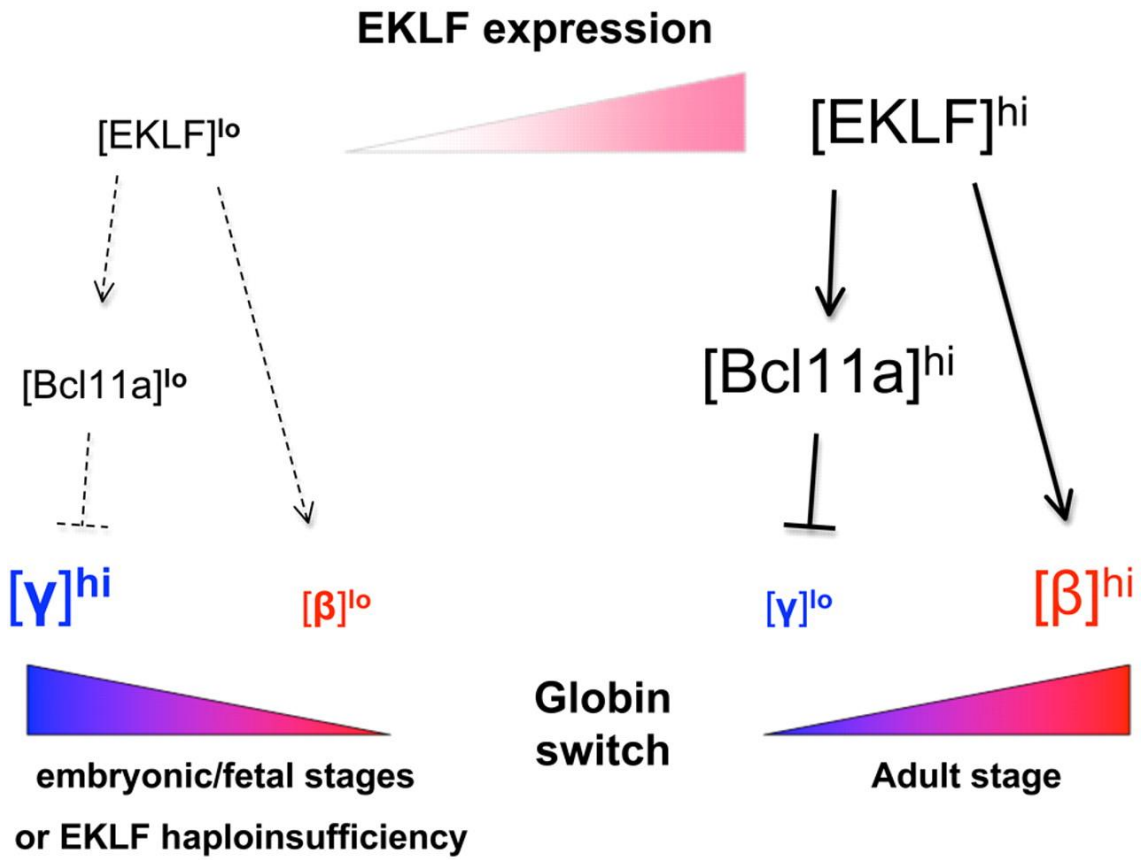
Şekil 1.5. EKLF'nin megakaryosit-eritroid progenitör aşamasında eritroid seri olarak sürecin devamını sağlaması-Siatecka ve ark. (30)'ndan alınmıştır.



Şekil 1.6. Kırmızı hücre terminal matürasyonunda KLF1'in rolü-Gnanapragasam ve ark. (31)'ndan alınmıştır. EKLF yokluğunda kırmızı hücrelerin enükleasyonunda duraklama ve progenitor hücrelerde birikme gibi fenotipik etkiler şekilde gösterilmektedir.

Son zamanlarda yapılan çalışmalar EKLF'nin gelişimsel süreçte gerçekleşen fetal hemoglobinden yetişkin hemoglobinine geçiş aşamasında çok kritik görevi olduğunu ortaya koymuştur. EKLF bu süreçte;

- Direkt β -globin geni aktivasyonu yaparken (promoter bölgedeki "CCACACCCT" yapısı üzerinden) (33-37),
- BCL11A (B-Cell CLL/Lymphoma 11A) regülasyonu ile indirekt olarak γ -globin geni ekspresyonunu repress etmektedir (Şekil 1.7) (30,38).



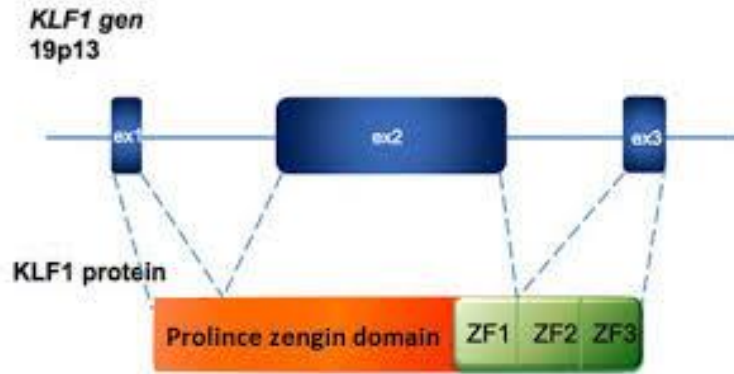
Şekil 1.7. KLF1'in "globin switch"deki rolü-Siatecka ve ark. (30)'ndan alınmıştır.

BCL11A; 2007-2008 yıllarında yapılan GWAS (Genome-wide association study) çalışmaları sonrasında keşfedilmiş major fetal globin repressörüdür (39-41). 2016 yılında ise ZBTB7A (Zinc Finger and BTB Domain-Containing Protein 7A) adı verilen ikinci bir fetal globin repressörü olduğu keşfedilmiştir (42). KLF1; her iki fetal globin repressörü ekspresyonunun regülasyonunda rol alan

transkripsiyon faktörü olduğundan ontogenik gelişimde çok önemli rol üstlenmektedir (43,44).

KLF1 geni 19. kromozom kısa kolunda (19p13.13) lokalizedir ve üç ekzondan oluşmaktadır (Şekil 1.8). 362 aminoasitlik hematopoitik-spesifik transkripsiyon faktörü rolü üstlenen bir çinko parmak proteini sentezlemektedir (45).

KLF1/*EKLF* proteini yapısında iki fonksiyonel domain ile üç adet çinko parmak barındırmaktadır (Şekil 1.8). Domainlerden birisi prolince-zengin aminoterminal transaktivasyon domainini oluşturur (diğer transkripsiyon faktörlerinin kendi üzerine bağlanabilecekleri bir alan yaratırlar) iken; diğeri, eritroid genlerin regülatuar bölgelerinde kendisinin bağlanabileceği motifleri ayırt edebilen karboksi terminal domainini oluşturur (çinko parmaklar bu domain bünyesinde) (46).



Şekil 1.8. *KLF1* geni ve eksprese ettiği *KLF1* proteininin fonksiyonel kısımları- Cao (47)'dan alınmıştır.

KLF1 genindeki mutasyonlar; konjenital diseritropoetik anemi, In(Lu) fenotipi kan hastalığı, HbF herediter persistansı gibi birtakım farklı fenotiplerle ilişkilendirilmiştir (Tablo 1.2) (30). Ayrıca son zamanlardaki çalışmalarda gendeki bazı mutasyonların borderline HbA₂ seviyeleri oluşturduğu ve talasemi minöre sebep olduğundan da bahsedilmektedir (48-58). Bu zamana kadar *KLF1* geninde

65'in üzerinde varyasyon tanımlanmıştır (59).

Tablo 1.2. *EKLF* geni mutasyonları ile ilişkili hematolojik bozukluklar-Siatecka ve ark. (30)'ndan alınmıştır.

Hematolojik Bozukluk	EKLF genindeki monoallelik mutasyonlar	Fenotip
Konjenital Diseritropoietik Anemi	E325K (KLF1 proteininin ZnF2 bölümünü kodlayan korunmuş yerdeki oluşan değişiklik)	-Hemolitik anemi -HbF yüksekliği -Kemik iliğindeki eritroblastların morfolojik anormallığı -Periferik kanda çekirdekli ortokromatik eritroblastlar -Su kanallarından AQP1, CD44'nin ekspresyonlarının ortadan kalkması
In(Lu) fenotipi Kan Grubu Bozukluğu	L127X } Prematür stop kodon K292X } H299Y ZnF1'in kodlandığı yerdeki değişiklik R328L } ZnF2'in kodlandığı yerdeki değişiklik R328H } R331G } 190. sıradaki Prolini kodlayan kodonda tek baz delesyonu (P190Lfs*47) 319. sıradaki Arjinini kodlayan kodonda tek baz insersiyonu (R319Gfs*34) GATA-1 bağlanma alanını ortadan kaldıran promoter (-124 T>C) mutasyonu	-Lutheran grubu eritrosit yüzey antijenlerinin eksikliği -HbF seviyesi bahsedilmemiş
Hereditör Fetal Hemogloblin Persistansı	M39L nötral değişiklik (?) K288X prematür stop kodon	-HbF yüksekliği (3-20%) -Mikrositoz
	S270X } prematür stop kodon K332Q } ZnF2'nin kodlandığı yerdeki değişiklik (biallelik trans pozisyonda mutasyon-bileşik heterozigot)	-HbF yüksekliği (22-30.9%) -Çinko protoporfirin yüksekliği

Talasemi hastalarında "Güncel gen manipülasyon yöntemleri ile *KLF1* geninde in-vivo oluşturulabilecek bir mutasyon; hastada HbF seviyesinin yükselmesini sağlayarak kliniği hafifletebilir mi?" hipotezi üzerinde de çalışmalar sürmektedir (43,60-67).

Türkiye'de 1993 yılında talasemi ve anormal hemoglobinleri önleme adına 3960 sayılı Kalıtsal Kan Hastalıkları ile Mücadele Kanunu yayınlanmış, sonrasında Antakya, Mersin, Antalya, İzmir ve Muğla'da merkezler kurulmuş; evlilik öncesi çiftlere talasemi ve hemoglobinopati taraması zorunlu hale getirilmiştir. 2000 yılında kurulan Ulusal Hemoglobinopati Konseyi (UHK) ile

çalışmalar hız kazanmış; Sağlık Bakanlığı ve UHK tarafından belirlenen 33 ilde Hemoglobinopati Önleme Programı başlatılmıştır. Sağlık Bakanlığı verilerine göre, 2003 yılında evlilik öncesi çiftlerin %30'u taranmış iken, 2008 yılında %81'i taranmış; 2003 yılında yeni hasta çocuk doğum sayısı yaklaşık 400 civarında iken, 2008 yılında 31'e düşmüştür (68).

"HbF veya HbA₂ anormalliği olan bireylerde Kruppel-like factor 1 ve Hemoglobin subunit delta genlerindeki mutasyonların genotip-fenotip ilişkisinin incelenmesi" araştırmasıyla HPLC elektroforetik yöntemi ile hemoglobin elektroforezinde HbF yüksekliği (>%2) veya normalin dışındaki bir seviyede HbA₂ değeri saptanan bireylerin *KLF1* ve *HBD* genlerindeki mutasyonlarının ve kliniğe etkilerinin olup olmadığı araştırılmış; bu genlerin olası bir rolünün olup olmadığının ortaya konması amaçlanmıştır.

Rutin pratikte; evlilik öncesi başvuruda bulunup klinik şikayeti olmayan ve yapılan tetkiklerde herhangi bir hematolojik bulgu (anemi, mikrositozis, hipokromi, kırmızı kan hücre sayısında artış gibi) saptanmayan ancak Hb elektroforezinde HbF yüksekliği ve/veya HbA₂ düşüklüğü ya da yüksekliği olması sebebiyle ileri değerlendirme gereken pek çok olgu ile karşılaşmaktadır. Dolayısıyla hedef genler olan *KLF1* ve *HBD* genlerindeki olası mutasyonların tespiti ile HbF ve/veya HbA₂ seviyelerindeki değişikliklerin belki de etyolojik sebebi açıklanabileceğinden kişilere genetik danışmanlık doğru bir şekilde verilebilecektir. Talasemi taşıyıcısı olduğu halde bunu HbA₂ ve HbF değerleri normal aralıkta saptandığı için bilmeyen, dolayısıyla yanlış klinik değerlendirmelere maruz kalanlara doğru genetik tanı konabilecek; talasemi hastalığı gibi, etkilenen bireylerde tedavisi zor ve maliyeti yüksek, taşıyıcıların saptanması ve doğum öncesi tanı konulabilmesiyle engellenebilen önemli bir halk sağlığı sorunu da daha etkin bir şekilde kontrol altında tutulabilecektir (69-71).

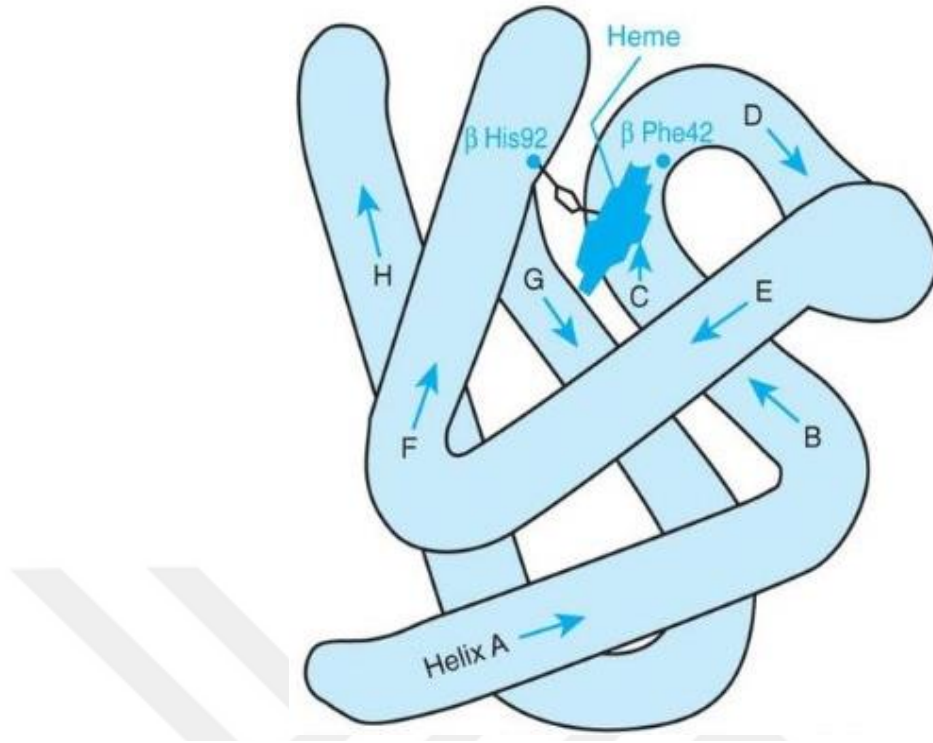
Türkiye'de, bilindiği kadarıyla, araştırmamızın hedef genleri olan *KLF1* ve *HBD* üzerinde sınırlı sayıda araştırma bulunmaktadır (72,74-78).

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Hemoglobin tanım, tarihçe ve biyokimyasal yapısı

Hemoglobin; hem+globin subunitlerinden oluşmuş, insandaki "hem" biyomolekülünü içeren major iki proteinden birisidir (diğeri myoglobin). Hemoglobin ve myoglobin yapılarındaki hem yapısı sayesinde "kırmızı proteinler" olarak da anılmaktadırlar (79). Hemoglobinin 3 boyutlu yapısı ilk kez, 1959 yılında Max Perutz ve arkadaşları tarafından X-ray kristalografi kullanılarak gösterilmiştir (80).

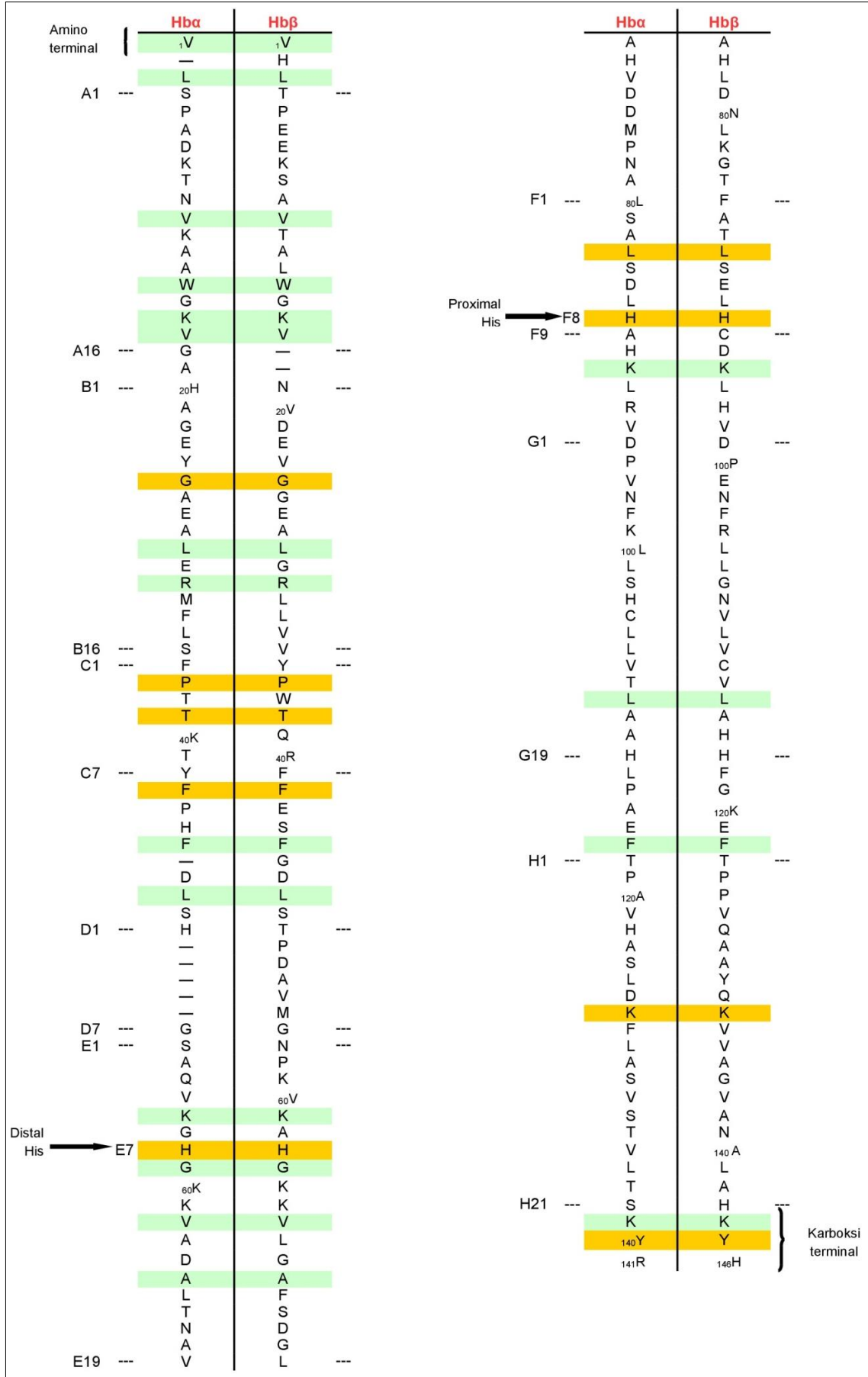
Hemoproteinlerin yapısını oluşturan hem molekülü; porfirin+ferröz demir iyonu (Fe^{+2}) kompleksinden ibarettir. Porfirin halkası; süksinil-COA ile glisin aminoasidinin ilk basamakta enzimatik reaksiyonu sonrası birbirini takip eden 6 biyokimyasal basamak nihayetinde oluşur. Son aşamada Fe^{+2} iyonu porfirin halkasının santralinde bulunan nitrojen (N) atomlarına bağlanarak "hem" yapısını oluşturur (79). Demir iyonu toplamda altı adet iyonik bağ yapabilir. Dördünü bahsedilen nitrojen iyonları ile yaparken geriye kalan ikisinin birini globin polipeptidinin "proksimal histidin [His92(F8)]" adı verilen histidin aminoasidi ile direkt; diğerini ise oksijen (O_2) molekülü ile yapmaktadır. Yine globin zincirinde bulunan "distal histidin [His63(E7)]" O_2 ile ferröz demir iyonunun (Fe^{+2}) stabilizasyonunu sağlamaktadır (81). Globin yapısının 42. sırasında bulunan "fenilalanin" aminoasidi ise (Phe42) hem biyomolekülünün "cep"ini oluşturup sınırlarını belirlemektedir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Hemoglobin proteinin moleküler yapısı-Nussbaum ve ark. (82)'ndan alınmıştır.

Hemoglobin molekülünün protein kısmı iki dimerik polipeptid zincirinin non-kovalent bağ ile birleşmesiyle (tetramerik form) oluşmaktadır. Dimer yapısında; α -globin ya da α -benzeri-globin (ζ =zeta) yapıdaki zincir ile β -globin ya da β -benzeri-globin (ϵ =epsilon, γ =gama ve δ =delta) yapıdaki zincir bulunmaktadır. Her bir protein zinciri hem molekülünü prostetik grup olarak bünyesinde barındırmaktadır; dolayısıyla tetramerik bir protein olan hemoglobinin yapısında dört adet hem molekülü vardır. α -globin zincirinde yedi adet alfa-helikal yapı mevcut iken (kısa D-heliksi bulunmaz), β -globin zinciri sekiz alfa-helikal yapıdan oluşmaktadır. α -globin polipeptidi 141 aminoasit; β -globin polipeptidi ise 146 aminoasit yapıdadır. Her ne kadar α ile β subunitlerinin aminoasit dizilimleri birbirlerinden oldukça farklı olsa da, üç boyutlu uzaysal yapıları birbirine oldukça benzemektedir (83,84). α - ve β -globin zincirlerinin primer aminoasit yapıları Şekil 2.2'dedir.

Şekil 2.2. α - ve β -globin zincirlerinin karşılaştırılması



Hemoglobin protein ailesinin tanımlanmış bazı alt tipleri mevcuttur. Bunların içindeki Hemoglobin A (HbA); yetişkinlerdeki major hemoglobin türüdür (yetişkinlerdeki total hemoglobin fraksiyonunun yaklaşık %95-%98'ini oluşturmaktadır). Yapısında " $\alpha\beta$ -polipeptid zincirinin" dimerini bulundurmaktadır. Diğer hemoglobin türlerinden Hemoglobin F (HbF); fetüs ve yenidoğanların (total hemoglobinin %80'lik kısmını oluşturabilir) major hemoglobin türüdür, yetişkin hemoglobini (HbA) senteziyle zamanla seviyesi düşmektedir (yetişkinlerdeki total hemoglobin fraksiyonunun en fazla %2'sini oluşturur). Yapısını " $\alpha\gamma$ -dimeri" oluşturmaktadır. Hemoglobin A₂ (HbA₂) total hemoglobin fraksiyonunun küçük bir bölümünü oluşturur (%2-3) ve yapısında " $\alpha\delta$ dimeri" bulunmaktadır.

Embriyo, fetüs, çocukluk ve yetişkin dönemlerde görülen genel olarak altı tip hemoglobin vardır (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Gelişimsel süreçte saptanan hemoglobin tipleri.

Hb tipi	Yapısı	Özelliği
Gower-1	$\zeta_2\varepsilon_2$	İlk üretilen hemoglobin. Major embriyonik Hb'sidir.
Gower-2	$\alpha_2\varepsilon_2$	Embriyonel dönem hemoglobini.
Portland	$\zeta_2\gamma_2$	Embriyonel dönem hemoglobini.
Fetal (F)	$\alpha_2\gamma_2$	Fetüs ve yenidoğanlarda major hemoglobin türüdür.
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	Major erişkin hemoglobin fraksiyonudur.
Hb A ₂	$\alpha_2\delta_2$	Postnatal olarak saptanabilir.

2.2.Globin genlerinin organizasyonu

α - ya da α -benzeri-globin ile β - ya da β -benzeri-globin subunitlerini kodlayan genler, iki birbirinden bağımsız gen ailesi (kümesi) tarafından farklı iki kromozom üzerinde kodlanmaktadır. α -globin zincirlerini α -gen kümesi; 16.

kromozom üzerindeki iki gen ($\alpha_1(HBA1)$ ve $\alpha_2(HBA2)$ genleri) aracılığıyla sentezlemektedir ($HBA1$: Hemoglobin Alfa Lokus-1; $HBA2$: Hemoglobin Alfa Lokus-2). Dolayısıyla α -globin polipeptidlerini her iki allelde kodlayan toplamda dört kopya gen bulunmaktadır. α -gen kümesi; bu iki genin yanında embriyonik dönemdeki hemoglobinin (Hemoglobin Gower-1 ve Hemoglobin Gower-2) α -benzeri-globin zincirlerini sentezleyen zeta (ζ) geni(HBZ) ile eksprese olmayan, psödogen olarak bulunan birtakım globin benzeri genleri de yapısında bulundurmaktadır. Her ne kadar α_1 - ve α_2 -globin genleri birbirlerinin neredeyse homoloğu olsalar da (farklılık az oranda bu genlerin 5' ve intronik bölgelerinden, daha çok ise 3' bölgelerindeki sekans dizisinden kaynaklanmaktadır (14)) yapılan ekspresyon çalışmalarında; α_2 -globin geninin α_1 -globin genine göre hem fetal hem de yetişkin hücrelerde 2,6 kat daha fazla eksprese olduğu gösterilmiştir (85). Dolayısıyla α_2 -globin geninde ortaya çıkan bir mutasyonun fenotipik etkisi α_1 -globindekine göre daha belirgin olmaktadır (86).

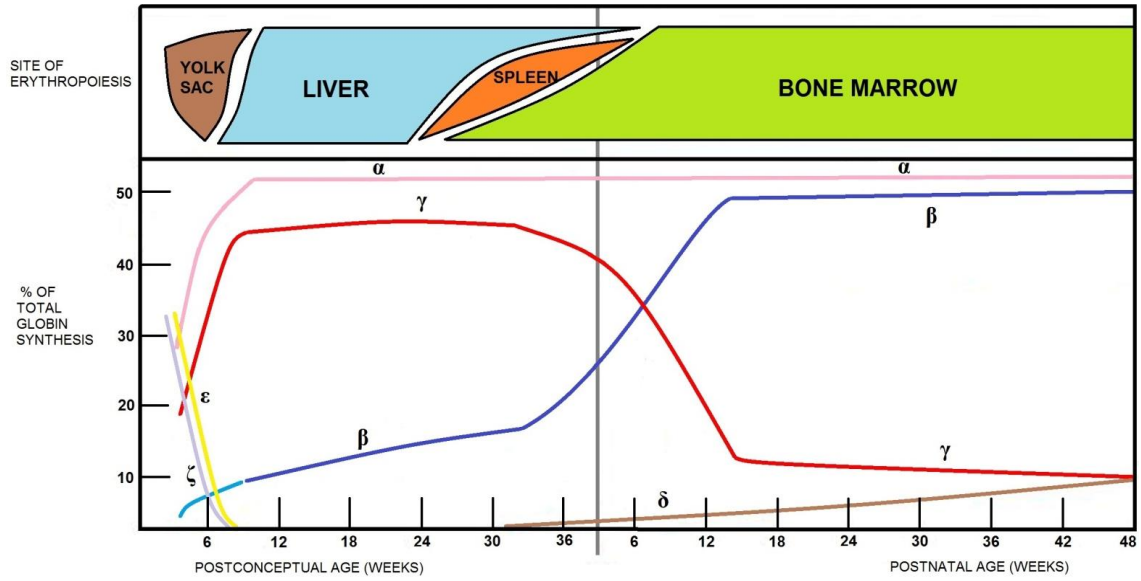
β -globin zincir sentezi 11 nolu kromozomda bulunan tek bir gen tarafından kodlanmaktadır (HBB geni). Bunun haricinde β -gen kümesinin üyesi olan dört farklı β -benzeri gen daha mevcuttur; epsilon (ϵ) geni($HBE1$), iki adet gamma (γ^G ve γ^A) geni($HBG1$ ve $HBG2$) ve delta (δ) geni(HBD). β -gen ailesinin ortak bir atasal genden "gen duplikasyonu ve non-allel gen konversiyonu" yoluyla, sekans homolojilerini koruyarak farklılaştığı düşünülmektedir (87-89). β - ile δ -globin yapılarının 146 aminoasitten sadece 10 aminoasidinin farklı olması bu evrimsel süreci doğrulamaktadır (Şekil 2.3).

Amino Acid Substitutions between the Human δ - and β -Globin Genes											
	Position	9	12	22	50	86	87	116	117	125	126
δ	Amino Acid	Thr	Asn	Ala	Ser	Ser	Gln	Arg	Asn	Gln	Met
	Codon	ACT	AAT	GCA	TCT	TCT	CAG	CGC	AAC	CAA	ATG
β	Amino Acid	Ser	Thr	Glu	Thr	Ala	Thr	His	His	Pro	Val
	Codon	TCT	ACT	GAA	ACT	GCC	ACA	CAT	CAC	CCA	GTG

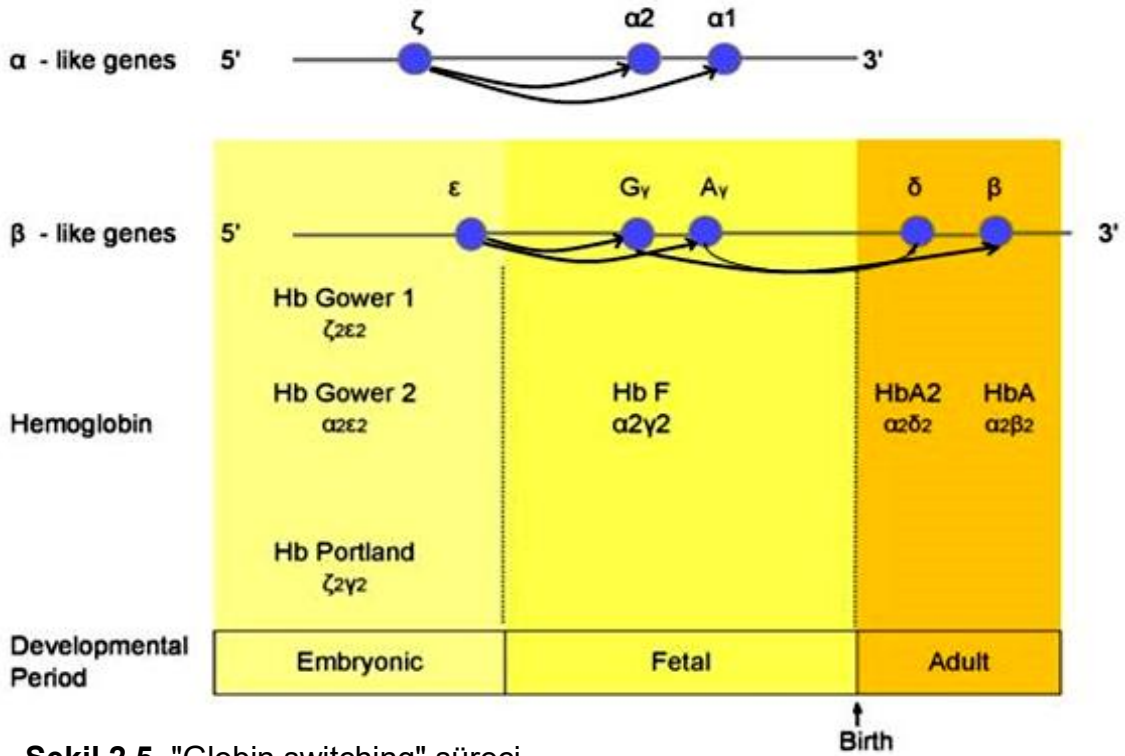
Şekil 2.3. β - ile δ -globin genlerinin birbirlerinden farklı kodladığı aminoasitler- Spritz ve ark. (17)'ndan alınmıştır.

2.3.Globin genlerinin gelişimsel süreçte ekspresyon özellikleri ve "globin switching"

α - ve β -gen kümelerini oluşturan genlerin gelişimsel sürece uygun bir sırada, benzer transkripsiyonel oryantasyonda bulunduğu gözlenmektedir. Farklı bir globin polipeptidi zincir sentezi; o dönemdeki etkin eritropoez merkezinin değişmesi ile başlamaktadır. İlk hemoglobin yapıları olan "embriyonik hemoglobinler" (Hb Gower-1, Hb Gower-2, Hb Portland) konsepsiyon ve sonrası ilk 8 haftada, yolk sak tarafından üretilmektedir. Embriyonik dönemin beşinci haftası ile birlikte hematopoezin fetal karaciğere geçmeye başlamasıyla Hb F sentezi artmaya başlar ve fetal dönemde major olarak HbF üretimi devam eder. Hematopoezin asıl yeri olan kemik iliğinin son olarak devreye girmesiyle, gebeliğin 8.ayı ile birlikte HbA sentezi başlar ve zamanla HbF'in yerini alır. Bahsedilen globin genlerinin ekspresyonunun gelişimsel sürece göre değişmelerine "globin switching" süreci de denilmektedir (90) [(Şekil 2.4), (Şekil 2.5)].



Şekil 2.4. Gelişimsel aşamada hemoglobin sentezi



Şekil 2.5. "Globin switching" süreci

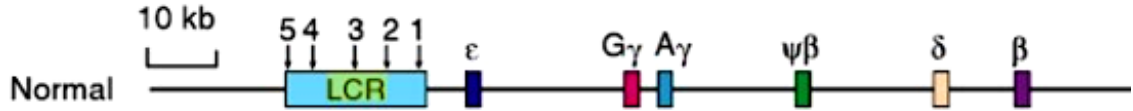
β -globin sentez eksikliğine neden olan mutasyonlar nedeniyle β -talasemi hastalığı vb. gibi durumlarda, kemik iliği sentezleyemediği β -zincirinin yerine β -benzeri-globinleri (özellikle γ -globin; sonucunda HbF oluşur) sentezleme strajisini uygulayarak bu hastalıkların klinik etkilerini azaltmaya ve kompanse etmeye çalışır. Çünkü HbF molekülü; HbA eksikliğinde ya da yokluğunda efektif bir oksijen molekülü taşıyıcısıdır. HbF'nin oksijene afinitesi HbA'dan yüksektir. Güncel tedavi yaklaşımlarında, β -globin sentez defektinde kullanılan farmasötiklerin bir kısmının amacı da işte bu yüzden HbF seviyesinin yükselmesini sağlamaya çalışmaktır (örneğin hidroksiüre).

2.4.Gelişimsel süreçte β -Gen ailesi genleri ekspresyonunun regülasyonu- Lokus kontrol bölgesi

β -gen kümesinin yaklaşık 6-kb upstream bölgesinde; ortalama 20-kb'lik uzanım gösteren "lokus kontrol bölgesi" (LCR, Locus Control Region) adı verilen bir alan bulunmaktadır (Şekil 2.6). Lokus kontrol bölgesi; eritroid hücrelerde beş

adet kromatin konfigürasyonuna açık hipersensitif bölge içermektedir (84,91). Bu konfigürasyon sayesinde transkripsiyon faktörlerinin β -globin genlerinin ekspresyonuna aracılık eden regülatuar elemanlarına bağlanmaları sağlanmaktadır. Lokus kontrol bölgesi ve beraberindeki DNA'ya bağlanan proteinler, β -gen ailesi genleri ile kompleks yaparak "aktif kromatin merkezi" yapısını oluştururlar. Aktif kromatin merkezi ile hangi β -gen ailesi geni ilişki içindeyse o genin ekspresyonu gerçekleşmektedir. Gelişimsel süreçte aktif kromatin merkezi ilk zamanlarda proksimalde yer alan ϵ -globin geni ile kompleks halinde iken; büyüme ve gelişme devam ettikçe kompleks yapı daha distaldeki globin genleriyle (δ - ve β -globin genleri) olmaktadır.

Lokus kontrol bölgesinin kaybı (delesyonu), β -gen kümesinin bütün genleri intakt durumda olsalar bile, β - ya da β -benzeri-globin subunitlerinin sentezlenememesine yol açar; bu duruma " $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talasemi hastalığı" denilmektedir.



Şekil 2.6. Lokus kontrol bölgesi lokalizasyonu-Nussbaum ve ark. (84)'ndan alınmıştır.

2.5.Hemoglobinopatiler

Hemoglobin bozuklukları (hemoglobinopatiler olarak da adlandırılmaktadır) tek gen hastalıklarının en sık görülenidir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ); dünya nüfusunun %5'inden fazlasının klinik olarak önem arz eden hemoglobinopatilerin genetik olarak taşıyıcısı olduğunu öngörmektedir. Herediter hemoglobin bozuklukları üç ana alt dalda sınıflandırılır ancak bazı klinik durumlar

her iki alt dalın özelliğini birlikte gösterebilmektedir;

1. Yapısal varyantlar: Globin polipeptid zincirindeki aminoasit dizisinin değiştiği, dolayısıyla hemoglobinin fonksiyonunda (oksijen transportu, stabilitesinde azalma vb.) değişikliklere neden olan varyantlardır. Örneğin; "Orak hücre hastalığı"nda gerçekleşen mutasyondan dolayı eritrositlerin hem kandaki çözünürlükleri azalır, hem de bikonkav yapıları oraklaşmaya başlayarak vücudun farklı bölgelerinde birikime neden olur (ağrılı krizler oluşur).

2. Talasemiler: Globin zincir sentezinin azalmasıyla ilişkili hastalıklardır (α -talasemi, β -talasemi gibi). Klinik; dimer yapısını oluşturan iki farklı globinin birbirine oranının ne kadar saptığı ile ilişkilidir.

3. Herediter Fetal Hemoglobin (HbF) Persistansı: Perinatal dönemdeki γ -globin'den β -globin sentezine geçiş aşamasında ortaya çıkan, oluşan moleküler düzeydeki bir defekt sebebiyle HbF üretiminin yüksek seviyelerde devam etmesiyle karakterize, genellikle benign klinik tablolarla karşımıza çıkan bir hastalık grubudur.

