

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DİYARBAKIR BÖLGESİNDE G6PD ÖZELLİKLERİ BİLİNMEYEN
KİŞİLERDE G6PD CANTON, KAİPİNG VE GAOHE MUTANT
ALLELLERİNİN BELİRLENMESİ**

Kadir Sinan ASLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI




DİYARBAKIR

Haziran 2011

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Kadir Sinan ASLAN tarafından yapılan “Diyarbakır Bölgesinde G6PD Özellikleri Bilinmeyen Kişilerde G6PD Canton, Kaiping Ve Gaohe Mutant Allellerin Belirlenmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>	
Başkan: Prof. Dr.	M.Orhan AYYILDIZ	
Üye : Yrd. Doç. Dr.	H.Hakan İNCE	
Üye : Yrd. Doç. Dr.	Reyhan Gül GÜVEN	

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 20/06/2011

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../2011

Prof. Dr. Hamdi TEMEL
ENSTİTÜ MÜDÜRÜ
(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışma, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hematoloji Laboratuvarında yapılmıştır.

Çalışma süresince her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, bilgilerinden ve deneyimlerinden faydalandığım çok değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Yrd. Dr. H.Hakan İNCE'ye, çalışmalarımda desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. M.Orhan AYYILDIZ'a, kan örneklerini toplanmamda yardımlarını esirgemeyen hematoloji laboratuvarı çalışanlarına, çalışmalarım boyunca verdiği katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. M.Akif Çürük ve Sayın Uzman İsa Ünlükurt'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca bu çalışmayı bir proje (DÜBAB 08-EF-28) olarak destekleyen Dicle Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Birimine teşekkür ederim.

Çalışma sürem boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen çok sevdiğim nişanlıma ve aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IV
ABSTRACT.....	V
ÇİZELGE LİSTESİ.....	VI
ŞEKİL LİSTESİ.....	VII
KISALTMA VE SİMGELER.....	VIII
1. GİRİŞ	1
1.1. G6PD Enzim Eksikliğinin Dünyadaki Dağılımı.....	2
1.2. G6PD Enzimi.....	4
1.3. G6PD Enziminin Genetik Özellikleri.....	4
1.4. Pentoz Fosfat Yolu.....	6
1.5. Glutasyon Yolu.....	8
1.6. G6PD Enzim Eksikliğinin Kalıtımı.....	11
1.7. G6PD Enzim Eksikliği.....	12
1.7.1. Neonatal Sarılık.....	13
1.7.2. Favizm.....	13
1.7.3. Hemolitik Anemi.....	13
1.7.4. Kronik Nonsferositik Hemolitik Anemi.....	14
1.8. G6PD Varyantları.....	14
1.9. G6PD Eksikliğini Tanısı İçin Uygulanan Yöntemler.....	18
1.9.1. Kalitatif Floresan Spot Test.....	18
1.9.2. Kantitatif Spektrofotometrik Yöntem.....	19
1.9.3. PCR-RFLP.....	19
1.9.4. PCR-SSCP.....	19
2. KAYNAK ÖZETLERİ	21
3. MATERYAL ve METOT	27
3.1. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi ve Saklanması.....	27
3.2. Kan Örneklerinden DNA'ların Saflaştırılması.....	27
3.3. G6PD Canton, Kaiping ve Gaohe Mutant Allellerin Belirlenmesi	28
3.3.1 Real Time PCR.....	28

3.3.2	Real Time PCR Genel Kullanım Alanları.....	29
3.3.3	Real Time PCR’da Kullanılan Prob Sistemleri ve Boyalar.....	31
3.3.4	LightCycler 480® II Real Time PCR Cihazında Mutasyon Analizlerinin Yapılması.....	33
3.3.4.1.	Hazırlık Aşaması	33
3.3.4.2.	Mutasyon Belirleme Aşaması.....	34
4.	BULGULAR ve TARTIŞMA.....	39
5.	SONUÇ ve ÖNERİLER.....	47
6.	KAYNAKLAR.....	49
	ÖZGEÇMİŞ.....	67

ÖZET

DİYARBAKIR BÖLGESİNDE G6PD ÖZELLİKLERİ BİLİNMEYEN KİŞİLERDE G6PD CANTON, KAİPİNG VE GAOHE MUTANT ALLELLERİNİN BELİRLENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kadir Sinan ASLAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2011

Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz (D-glucose 6-phosphate: NADP⁺ oksidoredüktaz, EC 1.1.1.49; G6PD) pentoz fosfat yolunun ilk basamağını katalizleyen kilit bir enzimdir. Eritrositlerde NADPH oluşumu için tek kaynak pentoz fosfat metabolik yolu olup, G6PD eksikliğinde NADPH üretimi önemli ölçüde azalmaktadır. G6PD eksikliği, X'e bağlı ve resesif olarak geçiş gösteren bir hastalıktır. Bu hastalığın dünyada oldukça geniş yayılımı olup, 400 milyondan fazla insanı etkilemektedir. Böyle bir yaygınlığa sahip enzimin, değişik kinetik özellik gösteren 400'ün üzerinde varyantı olduğu bildirilmektedir. G6PD enzimi eritrositteki indirgenmiş glutatyon düzeyinin devamlılığını sağlamak için gereklidir. Böylece bu hücreler oksidatif strese karşı korunmuş olur. G6PD enzim eksikliği enfeksiyonlar sırasında bazı ilaçların kullanımıyla, yenidoğan dönemde, bakla tüketimiyle ve stres koşullarında hemolitik anemiyle sonuçlanabilir.

Bu çalışmada G6PD özellikleri önceden bilinmeyen kişilerden tam kan örnekleri alınmıştır ve bu kanlar içerisindeki DNA'lar DNA saflaştırma kitleri kullanılarak izole edilmiştir. G6PD genotipleri Real Time PCR ve G6PD mutasyon kitleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, elektroforetik olarak incelenebilen enzim eksikliği ile ilişkili varyantlara rastlanmamıştır.

Anahtar Kelimeler: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, G6PD, Hemolitik anemi, PCR, Real Time PCR, Mutasyon

ABSTRACT

G6PD PROPERTIES UNKNOWN PEOPLE IN DIYARBAKIR DETERMINE OF THE MUTANT ALLELES G6PD CANTON, KAIPING AND GAOHE

MSC THESIS

Kadir Sinan ASLAN

DEPARTMENT OF BIOLOGY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2011

Glucose 6-phosphate dehydrogenase (D-glucose 6-phosphate: NADP⁺ oxidoreductase, EC 1.1.1.49; G6PD) is the key enzyme which catalyzes first step of pentose phosphate metabolic pathway. Unique source of NADPH in erythrocyte is the pentose phosphate metabolic pathway and synthesis of NADPH decreases in G6PD deficiency. G6PD deficiency is disease inherited X-linked recessive. This disease is the most common human enzyme defect, being present in more than 400 million people worldwide. In turn, the enzyme displays nearly 400 variants, showing different kinetic properties. G6PD enzyme is necessary to maintain to reduced glutathione level in erythrocytes. Thus these cells are protected against oxidative stress. The deficiency of G6PD deficiency may result in hemolytic anemia due to drug toxication, infections during the neonatal period, consumption of beans and stress conditions.

In this study, blood samples were taken from people previously unknown properties of G6PD and the blood in the DNA was isolated using DNA purification kits. G6PD genotypes were determined using real time PCR kits for the G6PD mutation. G6PD genotypes were determined by using Real Time PCR and G6PD mutation kits. In this study, electrophoretic variants related with enzyme deficiency were not observed.

Keywords: Glukoz-6-phosphate dehydrogenase, G6PD, Hemolytic anemia, PCR, Real Time PCR, Mutation

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 1.1	Türkiye’de bulunmuş olan G6PD varyantları	3
Çizelge 1.2.	G6PD’nin moleküler özellikleri	5
Çizelge 1.3.	G6PD enzim eksikliğinin dünyada yaygın varyant ve mutasyonlarının dağılımı	18
Çizelge 3.	ROCHE MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I	28
Çizelge 3.1.	Hazırlık Aşaması	34
Çizelge 3.2.	Reaksiyon Karışımı Hazırlanması	34
Çizelge 3.3.	LightCycler 480® II cihazının ayarlanması	35

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	G6PD Enzim Eksikliğinin Dünyadaki Dağılımı	3
Şekil 1.2.	G6PD Geninin Şematik Gösterimi	4
Şekil 1.3.	G6PD Enziminin Dimer Yapısı	5
Şekil 1.4.1.	Pentoz Fosfat Yolu.	7
Şekil 1.4.2.	Pentoz fosfat yolunun oksidatif ve non-oksidatif gösterimi	8
Şekil 1.5.1.	Glutasyonun yapısı	8
Şekil 1.5.2.	Glutasyon yolu	9
Şekil 1.5.3.	PFY ve Glutasyon yolu ile Hemoliz mekanizması	10
Şekil 1.6.	X kromozomuna bağlı resesif kalıtım gösteren aile ağacı	11
Şekil 1.8.1.	G6PD Varyantlarının Dünyadaki Dağılımı	16
Şekil 1.8.2.	İnsan G6PD geni	17
Şekil 3.1.	ROCHE MagNA Pure Compact Cihazı	27
Şekil 3.2.	LightCycler® 480 II Real Time PCR cihazı	31
Şekil 3.3.	LightCycler® 480 II Örnek erime eğrisi grafiği	31
Şekil 3.4.	Simple Probe Format (a)	32
Şekil 3.5.	Simple Probe Format (b)	32
Şekil 3.6.	Simple Probe Format (c) (Melting Curve Analysis)	33
Şekil 3.7.	LightSNiP rs72554665 (1376 G>T>C arg459leu ve arg459pro mutasyonlarının kitinin Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm değerleri	36
Şekil 3.8.	LightSNiP rs72554664 (1388 G>A (arg463his) mutasyon kitinin Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm değerleri	37
Şekil 4.1.	LightSNiP rs72554665 (1376 G>T>C arg459leu ve arg459pro mutasyonlarının kitinin Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm değerleri	41
Şekil 4.2.	LightSNiP rs72554664 (1388 G>A (arg463his) mutasyon kitinin Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm değerleri	42
Şekil 4.3.	Çalışmada bulunan Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm değerleri	43

KISALTMA VE SİMGELER

EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikası
Gd A ⁻	: A ⁻ tipi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz varyantı
Gd A ⁺	: A ⁺ tipi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz varyantı
Gd Akdeniz	: Akdeniz tipi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz varyantı
Gd B	: B tipi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz varyantı
G6P	: Glikoz 6-Fosfat
G6PD	: Glikoz 6-Fosfat Dehidrogenaz
GSH	: Redükte Glutatyon
GSSG	: Oksitlenmiş Glutatyon
H ₂ O ₂	: Hidrojen Peroksit
HMP	: Heksoz Mono Fosfat
MgCl ₂	: Magnezyumdiklorür
NAD	: Nikotinamid adenin dinükleotit
NADP	: Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NADPH	: Redükte Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PFY	: Pentoz Fosfat Yolu
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS	: Reactive oxygen species
-SH	: Tiyol Grubu
SNP	: Single Nucleotid Polymorphism
SSCP	: Single Strand Conformational Polymorphism
T _m	: Melting Temperature

1. GİRİŞ

Hemolitik anemilerle paralel giden eritrosit enzim eksiklikleri ilk kez Glikoz 6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzim eksikliğinin tanımlanmasıyla gündeme gelmiştir. Dünyada en sık görülen ve hemolitik anemiye neden olan G6PD enzim eksikliği, eritrositlerde tanımlanmış olan 15 enzim defekti içinde klinik açıdan en önemlisidir (Sodeman 1985).

G6PD enzim eksikliği en yaygın enzimopatilerden birisidir. 1950’li yıllarda G6PD enziminin X kromozomuyla kalıtıldığı saptanmış ve 1960’lı yılların başlarında ise enzimin çeşitli elektroforetik varyantları gösterilmiştir. G6PD enziminin değişik özellikler gösteren 400’ün üzerinde varyantının olduğu bulunmuştur (Vulliamy ve ark.1988). Ayrıca Human Gene Mutation Database (AGMD) verilerinde G6PD enzim eksikliğinin 150 tane mutasyonu belirtilmiştir (AGMD 2010).

G6PD enzim eksikliğine 1950’li yıllarda *primakin* denen sıtma ilacının alınımından sonra hemolitik kriz geçiren hasta grubunda ilk defa tanımlanmıştır (Schloff ve ark. 1999). G6PD’nin ilk defa primakin kullananlarda belirlenmesinden dolayı bu genetik eksiklik önceleri “*primakin duyarlılığı*” ismini almıştır. Daha sonra Fava fasulyesinin (Fava beans; *Vicia fava*) yenilmesi ile de ortaya çıktığı için de bu enzim eksikliğine *favizm* de denilmektedir (Persico ve ark.1986, Beutler ve ark. 1991)

G6PD eksikliğe sahip hastalarda bazı ilaçlar, yiyecekler ve enfeksiyonla hücre için tehlikeli olan serbest radikallerin aşırı üretimi hemolitik krize neden olmaktadır (Schloff ve ark. 1999, Mehta ve ark.2000).

Genel olarak ülkemizin Doğu Anadolu ve Güney bölgelerinde görülen bu enzim eksikliğinden dolayı meydana gelen sağlık sorunları önemli hale gelmiştir. Bir Akdeniz ülkesi olmamız ve G6PD eksikliğinin Akdeniz ülkelerinde çok fazla görünmesinden dolayı bölgemizin de ne derecede etkilendiğinin belirlenmesi gereğini doğurmuştur.

Diyarbakır’da bugüne kadar G6PD enzim eksikliği üzerinde çalışma yapılmamış olması ve enzim eksikliğine neden olan mutasyonlarının moleküler düzeyde araştırılmaması bizim bu eksikliğin bölgemizdeki dağılımını belirlemeye yöneltmiştir.

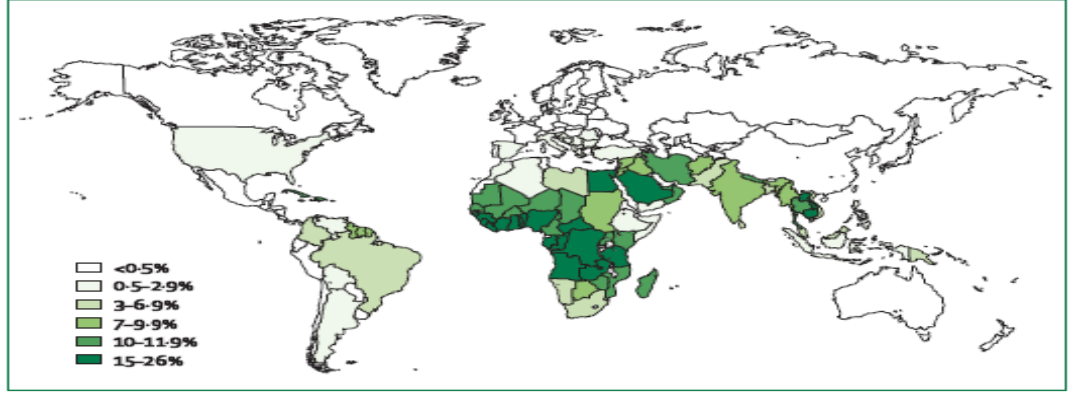
Geniş bir alana yayılım gösteren G6PD enzim eksikliğinin yol açtığı sağlık sorunlarının önlenebilir olması, Diyarbakır bölgesinde G6PD enzim eksikliğine yol açan varyantların moleküler temelini bilinmemesi ve bölgemizdeki mutasyonların belirlenmesi amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Bölgemizdeki mutasyonların tespiti ile dünya G6PD enzim eksikliği mutasyon haritasının tamamlanmasına katkı sağlayacağı düşünülmüştür. Ayrıca bu çalışmayla bölgemizdeki yaşayan insanların başka illere gitmesine gerek kalmayacağına ve bölge ekonomisine katkı sağlamasının yanı sıra yeni doğan çocuklarda yapılacak çalışmalara da katkı sunacağına inanmaktayız.