2.5.1.Hemoglobin yapısal varyantları

Varyant hemoglobinlerin çoğu, polipeptid yapısını kodlayan globin genlerinin birindeki nokta mutasyonlar sonucunda oluşmaktadır. Günümüzde 1000'in üzerinde "anormal hemoglobin" tanımlanmıştır (92). Hemoglobin yapısal varyantları klinik fenotiplerine göre 3 sınıfa ayrılabilir;

1) Hemolitik anemi tablosu yaratan varyantlar

Hemoglobin S (HbS), Hemoglobin C (HbC), Hemoglobin Hammersmith (Hb Hammersmith) gibi (hemoglobin tetramer yapısının stabilitesi azalır).

2) Oksijen transportunu değiştiren varyantlar

Methemoglobinler (Hemoglobin Hyde Park (Hb Hyde Park); β -zincir methemoglobin örneğidir), Hemoglobin Kempsey (Hb Kempsey) gibi (hemoglobinin oksijene afinitesi artar ya da azalır, methemoglobin oluşur, reversibl oksijenizasyon özelliği kaybolur).

3) Globin sentezinde azalmaya neden olan kodlayıcı bölgelerdeki mutasyonlar

Hemoglobin E (HbE) gibi (bu mutasyonların çoğu, mRNA ya da kodlanan proteinin seviyesini etkileyen diğer biyomoleküllerin sentezlenme hızlarını etkiler).

2.5.2. Anormal hemoglobin örnekleri

HbS: β -globin zincirinin altıncı kodonunda bulunan adenin bazının nokta mutasyonu sonrası timin olması; glutamik asit yerine valinin kodlanması sonucu oluşur (GAG \rightarrow GTG: Glu6Val). Bu mutasyonun her iki allelede de bulunması (homozigotluk) durumuna "orak hücre hastalığı" adı verilmektedir. Orak hücre hastalığı; düşük oksijen basıncı oluşan koşullarda kırmızı kan hücrelerinin şekillerinin oraklaşmaya başlaması ile karakterize, ciddi klinik sonuçları olabilen otozomal resesif kalıtılan bir hastalıktır. Mutasyonu tek allelerinde taşıyan (heterozigotluk) bireylere "orak hücre taşıyıcısı" denilmektedir. Taşıyıcılar klinik olarak genellikle normaldirler. Ancak in-vitro yapılan çalışmalarda oksijen basıncının oldukça düşük olduğu ortamlarda taşıyıcıların kırmızı kan hücrelerinin de oraklaşmaya başladığı gösterilmiştir. Taşıyıcı bireylerin bu durumda olması in-vivo pek beklenmez ancak uçak yolculuğu yaparken türbülans sonrası kabin basıncının düştüğü yüksek irtifa uçuşlarında ya da atletizm yarışmalarında kendilerini aşırı eforla zorlayan orak hücre taşıyıcısı bireyler splenik enfarkt açısından risk altındadırlar.

Yenidoğanların %25'inde orak hücre allelinin (β^S) heterozigotluğu görülebilmektedir.

HbC: Aynı HbS'de olduğu gibi β -globin zincirinin altıncı kodonunda nokta mutasyon sonrası glutamat aminoasidinin değişimi sonucu oluşur. Ancak burdaki değişiklik bu sefer lizin aminoasidi oluşmasına neden olur. Homozigot olarak HbC'yi yapılarında bulunduran bireylere "Hemoglobin C hastası" denilmektedir. Bu kişilerde, klinik olarak orak hücre hastalığından daha hafif seyirli olan, kronik hemolitik anemi gözlenir. Hastaların genelde enfarkt atakları geçirmeleri beklenmez ve dolayısıyla tedaviye ihtiyaçları da oluşmaz.

Bazı β -globin zincirlerinin orak hücre mutasyonunu, geriye kalan β -globin zincirlerinin ise HbC mutasyonunu taşıdığı (bileşik heterozigotluk) "**Hemoglobin SC hastalığı**" olarak isimlendirilen ayrı bir klinik durum mevcuttur. Hastaların, orak hücre hastalarına oranla hemoglobin seviyeleri daha yüksektir. Tanı; orak hücre hastalığında olduğu gibi çocukluk çağında ağrılı kriz genellikle görülmediği için gecikir. Hastalar genellikle herhangi bir ameliyat ya da doğum eylemi sonrasında gelişen ve ölümcül olabilen enfarktif krizler ile tanı alabilmektedir.

HbE: Özellikle Güneydoğu Asya'da yüksek oranda görülen (1 milyon kişinin homozigot, 30 milyon kişinin heterozigot olarak HbE taşıdığı öngörülmektedir) β -globin zincirinin 26. sırasındaki glutamatın nokta mutasyon sonrası (GAG \rightarrow AAG) lizin aminoasidi şeklinde kodlanması ile oluşan varyant hemoglobinlerden birisidir. HbE; "alternatif splicing bölgesi" aktivasyonu yaparak normal splicing bölgesi ile yarışmalı inhibisyona sebep olur. Alternatif splicing yolağının kullanımı ile her ne kadar RNA'nın yine de çoğunluğu normal bölgesinde splicing'e uğrasa da (%60 normal yolak, %40 alternatif yolak kullanılır), β -globin zinciri üretimi azalır.

HbE yapısını homozigot olarak taşıyanlar bile hafif anemik ya da asemptomatikler; ancak bu yapıyı başka bir β -talasemi oluşturabilecek mutasyon ile birlikte taşıyanlarda (bileşik heterozigotluk durumu), taşınan mutasyonun β -talasemi oluşturma ağırlığına göre anormal klinik fenotipler görülebilmektedir.

Hb Hammersmith: Mutasyon sonucu β -globin zincirinin 42. sırasında bulunan fenilalaninin yerine serin aminoasidinin kodlanması ile oluşur. 'Hem' biyomolekülünün "cep" yapısını oluşturup, sınırlarını belirleyen fenilalaninin (Phe42) serin aminoasidi ile yer değiştirmesi sonucu serin aminoasidinin daha küçük yan zincir rezidülerinin olması nedeniyle yapısal bir boşluk oluşur ve hem molekülü bu cebi terkeder. Bunun sonucunda Hb Hammersmith hem stabilitesini kaybeder hem de oksijene afinitesi azalır; dolayısıyla heterozigot bireyler siyanoz tablosu ile prezente olurlar.

HbD: HbS ve HbC'den sonra en sık görülen hemoglobin varyantlarından birisidir. HbD-Punjab (ya da diğer adıyla HbD-Los Angeles); toplumda HbD yapısının en fazla görüldüğü alt tiptir. β -globin geninin 121. sırasında glutamik asidi kodlayan kodonun nokta mutasyonu sonucu glutamin aminoasidini kodlamasıdır (*HBB*:c.364G>C, p.Glu121Gln). Bunun haricinde HbD yapısı oluşturan yedi farklı alt tip daha mevcuttur; HbD-Agri (*HBB*:c.29C>A), HbD-Bushman (*HBB*:c.49G>C), HbD-Ouled Rabah (*HBB*:c.60C>A ya da c.60C>G), HbD-Iran (*HBB*:c.67G>C), HbD-Granada (*HBB*:c.68A>T), HbD-Ibadan (*HBB*:c.263C>A), HbD-Neath (*HBB*:c.365A>C).

HbO-Arab: HbD yapısından farklı olarak β -globin zincirinin 121. sırasındaki glutamatın lizin aminoasidi şeklinde kodlanması sonucu oluşan varyant hemoglobindir (*HBB*:c.364G>A, p.Glu121Lys). Heterozigot olarak HbO-Arab yapısı taşıyanlarda (HbO-Arab taşıyıcıları) herhangi bir klinik bulgu gözlenmez. Homozigot olanlar ise literatürde pek bildirilmemiştir ancak hafif hemolitik anemi ve splenomegali görülebilmektedir. HbO-Arab taşıyıcılarında, HbE'yi heterozigot taşıyanlarda da olduğu gibi, klinik prezentasyon ciddi hemoliz bulguları, ciddi mikrositozis bulgularını gösteriyor ise bu olgularda mutlaka diğer allel başka bir mutasyon varlığı açısından değerlendirilmelidir.

Methemoglobinler: Hemoglobinin oksijen transport fonksiyonunu değiştiren mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Hemoglobin yapısında bulunan

hem biyomolekölü ferröz demir(Fe^{+2}) ile kompleks yapmıştır. Bu yapı sayesinde hemoglobinler reversibl oksijenasyon yapabilmektedir. Ferröz demir iyonu spontan olarak oksidasyona uğrama eğilimindedir; bunun sonucunda ferrik form (Fe^{+3}) oluşur. Yapısında ferrik formda demir iyonu bulunduran hemoglobine **methemoglobinler** denir. Methemoglobinler reversibl oksijenasyon yapamazlar. Kandaki seviyeleri yükseldikçe siyanoz tablosu ortaya çıkmaktadır. Ferrik formdaki demir iyonunun (Fe^{+3}) tekrar ferröz forma indirgenmesini "methemoglobin redüktaz" enzimi sağlamaktadır. Hem biyomolekölünü içerisinde barındıran "cep" yapısındaki değişikliklere neden olan α - ya da β -mutant globin varlığında hem-globin bağı etkilenir ve sonucunda demir iyonu methemoglobin redüktaz enzimine dirençli hale gelir. Methemoglobin oluşturacak mutasyonu heterozigot olarak taşıyanlar siyanotik görünümde olsalar da genellikle asemptomatiktirler. Fakat mutasyonu homozigot olarak taşıyanlarda klinik tablo ölümcüldür. β -zincir methemoglobin örneklerinden birisi "Hb Hyde Park"tır. Bu hemoglobin yapısında hem biyomolekölüne bağlanan histidin (His92) yerine tirozin aminoasidi bulunmaktadır.

Hb Kempsey: β -globin zincirinin 99. sırasındaki aspartik asidin asparajin aminoasidi şeklinde kodlanması sonucu oluşan; hemoglobinin oksijene afinitesinin artmasına neden olan varyant hemoglobindir. Oksijen afinitesi artmış olan hemoglobin ise oksijen molekülünü yapısından kolaylıkla bırakmaz, dokulara daha az oksijen sunar; bunun sonucunda polisitemi tablosu kaçınılmazdır.

Hb Constant Spring: α_2 -globin geninde stop kodon oluşturan bir mutasyon sonucu oluşan anormal hemoglobinlerden birisidir. Daha çok Güneydoğu Asya ve Çin'de görülmektedir. α -talaseminin nondelesyonel mutasyonları arasında en sık görülen formudur.

HbG-Philedelphia: α_2 -globin geninin 68. sırasındaki lizin aminoasidinin nokta mutasyon sonrası asparajin şeklinde kodlanması ile oluşan α -globin

varyantlarından birisidir. HbG-Philedelphia yapısı bazı bireylerde delesyonel α -talasemi mutasyonu ile birliktelik gösterebilmektedir. Dolayısıyla HbG-Philedelphia saptanan bireyler klinik olarak değerlendirilmeli, dört kopya halinde bulunan α -globin genlerinin delesyon açısından da analiz edilmeleri gerekmektedir (93).

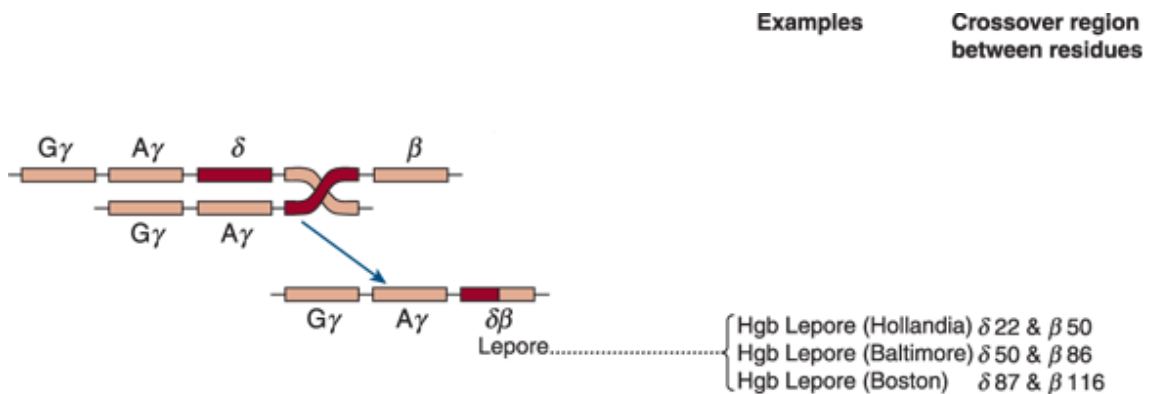
Hb Lepore: α -globin zincir yapısı normal olmasına rağmen diğer globin zincirinin δ - ve β -globin genlerinin homolog olmayan eşleşmesi ve dengesiz crossing-over'ı sonrası oluşmuş bileşik δ - β geninin hibrit globin zinciri eksprese ettiği yapısal hemoglobin varyantıdır. Sentezlenen proteinin N-terminalini δ -globin geni eksprese ederken, C-terminalini β -globin geni eksprese eder. 5' ve 3' uçtaki δ - ve β -globin genlerinin kırık noktalarına göre pek çok Hb Lepore tanımlanmıştır.

En çok bilinen üç Hb Lepore;

Hb Lepore-Hollandia \longrightarrow 5'- δ 22/ β 50-3'

Hb Lepore-Baltimore \longrightarrow 5'- δ 50/ β 86-3'

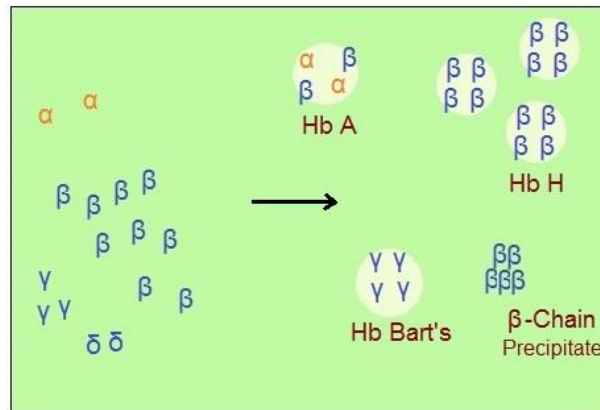
Hb Lepore-Baston \longrightarrow 5'- δ 87/ β 116-3' dir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Hb Lepore yapısı örnekleri-Kaushansky ve ark. (94)'ndan alınmıştır.

2.5.3. Alfa talasemiler

α -globin zinciri sentezini azaltan ya da engelleyen defektler " α -talasemi" denilen klinik tabloya neden olurlar. α -globin genleri 16. kromozom üzerinde dört kopya halinde bulunduğu için α -globin zincir eksikliklerinin farklı seviyeleri mevcuttur. Dört genden bir tanesi defektif ise bu duruma " α -talaseminin sessiz taşıyıcılığı" denmektedir; çünkü bireylerde herhangi bir klinik prezentasyon ya da hastalık gözlenmez. Eğer dört genden ikisinde defekt var ise bu durum " α -talasemi taşıyıcılığı (trait)" olarak isimlendirilmektedir. Üç defektif α -globin genine sahip olanlarda "Hemoglobin H" hastalığı oluşmaktadır. Bu hastalıkta şiddeti hafiften ciddi seviyelere kadar varabilen spektrumda hemolitik anemi gözlemlenmektedir. Tüm α -globin genleri defekte uğradığında ise bu durum "hidrops fetalis"e neden olur (Şekil 2.8). Gelişimsel aşamada, α -globine rağmen diğer tarafta ilk olarak γ - sonra ise β -globin zincirlerinin üretimi devam eder ve α -globin ile bu globinler tetramer yapısı oluşturamadıkça kendileri tetramer yapısı yaparlar; sonuçta Hb Barts(γ_4) veya HbH(β_4) tetramerleri oluşur. Her ne kadar bu tetramerler çökelmeyip suda çözünür durumda olsalar da hem-hem etkileşimi göstermezler, oluşan tetramerlerin oksijen afiniteleri oldukça yüksektir; bu durum da oksijen kullanımını oldukça azaltır. HbF fetal dönemin major hemoglobin yapısı olduğundan dört α -globin geninin de defektif olması yaşama bağdaşmaz ve fetal kayıp "hidrops fetalis" şeklinde olmaktadır.




Şekil 2.8. α -talasemi genotipik prezentasyonu

2.5.4. Beta talasemiler

α -globin zinciri sentezi normal iken β -globin zincir sentezi azalmış ya da yoktur. α -globin zincirleri β -globin zincirleri gibi kendi kendilerine tetramer yapısı oluşturamazlar; dolayısıyla α -globin tetramerleri kanda presipitat formda kalırlar. Bu durum olgun kırmızı kan hücresi üretilmeden hücrelerin erken hücre ölümüne yönlendirilmelerine sebep olur. 11. kromozomların her biri üzerinde yalnızca tek bir β -globin geni bulunduğundan α -talasemilerden farklı olarak β -talasemide iki klinik form oluşur;

- Eğer β -globin genlerinden yalnızca bir tanesi defektif ise bu duruma " β -talasemi taşıyıcılığı (trait, minör)" denilmektedir.
- Her iki alleldeki β -globin geni defektinde ise " β -talasemi hastalığı (major)" kliniği oluşur. β -talasemi majorde klinik bulgular genellikle doğumdan sonra altıncı ay ile birlikte başlamaktadır. Çünkü β -globin genleri geç dönem fetal gestasyona kadar eksprese olmazlar. β -talasemi majorlu hastalar kan transfüzyonuna ihtiyaç duyarlar. Kan transfüzyonu aslında β -talasemili hastalarda hayat kurtarıcıdır ancak yan etkisi olan "hemosiderozis" nedeniyle hastalar ileriki yaşlarda hayatlarını kaybetmektedirler.

β -talasemide bazı mutasyonlar β -globin sentezini azaltırken (β^+), bazı mutasyonlar sentezini tamamen durdururlar (β^0). Sentezin az da olsa olması (β^+) prognozun diğer forma göre (β^0) daha iyi olacağını göstermektedir.

α -thalassemia	β -thalassemia	Features
Normal	Normal	
α -thalassemia trait	β -thalassemia trait	
Hb H disease	β -thalassemia intermedia	
Hb Bart's hydrops fetalis	β -thalassemia major	

Şekil 2.9. α - ve β -talasemi klinik formları-Patrinov ve ark. (95)'ndan alınmıştır.

α -talaseminin genetik etiyolosinde delesyonel mutasyonlar yaklaşık %80'lik kısmı oluşturur iken; β -talasemide genetik etyolojinin %90'ı nokta mutasyonlarca oluşmaktadır (96,97).

2.6.Hemoglobin elektroforezi

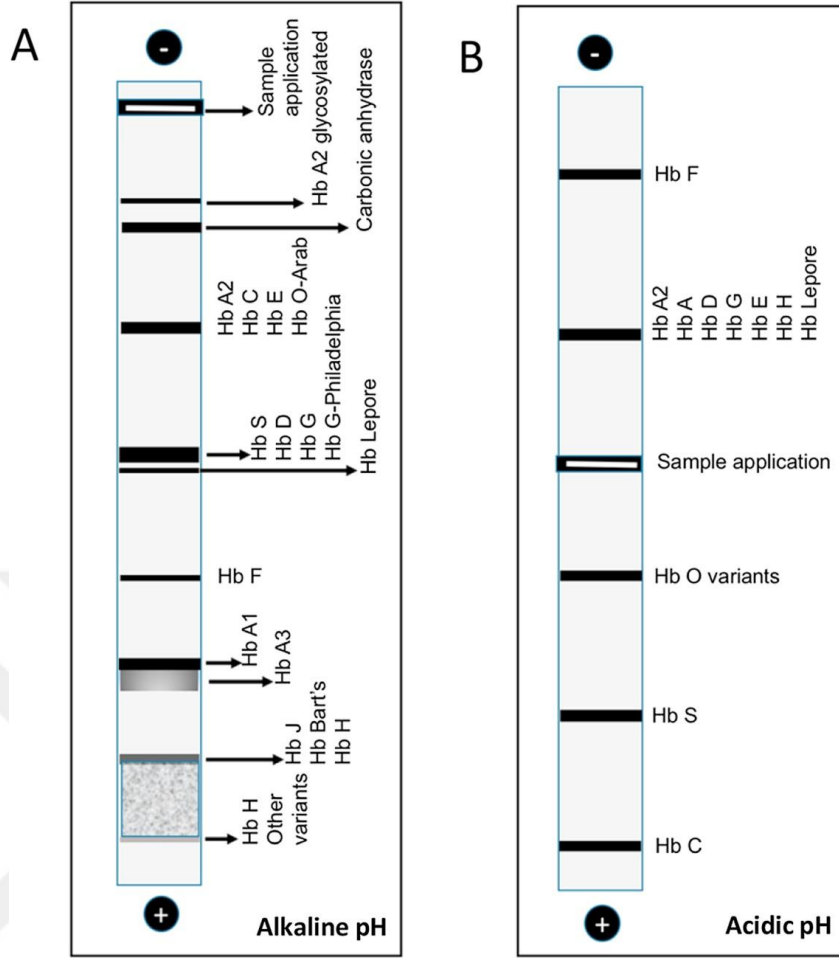
Hemoglobin elektroforezi başta talasemi hastalığı, taşıyıcılığı ya da anormal hemoglobin varyantları (hemoglobinopati) olasılığının araştırılması amacıyla yapılan, hemoglobin türlerinin yük, büyüklük ve topolojik özelliklerine göre ayrılmasına olanak veren bir kan testidir.

2.6.1.Selüloz asetat ile Hb elektroforezi

Elektroforez selüloz asetat nedeniyle alkali ortamda gerçekleştirilir (pH: 8,2-8,6). Bu yöntemle HbA, HbF, Hb S/G/D, Hb A₂/C/E/O-Arab bantları tespit edilebilir. Hb S/G/D bandı ya da Hb A₂/C/E/O-Arab bandı tespit edildiğinde ayrımları yapılmalıdır. Sitrat agar veya asidik agaroz jel gibi asit pH'da yürütme bu bant yapılarını ayırmada kullanılan yöntemler arasındadır.

2.6.2.Sitrat agar veya asidik agaroz jel ile Hb elektroforezi

Asidik ortamda (pH:6,0-6,2) Hb elektroforezi ile HbS; HbG ve HbD'den ayrılabilir. Yine HbC; HbO-Arab ve HbE'den ayrılabilir. HbF tespitinde asidik ortamdaki elektroforezler alkali ortamdakilere göre daha sensitiftirler (98). Bu metod genellikle selüloz asetat elektroforezi sonrasında saptanan hemoglobin varyantlarının konfirmasyonu ve nihai neticelendirilmesi amacıyla yapılmaktadır (98,99); ancak yine de HbD-Punjab'ı HbG'den ayırt edememektedir (Şekil 2.10) (98).



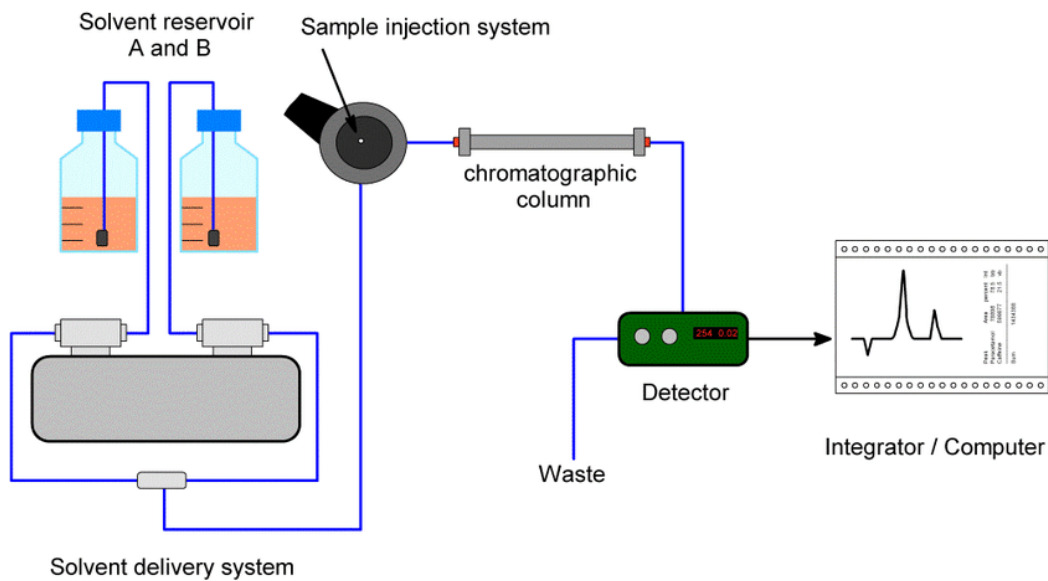
Şekil 2.10. Alkali ve asidik ortamda yapılan Hb elektroforezi bant paternleri- Barrett ve ark. (98)'ndan alınmıştır.

2.6.3.Yüksek basınçlı ya da yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

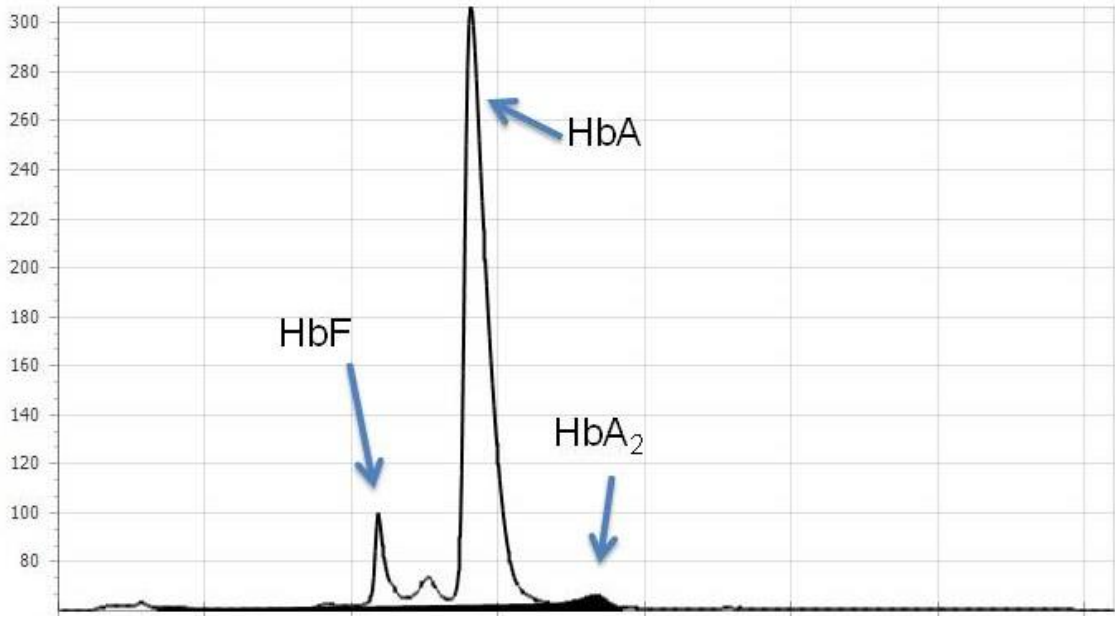
Özellikli solüsyonda yüksek basınç altında çözülmüş bileşenlerin katı bir destek ortamı (sabit faz) olan küçük kolonlar içerisinde önceden programlanmış zaman aralığında değişik etkileşimlere girmesi, sorbent partiküllerden yapılmış bu kolonlar içinde değişik hızlarla hareket etmeleri, farklı zamanlarda bileşenlerin elüsyonu ile (retansiyon zamanı olarak da isimlendirilmektedir) kolonu terk ederek birbirlerinden ayrılması temeline dayanır. Farklı hemoglobin yapılarının farklı retansiyon zamanı olduğundan ayrımları bu şekilde sağlanabilmektedir. HbA, HbF, HbS, HbC ve HbD'nin farklı retansiyon zamanları olduğundan bu

hemoglobinler HPLC yönteminde kendi isimleri ile pik verirler. HbA₂ ile HbE'nin retansiyon zamanları aynıdır; dolayısıyla HbA₂-HbE ayrımı mümkün olamayabilir. Bu nedenle E/β⁰-talasemi ile homozigot HbE ayrımı güçleşir (98). E/β⁰-talasemi ile homozigot HbE ayrımında; kapiller zon elektroforezi (HbE varlığında bile HbA₂ seviyesini net olarak saptayabilir), HbF seviyesinin değerlendirilmesi (homozigot HbE'de HbF seviyesi kısmen daha düşüktür), HbA₂ ile HbF seviyelerinin hesaba katıldığı bir takım formüller (EE skoru ($7,3 \times \text{HbA}_2 + \text{HbF}$; >60 ise E/β⁰-talasemi, <60 ise homozigot HbE ya da $\text{HbA}_2 > 6,0\%$, $\text{MCV} < 55 \text{fL}$, $\text{HbF} 5\% - 15\%$ ise E/β⁰-talasemi, $\text{HbA}_2 > 6,0\%$, $\text{MCV} < 55 \text{fL}$, $\text{HbF} < 5\%$ ise homozigot HbE ya da $(6 \times \text{HbA}_2 + \text{HbF}) / \text{MCV}$; $> 0,9$ ise E/β⁰-talasemi, $< 0,9$ ise homozigot HbE) kullanılmaktadır (100-105). Ancak yine de kesin tanı genellikle DNA analizi sonrasında konulmaktadır.

HbA₂ pikinin %6,5-%14 olduğu durumlarda Hb Lepore yapısının; HbA₂ pikinin %25-30 olduğu durumlarda da HbE taşıyıcılığının olabileceği akılda tutulmalıdır. Dolayısıyla koelüsyondan şüphelenilen durumlarda diğer varyant yapıyı tespit edebilmek ve HbA₂'den ayırabilmek için farklı ikinci bir metod kullanılmalıdır (98). HPLC'de HbA₂ ile birlikte Hb Lepore ve Hb E haricinde yürüyen hemoglobinler; Hb Kenya, HbG-Accra ve Hb Spanish Town'dur.



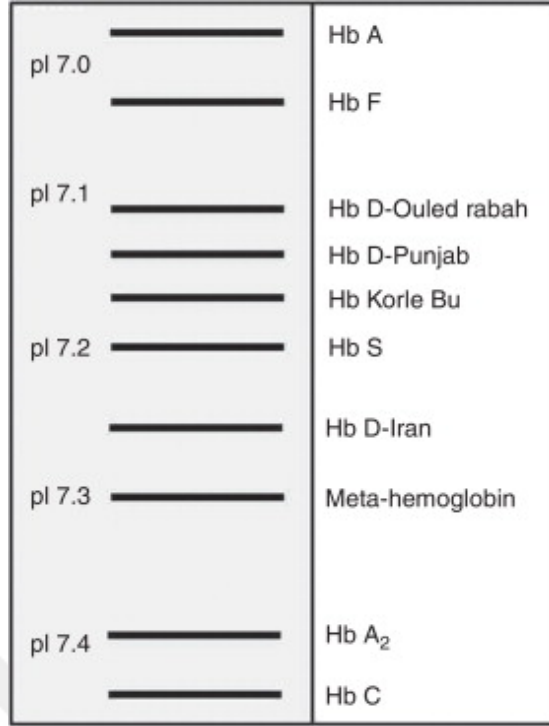
Şekil 2.11. HPLC çalışma prensibi-Scherf-Clavel (106)'dan alınmıştır.



Şekil 2.12. HPLC yöntemi ile yapılmış hemoglobin elektroforezi örneği

2.6.4. İzoelektrik odaklama (Elektrofokus yöntemi)

Amfoterik molekülleri (özellikle proteinleri) pH gradientine sahip jel ortamında izoelektrik noktalarına (pI) göre elektroforezle ayırma tekniğidir. Hemoglobin yapıları elektriksel alanda kendilerine özgü izoelektrik noktalarıyla uyumlu pH noktasına göç eder (107,108). Diğer yöntemlerden farkı çok daha farklı ve fazla sayıda anormal Hb varyantının ayırt edilebilmesine olanak sağlamasıdır. HbF'nin HbA'dan ayrılmasında ve HbS, HbC, HbE, HbD-Punjab ve HbO-Arab varyantlarının ayırt edilmesinde güzel sonuçlar vermekle birlikte en önemli dezavantajlarından birisi HbA₂ seviyesini net olarak saptayamamasıdır (98).



Şekil 2.13. İzoelektrik odaklama yönteminde hemoglobin yapılarının bant paternleri-Torres LdeS ve ark. (109)'ndan alınmıştır.

2.6.5.Kapiller zon elektroforezi

Silika cam kapiller tüpler içerisinde alkali pH elektrolit sayesinde bazik koşullarda gerçekleştirilen elektroforez yöntemidir. Yapısında bulunan bir dedektöre oldukça yüksek voltaj altında (9800V civarında) hemoglobin moleküllerinin kendilerine özgü yük ve hareket özelliklerine göre farklı hızlarda göç etmeleri prensibine dayanır. Standart kullanılan elektroforez yöntemlerinde ortalama 310-350V kullanılır iken kapiller zon elektroforezinde bu şekilde oldukça yüksek voltaj uygulanması hemoglobin varyantlarının fraksiyonlarının ayrılmasında daha net rezolüsyon sağlamaktadır (110). 415 nm'de absorpsiyon fotometri kullanılarak hemoglobin molekülleri HbA ve HbA₂'nin bantlarına göre standardize edilmiştir.

Kapiller elektroforez; HbA, HbF ve HbA₂ piklerini oldukça doğru ölçebilmekte ve HPLC yönteminin en önemli dezavantajı olan HbA₂'yi HbE-Hb-

Lepore'den ve HbS'den ayırabilmektedir (111-114). Kapiller zon elektroforezinin önemli dezavantajlarından birisi ise HbH tespitinin HPLC yöntemine göre daha zor olmasıdır (115).

Yukarıda bahsedilen dört temel hemoglobin elektroforez yönteminin avantaj ve dezavantajları Tablo 2.2'de belirtilmiştir.

Tablo 2.2. Temel Hb elektroforez yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları-
Barrett ve ark. (98)'ndan alınmıştır.

The advantages and disadvantages of the four main methods for measurement of haemoglobin.

Method	Advantages	Disadvantages
HPLC	Automated – high throughput; Rapid results; Low sample input; Good separation for Hb-A, -A ₂ -F, -S, -C, -D-Punjab, -G-Philadelphia; Accurate HbA ₂ quantification; HbH and Hb-Barts can be detected, but not quantified. Can detect Hb-constant spring.	Regular calibration needed; Possibility of column defects; Unable to separate HbE/Hb-Lepore/HbA ₂ and HbS derivatives/HbA ₂
CE	Semi-automated; Excellent separation; Rapid results; Low sample input; Quantifies Hb-A, -F, -A ₂ ; Discriminates HbA ₂ /E/S; Provisionally identifies Hb-S, -C, -D-Punjab, -G-Philadelphia, E; Separates Hb-Lepore/E/C/A ₂ . Can detect Hb-constant spring	Difficult to discriminate HbH; Need to add control material if HbA not present.
IEF	Semi-automated – high throughput; Separates more variants than CAE; Sharp bands produced; Useful for screening dried blood spots; Good separation for Hb-A, -F, -S, -C, -D-Punjab, -E, and -O-Arab; Can identify Hb-Barts.	Separates Hb into post-translational derivatives; Cannot separate HbA ₂ /E/O-Punjab; Not reliable for quantification of HbA ₂
CAE	Simple; Low cost; Can provide provisional identification of Hb-A and -F.	Time-consuming procedure; Low throughput; High cost; Cannot separate HbS/G/D, HbC/E/O-Arab, or HbC/E/A ₂ ; Quantification of HbA ₂ not accurate – bands must be eluted, which is laborious, and has potential for contamination.

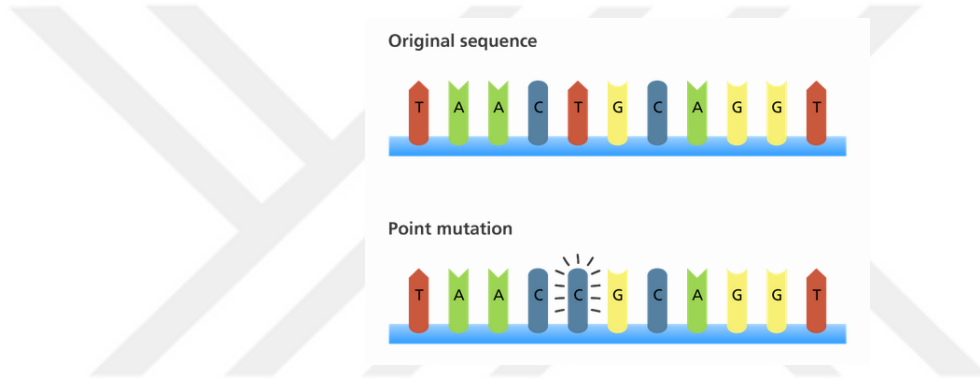
CE: Kapiller Elektroforez
IEF: İzoelektrik Odaklama
CAE: Selüloz Asetat ile Hb Elektroforezi

2.7. Mutasyon tanımı, tipleri ve yorumlanması

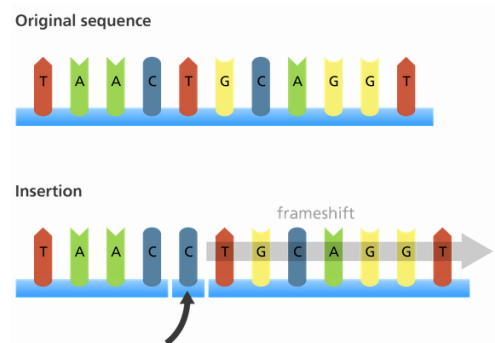
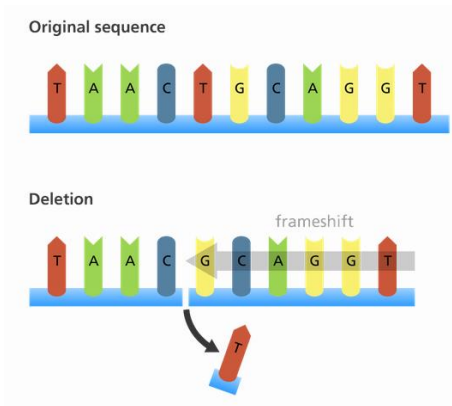
DNA sekansında oluşan değişimlere “mutasyon” adı verilir. Bu değişim; DNA replikasyonu sırasındaki bir hataya bağlı olarak gerçekleşebileceği gibi çevresel (UV, sigara, güneş ışığı, radyasyon) etkenler nedeniyle de gerçekleşebilir. DNA’da meydana gelebilecek çok sayıda farklı mutasyon vardır;

1. Küçük Ölçekli Mutasyonlar (Small-Scale Mutations)

a) Nokta Mutasyon: DNA dizilimindeki tek bir bazın değişimi (sessiz (silent) mutasyon, yanlış anlamlı (missense) mutasyon, anlamsız (nonsense) mutasyon).