Bu düşünceden hareket ederek mutasyonlarının varlığının tespiti için, Dicle Üniversitesi Hematoloji Kliniği'ne G6PD özellikleri bilinmeyen rastgele başvuran 96 kişinin rızaları alınarak 2 ml kan alınıp genel tarama yapılmıştır ve bu kanlar içerisindeki DNA'lar DNA saflaştırma kitleri (ROCHE MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I) kullanılarak izole edilmiştir. G6PD genotipleri de Real Time PCR ve G6PD mutasyon kitleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu yöntemin kullanım amacı; mevcut mutasyonların kısa sürede tespitini yapılabilmesi ve olası yeni varyantların keşfedilmesinin de mümkün olacağı düşüncesidir. Böylelikle bölgemizdeki mutasyonların insidansını belirleyebileceğiz.

1.1. G6PD Enzim Eksikliğinin Dünyadaki Dağılımı

G6PD enzim eksikliğinin dünyada 400 milyondan fazla insanı etkileyen ve en fazla rastlanılan eritrosit enzim eksikliğidir (Wolfe ve ark.2006).

G6PD enzim eksikliği Akdeniz ülkelerinde, Afrika'da, Ortadoğu'da, Güneydoğu Asya'da, Kafkas halklarında ve onların soylarından gelenlerde görülmektedir (Leurence ve ark. 1997, Kayaalp 2000). Yunanlılar, Çinliler, Filipinliler, Endonezyalılar, İspanyol Yahudileri ve Hintliler'de de G6PD enzim eksikliğinin % 5-40 oranında görüldüğü belirtilmiştir (Cotron ve ark. 1999). G6PD enzim eksikliğinin dünyadaki dağılımı şekil 1.1. de gösterilmiştir (WHO 1989).



Şekil 1.1. G6PD enzim eksikliğinin dünyadaki dağılımı (WHO 1989).

Türkiye’de ise G6PD enzim eksikliğinin Çukurova ve Van’ın Başkale ilçesinde daha çok görüldüğü belirtilmiştir. Ayrıca Eti Türklerinde % 11.4, Çukurova bölgesinde % 8.2, Kıbrıslılarda % 3.5 oranında G6PD eksikliği tespit edilmiştir (Tamer ve ark.1998). Yüreğir ve arkadaşlarının (1987) yaptığı çalışmalarda Tarsus ve Hatay yöresinde enzim eksikliğini % 17 oranında bulmuşlardır. Türkiye’de bulunmuş olan G6PD varyantları Çizelge 1.1 de verilmiştir (Yalın ve ark. 1987, Aksoy ve ark. 1987, Aksoy 1990).

Çizelge 1.1.’de Türkiye’de bulunmuş olan G6PD varyantları

Varyant	Yıl	Yazar
G6PD B-	1967	Berkal
G6PD B -	1973	Altay
G6PD-Ankara	1975	Kohn
G6PD-Tarsus	1976	Gahr
G6PD-Antalya	1979	Sipahioğlu
G6PD-Mersin	1981	Akoğlu
G6PD-Samandağ	1987	Aksoy
G6PD-Balcalı	1987	Aksoy
G6PD-Adana	1987	Aksoy
G6PD-Antakya	1988	Aksoy
Isıya dayanıklı G6PD	1988	Aksoy
G6PD-Hacettepe	1989	Kuş
G6PD-Korkuteli	1989	Alicıgüzel
G6PD-Aksu	1989	Alicıgüzel
G6PD-Serik	1989	Yücel
G6PD-Çorum	1989	Kuş
Gal6P-kullanımı yüksek	1989	Dikmen
G6PD-Siirt	1992	Dikmen

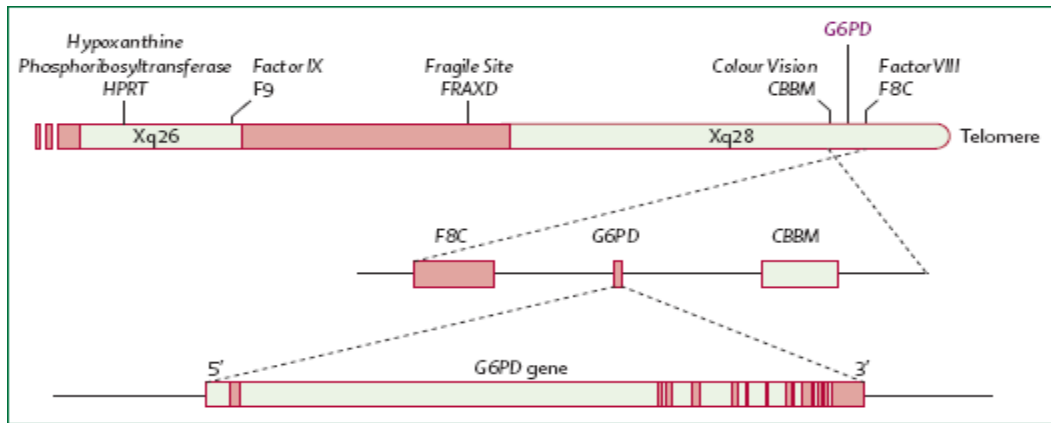
1.2. G6PD Enzimi

G6PD enzimi, pentoz fosfat yolunda rol oynayan ilk ve kilit enzimdir (Persico ve ark.1986). G6PD enzimi daha çok sitoplazmada bulunuyorsa da peroksisom, endoplazmik retikulum, lizozom, kloroplast ve mitokondri gibi çeşitli organellerde de bulunduğu saptanmıştır (Antonenkov 1989).

Bakteri, protozoa, mantar, sinek, balık ve memelilerin de içinde bulunduğu geniş bir canlı topluluğunda bulunan G6PD enzimine geniş bir canlı topluluğunda bulunmasından dolayı “*ubiquitous*” enzim de denilmektedir. Ayrıca enzim üstlendiği biyokimyasal rolden dolayı da yaşam için gerekli anlamına gelen “*housekeeping*” enzim olarak ta adlandırılmıştır (Persico ve ark.1986, De Angioletti ve ark.2001).

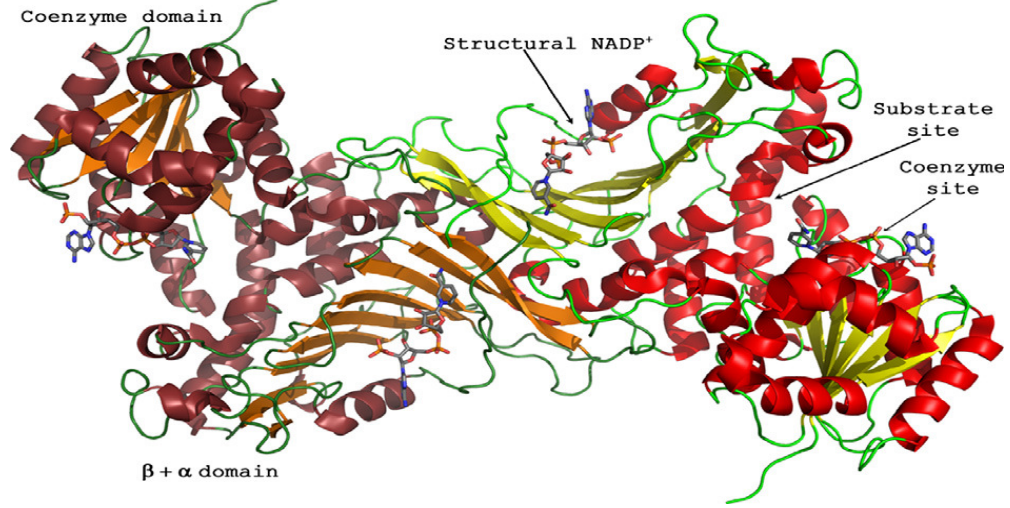
1.3. G6PD Enziminin Genetik Özellikleri

G6PD enziminin yapısını oluşturan G6PD geni, X kromozomunun uzun kolu üzerinde q28 bölgesinde bulunmaktadır. Bu gen 20114 baz çifti (bç) uzunluğunda olup, 12 intron ve 13 exondan oluşmaktadır. 3. exon 38 bç’den oluşan en kısa exondur. En uzun exon ise 771 bç’den oluşan 13. exondur. Genin sadece 2. intronu 300 bç çiftinden uzundur ve 11 kb (kilobaz) uzunluğundadır. NADP⁺ enzimde 386. ve 387. aminoasitlere bağlanır (Persico ve ark.1986, Chen ve ark. 1991). G6PD geninin X kromozomundaki bulunduğu yer Şekil 1.2. de şematik olarak gösterilmiştir (Szabo ve ark. 1984, Trask ve ark. 1991).



Şekil 1.2. G6PD Geninin Şematik Gösterimi. HPRT: Hiposantin Quanin Fosforibozil Transferaz, Faktör VIII-IX F8C: Hemofili, Fragile site FRAXD: Fragile, Colour Vision CBBM: Renkli görme (Szabo ve ark. 1984, Trask ve ark. 1991)

G6PD enziminin dimer yapısında 2 koenzim ve 2 substrat bağlanma bölgesi bulunmuştur. Enzimin dimer yapısı Şekil 1.3.'te gösterilmiştir (Au ve ark. 2000, Kotaka ve ark. 2005).



Şekil 1.3. G6PD Enziminin Dimer Yapısı (Au ve ark. 2000, Kotaka ve ark.2005)

G6PD enziminin fonksiyonunu belirleyen G6PD geninin kodladığı mRNA aminoasit dizisi ve büyüklüğüdür. G6PD geni 18.5 kb ve genin kodladığı mRNA ise 2269 bç uzunluğundadır (Luzatto 1987, Beutler ve ark. 1995). G6PD geninin kodlama dizilimi 1545 baz çifti uzunluğunda olup 515 aminoasitlik G6PD proteinini meydana getirmektedir. G6PD enziminin aktif formu her biri 59.265 kDa molekül ağırlığa sahip 2 veya 4 aynı alt birimden oluşmaktadır. İnsan G6PD enziminin moleküler özellikleri Çizelge 1.2.'de gösterilmiştir (Luzatto 1995).

Çizelge 1.2. G6PD'nin moleküler özellikleri (Luzatto 1995)

DNA	
Gen uzunluğu	18.5
Ekzon sayısı	13
İntron sayısı	12
mRNA	
Nükleotit sayısı	2269
5' kodlanmayan bölge	69
Kodlanan bölge	1545
3' kodlanmayan bölge	655
Protein	
Aminoasit dizisi	515
Moleküler ağırlık	59.265
Aktif enzim moleküllerinin subünite sayısı	2 veya 4
Her subünitedeki NADP'ye bağlanan molekül sayısı	1

Enzimin molekül ağırlığı mikrobiyal türlerde 50-60 kDa, memelilerde 58-67 kDa arasındadır. Enzimin insandaki molekül ağırlığı ise 59 kDa'dur. G6PD enziminin dimerik veya tetramerik yapısı genelde aktif olan yapılarıdır. Bu aktif formlarını sıcaklık, NADP⁺, NADPH gibi çeşitli faktörler etkilemektedir. Düşük pH ve iyonik kuvvet enzimin tetramer, yüksek pH ve iyonik kuvvet de enzimin dimer yapı oluşumuna neden olmaktadır (Levy 1979).

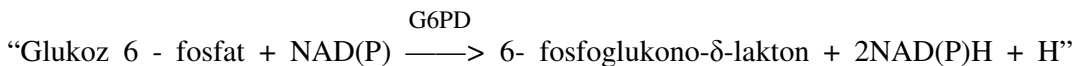
1.4. Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz fosfat yolunun ilk ve kontrol enzimi G6PD (EC 1.1.1.49)'dir (Mehta ve ark. 2000). Temel görevi NADPH'ları üretmek olan pentoz fosfat yoluna heksoz monofosfat yolu (HMP) da denilmektedir. Üretilen NADPH'lar genellikle, indirgenmiş glutatyon, steroidler, birtakım aminoasitler, yağ asitlerinin sentezi ve DNA sentezi için ribonükleotidlerin deoksiribonükleotidlere dönüşmesi gibi birçok reaksiyonda kullanıldığı bildirilmiştir (Scot ve ark. 1991, Yalın ve ark. 2001, Nelson ve Cox 2005, Özmen ve ark.2005).

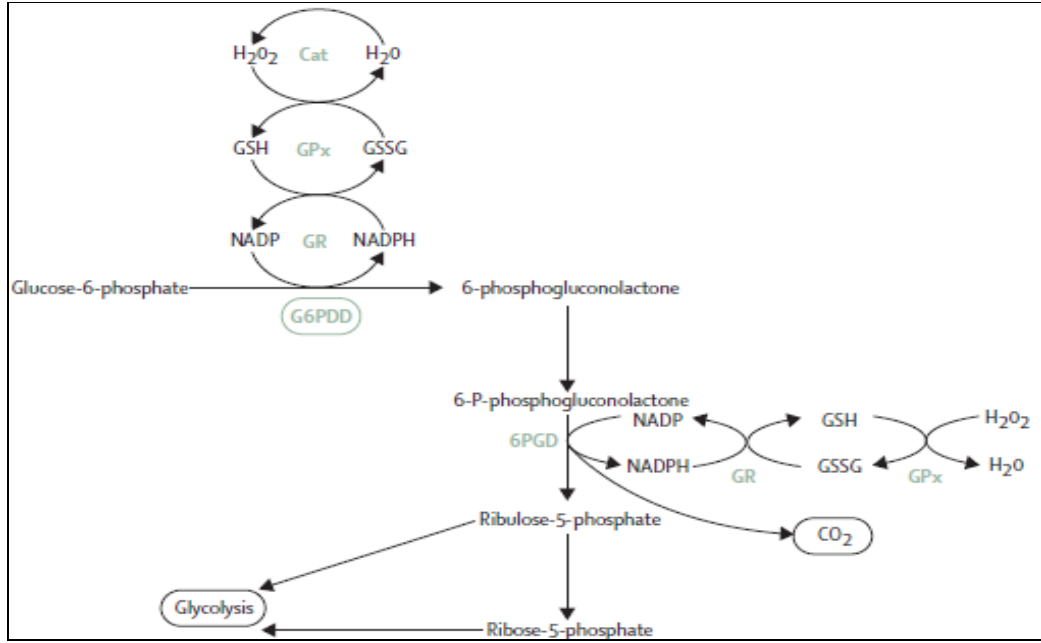
Eritrositlerde NADPH oluşumu için tek kaynak pentoz fosfat yoludur ve G6PD eksikliğinde NADPH üretimi azalacağı belirtilmiştir (Telefoncu 1989). Hücreyi iç ve dış kaynaklı toksik bileşiklerden ve reaktif oksijen türlerinden (ROS), redükte glutatyon (GSH) ve GSH'a bağımlı enzimlerin koruduğu belirtilmiştir (Siems 2000). HMP yolunda üretilen NADPH'ın eritrositlerdeki en önemli rolü oksitlenmiş glutatyonu (GSSG) indirgenmiş glutatyon haline dönüştürmektir (Şekil 1.4.1.). Glutatyon redüktaz enzimi tarafından bu reaksiyon katalizlenir (Telefoncu 1989).

Fagositlerde oksijen tüketimi ve H₂O₂ oluşumu fazla olduğundan PFY'nun aktivitesi de yüksektir (Hollenberg 1992). Normal eritrositlerde daima glukozun % 90'ı aerobik glikolizle yıkılırken, % 10 luk bir kısmı da HMP fosfat yoluyla metabolize edilir ve NADPH'lar elde edilmiş olur (Weksler ve ark. 1990, Fairbanks ve ark. 1994).

Glukoz-6-fosfatın 1 nolu karbonunun dehidrogenasyonu ile pentoz fosfat yolu başlar. G6PD enzimi tarafından bu reaksiyon katalizlenir. Reaksiyon sonucu 6-fosfoglukano δ-lakton oluşur.



Devam eden basamakta 6-fosfoglukano δ -lakton'un laktanaz enzimi katalizörlüğünde 6-fosfoglukonat oluşur. Oluşan bu 6 karbonlu şeker daha sonra oksidatif dekarboksilasyonla ribulaz-5 fosfata dönüşür. Bu reaksiyonda koenzimi NADP^+ olan 6-fosfoglukonat dehidrogenaz enzimi görev alır. Sonuç olarak pentoz fosfat yolu reaksiyonlarında bir glukoz molekülünden 2 NADPH ve 1 riboz 5-fosfat oluşmaktadır (Beutler ve ark.1991, Nelson 2005). Pentoz fostat yolu Şekil 1.4.1.'de gösterilmiştir(Luzatto ve ark.2001).

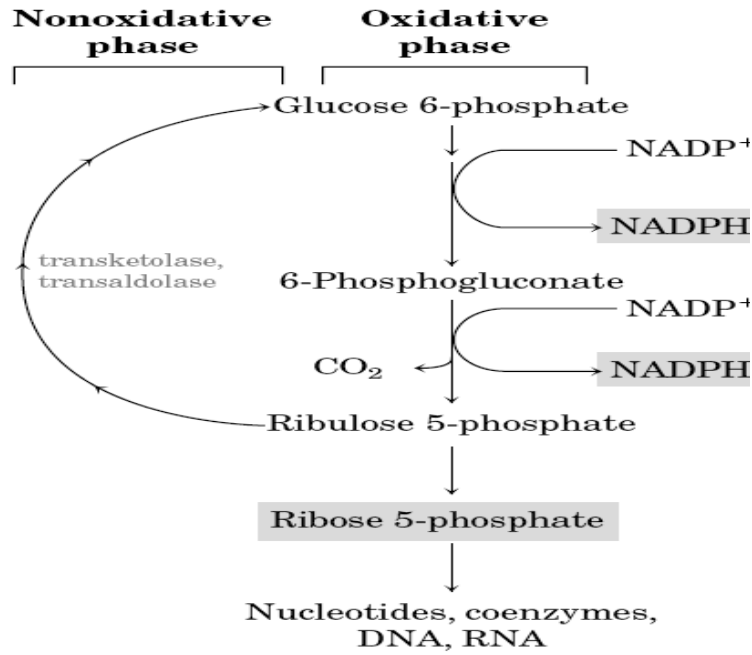


Şekil 1.4.1. Pentoz fosfat yolu. Cat: Katalaz, GPx: Glutasyon peroksidaz, GR: Glutasyon redüktaz, G6PDD: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz, 6PGD: 6-fosfoglukonat dehidrogenaz, GSH: Redükte glutasyon, GSSG: Okside glutasyon (Luzatto ve ark.2001)

Bu olayın total reaksiyonu;



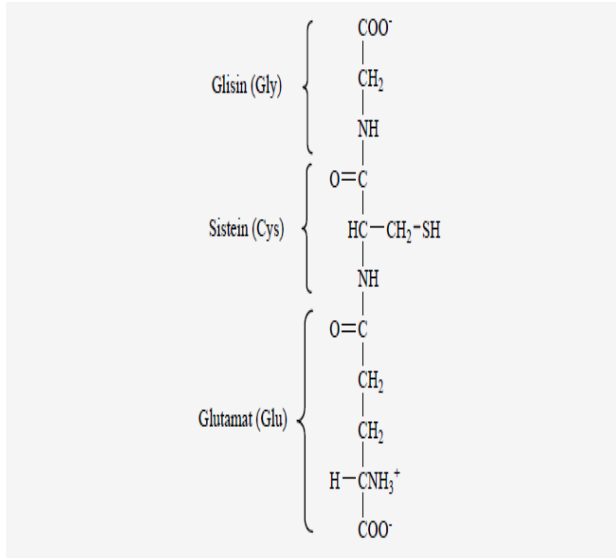
Pentoz fosfat yolu oksidatif ve non-oksidatif olarak 2 yoldan gerçekleşir. Oksidatif fazın son ürünü riboz-5 fosfattır ve birçok dokuda yol burada noktalanır. Oluşan riboz 5 fosfat nükleotit sentezinde görev alır. Primer ihtiyacı, NADPH olan eritrositlere benzer dokularda ise non-oksidatif fazda riboz-5 fosfattan önceki ara ürün riboloz 5-fosfat ise transketolaz ve trans aldolaz enzimleriyle yeniden glukoz 6 -fosfata katalizlenir. Şekil 1.4.2.'de pentoz fosfat yolunun oksidatif ve non-oksidatif yolu gösterilmiştir (Nelson 2005).



Şekil 1.4.2. Pentoz fosfat yolunun oksidatif ve non-oksidatif gösterimi(Nelson 2005).

1.5. Glutasyon Yolu

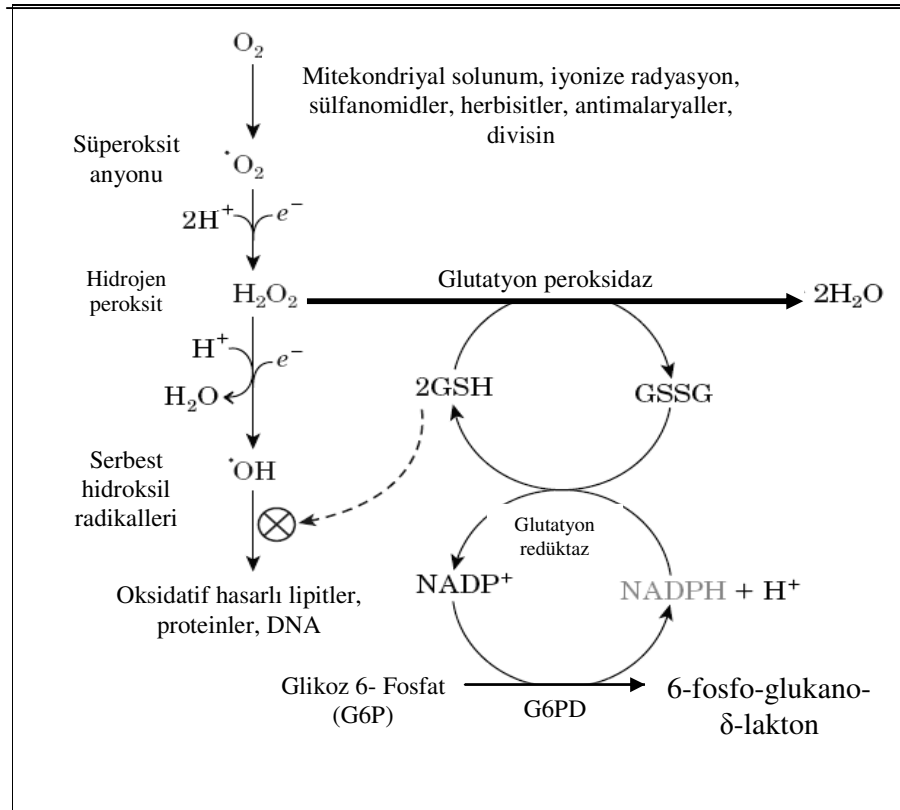
Glutasyon (GSH); glutamat, glisin ve sistein aminoasitlerden oluşan, kolay bir şekilde hidrojen verebilen düşük molekül ağırlıklı bir tripeptittir. Glutasyonun bu üçlü yapısı şekil 1.5.'de gösterilmiştir (Champe 1997).



Şekil 1.5.1. Glutasyonun yapısı (Champe 1997)

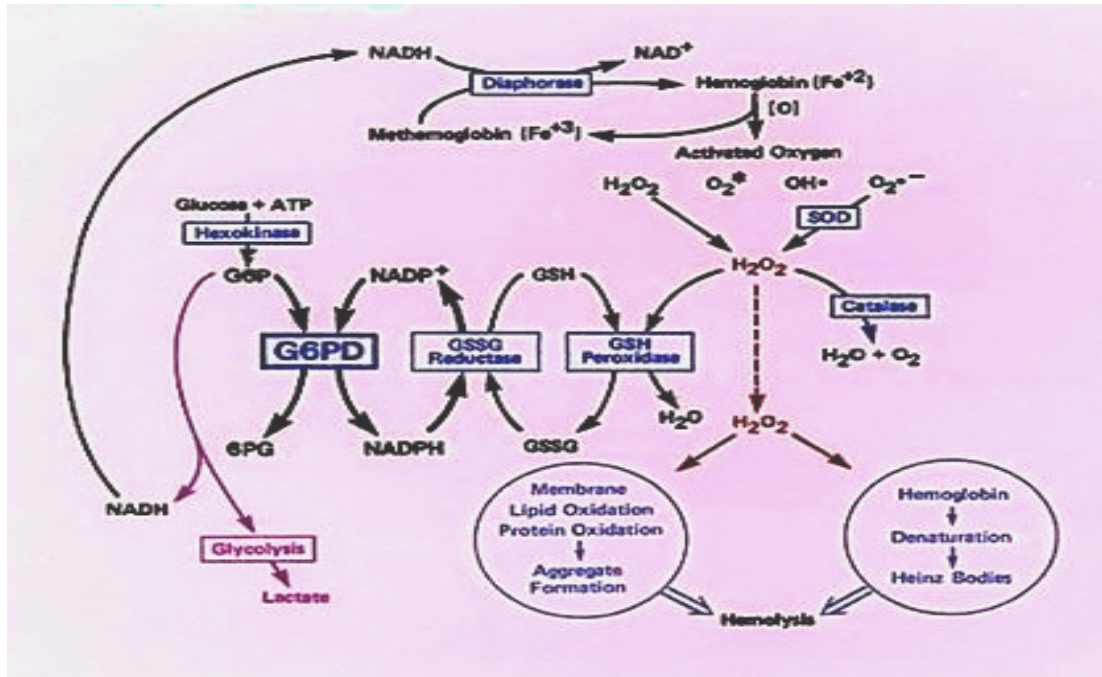
Glutatyonun; DNA ve protein sentezi, enzim aktivitelerinin düzenlenmesi, hücre içi ve dışı transportlar gibi hücresel faaliyetlerinin dışında antioksidan olarak hücre savunmasında da önemli bir rolü vardır. İndirgenmiş glutatyon (GSH) yapısında bulunan aminoasitlerin içerdiği tiyol grubu (-SH) aracılığıyla hücreyi oksidatif hasarlardan korur. Glutatyon peroksidaz (GPx) enzimin katalizörlüğünü yaparak hidrojen peroksidi (H_2O_2) metabolize eder (Meister ve Anderson 1983, Deneke ve Fanburg 1989, Ambrosio ve ark.1992, Meister 1994).

Hidrojen peroksidin (H_2O_2) ve diğer peroksitlerin glutatyon peroksidazın etkisiyle etkisiz duruma getirilmesi sırasında GSH yükseltgenir ve GSSG haline dönüşür. GSSG glutatyon aracılığıyla indirgenerek yeniden kullanılabilir hale dönüşmesi için de NADPH gerekmektedir. Glutatyon yolu Şekil 1.5.2 de gösterilmiştir (Scot ve ark. 1991, Izawa v ark. 1998, Bilmen ve ark. 2001, Çiftçi ve ark. 2001, Özmen ve ark. 2005).



Şekil 1.5.2. Glutatyon yolu (Nelson ve Cox 2005).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda çeşitli stres modellerinin reaktif oksijen ürünlerinin (ROS) oluşumunu hızlandırdığı gözlenmiştir. ROS'un oluşturduğu oksidatif hasar oksidatif stres olarak tanımlanmıştır (Das ve Banerjee 1993, Goldin ve ark. 1997). Hücre yüksek miktarda oksidana maruz kaldığında, yükseltgenmiş glutatyon (GSSG) oluşumu sınır düzeyini aşmakta ve oksidatif stres meydana gelmektedir. Detoksifiye (toksinlerden arındırma) olamayan oksidanlar membran lipidlerinin ve çeşitli hücrelerin fonksiyonel ve yapısal proteinlerinin bozulmasına sebep olmaktadır. Çeşitli oksidatif ajanlardan kaynaklanan H_2O_2 , süperoksit anyonu O_2^- ve serbest hidroksil radikalleri hücre için çok toksiktir (Cochrane 1991, Ambrosio ve ark.1992). Ayrıca glutatyonun eritrositlerde hemoglobinin yapısındaki demirin (Fe^{+2}) indirgenmiş halde tutulmasında da rolü bulunmaktadır. Fonksiyonel olmayan methemoglobinin yapısındaki yükseltgenmiş demirin (Fe^{+3}) indirgenmesi sırasında glutatyon tüketilmektedir. Bu nedenle eritrositler indirgenmiş glutatyonla çok fazla gereksinim duymaktadırlar (Szweda ve Stadtman 1992). Eritrositlerdeki görevi glutatyonu indirmek olan NADPH'ın üretimi G6PD eksikliğinde önemli ölçüde azalır. Hemolize neden olan maddelerin G6PD eksikliği olan kişilere verilmesi durumunda o maddelerin kendisi veya metabolitleri hemolize karşı dayanıklılığı sağlayan GSH'yi oksitleyerek inaktive ederler. Bunun neticesinde eritrositlerde hemoliz meydana gelir (Şekil 1.5.3).

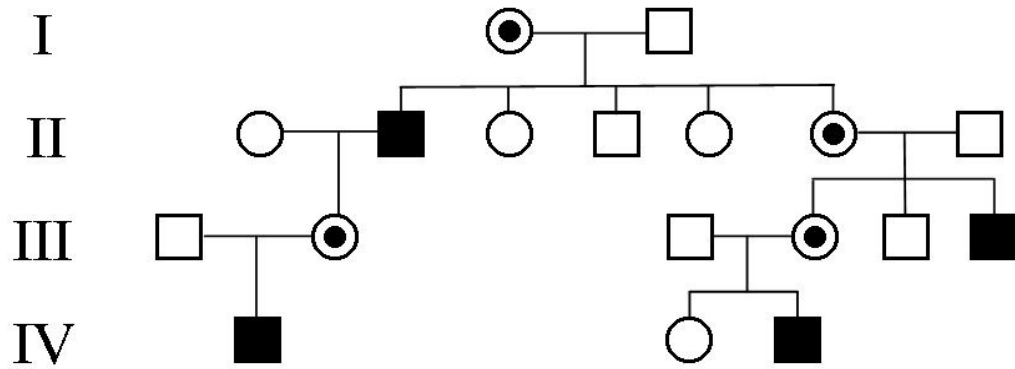


Şekil 1.5.3. PFY ve Glutatyon yolu ile Hemoliz mekanizması (Szweda ve Stadtman 1992).

Eritrosit GSH düzeyi hemoliz oluşumundan hemen önce azalır ve GSSG artış gösterir. Hücre içi toplam GSH miktarı GSSG'nin hücreden dışarı çıkmasıyla azalmaktadır. Eritrositlerin membranlarında bulunan sülfidril gruplarının oksidasyonu membranın fonksiyonunu bozar ve dalakta, daha da ağır durumlarda karaciğerde eritrositlerin erken yıkımına neden olduğu bulunmuştur (Sodeman 1985).