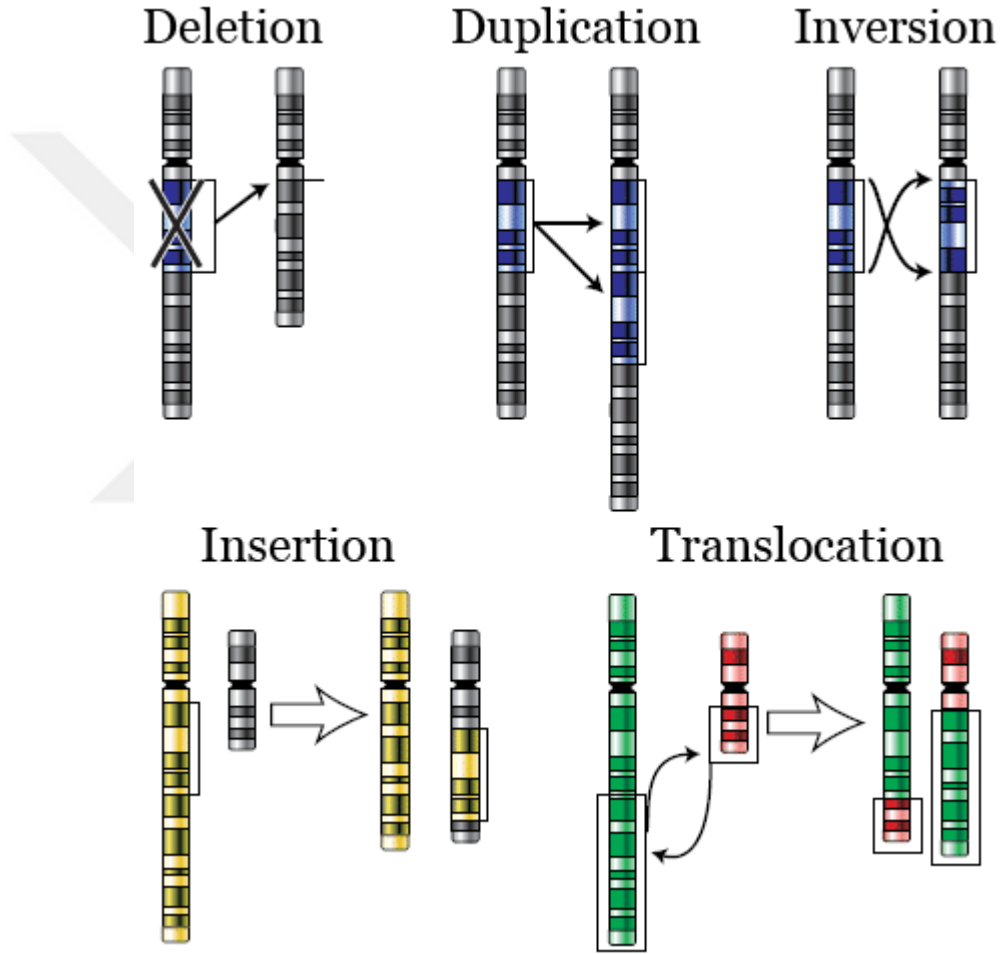


b) Çerçeve kayması (Frameshift) Mutasyonu: Okuma çerçevesinde kaymaya neden (üç ve üçün katları olmayan değişimler sonucu kodonların değişmesi) olan ve genellikle beklenen yerin öncesinde stop kodon oluşturarak erken zincir sonlanması oluşturan mutasyonlardır. İnsersiyon ya da delesyon sonrası oluşabilir.



2. Büyük Ölçekli Mutasyonlar (Large-Scale Mutations)

- Delesyon/Duplikasyon mutasyonları (İndels)
- Ters dönme (inversiyon) mutasyonu
- Araya eklenme (İnsersiyon) mutasyonu
- Translokasyon mutasyonu



2015 yılında Richards ve arkadaşları saptanan herhangi bir mutasyonun yorumlanması ile ilgili birtakım kriterler oluşturmuşlardır (Tablo 2.3, Tablo 2.4, Tablo 2.5).

Tablo 2.3. Patojenik varyant diyebilmek için gerekli kriterler- Richards ve ark. (203)'ndan alınmıştır.

Evidence of pathogenicity	Category
Very strong	<p>PVS1 null variant (nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where LOF is a known mechanism of disease</p> <p>Caveats:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Beware of genes where LOF is not a known disease mechanism (e.g., <i>GFAP</i>, <i>MYH7</i>) • Use caution interpreting LOF variants at the extreme 3' end of a gene • Use caution with splice variants that are predicted to lead to exon skipping but leave the remainder of the protein intact • Use caution in the presence of multiple transcripts
Strong	<p>PS1 Same amino acid change as a previously established pathogenic variant regardless of nucleotide change</p> <p>Example: Val→Leu caused by either G>C or G>T in the same codon</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level</p> <p>PS2 De novo (both maternity and paternity confirmed) in a patient with the disease and no family history</p> <p>Note: Confirmation of paternity only is insufficient. Egg donation, surrogate motherhood, errors in embryo transfer, and so on, can contribute to nonmaternity.</p> <p>PS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies supportive of a damaging effect on the gene or gene product</p> <p>Note: Functional studies that have been validated and shown to be reproducible and robust in a clinical diagnostic laboratory setting are considered the most well established.</p> <p>PS4 The prevalence of the variant in affected individuals is significantly increased compared with the prevalence in controls</p> <p>Note 1: Relative risk or OR, as obtained from case-control studies, is >5.0, and the confidence interval around the estimate of relative risk or OR does not include 1.0. See the article for detailed guidance.</p> <p>Note 2: In instances of very rare variants where case-control studies may not reach statistical significance, the prior observation of the variant in multiple unrelated patients with the same phenotype, and its absence in controls, may be used as moderate level of evidence.</p>
Moderate	<p>PM1 Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation</p> <p>PM2 Absent from controls (or at extremely low frequency if recessive) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium</p> <p>Caveat: Population data for insertions/deletions may be poorly called by next-generation sequencing.</p> <p>PM3 For recessive disorders, detected in <i>trans</i> with a pathogenic variant</p> <p>Note: This requires testing of parents (or offspring) to determine phase.</p> <p>PM4 Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a nonrepeat region or stop-loss variants</p> <p>PM5 Novel missense change at an amino acid residue where a different missense change determined to be pathogenic has been seen before</p> <p>Example: Arg156His is pathogenic; now you observe Arg156Cys</p> <p>Caveat: Beware of changes that impact splicing rather than at the amino acid/protein level.</p> <p>PM6 Assumed de novo, but without confirmation of paternity and maternity</p>
Supporting	<p>PP1 cosegregation with disease in multiple affected family members in a gene definitively known to cause the disease</p> <p>Note: May be used as stronger evidence with increasing segregation data</p> <p>PP2 Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease</p> <p>PP3 Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.)</p> <p>Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm should not be counted as an independent criterion. PP3 can be used only once in any evaluation of a variant.</p> <p>PP4 Patient's phenotype or family history is highly specific for a disease with a single genetic etiology</p> <p>PP5 Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation</p>

LOF, loss of function; OR, odds ratio.

Tablo 2.4. Benign varyant diyebilmek için gerekli kriterler- Richards ve ark. (203)'ndan alınmıştır.

Evidence of benign impact	Category
Stand-alone	BA1 Allele frequency is >5% in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium
Strong	BS1 Allele frequency is greater than expected for disorder
	BS2 Observed in a healthy adult individual for a recessive (homozygous), dominant (heterozygous), or X-linked (hemizygous) disorder, with full penetrance expected at an early age
	BS3 Well-established in vitro or in vivo functional studies show no damaging effect on protein function or splicing
	BS4 Lack of segregation in affected members of a family Caveat: The presence of phenocopies for common phenotypes (i.e., cancer, epilepsy) can mimic lack of segregation among affected individuals. Also, families may have more than one pathogenic variant contributing to an autosomal dominant disorder, further confounding an apparent lack of segregation.
Supporting	BP1 Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease
	BP2 Observed in <i>trans</i> with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder or observed in <i>cis</i> with a pathogenic variant in any inheritance pattern
	BP3 In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function
	BP4 Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.) Caveat: Because many in silico algorithms use the same or very similar input for their predictions, each algorithm cannot be counted as an independent criterion. BP4 can be used only once in any evaluation of a variant.
	BP5 Variant found in a case with an alternate molecular basis for disease
	BP6 Reputable source recently reports variant as benign, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation
	BP7 A synonymous (silent) variant for which splicing prediction algorithms predict no impact to the splice consensus sequence nor the creation of a new splice site AND the nucleotide is not highly conserved

Tablo 2.5. Mutasyonların yorumlanması- Richards ve ark. (203)'ndan alınmıştır.

Pathogenic	(i) 1 Very strong (PVS1) AND
	(a) ≥ 1 Strong (PS1–PS4) OR
	(b) ≥ 2 Moderate (PM1–PM6) OR
	(c) 1 Moderate (PM1–PM6) and 1 supporting (PP1–PP5) OR
	(d) ≥ 2 Supporting (PP1–PP5)
	(ii) ≥ 2 Strong (PS1–PS4) OR
	(iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND
	(a) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR
	(b) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 Supporting (PP1–PP5) OR
	(c) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Likely pathogenic	(i) 1 Very strong (PVS1) AND 1 moderate (PM1–PM6) OR
	(ii) 1 Strong (PS1–PS4) AND 1–2 moderate (PM1–PM6) OR
	(iii) 1 Strong (PS1–PS4) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR
	(iv) ≥ 3 Moderate (PM1–PM6) OR
	(v) 2 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 2 supporting (PP1–PP5) OR
	(vi) 1 Moderate (PM1–PM6) AND ≥ 4 supporting (PP1–PP5)
Benign	(i) 1 Stand-alone (BA1) OR
	(ii) ≥ 2 Strong (BS1–BS4)
Likely benign	(i) 1 Strong (BS1–BS4) and 1 supporting (BP1–BP7) OR
	(ii) ≥ 2 Supporting (BP1–BP7)
Uncertain significance	(i) Other criteria shown above are not met OR
	(ii) the criteria for benign and pathogenic are contradictory

3.GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırma; Mart 2013, bu tarih laboratuvarımızca *HBB* geninin sanger sekans yöntemi ile dizilenmeye başladığı tarihtir, -Ağustos 2018 yılları arası Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Tanı ve Tedavi Merkezi'ne başvurmuş toplam 566 kişiden; araştırmaya dahil edilme kriterlerini karşılayan 80 olgu ve 20 sağlıklı kontrol birey olmak üzere toplam 100 kişiye ait retrospektif veriler kullanılarak yürütüldü. Bu bireylere ait hedef *KLF1* ve *HBD* genlerinin genotiplenmesi için yine Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Tanı ve Tedavi Merkezine ait alt yapı olanaklarından yararlanılmıştır.

3.1.Kişilerin bilgilendirilmesi, aydınlatılmış onam ve etik kurul onayı

Araştırmaya dahil edilen olgu ve kontrol grubundaki bireyler laboratuvar kayıtlarımızdaki iletişim bilgileri kullanılarak polikliniğimize davet edildi. Bu araştırma hakkında kendilerine bilgi verildi. Katılma onamı veren bireylerin daha önceden *HBB* geni analizleri için vermiş oldukları biyolojik materyallerin yeterliliği kontrol edildi; yeterli olanlardan yeniden periferik kan örneği istenmedi. Yetersiz olduğu tespit edilenlerden ise onam formu imzalatılarak tekrardan EDTA'lı 5ml periferik kan örneği alınması planlandı.

Araştırmanın etik açıdan uygunluğu "Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu" tarafından 17.10.2018 tarih ve 2018-18 nolu kararı ile onaylandı. Araştırmanın finansmanı kendi imkânlarımızla sağlandı; birtakım idari aksaklıklar nedeniyle ÇOMÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (BAP) başvuru yapılamadı.

3.2.Olgu gruplarının seçimi

Hemoglobin elektroforezinde HbF yüksekliği (>2%) veya HbA₂ seviyesi anormalliği saptanıp ileri değerlendirme, tanı için yönlendirilmiş ya da doğrudan başvurmuş ve genetik etyoloji için *HBB* geni sanger sekans dizilemesi yapılmış olgulara ait dosyalar retrospektif olarak tarandı. İletişim kurulabilen, araştırmaya katılma onamı veren ve hemoglobin elektroforez analizi HPLC yöntemi ile yapıp sonuçlarına ulaşılabilenler araştırmaya dahil edildi.

Elektroforez sonuçlarına göre "HbF yüksekliği" diyebilmek için sınır değer 2%, "HbA₂ düşüklüğü" diyebilmek için sınır değer 2%, "borderline seviyede HbA₂ yüksekliği" diyebilmek için sınır aralığı 3,3%-4,1% (48,116-120), "borderline seviye üzerinde HbA₂ yüksekliği" diyebilmek için sınır değer 4,1% olarak kabul edildi. >2% HbF seviyesi "HbF yüksekliği", <2% HbA₂ seviyesi "HbA₂ düşüklüğü", 3,3%-4,1% HbA₂ seviyesi "borderline seviyede HbA₂ yüksekliği" ve >4,1% HbA₂ seviyesi "borderline seviye üzerinde HbA₂ yüksekliği" olarak değerlendirildi.

Hemoglobin fraksiyon farklılıklarına göre dört farklı olgu grubu (A grubu, B grubu, C grubu ve D grubu) oluşturuldu ve her grupta toplamda 20 olgu olacak şekilde gruplar dizayn edildi. Araştırmaya dahil edilme kriterleri ve olgu grupları şu şekilde düzenlendi;

A Grubu: Elektroforez sonuçlarına göre sadece HbF yüksekliği (>2%) saptanan; HbA ve HbA₂ düzeyleri normal seviyelerde olanlar bu grupta değerlendirildi. Retrospektif taranarak bu özelliğe sahip toplamda 20 olgunun tamamı A grubunda araştırmaya dahil edildi.

B Grubu: Elektroforez sonuçlarına göre sadece borderline seviyede HbA₂ yüksekliği (3,3%-4,1%) saptanan; HbA ve HbF düzeyleri normal seviyelerde olanlar bu grupta değerlendirildi. Retrospektif taranarak bu özelliğe sahip toplamda 21 olgu içerisinde 20 olgu B grubunda araştırmaya dahil edildi. Borderline seviyede HbA₂ yüksekliği olan ve araştırma dışında kalan tek olgunun

kız kardeşi araştırmaya dahil edilmişti. Böylelikle allel frekansını etkilememesi için aynı soy bağından gelen kişilerden sadece birisi araştırmaya dahil edilmiş oldu.

C Grubu: Elektroforez sonuçlarına göre sadece borderline seviyesi üzerinde HbA₂ yksekligi(>4,1%) saptanan; HbA ve HbF düzeyleri normal seviyelerde olanlar bu grupta değerlendirildi. Retrospektif taranarak bu özelliğe sahip toplamda 47 olgu arasından "basit rastgele örnekleme" yöntemi ile seçilen 20 olgu C grubunda araştırmaya dahil edildi.

D grubu: Elektroforez sonuçlarına göre sadece HbA₂ düşüklüğü(<2%) saptanan; HbA ve HbF düzeyleri normal seviyelerde olanlar bu grupta değerlendirildi. Retrospektif taranarak bu özelliğe sahip toplamda 41 olgu arasından mutasyon saptama ihtimalini artırmak amacıyla HbA₂ seviyesinin ≤1,7% olduğu 28 olgunun arasından 20 olgu "basit rastgele örnekleme" yöntemi ile araştırmaya dahil edildi.

Tüm olguların yaş (rneği verdikleri andaki), cinsiyet, tam kan sayımı (CBC) verilerinden RBC(x10³/mm³) sayısı, Hb(g/dL), MCV(fL) ve MCH(pg) değerleri ve varsa demir profilini yansıtan parametreleri (ferritin(ng/mL), serum demir(ug/dL)/total demir bağlama kapasitesi(ug/dL)) kaydedildi.

3.3.Kontrol grubunun seçimi

İletişim kurulabilen, araştırmaya katılma onamı veren ve hemogloblin elektroforez analizi HPLC yöntemi ile yapılıp sonuçlarına ulaşılabilenler araştırmaya dahil edildi.

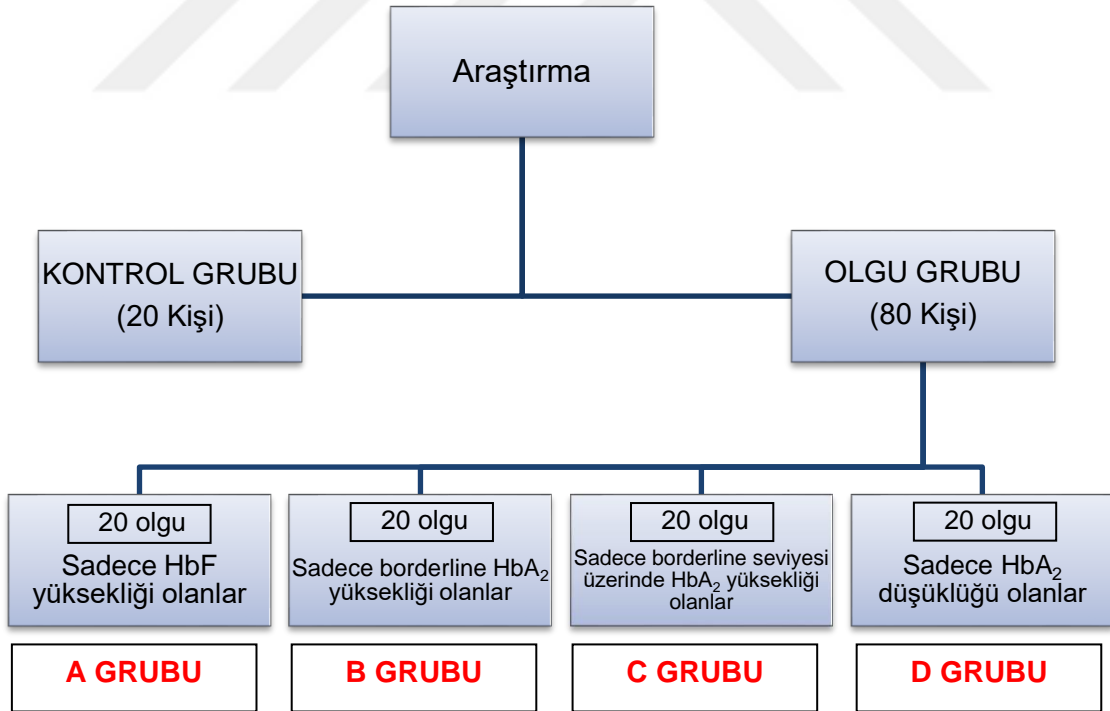
Tam kan sayımı değerleri (RBC sayısı, Hb, MCV ve MCH değerleri) ve elektroforez sonuçları (HbF, HbA ve HbA₂ değerleri açısından) normal aralıktta olup, eşlerinde/partnerlerinde elektorforez anormalliği olması nedeniyle doğru genetik danışma verebilmek için kendilerine de *HBB* geni sanger sekans dizilemesi yapılmış ya da başka bir sebepten ötürü genetik çalışmaya alınmış toplamda 63 kişi arasından "basit rastgele örnekleme" yöntemi ile seçilen 20 kişi

kontrol grubunda araştırmaya dahil edildi.

Kişilerin rneği verdikleri andaki yaş, cinsiyet, tam kan sayımı (CBC) verilerinden RBC($\times 10^3/\text{mm}^3$) sayısı, Hb(g/dL), MCV(fL) ve MCH(pg) değerleri ve varsa demir profilini yansıtan parametreleri (ferritin(ng/mL), serum demir(ug/dL)/total demir bağlama kapasitesi(ug/dL)) kaydedildi.

İletişim bilgileri üzerinden irtibat sağlanamayan, araştırmaya katılma onamı vermeyen, HbF ile HbA₂ birlikte yüksekliği saptanan, Hb elektroforez analizi yapılmamış ya da başka yöntemlerle yapılmış olan, HPLC sonucuna ulaşılamayan, aynı soy bağından gelen kişilerden sadece birisi haricindeki diğer kişiler araştırma dışı bırakılmıştır.

Araştırmanın dizaynı Şekil 3.1'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. Araştırmamızın dizaynı.

3.4.Yöntem

80 olgu ile 20 kontrol grubu bireyin EDTA'lı periferik kan materyallerinden izole edilmiş DNA örnekleri kullanıldı. Örneklerle ilgili tüm işlemler Genetik Tanı ve Tedavi Merkezimiz bünyesinde çalışıldı. Araştırmaya alınan kişilerin hepsinin biyolojik materyalleri yeterliydi; dolayısıyla kişilerden yeniden periferik kan örneği istenmedi.

Tüm örneklerin; tam kan sayımı (CBC) analizleri ve demir profillerini gösteren tetkikleri Çanakkale İl Halk Sağlığı Laboratuvarı bünyesinde bulunan Pentra DF Nexus-Horiba®, UniCel DxI 800-Beckman Coulter® ve AU5800-Beckman Coulter® cihazlarında çalışılmıştı. Örneklerin hemoglobin fraksiyonlarının kantitasyon ölçümleri ve hemoglobin analizleri yine Çanakkale İl Halk Sağlığı Laboratuvarı bünyesinde bulunan otomatize HPLC cihazında (HLC-723G8; Tosoh®, Tokyo, Japonya) beta-talasemi analiz modu kullanılarak yapılmıştı. Bu verilerin kullanım izni Çanakkale İl Sağlık Müdürlüğü'nün 30.10.2018 tarih ve 18231034-604.02.99-E.780 sayılı yazısı ile alındı.

3.4.1.Genetik analiz

3.4.1.1.PCR ile amplifikasyon ve DNA dizi analizi

Sırasıyla aşağıdaki basamaklar uygulandı:

- Daha önceden izole edilmiş DNA'ların kalitatif ve kantitatif açıdan değerlendirilmesi.

- *KLF1* ve *HBD* genlerinin kodlayıcı tüm ekzonlarının ve ekzon-intron kavşak bölgelerinin, 5'UTR-3'UTR bölgelerinin ve promoter bölgelerinin belirli bir kısmının uygun primerler ile amplifikasyonu (Birinci PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) aşaması)

- %2'lik agaroz jel elektroforezinde ampikonların kontrolü
- PCR ürünlerini temizleme aşaması
- İşaretleme reaksiyonu (İkinci PCR aşaması)

- İkinci PCR ürünlerini saflaştırma aşaması
- Örneklerin kapiller elektroforez cihazına yüklenmesi ve ham dataların uygun yardımcı programlar aracılığıyla analiz edilmesi.

3.4.1.1.1.Kullanılan cihazlar

Tablo 3.1'deki cihazlarla araştırma yürütüldü.

Tablo 3.1. Kullanılan cihazlar.

Cihazlar	Marka
Otomatik Kapiller Elektroforez Cihazı	ABI PRISM® 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™)
Termal döngü cihazları	<ul style="list-style-type: none"> • GeneAmp® 9700 (Applied Biosystems™) • Veriti® (Applied Biosystems™) • SimpliAmp® (Applied Biosystems™) • T100® (Bio-Rad™)
Mikrosantrifüj	<ul style="list-style-type: none"> • iCEN-24 (AllSheng™) • Mikro 200 (Hettich Zentrifugen™)
Otomatik pipet seti	<ul style="list-style-type: none"> • Research Plus (Eppendorf™) • FinnPipette® (Thermo Fisher Scientific™)
Spektrofotometre	P 330 (Implen™)
Vorteks	Genius 3 (IKA™)
Hassas terazi	aeADAM™
Mikrodalga fırın	ALMD 17 B (Altus™)
Yatay elektroforez tankı	Nanopac-300 (Fisher Scientific™)
Jel görüntüleme cihazı	UVP Transilluminator (Analytik Jena™)
Minispin	Espresso®(Thermo Fisher Scientific™)
Combi-Spin	FVL-2400N (Biosan™)
Mikroplak karıştırıcı-spin	Universal centrifuge vortex (CV-U) (Biosan™)

3.4.1.1.2.Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar

Tablo 3.2'deki sarf malzemeler ve kimyasallar kullanıldı.

Tablo 3.2. Kullanılan sarf malzemeler ve kimyasallar.

	İçerik	Marka
PCR için gerekli kimyasallar	✓ dNTP Mix	GML®
	✓ MgCl ₂	GML®
	✓ PCR Buffer	GML®
	✓ Enhancing Buffer	GML®
	✓ Taq Polimeraz	GML®
	✓ DMSO	Cas. No:67-68-5 (teknik kimyasallar)
BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit	✓ BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix (dideoksiribonükleozit trifosfatları (ddNTP) ve AmpliTaq DNA polimerazı içerir.) ✓ 5X BigDye® Sequencing Buffer	Applied Biosystems™
ExoSAP™ PCR Product Cleanup kiti	✓ Exonuclease I ✓ Shrimp Alkaline Phosphatase(SAP) ✓ Buffer	GML®
POP-7™ Polimer	✓ Performans Optimize Edici Polimer	Applied Biosystems™
	✓ Kolonlu tüp	GML®
Sephadex®	✓ Çapraz bağlı dekstran jel	GML®
	Steril ependorf tüpleri (2ml)	GenFollower®
	Steril PCR tüpleri (0,2ml)	• GenFollower® • Axygen®

Steril, filtreli 10 µl, 100 µl, ve 1000 µl pipet uçları	Molgen®
Mikroplak ve septaları	<ul style="list-style-type: none"> • Plate Septa 96-well (Applied Biosystems™) • MicroAmp® optical 96-well reaction plate (Applied Biosystems™)
Tek kullanımlık pudralı/pudrasız nitril eldiven	<ul style="list-style-type: none"> • Tenty® nit R403 (Multikan™) • Tenty® grip (Multikan™)

3.4.1.1.3. Spektrofotometre ile DNA konsantrasyon ve kalitesinin değerlendirilmesi

Spektrofotometre ile ışık absorpsiyonu yapabilen maddelerin sıvı solüsyonlar içindeki miktarı ve kaliteleri değerlendirilir. Farklı spektrumlarda ışın gönderilerek ne kadar ışının absorbe (A) edildiği hesaplanır. DNA ve RNA gibi nükleik asitler ışığı 260 nm'de, proteinler ise 280 nm'de maksimum absorbe ederler. Dolayısıyla A260/A280 oranı nükleik asitlerin saflığının (kalitesinin) değerlendirmesinde kullanılan bir orandır. DNA saflığı için uygun olan A260/A280 oranı 1,8-2 değerleridir. Bu aralıktan daha az olan değerler protein kontaminasyonunu gösterirken üzerindeki değerler RNA miktarının fazla olduğunu gösterir.

Daha önceden izole edilmiş DNA örnekleri konsantrasyon ve saflık açısından spektrofotometre ile değerlendirildi. DNA örneklerinin 20-60 ng/uL konsantrasyon aralığında olması sağlandı.

3.4.1.1.4.KLF1 ve HBD genlerinin PCR ile amplifikasyonu

KLF1 ve *HBD* genlerinin kodlayıcı tüm ekzonları, ekzon-intron kavşak bölgeleri, 5'UTR-3'UTR bölgeleri ve promoter bölgelerinin belirli bir kısmı uygun primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldı.

PCR için dizileri daha önceden yayınlarda belirtilmiş olan (46,121,122) primer çiftleri kullanıldı (Tablo 3.3). *KLF1* geninin ikinci ekzonu büyük olduğundan bu ekzonun dizilenmesi iki primer çifti ile sağlandı (46). Primerlerin dizaynında *KLF1* geni için "NM_006563" nolu transkripti, *HBD* geni için "NM_000519" nolu transkripti referans dizi olarak kabul edildi.

Tablo 3.3. Araştırmada kullanılan primer dizileri.

Gen	Ekzon	Primer Çifti
<i>KLF1</i> (46)	1.Ekzon	F-5'-GAACCTCAAACCCCTAGACCACC-3' R-5'-TTACCCAGCACCTGGACCCT-3
	2.Ekzon	F1-5'-CCGGGTCCCAACAACACTCA-3' R1-5'-GTGTCCAGCCCGCGATGT-3' F2-5'-GCCCTCTGCAACCCTTCTTC-3' R2-5'-CCGAGACTCTGGGCGCATA-3'
	3.Ekzon	F-5'-CTTGTCCCATCCCCAGTCACT-3' R-5'-TGCGGCAAGAGCTACACCA-3'
<i>HBD</i> (121,122)	1.Ekzon	F-5'-GAGCCTCTCTTATAACCTTG-3' R-5'-AGAACAGCCAATCTCAGGGC-3'
	2.Ekzon	F-5'-AGAGAAAAGTGAAGCATCTC-3' R-5'-CAAGGTTATAAGAGAGGCTC-3'
	3.Ekzon	F-5'-TAATCAGGAAGTTGAGCTGAA-3' R-5'-CTCTGTTAACCATATGCATGT-3'

3.4.1.1.4.1.Hedef bölgelerin amplifikasyonu (Birinci PCR) için reaksiyon karışımı ve birinci PCR koşulları

KLF1 ve *HBD* genleri amplifikasyonu için toplam reaksiyon hacmi 25 µL olacak şekilde Tablo 3.4'teki bileşenler belirtilen oranlarda 0,2 ml'lik steril PCR tüplerine eklenerek karıştırıldı. Tablo 3.5'te belirtilen PCR siklus ve süreleri

uygulanarak ilgilenilen bölgelerin amplifikasyonu sağlandı.

Tablo 3.4. Hedef bölge amplifikasyonu (Birinci PCR) reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.

Bileşenler	Miktar(µL)
Distile Su	7,5 µL
GML® PCR Buffer	2,5 µL
İlgili bölgeye ait primer (F,R)	1 µL +1 µL
dNTP Mix	2 µL
MgCl ₂	0,5 µL
GML® Enhancing Buffer	7,5 µL
Taq Polimeraz	0,75 µL
DMSO*	0,65**/1,3** µL
Genomik DNA (20-60 ng/µL)	2,5 µL
Total	25 µL
*: <i>KLF1</i> geni ekzonlarının amplifikasyonu için kullanıldı.	
**: <i>KLF1</i> geni birinci ve ikinci ekzonu için 2,5%'luk DMSO; üçüncü ekzonu için 5%'lik DMSO kullanıldı.	

Tablo 3.5. Birinci PCR koşulları.

Aktivasyon	95°C	10 dakika
Amplifikasyon öncesi hazırlık (Pre-PCR) (9 döngü)	95°C	40 saniye
	70°C*	30 saniye
	72°C	1 dakika
Amplifikasyon (35 döngü)	95°C	40 saniye
	60°C**	1 dakika
	72°C	1 dakika
Final Uzama	72°C	10 dakika
Saklama	4°C	∞
*: Her döngüde 2°C düşürülerek.		
** : Primerlerin T _m derecelerine göre farklılık gösterebilmektedir.		

3.4.1.1.5. Jel elektroforezinde amplikonların kontrolü

Birinci PCR sonrası amplifiye edilmiş fragmanlar jel görüntüleme cihazına alınarak bant yapıları ve ilgilenilen bölgelerin doğru bir şekilde çoğaltıldığı kontrolü sağlandı. Tek, parlak ve istenilen uzunlukta olan bant yapıları ile çalışmaya devam edilirken; bant yapısı oluşturmayan ya da silik gözükken, parçalı-pek çok bant yapısı oluşturmuş PCR ürünleri ise yeniden tekrarlandı.

Jel elektroforezi için kullanılan kimyasallar Tablo 3.6'da belirtilmiştir.

Tablo 3.6. Jel elektroforezi için kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Marka
Agaroz	Prona Biomax Agarose
Etidyum bromür	Thermo Fisher Scientific™ Cas No:1239-45-8
Bromfenol mavisi	6x DNA loading dye solution Fc Biotek®
DNA marker	GeneRuler® 1kb DNA ladder Thermo Fisher Scientific™
10x Tris borat EDTA (TBE) tampon solüsyonu	Multicell® Wisent Bio Products™

Sırasıyla aşağıdaki basamaklar uygulandı;

1. 100 ml'lik erlenmayer içine 1 gr agaroz ve 50 ml 10x TBE solüsyonu konulup mikrodalga fırında eriyip berraklaşana kadar ısıtıldı.
2. 3 µl etidyum bromür ilave edildi ve karıştırılarak jelin donması beklendi.
3. 2 µl Bromfenol mavisi ile 5 µl PCR ürünü parafilm üzerinde karıştırılarak jel üzerinde oluşturulan kuyucuklara yüklendi.
4. Amplikon kontrolü için örnek marker yüklendi.
5. Örnekler agaroz jelde (120 V) akımda yaklaşık 20-30 dk yürütülerek beklenen baz çifti uzunluğuna göre ayrılmaları sağlandı. Amplifiye edilen fragmanların uzunlukları Tablo 3.7'de belirtilmiştir.

Tablo 3.7. Kullanılan primer çiftleri sonrası amplifiye edilen fragmanların uzunlukları.

Gen	Ekzon	Uzunluk(bç)
<i>KLF1</i>	1.Ekzon	567 bç
	2.Ekzon 1.primere çifti	713 bç
	2.Ekzon 2.primere çifti	662 bç
	3.Ekzon	537 bç
<i>HBD</i>	1.Ekzon	330 bç
	2.Ekzon	373 bç
	3.Ekzon	310 bç

6. Süre bitiminde amplifiye olmuş fragmanlar jel görüntüleme cihazıyla incelendi ve bant yapılarının görüntüleri alındı.

3.4.1.1.6.PCR ürünlerinin enzimatik temizlenmesi

PCR ürünleri; uygun şekilde amplifiye olmamış ürünler, tepkimeye girmemiş dNTP'ler, tek zincirli DNA iplikleri ve hibridize olmamış primerlerden ExoSAP® PCR Product Cleanup kiti (GML®) kullanılarak temizlendi. Kit içerisindeki Exonuclease I enzimi primerleri ve DNA ipliklerini uzaklaştırırken; Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) enzimi ise ortamdaki dNTP'leri uzaklaştırır. Dolayısıyla istenmeyen ürünler bu şekilde ortamdaki uzaklaştırılmış olur.

Belirtilen standartlara göre şu basamaklar sırasıyla gerçekleştirildi:

1. Her reaksiyon için yeni 0,2 ml'lik steril PCR tüpü içine 7 µl PCR ürünü ile 2,7 µl ExoSAP® reaktifi koyuldu, pipetaj ile karıştırıldı.
2. Karışım termal döngü cihazına yerleştirilerek üreticinin belirttiği koşullarda tepkime gerçekleştirildi (Tablo 3.8).

Tablo 3.8. PCR ürünlerinin enzimatik temizlenmesi.

Basamak	Sıcaklı	Süre
Enzim İnkübasyonu	37°C	30
Enzim İnaktivasyonu	80°C	15
Saklama	4°C	∞

3.4.1.1.7.İşaretleme reaksiyonu (İkinci PCR reaksiyonu) bileşenleri ve ikinci PCR koşulları

İkinci PCR reaksiyonunda BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit kullanıldı. Her bir PCR ürünü; işaretleme reaksiyonu için iki yeni steril PCR tüp ("F" ve "R") olarak hazırlandı (reaksiyon tek yönlü ilerlediği için). 2 µl'lik PCR ürünü 8 µl'lik reaksiyon karışımı üzerine eklenerek (Tablo 3.9); üreticinin belirttiği koşullarda ikinci PCR reaksiyonu gerçekleştirildi (Tablo 3.10).

Tablo 3.9. İşaretleme reaksiyonu (İkinci PCR reaksiyonu)
bileşenleri.

Bileşenler	Miktar(µL)
Distile Su	3 µL
Forward ya da Reverse	2 µL
5X BigDye® Sequencing	2 µL
BigDye® Terminator Mix	1 µL
PCR ürünü	2 µL
Total	10 µL

Tablo 3.10. İkinci PCR tepkime koşulları.

Basamak	Sıcaklık	Süre
Aktivasyon	96°C	1 dakika
Amplifikasyon (25 döngü)	96°C	10 saniye
	50°C	5 saniye
	60°C	4 dakika
Saklama	4°C	∞

3.4.1.1.8.İkinci PCR ürünlerinin saflaştırılması

İstenmeyen arka plan kirlilikleri, PCR aşamasında bağlanmayan floresan boya ları, hibridize olmayan ddNTP'leri ve diğer PCR bileşenlerini ortamd an uzaklaştırmak için bu aşama gereklidir. Sırasıyla üreticinin belirttiği şu aşamalar uygulandı;

1. 700 µl Sephadex (1 gr Sephadex + 14 ml distile su olacak şekilde hazırlanmış) 2 ml'lik kolonlu tüp içine eklendi.
2. 3 dakika 2000 g'de santrifüj yapıldı.
3. Tüpte kolon oluşumu sağlandıktan sonra alttaki koleksiyon tüpleri atıldı, kolon yeni koleksiyon tüpleri üzerine oturtuldu ve her bir PCR ürünü kolonlar üzerine aktarıldı.
4. PCR ürünü 3 dakika 2000 g'de santrifüj yapıldıktan sonra üstteki kolon atıldı ve altta kalan ürünler analize hazır halde cihaza yüklenmek üzere mikropiplara yüklendi. Kapiller elektroforez cihazına yükleme hemen olmayacak ise ürünler kısa süre için +4 °C'de, uzun süre için ise -20 °C'de muhafaza edildi.

3.4.1.1.9.Örneklerin kapiller elektroforez cihazına yüklenmesi

Örnekler, 96 kuyucuğu bulunan ticari mikropiplara her bir kuyuya bir örnek gelecek şekilde uygun olan sırayla yüklenerek kapiller elektroforez cihazı (Applied Biosystems® 3130 Genetic Analyzer) içerisine yerleştirildi ve POP-7® polimeri kullanılarak ilgili analiz metodunda yürütüldü.

3.4.1.1.10.Elektroforez sonuçlarının değerlendirilmesi

Ham dataların analizi Seqscape® v2.6 ve Sequencing Analysis® 5.3.1 programlarından faydalanılarak yapıldı. Kapiller elektroforez cihazının ürettiği elektroferogramda; siyah renk guanini, yeşil renk adenini, kırmızı renk timini ve mavi renk sitozin bazını temsil etmekte idi. Sonuçlar, ilgili genin Genbank®taki referans dizisi ile karşılaştırma yapılarak değerlendirildi ve saptanan varyasyonlar; *KLF1* geni için "NM_006563" nolu transkript referans dizisine, *HBD* geni için "NM_000519" nolu transkript referans dizisine göre isimlendirildi. Olgularda saptanan varyasyonların fenotipik etkilerinin olup olmadığı ilgili veritabanları (HGMD® Public version, VarSome®, ClinVar® vb.) ve literatür taraması yapılarak araştırıldı. Daha önce literatürde tanımlanmamış değişimlerin patojenite yaratıp yaratmadığı; Polymorphism phenotyping v2 (PolyPhen-2®),

Mutation Taster®, SIFT®, Human Splicing Finder vb. gibi in-silico bioinformatik programları ile değerlendirildi.

3.5.İstatistiksel analiz

Bulgular; SPSS® versiyon 22.0 sürümü ile analiz edildi. Bulguların sunumunda; ortalama, standart sapma, yüzde, medyan, minimum ve maksimum değerler gibi tanımlayıcı istatistiksel metotlar kullanıldı. Grupların istatistiksel olarak karşılaştırılmasında Ki-kare ve ANOVA testi; ANOVA testinin varsayımlarının karşılanmadığı durumlarda Kruskal-Wallis non-parametrik testi kullanıldı. " $p < 0,05$ " olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. ANOVA testi sonucunda istatistiksel anlamlılık saptandığında farkın kaynağını bulmak için Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden faydalanıldı.

4.BULGULAR

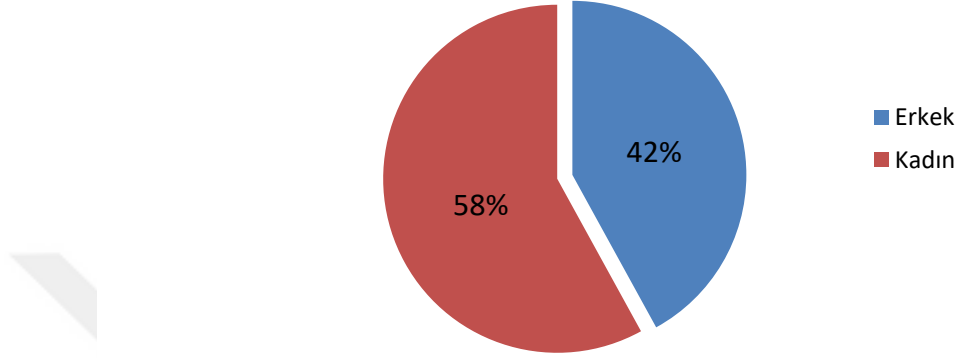
Araştırma; Mart 2013-Ağustos 2018 tarihleri arası Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Tanı ve Tedavi Merkezi'ne başvurmuş; araştırmaya dahil edilme kriterlerini karşılayan 80 olgu ve 20 sağlıklı kontrol birey olmak üzere toplam 100 kişiye ait retrospektif veriler kullanılarak yürütüldü.

Kişilere ait demografik veriler, tam kan sayımı (CBC) sonuçlarından RBC sayısı ($\times 10^3/\text{mm}^3$), (Hb (g/dL), MCV (fL) ve MCH(pg) değerleri, HPLC yöntemi ile yapılan Hb elektroforez sonuçları ve demir profilini yansıtan verileri (serum demir (ug/dL), UIBC (ug/dL), ferritin (ng/mL)) Tablo 4.5, Tablo 4.6, Tablo 4.7, Tablo 4.8 ve Tablo 4.9'da sunulmuştur.

4.1. Demografik veriler

Araştırmaya dahil edilen 100 kişinin 58'i kadın, 42'si erkek idi (%58 kadın, %42 erkek; n=100) (Şekil 4.1).

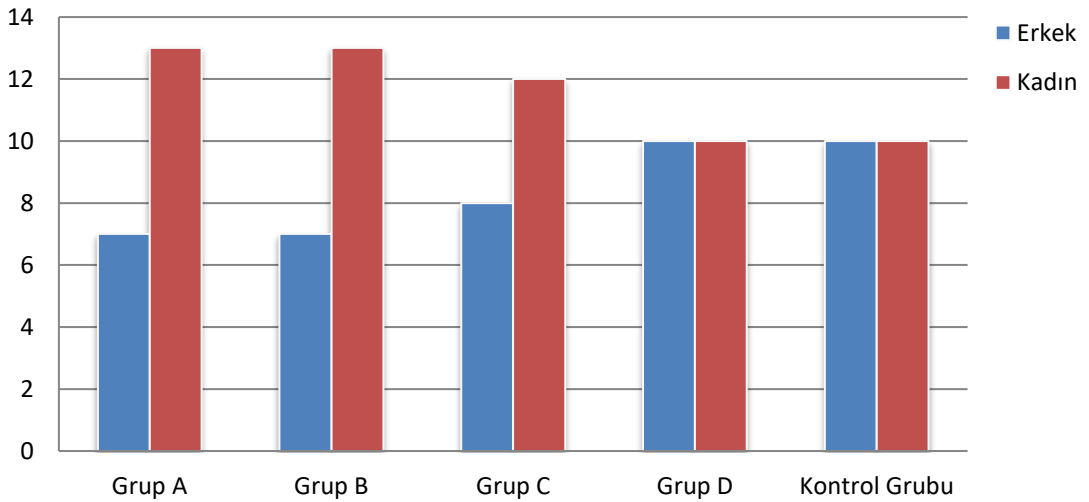
Genel Cinsiyet Dağılımı



Şekil 4.1. Araştırmaya dahil edilen kişilerin genel cinsiyet dağılımı.

Gruplar arası değerlendirildiğinde; Grup A ve Grup B 13 kadın- 7 erkek (%65 kadın, %35 erkek; n=20), Grup C 12 kadın- 8 erkek (%60 kadın, %40 erkek; n=20), Grup D ve Kontrol Grubu ise 10 kadın- 10 erkek (%50 kadın, %50 erkek) ten oluşmakta idi (Şekil 4.2).

Gruplar Arası Cinsiyet Dağılımı



Şekil 4.2. Gruplar arası cinsiyet dağılımı.

Gruplar arası kadın-erkek dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı ($p>0,05$) (Şekil 4.3).

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)
Pearson Chi-Square	1.888 ^a	4	.756
Likelihood Ratio	1.890	4	.756
Linear-by-Linear Association	1.646	1	.200
N of Valid Cases	100		

a. 0 cells (.0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 8.40.

Şekil 4.3. Ki-kare testi; gruplar arası kadın-erkek dağılımı açısından istatistiksel değerlendirme. Ok işareti "p" değerini göstermektedir.

100 kişinin yaş ortalaması $25,71\pm 12,37$ idi. Grup içi değerlendirildiğinde; Grup A yaş ortalaması $17,85\pm 13,46$, Grup B yaş ortalaması $20,40\pm 9,96$, Grup C yaş ortalaması $31,95\pm 12,01$, Grup D yaş ortalaması $30,40\pm 10,69$ ve Kontrol Grubu yaş ortalaması $27,95\pm 9,71$ idi (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Araştırmaya dahil edilen kişilerin genel ve grup içi yaş ortalamaları \pm Ss, minimum-maksimum ve medyan değerleri.

	Yaş ortalaması \pm Ss	Min-Maks (Medyan)
Grup A	17,85 \pm 13,46	1-38 (19)
Grup B	20,40 \pm 9,96	6-36 (21,5)
Grup C	31,95 \pm 12,01	16-63 (31,5)
Grup D	30,40 \pm 10,69	10-57 (27,5)
Kontrol Grubu	27,95 \pm 9,77	8-45 (27)
Toplam	25,71 \pm 12,37	1-63 (27)

Yaş dağılımları açısından gruplar arası varyans homojenliği vardı ($p>0,05$) (Şekil 4.4), ancak Grup D'deki aşırı değerden (Olgu D14) (Şekil 4.6) dolayı gruplar arası normal dağılım yoktu ($p<0,05$) (Şekil 4.5).

Test of Homogeneity of Variances

YAS

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.299	4	95	.276

Şekil 4.4. Levene's testi; yaş dağılımları açısından gruplar arası varyans homojenliğinin değerlendirilmesi. Ok işareti "p" değerini göstermektedir.

Tests of Normality

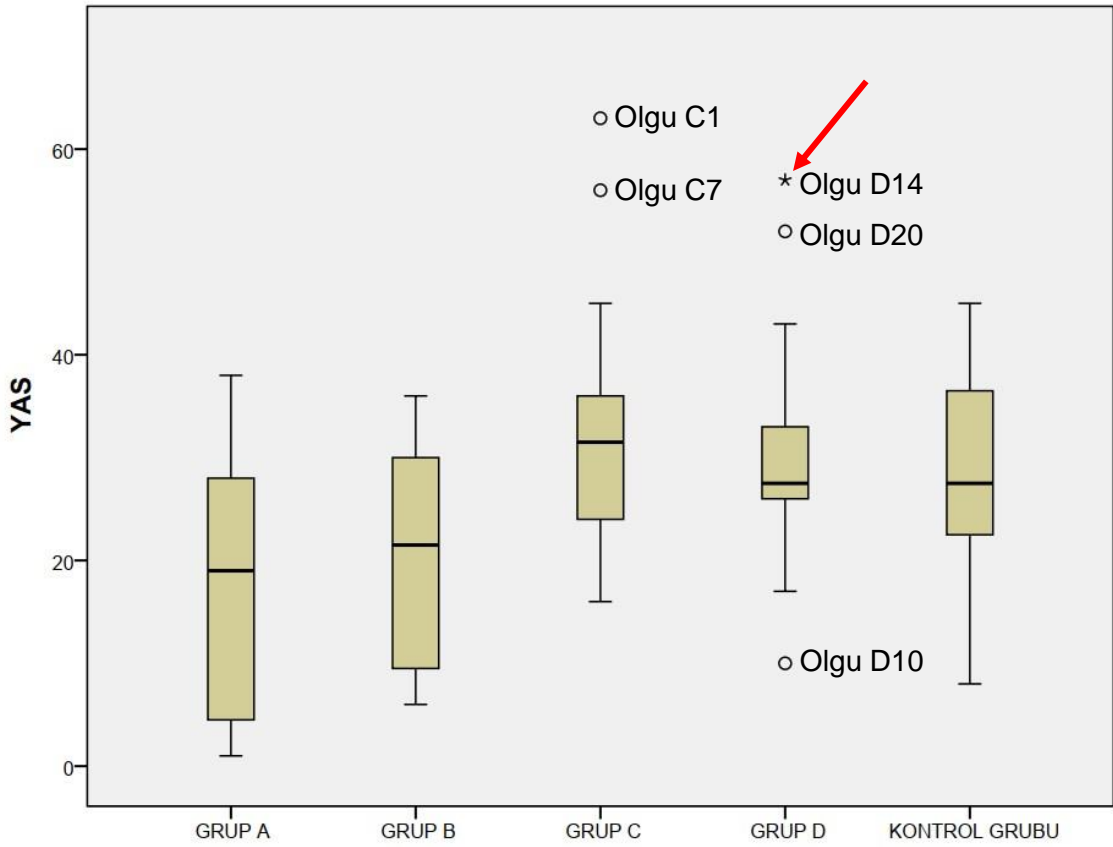
GRUPLAR	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
YAS GRUP A	.161	20	.189	.894	20	.032
GRUP B	.144	20	.200*	.906	20	.054
GRUP C	.182	20	.080	.905	20	.051
GRUP D	.265	20	.001	.871	20	.012
KONTROL GRUBU	.148	20	.200*	.963	20	.611

*. This is a lower bound of the true significance.

a. Lilliefors Significance Correction

Şekil 4.5. Normallik testleri (Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk); yaş dağılımları açısından gruplar arası normal dağılımın değerlendirilmesi. Ok işaretleri "p" değerini göstermektedir.

ANOVA testi varsayımları karşılanmadığından non-parametrik test (One way non-parametrik ANOVA) olan "Kruskal-Wallis" testi kullanıldı. Gruplar arasında yaş açısından istatistiksel olarak fark mevcuttu ($p < 0,05$) (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. Yaş dağılımı açısından gruplar. Kırmızı ok normalliği bozan aşırı değeri (Olgu D14) göstermektedir.

Kruskal-Wallis Test

Test Statistics^{a,b}

	YAS
Chi-Square	17.128
df	4
Asymp. Sig.	.002

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:
GRUPLAR

Şekil 4.7. Kruskal-Wallis testi; gruplar arası yaş açısından istatistiksel değerlendirme. Ok işareti "p" değerini göstermektedir.

ANOVA testi kullanılamasa da farkın hangi grup tarafından kaynaklandığını bulmak amacıyla Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden "Tukey HSD" testi kullanıldı. Yaş açısından farklılığın daha çok Grup A; daha az oranda Grup B'den kaynaklı olduğu saptandı (Şekil 4.8).

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: YAS

Tukey HSD

(I) GRUPLAR	(J) GRUPLAR	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% ...
					Lower Bound
GRUP A	GRUP B	-2.550	3.560	.952	-12.45
	GRUP C	-14.100*	3.560	.001	-24.00
	GRUP D	-12.550*	3.560	.006	-22.45
	KONTROL GRUBU	-10.100*	3.560	.043	-20.00
GRUP B	GRUP A	2.550	3.560	.952	-7.35
	GRUP C	-11.550*	3.560	.014	-21.45
	GRUP D	-10.000*	3.560	.047	-19.90
	KONTROL GRUBU	-7.550	3.560	.220	-17.45
GRUP C	GRUP A	14.100*	3.560	.001	4.20
	GRUP B	11.550*	3.560	.014	1.65
	GRUP D	1.550	3.560	.992	-8.35
	KONTROL GRUBU	4.000	3.560	.794	-5.90
GRUP D	GRUP A	12.550*	3.560	.006	2.65
	GRUP B	10.000*	3.560	.047	.10
	GRUP C	-1.550	3.560	.992	-11.45
	KONTROL GRUBU	2.450	3.560	.959	-7.45
KONTROL GRUBU	GRUP A	10.100*	3.560	.043	.20
	GRUP B	7.550	3.560	.220	-2.35
	GRUP C	-4.000	3.560	.794	-13.90
	GRUP D	-2.450	3.560	.959	-12.35

Şekil 4.8. Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden "Tukey HSD" testi; yaş açısından farklılığın hangi grup tarafından kaynaklandığını değerlendirme. Ok işaretleri farklılığın daha çok Grup A; daha az oranda Grup B'den kaynaklandığını göstermektedir.

4.2.Hematolojik veriler

Sonuçlarına ulaşılabilen toplamda 89 kişinin Hb ortalaması $12,89\pm 1,76$ ve RBC sayısı ortalaması $4,69\pm 0,69$ iken; MCV değeri ortalaması $84,04\pm 10,94$ ve MCH değeri ortalaması $27,92\pm 3,89$ idi. Gruplar arası ve toplam ortalamalar Tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2. Sonuçlarına ulaşılabilen kişilerin hematolojik verilerinin (RBC sayısı, Hb, MCH ve MCV değerleri) toplam ve gruplar arası ortalamaları. Kırmızı oklar ortalama ve standart sapmayı göstermektedir.

		N	Mean	Std. Deviation
RBC	GRUP A	13	4.2331	.54087
	GRUP B	20	4.4175	.57421
	GRUP C	18	5.5489	.69256
	GRUP D	18	4.5750	.39643
	KONTROL GRUBU	20	4.6115	.47826
	Total	89	4.6948	.69726
HEMOGLOBINDEGERLERI	GRUP A	13	12.6977	1.62695
	GRUP B	20	12.9460	1.90372
	GRUP C	18	11.7867	1.86938
	GRUP D	18	13.3694	1.11873
	KONTROL GRUBU	20	13.5430	1.73241
	Total	89	12.8951	1.76278
MCV	GRUP A	13	91.46	7.019
	GRUP B	20	88.05	5.717
	GRUP C	18	65.94	5.795
	GRUP D	18	87.83	6.767
	KONTROL GRUBU	20	88.10	4.898
	Total	89	84.04	10.943
MCH	GRUP A	13	30.0892	2.42456
	GRUP B	20	29.3075	2.14082
	GRUP C	18	21.8400	3.33369
	GRUP D	18	29.3039	2.15093
	KONTROL GRUBU	20	29.3495	1.86911
	Total	89	27.9201	3.89053

Hematolojik verilerin gruplar arası varyans homojenliği vardı ($p>0,05$) (Şekil 4.9), ancak MCV ve MCH değerleri açısından Grup C normal dağılımı bozuyordu ($p<0,05$) (Şekil 4.10).

Test of Homogeneity of Variances

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
RBC	1.121	4	84	.352
HEMOGLOBINDEGERLERI	1.343	4	84	.261
MCV	.516	4	84	.724
MCH	.754	4	84	.558

Şekil 4.9. Levene's testi; hematolojik veriler açısından gruplar arası varyans homojenliğinin değerlendirilmesi. Ok işareti "p" değerini göstermektedir.

Tests of Normality

	GRUPLAR	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
RBC	GRUP A	.095	13	.200 [*]	.994	13	1.000
	GRUP B	.120	20	.200 [*]	.966	20	.663
	GRUP C	.156	18	.200 [*]	.929	18	.188
	GRUP D	.172	18	.169	.884	18	.030
	KONTROL GRUBU	.151	20	.200 [*]	.961	20	.568
HEMOGLOBINDEGERLERI	GRUP A	.127	13	.200 [*]	.966	13	.836
	GRUP B	.133	20	.200 [*]	.971	20	.771
	GRUP C	.142	18	.200 [*]	.970	18	.804
	GRUP D	.130	18	.200 [*]	.978	18	.933
	KONTROL GRUBU	.153	20	.200 [*]	.931	20	.164
MCV	GRUP A	.187	13	.200 [*]	.961	13	.774
	GRUP B	.123	20	.200 [*]	.979	20	.920
	GRUP C	.218	18	.023	.833	18	.005
	GRUP D	.124	18	.200 [*]	.963	18	.653
	KONTROL GRUBU	.127	20	.200 [*]	.956	20	.460
MCH	GRUP A	.155	13	.200 [*]	.926	13	.301
	GRUP B	.125	20	.200 [*]	.967	20	.683
	GRUP C	.284	18	.000	.757	18	.000
	GRUP D	.181	18	.125	.900	18	.058
	KONTROL GRUBU	.172	20	.124	.951	20	.384

Şekil 4.10. Normallik testleri (Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk); hematolojik veriler açısından gruplar arası normal dağılımın değerlendirilmesi. Ok işaretleri normal dağılımın Grup C kaynaklı bozulduğunu göstermektedir.

ANOVA testi varsayımları yine karşılanmadığından non-parametrik test (One way non-parametrik ANOVA) olan "Kruskal-Wallis" testi kullanıldı. RBC sayısı, MCV ve MCH değerleri açısından gruplar arası istatistiksel olarak farklılık mevcuttu ($p < 0,05$) (Şekil 4.11).

Test Statistics^{a,b}

	RBC	HEMOGLOBİN DEĞERLERİ	MCV	MCH
Chi-Square	30.286	9.204	43.713	34.379
df	4	4	4	4
Asymp. Sig.	.000	.056	.000	.000

a. Kruskal Wallis Test

Şekil 4.11. Kruskal-Wallis testi; gruplar arası hematolojik veriler açısından istatistiksel değerlendirme. Ok işareti "p" değerini göstermektedir.

ANOVA testi kullanılamasa da farkın hangi grup tarafından kaynaklandığını bulmak amacıyla Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden "Bonferroni" testi kullanıldı. Tüm değerler açısından farkın Grup C kaynaklı olduğu saptandı ($p < 0,05$) (Şekil 4.12). Bu sonuç çok şaşırtıcı değildi çünkü Grup C olguları tipik olarak talasemi minör fenotipini yansıtmaktalardı (hipokromi, mikrositozis, RBC sayısı artışı).

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Bonferroni

Dependent Variable	(I) GRUPLAR	(J) GRUPLAR	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
RBC	GRUP A	GRUP B	-.18442	.19415	1.000	-.7442	.3753
		GRUP C	-1.31581*	.19835	.000	-1.8877	-.7439
		GRUP D	-.34192	.19835	.884	-.9138	.2299
		KONTROL GRUBU	-.37842	.19415	.546	-.9382	.1813
	GRUP B	GRUP A	.18442	.19415	1.000	-.3753	.7442
		GRUP C	-1.13139*	.17705	.000	-1.6418	-.6209
		GRUP D	-.15750	.17705	1.000	-.6680	.3530
		KONTROL GRUBU	-.19400	.17233	1.000	-.6908	.3028
	GRUP C	GRUP A	1.31581*	.19835	.000	.7439	1.8877
		GRUP B	1.13139*	.17705	.000	.6209	1.6418
		GRUP D	.97389*	.18165	.000	.4502	1.4976
		KONTROL GRUBU	.93739*	.17705	.000	.4269	1.4478
	GRUP D	GRUP A	.34192	.19835	.884	-.2299	.9138
		GRUP B	.15750	.17705	1.000	-.3530	.6680
		GRUP C	-.97389*	.18165	.000	-1.4976	-.4502
		KONTROL GRUBU	-.03650	.17705	1.000	-.5470	.4740
	KONTROL GRUBU	GRUP A	.37842	.19415	.546	-.1813	.9382
		GRUP B	.19400	.17233	1.000	-.3028	.6908
		GRUP C	-.93739*	.17705	.000	-1.4478	-.4269
		GRUP D	.03650	.17705	1.000	-.4740	.5470

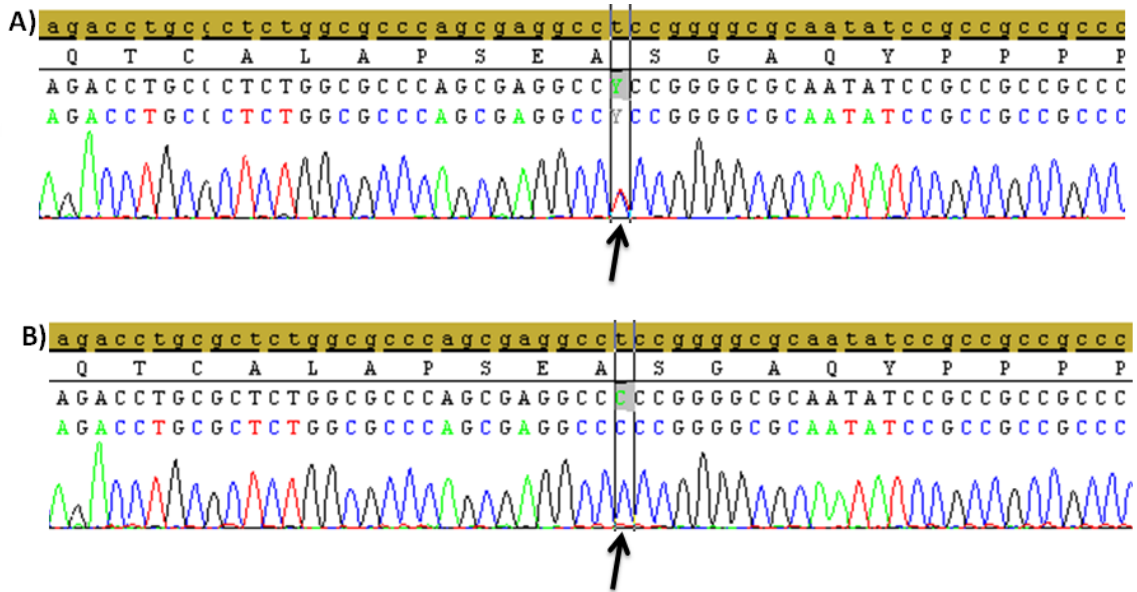
HEMOGLOBİNDEĞERLERİ	GRUP A	GRUP B	-.24831	.60010	1.000	-1.9784	1.4818
		GRUP C	.91103	.61309	1.000	-.8566	2.6786
		GRUP D	-.67175	.61309	1.000	-2.4393	1.0958
		KONTROL GRUBU	-.84531	.60010	1.000	-2.5754	.8848
	GRUP B	GRUP A	.24831	.60010	1.000	-1.4818	1.9784
		GRUP C	1.15933	.54726	.371	-.4184	2.7371
		GRUP D	-.42344	.54726	1.000	-2.0012	1.1543
		KONTROL GRUBU	-.59700	.53266	1.000	-2.1327	.9387
	GRUP C	GRUP A	-.91103	.61309	1.000	-2.6786	.8566
		GRUP B	-1.15933	.54726	.371	-2.7371	.4184
		GRUP D	-1.58278	.56147	.060	-3.2015	.0360
		KONTROL GRUBU	-1.75633*	.54726	.019	-3.3341	-1.1786
	GRUP D	GRUP A	.67175	.61309	1.000	-1.0958	2.4393
		GRUP B	.42344	.54726	1.000	-1.1543	2.0012
		GRUP C	1.58278	.56147	.060	-.0360	3.2015
		KONTROL GRUBU	-.17356	.54726	1.000	-1.7513	1.4042
	KONTROL GRUBU	GRUP A	.84531	.60010	1.000	-.8848	2.5754
		GRUP B	.59700	.53266	1.000	-.9387	2.1327
		GRUP C	1.75633*	.54726	.019	.1786	3.3341
		GRUP D	.17356	.54726	1.000	-1.4042	1.7513
MCH	GRUP A	GRUP B	.78173	.86184	1.000	-1.7030	3.2665
		GRUP C	8.24923*	.88050	.000	5.7107	10.7878
		GRUP D	.78534	.88050	1.000	-1.7532	3.3239
		KONTROL GRUBU	.73973	.86184	1.000	-1.7450	3.2245
	GRUP B	GRUP A	-.78173	.86184	1.000	-3.2665	1.7030
		GRUP C	7.46750*	.78595	.000	5.2015	9.7335
		GRUP D	.00361	.78595	1.000	-2.2624	2.2696
		KONTROL GRUBU	-.04200	.76499	1.000	-2.2475	2.1635
	GRUP C	GRUP A	-8.24923*	.88050	.000	-10.7878	-5.7107
		GRUP B	-7.46750*	.78595	.000	-9.7335	-5.2015
		GRUP D	-7.46389*	.80637	.000	-9.7887	-5.1391
		KONTROL GRUBU	-7.50950*	.78595	.000	-9.7755	-5.2435
	GRUP D	GRUP A	-.78534	.88050	1.000	-3.3239	1.7532
		GRUP B	-.00361	.78595	1.000	-2.2696	2.2624
		GRUP C	7.46389*	.80637	.000	5.1391	9.7887
		KONTROL GRUBU	-.04561	.78595	1.000	-2.3116	2.2204
	KONTROL GRUBU	GRUP A	-.73973	.86184	1.000	-3.2245	1.7450
		GRUP B	.04200	.76499	1.000	-2.1635	2.2475
		GRUP C	7.50950*	.78595	.000	5.2435	9.7755
		GRUP D	.04561	.78595	1.000	-2.2204	2.3116
MCV	GRUP A	GRUP B	3.412	2.135	1.000	-2.74	9.57
		GRUP C	25.517*	2.181	.000	19.23	31.81
		GRUP D	3.628	2.181	1.000	-2.66	9.92
		KONTROL GRUBU	3.362	2.135	1.000	-2.79	9.52
	GRUP B	GRUP A	-3.412	2.135	1.000	-9.57	2.74
		GRUP C	22.106*	1.947	.000	16.49	27.72
		GRUP D	.217	1.947	1.000	-5.40	5.83
		KONTROL GRUBU	-.050	1.895	1.000	-5.51	5.41
	GRUP C	GRUP A	-25.517*	2.181	.000	-31.81	-19.23
		GRUP B	-22.106*	1.947	.000	-27.72	-16.49
		GRUP D	-21.889*	1.998	.000	-27.65	-16.13
		KONTROL GRUBU	-22.156*	1.947	.000	-27.77	-16.54
	GRUP D	GRUP A	-3.628	2.181	1.000	-9.92	2.66
		GRUP B	-.217	1.947	1.000	-5.83	5.40
		GRUP C	21.889*	1.998	.000	16.13	27.65
		KONTROL GRUBU	-.267	1.947	1.000	-5.88	5.35
	KONTROL GRUBU	GRUP A	-3.362	2.135	1.000	-9.52	2.79
		GRUP B	.050	1.895	1.000	-5.41	5.51
		GRUP C	22.156*	1.947	.000	16.54	27.77
		GRUP D	.267	1.947	1.000	-5.35	5.88

Şekil 4.12. Post Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden "Bonferroni" testi; hematolojik veriler açısından farklılığın hangi grup tarafından kaynaklandığını değerlendirme. Ok işaretleri farklılığın Grup C kaynaklı olduğunu göstermektedir.

4.3.Saptanan mutasyonlar

4.3.1.KLF1 geninde saptanan mutasyonlar

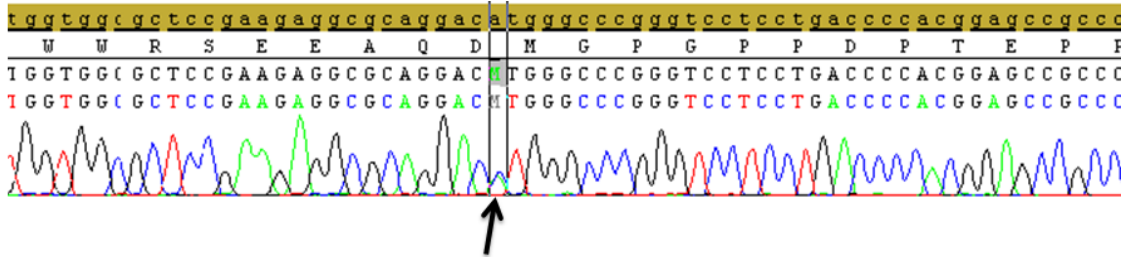
Araştırmaya dahil edilen 100 kişinin 47'sinde (41'i olgu grubunda, 6'sı kontrol grubunda) *KLF1* geni S102P mutasyonu (%47) saptandı; bunların 42'si heterozigot iken, 5 olguda S102P mutasyonu homozigot idi.



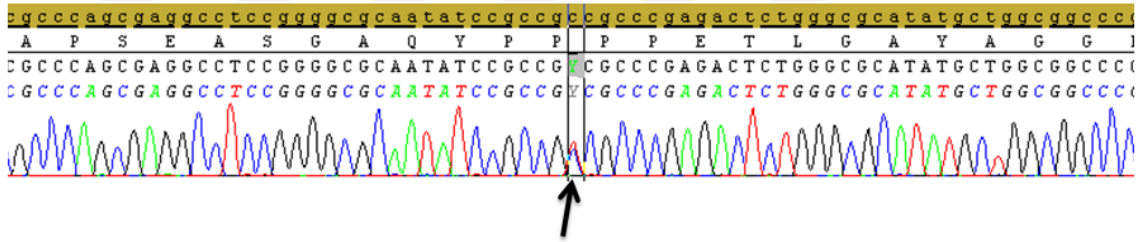
Şekil 4.13. *KLF1* geni ekzon 2 S102P mutasyonu sanger dizi analiz profilleri.
A) Olgu D13'e ait saptanan heterozigot S102P (*KLF1*:c.304T>C) mutasyonu (ok).
B) Olgu D17'e ait saptanan homozigot S102P (*KLF1*:c.304T>C) mutasyonu (ok).

S102P mutasyonu haricinde; *KLF1* geninde bir olguda M39L heterozigot mutasyonu (Olgu B3), iki olguda P109S heterozigot mutasyonu (Olgu C19, Kontrol K18), üç olguda F182L heterozigot mutasyonu (Olgu B4, Olgu B17, Olgu D18) ve bir olguda R268L heterozigot mutasyonu (Olgu B1) saptandı. Saptanan tüm mutasyonlar *KLF1* geninin proline zengin N-terminal transaktivasyon domainini kodlayan bölümündeki mutasyonlardı. Analiz edilen kişilerin hiçbirinde *KLF1* geni üçüncü ekzonunda mutasyon yoktu.

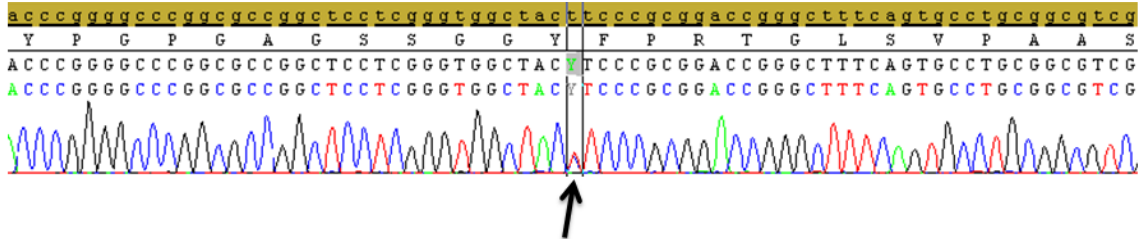
Ayrıca yine önemli bulgulardan birisi; *KLF1* geninde mutasyon saptamayı beklediğimiz Grup A olgularında *KLF1* geninde herhangi bir patojenik/muhtemel patojenik mutasyon saptanmadı.



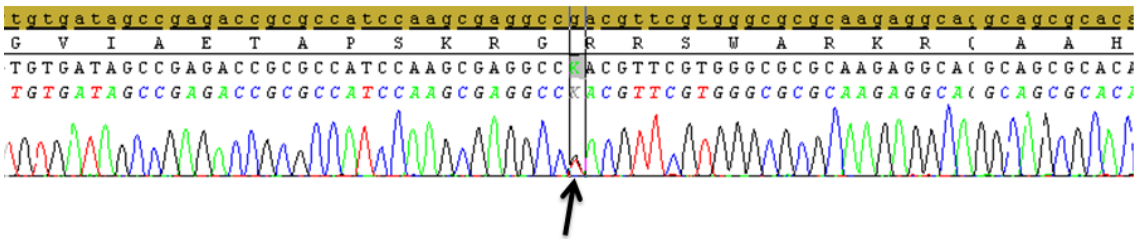
Şekil 4.14. *KLF1* geni ekzon 2 M39L mutasyonu sanger dizi analiz profili. Olgu B3'e ait saptanan heterozigot M39L (*KLF1*:c.115A>C) mutasyonu (ok).



Şekil 4.15. *KLF1* geni ekzon 2 P109S mutasyonu sanger dizi analiz profili. Olgu C19'a ait saptanan heterozigot P109S (*KLF1*:c.325C>T) mutasyonu (ok).



Şekil 4.16. *KLF1* geni ekzon 2 F182L mutasyonu sanger dizi analiz profili. Olgu B4'e ait saptanan heterozigot F182L (*KLF1*:c.544T>C) mutasyonu (ok).



Şekil 4.17. *KLF1* geni ekzon 2 R268L mutasyonu sanger dizi analiz profili. Olgu B1'e ait saptanan heterozigot R268L (*KLF1*:c.803G>T) mutasyonu (ok).

S102P mutasyonun saptanması açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$) (Şekil 4.14).

Kruskal-Wallis Test

Test Statistics ^{a,b}	
	KLF1GENIND ES102PMUTA SYONU
Chi-Square	5.954
df	4
Asymp. Sig.	.203

Şekil 4.18. Kruskal-Wallis testi; gruplar arası *KLF1* geni S102P mutasyonu saptanma sayısı açısından istatistiksel değerlendirme. Ok işareti "p" değerini göstermektedir.

Tablo 4.3. Araştırmada *KLF1* geninde saptanan mutasyon türleri, dağılımları ve bu mutasyona sahip kişilerin HbF ve HbA₂ seviyeleri. **A)** *KLF1* geni S102P mutasyonu saptananlar. **B)** *KLF1* geni S102P dışında saptanan mutasyonlar.