1.6. G6PD Enzim Eksikliğinin Kalıtımı

G6PD enzim eksikliği X kromozomuna bağlı resesif geçiş gösteren bir enzim eksikliği olarak tanımlanmıştır. Buna göre G6PD enzim eksikliğine sahip erkekler hemizigot normal (Gd^+) veya hemizigot yetmezlikli (Gd^-) ; dişiler ise homozigot normal (Gd^+/Gd^+), homozigot yetmezlikli (Gd^-/Gd^-) veya heterozigot yetmezlikli (Gd^+/Gd^-) olabilirler. Dişi bireyler iki X kromozomu taşıdıklarından dolayı hastalığın ortaya çıkabilmesi için dişi bireylerin her iki mutant X kromozomunu da taşımaları gereklidir. Erkeklerde ise tek X kromozomu olduğundan resesif karakterli mutasyon fenotipik olarak kendini gösterebilmektedir. Bu nedenle X kromozomuna bağlı resesif hastalıklar genellikle erkeklerde görülür. Bu erkeklerin anneleri taşıyıcıdır. Hasta bir baba erkek çocuklarına sadece Y kromozomunu vereceğinden, hastalığı erkek çocuklarına geçirmez ama kız çocuklarına zorunlu olarak mutant geni taşıyan X kromozomunu vereceğinden, böyle bir babanın tüm kız çocukları taşıyıcı olacaklardır. Bu kız çocukları ise taşımakta oldukları mutant geni kendi erkek çocuklarına % 50 olasılıkla geçirecekler, kız çocukları ise % 50 olasılıkla normal, % 50 olasılıkla taşıyıcı olacaklardır. X kromozomuna bağlı resesif kalıtım gösteren bir aile ağacı Şekil 1.6.'da gösterilmiştir (Apak ve Semerci 2005).



Şekil 1.6. X kromozomuna bağlı resesif kalıtım gösteren aile ağacı(Apak ve Semerci 2005)

X kromozomuna bağlı resesif kalıtımda kız çocuklarının hasta olabilmesi için, mutant geni hem anneden hem de babadan alması, bunun için de babanın hasta, annenin ise taşıyıcı olması gereklidir. X kromozomuna bağlı resesif hastalığın kız çocuklarında görölmesini açıklayan diğer bir durum ise Lyon hipotezidir (Vulliamy ve ark. 1996). Bu hipoteze göre;

- Dişi bireylerde bulunan iki X kromozomundan sadece biri aktif diğeri inaktiftir.
- Embriyonun erken gelişim aşamalarında iki X kromozomunun hangisinin aktif kalacağı rastgele tayin edilir.
- Aynı inaktif X kromozomu taşıyan her bir hücrenin çoğalmasında X kromozomu inaktif kalır.

X kromozomunda G6PD eksiklik geni taşıyan erkek klinik bulgu verir ve hemizigot G6PD yetmezlikli olarak tanımlanır. Dişi bireylerde XX genotipi normal, X-X⁻ genotipi homozigot ve X-X genotipi heterozigot G6PD yetmezlikli olarak tanımlanırlar. Heterozigot yetmezlikli dişiler az veya çok klinik etki gösteren yetmezlikli hücrelere sahiptirler. Dişilerin tüm hücrelerinde sadece bir X kromozomunun aktif olmasından dolayı dişi heterozigotlar normal (sağlıklı) ve enzim eksikli olmak üzere iki eritrosit popülasyonuna sahiptirler (Battistuzzi ve ark 1985, Beutler 1994, Hansen ve ark. 1996, Gürbüz 2003, Yan ve ark. 2006, Guindo ve ark. 2007).

1.7. G6PD Enzim Eksikliği

1950'li yılların başlarında ilk olarak Amerikalı zencilerde antimalaryal ilaçların araştırılması esnasında ortaya çıkan hemolitik tablolar ile G6PD yetmezliği tanımlanmıştır. İlerleyen çalışmalarda da Akdeniz yöresinde bu eksikliğin yaygın olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Bu bölgelerin bir diğer ortak özelliği sıtma hastalığının görüldüğü bölgeler olması ve G6PD yetmezlikli bireylerin de sıtmaya karşı dirençli olmalarıdır (Beutler 1994, Martini ve Ursini 1996, Luzatto 1999, Pietropetrosa ve ark. 2001). G6PD enzim eksikliğinin plazmodiumlara karşı dayanıklılık sağlaması ile ilgili bir seleksiyon olayına bağlı olduğu ileri sürülmüştür (Kayaalp 1998). *P.falciparum*'a karşı immünite gelişiminde G6PD eksikliğinin oluşması, malaryanın yaygın olduğu bölgelerde G6PD sıklığının artmasıyla açıklanabilmiştir.

G6PD eksikliğinin olduğu eritrositlerdeki malarya parazitinin gelişiminin normal eritrositlerden daha yavaş olduğu grlmştir (Beutler 1994).

G6PD enzim eksikliği insidansı Akdeniz lkelerinde, Afrika'da ve Çin'de daha yüksek olmakla birlikte bütün ırklarda ve etnik gruplarda tanımlanmıştır (Calabro ve ark. 1990, Beutler ve ark. 1992). Bu enzim eksikliğinin en önemli belirtileri neonatal sarılık, favizm ve hemolitik anemi olduğu ve enzimin şiddetli eksikliğinde kronik nonsferositik hemolitik anemi görüldüğü bildirilmiştir. (Rang ve ark.1999).

1.7.1. Neonatal Sarılık

Akdeniz ve Asya'da sıklıkla görülen neonatal sarılık, G6PD enzim eksikliğinin ve buna bağlı olarak gerçekleşen hemolizin önemli bir sonucudur. Yenidoğan bebeklerde tedavi edilmediği zaman kernikterusa sebep olmaktadır (Salvati ve ark. 1999).

1.7.2. Favizm

G6PD enzim eksikliği olan hastalarda görülen, güçlü oksidan özelliği olan Fava fasulyesi veya baklasının (*Vicia fava*) yenilmesinden veya polenlerinin inhale edilmesinden sonra ortaya çıkan ve şiddetli hemoliz görülen bir hastalıktır (Rang ve ark.1999). Çoğunlukla Fava alımından 24 saat geçtikten sonra hemoliz başlar. G6PD enzim eksikliği olanlarda favizmin görülmesi kişinin genetik yapısı ve Fava'nın içeriğinin metabolizmasıyla ilgilidir. G6PD eksikliği olan hastaların hepsinde favizm görülmemektedir fakat favizmi olan kişilerde her zaman G6PD enzim eksikliği görülmektedir. G6PD Akdeniz (Mediterranean) varyantında fava fasulyesinin tkertilmesine bağlı akut ve çok şiddetli hemoliz görülmektedir (Fairbanks ve ark 1994).

1.7.3. Hemolitik Anemi

Kronik hemolitik anemiye sebep olan nokta mutasyonlarının incelenmesi sonucunda G6PD geninin 10. ekzonu tarafından kodlanan, 361-428 aminoasitlerinin arasındaki bir bölgede yoğunlaştığı saptanmıştır. G6PD'nin stabilitesi ve aktivitesi için gereken aktif dimer oluşumunda bu bölge görev almaktadır (Hunsdoerfer ve ark 2002).

G6PD enzim eksikliği görülen eritrositler ozmotik şok ve oksidatif strese karşı daha duyarlı olduğundan Heinz cisimcikleri oluşumu sebebiyle hemoliz ve bunun sonucunda da anemi oluşmaktadır (Long ve ark. 2002).

1.7.4. Kronik Nonsferositik Hemolitik Anemi

Kronik nonsferositik hemolitik anemi G6PD enziminin şiddetli eksikliğinde oluşmaktadır. Bu anemiyle ilişkili 80'den fazla genetik varyant tanımlanmıştır. G6PD-Portici varyantında G-A değişimi şeklindeki tek nokta mutasyonu polipeptid zincirindeki histidin aminoasidinin arjinin-393 ile yer değiştirmesine ve buna bağlı olarak enzimin üç boyutlu yapısının bozulmasına sebep olur. Bu varyantın bulunduğu eritrositlerde küresel yapının bozulması, anemi, retikülosit ve bilirubin değerlerinde artma gibi belirtiler göstermektedir (Filosa ve ark.1992).

1.8. G6PD Varyantları

Yapılan araştırmalarda yaklaşık 400 milyondan fazla kişinin G6PD enzim eksikliği taşıdığı saptanmıştır. Dahası böyle bir yaygınlığa sahip olan G6PD'nin değişik kinetik özellikler gösteren 400'ün üzerinde varyantı olduğu da bilinmektedir. Moleküler düzeyde çok farklı olmayan bu varyantların biyokimyasal özelliklerinin birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Varyantların çoğunun dengeli bir polimorfizm göstermesi sebebiyle herhangi bir oksidan ajanla karşılaşarak akut hemoliz atağı gösterinceye kadar asemptomatik olarak kalırlar(Vulliamy ve ark. 1998, Cappelini ve ark. 1996).

1967 yılında toplanan Dünya Sağlık Örgütü (WHO) eritrosit G6PD enzim aktivitesini, elektroforetik analiz ve inhibitörlere yanıt gibi değişik parametrelerin varyantlarını tanımlamada kullanılmasına karar vermiştir. WHO'nun amacı; değişik laboratuarlarda tanımlanan çok sayıda varyantın birbirleriyle karşılaştırma zorluğunu ortadan kaldırmak ve yeni varyant standartlarını oluşturmaktır. Tanımlanan bu varyantların oluşturduğu enzim eksikliğinin tablosu, bulunan deneysel verilere ve klinik bulgulara göre beş ana grupta toplanmıştır:

1. Kronik nonsferositik hemolitik anemi gösteren grup,
2. Enzim aktivitesi % 10'un altında olan, şiddetli enzim eksikliği gösteren fakat hemolitik anemi görülmeyen grup,
3. Enzim aktivitesi % 10 – 60 arası olan orta derecede enzim eksikliği gösteren grup,
4. Enzim aktivitesi % 60 – 100 arası olan hiç enzim eksikliği göstermeyen veya çok hafif gösteren grup,
5. Enzim aktivitesi artmış grup (WHO 1967)

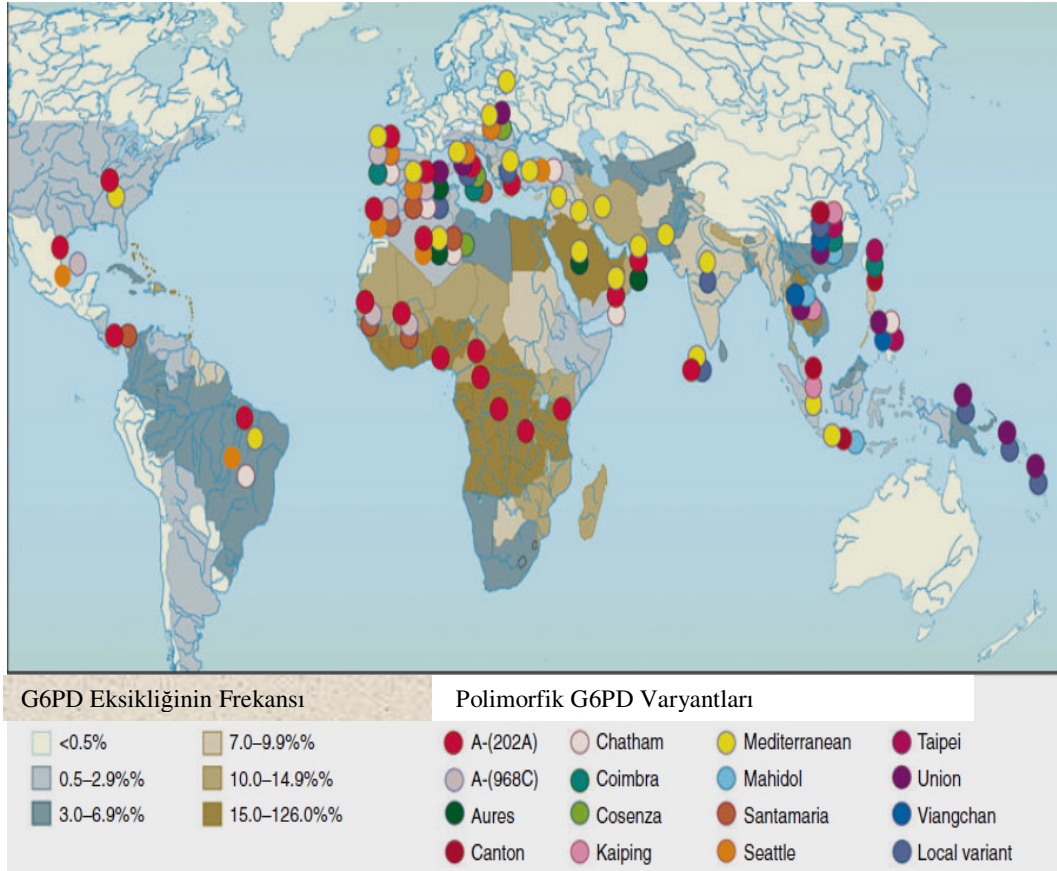
İnsanlarda elektroforetik olarak G6PD'nin 3 ayrı tipi mevcuttur. Bazı kişilerde tek bir B bandı, diğer bir grupta tek bir A bandı varken, bir kısmında da A ve B bandları bir arada bulunmaktadır. 400'den fazla genetik varyantı bulunan ve bu kadar çok olan çeşitliliğin, mutasyon nedeniyle ortaya çıkan G6PD eksikliğinin çoğunda, klinik bozukluk veya hemolitik anemi görülmez. En sık görülen varyant G6PD B tipidir ve Wild-type (vahşi tip) allel olarak kabul edilir.

Beyazlar arasında yaygın olarak görülen enzim defekti G6PD Mediterranean tipidir ve bu tip G6PD B⁻ olarak ta adlandırılır. G6PD Mediterranean varyantında enzim aktivitesi normalin % 1'inden daha azdır ve daha çok Akdeniz'deki beyazlarda daha fazla yaygındır. Ayrıca klinik bakımdan hemolize neden olan varyantlardan biridir. G6PD Akdeniz (Mediterranean) tipi Orta Doğu'da yaygın olarak bulunmaktadır ve bu tipte enzim aktivitesi % 10'dan daha azdır.

G6PD A tipi; Afrikalılarda görülen ve normal aktivite gösteren A tipinde hemoliz görülmez ve B tipine göre yalnız bir aminoasit farklılığı vardır. Ayrıca A tipi B tipine göre elektroforezde daha hızlı yürür. Siyah Amerikan erkeklerinin yaklaşık % 20'lik bir kısmında G6PD A alleli vardır. A⁻ olarak isimlendirilen tip klinik olarak önemli olan anormal G6PD tipidir ve siyah Amerikan erkeklerinde % 11 oranıyla en sık görülen tiptir.