A)

Grup	Zigosite	Kaç kişide saptandığı	Oran (%) (n=20)	HbF değerleri (%) (Min-Maks)	HbA ₂ değerleri (%) (Min-Maks)
Grup A	S102P Heterozigot	8	%40	2,2-3,6	2,1-3,1
Grup B		9	%45	0,5-1,3	3,3-3,9
Grup C		8	%40	0,6-1,5	4,2-6,6
Grup D		11	%55	0,2-1,7	0,8-1,7
Kontrol Grubu		6	%30	0,2-1,5	2,4-2,9
Grup A	S102P Homozigot	1	%5		
Grup B		3	%15	0,5-0,8	3,3-3,8
Grup C		-	-		
Grup D		1	%5		
Kontrol Grubu		-	-		

B)

<i>KLF1</i> Geni Mutasyonu	Zigosite	Olgu/Kontrol	HbF Değeri (%)	HbA ₂ Değeri (%)
M39L	Heterozigot	Olgu B3	0,6	3,8
P109S	Heterozigot	Olgu C19	0,8	6,3
		Kontrol K18	0,3	2,9
F182L	Heterozigot	Olgu B4	1,0	3,3
		Olgu B17	0,5	3,3
		Olgu D18	0,7	0,8
R268L	Heterozigot	Olgu B1	0,6	3,4

4.3.2.HBD geninde saptanan mutasyonlar

HBD geninde mutasyon; gruplar arasında sadece Grup D'de yani sadece HbA₂ seviyesi düşük olan olgularda saptandı. Bu durum istatistiksel olarak da anlamlıydı ($p < 0.05$) (Şekil 4.19).

Kruskal-Wallis Test

Test Statistics^{a,b}

	HBDGENIND EMUTASYON
Chi-Square	92.889
df	4
Asymp. Sig.	.000

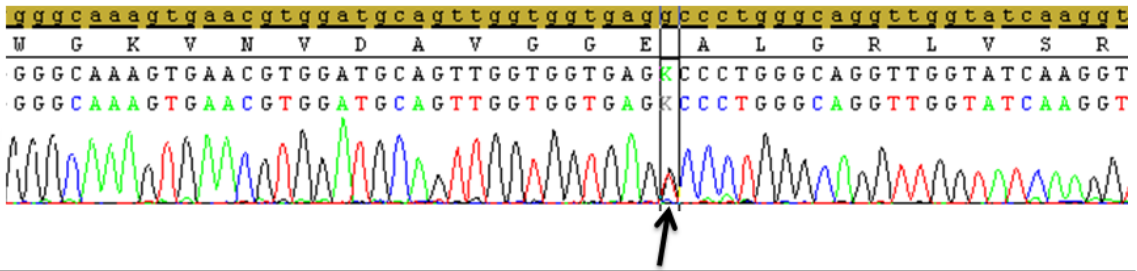
Şekil 4.19. Kruskal-Wallis testi; gruplar arası *HBD* geninde mutasyon saptanması açısından istatistiksel değerlendirme. Ok işareti "p" değerini göstermektedir.

Toplam 20 olgudan oluşan Grup D'de 19 olguda *HBD* geninde mutasyon saptandı (%95, n=20).

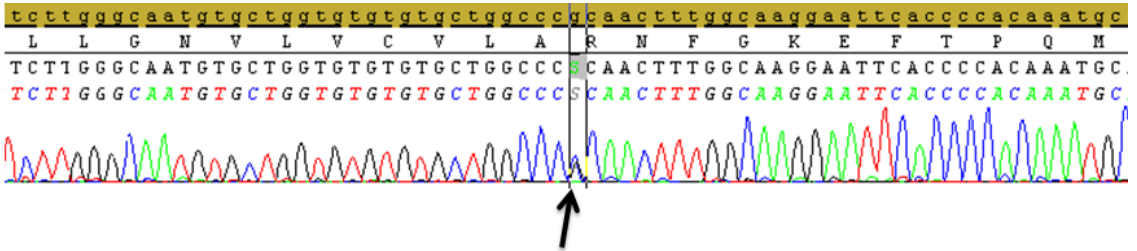
4.3.2.1.HBD geninde saptanan bilinen mutasyonlar

Saptanan 19 mutasyonun 18 tanesi daha önceden bilinen ve literatüre kazandırılmış mutasyonlardı. Bunların 12 tanesi "HbA₂-Yialousa" varyantını

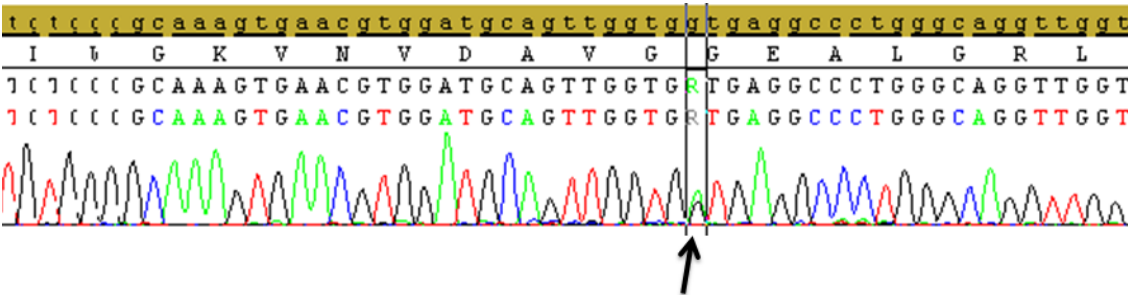
oluşturan (delta 27(B9) Ala-->Ser; HBD:c.82G>T) heterozigot mutasyonu (Olgu D2, D4, D5, D6, D7, D11, D12, D13, D14, D15, D19 ve D20); beş tanesi "HbA2-Bornova" varyantını oluşturan (delta 116(G18) Arg-->Pro; HBD:c.350G>C) heterozigot mutasyonu (Olgu D1, D9, D16, D17, D18) ve bir tane "HbA2-Yokoshima" varyantını oluşturan (delta 25(B7) Gly-->Asp; HBD:c.77G>A) heterozigot mutasyonu (Olgu D3) idi.



Şekil 4.20. HbA2-Yialousa. Olgu D2'ye ait saptanan heterozigot Delta 27(B9) Ala->Ser; HBD:c.82G>T) mutasyonu (ok).



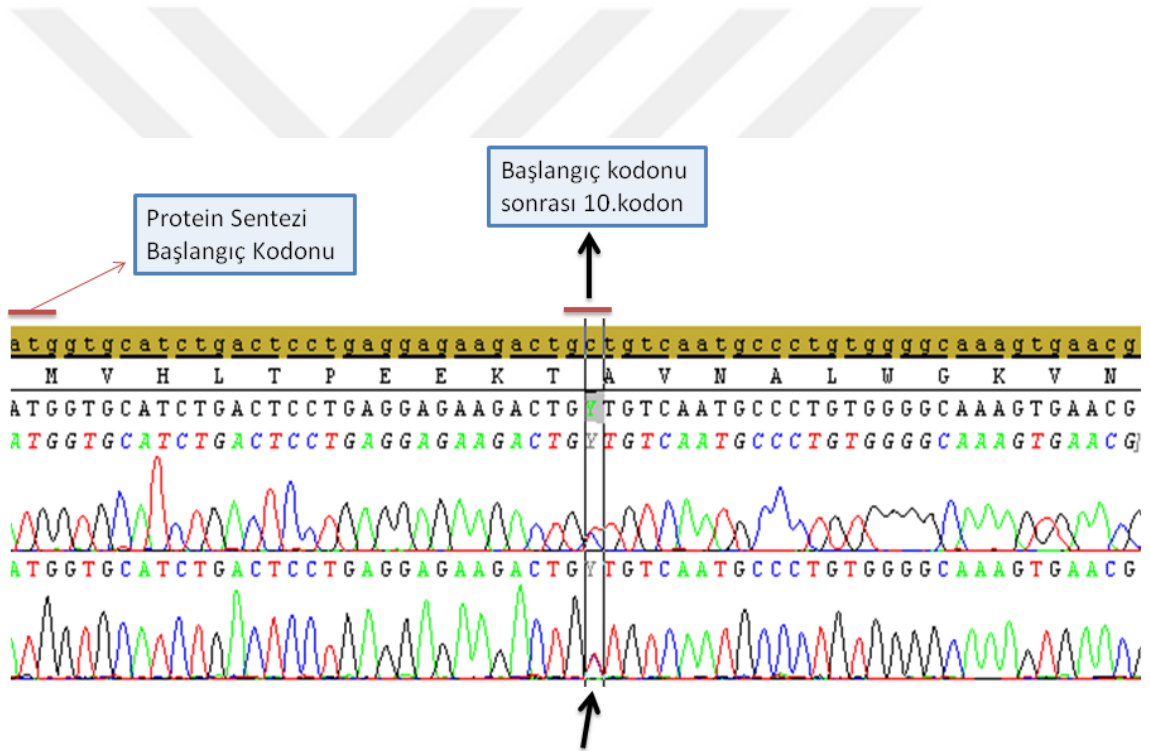
Şekil 4.21. HbA2-Bornova. Olgu D17'ye ait saptanan heterozigot Delta 116(G18) Arg->Pro; HBD:c.350G>C) mutasyonu (ok).



Şekil 4.22. HbA2-Yokoshima. Olgu D3'e ait saptanan heterozigot Delta 25(B7) Gly->Asp; HBD:c.77G>A) mutasyonu (ok).

4.3.2.2.HBD geninde ilk kez saptanan mutasyon

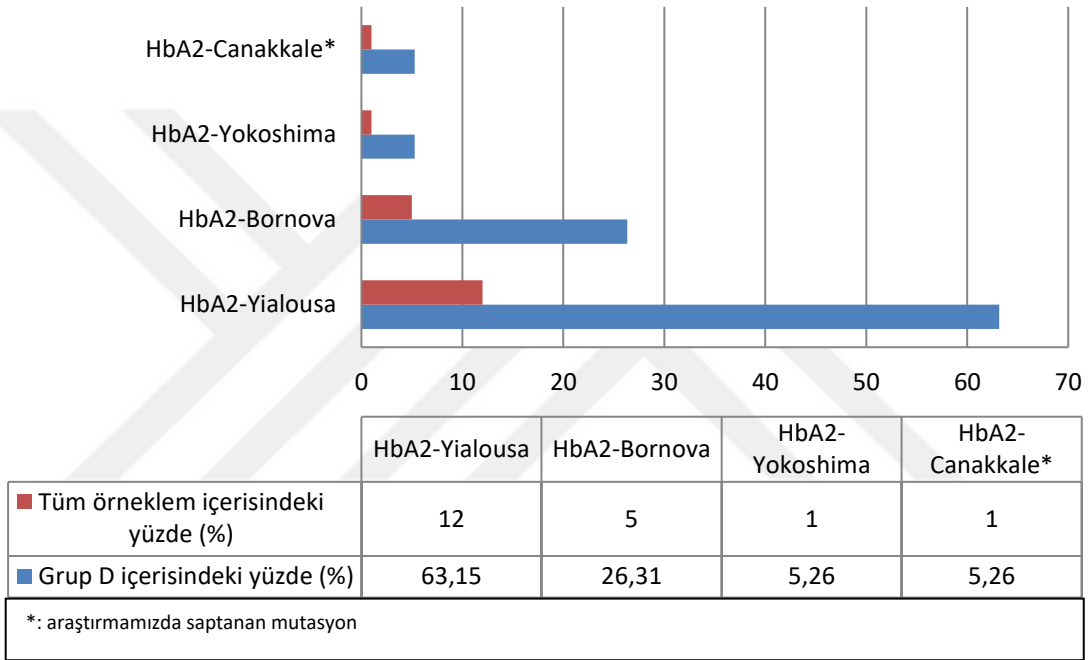
Araştırmamızda daha önceden literatürde bildirilmemiş "novel" *HBD* geni heterozigot mutasyonu tespit edildi (Olgu D8). Olgunun geldiği yer köken alınarak saptanan HbA₂ varyantına "HbA₂-Canakkale" adı verildi. Bu mutasyon *HBD* geninin A heliksi yedinci sırada bulunan alanin aminoasidinin valin şeklinde kodlanmasına neden olan bir mutasyondur (delta 10(A7) Ala-->Val; HBD:c.32C>T)



Şekil 4.23. İlk kez saptanan *HBD* geni mutasyonu. Olgu D8'e ait saptanan bu heterozigot "novel" mutasyon '**HbA₂-Canakkale (delta 10(A7) Ala-->Val; HBD:c.32C>T)**' olarak isimlendirilmiştir (olgunun geldiği yerin ismi verilmiştir).

Araştırmamızda *HBD* geni mutasyonları arasında en sık saptanan mutasyon; HbA2-Yialousa mutasyonu (%63,15; n=19), sonrasında HbA2-Bornova mutasyonu idi (%26,31). Tüm örneklem içerisinde ise HbA2-Yialousa mutasyonu %12 oranında saptanmıştı (Şekil 4.24).

HBD GENİ MUTASYONLARI



Şekil 4.24. Araştırmamızdaki *HBD* geni mutasyonlarının saptanma sıklıkları.

HbA2-Yialousa varyantını taşıyanların HbA₂ seviyeleri ortalaması $1,54 \pm 0,10$ iken HbA2-Bornova varyantını taşıyanların HbA₂ seviyeleri ortalaması $1,12 \pm 0,25$ idi (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. Araştırmada *HBD* geninde saptanan mutasyonlar.

Olgu	HbA ₂ Varyantı	HbA ₂ Değeri (%)	HbA ₂ ortalaması(%)±Ss	Min-Maks HbA ₂ (%)
D2	HbA2-Yialousa	1,6	1,54±0,10	1,4-1,7
D4	HbA2-Yialousa	1,4		
D5	HbA2-Yialousa	1,6		
D6	HbA2-Yialousa	1,7		
D7	HbA2-Yialousa	1,5		
D11	HbA2-Yialousa	1,5		
D12	HbA2-Yialousa	1,4		
D13	HbA2-Yialousa	1,5		
D14	HbA2-Yialousa	1,4		
D15	HbA2-Yialousa	1,6		
D19	HbA2-Yialousa	1,7		
D20	HbA2-Yialousa	1,6		
D1	HbA2-Bornova	0,9	1,12±0,25	0,8-1,4
D9	HbA2-Bornova	1,4		
D16	HbA2-Bornova	1,3		
D17	HbA2-Bornova	1,2		
D18	HbA2-Bornova	0,8		
D3	HbA2-Yokoshima	0,9		
D8	HbA2-Canakkale	1,4		

Tablo 4.5. Grup A olgularının demografik ve hematolojik verileri, hemoglobin elektroforez sonuçları.

Grup	Sıra	K/E	Yaş*	Hb (g/dl)	RBC (x10 ³ /mm ³)	MCV (fL)	MCH (pg)	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Ferritin (ng/mL)	Serum Demir (ug/dl)	TDBK (ug/dl)
GRUP A (Sadece HbF yüksekliği saptananlar)	A1	E	4	12,93	4,86	77	26,61	78,4	2,8	4,7	21,0	45	395
	A2	E	1	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	80,3	2,4	3,1	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	A3	K	28	12,29	3,79	103	32,41	83,0	2,7	2,2	Veri yok	163	292
	A4	K	25	12,6	4,31	90	29,23	82,4	2,6	2,1	Veri yok	47	346
	A5	E	36	14,79	4,72	95	31,29	82,4	2,5	2,9	57,7	113	382
	A6	E	36	14,17	4,58	91	30,95	81,4	2,1	2,2	Veri yok	69	334
	A7	K	20	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	81,4	2,9	2,7	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	A8	K	1	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	78,3	2,3	7,0	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	A9	K	18	11,21	3,24	99	34,58	82,3	2,7	2,6	Veri yok	63	453
	A10	K	1	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	81,7	2,9	3,0	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	A11	K	9	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	81,1	3,0	3,4	Veri yok	180	298
	A12	E	28	15,87	5,18	91	30,65	81,4	3,0	3,3	Veri yok	237	338
	A13	K	38	13,35	4,45	93	29,97	82,5	2,9	2,4	Veri yok	167	323
	A14	K	17	12,98	4,35	90	29,85	82,6	2,6	3,6	Veri yok	57	368
	A15	E	36	12,74	4,05	95	31,44	81,5	2,8	2,8	Veri yok	69	272
	A16	K	6	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	80,6	3,0	3,5	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	A17	E	5	10,3	3,91	81	26,32	80,9	2,9	2,2	3,1	Veri yok	Veri yok
	A18	K	26	11,18	3,58	97	31,26	81,1	2,7	2,7	Veri yok	48	448
	A19	K	21	10,66	4,01	87	26,6	80,6	2,2	2,4	Veri yok	28	493
	A20	K	1	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	80,6	3,1	3,0	Veri yok	Veri yok	Veri yok

*: Örneğin verildiği zamandaki yaş.

Tablo 4.6. Grup B olgularının demografik ve hematolojik verileri, hemoglobin elektroforez sonuçları.

Grup	Sıra	K/E	Yaş*	Hb (g/dl)	RBC (x10 ³ /mm ³)	MCV (fL)	MCH (pg)	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Ferritin (ng/mL)	Serum Demir (ug/dl)	TDBK (ug/dl)
GRUP B (Sadece borderline HbA ₂ yüksekliği saptananlar)	B1	K	23	11,47	4,09	87	28,02	83,4	3,4	0,6	14,8	41	300
	B2	K	20	11,92	4,37	83	27,27	83,2	3,6	0,5	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	B3	K	36	8,82	3,04	89	29,03	82,2	3,8	0,6	4,9	45	436
	B4	K	6	11,2	4,34	78	25,79	80,7	3,3	1,0	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	B5	K	31	12,39	4,13	92	29,98	83,5	3,6	0,8	77,2	101	302
	B6	K	30	12,79	4,21	93	30,34	85,0	3,5	0,5	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	B7	E	21	16,54	5,00	97	33,06	84,2	3,5	0,5	Veri yok	142	282
	B8	E	23	14,47	4,62	91	31,31	83,0	3,8	0,8	Veri yok	99	295
	B9	E	30	15,4	5,05	89	30,47	83,0	3,9	0,6	47,2	203	317
	B10	K	11	13,94	5,16	85	27,02	83,4	3,6	0,6	13,3	65	322
	B11	K	19	11,14	3,64	92	30,58	84,5	3,4	0,5	27,3	117	302
	B12	K	21	13,75	4,01	101	34,26	85,0	3,7	0,6	Veri yok	147	325
	B13	E	33	16,13	5,43	86	29,68	84,8	3,4	0,2	Veri yok	153	301
	B14	E	24	13,53	4,42	94	30,59	83,5	3,3	0,6	Veri yok	78	328
	B15	E	31	14,85	5,17	85	28,74	83,6	3,3	0,6	Veri yok	134	323
	B16	K	6	12,65	4,77	80	26,52	83,0	3,4	1,3	16,8	89	382
	B17	K	22	11,66	3,96	87	29,46	85,1	3,3	0,5	Veri yok	89	450
	B18	K	8	12,28	4,46	83	27,51	84,3	3,8	0,2	20,2	168	370
	B19	K	6	11,3	4,11	83	27,5	86,6	3,5	0,6	80,5	73	314
	B20	E	7	12,69	4,37	86	29,02	83,2	3,3	1,0	18,0	56	307

*: Örneğin verildiği zamandaki yaş.

Tablo 4.7. Grup C olgularının demografik ve hematolojik verileri, hemoglobin elektroforez sonuçları.

Grup	Sıra	K/E	Yaş*	Hb (g/dl)	RBC (x10 ³ /mm ³)	MCV (fL)	MCH (pg)	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Ferritin (ng/mL)	Serum Demir (ug/dl)	TDBK (ug/dl)
GRUP C (Sadece borderline seviyesi üzerinde HbA ₂ yüksekliği saptananlar)	C1	K	63	11,13	5,49	61	20,27	80,6	5,5	0,7	36,4	82	301
	C2	E	32	11,51	5,94	66	19,37	81,5	5,2	0,8	Veri yok	43	289
	C3	K	32	10,28	4,91	66	20,95	79,8	5,3	1,5	25,8	111	324
	C4	E	38	10,74	5,4	62	19,88	80,2	6,0	0,9	Veri yok	59	314
	C5	E	17	11,64	5,34	70	21,79	80,0	5,8	1,5	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	C6	K	18	10,14	5,26	61	19,26	81,9	5,0	0,7	Veri yok	74	263
	C7	K	56	11,2	5,29	67	21,18	79,9	5,6	0,7	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	C8	E	29	14,94	6,37	70	23,47	79,7	4,8	0,7	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	C9	E	32	14,67	5,72	79	25,66	80,3	6,6	0,6	Veri yok	92	379
	C10	K	25	8,95	4,77	62	18,75	79,3	5,2	1,7	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	C11	K	31	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	79,9	5,8	1,2	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	C12	K	45	12,92	6,32	62	20,45	79,5	6,1	0,9	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	C13	K	22	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	77,9	7,3	1,2	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	C14	K	28	10,98	5,34	63	20,56	79,6	5,3	1,2	Veri yok	95	317
	C15	E	38	12,88	6,55	62	19,66	78,4	6,2	1,6	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	C16	K	34	8,15	3,75	66	21,72	78,7	5,2	1,6	18,5	174	378
	C17	E	27	13,2	6,34	65	20,81	80,1	5,5	1,8	Veri yok	84	301
	C18	K	23	14,16	5,23	80	27,06	82,1	4,2	0,9	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	C19	K	16	11,45	5,64	59	20,3	79,9	6,3	0,8	Veri yok	97	371
	C20	E	33	13,22	6,22	66	31,98	80,1	5,0	0,6	37,1	160	326

*: Örneğin verildiği zamandaki yaş.

Tablo 4.8. Grup D olgularının demografik ve hematolojik verileri, hemoglobin elektroforez sonuçları.

Grup	Sıra	K/E	Yaş*	Hb (g/dl)	RBC (x10 ³ /mm ³)	MCV (fL)	MCH (pg)	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Ferritin (ng/mL)	Serum Demir (ug/dl)	TDBK (ug/dl)
GRUP D (Sadece HbA₂ düşüklüğü bulunanlar)	D1	K	29	12,06	4,43	85	27,23	84,6	0,9	0,7	Veri yok	66	470
	D2	E	26	12,68	4,49	86	28,26	80,9	1,6	0,2	Veri yok	43	322
	D3	K	29	13,25	4,23	99	31,3	80,7	0,9	0,9	Veri yok	45	373
	D4	K	17	12,76	4,93	78	25,9	84,5	1,4	0,5	Veri yok	97	300
	D5	E	30	13,41	4,52	90	29,68	83,6	1,6	0,7	42,3	129	292
	D6	E	38	14,36	4,74	93	30,28	83,4	1,7	1,2	Veri yok	100	432
	D7	E	27	13,2	5,45	74	24,23	83,6	1,5	0,6	Veri yok	95	410
	D8	K	29	8,93	Veri yok	61	Veri yok	84,3	1,4	0,5	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	D9	E	26	14,54	4,72	94	30,79	84,3	1,4	0,5	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	D10	K	10	Veri yok	Veri yok	Veri yok	Veri yok	85,0	1,1	0,9	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	D11	K	27	12,83	4,15	92	30,88	83,8	1,5	0,9	Veri yok	115	339
	D12	K	28	12,77	4,29	88	29,81	85,2	1,4	0,3	Veri yok	93	359
	D13	E	43	15,78	5,47	84	28,83	85,1	1,5	0,5	Veri yok	82	272
	D14	E	57	14,28	4,72	90	30,27	81,4	1,4	0,8	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	D15	K	26	12,23	4,44	84	27,56	83,3	1,6	0,3	Veri yok	104	394
	D16	K	24	12,69	4,1	89	30,92	85,0	1,3	1,1	Veri yok	136	307
	D17	E	27	13,9	4,38	89	31,72	83,6	1,2	0,6	Veri yok	141	364
	D18	K	36	11,18	4,12	77	27,12	84,3	0,8	0,7	2,6	25	358
	D19	E	27	14,04	4,52	98	31,07	82,8	1,7	1,4	Veri yok	117	332
	D20	E	52	14,69	4,65	91	31,62	82,8	1,6	1,7	Veri yok	70	341

*: Örneğin verildiği zamandaki yaş.

Tablo 4.9. Kontrol Grubu kişilerinin demografik ve hematolojik verileri, hemogloblin elektroforez sonuçları.

Grup	Sıra	K/E	Yaş*	Hb (g/dl)	RBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	MCV (fl)	MCH (pg)	HbA (%)	HbA ₂ (%)	HbF (%)	Ferritin (ng/mL)	Serum Demir	TDBK (ug/dl)
Kontrol Grubu	K1	K	28	13,09	4,23	93	30,95	83,0	2,7	0,5	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	K2	E	37	11,78	3,88	89	30,35	81,3	2,5	0,8	40,9	45	351
	K3	K	10	12,48	4,35	83	28,67	82,3	2,8	0,5	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	K4	K	31	12,19	3,95	92	30,86	83,6	2,8	0,6	Veri yok	69	236
	K5	E	23	13,88	4,49	88	30,89	81,8	2,5	0,6	Veri yok	145	398
	K6	K	28	12,89	4,52	86	28,54	84,8	2,7	0,4	10,2	136	348
	K7	E	20	16,56	5,07	98	32,67	83,7	2,9	1,5	42,9	161	326
	K8	E	8	12,01	4,44	85	27,06	80,1	2,9	0,3	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	K9	E	22	15,51	5,39	84	28,77	81,6	2,6	0,5	22,5	94	363
	K10	E	20	14,56	5,11	82	28,5	82,1	2,9	0,5	Veri yok	68	351
	K11	K	45	12,76	4,55	88	28,04	82,5	2,6	0,7	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	K12	E	27	16,58	4,94	98	33,57	85,3	2,5	0,4	Veri yok	173	372
	K13	K	42	13,93	4,95	83	28,14	83,2	2,6	0,5	16,8	48	306
	K14	K	28	11,3	3,99	88	28,34	83,9	2,8	0,3	5,8	38	368
	K15	K	37	12,59	4,26	89	29,54	83,2	2,6	0,6	Veri yok	45	301
	K16	K	26	12,48	4,47	85	27,93	83,2	2,8	0,6	9,2	62	367
	K17	K	36	10,98	4,23	80	25,95	80,6	2,4	0,7	Veri yok	Veri yok	Veri yok
	K18	E	40	14,01	5,01	88	27,96	81,1	2,9	0,3	31,3	102	375
	K19	E	25	16,42	5,58	91	29,44	82,7	2,7	0,2	27,2	172	289
	K20	E	26	14,86	4,82	92	30,82	81,7	2,8	0,8	Veri yok	158	378

*: Örneğin verildiği zamandaki yaş.

5.TARTIŞMA

Evlilik öncesi talasemi taramasının zorunlu olduğu ülkeler arasında Türkiye ile birlikte Birleşik Arap Emirlikleri, Suudi Arabistan, Ürdün, Kıbrıs ve İran gibi ülkeler de bulunmaktadır (123). Bu sayede talasemi hastalığı gibi önemli bir halk sağlığı sorunu etkin bir şekilde kontrol altında tutulabilmekte ve tedavi için sağlığa ayrılan maliyetler ciddi oranda düşürülebilmektedir. Bir ülkede; popülasyon taraması yaparak taşıyıcıların saptanması, mutasyonların moleküler karakterizasyonun ortaya konulması, genetik danışmanlık ve prenatal tanı talasemi kontrol programının yapıtaşlarını oluşturmaktadır (117,124).

Talasemi taramasında günümüzde ilk basamak yaklaşım; olguların tam kan sayımı (CBC) analizlerinin yapılması, hematolojik parametrelerinde anormallik saptananların (hipokromi, mikrositik anemi, eritrositozis) ise takiben otomatize HPLC ya da kapiller elektroforez cihazı ile hemoglobin fraksiyonlarının analiz edilmesinden oluşur (125-128). Çiftlerden birinin klasik β -talasemi taşıyıcısı olduğunun bilindiği durumlarda diğersinin normal ya da borderline seviyede HbA₂ seviyesi olsa bile β -globin geni analizi yapılmalı ve δ -globin genotiplenmesi de özellikle akılda tutulmalıdır (105,117,129-131).

Talasemi prevalansının yüksek olduğu ülkeler (Akdeniz ülkeleri, İran, Hong Kong, Tayland ve Çin gibi) de dahil olmak üzere pek çok ülkede MCV değerinin 80 ve üzeri seviyeleri (≥ 80 fL) ile MCH değerinin 27 ve üzeri seviyeleri (≥ 27 pg) normal kabul edilmektedir (126,132-138). Ancak talasemi taraması için sadece bu indeksler üzerinden yorum ve değerlendirme yapmak pek çok bireyin talasemi açısından atlanmasına neden olabilmektedir (139). α - ve β -talasemi birlikteliği durumunda ya da HbS, HbE hemoglobinopatileri, sessiz β -talasemi mutasyonlarını (Capsite +1 (A \rightarrow C), IVS-II-844 C>G, PolyA (T \rightarrow C) gibi) taşıyanlarda MCV ve MCH indekslerinin normal aralıkta olduğu ve talasemi tarama programlarında bu olguların yanlışlıkla negatif bireyler olarak değerlendirildikleri pek çok çalışmada gösterilmiştir (133,140-148).

Hemoglobin fraksiyon seviyeleri üzerine de pek çok faktör etki edebilmektedir (Tablo5.1). Bu durum talaseminin laboratuvar tanısını koymada klinisyenlere zorluk yaşatmaktadır.

Tablo 5.1. Talaseminin laboratuvar tanısında karşılaşılan zorluklar-Aliyeva ve ark. (149)'ndan alınmıştır.

Artmış HbA ₂ seviyesi ile ilişkili faktörler	β-talasemi taşıyıcısı olup borderline HbA ₂ seviyesi ile ilişkili faktörler	HbF yüksekliği ile ilişkili faktörler
<i>KLF1</i> geni mutasyonları	"Sessiz" β-talasemi mutasyonları: -101 [C>T]	Hereditör Fetal Hemoglobin Persistans
α-gen triplikasyonu	-92 [C>T]	δβ-talasemi
Elektroforezde HbA ₂ ile birlikte yürüyen varyantlar	CAP +1 [A>C]	<i>BCL11A</i> geni mutasyonları
Antiretroviral tedavi alan HIV'li hastalar	+33 [C>G]	<i>HBS1L-MYB</i> geni mutasyonları
Hipertiroidi	+1480 [C>G]	Kemik iliği tümörleri
Megaloblastik anemi	IVS-I-6 [T>C]	Aplastik anemi
Hipertrofik osteoartropati	IVS-II-844 [C>G]	Fankoni anemisi
Psödoksantoma elastikum	PolyA mutasyonları	Eritropoietik stres yaratan durumlar
	α-talasemi	Gebelik
	δ-talasemi	HbF üretimini indükleyen tedaviler
	α-zincir varyantları	
	δ-zincir varyantları	
	Ağır demir eksikliği	
	Sideroblastik anemi	
	Eritrolökemi	
	Aplastik anemi	
	Kurşun zehirlenmesi	

Herhangi bir endikasyon sonrası yapılan Hb elektroforez sonucunda HbA₂ düşüklüğü saptanan bireylerde demir eksikliği anemisi- talasemi (örneğin δ-talasemi) ayrımı yapılmalıdır. Tam kan sayımı (CBC) değerleri üzerinden talasemiler ile demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısını yapabilmek için 40'tan fazla formül geliştirilmiştir (en çok kullanılanları Tablo 5.2'de gösterilmiştir) ancak hiç bir formülün %100 spesifitesi ya da sensitivitesi bulunmamaktadır (98). Demir eksikliği anemisi dışında *HBD* genindeki mutasyonlar da HbA₂ seviyelerindeki düşüklükten sorumlu olabilmektedir.

Tablo 5.2. Talasemi-demir eksikliği anemisi ayırıcı tanısında kullanılan formüller- Barrett ve ark. (98)'ndan alınmıştır.

Algorithms for discrimination of IDA and thalassaemia. MCV – mean corpuscular volume; RBC – number of red blood cells; MCH – mean corpuscular haemoglobin; RDW – red blood cell distribution width.

Algorithm	Formula	Indicates IDA	Indicates Thalassaemia
England & Fraser (150)	$MCV - RBC - (5 \times Hb) - 3.4$	≥ 0.0	< 0.0
Green & King (151)	$(MCV^2 \times RDW - CV)/(Hb \times 100)$	≥ 65.0	< 65.0
Mentzer (152)	MCV/RBC	≥ 13.0	< 13.0
Shine & Lal (153)	$MCV^2 \times MCH \times 0.01$	≥ 1530.0	< 1530.0
Ricerca (154)	RDW/RBC	≥ 4.4	< 4.4
Srivastara (155)	MCH/RBC	≥ 3.8	< 3.8
Ehsani (156)	$MCV - (10 \times RBC)$	≥ 15.0	< 15.0
Sirdah (157)	$MCV - RBC - 3 \times Hb$	≥ 27.0	< 27.0
Bordbar (158)	$ 80 - MCV \times 27 - MCH $	< 44.76	≥ 44.76
RDW Index	$RDW \times MCV/RBC$	≥ 220.0	< 220

δ -globin genindeki mutasyonların bazıları aynı β -globin geninde olduğu gibi talasemik tablo oluşturmayıp, moleküler karakteri farklı olan yapısal varyantlar oluşturur iken; bazı mutasyonları δ -globin ekspresyonuna engel olarak δ^+ veya δ^0 talasemilere neden olmaktadır. *HBD* geninde bugüne kadar saptanmış olan mutasyonların yaklaşık %20'sinin talasemik mutasyonlar olduğu bilinmektedir (159).

Herhangi bir hemoglobin varyantının stabil olup olmadığı; spesifik stabilite testi denilen "isopropanol test" ile değerlendirilebilir. Kullanılan ortamdaki tampon isopropanol varlığında daha az polar olur; bu da hemoglobin hidrofobik bağlantılarının zayıflamasına ve böylece hemoglobin yapılarının presipite

olmalarına olanak sağlar. Dolayısıyla stabil yapıda olmayan bir hemoglobin varyantı presipite olur iken, karşılaştırma için kullanılan kontrol solüsyonu berrak olarak kaldığından analiz edilen yapının stabil olmadığı tespit edilmiş olur (160).

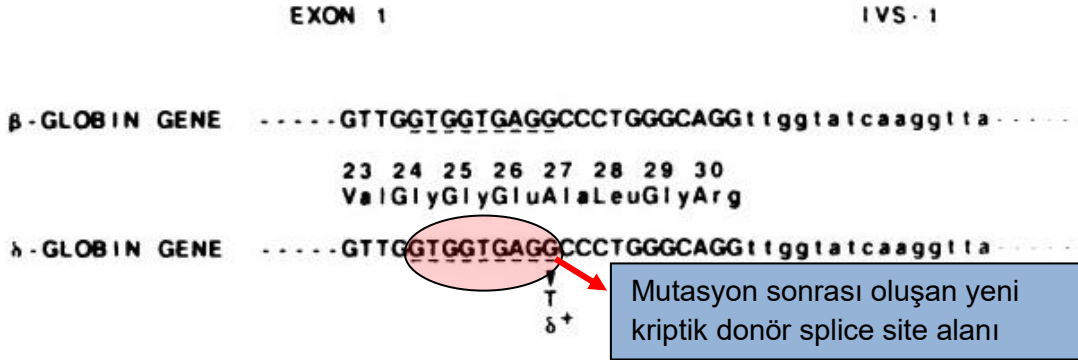
HBD geni mutasyonlarının en sık görülenleri farklı popülasyonlarda değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin; Çinlilerde *HBD* geni -77 mutasyonu %0,4'lük toplam δ -geni defektleri içerisinde %0,2'lik prevalansı ile en sık rastlanan delta geni mutasyonudur (130). -77 mutasyonu; δ -globin geni ekspresyonu için önemli olan GATA-1 eritroid-spesifik faktörünün proksimal promoter bağlanma alanı olan 5'-TTATCT-3' motifi içerisinde yer alır. Dolayısıyla mutasyon sonrası GATA-1 bağlanma alanı bozulduğundan δ -globin geni ekspresyonu efektif bir şekilde engellenmiş olur.

Afrika ve bazı Asya popülasyonunda, Afro Amerikalılarda en sık görülen delta globin zincir varyantı ise HbB₂'dir (δ 16 Gly>Arg) (HbA₂' olarak da isimlendirilmektedir) (161,162,163). HbB₂ yapısı klinik olarak tamamen sessiz bir varyanttır ancak total elektriksel yükü HbA₂'den farklı olduğu için elektroforez yöntemlerinde ayrı yerde pik vererek HbA₂ seviyesinin yanlış hesaplanmasına neden olur. Dolayısıyla HbA₂ seviyesi hesaplanır iken HbA₂' gibi stabil olan δ -globin varyantlarının seviyesi de mutlaka toplam hesaba dahil edilmelidir (164).

HbA₂-Yialousa (δ 27 Ala>Ser); İspanya, Portekiz, İtalya, Yunanistan, Kıbrıs gibi Akdeniz bölgesi ülkeleri ile Umman ve Orta Doğu'da en sık görülen δ -globin varyantıdır (119,122,165-174). Kountouris ve arkadaşları (175) 20 yıllık süreçte yaklaşık olarak taradıkları 15000 kişinin içerisinde 428 kişinin δ -globin geni mutasyonu taşıdığını; varyantların en sık görüleninin ise %48,1'lik oranla HbA₂-Yialousa olduğunu saptamışlardır. Pavlou ve arkadaşları (168) 5030 kişilik kohort içerisinde HbA₂ seviyesi %1,9 ve altında olan 74 olgudan 54'ünde (%72,9) δ -globin geni mutasyonu saptamış; varyantlar arasında yine en sık varyant olarak HbA₂-Yialousa'yı (%60,7) bulmuşlardır. Pirastu ve arkadaşları

(176) Sardinya'da HbA2-Yialousa varyantının genel toplumdaki insidansını %0,7; Guiso ve arkadaşları (170) yine Sardinya'da rastgele seçilmiş 750 kişilik bir örnekleme HbA2-Yialousa insidansını %1,2 olarak bulmuşlardır. Trifillis ve arkadaşları ise Yunan kökenli Kıbrıslılarda genel HbA2-Yialousa insidansını %1,3 olarak belirtmektedirler (177). Kordafshari ve arkadaşları (167) İran'da 2007-2013 yılları arası toplam 43 olguyu *HBD* geni açısından genotiplemiş ve 21 olguda mutasyon saptamıştır. Olgularda varyantlar arasında en sık HbA2-Yialousa (%71,4) görülmüştür. Alkindi ve arkadaşları (165) araştırmaya dahil ettikleri 78 Ummanlı olgunun 40'ında δ -globin geni mutasyonu saptamış; aralarında en sık olarak da yine HbA2-Yialousa'yı (%66,6; n=26) saptamışlardır. Bizim araştırmamızda da en sık saptanan varyant %63,15'lik oran ile HbA2-Yialousa varyantıydı. Bu sonuç literatürdeki araştırmalarla benzerlik göstermekte idi. Ayrıca araştırmamızda tüm örneklem içerisinde %12'lik HbA2-Yialousa saptama frekansı mevcuttu. Bu oran genel insidans çalışması yapan diğer araştırmalara göre oldukça yüksekti (170,177,176); ancak oranın bu kadar yüksek çıkmasının nedenleri olarak; araştırdığımız örneklemin rastgele seçilememesi ve *HBD* geninde mutasyon saptama ihtimalini artırabilmek için düşük HbA₂ seviyesinin \leq %2 yerine \leq %1,7 olarak seçilmesine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

HbA2-Yialousa; δ^+ talasemiye neden olmaktadır. Aynı mutasyonun *HBB* genindeki karşılığında olduğu gibi (Hb Knossos (β 27(B9) Ala>Ser, HBB:c.82G>T); yeni bir kriptik donör splice alanı aktivasyonuna neden olarak alternatif splicinge sebebiyet verdiği düşünülmektedir (Şekil 5.1). Aktivasyon sonrası bu yeni splice alanı *HBD* geninin B heliksinin bir parçası olan 27-30. kodonlarının splicing'e uğrayamamasına yol açarak normal RNA splicing mekanizmasını bozar ve stabil olmayan mRNA'ların sentezlenmesine neden olur. Bu da normal olarak transkripsiyona uğrayan mRNA'nın miktar olarak azalmasına sebep olmaktadır.