Ayrıca G6PD A⁻ nın ilaca bağlı hemolitik anemiyle de yakın ilişkisi vardır. G6PD A ve A⁻ varyantları sıtma hastalığının yaygın olarak görüldüğü Afrika'ya has olarak tanımlanmasına rağmen İtalya, İspanya, Güneydoğu Asya, Orta Doğu ve Güney Amerika kökenli beyazlarda da görülmektedir. Ayrıca enzim aktivitesi çok düşük olan

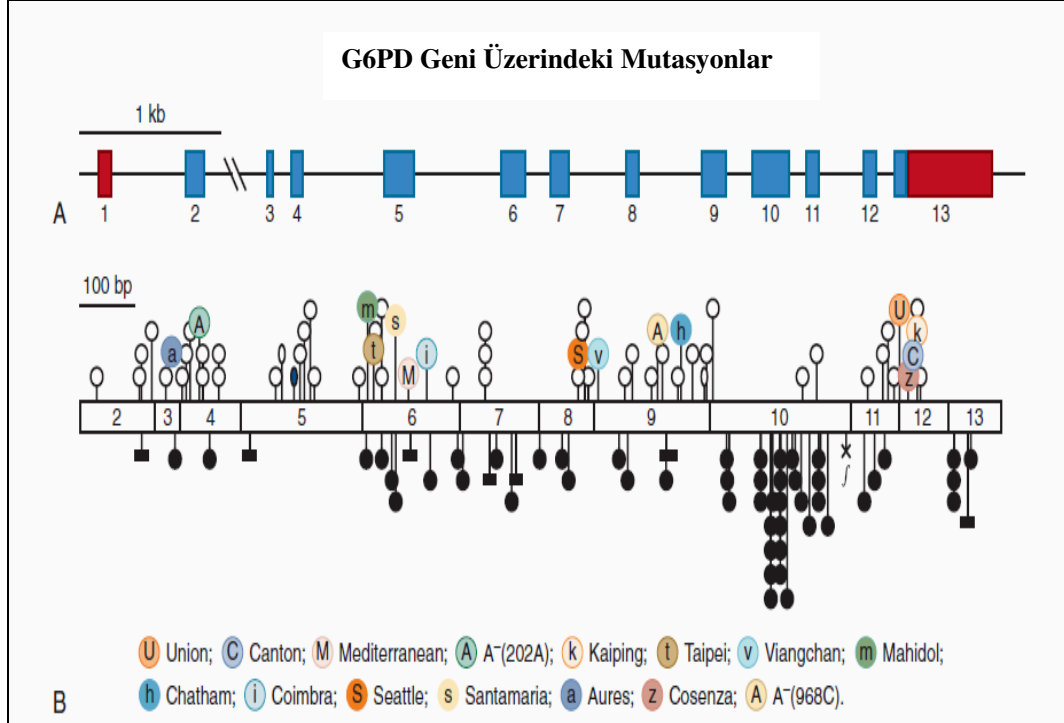
Mahidol ve Union varyantları Güneydoğu Asya’da en yaygın varyantlardandır. Chicago varyantındaysa ömür boyu oldukça şiddetli hemolitik anemi görülmektedir (Beutler ve ark. 1991, Beutler 1994, 1996, Tishkoff ve ark. 2001, Kurdi-Haidar ve ark. 1990, Beutler ve Vulliamy 2002, Martinez ve ark. 1997). Sık görülen G6PD varyantlarının dünyadaki dağılımı şekil 1.8.1. de gösterilmiştir(WHO 1989, Tan ve Boey 1989).



Şekil 1.8.1. G6PD Varyantlarının Dünyadaki Dağılımı (WHO 1989, Tan ve Boey 1989).

DNA düzeyinde meydana gelen çeşitli nokta mutasyonlar genelde G6PD enziminin substrat bağlanma bölgesinde yer alan aminoasitleri etkilemekte ve enzimin aktivite göstermesi için protein katlanmalarına ve dimerizasyonuna engel olmaktadır (Cochrane 1991). Afrika’da görülen G6PD A varyantında en çok 202A, 376G bölgesinde mutasyonlar görülmektedir. G6PD Mediterreanean tipindeyse 563T, Güney Avrupa, Orta Doğu ve Hindistan’da da 563 T bölgesinde mutasyonlar görülmektedir (Beutler 2002).

İnsan G6PD geni üzerindeki çeşitli intron ve ekson bölgelerinde nokta mutasyonlar meydana gelmektedir. Bu mutasyonların gerçekleştiği bölgeler ve yaygın görülen mutasyonlar şekil 1.8.2. de gösterilmiştir (Martini ve ark.1986).



Şekil 1.8.2. İnsan G6PD geni. (A.İntron ve ekson bölgeleri; B.Mutasyonların bulunduğu bölgeler) (Martini ve ark.1986).

G6PD enzim eksikliğinin dünyada yaygın varyant ve mutasyonlarının dağılımı, WHO'nun sınıflaması ve yaygın olan bölgeler Çizelge 1.3.'te verilmiştir. Birtakım mutasyonlar buldukları yerlerde farklı isimlerle adlandırılmışlardır ve alt alta yazılmış isimler aynı mutasyonun değişik bölgelerindeki farklı isimlendirmelerinden oluşmaktadır (Beutler 1994, Beutler ve Vulliamy 2002, Martinez 1997, Luzatto 1999).

Çizelge 1.3. G6PD enzim eksikliğinin dünyada yaygın varyant ve mutasyonlarının dağılımı. (Beutler 1994, Beutler ve Vulliamy 2002, Martinez 1997, Luzatto 1999)

Variyat ismi	Exon	Nükleotit	Amino asit	WHO	Yaygın yerler
Gaohe* Gaozhou	Ex2	95 A>G	32 His>Arg	2	Çin
Sunderland	Ex2	105-107del	35 Ile del	1	İngiltere
Aures	Ex3	143 T>C	48 Ile>Thr	2	Cezayir, Arabistan, İspanya
Asahi Castilla Alabama Ferrara	Ex4	202G >A	68 Val>Met	3	Afrika, İtalya, İspanya, Kanarya Adaları, Meksika
Ube, Konan	Ex4	241 C>T	81 Arj>Cys	3	Japonya
A	Ex5	376 A>G	126 Asn>Asp	4	Afrika, İspanya, Kanarya Adaları
Mahidol	Ex6	487 G>A	163 Gly>Ser	3	G.Asya, Çin, Tayvan
Chinese-3 Taipei	Ex6	493 A>G	165 Asn>Asp	2	Filipinler
Santamaria	Ex6	542 A>T	181 Asp>Val	2	Kosta Rika, İtalya, Kanarya Adaları
Mediterranean Dallas, Birmingham Sassari Caglari Panama	Ex6	563 C>T	188 Ser>Phe	2	İtalya, Yunanistan, Arabistan, İran, Türkiye, Irak, İsrail, Mısır, Yahudiler, Yahudi Kürtleri
Seattle Modena Ferrarall Athens- like,Mexico	Ex8	844 G>C	282 Asp>His	2	İtalya, İspanya, Sardinya, Kanarya Adaları
Viangchan	Ex9	871 G>A	291 Val>Met	2	Hindistan, Çin, Filipinler, Laos
Kalyan	Ex9	949 G>A	317 Glu>Lys	3	Hindistan
S.Antioco	Ex11	1342 A>G	448 Ser>Gly	?	Sardinya
Union Maewo Chinese-2	Ex11	1360 C>T	454 Arg>Cys	2	Laos, Filipinler, Çin, Japonya, İspanya, İtalya
Canton*	Ex12	1376 G>T	459 Arg>Leu	?	Çin, Tayvan
Kaiping*	Ex12	1388 G>A	463 Arg>His	2	Laos

*: Çalışmamıza konu olan mutasyon tipleri.

1.9. G6PD Eksikliğinin Tanısı İçin Uygulanan Yöntemler

1.9.1. Kalitatif Floresan Spot Test

Kalitatif floresan spot test G6PD enziminin aktivitesiyle oluşan NADPH'ın tayini esasına dayanır. NADPH aktive edilerek ultraviyole ışığı ile floresan oluşum miktarı gözlenir. Bu test niteliksel olarak enzimin varlığını gösterir fakat enzimin miktarına yönelik bilgiler vermemektedir. Kalitatif bir test olduğundan dolayı da sayısal

bir değer verilememektedir. Enzimin tanısı için yapılan diğer testlerle karşılaştırıldığında uyumluluk görülmektedir. Tarama amaçlı enzim tayinleri için kullanılabilen bu test basit, ucuz ve hızlıdır.

1.9.2. Kantitatif Spektrofotometrik Yöntem

Bireyin enzim miktarını tam olarak gösterebilen bu testler spektrofotometrik olarak yapılmaktadır. Bu test ile hemizigot, heterozigot ve homozigot bireylerin hepsi belirlenebilmektedir. Yöntem NADPH'ın 340 nm (nanometre)'de verdiği absorbans değerinin ölçümüne dayanır. Genellikle biyokimya laboratuvarlarında kullanılan bir yöntemdir. Enzim aktivitesi; 25 °C'de 1 dk da 1 mM NADP'yi NADPH'a katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanır ve değerlendirilir (Tabata ve ark 2002, Altikat ve ark. 2002).

1.9.3. PCR-RFLP

Nükleik asit zinciri içerisinde yalnızca belirli bir baz dizisini tanıyıp zinciri bu diziden hidrolitik olarak kesen enzimler restriksiyon endonükleaz enzimleridir. Bu endonükleazlar ile genin içindeki mutasyonlar kesilerek var olan kesilmemiş parçaların yapısından farklı olacaklardır. Agaroz jel elektroforezinde bu değişim gösterilerek mutasyon noktasının meydana çıkarılması sonucu moleküler düzeyde hastalık tanısı konulabilmektedir.

PCR işlemiyle incelenecek olan G6PD gen bölgesi çoğaltılır. Daha sonra mutasyon bölgesini tanıyan restriksiyon enzimleriyle uygun ölçülerde karıştırılarak, enzimin aktif olduğu sıcaklık ve sürede inkübasyon yapılmaktadır. DNA'nın kesilip kesilmediği inkübasyon ürününün % 2'lik agaroz jelde yrtllp kontrol örneklerle karışılaştırılarak değerlendirme yapılmaktadır (Martini ve ark. 1986, zmen ve ark. 2004, Noori ve ark. 2004, Gürbüz ve ark. 2005).

1.9.4. PCR- SSCP

Molekül içi etkileşim nedeniyle tek zincirli DNA'da her bir zincir farklı formda katlanıp kıvrılır ve zincirde değişik konformasyonlar oluşur. PCR- SSCP, değişik konformasyonlar içeren aynı uzunluktaki baz dizilerinin poliakrilamid jel elektroforezinde farklı hızla hareket etmesine dayanan bir yöntemdir. Mutasyon içeren

DNA molekölü normal diziden farklı bir yapıda olduğundan, jel elektroforezinde normalden farklı yerde bant verecektir. İncelenen örneğin ve normalin beraber jele yüklenip karşılaştırıldığında normalden farklı bantların bulunması örnekte mutasyon varlığını göstermektedir.

PCR işlemlle incelenecek olan G6PD gen bölgesi çoğaltılır. Amplikonlar PCR'da 90-95 °C'ye kadar ısıtıldığı zaman DNA hidrojen bağlarından ayrılarak tek zincir haline gelir. Ortamın hızla 0 °C'ye kadar soğutulduğunda zincirler tekrar birleşemeyerek ve kendi içlerinde kıvrılıp katlanarak ayrı ayrı iki yapı oluştururlar. Mutasyon içeren DNA molekölü normal halinden farklı bir konformasyon oluşturup elektroforezde farklı hızla yürüdüğünden jel elektroforezde normalinden ayırt edilebilmektedir. DNA fragmentinde baz değişiminin bulunduğu bu yöntemle belirlenebilmektedir fakat mutasyon türü tespit edilememektir (Beutler 1995, Menounos ve ark. 2000, 2003).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Carson ve arkadaşları (1956), primakin ilaçlarla yaptıkları çalışmada G6PD enzim eksikliğinin teşhisini koymuşlardır.

Childs ve arkadaşları (1958), G6PD enzim eksikliğinin kromozomal yapısını bildirmişlerdir.

Zinkham (1961), primakin duyarlı eritrositlere sahip bireylerde G6PD aktivite eksikliği olduğunu bildirmiştir.

Porter ve arkadaşları (1964), G6PD enziminin Afrika, Akdeniz ve Asya topluluklarında farklı varyantlarının olduğunu bildirmişlerdir.

Boyer ve arkadaşları (1965) yaptıkları çalışmalarda G6PD enzim eksikliğinin elektroforetik varyantlarını bildirmişlerdir.

McCurdy ve arkadaşları (1966), G6PD Kanton varyantını güney Çin'de % 1.7 bir gen frekansına ulaşan ve en sık görülen G6PD eksikliği olarak bulmuşlardır.

Yoshida (1967), tek bir aminoasit mutasyonu sonucu G6PD molekülünde değişim olabileceğini bildirmiştir.

Beutler ve arkadaşları (1968), eritrosit enzim eksikliğinin favizm, primakin duyarlılık ve bazı ilaç duyarlı hemolitik anemi, anemi ve yenidoğan sarılığı ve kronik nonspherositik hemolitik anemi temeli olduğunu bildirmişlerdir.

Luzzatto ve arkadaşları (1969) G6PD enzimin eksikliğinin sıtmaya karşı bir avantaj sağladığını bildirmişlerdir.

Yoshida (1971), Beutler (1978) ve arkadaşları G6PD varyantlarının çeşitliliğini gösteren tablolar yayımlamışlardır.

Du ve arkadaşları (1985) G6PD Gaohe varyantını tanımlamışlardır.

Takizawa ve arkadaşları (1986), G6PD geninin 58 dalton moleküler ağırlığa sahip ve 531 aminoasitten oluştuğunu bildirmişlerdir.

Aksoy ve arkadaşları (1987) Türkiye'de G6PD Adana, G6PD Samandağ, ve G6PD Balcalı varyantlarını tanımlamışlardır. Enzimler için DEAE-52 selüloz pH 7.0 kolon kromatografisi ve amonyum sülfat kullanarak kan örneklerinden saflaştırılmıştır.

Du ve arkadaşları (1988) tarafından Çin'de görülen varyant olan G6PD Kaiping'i tanımlamışlardır.

Chen ve arkadaşları (1991), G6PD geninin tam dizi analizini belirlemişler ve G6PD geninin insan DNA'sındaki 20.114 bç sırasını belirlemişlerdir.

Tang ve arkadaşları (1992), Çin'de G6PD eksikliklerinin moleküler temelini araştırmışlardır. Yaptıkları çalışmalarda 21.271 (11.400 erkek, 9.871 kız) yenidoğan bebeklerinde G6PD aktivitesini belirlemişlerdir ve düşük G6PD aktivitesi olan kız bebekleri incelemişlerdir. Rastgele seçilen kişilerden PCR ile restriksiyon enzimleriyle (RE) sindirim yöntemi kullanılarak G6PD geni çoğaltılmıştır. Onların sonuçlarına göre Tayvan'da G6PD poliformizminden sorumlu en az dört çeşit mutasyon olduğunu bildirmişlerdir. Bu mutasyonların ilk türü 487. nükleotitte G ile A'nın yer değiştirmesi ile Ser den Gly oluşan yeni bir tip bulmuşlardır. İkinci tip mutasyon daha önce bildirilmemiş olan 493. nükleotitte A ile G değişmesidir. İki mutasyonu tespit etmek için PCR/RE sindirim yöntemi ile sırasıyla Alu I ve II Ava tanıma siteleri oluşturulmuştur. Üçüncü mutasyon 1376. nükleotitte G ile T değişmesini tespit etmişlerdir. Dördüncü mutasyon türü olarak da 1388. nükleotitte G ile A değişimi saptanmıştır.

Bautista ve ark. (1992) ile Maeda ve ark (1992) tarafından G6PD enzimi farklı kaynaklardan değişik yöntemler kullanılarak birçok kez saflaştırılmıştır.

Saha ve arkadaşları (1994) Singapur'da yaşayan Çinli erkeklerde Mediterranean (563 C>T), Canton (G>T, 1376) ve Kaiping (1388G>A) ve Chinese-5 (1024C>T) variantlarını belirlemişlerdir. Spesifik oligonükleotidler ile restriksiyon enzimleri ile DNA dizilerini açıklamışlardır. Bütün varyant çeşitlerinde enzim aktivitelerinin düşük olduğunu (0.2-0.6 IU/g Hb) belirtmişlerdir.

Huang ve arkadaşları (1996) Çin'de G6PD eksikliği olan 50 kadın ve 112 erkekte moleküler mutasyonlar ve yenidoğanlarda neonatal sarılık klinik bulguları araştırmışlardır. % 50 oranında nükleotit 1376 (G>T), % 16.1 oranında nükleotit 1388 (G > A), % 8.0 oranında nükleotit 493 (A>G), % 6.2 oranında nükleotit 1024 (C>T), % 5.4 oranında nükleotit 95 (A>G), % 1.8 oranında nükleotit 392 (G>T), % 1.8 oranında nükleotit 487 (G > A), % 0,9 oranında nükleotit 871 (G > A) ve % 0,9 oranında nükleotit 1360 (C>T) mutasyonlarını bulmuşlardır. Nükleotit 1376 mutasyonunun

Tayvan ve Çin' de yeni doğanlarda daha yaygın olduğunu bildirmişlerdir. Tüm kordon kanı örneklerinde G6PD aktivitesinin kantitatif olarak ölçülmüş ve bilinen dokuz oligonükleotid ile doğal ve mutasyonlu primerler hazırlanarak DNA sentezleyici de sentezleyip saflaştırmışlardır. Bu bilinen mutasyonların hızlı tespiti için, tam kandan direkt PCR ile modifiye edilmiştir.

Miwa ve Fujii (1996) G6PD mutasyonlarından sorumlu 78 varyantı listelenmişlerdir. Onlar tahminen dünya çapında 400 milyon kişinin G6PD eksikliğinin kronik hemolitik anemi ve uyuşturucu yada enfeksiyonun neden olduğu akut hemolitik anemi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir.

Iwai ve arkadaşları (2001) güneydoğu Asya'daki G6PD dağılımını incelemek için G6PD varyantları üzerinde moleküler çalışmalar yapmışlardır. Bu çalışma için 16 etnik gruptan 4317 kişi (2.019 erkek, 2.298 kadın) taranmıştır. Tarama sonucunda; (1291 G>A) G6PD Surabaya, 383 T>C (G6PD Vanua Lava), 487 G>A (G6PD Mahidol), 871 G>A (G6PD Viangchan), 592 C>T (G6PD Coimbra), 95 A>G (G6PD Gaohe), 1003 G>A (G6PD Chatham), 1360 C>T (G6PD Union), 1376 G>T (G6PD Canton), ve 1388 G>A (G6PD Kaiping) varyantları tespit edilmiştir. Bu çalışma için Tek Adım Tarama Yöntemi (a single-step screening method), PCR ve SSCP analiz yöntemi kullanılmıştır.

Nuchprayoon ve arkadaşları (2001) Tayland'da G6PD eksikliği için kantitatif G6PD yöntemi kullanmışlardır. Alınan kordon kanı örneklerinde G6PD eksikliğinin Tai erkeklerinde % 11.1 olduğu ve kadınlarda % 5.8 olarak bildirilmiştir. G6PD Viangchan (871 G>A) tanımlamak için PCR-restriksiyon enzim tabanlı bir yöntem geliştirmişler ve G6PD eksikliği olan kan örneklerindeki DNA için mutasyonlar aramışlardır. G6PD Viangchan (871 G>A) varyantının Asya'nın güneydoğundaki toplumda en sık görülen tür olduğunu bildirmişlerdir.

Çiftçi ve arkadaşları (2001) metamizol ve eritrosit G6PD enzim aktivitesi üzerine magnezyum sülfat etkileri in vitro ve in vivo koşullarda incelenmişlerdir. Metamizol ve magnezyum sülfatın in vitro ve in vivo G6PD enzim aktivitesini inhibe edeceğini öne sürmüşlerdir. Çalışmalarını 340 nm dalga boyunda bir spektrofotometre kullanılarak Beutler yöntemine göre yapmışlardır.

Yusoff ve arkadaşları (2002) Malezya'da yaptıkları çalışmada G6PD mutasyonlarını taramak için MPTP ve PCR yöntemini kullanmışlardır. G6PD geninin 3, 4, 5, 6, 7, 9, 11 ve 12 ekzon bölgesindeki mutasyonlar MPTP ile taranmıştır. 9 mutasyon tespit edilmiştir. G6PD Viangchan, G6PD Mediterranean (C563T), G6PD Vanua Lava (T383C), G6PD Coimbra (C592T), G6PD Kaiping (G1388A), G6PD Orissa (C131G), G6PD Mahidol (G487A), G6PD Canton (G1376T), and G6PD Chatham (G1003A) varyantlarını bulmuşlardır.

Ainoon ve arkadaşları (2004) 128 Çinli yenidoğan bebeklerin kordon kanından PCR restriksiyon enzimleri ve SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism) ve DNA dizi analizi yapılmıştır. G6PD Canton 1376 G>T, Kaiping 1388 G>A, G6PD Gaohe 592 G>A, Chinese-5 1024 C>T, Nankang 517 T>C, Mahidol 487 G>A, Quing Yang 392 G>T, Union 1360 C>T, Viangchan 871 G>A ve Chatham 1003 G>T varyantlarını bulmuşlardır.

Laosombat ve arkadaşları (2006) G6PD eksikliği olan 210 erkek ve 15 kadın oluşan 225 kişi üzerinde Tayland'ın güneyindeki Songklanagarind Hastanesi'nde çalışma yapmışlardır. Bu hastaların % 85 inde Neonatal sarılık, % 17.3 ünde enfeksiyonuna bağlı akut hemoliz, % 3.6 sında ilaça bağlı G6PD eksikliği, % 1.8 de akut hemoliz bağlı favism saptamışlardır. Numunelerden mutasyonları karakterize etmek için PCR-RFLP yöntemini kullanmışlardır. MPTP ve DNA dizi analizleri ile bandlar elde etmişlerdir. Taylandlılar arasında G6PD varyantlarının ve heterojen G6PD Viangchan, Kaiping, Mahidol ve Kanton ve türevleri olan vakaların yaklaşık % 78'ini hesaplamışlardır. Onların bulgularına göre Güneydoğu Asya da G6PD Viangchan ve Mahidol varyantlarının ortak olduğu teorisini kanıtlayan teoriler ortaya sunmuşlardır. 4. ekzonda 196. kodonda TTC>ATC değişiminin olduğunu ve basit bir aminoasit olan Phe66 ile bulmuşlardır ve bunu G6PD Songklanagarind sınıf II varyantı olarak belirlemişleridir.

Kawamoto ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada Endonezya'nın doğusunda Doğu Nusa Tenggara eyaletinde Flores Adası'nda sıtma ve G6PD eksikliği için arazi çalışmaları yapmışlardır. 642 erkek, 466 kadın gönüllü bu çalışmaya katılmışlardır ve 38 erkek ve 17 kadında toplam 55 kişide G6PD eksikliği olan bireyler saptamışlardır. G6PD Chatham (1003 G>A), G6PD Coimbra (592 C>T), G6PD Kaiping (1388 G>A),

G6PD Vanua Lava ile 282 Asp>Tyr aminoasit değişikliği olan, ekson 8 (844 G>T) yeni bir mutasyonu bildirmişlerdir. Bu işlemler için basit yeni ve hızlı bir tarama yöntemi olan Tantular ve arkadaşları (1999) ile Matsuoka ve arkadaşlarının (2003) yöntemi kullanılmıştır, hemoglobin miktarı Hemo Cue makinesi kullanılarak ölçülmüştür.

Jiang ve arkadaşları (2006) Çin'de G6PD yapısı ve varyasyon fonksiyonu üzerine sistematik bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Toplam 155.879 kişide G6PD/6PGD oranı yöntemi ile G6PD eksikliği için taranmış ve 6683 olgu tespit edilmiştir. 11 etnik temelli gruplar içinden 1004 olgu moleküler analiz tabi tutulmuştur ve şu sonuçlara varmışlardır:

- G6PD varyantlarının, geleneksel etnik sınırları tutarlıdır ancak, Çin nüfusunun etnik temelli gruplarında frekansları değiştiğini,
- Çin toplumunda G6PD varyantları, Afrika, Avrupa farklı olduğunu,
- Yeni bir G6PD eksikliği mutasyonu olan 274 C>T tespit edilmiştir
- Denatüre yüksek performanslı sıvı kromatografi tanı ve genetik çalışma için G6PD eksikliği olan mutasyonları tespit için büyük bir avantaj olduğunu bildirmişlerdir.
- G6PD Kaiping ve G6PD Canton varyantlarının Çin popülasyonunda en sık gözlenen varyantlar olduğu bildirilmiştir.

Doğan (2007), yeni doğan hemolitik anemi teşhisi konmuş hastalarda G6PD enzim genindeki Mediterranean, Seattle, San Antioco ve Union olmak üzere 4 G6PD mutasyon tipi taranmıştır. G6PD enzim aktiviteleri 4.00 U/grHb nin altında olan (21 kız, 39 erkek) 60 olgu mikroarray yöntemi ile mutasyon analizine alınmıştır. Olgulardan periferik kan alınarak DNA izole edilmiş, incelenecek bölgeler PCR ile çoğaltılmış ve mikroarray teknolojiyle SNP (Single Nucleotide Polymorphism-Tek Nükleotid Değişimi) analizi yapılmıştır. Yapılan analizler sonucunda, G6PD Mediterranean (563 C→T) mutasyonunu tespit etmiştir.

Chun ve arkadaşları (2007) Çinin Güney-batısında yeni doğanlarda G6PD eksikliği olan 240 hastada G1388A, G1376T, A95G mutasyonlarının analizini yapmışlardır. 190 G1388A, 48 G1376T ve iki A95G mutasyonunu bulmuşlardır. G6PD enzim eksikliği için Sigma Diagnostic Kit ve PCR kullanılmıştır. Wang ve arkadaşları

(2010) yaptıkları çalışmada Kuzeydoğu Çin'de Liaoning Eyaletinde ilk defa ağır kronik anemi gösteren, 3 yaşında bir çocukta G6PD eksikliği bulunmuştur. Bulunan bu eksikliğin Çin'de ilk defa bulunan G6PD Santiago de Küba olduğunu bildirmişlerdir. Dünya Sağlık Örgütü sınıflamasına göre, bu hasta çocuk sınıf I olarak kategorize edilmiştir (çok şiddetli G6PD eksikliği). Wang ve ark bu hastadaki G6PD genini incelendiğinde ekson 11 de 1339. nükleotidde A'nın G ile değişmesini bulmuşlardır. Bunun sonucunda molekülün 447. pozisyonunda aminoasit (Gly-arg) değişikliği meydana gelmiş olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca Çin'de yaygın olarak gözlenen G6PD Kaiping (1388G>T) varyantını da bildirmişlerdir.

Xiaowen Chen ve arkadaşları (2010) Çin'de Shenzhen Çocuk Hastanesi'nde yaşları 0.1 ila 12 arasında değişen 104 çocuk üzerinde Çin'de görülen 17 mutasyonu araştırmışlardır. Bu araştırma için RT-PCR ve denatüre gradient jel elektroforezi (DGGE) yöntemini kullanmışlardır. Sonuç olarak 95A>G (G6PD Gaohe), 392G>T (G6PD Chinese-4), 517T>C (G6PD Nankang), 871G>A (G6PD Viangchan), 1024T>C (G6PD Chinese-5), 1360C>T (G6PD Union), 1376G>T (G6PD Canton), 1388G>A (G6PD Kaiping) mutasyonları bulunmuştur. Toplam mutasyon belirleme sıklığı % 84,6 olarak bulunmuştur.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kan Örneklerinin Elde Edilmesi ve Saklanması

Yapılan çalışmada G6PD enzim eksikliğine neden olan Canton 1376 G>T (p.Arg459Leu), Kaiping 1388 G>A (p.Arg463His), Gaohe 95 A>G (p.His32Arg) mutasyonlarının varlığının tespiti için, Dicle Üniversitesi Hematoloji Kliniği'ne G6PD özellikleri bilinmeyen rastgele başvuran 96 kişinin rızaları alınarak 2 ml kan alınıp genel tarama yapılmıştır. Toplanan kan örnekleri EDTA'lı tüplerde +4 °C de beklemede tutulmuştur.

3.2 Kan Örneklerinden DNA'ların Saflaştırılması

Toplanan tam kan örneklerinden DNA'lar, ROCHE MagNA Pure Compact adı verilen DNA saflaştırma cihazı (Şekil 3.1.) ve bu cihazla uyumlu çalışan ROCHE MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I isimli saflaştırma kiti yardımı ile üretici firma talimatlarına uygun olarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma kiti bir kerede 8 tam kan örneğinden DNA saflaştırabilme özelliğindedir. Toplanan tam kan örneklerinden 200 µl alındı ve saflaştırma kitine bırakıldı. Set halinde alınan 32 izolasyonluk kit ile 96 tam kan örneğinin saflaştırma işlemine başlandı. Kit saflaştırma cihazına yerleştirildi ve saflaştırma işlemi yapıldı. Cihazın çalışmasından 25-30 dk sonra 100 µl izole edilmiş DNA elde edildi. Saflaştırma işlemi bittikten sonra elde edilen saf DNA'lar Real Time PCR işlemleri için -20 °C'de beklemeye alındı. Saflaştırmada kullanılmış olan ROCHE MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I kitinin içeriği Çizelge 3.'te verilmiştir.



Şekil 3.1. ROCHE MagNA Pure Compact Cihazı (ROCHE 2007)

Çizelge 3. ROCHE MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I (ROCHE 2007)

Reagent Cartridge	<ul style="list-style-type: none">- 32 sealed cartridge- contains reagents sufficient for one isolation run (well 1: proteinase K, well 2: Lysis Buffer, well 3: MGPs, well 4,5: Wash Buffer 1, well 6: Wash Buffer 2, well 7: Wash Buffer 3, well 8: Elution Buffer)
Tip Tray	<ul style="list-style-type: none">- 32 disposable Tip Trays- contains Reaction Tips (2 large and 1 small) and Piercing Tool
Sample Tube	<ul style="list-style-type: none">- 32 tubes, 2.0 ml- to be placed into the Tube Rack of MagNA Pure Compact Instrument
Elution Tube	<ul style="list-style-type: none">- 32 barcoded tubes, 2.0 ml- to be placed into the Elution Tube Rack of MagNA Pure Compact Instrument
Elution Tube Cap	<ul style="list-style-type: none">- 35 tube caps- to seal the Elution Tubes

3.3. G6PD Canton, Kaiping ve Gaohe Mutant Allellerin Belirlenmesi

G6PD mutasyon taraması için yaptığımız bu çalışmada LightCycler® 480 II (ROCHE Diagnostic) cihazı ve bu cihaz ile 96 örneğin analizi aynı anda yapılabilen LightSNip G6PD mutasyon kitleri (TIB MOLBIOL) kullanılmıştır. Bu cihaz ve kitin kullanımından önce Real Time PCR yöntemini açıklamanın yapılan işlemleri daha anlaşılır düzeye getireceği düşünülmüştür.