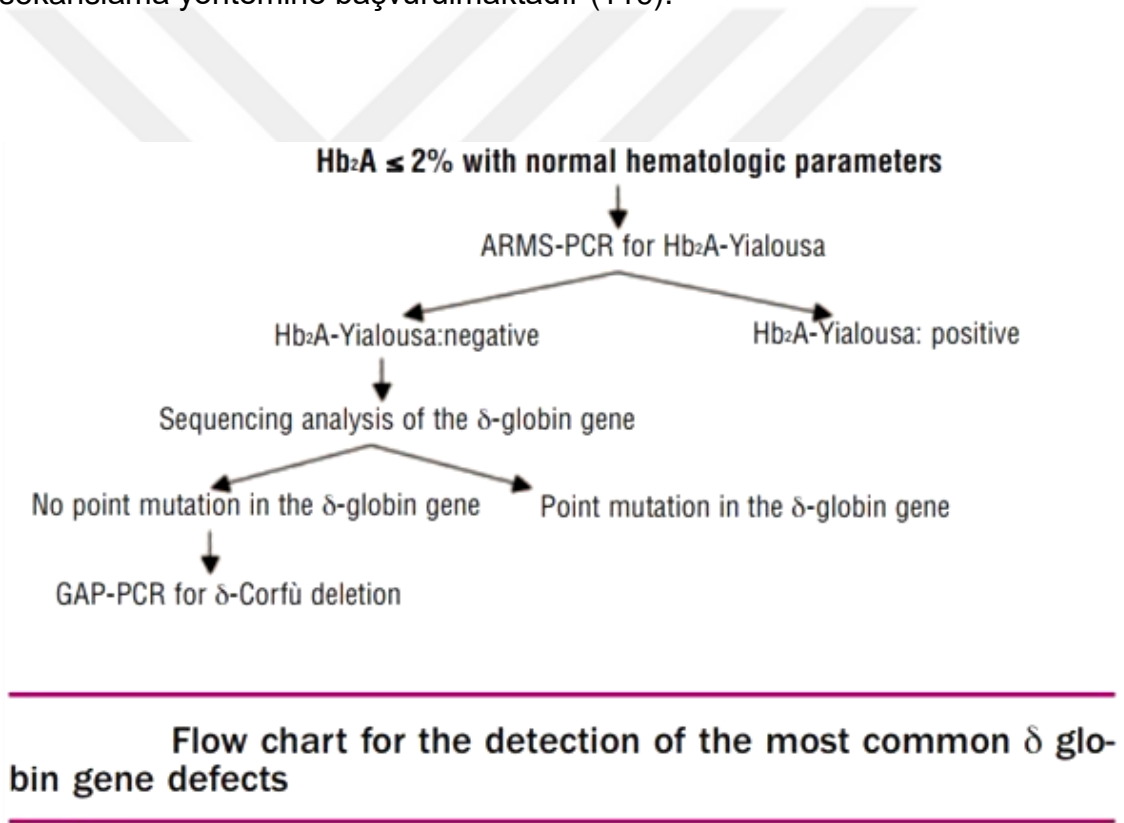
Underlined sequences resemble the donor splice site consensus sequences $\hat{A}GGT\hat{A}GT$.

Şekil 5.1. Kriptik donör splice site alanı-Moi ve ark. (171)'ndan alınmıştır.

Türkiye'de *HBD* genotipleme üzerine yapılmış çalışmalar oldukça azdır (74-76,78). Öner ve arkadaşları β -talasemi taşıyıcısı olup normal HbA₂ seviyesine sahip olan toplam 6 olguyu δ -globin gen mutasyonu açısından incelemiş ve 5 olguda *HBD* geninde mutasyon saptamıştır (78). Saptadığı mutasyonlar; IVS-I-2 (T>C), HbA₂-Yialousa ve Codon 59 (-A) mutasyonlarıdır. Köşeler ve arkadaşları (75) β -talasemi taşıyıcısı olup HbA₂ değeri düşük olan toplam 12 kişinin yalnızca üçünde δ -globin geninde mutasyon saptayıp saptadıkları varyantların HbA₂-Yialousa ve HbA₂-Yokoshima olduğundan bahsetmişlerdir. Kavasoglu ve arkadaşları (76) toplamda 50 olguda *HBD* geni genotiplendirmesi yapmış ve 8 olguda toplam 7 farklı varyasyon saptamışlardır. Bu varyasyonlar -65(A->G) delta+ (HBD:c.-115A>G), Codon 4(ACT->ATT) delta+ (HBD:c.14C>T), HBD:c.294C>T, HBD:c.316-174_316-173delAT, HBD:c.315+429 T>C, HBD:c.-172 A>T ve literatüre yeni olarak kazandırdıkları HBD:c.350G>C (HbA₂-Bornova varyantı) varyasyonlarıdır; ancak 50 olgunun hiçbirisinde HbA₂-Yialousa gibi en sık saptanması beklenen HbA₂ varyantını saptayamamaları, Akdeniz ülkelerinden birisi olan Türkiye için oldukça şaşırtıcı bir sonuçtur. Akar ve arkadaşları (74) ise 5 yıllık süreçte saptadıkları anormal

hemoglobin türlerini yayınlamış ve δ -globin mutasyonlarından sadece HbA₂-Yialousa varyantını saptadıklarını belirtmişlerdir.

Ülkemizin de dahil olduğu Akdeniz bölgesi ülkelerinde δ -globin varyantları arasında HbA₂-Yialousa'nın bu kadar sık oranda saptanması tanı koymada maliyet-etkinlik açısından bazı algoritmaların oluşmasını sağlamıştır (Şekil 5.2). Bunun sonucunda δ -varyantından şüphelenilen olgularda daha ucuz tekniklerle öncelikle HbA₂-Yialousa varyantı saptanmasına yönelik tarama yapılmakta HbA₂-Yialousa saptanmadığında ise sonrasında δ -globin geni sekanslama yöntemine başvurulmaktadır (119).



Şekil 5.2. δ -globin varyantları açısından değerlendirme-Giambona ve ark. (119)'ndan alınmıştır.

Literatürde HbA₂-Yialousa saptananlarda HbA₂ seviyelerinin %1,5-%2,0 arasında değiştiği söylenmektedir (119,177). Kordafshari ve arkadaşları (167) yaptıkları çalışmada HbA₂-Yialousa varyantını taşıyan kişilerin HbA₂ seviyelerinin $1,43 \pm 0,41$ olduğundan bahsetmişlerdir. Bizler de araştırmamızda

HbA2-Yialousa varyantını taşıyanların HbA₂ seviyeleri ortalamasını 1,54±0,10 olarak saptadık.

Pavlou ve arkadaşları HbA₂ seviyesi ≤1,6% olan olguların tamamında δ-globin geninde mutasyon saptandığını; 1,7%-1,8% seviyelerine yükseldikçe mutasyon saptanma oranının düşmeye başladığını (%90,9) ve HbA₂ seviyesi 1,9% olduğunda ise bu oranın %53,5'lere kadar düştüğünü belirtmektedirler (168). Bizler de HbA₂ seviyesi ≤%1,7 olarak seçtiğimiz 20 olgunun 19'unda (%95; n=20) *HBD* geninde mutasyon saptadık.

HbA2-Yokoshima ilk kez Japonya'da bir ailede tanımlanmıştır (178). Aile köken olarak Yokoshima adı verilen küçük bir adadan geldiği için saptanan varyanta bu isim verilmiştir. Ohba ve arkadaşlarının sundukları bu olgu sunumunda; proband, probandın babası, probandın amcası, probandın dedesi ve babaanesi HbA2-Yokoshima varyantını heterozigot olarak taşıırken; probandın başka bir amcası bu varyantı homozigot olarak taşımaktadır. Hemogloblin fraksiyon analizi için izoelektrik fokuslama yönteminde HbA2-Yokoshima varyantını homozigot olarak taşıyan bireyde herhangi bir normal HbA₂ bandı saptanmamıştır.

HbA2-Yokoshima varyantında *HBD* geni başlangıç kodonundan sonraki 25. kodonda glisin aminoasidini kodlayan GGT sekansı mutasyon sonrası aspartatı kodlayan GAT sekansına dönüşmektedir (Delta 25(B7) Gly-->Asp; HBD:c.77G>A). Glisin; yan zinciri sadece hidrojen atomundan oluşmuş, optik olarak aktif olmayan (optik izomeri bulunmamaktadır) aminoasitlerin en basiti denilebilecek apolar bir aminoasittir. Yan zincirinin olmaması iki polipeptit ana zincirinin birbirlerine yaklaşabilecekleri bölümlerde bulunmalarını sağlar. Ayrıca diğer aminoasitlerden çok daha fazla esnek olup; polipeptit ana zincirinin hareket ettiği ve kırıldığı bölümlerde bulunmaktadırlar. Yapısının küçük olmasından dolayı çoğu aminoasidin sığamadığı pek çok yere sığabilmektedirler. Mutasyon sonrası glisin yerine gelen aspartat aminoasidi polar ve asidik yapıda olduğundan HbA₂ proteinin net yükünü değiştirir; ayrıca glisin aminoasidinden daha büyük

yapıda olduğundan ana kütlede 58 ünitelik artışa sebep olur. Aynı yerdeki mutasyonun *HBB* genindeki karşılığı "Hb J-Auckland [β 25(B7)Gly-->Asp; HBB:c.77G>A]" varyantıdır. Williamson ve arkadaşları (179) saptadıkları bu hemoglobin varyantının oksijene afinitesinin düşük olduğunu ve moleküler yapısının hafif anstabil olduğunu belirtmişlerdir. Dolayısıyla HbA2-Yokoshima'nın da δ^+ talasemiye neden olduğu düşünülmektedir.

HbA2-Yokoshima yapısına, bilindiği kadarıyla, Japonya haricinde Kıbrıs ve ülkemizde de rastlanmıştır (75,168,175). Kountouris ve arkadaşları (175) toplam 428 δ -globin taşıyıcısı içerisinde HbA2-Yokoshima varyantını taşıyanların oranını %11,2 olarak bulmuşken (n=51); Pavlou ve arkadaşları (168) toplam 54 δ -globin varyantı saptanan kişi arasında yalnızca bir kişide (%1,8) HbA2-Yokoshima varyantı tespit etmişlerdir. Köseler ve arkadaşlarının Türkiye'de yaptıkları bir çalışmada (75); β -talasemi taşıyıcısı olup HbA₂ değeri düşük olan toplam 12 kişinin yalnızca üçünde δ -globin geninde mutasyon saptamış; bunların içerisinde bir kişide HbA2-Yokoshima yapısı saptamışlardır. Bizler de yapmış olduğumuz bu araştırmamızda bir olguda HbA2-Yokoshima varyantını saptadık.

Literatürde HbA2-Yokoshima varyantına sahip olguların HbA₂ seviyeleri hakkında, bilindiği kadarıyla, pek fazla bilgi mevcut değildir. Sadece Pavlou ve arkadaşlarının (168) araştırmasında HbA2-Yokoshima varyantı saptanan tek olgunun HbA₂ seviyesinin 1,4% olduğu belirtilmiştir. Bizim yaptığımız çalışmada ise HbA2-Yokoshima varyantını saptadığımız olgunun (Olgu D3) HbA₂ seviyesi %0,9 olarak saptanmış ve HPLC görüntüsünde de farklı bir yerde pik olduğunu düşündürecek bulguya rastlanmamıştır. Dolayısıyla bizler de HbA2-Yokoshima'nın δ^+ talasemiye neden olduğu düşünmekteyiz.

HbA2-Bornova varyantı; ilk kez Kavasoğlu ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada tespit edilmiş (76) ve olguların köken aldıkları yer Bornova olduğu için varyanta bu isim verilmiştir. Kavasoğlu ve arkadaşları araştırmalarını HbA₂ değeri \leq %2, mikrositoz ve hipokromisi olan 40 olgu ile HPLC'de HbA₂

fraksiyonunda ek pik saptanan 10 olgu üzerinden yürütmüşler ve yaptıkları *HBD* geni genotiplendirmesinde bir olguda HbA₂-Bornova varyantını tespit etmişlerdir.

HbA₂-Bornova; *HBD* geni G heliksi 18. sırada bulunan, başlangıç kodonundan sonra 116. sıradaki arjinin aminoasidini kodlayan CGC dizisinin mutasyon sonucu CCC dizisi haline dönmesi ve prolin aminoasidini kodlamasıyla oluşan HbA₂ varyantıdır (Delta 116(G18) Arg-->Pro; HBD:c.350G>C). Prolin; sekonder protein yapıları olarak isimlendirilen α -heliks ve β -tabaka yapılarını bozar, dolayısıyla bu şekilde helikal bölgeleri kodlayan DNA dizilerinde oluşan herhangi bir mutasyon sonrası prolin aminoasidinin kodlanması; total protein yapısının stabilitesini kaybetmesine neden olur. Trifillis ve arkadaşları (177); toplamda 24 adet herhangi bir aminoasitten prolin aminoasidine değişim saptanan β -zincir varyantı olduğunu bunların 21 tanesinin stabil olmayan Hb varyantı oluşturduğunu belirtmişlerdir. Arjinin aminoasidi polar ve bazik yapıda bir aminoasit iken; prolin aminoasidi apolar yapıdadır, dolayısıyla bu değişiklik protein net yükünü değiştirmektedir. Ayrıca prolinin kodlanması ile toplam kütlede 59 ünitelik kayıp yaşanmaktadır. *HBB* ile *HBD* geni arasındaki farklı 10 aminoasitten birisi olduğu için başlangıç kodonu sonrası 116. sıradaki aminoasit değişikliğinin *HBB* genindeki karşılığı oluşacak varyantın fenotipik etkisi HbA₂-Bornova ile karşılaştırılamamaktadır. Ancak; aynı noktadaki farklı mutasyonlarla HbA₂-Lepore (HBD:c.350G>T) ve HbA₂-Coburg (HBD:c.350G>A) ile aynı kodonda başka mutasyonla HbA₂-Troodos (HBD:c.349C>T) varyantlarının oluşması bu kodonun mutasyona uğrama açısından hot-spot bir nokta olduğunu göstermektedir.

Kavasoğlu ve arkadaşlarının HbA₂-Bornova varyantını saptadığı olgunun HPLC elektroforez yönteminde HbA₂ değeri 1,0% olarak ölçülmüş ve ekstra herhangi bir pik saptanmamıştır. Bizim araştırmamızda da HbA₂-Bornova saptanan olguların HbA₂ seviyeleri ortalamaları 1,12±0,25 olarak bulunmuş ve yine hiçbir olguda ek pik saptanmamıştır. Dolayısıyla bizler HbA₂-Bornova varyantını oluşturan mutasyonun δ^+ talasemiye neden olduğu düşünmekteyiz.

Çalışmamız, bilindiği kadarıyla, HbA2-Bornova varyantına sahip olgulardan oluşmuş bir serinin (n=5) sunulduğu literatürdeki ilk çalışmadır. HbA2-Bornova yapısının bu zamana kadar sadece, bilindiği kadarıyla, İzmir ile Çanakkale illerinde saptanması; bu varyantın belki de özel bir coğrafik alandaki popülasyona ait bir varyant olduğunu düşündürmektedir.

Çalışmamızda bir olguda literatürde daha önce saptanmamış; *HBD* geni A heliksi 7. sırada ve başlangıç kodonu sonrası 10. kodonda GCT>GTT heterozigot değişimi sonrası alanin aminoasidinin valin şeklinde kodlandığı yeni varyant yapısı olabilecek bir mutasyon saptadık. Saptanan bu olası varyant olgunun köken aldığı yer Çanakkale olduğu için 'HbA2-Canakkale (delta 10(A7) Ala-->Val; HBD:c.32C>T)' olarak isimlendirilmiştir. Varyantın "HbVar" veritabanına eklenmesi ve ilgili mutasyonun görüldüğü tek nükleotid polimorfizminin (SNP) "rs numarası" alması hedeflenmiştir.

HbA2-Canakkale varyantını oluşturan Ala-->Val mutasyonu her iki proteinin de apolar yapıda olmasından ötürü protein net yükünde herhangi bir değişiklik yaratmamaktadır. Aynı mutasyonun HBB genindeki karşılığı Hb Iraq-Halabja varyantıdır (beta 10(A7) Ala>Val; HBB:c.32C>T). Deutsch ve arkadaşları (180) saptadıkları bu Hb Iraq-Halabja varyantının yaptıkları ısı dayanıklılık ve isopropanol testleri sonrası stabil yapıda olduğunu, oksijen afinitesinin normal β -zinciri ile aynı olduğunu saptamışlardır. İlgili yayında Hb Iraq-Halabja, olgularda tek saptanan mutasyon olmayıp; beraberinde bazı olgularda α -talasemi/ α -globin triplikasyonu ve β^0 -talasemi mutasyonları da saptanmıştır. Yapılan karşılaştırma ve fonksiyonel çalışmalar sonrası Hb Iraq-Halabja varyantının "sessiz" bir varyant olduğuna karar verilmiştir (180).

HbA2-Canakkale varyantını oluşturan mutasyon Polyphen-2[®] ve Mutation Taster[®] gibi in-siliko bioinformatik programlarında "polimorfizm, tolere edilebilir, nötral varyant" olarak değerlendirilmektedir. Dolayısıyla bizler bu mutasyonun stabil yapıda "sessiz" bir varyant oluşturduğunu düşünmekteyiz. Ancak varyantın saptandığı olgunun (Olgu D8) HPLC analizinde ek pikin görülmemesi yöntem ya da cihaz kaynaklı olabileceği gibi oluşan varyantın diğer piklerle ortak koelüsyonu

sonucu da olabilir.

Hemoglobin fraksiyon analizi sonrası borderline seviyede HbA₂ seviyesi saptanan bireyler de dikkatli değerlendirilmeli ve olası sebepler olabildiğince ekarte edilmelidir. Demir profilini yansıtan parametreler (ferritin, çinko protoporfirin (ZPP), serum demir/total demir bağlama kapasitesi/satürasyon indeksi gibi) dikkatlice gözden geçirilmelidir. Demir eksikliği; HbA₂ seviyesini düşürüp talasemi taşıyıcısı olan bir bireyin sonuçlarını maskeleyebilmektedir (73). Bunun yanında vitamin B12/folat eksikliği; HbA₂ yüksekliği yaparak bireylerin yanlışlıkla beta talasemi taşıyıcısı tanısı almalarına sebep olabilmektedir. Nütrisyonel eksikliklerin HbA₂ seviyesi üzerine etkileri hem 3,5%-3,9% gibi yüksek seviyeler ile hem de düşük seviyelerle (1,6%-1,9%) ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde sessiz β -talasemi mutasyonları ya da β -talasemi taşıyıcılığının δ -talasemi ile birlikteliği, α -gen triplikasyonu/kuadriplikasyonu, *KLF1* gen mutasyonları borderline seviyede HbA₂ seviyesine neden olabilmektedir (48,118,121,165,181-197).

Perseu ve arkadaşları (48) MCV ve MCH değerleri normal ya da hafif düşük, borderline seviyede HbA₂ seviyesine sahip, *HBB* geni ile α -globin genleri mutasyonları ve hemoglobin varyantları açısından herhangi (+) sonuç saptanmamış toplam 145 olgunun 52'sinde *KLF1* geninde altı farklı mutasyon saptamışlardır. Saptanan mutasyonların arasında en sık görülen S270X mutasyonu(%80,8) iken; iki olguda T280_H283del mutasyonu, dört olguda R319EfsX34 frameshift mutasyonu, bir olguda L326R mutasyonu, iki olguda T327S mutasyonu ve bir olguda K332Q mutasyonunu saptamışlardır. Lou ve arkadaşları (51) borderline seviyede HbA₂ seviyesine sahip toplam 165 Çinli olgunun 20'sinde (%12,1) *KLF1* geninde sekiz farklı mutasyon saptamışlar; saptanan mutasyonlar arasında en sık G176Afsx179 mutasyonunu (%50) saptamışlardır. Diğer mutasyonlar ise; A298P, H299D, S270W, T334R, P338T, C341Y ve R328AfsX31 mutasyonlarıdır. Nitta ve arkadaşları (50) β -talasemi taşıyıcılığından şüphelendikleri ancak *HBB* genini intakt buldukları için yeni nesil dizileme yöntemiyle tüm ekzom sekanslanması sonrası *KLF1* geninde C316Y

mutasyonunu saptadıkları bir olguyu paylaşmışlardır. 2018 yılı itibariyle *KLF1* geninin HbA₂ seviyesi üzerine etkisi konusundaki çalışmalar hız kazanmış, literatüre pek çok yeni *KLF1* mutasyonunun β -talasemi minör tablosu yarattığını bildiren çalışmalar kazandırılmıştır (52,198,199). Sardinya'da bu yüzden borderline seviyede HbA₂ seviyesine sahip olan bireylerde δ -geni genotiplemesinin yanında *KLF1* geni mutasyon analizi ve α -gen triplikasyonu açısından tarama da yapılmaktadır (183).

Bilindiği kadarıyla Türkiye'de *KLF1* genotipleme üzerine yapılmış tek çalışma vardır (77). Aydın ve arkadaşlarının 53 olgu üzerinde yaptıkları bu çalışmada HbF yüksekliği ile *KLF1* geni mutasyonları arasında ilişki olup olmadığı değerlendirilmiş, çalışma sonunda *KLF1* geni protein kodlayan bölgede beş farklı varyasyon saptamışlardır. Bizim çalışmamız bu haliyle *KLF1* geni mutasyonları ile HbA₂ seviyesi arasındaki ilişkiyi değerlendiren Türkiye'deki ilk çalışma olması özelliğini de taşımaktadır.

2016 yılında, bünyesinde pek çok farklı ülkeden *KLF1* geni üzerinde çalışma yapmış araştırmacıların bulunduğu "*KLF1* Uzlaşma Çalışma Grubu" oluşturulmuştur. Bu grup *KLF1* geninde saptanan varyasyonları dört ana fonksiyonel sınıfa ayırmışlardır;

- Fonksiyonel yapıda minör etki ya da hiç etki etmesi beklenmeyen varyasyonları "Sınıf 1 varyasyon"
- Fonksiyonda azalma olmakla birlikte hipomorfik varyasyonları "Sınıf 2 varyasyon"
- Gündük bırakıcı heterozigotluk kaybına (truncating loss-of-function) yol açan varyasyonları "Sınıf 3 varyasyon" ve
- Dominant etkisi olan varyasyonları "Sınıf 4 varyasyon" olarak tanımlamışlardır (59).

Tablo 5.3. *KLF1* Uzlaşı Çalışma Grubu'na göre *KLF1* genindeki varyasyonların fonksiyonel sınıfları-Perkins ve ark. (59)'ndan alınmıştır. Oklar araştırmamızda saptanan *KLF1* mutasyonlarını göstermektedir.

Location	Residue	Protein variant	Class	DNA variant	# of cases	SNP	MAF
Promoter				-251C>G: NC_000019.10:g.12887391G>C		rs3817621	0.325
				-154C>T: NC_000019.10:g.12887294G>A	11	rs372651309	0.001
				-149dupC: NC_000019.10:g.12887288_12887289insG		rs552824864	
				-148G>A: NC_000019.10:g.12887288C>T	22	rs79334031	0.016
				-124T>C: NC_000019.10:g.12887274A>G	1		
				-120T>G: NC_000019.10:g.12887242A>C	1	rs548543206	0.000
5'UTR				-114C>A: NC_000019.10:g.12887254G>A	1		
Transactivation domain 1				c.-23_-21delC			
	2	p.A2GfsX14	3	c.4_5insCG		rs150268373	
	3	p.T3HfsX24	3	c.6dupC		rs151251208	
	5	p.E5K	2	c.13G>A	1	rs483352842	0.001
	6	p.T6S	1	c.16A>T	2		
	7	p.A7T	1	c.19G>A		rs201164683	
	14	p.L14P	1	c.41T>C	1		
	21	p.P21L	1	c.62C>T		rs559879342	0.000
	28	p.L28F	1	c.82C>T		rs375248069	
	30	p.W30X	3	c.89G>A	2		
30	p.W30X	3	c.90G>A	1			
34	p.E34K	1	c.100G>A		rs368908352		
39	p.M39L	1	c.115A>C	11	rs112631212	0.014	
Transactivation domain 2	51	p.L51R	1	c.152T>G	1		
	52	p.H52P	1	c.155A>C		rs541471724	0.000
	53	p.V53L	1	c.157G>C		rs143927401	0.000
	54	p.K54PfsX9	3	c.159_169 delGAAGCTGAGG	1		
	58	p.Q58X	3	c.172C>T	3		
	79	p.L79F	1	c.235C>T		rs150150802	
83	p.S83L	1	c.248C>T		rs374473630		
N-terminal domain	102	p.S102P	1	c.304T>C		rs2072597	0.444
	104	p.A104V	1	c.311C>T		rs182276666	0.001
	104	p.A104GfsX249	3	c.310dupG	1		
	109	p.P109S	1	c.325C>T		rs117351327	0.016
	111	p.E111YfsX239	3	c.330_344delinsAGCATAT			
	116	p.Y116X	3	c.348T>G			
	127	p.L127X	3	c.380T>A	1		
	137	p.R137C	1	c.409C>T		rs111888566	
	143	p.R143W	1	c.427C>T		rs576714319	0.000
	157	p.P157A	1	c.469C>G		rs555308232	0.000
	158	p.A158T	1	c.472G>A	2		
	173	p.P173PfsX64	3	c.517-519delC	1		
	174	p.G174C	1	c.520G>T		rs566095433	0.000
	174	p.G174RfsX179	3	c.519_520insC	1		
	176	p.G176RfsX179	3	c.525_526insCGGCGCC	33	rs483352838	
	176	p.G176AfsX179	3	c.526_527insCGGCGCC	138		
	181	p.Y181N	1	c.541T>A		rs547785696	0.001
	182	p.F182L	1	c.544T>C		rs2072596	0.050
	184	p.R184W	1	c.550C>T		rs571697524	0.000
	184	p.G184EfsX167	3	c.551-556GGACCG>A	1		
	188	p.S188R	1	Not reported	1		
	190	p.P190LfsX47	3	c.569delC	7		
	191	p.A191V	1	c.572C>T		rs552126408	0.001
	197	p.Y197X	3	c.591C>G	1		
	210	p.P210R	1	c.629C>G		rs530729436	0.000
	213	p.Q213X	3	c.637C>T	2		
	217	p.Q217X	3	c.649C>T	1		
	222	p.L222SfsX15	3	c.663delG	1		
	249	p.G249R	1	c.745G>A		rs201935177	0.000
	256	p.G256S	1	c.766G>A		rs141784467	
264	p.S264T	1	c.790T>C	1			
268	p.R268X	3	c.802C>T	1			
268	p.R268L	1	c.803G>T		rs199685739	0.001	
270	p.S270X	3	c.809C>A	45			
270	p.S270W	2	c.809C>G	2	rs558942739	0.000	
272	p.A272P	1	c.814G>C		rs540601454	0.000	
278	p.A278V	1	c.833C>T		rs372605116		
279	p.H279Q	2	c.837C>G				

Finger 1	280	p.T280_H283del	2	c.838_849delACGTGCGCGCAC	2		
	283	p.H283N	2	c.847G>T		rs371057187	
	288	p.K288X	3	c.862A>T	11	rs267607202	
	288	p.K288E	2	c.862A>G	1		
	292	p.K292X	3	c.874A>T	1	rs137852687	
	298	p.A298P	2	c.892G>C	26	rs387907598	
	299	p.H299D	2	c.895C>G	13	rs137852688	
	299	p.H299Y	2	c.895C>T	1	rs137852688	
	299	p.L300P	2	c.899T>C	1		
	301	p.R301C	2	c.901C>T	1		
	301	p.R301H	2	c.902G>A	3		
	301	p.R301LfsX52	3	c.902insT	1		
	302	p.T302AfsX52	3	c.900_903dupGCGC	1		
	Splice site			c.914-4_914-1del CTAG	1		
			c.913+1G>A	1	rs483352840		
Linker 1	306	p.E306RfsX	3	c.916delG		rs35891202	
	310	p.A310P	2	c.928G>C		rs145551738	
Finger 2	313	p.W313C	2	c.939G>T	1		
	316	p.C316Y	2	c.947G>A	10		
	316	p.C316X	3	c.948C>A		rs572756401	0.000
	319	p.R319EfsX34	3	c.954dupG	15	rs397514445	
	322	p.R322S	2	c.964C>A	1	rs376711350	
	323	p.S323W	2	c.968C>G	1		
	325	p.E325K	4	c.973G>A	6	rs267607201	
	326	p.L326R	2	c.977T>G	2	rs397514634	
	327	p.T327S	2	c.979A>T	1		
	327	p.T327S	2	c.980C>G	1		
	328	p.R328AfsX31	3	c.982delC	1		
	328	p.R328L	2	c.983G>T	2		
	328	p.R328H	2	c.983G>A	4	rs140252918	
	329	p.H329R	2	c.986A>G			
	331	p.R331G	2	c.991C>G	1		
	Linker 2	331	p.R331W	2	c.991C>T	3	
332		p.K332Q	2	c.994A>C	5		
334		p.T334K	2	c.1001C>A	1		
334		p.T334R	2	c.1001C>G	17	rs483352841	
335		p.G335R	2	c.1003G>A	7		
338		p.P338T	2	c.1012C>A	1		
Finger 3	338	p.P338S	2	c.1012C>T	3	rs387907599	
	341	p.C341Y	2	c.1022G>A	3	rs483352839	
	342	p.Q342H	2	c.1026G>C		rs146658904	0.000
	345	p.P345L	2	c.1034C>T		rs370574267	
	357	p.H357P	2	c.1070C>A			
	357	p.H357Q	2	c.1071C>A	1	rs398122931	

Araştırmamızda saptadığımız tüm mutasyonlar *KLF1* Uzlaşlı Çalışma Grubu'na göre "Sınıf 1 varyasyon" olarak tanımlanmakta ve fenotipik etkisinin minör ya da olmaması beklenmektedir.

Araştırmamızda 47 kişide (%47; n=100) S102P mutasyonu saptayıp; bunların içinde beş kişide S102P mutasyonunu homozigot olarak bulduk. S102P mutasyonu; 1000 Genomes, ExAC ve gnomAD gibi allel frekansını saptama çalışmalarında sırasıyla %44, %43 ve %36 olarak saptanmıştı. Sonuçlarımız bu oranlarla korele gözükmektedir. Ayrıca S102P mutasyonunu saptama açısından araştırmamızda gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0.05$); yani kontrol grubu da dahil olmak üzere her gruptan bazı kişilerde bu mutasyon

mevcuttu. Dolayısıyla bu kadar yüksek allel frekansında saptanan bir varyasyonun fenotipik etkisinin olması zaten beklenmemektedir.

KLF1 geninde saptadığımız M39L, S102P ve P109S mutasyonları; aminoasit değişikliği hakkında in-siliko prediktif değerlendirme yapan ve veri sunan SIFT[®], Polyphen-2[®] ve Mutation Taster[®] gibi programlarda "polimorfizm, tolere edilebilir, nötral varyant"lar olarak değerlendirilmektedirler. F182L mutasyonu için ise SIFT[®] ve Mutation Taster[®] "tolere edilebilir ve polimorfizm" derken; Polyphen-2[®] programı "muhtemelen hasar verici" varyasyon olarak değerlendirmektedir (200). Ancak R268L mutasyonu için bu üç in-siliko prediktif programında da "hasar verici" olarak değerlendirilmektedir.

Araştırmamızda saptadığımız başka bir mutasyon olan M39L mutasyonu 1000 Genomes, ExAC ve gnomAD'de sırasıyla %1,4, %1,3 ve %1,1 olarak saptanmıştı. Bizler de sadece tek olguda (olgu B3) M39L mutasyonu saptadık (%1; n=100). Sonucumuz bu oranlarla benzer gözükmektedir. Borg ve arkadaşları (60) M39L mutasyonunu; mutasyona uğrayan metiyonin aminoasidinin türler arasında korunmadığı (örneğin; fare *KLF1* geninde burada lösin bulunmaktadır) için nötral bir değişiklik olarak değerlendirmişlerdir.

Saptadığımız diğer mutasyon olan P109S mutasyonu 1000 Genomes, ExAC ve gnomAD'de sırasıyla %1,6, %0,3 ve %0,5 olarak saptanmıştı. Araştırmamızda biz iki olguda (olgu C19 ve Kontrol K18) P109S mutasyonu saptadık (%2; n=100). Sonucumuz bu oranlardan biraz yüksek çıksa da araştırdığımız örneklem küçük olduğu sonucun böyle çıktığını düşünmekteyiz. P109S mutasyonunu, hem borderline seviyesi üzerinde HbA₂ değerine sahip olguda (olgu C19) hem de kontrol grubuna dahil ettiğimiz kişide (Kontrol K18) saptayıp fenotipik etkilenme gözlemediğimiz için bu mutasyonun fenotipik etkisinin olmadığını düşünmekteyiz.

KLF1 geni F182L mutasyonu 1000 Genomes, ExAC ve gnomAD'de sırasıyla %5, %3,6 ve %3,1 olarak saptanmıştı. Bizler de üç olguda (olgu B4, olgu

B17, olgu D18) F182L mutasyonu saptadık (%3; n=100). Sonucumuz bu oranlarla yine benzer gözükmektedir. Zaker-Kandjani ve arkadaşları (201) F182L mutasyonunu 227 İranlı β -talasemi hastası kişiden oluşan bir grupta tek olguda saptamış, sonrasında yaptığı bu olgunun aile çalışmasında olgunun erkek kardeşinde bu mutasyona rastlamamış; ancak olgu ile erkek kardeşinin hematolojik etkilenmeleri benzer olduğundan F182L mutasyonunun fenotipik etkisinin tartışılması gerektiğini savunmuştur. Bizim araştırmamızda ise F182L mutasyonu hem borderline seviyede HbA₂ seviyesine sahip olgularda (olgu B4, olgu B17) hem de düşük HbA₂ seviyesine sahip olguda (olgu D18) saptandığından bu mutasyonun genotip-fenotip korelasyonu sağlamadığını, fenotipik etki oluşturmadığını düşünmekteyiz.

Son olarak araştırmamızda saptadığımız R268L mutasyonu 1000 Genomes ve gnomAD'de sırasıyla %0,1 ve %0,01 olarak saptanmış; ExAC'de ise saptanamamıştır. VarSome[®] veritabanı bu mutasyonu "klinik önemi bilinmeyen varyant" olarak değerlendirirken, ClinVar[®] ve HGMD[®] de bu mutasyon bulunmamaktadır. Araştırmamızda biz tek olguda (olgu B1) bu mutasyonu saptadık. Olgunun MCV ve MCH değerlerinin normal aralıkta olup borderline seviyede HbA₂ seviyesi (3,4%) nin saptanması ve R268L mutasyonunun allel frekansının oldukça düşük seviyelerde olması nedeniyle; her ne kadar *KLF1* Uzlaşma Çalışma Grubu R268L mutasyonunu "Sınıf 1 varyasyon" olarak değerlendirirse de bizler bu mutasyonun fenotipik etkisi olabileceğinin akılda tutulması gerektiğini; dolayısıyla bu mutasyonun fonksiyonel çalışmalarının yapılmasının gerekli olduğunu ve R268L mutasyonuna sahip olan daha geniş olgu serilerinin değerlendirilmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Araştırmamızda HbF yüksekliği bulunan olguların genetik etyolojisinde bu durumu açıklayabilecek herhangi bir *KLF1* geni mutasyonu saptayamadık. *KLF1* dışında HbF düzeyini etkileyen pek çok faktörün olması (^G*Xmnl* (rs7482144), *BCL11A* (rs4671393) ve *HBS1L-MYB* (rs4895441, rs9399137) tek nükleotit polimorfizmleri gibi (202)) belki de HbF yüksekliği olan grupta mutasyon saptayamamızın sebebi olabilir.