3.3.1 Real Time PCR

Real-time PCR; DNA'nın çoğaltımını ve ürünlerini tek bir tüpte belirlemeye olanak sağlayan yakın bir zamanda uygulamaya konulmuş popüler bir metottur (Gibson ve ark. 1996). Gen anlatımının analizini değiştiren bu yöntem ile geleneksel olarak yapılan PCR yöntemi ve gen analizi birleştirilmiştir. PCR çoğaltımını görünür hale getiren ve bir bilgisayar monitöründen izlenebilen floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı, floresanın oluşan DNA ile doğru orantılı olarak arttığı bir çoğaltma yöntemidir. Birçok adlandırmayla anılan bu teknolojiye bazı yayınlarda “kinetik PCR”, “homojen PCR”, kantitatif Real-time PCR” gibi çeşitli adlarla da isimlendirilmektedir (Bustin 2000).

Real Time PCR yönteminde amplifikasyon ve analiz aynı anda yapılır ve örnek transferi, reaktif eklenmesi ve jel ayrımı yoktur. Real time PCR yöntemi kapalı bir sistem olduğundan devam eden reaksiyonlarda ürünün kontamine olma riski büyük ölçüde azaltılmıştır (Persing ve ark. 2006). Örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal verilere dönüştürme ve mRNA'nın düzeyini sayısal olarak belirleyebilme en çok kullanılan alanlarıdır. Bu amaçlarla kullanımının yanı sıra tek nokta mutasyonlarını belirleme, patojen tespiti, DNA hasarı tespiti, metilasyon tespiti, SNP analizi ve kromozom bozukluklarının tespiti gibi çalışmalarda da kullanım alanları vardır (Kubista ve ark. 2006).

Real Time PCR floresan okuma yapılmaktadır. Okunan bu değer floresan primer veya probun taşıdığı floresan madde sayesinde çeşitli dalga boylarında oluşmaktadır. Real time PCR sistemleri floresan bir boyayı belirleyerek reaksiyonun oluşması sırasında PCR ürününün miktarı ile meydana gelen floresan sinyal arasında bir ilişki kurduğu belirtilmiştir. (Wittwer ve ark. 2001, Roche 2005, Herrmann ve ark. 2006).

3.3.2. Real Time PCR Genel Kullanım Alanları

Klasik PCR yöntemlerinin uygulanabildiği her durumda Real-Time PCR uygulanabilir. Aşağıdaki uygulamalar örnek olarak verilmiştir;

- Gen ekspresyonunun belirlenmesi (Giulietti 2001)
- Viral quantifikasyon (Niesters 2001, Mengelle 2003)
- Biyoemniyet ve genetik stabilite testleri (Lovatt 2002)
- Real-Time Immuno-PCR (IPCR) (Adler 2003, Barletta 2004, Lind ve Kubista 2005)
- Patojen araştırmaları (Belgrader 1999, Uhl 2002, Mackay 2004, Perandin 2004, Watzinger 2004)
- Streptococcus pneumoniae (Kearns 2002)
- Mycobacterium tuberculosis ve dirençli türleri (Kraus 2001, Torres 2003, Cleary 2003, Hazbon 2004)
- DNA hasarının (microsatellite instability) belirlenmesi (Dietmaier 2001)
- Mitokondriyal DNA çalışmaları (He 2002, Liu 2003, Alonso 2004)

- Metilasyon araştırmaları (Trinh 2001, Cottrell 2004, Thomassin 2004)
- Solid organ transplantasyonu sonrası sonuçların izlenmesi (Sabek 2002, Gibbs 2003)
- Hematopotik Kök hücre transplantasyonu sonrası minimal residual hastalığın izlenmesi (Elmaagacli 2002, Cilloni 2002, Sarris 2002, Gabert 2003, Van der Velden 2003)
- Hematopotik Kök hücre transplantasyonu sonrası kimerizmin izlenmesi (Elmaagacli 2002, Alizadeh 2002, Thiede 2004, Harries, 2004)
- Floresan melting-curve analizi (FMCA) veya High-resolution melting analizi (HRMA) ile genotipleme (Von Ahsen 2000, Donohoe 2000, Lyon 2001, Waterfall ve Cobb 2002, Bennett 2003, Zhou 2005, Palais 2005)
- Spesifik prob/beacon ile genotipleme (Tapp 2000, Mhlanga 2001, Solinas 2001, Gupta 2004)
- Tek-gen kopya sayısı (Bieche 1998, Mocellin 2003, Barrois, 2004, Linzmeier 2005).
- Mikrodelesyonlar (Laurendeau 1999, Kariyazono 2001, Covault 2003, Coupry 2004)
- Haplotip araştırmaları (Von Ahsen 2004)
- Kuantitatif mikrosatellit araştırmaları analizi (Ginzinger 2000)
- Kuantitatif allelik ayırım (Abbas 2004, Quesada 2004)
- Maternal kandan tek hücre izolasyonu ile prenatal tanı / cinsiyet belirleme (Abbas 2004, Quesada 2004)
- Hemaglobinopatilerin prenatal tanısı (Kanavakis 1997, Vrettou 2003, Vrettou 2004)
- İnteroperatif kanser tanısı (Raja 2002)
- Linear after the exponential (LATE)-PCR: Klinik tanı, biyosavunma, araştırma ve DNA dizilemeye uyarlanabilen, yüksek doğrulukta ve küçük örneklerle çalışılabilen yeni bir metod (Sanchez, 2004).

3.3.3. Real Time-PCR'da Kullanılan Prob Sistemleri Ve Boyalar

A. Özgül Floresan İşaretli Problar (Dizi Spesifik Problar)

Taqman (Hidroliz probları)

Molecular Beacon

Scorpion Primerleri

Hibridizasyon Probları (Tek işaretli problar, Simple prob,)

B. Özgül Olmayan Floresan İşaretli Problar

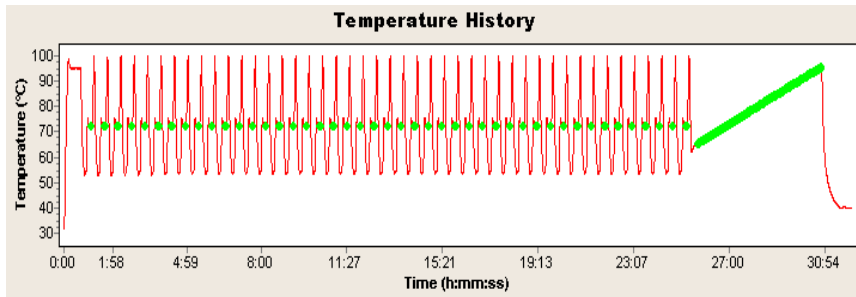
Syber Green I (Tüm çift iplikli DNA'lar belirlemek için boya)

Etidyum Bromid (Sayitoğlu 2005)

G6PD mutasyon taraması için yaptığımız bu çalışmada sıcak hava akımıyla ısınan kapalı bir sistem olan LightCycler® 480 II Real Time PCR cihazı (ROCHE Diagnostic) cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.2). Bu cihaz ile 96 örneğin analizi aynı anda yapılabilmektedir. Cihazda gerçekleşen örnek erime eğrisi Şekil 3.3.'de gösterilmiştir.



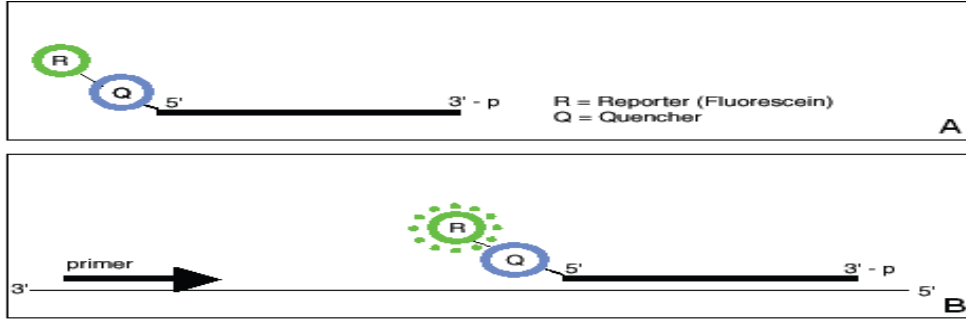
Şekil 3.2 LightCycler® 480 II Real Time PCR cihazı (ROCHE 2005)



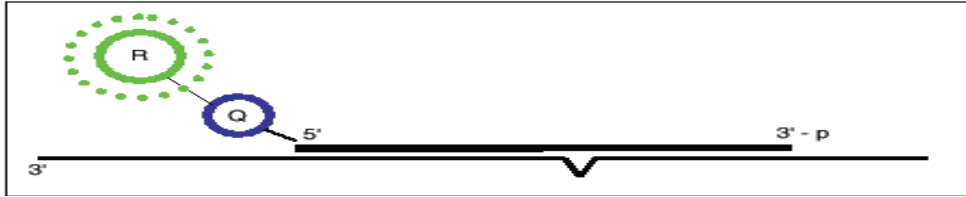
Şekil 3.3. LightCycler® 480 II Örnek erime eğrisi grafiği. Grafikteki her bir pik bir PCR döngüsünü göstermektedir.

3. MATERYAL VE METOT

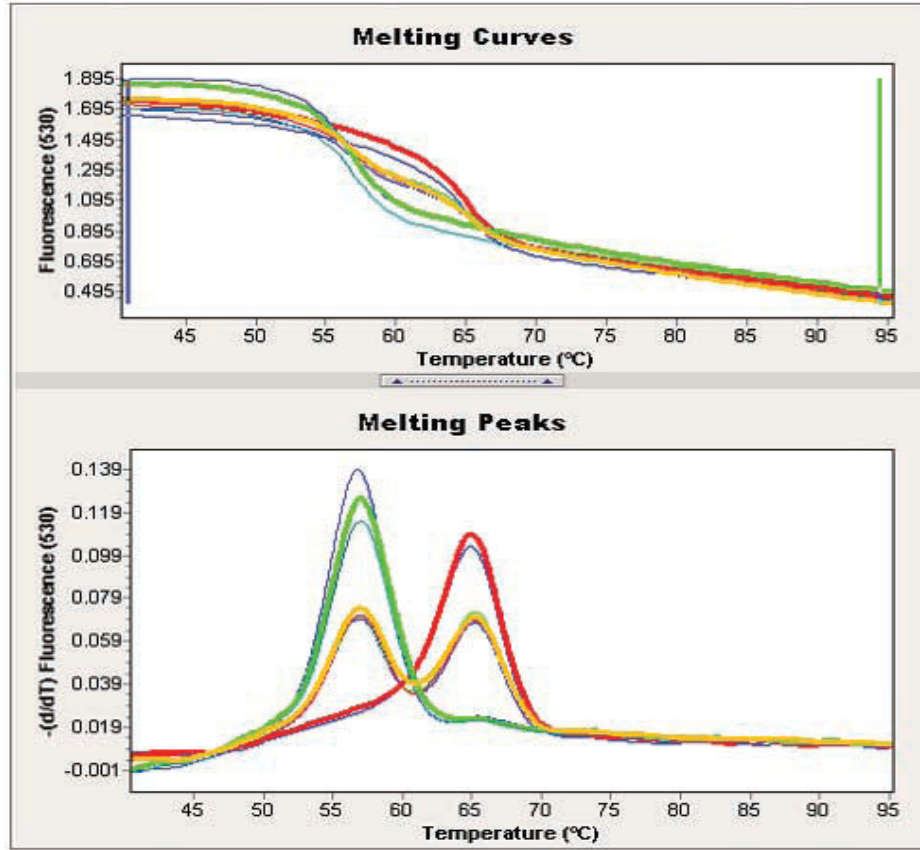
Ayrıca mutasyon kiti olarak LightSNip G6PD mutasyon kitleri (TIB MOLBIOL) kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada kullanılan kitlerin içerisindeki probun türü dizi-spesifik problardan hibridizasyon problelerinden simple probtur. Bu simple prob, mutasyon ve SNP'lerin varlığını belirleyebilen özelleştirilmiş bir tiptir. Bu probun formatı sadece bir florofor ile işaretlenmiş bir adet hibridizasyon probu içerir. Böyle bir prob SNP içeren hedef bir diziyi hibridize etmek için tasarlanmıştır. Hedef diziyi bir kez hibridize olan simple prob bağlanma olmadan önceki duruma göre daha fazla floresan ışık yaymaya başlar ve bu ışıma Real Time PCR cihazı ile görülür. Simple probun formatları şekil 3.4., 3.5., şekil 3.6.' de ayrıntılı olarak gösterilmiştir (Wittwer ve ark. 2001, Sohoeli ve Samiei 2005, Roche 2009).



Şekil 3.4. Simple prob formatı (a). (A): Simple Probu nasıl çalıştığını göstermektedir. Simple prob 3' veya 5' ucundan işaretlenir. (B): Prob hedef diziyi bağlandığı zaman LightCycler® 480 II cihazının LED ışığının uyarıcı etkisiyle yeşil floresan yaymaya başlar (Roche 2005)



Şekil 3.5. Simple prob formatı (b). SNP analizi için LightCycler® 480 II cihazı Simple Probu melting davranışını görüntüler. Sıcaklık arttıkça hedef probun erimesi floresan ölçümüyle algılayabilir. Prob ve hedef arasında ne kadar çok hibridizasyon olursa melting sıcaklık da o kadar belirgin olur (ROCHE 2005)



Şekil 3.6. Simple Probe Format (c) (Melting Curve Analysis). Şekilde floresan sinyalin sıcaklık arttığında azaldığı görülmektedir. Çünkü sıcaklık arttıkça prob hedef bölgeden ayrılır buda floresansı düşürmektedir. Melting Peaks'in olduğu alttaki grafik ise bulunan mutasyonun wild-type, homozigot ya da heterozigot olduğunu gösteren kısımdır (Roche 2005).

SNP belirlemede simple problemler oldukça iyi sonuçlar vermektedirler. Çünkü simple problemler hızlı bir şekilde wild-type, mutant ve heterozigotluğu belirlemektedirler (Lohman ve ark. 2000, Wittwer ve ark. 2002, Fraga ve ark. 2008).

3.3.4. LightCycler® 480 II Real Time PCR Cihazında Mutasyon Analizlerinin Yapılması

3.3.4.1 Hazırlık Aşaması

Bu aşamada Real Time cihazında mutasyon analizleri yapılmadan önce bir ön hazırlık yapılmıştır. Gerekli malzemeler ve PCR karışımı elde edilmiştir. Yapılan bu hazırlık aşaması işleminde öncelikle G6PD mutasyon kitleri içindeki primer ve prob (Reagent Mix) liyofilize olduğundan her kitin içerisine 100 µl PCR-grade water ekleyip

oluşan sölüsyonu 5-10 saniye kadar vortex cihazında karıştırıldı. Böylelikle reagent mix optimize edilmiş oldu. Her bir hasta için reaksiyon karışımı oluşturuldu. Bu karışım içerisindeki maddeler ve miktarları şu şekildedir:

Çizelge 3.1 Hazırlık Aşaması

H ₂ O	: 10.4 µl
Reagent mix	: 1 µl
Fastart DNA Master*	: 2 µl (DNA polimeraz içerir)
MgCl ₂	: 1.6 µl
Toplam Hacim	: 15.0 µl

*: LightCycler Fastart DNA Master HybProbe (ROCHE Diagnostic)

Hazırlanan bu karışıma 5 µl saflaştırılmış DNA'dan eklenerek 20 µl hacimde PCR mix elde edilir. Hazırlanan bu PCR mix G6PD mutasyonları için 96 örnek belirtilen miktarlarda hazırlandı. Her PCR mixte sadece kullanılan reagent mixi bakılan mutasyon tipine özgül olarak konulmuştur (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Reaksiyon Karışımı Hazırlanması.