Araştırmamızın birtakım kısıtlılıkları mevcuttu. Örneğin; araştırmaya dahil edilen kişilerin hematolojik verileri retrospektif olarak dosya arşivlerinden tarandığı için bazı kişilerin demir parametrelerini yansıtan tetkikleri (ferritin seviyeleri, serum demir/total demir bağlama kapasitesi gibi) yapılmadığından bu verileri mevcut değildi. Dolayısıyla verileri eksik olan kişilerde nütrisyonel eksikliğin borderline HbA₂ seviyesi ya da HbA₂ düşüklüğü üzerine etkisinin olup olmadığı değerlendirilemedi. Diğer bir kısıtlılık; finansman azlığı nedeniyle HbF ve HbA₂ seviyeleri üzerine önemli etkisi olan α -globin gen değişikliklerinin analizlerinin örnekleme yapılamamasıydı. Dolayısıyla yine borderline HbA₂ seviyesi ya da HbA₂ düşüklüğü etyolojisinde α -globin gen değişikliklerinin olup olmadığı değerlendirilemedi.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

β -talasemi taşıyıcılarının %90'ından fazlasında tanısal HbA₂ yükselmesi, %50'sinde de HbF yükselmesi saptanmaktadır. Dolayısıyla talasemi taşıyıcılığı tespitinde hemoglobin elektroforezinin yeri çok önemlidir. Ancak HbA₂ düzeyi normal olan bazı bireylerde *HBB* geninde mutasyon tespit edilmesi ya da aynı soy bağına sahip, *HBB* geninde de aynı mutasyon saptanan aile içi bireylerde HbA₂ düzeylerinin birbirinden farklı olduğunun (fenotip farklılığı) görülmesi; talasemi taşıyıcılığı tespitinde HbA₂ düzeyi yüksekliğinin mutlak olmadığını göstermiştir. β -talasemi taşıyıcılığı nedeniyle tanısal yükselmesi beklenen HbA₂ seviyesi; δ -talasemi nedeniyle normal sınırlara inebilmektedir. Dolayısıyla bu bireylerin β -talasemi taşıyıcısı olduğu bilenen başka bir bireyle evliliği sonrası β -talasemi majorlu çocukları doğabilmektedir. Normal HbA₂ piki nedeniyle göz ardı edilen; ileri değerlendirmeye yönlendirilmeyen bireylerin $\delta\beta$ -talasemi olabileceği unutulmamalıdır. Hb elektroforez sonucu normal sınırlarda olsa bile β -talasemi taşıyıcılığı saptanmış bireylerin partnerleri mutlaka DNA analiz yöntemleri ile β -

talasemi taşıyıcılığı açısından değerlendirilmelidir ve eşlik edebilecek δ -talasemi açısından mutlaka *HBD* geni genotiplendirmesi akılda tutulmalıdır.

Borderline seviyede HbA₂ seviyesine sahip olan kişiler de mutlaka ayrıntılı olarak değerlendirilmelidir. Nütrisyonel eksikliklerin, sessiz β -talasemi mutasyonlarının, β -talasemi taşıyıcılığı ile δ -talasemi birlikteliğinin, α -gen triplikasyonu/kuadriplikasyonun yanında *KLF1* gen mutasyonlarının da borderline seviyede HbA₂ seviyesine neden olabileceği unutulmamalıdır. MCV ve MCH değerleri normal ya da hafif düşük olgularda görülebilen HbF yüksekliği ya da borderline seviyede HbA₂ yüksekliği *KLF1* genindeki mutasyondan kaynaklanıyor olabilir; ya da fenotipik olarak tipik talasemi minör ile uyumlu bulguları olan ancak *HBB* geninin intakt olarak saptandığı olgularda mutlaka *KLF1* genotiplendirmesi akılda tutulmalıdır.

HBD genindeki mutasyonlar sadece talasemik tablo oluşturmayıp, stabil yapıda varyant HbA₂ yapısı da oluşturabileceğinden (Örneğin; HbB₂); HbA₂ seviyesi hesaplanırken mutlaka tüm HbA₂ yapıları dikkate alınmalıdır. HPLC ya da kapiller zon elektroforezi değerlendirilirken normal HbA₂ pikinin haricinde ek pik olup olmadığı gözden geçirilmelidir.

HbA₂ seviyesi düşüklüğü saptandığında olgular mutlaka demir eksikliği anemisi yönünden değerlendirilmeli; şüphe duyulan durumlarda demir replasmanı sonrası hemoglobin elektroforez testleri tekrarlanmalıdır. HbA₂ düşüklüğünde *HBD* genindeki mutasyonların yanında α -talasemi taşıyıcılığının da genetik etyolojik sebep olabileceği unutulmamalı; olguların mutlaka α -globin açısından genotiplendirmeleri yapılmalıdır.

Araştırmamızda saptadığımız R268L mutasyonunun bizler fenotipik etkisi olabileceğini düşünmekteyiz; dolayısıyla bu mutasyonun fonksiyonel çalışmalarının yapılmasının gerekli olduğuna ve R268L mutasyonuna sahip olan daha geniş olgu serilerinin değerlendirilmesi gerekliliğine inanıyoruz.

Türkiye'de *KLF1* ve *HBD* genleri ile ilgili çalışmalar, bilindiği kadarıyla, oldukça azdır. Genotipik çeşitlilik açısından eşsiz bir yelpazeye sahip olan ülkemizde bu genlerle ilgili bilgi ve tecrübelerimiz arttıkça literatüre daha önce girmemiş varyantların ve fenotipik etkilerinin ortaya konulmasının da önü bu şekilde açılmış olacaktır.

Sonuç olarak; HPLC sonrası HbF veya HbA₂ seviye anormalliği saptanan sınırlı sayıda olgunun dahil edildiği araştırmamızın sonuçlarına göre globin proteini üreten ya da üretiminde etkisi olan diğer alternatif (*KLF1*, *HBD* ve diğer) genlerin de HbF ve HbA₂ seviyesini etkileyen ve hemoglobinopatilerde patojenite etkeni olabileceğini ortaya koymuştur. Mart 2013-Ağustos 2018 yılları arası Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Genetik Tanı ve Tedavi Merkezine *HBB* gen analizi için başvurmuş olgu ve kontrol grubu bireylere ait DNA bankasının kullanılarak yapılan mevcut araştırma sonuçları çalışılan hedef her iki gende de (*KLF1* ve *HBD*) nokta mutasyon oranının yüksek olduğunu ortaya koymuştur. Çalışılan olgu grubundaki bireylerin %58,75'inde *KLF1* geninde ve %23,75'inde ise *HBD* geninde mutasyon saptanmıştır. *KLF1* geninde saptanan beş farklı nokta mutasyonun sırasıyla 41 olguda (%87,23; n=47) S102P, 3 olguda (%6,38) F182L, 1 olguda (%2,12) P109S, 1 olguda (%2,12) M39L ve 1 olguda ise (%2,12) R268L oldukları ortaya konmuştur. Saptanan 4 farklı nokta mutasyonun (M39L, P109S, F182L ve R268L) heterozigot yapıda oldukları, S102P mutasyonunun ise toplam 36 olguda (%87,8) heterozigot ve 5 olguda (%12,2) ise homozigot yapıda olduğu tespit edilmiştir. Çalışılan olgu grubu bireylerin 19'unda (%23.75) *HBD* geninde mutasyon saptanırken, 61'nin(%76.25) normal yapıda oldukları ortaya konmuştur. Heterozigot olarak saptanan dört farklı nokta mutasyonun sırasıyla 12 olguda (%63,15; n=19) HbA₂-Yialousa, 5 olguda (%26,31) HbA₂-Bornova, 1 olguda (%5,26) HbA₂-Yokoshima ve 1 olguda ise (%5,26) Delta 10(A7) Ala-->Val; HBD:c.32C>T varyasyonu oldukları ortaya konmuştur. Araştırmamız kapsamında çalışılan olgulardan sadece birisinde saptanan "Delta 10(A7) Ala-->Val; HBD:c.32C>T" nokta mutasyonu ilk kez bu araştırmada tanımlanmıştır. Mevcut araştırma sonucunda saptanan HBD:c.32C>T mutasyonu yeni bir hemoglobin HbA₂ varyantı olarak

değerlendirilmiş ve HbA2-Canakkale ismiyle literatüre kazandırılmıştır. Saptanan varyantın "HbVar" veritabanına eklenmesi ve ilgili mutasyonun görüldüğü tek nükleotid polimorfizminin (SNP) yeni bir referans numarası ("rs no") ile literatüre kazandırılması hedeflenmiştir. Araştırmamız ayrıca, bilindiği kadarıyla, HbA2-Bornova varyantına sahip olgulardan oluşmuş bir serinin (n=5) sunulduğu ilk çalışmadır. Yine araştırmamız *KLF1* geni mutasyonları ile HbA₂ seviyesi arasındaki ilişkiyi değerlendiren Türkiye'deki ilk çalışma olması özelliğini de taşımaktadır. Araştırma sonuçları, hemoglobinopatilerin moleküler etyolojik sebepleri araştırılırken *KLF1* ve *HBD* gibi globin proteini üreten ya da üretiminde etkisi olan diğer alternatif genlerin olası varyasyonlar açısından genotiplendirilmesinin kesin tanı açısından önemli olduğu önerilmiştir.

7.KAYNAKLAR

1. Manchinu MF, Marongiu MF, Poddie D, Casu C, Latini V, Simbula M, Galanello R, Moi P, Cao A, Porcu S, Ristaldi MS. In vivo activation of the human δ -globin gene: the therapeutic potential in β -thalassemic mice. *Haematologica* 2014;99(1):76–84.
2. Ristaldi MS, Casula S, Porcu S, Pirastu M, Cao A. Activation of the delta globin gene by the beta-CACCC motif. *Blood Cells Mol. Dis.* 1999;25(3–4):193–209.
3. Daar S, Al Zadjali S, Gravell D, Al Haddabi H, Al Riyami M, Al Belushi A, Berbar T, Krishnamoorthy R. Hb A2' (Hb B2) in the Omani population and diagnostic significance. *Hemoglobin* 2011;35(2):117-124.
4. Moleirinho A, Seixas S, Lopes AM, Bento C, Prata MJ, Amorim A. Evolutionary constraints in the β -globin cluster: the signature of purifying selection at the δ -globin (*HBD*) locus and its role in developmental gene regulation. *Genome Biol. Evol.* 2013;5(3):559–571.
5. Wienert B, Martyn GE, Funnell APW, Quinlan KGR, Crossley M. Wake-up Sleepy Gene: Reactivating Fetal Globin for β -Hemoglobinopathies. *Trends Genet.* 2018;34(12):927-940.
6. Ota Y, Yamaoka K, Sumida I, Fujita S, Fujimura T. Homozygous delta-thalassemia first discovered in Japanese family with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Blood* 1971;37(6):706–715.
7. Zorai A, Mourni I, Mosbahi I, Douzi K, Chaouachi D, Guemira F, Abbes S. Rare hemoglobin variants in Tunisian population. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2015;37:148-154.
8. Sahli CA, Bibi A, Ouali F, Fredj SH, Dakhlaoui B, Othmani R, Laaouini N, Jouini L, Ouenniche F, Siala H, Touhami I, Becher M, Fattoum S, El Houda Toumi N, Messaoud T. Red cell indices: differentiation between beta-thalassemia trait and iron deficiency anemia and application to sickle-cell disease and sickle-cell thalassemia. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51:1595-1603.

9. Lacerra G, Musollino G, Scarano C, Lagona LF, Caruso DG, Testa R, Preziso R, Di Noce F, Medulla E, Friscia MG, Mastrullo L, Caldora M, Nota L, Gaudio C, Magnano C, Ciaccio C, Romeo MA, Carestia C. Molecular evidences of single mutational events followed by recurrent crossing-overs in the common delta-globin alleles in the Mediterranean area. *Gene* 2008;410:129-138.
10. Colaco S, Trivedi A, Colah RB, Ghosh K, Nadkarni AH. Masking of a β -Thalassemia Determinant by a Novel δ -Globin Gene Defect [Hb A₂-Saurashtra or δ 100(G2)Pro \rightarrow Ser; HBD: c.301C>T] in Cis. *Hemoglobin* 2014;38(1):24-27.
11. De AM, Lacerra G, Gaudio C, Mastrolonardo G, Pagano L, Mastrullo L, Masciandaro S, Carestia C. Epidemiology of the δ -globin alleles in southern Italy shows complex molecular, genetic, and phenotypic features. *Hum Mutat.* 2002;20(5):358–367.
12. Lacerra G, Scarano C, Lagona LF, Testa R, Caruso DG, Medulla E, Friscia MG, Mastrullo L, Caldora M, Prezioso R, Gaudio C, Magnano C, Romeo MA, Musollino G, Noce FD, Carestia C. Genotype-phenotype relationship of the δ -thalassemia and Hb A₂ variants: observation of 52 genotypes. *Hemoglobin* 2010;34(5):407–423.
13. Steinberg MH, Adams JG 3rd. Hemoglobin A₂: origin, evolution, and aftermath. *Blood* 1991;78:2165–2177.
14. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood* 2008;112:3927–3938.
15. Codrington JF, Li HW, Kutlar F, Gu LH, Ramachandran M, Huisman TH. Observations on the levels of Hb A₂ in patients with different β -thalassemia mutations and a δ chain variant. *Blood* 1990;76(6):1246–1249.
16. Globin Gene Server. HbVar database [Online]
Erişim: [<https://globin.cse.psu.edu/hbvar>]
Erişim Tarihi:10.04.2019
17. Spritz RA, DeRiel JK, Forget BG, Weissman SM. Complete nucleotide sequence of the human delta-globin gene. *Cell* 1980;21:639-646.

18. Tang DC, Ebb D, Hardison RC, Rodgers GP. Restoration of the CCAAT box or insertion of the CACCC motif activates delta-globin gene expression. *Blood* 1997;90:421–427.
19. Donze D, Jeancake PH, Townes TM. Activation of delta-globin gene expression by erythroid Kruppel-like factor: a potential approach for gene therapy of sickle cell disease. *Blood* 1996;88(10):4051–4057.
20. Tang DC, Rodgers GP. Activation of the human delta-globin gene promoter in primary adult erythroid cells. *Br J Haematol.* 1998;103(3):835–838.
21. Ross J, Pizarro A. Human beta and delta globin messenger RNAs turn over at different rates. *J Mol Biol.* 1983;167:607–617.
22. Wood WG, Old JM, Roberts AV, Clegg JB, Weatherall DJ. Human globin gene expression: control of beta, delta and delta beta chain production. *Cell* 1978;15:437–446.
23. Kosche KA, Dobkin C, Bank A. DNA sequences regulating human beta globin gene expression. *Nucl Acids Res.* 1985;13:7781–7793.
24. LaFlamme S, Acuto S, Markowitz D, Vick L, Landschultz W, Bank A. Expression of chimeric human beta- and delta-globin genes during erythroid differentiation. *J Biol Chem.* 1987;262(10):4819-4826.
25. Poillon WN, Kim BC, Rodgers GP, Noguchi CT, Schechter AN. Sparing effect of hemoglobin F and hemoglobin A₂ on the polymerization of hemoglobin S at physiologic ligand saturations. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 1993;90:5039–5043.
26. Jiang J, Chan YS, Loh YH, Cai J, Tong GQ, Lim CA, Robson P, Zhong S, Ng HH. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2008;10:353–360.
27. Tetreault MP, Yang Y, Katz JP. Krüppel-like factors in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:701–713.
28. McConnell BB, Yang VW. Mammalian Kruppel-like factors in health and diseases. *Physiol Rev.* 2010;90:1337–1381.

29. Norton LJ, Hallal S, Stout ES, Funnell APW, Pearson RCM, Crossley M, Quinlan KGR. Direct competition between DNA binding factors highlights the role of Krüppel-like Factor 1 in the erythroid/megakaryocyte switch. *Sci. Rep.* 2017;7:1–10.
30. Siatecka M, Bieker JJ. The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood* 2011;118:2044–2054.
31. Gnanapragasam MN, McGrath KE, Catherman S, Xue L, Palis J, Bieker JJ. EKLF/KLF1-regulated cell cycle exit is essential for erythroblast enucleation. *Blood* 2016;128:1631–1641.
32. Gnanapragasam MN, Bieker JJ. Orchestration of late events in erythropoiesis by KLF1/EKLF. *Curr Opin Hematol.* 2017;24(3):183-190.
33. Lee JS, Ngo H, Kim D, Chung JH. Erythroid Kruppel-like factor is recruited to the CACCC box in the beta-globin promoter but not to the CACCC box in the gamma-globin promoter: the role of the neighboring promoter elements. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 2000;97(6):2468–2473.
34. Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol.* 1993;13:2776–2786.
35. Bieker JJ, Southwood CM. The erythroid Kruppel-like factor transactivation domain is a critical component for cell-specific inducibility of a beta-globin promoter. *Mol Cell Biol.* 1995;15:852–860.
36. Nuez B, Michalovich D, Bygrave A, Ploemacher R, Grosveld F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the *EKLF* gene. *Nature* 1995;357:316–318.
37. Perkins AC, Sharpe AH, Orkin SH. Lethal beta thalassemia in mice lacking the erythroid CACCC transcription factor EKLF. *Nature* 1995;375:318–322.
38. Sankaran VG, Xu J, Ragozy T, Ippolito GC, Walkley CR, Maika SD, Fujiwara Y, Ito M, Groudine M, Bender MA, Tucker PW, Orkin SH. Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature* 2009;460(7259):1093–1097.

39. Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, Usala G, Busonero F, Maschio A, Albai G, Piras MG, Sestu N, Lai S, Dei M, Mulas A, Crisponi L, Naitza S, Asunis I, Deiana M, Nagaraja R, Perseu L, Satta S, Cipollina MD, Sollaino C, Moi P, Hirschhorn JN, Orkin SH, Abecasis GR, Schlessinger D, Cao A. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 2008;105:1620–1625.
40. Menzel S, Garner C, Gut I, Matsuda F, Yamaguchi M, Heath S, Foglio M, Zelenika D, Boland A, Rooks H, Best S, Spector TD, Farrall M, Lathrop M, Thein SL. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat. Genet*. 2007;39:1197–1199.
41. Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araújo AS, Uda M, Sanna S, Cao A, Schlessinger D, Costa FF, Hirschhorn JN, Orkin SH. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*. 2008;105:11869–11874.
42. Masuda T, Wang X, Maeda M, Canver MC, Sher F, Funnell AP, Fisher C, Suci M, Martyn GE, Norton LJ, Zhu C, Kurita R, Nakamura Y, Xu J, Higgs DR, Crossley M, Bauer DE, Orkin SH, Kharchenko PV, Maeda T. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin. *Science* 2016;351:285–289.
43. Zhou D, Liu K, Sun CW, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat. Genet*. 2010;42:742–744.
44. Norton LJ, Funnell APW, Burdach J, Wienert B, Kurita R, Nakamura Y, Philipsen S, Pearson RCM, Quinlan KGR, Crossley M. KLF1 directly activates expression of the novel fetal globin repressor ZBTB7A/LRF in erythroid cells. *Blood Adv*. 2017;1:685–692.

45. Tallack MR, Whittington T, Yuen WS, Wainwright EN, Keys JR, Gardiner BB, Nourbakhsh E, Cloonan N, Grimmond SM, Bailey TL, Perkins AC. A global role for KLF1 in erythropoiesis revealed by ChIP-seq in primary erythroid cells. *Genome Res.* 2010;20(8):1052-1063.
46. Singleton BK, Burton NM, Green C, Brady RL, Anstee DJ. Mutations in EKLF/KLF1 form the molecular basis of the rare blood group In(Lu) phenotype. *Blood* 2008;112:2081–2088.
47. Cao A. Novità sul processo di transizione (switching) HbF->HbA. *Rivista Italiana di Genetica e Immunologia Pediatrica* 2011;3:1-10.
48. Perseu L, Satta S, Moi P, Demartis FR, Manunza L, Sollaino MC, Barella S, Cao A, Galanello R. *KLF1* gene mutations cause borderline HbA₂. *Blood* 2011;118:4454-4458.
49. Borgio JF, AbdulAzeez S, Al-Muslami AM, Naserullah ZA, Al-Jarrash S, Al-Suliman AM, Al-Madan MS, Al-Ali AK. *KLF1* Gene and Borderline Hemoglobin A₂ in Saudi Population. *Archives of Medical Science* 2018;1:230–236.
50. Nitta T, Kawano F, Yamashiro Y, Takagi F, Murata T, Tanaka T, Ferania M, Adhiyanto C, Hattori Y. A New Krüppel-Like Factor 1 Mutation (C.947G > A or P.C316Y) in Humans Causes β -Thalassemia Minor. *Hemoglobin* 2015;39(2):121–126.
51. Lou JW, Li DZ, Zhang Y, He Y, Sun MN, Ye WL, Liu YH. Delineation of the Molecular Basis of Borderline Hemoglobin A₂ in Chinese Individuals. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2014;53(4):261–264.
52. Huang LY, Li J, Zhang Y, Li DZ. A *KLF1* gene mutation causes β thalassemia minor in a Chinese family. *Int J Lab Hematol.* 2018;40(2):e35–e37.
53. Liu D, Zhang X, Yu L, Cai R, Ma X, Zheng C, Zhou Y, Liu Q, Wei X, Lin L, Yan T, Huang J, Mohandas N, An X, Xu X. *KLF1* mutations are relatively more common in a thalassemia endemic region and ameliorate the severity of beta-thalassemia. *Blood* 2014;124:803–811.

54. Viprakasit V, Ekwattanakit S, Riolveang S, Chalaow N, Fisher C, Lower K, Kanno H, Tachavanich K, Bejrachandra S, Saipin J, Juntharaniyom M, Sanpakit K, Tanphaichitr VS, Songdej D, Babbs C, Gibbons RJ, Philipsen S, Higgs DR. Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. *Blood* 2014;123:1586–1595.
55. Yu LH, Liu D, Cai R, Shang X, Zhang XH, Ma XX, Yan SH, Fang P, Zheng CG, Wei XF, Liu YH, Zhou TB, Xu XM. Changes in hematological parameters in alpha-thalassemia individuals co-inherited with erythroid Kruppel-like factor mutations. *Clin Genet.* 2015;88:56–61.
56. Wayne JS, Eng B. Kruppel-like factor 1: hematologic phenotypes associated with *KLF1* gene mutations. *Int J Lab Haematol.* 2015;37:78–84.
57. Satta S, Perseu L, Moi P, Asunis I, Cabriolu A, Maccioni L, Demartis FR, Manunza L, Cao A, Galanello R. Compound heterozygosity for *KLF1* mutations associated with remarkable increase of fetal hemoglobin and red cell protoporphyrin. *Haematologica* 2011;96:767–770.
58. Satta S, Perseu L, Maccioni L, Giagu N, Galanello R. Delayed fetal hemoglobin switching in subjects with *KLF1* gene mutation. *Blood Cells Mol Dis.* 2012;48:22–24.
59. Perkins A, Xu X, Higgs DR, Patrinos GP, Arnaud L, Bieker JJ, Philipsen S; KLF1 Consensus Workgroup. Kruppeling erythropoiesis: an unexpected broad spectrum of human red blood cell disorders due to *KLF1* variants. *Blood* 2016;127:1856–1862.
60. Borg J, Papadopoulos P, Georgitsi M, Gutiérrez L, Grech G, Fanis P, Phylactides M, Verkerk AJ, van der Spek PJ, Scerri CA, Cassar W, Galdies R, van Ijcken W, Ozgür Z, Gillemans N, Hou J, Bugeja M, Grosveld FG, von Lindern M, Felice AE, Patrinos GP, Philipsen S. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor *KLF1* causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat. Genet.* 2010;42:801–805.

61. Shariati L, Khanahmad H, Salehi M, Hejazi Z, Rahimmanesh I, Tabatabaiefar MA, Modarressi MH. Genetic disruption of the *KLF1* gene to overexpress the γ -globin gene using the CRISPR/Cas9 system. *J Gene Med.* 2016;18(10):294-301.
62. Bauer M, Kinkl N, Meixner A, Kremmer E, Riemenschneider M, Förstl H, Gasser T, Ueffing M. Prevention of interferon-stimulated gene expression using microRNA-designed hairpins. *Gene Ther.* 2009;16(1):142-147.
63. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F, Kay MA. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006;441(7092):537-541.
64. Shariati L, Modarressi MH, Tabatabaiefar MA, Kouhpayeh S, Hejazi Z, Shahbazi M, Sabzehei F, Salehi M, Khanahmad H. Engineered zinc-finger nuclease to generate site-directed modification in the *KLF1* gene for fetal hemoglobin induction. *J Cell Biochem.* 2019;120:8438-8446.
65. Li Y, Liu D, Zhang X, Li Z, Ye Y, Liu Q, Shen J, Chen Z, Huang H, Liang Y, Han X, Liu J, An X, Mohandas N, Xu X. miR-326 regulates HbF synthesis by targeting EKLF in human erythroid cells. *Exp Hematol.* 2018;63:33-40.
66. Wienert B, Funnell A, Norton L, Pearson R, Wilkinson-White L, Lester K, Vadolas J, Porteus M, Matthews J, Quinlan K, Crossley M. Editing the genome to introduce a beneficial naturally occurring mutation associated with increased fetal globin. *Nat Commun.* 2015;6:1–8.
67. Gillinder KR, Ilsley MD, Nébor D, Sachidanandam R, Lajoie M, Magor GW, Tallack MR, Bailey T, Landsberg MJ, Mackay JP, Parker MW, Miles LA, Graber JH, Peters LL, Bieker JJ, Perkins AC. Promiscuous DNA-binding of a mutant zinc finger protein corrupts the transcriptome and diminishes cell viability. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(3):1130-1143.
68. Canatan D, Aydınok Y(ed). *Talasemi ve Hemoglobinopatiler Tanı ve Tedavi.* Talasemi Federasyonu. Antalya: Retma Matbaa, 2007.
69. Weatherall DJ, Clegg JB. Thalassaemia—a global public health problem. *Nature medicine* 1996;2:847–849.
70. Weatherall DJ, Clegg JB. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001;79:704–712.

71. Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet* 2012;379(9813):373–383.
72. Özbolat G, Tuli A. Kruppel Benzeri Transkripsiyon Faktör KLF1'in HbA₂ ve HbF Değerlerine Etkisi. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi* 2017;26(3):342-351.
73. Giordano PC. The effects of iron deficiency anemia on the levels of the hemoglobin subtypes: possible consequences on clinical diagnosis. *Clin Lab Haematol.* 2003;25(3):203.
74. Akar E, Akar N. A review of abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk J Hematol.* 2007;24:143-145.
75. Köseleler A, Atalay A, Atalay EÖ. HbA₂ -Yokoshima (delta 25(B7)Gly >Asp) and Hb A₂ -Yialousa (delta 27(B9)Ala>Ser) in Turkey. *Turk J Hematol.* 2012; 29:289-290.
76. Kavasoğlu AN. Hemoglobin A₂ değerini düşüren delta globin gen değişikliklerinin araştırılması. *Tıpta Uzmanlık Tezi, Ege Üniv. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, İzmir, 2017.*
77. Aydın M, Rencuzogullari E, Bayram S, Sevgiler Y, Genc A. Alterations on high HbF levels may be associated with *KLF1* gene mutations. *Cell Mol Biol. (Noisy-le-grand)* 2017;63(8):51-57.
78. Oner R, Birben E, Acar C, Oner C, Kara A, Gümrük F, Gürgey A, Altay C. Molecular analysis of turkish beta-thalassaemia heterozygotes with normal Hb A₂ levels. *Hemoglobin* 2000;24(3):195-201.
79. Martin DW, Mayes PA, Rodwell VW, editors. *Harper's Review of Biochemistry.* 19th ed. California: Lange Medical Publications, 1983.
80. Perutz MF, Rossmann MG, Cullis AF, Muirhead H, Will G, North ACT. Structure of haemoglobin: a threedimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature* 1960;185:416–422.
81. Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR, editors. *Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry.* 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.
82. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, editors. *Thompson & Thompson Genetics in Medicine.* 7th ed. Philadelphia: Elsevier, 2007.
83. Nelson DL, Cox MM, editors. *Lehninger Principles of Biochemistry.* 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company, 2005.

84. Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, editors. Thompson & Thompson Genetics in Medicine. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2016.
85. Liebhaber SA, Russell JE. Expression and developmental control of the human alpha-globin gene cluster. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;850:54–63.
86. Liebhaber SA, Cash FE, Ballas SK. Human alpha-globin gene expression. The dominant role of the alpha 2-locus in mRNA and protein synthesis. *J Biol Chem.* 1986;261:15327–15333.
87. Opazo JC, Hoffmann FG, Storz JF. Genomic evidence for independent origins of β -like globin genes in monotremes and therian mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008;105:1590–1595.
88. Papadakis MN, Patrinos GP. Contribution of gene conversion in the evolution of the human β -like globin gene family. *Hum Genet.* 1999;104:117–125.
89. Borg J, Georgitsi M, Aleporou-Marinou V, Kollia P, Patrinos GP. Genetic recombination as a major cause of mutagenesis in the human globin gene clusters. *Clin Biochem.* 2009;42:1839–1850.
90. Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus P, editors. *The Molecular Basis of Blood Diseases.* Philadelphia: Saunders, 1987, p 66.
91. Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves DR, Kollias G. Position-independent, high-level expression of the human beta-globin gene in transgenic mice. *Cell* 1987;51:975–985.
92. Giardine B, Borg J, Viennas E, Pavlidis C, Moradkhani K, Joly P, Bartsakoulia M, Riemer C, Miller W, Tzimas G, Wajcman H, Hardison RC, Patrinos GP. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(database issue):D1063-D1069.
93. Milner PF, Huisman TH. Studies of the proportion and synthesis of haemoglobin G Philadelphia in red cells of heterozygotes, a homozygote, and a heterozygote for both haemoglobin G and alpha thalassaemia. *Br J Haematol.* 1976;34:207–220.
94. Kaushansky K, Lichtman MA, Prchal JT, Levi MM, Press OW, Burns LJ, Caligiuri M. *Williams Hematology.* 9th ed. USA: McGraw Hill Medical Books, 2016.

95. Patrinos GP, Kollia P, Papadakis MN. Molecular diagnosis of inherited disorders: lessons from hemoglobinopathies. *Hum Mutat.* 2005;26:399–412.
96. Blattner A, Brunner-Agten S, Ludin K, Hergersberg M, Herklotz R, Huber AR, Röthlisberger B. Detection of germline rearrangements in patients with α - and β -thalassemia using high resolution array CGH. *Blood cells, Molecules and Diseases* 2013;51(1):39–47.
97. Gu X, Zeng Y. A review of the molecular diagnosis of thalassemia. *Hematology* 2002;4:203–209.
98. Barrett AN, Saminathan R, Choolani M. Thalassaemia screening and confirmation of carriers in parents. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 2017;39:27-40.
99. Hicks EJ, Hughes BJ. Comparison of electrophoresis on citrate agar, cellulose acetate, or starch for hemoglobin identification. *Clin Chem.* 1975;21:1072-1076.
100. Sae-ung N, Srivorakun H, Fucharoen G, Yamsri S, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. Phenotypic expression of hemoglobins A₂, E and F in various hemoglobin E related disorders. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2012;48(1):11–16.
101. Johnson JP, Vichinsky E, Hurst D, Camber A, Lubin B, Louie E. Differentiation of homozygous hemoglobin E from compound heterozygous hemoglobin E-beta⁰-thalassemia by hemoglobin E mutation analysis. *J Pediatr.* 1992;120:775–779.
102. Wong SC, Aw TC, Suri R, Wong CK, Plaseska D, Efremov GD. Differential diagnosis of Hb EE and Hb E-beta(0)-thalassemia by protein and DNA analyses. *Acta Haematol.* 2000;103(2):84–89.
103. Singha K, Fucharoen G, Sanchaisuriya K, Fucharoen S. EE score: an index for simple differentiation of homozygous hemoglobin E and hemoglobin E- β 0-thalassemia. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2018; 56(9):1507-1513.
104. Prasing W, Pornprasert S. Measurement of HbA₂ by Capillary Electrophoresis for Diagnosing β -thalassemia/HbE Disease in Patients With Low HbF. *Laboratory Medicine* 2014;45(3):226–230.

105. Pornprasert S, Tookjai M, Punyamung M, Kongthai K. A Formula to Identify Potential Cases of β -Thalassemia/HbE Disease Among Patients With Absent HbA, HbE >75% and HbF Between 5 and 15%. *Laboratory Medicine* 2018;00:1-5.
106. Scherf-Clavel O. Impurity Profiling of Challenging Active Pharmaceutical Ingredients without Chromophore. PhD, University of Wuerzburg, Würzburg, 2016.
107. Basset P, Beuzard Y, Garel MC, Rosa J. Isoelectric focusing of human hemoglobin: its application to screening, to the characterization of 70 variants, and to the study of modified fractions of normal hemoglobins. *Blood* 1978;51(5):971–982.
108. Campbell M, Henthorn JS, Davies SC. Evaluation of cation-exchange HPLC compared with isoelectric focusing for neonatal hemoglobinopathy screening. *Clin Chem*. 1999;45(7):969–975.
109. Torres LdeS, Okumura JV, Silva DG, Bonini-Domingos CR. Hemoglobin D-Punjab: origin, distribution and laboratory diagnosis. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2015;37(2):120-126.
110. Borbely N, Phelan L, Szydlo R, Bain B. Capillary zone electrophoresis for haemoglobinopathy diagnosis. *J Clin Pathol*. 2013;66:29–39.
111. Cotton F, Lin C, Fontaine B, Gulbis B, Janssens J, Vertongen F. Evaluation of a capillary electrophoresis method for routine determination of hemoglobins A₂ and F. *Clin Chem* 1999;45:237–243.
112. Higgins T, Mack M, Khajuria A. Comparison of two methods for the quantification and identification of hemoglobin variants. *Clin Biochem*. 2009;42:701–705.
113. Van Delft P, Lenters E, Bakker-Verweij M, de Korte M, Baylan U, Harteveld CL, Giordano PC. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. *Int J Lab Hematol*. 2009;31(5):484–495.

114. Keren DF, Hedstrom D, Gulbranson R, Ou CN, Bak R. Comparison of Sebia Capillary capillary electrophoresis with the Primus high-pressure liquid chromatography in the evaluation of hemoglobinopathies. *Am J Clin Pathol.* 2008;130(5):824–831.
115. Pornprasert S, Tookjai M, Punyamung M, Pongpunyayuen P, Jaiping K. Development of hemoglobin typing control materials for laboratory investigation of thalassemia and hemoglobinopathies. *Clin Chem Lab Med.* 2016;54(1):81-89.
116. Paglietti ME, Satta S, Sollaino MC, Barella S, Ventrella A, Desogus MF, Demartis FR, Manunza L, Origa R. The problem of borderline hemoglobin A₂ levels in the screening for β -thalassemia carriers in sardinia. *Acta Haematologica* 2016;135:193–199.
117. Gorivale M, Sawant P, Mehta P, Nadkarni A, Ghosh K, Colah R. Challenges in prenatal diagnosis of beta thalassaemia: Couples with normal HbA₂ in one partner. *Prenat Diagn.* 2015;35:1353–1357.
118. Panigrahi I, Mahapatra M, Kumar R, Kumar G, Choudhry VP, Saxena R. Jaundice and alpha gene triplication in beta-thalassemia: association or causation? *Hematology* 2006;11(2):109–112.
119. Giambona A, Passarello C, Ruggeri G, Renda D, Teresi P, Anzà M, Maggio A. Analysis of delta-globin gene alleles in the Sicilian population: identification of five new mutations. *Haematologica* 2006;91(12):1681-1684.
120. Hariharan P, Colah R, Ghosh K, Nadkarni A. Differential role of Kruppel like factor 1 (KLF1) gene in red blood cell disorders. *Genomics* 2019;[Epub ahead of print]. doi:10.1016/j.ygeno.2018.11.032.
121. Bouva MJ, Harteveld CL, van Delft P, Giordano PC. Known and new δ -globin gene mutations and their diagnostic significance. *Haematologica* 2006;91(1):129–132.
122. Morgado A, Picanco I, Gomes S, Miranda A, Coucelo M, Seuanes F, Seixas MT, Romao L, Faustino P. Mutational spectrum of delta-globin gene in the Portuguese population. *Eur J Haematol.* 2007;79:422–428.
123. Cao A, Kan YW. The prevention of thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;3(2):a011775.

124. Gorakshakar AC, Breganza PV, Colaco SP, Shaikh RF, Bohra MY, Sawant PM, Nadkarni AH, Colah RB, Ghosh KK. Rare β - and δ -Globin Gene Mutations in the Pathare Prabhus: Original Inhabitants of Mumbai, India. *Hemoglobin* 2018;42(5-6):297-301.
125. Traeger-Synodinos J, Hartevelde CL, Old JM, Petrou M, Galanello R, Giordano P. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015;23:426-437.
126. Ryan K, Bain BJ, Worthington D, James J, Plews D, Mason A, Roper D, Rees DC, De La Salle B, Streetly A. British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: Guidelines for screening and diagnosis. *Br. J. Haematol.* 2010;149:35–49.
127. Langlois S, Ford JC, Chitayat D, Désilets VA, Farrell SA, Geraghty M, Nelson T, Nikkel SM, Shugar A, Skidmore D, Allen VM, Audibert F, Blight C, Gagnon A, Johnson JA, Wilson RD, Wyatt P. Carrier screening for thalassemia and hemoglobinopathies in Canada. *J Obstet Gynaecol Can.* 2008;30:950-971.
128. Stephens AD, Angastiniotis M, Baysal E, Chan V, Fucharoen S, Giordano PC, Hoyer JD, Mosca A, Wild B; International Council for the Standardisation of Haematology (ICSH). ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin A₂. *Int J Lab Hematol.* 2012;34(1):1–13.
129. Yan JM, Zhou JY, Xie XM, Li J, Li DZ. A New δ -Globin Gene Variant: Hb A₂-Fengshun [δ 121(GH4)Glu→Lys (HBD: c.364G > A)]. *Hemoglobin* 2016;40(3):213-214.
130. Liu N, Xie XM, Zhou JY, Li R, Liao C, Li DZ. Analysis of delta-globin gene mutations in the Chinese population. *Hemoglobin* 2013;37:85–93.
131. Riberio MLS, GUL H, Buchanan-Adair I, Husman THJ. Incorrect genetic counseling of a couple with δ -thalassemia, due to incomplete testing. *Am J Hum Genet.* 1993;52:842–843.
132. WHO 1989. Report of the VIth Annual Meeting of the WHO Working Group on the Feasibility Study on Hereditary Disease Community Control Programs (Hereditary Anaemias). Cagliari, Sardinia, Italy, 8-9 April 1989.

133. Angastiniotis M, Eleftheriou A, Galanello R, Harteveld CL, Petrou M, Traeger-Synodinos J, Giordano P, Jauniaux E, Modell B, Serour G. Prevention of Thalassaemias and Other Haemoglobin Disorders: Volume 1: Principles. Erişim: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK190481>[Online] Erişim Tarihi: 10.04.2019
134. Traeger-Synodinos J, Harteveld CL, Old JM, Petrou M, Galanello R, Giordano P. EMQN Best Practice Guidelines for molecular and haematology methods for carrier identification and prenatal diagnosis of the haemoglobinopathies. *Eur. J. Hum. Genet.* 2015;23:560.
135. Karimi ME, Rasekhi AR. Efficiency of premarital screening of beta thalassemia trait using MCH rather than MCV in the population of Fars Province, Iran. *Haematologia* 2002;32:129-133.
136. Chan LC, Ma SK, Chan AY, Ha SY, Waye JS, Lau YL, Chui DH. Should we screen for globin gene mutations in blood samples with mean corpuscular volume (MCV) greater than 80 fL in areas with a high prevalence of thalassaemia? *J Clin Pathol.* 2001;54:317-320.
137. Ou Z, Li Q, Liu W, Xiaofang S. Elevated hemoglobin A₂ as a marker for β -thalassemia trait in pregnant women. *Tohoku J Exp Med.* 2011;223(3):223-226.
138. Brugnara C, Mohandas N. Red cell indices in classification and treatment of anemias: from M.M. Wintrob's original 1934 classification to the third millennium. *Curr Opin Hematol.* 2013;20:222-230.
139. Giordano PC. Strategies for basic laboratory diagnostics of the hemoglobinopathies in multi-ethnic societies: interpretation of results and pitfalls. *Int J Lab Hematol.* 2013;35:465–479.
140. Kan YW, Nathan DG. Mild thalassemia: the result of interactions of alpha and beta thalassemia genes. *J Clin Invest.* 1970;49(4):635–642.
141. Nadkarni AH, Gorakshakar AC, Sawant PM, Khushnooma YI, Dipti SU, Manju SG, Pallavi RM, Priya H, Kanjaksha G, Roshan BC. The phenotypic and molecular diversity of hemoglobinopathies in India: A review of 15 years at a referral center. *Int J Lab Hematol.* 2018;00:1-9.

142. Zhong L, Gan X, Xu L, Liang C, Xie Y, Lin W, Chen P, Liu M. The phenomena of balanced effect between α -globin gene and of β -globin gene. *BMC Medical Genetics* 2018;19:145.
143. Giambona A, Passarello C, Renda D, Maggio A. The significance of the hemoglobin A(2) value in screening for hemoglobinopathies. *Clin Biochem.* 2009;42:1786–1796.
144. Al-Amodi AM, Ghanem NZ, Aldakeel SA, Asoom LIA, Ahmed NR, Almandil NB, Naserullah ZA, Al-Jarrash S, Akhtar MS, AbdulAzeez S, Al-Ali AK, Borgio JF. Hemoglobin A₂ (HbA₂) has a measure of unreliability in diagnosing β -thalassemia trait (β -TT). *Current Medical Research and Opinion* 2018;34(5):945-951.
145. Old J, Angastiniotis M, Eleftheriou A, Galanello R, Hartevelde CL, Petrou M, Traeger-Synodinos J, Giordano P, Jauniaux E, Modell B, Serour G. Haemoglobin pattern analysis. In: Old J, Angastiniotis M, Eleftheriou A, Galanello R, Hartevelde CL, Petrou M, Traeger-Synodinos J, Giordano P, Jauniaux E, Modell B, Serour G. *Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders*. 2nd ed. Thalassaemia International Federation, Nicosia, Cyprus, 2012:35-55.
146. Azma RZ, Othman A, Azman N, Alauddin H, Ithnin A, Yusof N, Razak NF, Hussin NH. Co-inheritance of compound heterozygous Hb constant spring and a single $-\alpha$ (3.7) gene deletion with heterozygous deltabeta thalassaemia: a diagnostic challenge. *Malays J Pathol.* 2012;34(1):57–62.
147. Mosca A, Paleari R, Ivaldi G, Galanello R, Giordano PC. The role of haemoglobin A₂ testing in the diagnosis of thalassaemias and related haemoglobinopathies. *J Clin Pathol.* 2009;62:13-17.
148. Melis MA, Pirastu M, Galanello R. Phenotypic effect of heterozygous α and β^0 -thalassemia interaction. *Blood* 1983;62:226-229.
149. Aliyeva G, Asadov C, Mammadova T, Gafarova S, Abdulalimov E. Thalassemia in the laboratory: pearls, pitfalls, and promises. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)* 2018;57(2):165-174.
150. England JM, Fraser PM. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait by routine blood-count. *Lancet* 1973;1:449-452.

151. Green R, King R. A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassemia minor. *Blood Cells* 1989;15:481-491.
152. Mentzer WC. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. *Lancet* 1973;1:882.
153. Shine I, Lal S. A strategy to detect beta-thalassaemia minor. *Lancet* 1977;1:692-694.
154. Ricerca BM, Storti S, d'Onofrio G, Mancini S, Vittori M, Campisi S, Mango G, Bizzi B. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait: a new approach. *Haematologica* 1987;72:409-413.
155. Srivastava PC. Differentiation of thalassaemia minor from iron deficiency. *Lancet* 1973;2:154-155.
156. Ehsani MA, Shahgholi E, Rahiminejad MS, Seighali F, Rashidi A. A new index for discrimination between iron deficiency anemia and beta-thalassemia minor: results in 284 patients. *Pak J Biol Sci.* 2009;12:473-475.
157. Sirdah M, Tarazi I, Al Najjar E, Al Haddad R. Evaluation of the diagnostic reliability of different RBC indices and formulas in the differentiation of the beta-thalassaemia minor from iron deficiency in Palestinian population. *Int J Lab Hematol.* 2008;30:324-330.
158. Bordbar E, Taghipour M, Zucconi BE. Reliability of different RBC indices and formulas in discriminating between beta-thalassemia minor and other microcytic hypochromic cases. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2015;7:e2015022.
159. Wajcman H, Azimi M, Cui J, Hoppe C, Flamini M, Ho C, Reddy S. Hemoglobinopathy testing: the significance of accuracy and pitfalls in HbA₂ determination. *Int J Lab Hematol.* 2017;39(1):e23-e27.
160. Carrell RW, Kay R. A simple method for the detection of unstable haemoglobins. *Br J Haematol.* 1972;23:615-619.
161. Khalil MS, Marouf S, Element D, Timbs A, Gallienne A, Schuh A, Old JM, Henderson S. A study of δ -globin gene mutations in the UK population: identification of three novel variants and development of a novel DNA test for HbA₂. *Hemoglobin* 2014;38:201-206.

162. Huisman TH, Reynolds CA, Dozy AM, Wilson JB. Hemoglobin Babinga or $\alpha 2\delta 2$ 136 Gly—Asp observed in the American Negro. *Biochim Biophys Acta*. 1969;175:223-225.
163. Vella F. Variation in Hemoglobin A₂. *Hemoglobin* 1977;1(7):619-650.
164. Sahli CA, Gritli S, Dabboubi R, Omar S, Siala H, Kaabachi N, Bibi A, Messaoud T. Fortuitous description of haemoglobin A₂' [$\delta 16$ (A13) Gly→Arg (GGC→CGC)] in a Tunisian family: study of the molecular defect and its origin. *Ann Biol Clin*. 2015;73(3):353-358.
165. Alkindi S, AlZadjali S, Daar S, Ambusaidi R, Gravell D, Al Haddabi H, Krishnamoorthy R, Pathare A. First report of the spectrum of δ -globin gene mutations in Omani subjects – identification of novel mutations. *Int. Jnl. Lab. Hem*. 2015;37:238-243.
166. Lacerra G, Scarano C, Lagona LF, Testa R, Caruso DG, Medulla E, Friscia MG, Mastrullo L, Caldora M, Prezioso R, Gaudiano C, Magnano C, Romeo MA, Musollino G, Noce F, Carestia C. Genotype-phenotype relationship of the δ -thalassemia and Hb A(2) variants: observation of 52 genotypes. *Hemoglobin* 2010;34:407-423.
167. Kordafshari, A, Amirian, A, Zeinali, S, Valaei, A, Maryami, F, Karimipoor, M. Molecular Characterization of δ -Thalassemia in Iran. *Hemoglobin* 2016;40:44–47.
168. Pavlou E, Phylactides M, Kyrri A, Kalogerou E, Makariou C, Georgiou I, Kleanthous M. δ -Thalassemia in Cyprus. *Hemoglobin* 2006;30(4):455–462.
169. De Angioletti M, Lacerra G, Gaudiano C, Mastrolonardo G, Pagano L, Mastrullo L, Masciandaro S, Carestia C. Epidemiology of the δ globin alleles in southern Italy shows complex molecular, genetic, and phenotypic features. *Hum Mutat*. 2002;20(5):358–367.
170. Guiso L, Frogheri L, Pistidda P, Angioni L, Dore F, Pardini S, Longinotti M. Frequency of delta+ δ -thalassaemia in Sardinians. *Clin Lab Haematol*. 1996;18(4):241-244.

171. Moi P, Paglietti E, Sanna A, Brancati C, Tagarelli A, Galanello R, Cao A, Pirastu M. Delineation of the molecular basis of delta- and normal HbA₂ beta-thalassemia. *Blood* 1988;72(2):530-533.
172. Trifillis P, Kyrri A, Kalogirou E, Kokkofitou A, Ioannou P, Schwartz E, Surrey S. Analysis of delta-globin gene mutations in Greek Cypriots. *Blood* 1993;82:1647–1651.
173. Tzetis M, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis C. The molecular basis of normal HbA₂ type 2 beta-thalassemia in Greece. *Hematol Pathol.* 1994;8:25–34.
174. Papadakis M, Drakoulakou O, Papapanagiotou E, Pessini D, Loutradi-Anagnostou A. Hb A₂-Agrinio [δ 43(CD2)Glu>Gly(GAG>GGG)]: a new delta chain variant detected in a Greek family. *Hemoglobin* 1995;19:295–299.
175. Kountouris P, Kousiappa I, Papasavva T, Christopoulos G, Pavlou E, Petrou M, Feleki X, Karitzie E, Phylactides M, Fanis P, Lederer CW, Kyrri AR, Kalogerou E, Makariou C, Ioannou C, Kythreotis L, Hadjilambi G, Andreou N, Pangalou E, Savvidou I, Angastiniotis M, Hadjigavriel M, Sitarou M, Kolnagou A, Kleanthous M, Christou S. The molecular spectrum and distribution of haemoglobinopathies in Cyprus: a 20-year retrospective study. *Sci Rep.* 2016;6:26371.
176. Pirastu M, Galanello R, Melis MA, Brancati C, Tagarelli A, Cao A, Kan YW. Delta+ -thalassemia in Sardinia. *Blood* 1983;62(2):341-345.
177. Trifillis P, Ioannou P, Schwartz E, Surrey S. Identification of four novel delta-globin gene mutations in Greek Cypriots using polymerase chain reaction and automated fluorescence-based DNA sequence analysis. *Blood* 1991;78(12):3298-3305.
178. Ohba Y, Igarashi M, Tsukahara M, Nakashima M, Sanada C, Ami M, Arai Y, Miyaji T. HB A₂ Yokoshima, α 2 δ 2 25(B7)Gly-->Asp, A new δ Chain Variant Found in a Japanese Family. *Hemoglobin* 1985;9(6):613-615.
179. Williamson D, Wells RM, Anderson R, Matthews J. A new unstable and low oxygen affinity hemoglobin variant: Hb J-Auckland [β 25(B7)Gly-->Asp]. *Hemoglobin* 1987;11(3):221-230.

180. Deutsch S, Darbellay R, Offord R, Frutiger A, Kister J, Wajcman H, Beris P. Hb Iraq-Halabja β 10(A7) Ala \rightarrow Val (GCC \rightarrow GTC): A new β -chain silent variant in a family with multiple Hb disorders. *Am J Hematol.* 1999;61(3):187-193.
181. Warghade S, Britto J, Haryan R, Dalvi T, Bendre R, Chheda P, Matkar S, Salunkhe Y, Chanekar M, Shah N. Prevalence of hemoglobin variants and hemoglobinopathies using cation-exchange high-performance liquid chromatography in central reference laboratory of India: A report of 65779 cases. *J Lab Physicians.* 2018;10(1):73-79.
182. Giambona A, Passarello C, Vinciguerra M, Muli RL, Teresi P, Anzà M, Ruggeri G, Renda D, Maggio A. Significance of borderline hemoglobin A₂ values in an Italian population with a high prevalence of β -thalassemia. *Haematologica* 2008;93(9):1380-1384.
183. Alaithan MA, AbdulAzeez S, Borgio JF. A comprehensive review of the prevalence of beta globin gene variations and the co-inheritance of related gene variants in Saudi Arabians with beta-thalassemia. *Saudi Med J.* 2018;39(4):329-335.
184. Hariharan P, Colaco S, Colah R, Ghosh K, Nadkarni A. Delta globin gene variations leading to reduction in HbA₂ levels. *Int J Lab Hematol.* 2016;38:610-615.
185. Sun M, Lou J, Zhao Y, Liu Y. Molecular and Hematological Characterization of Two Novel δ -Globin Gene Mutations Found in Chinese Individuals. *Hemoglobin* 2018;42(2):132-134.
186. Jain S, Edison ES, Mathews V, Shaji RV. A novel δ -globin gene mutation (HBD: c.323G>A) masking the diagnosis of β -thalassemia: a first report from India. *Int J Hematol.* 2012;95:570-572.
187. Urrechaga E. Red blood cell microcytosis and hypochromia in the differential diagnosis of iron deficiency and β -thalassaemia trait. *International Journal of Laboratory Hematology* 2009;31:528-534.

188. Cassarà F, Vinciguerra M, Cannata M, Marchese G, Passarello C, Leto F, Maggio A, Giambona A. Phenotypic Evaluation of a Novel Nucleotide Substitution (HBD: c.442T>C) on the δ -Globin Gene. *Hemoglobin* 2017;41(3):220-222.
189. Weatherall DJ, Clegg JB, editors. *The Thalassemia Syndromes*. 4th ed. Oxford: Blackwell Science, 2001.
190. Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ, editors. *Disorders of Hemoglobin*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.
191. Thein SL. The molecular basis of β -thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3:a011700.
192. Galanello R, Ruggeri R, Paglietti E, Addis M, Melis MA, Cao A. A family with segregating triplicated alpha globin loci and beta thalassemia. *Blood* 1983;62:1035-1040.
193. Sollaino MC, Paglietti ME, Perseu L, Giagu N, Loi D, Galanello R. Association of α -globin gene quadruplication and heterozygous β -thalassemia in patients with thalassemia intermedia. *Haematologica* 2009;94:1445-1448.
194. Origa R, Sollaino MC, Borgna-Pignatti C, Piga A, Feliu Torres A, Masile V, Galanello R. α -Globin gene quadruplication and heterozygous β -thalassemia: a not so rare cause of thalassemia intermedia. *Acta Haematologica* 2014;131:162-164.
195. Stephens AD, Colah R, Fucharoen S, Hoyer J, Keren D, McFarlane A, Perrett D, Wild BJ; International Council for the Standardisation of Haematology (ICSH). ICSH recommendations for assessing automated high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis equipment for the quantitation of HbA₂. *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2015;37:577-582.
196. Galanello R, Ruggeri R, Addis M, Paglietti E, Cao A. Hemoglobin A₂ in iron deficient β -thalassemia heterozygotes. *Hemoglobin* 1981;5(6):613–618.
197. Bianco I, Cappabianca MP, Foglietta E, Lerone M, Deidda G, Morlupi L, Grisanti P, Ponzini D, Rinaldi S, Graziani B. Silent thalassemias: genotypes and phenotypes. *Haematologica* 1997;82(3):269–280.

198. Jiang F, Chen GL, Li J, Zhou JY, Liao C, Li DZ. Analysis of the Genotypes in a Chinese Population with Increased Hb A₂ and Low Hematological Indices. *Hemoglobin* 2018;42(3):154-158.
199. Rani N, Jamwal M, Kaur J, Sharma P, Malhotra P, Maitra A, Singh R, Das R. Homozygous KLF1 mutation c.901C>T (p.Arg301Cys) resulting in mild thalassemia intermedia in an Indian: A next-generation sequencing diagnosis. *Blood Cells Mol Dis.* 2018;72:19-21.
200. Khamphikham P, Sripichai O, Munkongdee T, Fucharoen S, Tongsimas S, Smith DR. Genetic variation of Krüppel-like factor 1 (KLF1) and fetal hemoglobin (HbF) levels in β^0 -thalassemia/HbE disease. *Int J Hematol.* 2018;107(3):297-310.
201. Zaker-Kandjani B, Namdar-Aligoodarzi P, Azarkeivan A, Najmabadi H, Banan M. Mutation screening of the Krüppel-like factor 1 gene using single-strand conformational polymorphism in a cohort of Iranian β -thalassemia patients. *Hemoglobin* 2015;39(1):24-29.
202. Tepakhan W, Yamsri S, Sanchaisuriya K, Fucharoen G, Xu X, Fucharoen S. Nine known and five novel mutations in the erythroid transcription factor *KLF1* gene and phenotypic expression of fetal hemoglobin in hemoglobin E disorder. *Blood Cells Mol Dis.* 2016;59:85-91.
203. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL; ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424.

8.EKLER

Ek 1. Etik kurul onayı



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 18920478-050.04.04-E.1800152803
Konu : Başvuru İncelemesi

22/10/2018

Sayın Prof. Dr. Fatma SILAN

Yürütücülüğünü yapmış olduğunuz "HbF veya HbA2 Anormalliği Olan Bireylerde Kruppel-Like Factor 1 ve Hemoglobin Subunit Delta Genlerindeki Mutasyonların Genotip-Fenotip İlişkisinin İncelenmesi" başlıklı 2011-KAEK-27/2018- E.1800139141 no'lu projeniz ile ilgili olarak Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun almış olduğu 17.10.2018 tarih ve 18-05 no'lu kararı aşağıdadır.

Bilgilerinize rica ederim.

Karar Tarihi: 17.10.2018

Karar No: 2018-18

Karar05)2011-KAEK-27/2018-E.1800139141 no'lu araştırma ile ilgili olarak, proje yürütücüsü Prof. Dr. Fatma SILAN'ın çalışması Etik Kurul tarafından değerlendirilmiş olup; yapılan oylamada **"ETİK KURUL ONAYINI ALIR"** kararı verilmiştir.(Doç. Dr. Coşkun SILAN, Prof. Dr. Fatma SILAN'ın eşi olduğundan dolayı bu araştırma önerisi için oy kullanmamıştır.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Kurul Başkanı

Ek 2. Proje yürütücüsü değişikliğini bildirir dilekçe



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
Dahili Tıp Bilimleri Bölümü Başkanlığı
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanlığı



Sayı : 34177854-703.01-E.1900013693
Konu : Proje Yürütücülüğü Hk.

23/01/2019

DAHİLİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ BAŞKANLIĞINA

İlgili kurulumuzdan 17.10.2018 tarih ve 2018 -18 karar no ile onatını aldığımız "HbF veya HbA2 anormalleği olan bireylerde Kruppel- like Factor 1 ve Hemoglobin Subunit Delta günlerindeki mutasyonların genotip- fenotip incelenmesi "başlıklı projemizin yürütücülüğünü ,TUKMOS kriterleri sebebiyle uzmanlık eğitimlerini tamamlamak üzere yatay geçişle Fakültemize transfer edilen tez döneminde iki yeni asistan doktorumuzun olması sebebi ile, Prof.Dr. Fatma SILAN yerine Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR yapacaktır.



Gereğini bilgilerinize arz ederim.

e-imzalıdır

Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Ana Bilim Dalı Başkanı

Ek: Anabilim Dalı Kurul Kararı

Ek 3. Proje yürütücüsü değişikliğinin etik kurul tarafından onayı



T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 18920478-703.01-E.1900026198
Konu : Proje Yürütücülüğü Hk.

14/02/2019

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 04.02.2019 tarihli ve 30566003-703.01-E.1900020159 sayılı yazınız.

İlgi dilekçe de belirtilmiş olan Tıbbi Genetik Anabilim Başkanlığı tarafından proje yürütücülüğü ile ilgili değişiklik talebi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından uygun bulunmuştur.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Öztürk ÖZDEMİR
Kurul Başkanı

Ek: 4.02.2019 tarihli 30566003-703.01-E.1900020159 sayılı yazı

9.ÖZGEÇMİŞ

Arş.Gör.Dr.Taner KARAKAYA	
karakayatane1990@gmail.com tkarakaya@comu.edu.tr	
(0286) 2200205 – 2412/2424	
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü	
Tıbbi Genetik Anabilim Dalı 17100- Çanakkale	
Website:http://aves.comu.edu.tr/1960/	

DİPLOMALAR

Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi
---------------	---

Öğrenim

	Doktora Öncesi	Tezler
Lisans 2009-2012	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi – ERZURUM	-
Lisans 2012-2015	Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi – SAMSUN	-
Tıpta Uzmanlık Eğitimi 2016-2020	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü – Tıbbi Genetik ABD	"HbF veya HbA ₂ anormalliği olan bireylerde Kruppel-like factor 1 ve Hemoglobin subunit delta genlerindeki mutasyonların genotip-fenotip ilişkisinin incelenmesi" Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Öztürk ÖZDEMİR

Görevler

Hekim (Pratisyen) 2015-2016	Yakakent Toplum Sağlığı Merkezi – SAMSUN
Araştırma Görevlisi Doktor 2016-2016	Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Genetik ABD – İSTANBUL
Araştırma Görevlisi Doktor 2016-2020	Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Tıp Fakültesi, Dahili Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Genetik ABD – ÇANAKKALE

RUTİN HİZMETLER		2016-2020 yılları arasında tanı laboratuvarı olarak(Sitogenetik ve Moleküler) verdiği hizmetler ve tanı raporları
<u>A- Sitogenetik</u>	<u>Adet</u>	
<i>Lenfosit Hücre Kültürü</i>	<i>2629</i>	Karyotip – karyogram analiz
<i>FISH</i>	<i>400</i>	Metafaz-interfaz analiz
<u>B- Moleküler Genetik</u>	<u>Adet</u>	
<i>FMF</i>	<i>1341</i>	Moleküler tanı
<i>CVD</i>	<i>1404</i>	Habituel Abortus, PTE, SVH, Behçet Sendromu, DVT, MI, Atherosklerozis
<i>Farmakogenetik</i>	<i>193</i>	Warfarin, Klopidoğrel, Mikofenolat Mofetil vb. ve kompleks ilaç detoksifikasyon profil analizleri
<i>Onkogenetik</i>	<i>95</i>	Kras, EGFR sekans ve Bcr-ABL (t9;22) (p210) transkript analizi
<i>Prenatal Tanı (QF-PCR)</i>	<i>468</i>	Kromozom 13,18,21,X ve Y STR fragment analizi
<i>MLPA</i>	<i>968</i>	Mikrodelesyon sendromları, Subtelomerik, CFTR, BRCA1/2, DMD,SMA vb.
<i>Array-CGH (60K ve 180K)</i>	<i>981</i>	Delesyon/duplikasyon analizi
<i>Yeni Nesil Dizileme (NGS)</i>	<i>220</i>	CFTR, Otoinflamatuvar hastalıklar, Male/Female İnfertilite, BRCA1/2, Ailevi Kanser paneli, SMA, DMD, Osteogenezis İmperfecta, Marfan Sendromu, NF1/2 vb.
<i>Diğer</i>	<i>1345</i>	Talasemi, TRAPS, CAPS, MVK, Frajil X, HPV, Çölyak, JAK2,HLAB27
<i>Poliklinik hasta sayısı</i>	<i>5502</i>	

İLGİ ALANLARI - LABORATUVAR DENEYİMİ (ARAŞTIRMA ALANI)

A-Sitogenetik

- A1- Periferik kandan lenfosit hücre kültürü ve kromozom analizi
- A2- Seks kromatin analizi
- A3- Manuel ve otomatik karyotip, karyogram ve ideogram analizler
- A4- GTG, C, NOR, HRB bantlama teknikleri

B- Moleküler Sitogenetik

- B1- Direkt, indirekt hibridizasyon teknikleri, CGH ve FISH
- B2- Kromozomal mikrodiseksiyon
- B3- Preimplantasyon Genetik Teşhis (PGT) ve IVF
- B4- In situ hibridizasyon, strip, line-assay hibridizasyon ve genetik hastalıklarda tarama

C- Moleküler Genetik

- C1- Elektroforetik teknikler (agaroz, acrilamide)
- C2- Western blot analiz
- C3- PCR, Multiplex PCR, RT-PCR, Real-Time PCR teknikleri
- C4- RFLP mutasyon ve polimorfizm taramaları
- C5- Genomik DNA izolasyonu (solid, kan ve diğer dokular) ve DNA dizi analizi
- C6- Epigenetik, DNA metilasyon analizi, gen ekspresyonu ve modifikasyon analizi
- C7- MLPA, Strip-Assay
- C8- QF PCR, Direkt sekanslama
- C9- MikroArray-CGH
- C10- Yeni nesil sekans analiz (NGS)

MERKEZİ KURULUŞ ÜYELİKLERİ

1. Tıbbi Genetik Derneği ANKARA

BİLİMSEL ÇALIŞMALARI

A- Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

A1. OZDEMIR OZTURK, PAKSOY BARIS, KARAKAYA TANER, SILAN FATMA. A mosaic infertile case of isodicentric Y-chromosome with duplicated SRY, SHOX and deleted AZF locus. *Biomedical Genetics and Genomics* 2017;2(1):1-3. Doi: 10.15761/BGG.1000125

A2. SILAN FATMA, KANKAYA DUYGU, KARAKAYA TANER, PAKSOY BARIS, TURUNZ VOLKAN, OZDEMIR OZTURK. The GJB2 gene mutation profiles in hearing impaired patients from Western Turkey, Canakkale. *Biomedical Genetics and Genomics* 2017;2(2):1-5. Doi: 10.15761/BGG.1000130

A3. SILAN FATMA, BOUROUBA ROMYLA, KARAKAYA TANER, YILDIZ ONUR, PAKSOY BARIS, URFALI MINE, OZDEMIR OZTURK. The clinical, cytogenetics and molecular characterization of inverted duplication/deletion of chromosome 8p in a boy with mental and motor retardation: Genotype-phenotype correlation in a case report. *Egyptian Journal of Medical Human Genetics* 2018;19(4):437-441. Doi: 10.1016/j.ejmhg.2018.04.001

BİLDİRİLER

A- Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

A1. SILAN FATMA, PAKSOY BARIS, URFALI MINE, KARAKAYA TANER, OZDEMIR OZTURK. Clinical and molecular characterization of SLC7A gene that located in 14q11.2 locus in a seconder infertile rare case with lysinuric protein intolerance. *European Biotechnology Congress 2017, Dubrovnik, Croatia.* 2017;256(Supplement):78. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.1067. (Özet Bildiri/Poster)

A2. SILAN FATMA, KARAKAYA TANER, YILDIZ ONUR, PAKSOY BARIS, URFALI MINE, OZDEMIR OZTURK. A mental and motor retarded case with derivative chromosome 8p rearrangements: Genotype–phenotype correlation in a case report. *European Biotechnology Congress 2017, Dubrovnik, Croatia.* 2017;256(Supplement):78-79. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.1069. (Özet Bildiri/Poster)

A3. OZDEMIR OZTURK, URFALI MINE, PAKSOY BARIS, KARAKAYA TANER, YILDIZ ONUR, SILAN FATMA. A balanced non-reciprocal translocated case with recurrent abortions: The importance and validity of conventional cytogenetics analysis in balanced translocations detection when comparing to the MicroArray-CGH technique. *European Biotechnology Congress 2017, Dubrovnik, Croatia.* 2017;256(Supplement):79, Doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.1070. (Özet Bildiri/Poster)

A4. OZDEMIR OZTURK, YILDIZ ONUR, KARAKAYA TANER, PAKSOY BARIS, URFALI MINE, SILAN FATMA. The microdeletion of 15q11.2 locus encompassing TUBGCP5, NIPA1, NIPA2, and CYFIP1 genes in an epileptic case with macrocephaly, attention-deficit/hyperactivity disorder (ADHD), speech and motor delay. *European Biotechnology Congress 2017, Dubrovnik, Croatia.* 2017;256(Supplement):78. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.06.1068. (Özet Bildiri/Poster)

A5. SILAN FATMA, PAKSOY BARIS, KARAKAYA TANER, YILDIZ ONUR, URFALI MINE, OZDEMIR OZTURK. Two candidate genes for recurrent pregnancy loss and infertility: Could ZP3 and UPK3B give us new diagnostic and therapeutic approach?. World BioDiscovery Congress 2017, Sofia, Bulgaria. 2017;20:20113.

Doi: 10.3897/biodiscovery.20.e20113. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

A6. OZDEMIR OZTURK, KARAKAYA TANER, DINCISOY BIR FIRDEVES, YILDIZ ONUR, SILAN FATMA. Distal trisomy 3q and distal monosomy 11q in a mother and child with neurodevelopmental delay, short stature, facial dysmorphism and digital malformations. European Biotechnology Congress 2018, Athens, Greece. 2018;280(Supplement):66. Doi:10.1016/j.jbiotec.2018.06.215. (Özet Bildiri/Poster)

A7. SILAN FATMA, KARAKAYA TANER, DINCISOY BIR FIRDEVES, PAKSOY BARIS, OZDEMIR OZTURK. Frameshift mutation in N-acetyl-glutamate synthase (NAGS) gene in a consanguineous family: three deceased cases before diagnosis. European Biotechnology Congress 2018, Athens, Greece. 2018;280(Supplement):65-66. Doi:10.1016/j.jbiotec.2018.06.214. (Özet Bildiri/Poster)

A8. DINCISOY BIR FIRDEVES, OZDEMIR OZTURK, KARAKAYA TANER, YILDIZ ONUR, SILAN FATMA. A case with 10q22.3q23.2 microdeletion syndrome and mosaic Klinefelter syndrome. European Biotechnology Congress 2018, Athens, Greece. 2018;280(Supplement):64. Doi: 10.1016/j.jbiotec.2018.06.210. (Özet Bildiri/Poster)

A9. SILAN FATMA, DINCISOY BIR FIRDEVES, ERSAY AHMET RESIT, KARAKAYA TANER, OZDEMIR OZTURK. The c.1397CG and c.3209GA mutations in exon 10 of CFTR gene in an infertile men with oligoastenozoospermia. VII Baltic Genetics Congress, Riga, Latvia. 2018;16(3):255. Doi: 10.22364/eeb.16.18. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

A10. ALBUZ BURCU, SILAN FATMA, OZTURK MENEKSE, KARAKAYA TANER, OZTURK OZDEMIR. A rare heterochromatin polymorphism of chromosome 6 associated with recurrent miscarriage: A case report. 13th Balkan Congress of Human Genetics, Edirne, Turkey. 2019:187(Abstract Book). (Özet Bildiri/Poster)

B- Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Bildiriler

B1. ARSLAN ATES ESRA, GECKINLI BILGEN BILGE, KARAKAYA TANER, TURKYILMAZ AYBERK, SIMSEK HASAN, SOYLEMEZ MEHMET ALI, DELIL KENAN, ATA PINAR, GUNEY AHMET ILTER, ARMAN AHMET. Geç Tanı Almış Williams Sendromlu Üç Olgunun Klinik Değerlendirmesi. 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Medical Genetics (Official Journal of Turkish Society of Medical Genetics) (Abstracts of the 12th National Medical Genetics Congress of Turkish Society of Medical Genetics (with International Participation)). 2016;2(Supplement 1):144. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

B2. DELIL KENAN, TURKYILMAZ AYBERK, SIMSEK HASAN, KARAKAYA TANER, ARSLAN ATES ESRA, SOYLEMEZ MEHMET ALI, GECKINLI BILGEN BILGE, GUNEY AHMET ILTER, ATA PINAR, ARMAN AHMET. Nadir Görülen Bir Genetik Sendrom: Meacham Sendromu. 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Medical Genetics (Official Journal of Turkish Society of Medical Genetics) (Abstracts of the 12th National Medical Genetics Congress of Turkish Society of Medical Genetics (with International Participation)). 2016;2(Supplement 1):301. (Özet Bildiri/Poster)

B3. GECKINLI BILGEN BILGE, DELIL KENAN, SIMSEK HASAN, SOYLEMEZ MEHMET ALI, TURKYILMAZ AYBERK, ARSLAN ATES ESRA, KARAKAYA TANER, GUNEY AHMET ILTER, ATA PINAR, ARMAN AHMET. Silver-Russell Sendromlu bir olgu. 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Medical Genetics (Official Journal of Turkish Society of Medical Genetics) (Abstracts of the 12th National Medical Genetics Turkish Society of Medical Genetics (with International Participation)). 2016;2(Supplement 1):213. (Özet Bildiri/Poster)

B4. GECKINLI BILGEN BILGE, DELIL KENAN, TURKYILMAZ AYBERK, SOYLEMEZ MEHMET ALI, SIMSEK HASAN, KARAKAYA TANER, ARSLAN ATES ESRA, GUNEY AHMET ILTER, ATA PINAR, ARMAN AHMET. Chromosome 17p11.2 deletion in a Turkish girl with Smith-Magenis Syndrome. 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Medical Genetics (Official Journal of Turkish Society of Medical Genetics) (Abstracts of the 12th National Medical Genetics Congress of Turkish Society of Medical Genetics (with International Participation)). 2016;2(Supplement 1):223. (Özet Bildiri/Poster)

B5. KARAKAYA TANER, SOYLEMEZ MEHMET ALI, ARSLAN ATES ESRA, TURKYILMAZ AYBERK, SIMSEK HASAN, DELIL KENAN, GECKINLI BILGEN BILGE, ATA PINAR, GUNEY AHMET ILTER, ARMAN AHMET. Beckwith Wiedemann Sendromlu Olgunun Klinik Bulguları ve Moleküler Tanısı. 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Medical Genetics (Official Journal of Turkish Society of Medical Genetics) (Abstracts of the 12th National Medical Genetics Congress of Turkish Society of Medical Genetics (with International Participation)). 2016;2(Supplement 1):254. (Özet Bildiri/Poster)

B6. GECKINLI BILGEN BILGE, SIMSEK HASAN, DELIL KENAN, TURKDOGAN DILSAD, SAGER SAFIYE GUNES, SOYLEMEZ MEHMET ALI, ARSLAN ATES ESRA, TURKYILMAZ AYBERK, KARAKAYA TANER, GUNEY AHMET ILTER, AVSAR MELIKE, ATA PINAR, ARMAN AHMET. Nöromotor gelişme geriliği ve distonili Xq28 duplikasyon sendromu. 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Medical Genetics (Official Journal of Turkish Society of Medical Genetics) (Abstracts of the 12th National Medical Genetics Congress of Turkish Society of Medical Genetics (with International Participation)). 2016;2(Supplement 1):214. (Özet Bildiri/Poster)

B7. TURKYILMAZ AYBERK, SOYLEMEZ MEHMET ALI, ARSLAN ATES ESRA, SIMSEK HASAN, KARAKAYA TANER, DELIL KENAN, GECKINLI BILGEN BILGE, ATA PINAR, GUNEY AHMET ILTER, ARMAN AHMET. RAB3GAP1 Geninde Bilinen Bir Splice-Site Mutasyonunun Fonksiyonel Değerlendirmesi. 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Medical Genetics (Official Journal of Turkish Society of Medical Genetics) (Abstracts of the 12th National Medical Genetics Congress of Turkish Society of Medical Genetics (with International Participation)). 2016;2(Supplement 1):127-128. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

B8. SOYLEMEZ MEHMET ALI, TURKYILMAZ AYBERK, ARSLAN ATES ESRA, SIMSEK HASAN, KARAKAYA TANER, DELIL KENAN, GECKINLI BILGEN BILGE, ATA PINAR, GUNEY AHMET ILTER, ARMAN AHMET. Clinical Evaluation of a MDC1A Case Carrying LAMA2 Mutation. 12. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, Medical Genetics (Official Journal of Turkish Society of Medical Genetics) (Abstracts of the 12th National Medical Genetics Congress of Turkish Society of Medical Genetics (with International Participation)). 2016;2(Supplement 1):126. (Özet Bildiri/Sözlü Sunum)

B9. SILAN FATMA, KARAKAYA TANER, DINCISOY BİR FIRDEVŞ, ÖZDEMİR ÖZTÜRK. Çanakkale Populasyonunda HBB (Hemoglobin Subunit Beta) Geni Mutasyon Profilleri. 3. Hematolojik Genetik Sempozyumu. 2018:65(Özet Bildiri Kitabı). (Özet Bildiri/Poster)

B10. SILAN FATMA, YORUK YAYAR ÖZLEM, DINCISOY BİR FIRDEVŞ, KARAKAYA TANER, PAKSOY BARIS, ÖZDEMİR ÖZTÜRK. Loss of Heterozygosity (LOH) of the TBX18 and MRAP2 genes in a case with unilateral renal agenesis and central obesity. Erciyes Tıp Genetik Günleri 2018. 2018;40(2):74. (Özet Bildiri/Poster)

HOBİLERİ

1. Spor (Futbol, Basketbol, Voleybol, Atletizm, Hentbol, Yüzme ve Amatör Branşlar)
2. Satranç