Preparation of the reaction mix:	
20 µl reaction mixture	
H ₂ O	14.4 – 10.4 µl
Reagent Mix	1.0 µl
FastStart DNA Master	2.0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1.6 µl
DNA	1.0 – 5.0 µl (~ 50 ng)
Final MgCl₂ conc.:	3.0 Mm

3.3.4.2. Mutasyon Belirleme Aşaması

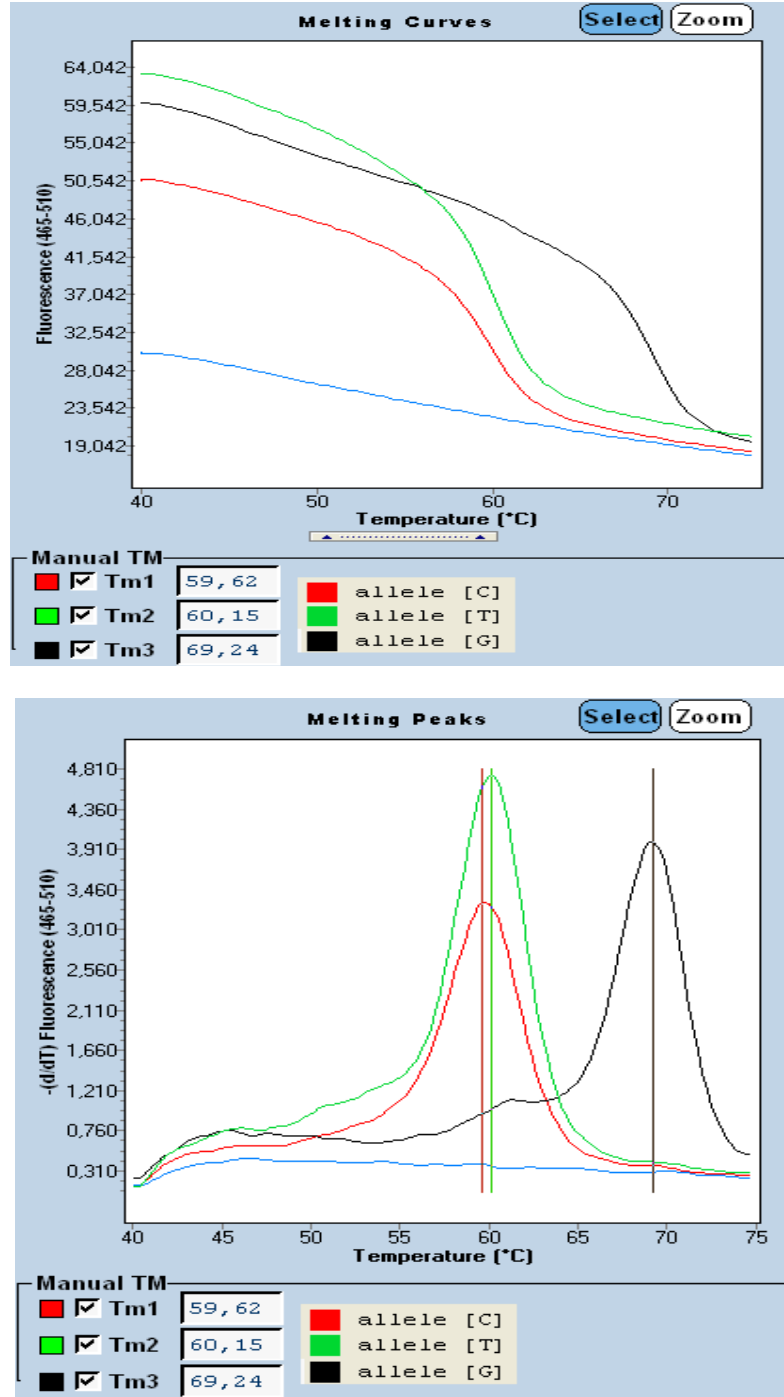
Bu aşamada 96 örnek için hazırlanmış PCR mixi 96'lık plate üzerindeki kuyucuklara, örneklerde verilen numara sırasına göre yüklenmiştir. Daha sonra bu plate Real Time PCR cihazındaki hazneye yerleştirildi ve LightCycler® 480 II cihazı için gerekli cihaz ayarlamaları yapıldıktan sonra çalıştırıldı. Elde edilen verilerdeki Melting Curve eğrileri ve Melting Peakleri ekrandan izlenmiştir. Cihazın çalışması için gerekli döngüler ve zaman ayarlamaları Çizelge 3.3. gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. LightCycler 480 II cihazının ayarlanması

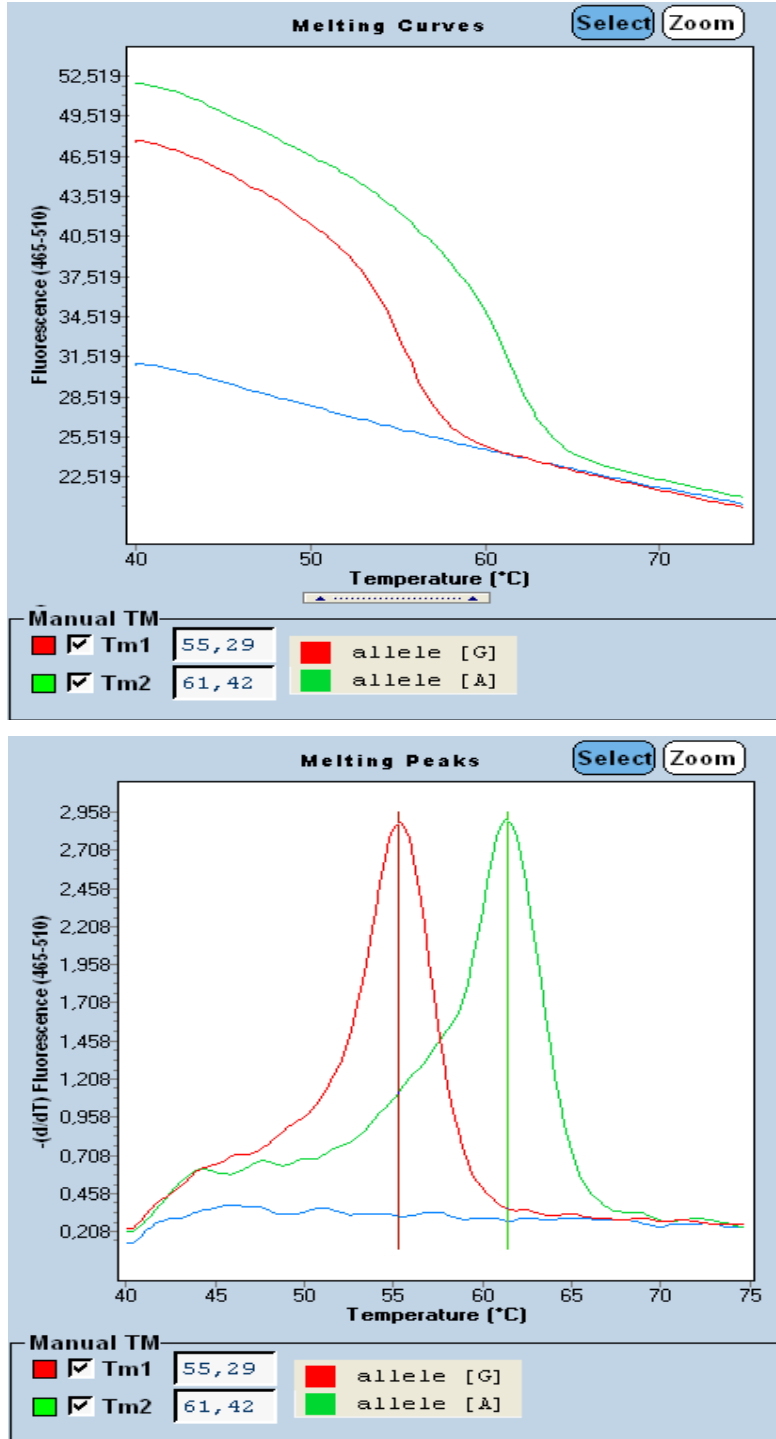
Program:	Denaturation	Cycling			Melting			Cooling
Parameter								
Analysis Mode	None	Quantification			Melting Curves			None
Cycles	1	45			1			1
Segment	1	1	2	3	1	2	3	1
Target [°C]	95	95	60	72	95	40	75	40
Hold [hh:mm:ss]	00:10:00	00:00:10	00:00:10	00:00:15	00:00:30	00:02:00	00:00:00	00:00:30
Ramp Rate [°C/s] 384	4.6	4.6	2.4	4.6	4.6	2.0	-	2.0
Ramp Rate [°C/s] 96	4.4	4.4	2.2	4.4	4.4	1.5	-	1.5
Acquisition Mode	None	None	Single	None	None	None	Continu.	None
Acquisitions [per °C]							3	

LightCycler® 480 II cihazı ile analizi yapılan mutasyonlar varlığında oluşması beklenen Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve T_m (Melting Temperature) değerleri Şekil 3.7. ve Şekil 3.8 de gösterilmiştir. Melting Peaks değerlerinin görüldüğü ekranda oluşan pik sadece sağda ise homozigot mutant allele, oluşan pik hem sağ hem sol tarafta ise heterozigot mutant allele eğer sadece solda pik oluşmuş ise homozigot wild-type allele sahip olduğu göstermektedir.

DNA saflaştırılması, LightSNip G6PD mutasyon kitlerinin kullanıma hazırlanışı, PCR mix hazırlanması ve Real Time PCR cihazının kullanımı, verilerin okunması ve değerlendirme işlemi üretici firmanın talimatlarına göre yapılmıştır.



Şekil 3.7. LightSNiP rs72554665 (1376 G>T>C arg459leu & arg459pro mutasyonlarının kiti) kitinin Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm değerleri (Roche 2005).



Şekil 3.8. LightSNiP rs72554664 (1388 G>A (arg463his) mutasyon kiti) kitinin Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm değerleri(Roche 2005)

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

G6PD geninin primer yapısının bilinmesi, mutasyon saptama yöntemindeki gelişmeler, PCR teknolojisinin etkin mutasyonları belirlemede kullanılabilmesi, G6PD geninin farklı bölgelerinin çoğaltılmasında kullanılan spesifik primerlerin tasarlanıp geliştirilmesi gibi bu alandaki gelişmeler G6PD varyantlarını moleküler düzeyde tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Bu bakımdan biyokimyasal düzeyde saptanan farklılıkların gen düzeyinde geçerli olup olmadığı, farklılıkları yansıtıp yansıtmadığı veya mutasyonlarla G6PD enzim eksikliğinin yol açtığı sağlık sorunları arasındaki bağlantılar açısından son derece önemli bulgulara ulaşılmıştır. 1980'li yıllardan başlayarak biyokimyasal varyantların oluşumuna yol açan DNA düzeyindeki değişiklikler üzerinde çalışılmaya başlanmıştır. 442 biyokimyasal varyantın kökende 60 moleküler varyanttan köken aldığı saptanmıştır (Beutler 1994).

G6PD varyantlarının DNA teknolojisini kullanarak moleküler düzeyde tanımlanan biyokimyasal teknolojilere üstünlüğünün, DNA örneklerinin kandaki enzimden daha stabil olması ve varyantların daha doğru ve güvenilir şekilde saptanabilmesi olduğu açıklanmıştır. Bunun yanı sıra G6PD enzim eksikliği saptanan olgular, enzim eksikliği düzeyine, buldukları coğrafik bölgeye ve soy ağacına ilişkin veriler doğrultusunda bu eksikliğe yol açan mutasyonlar belirlenebilmektedir (Beutler 1992, 1994).

G6PD geninde oluşan mutasyonların tanımladığı varyantlar, değişik düzeylerde sağlık sorunlarına yol açar. Tanımlanan mutasyonların çoğunu nokta mutasyonlar ve delesyonlar oluşturmaktadır.

Epidemiyolojik verilere göre, G6PD eksikliğinin yaygın olduğu bölgelerde sıtma hastalığının daha sık görüldüğünü gösterilmektedir. Ayrıca talesemi ve orak hücreli aneminin bulunduğu bölgelerde de, G6PD enzim eksikliğine daha sık rastlanması bu üç rahatsızlığın birlikte görüldüğünü göstermiştir. Bundan dolayı çoğu çalışmalar bu üç kalıtsal hastalıkla birlikte taranarak, aralarında ilişki saptanmaya çalışılmıştır (WHO 1985, Oppenheim ve ark. 1993).

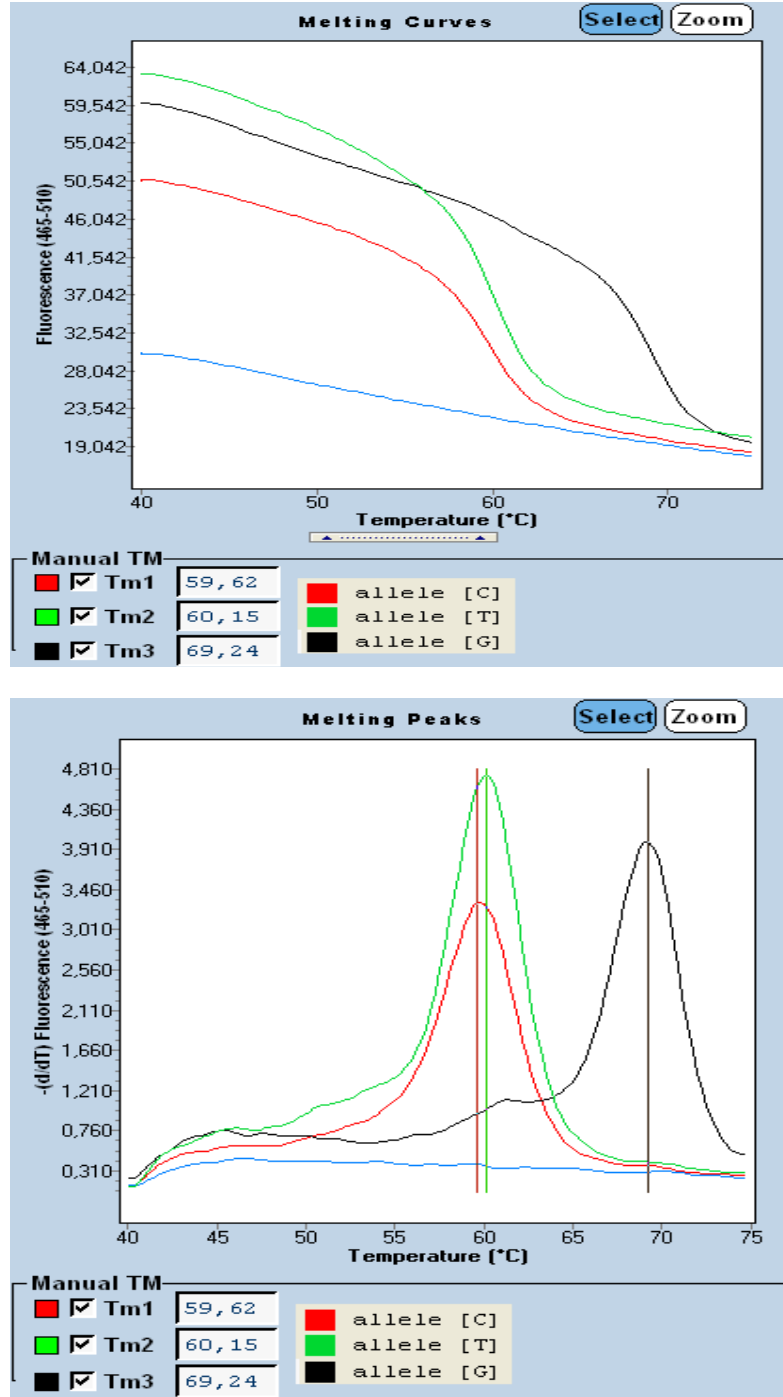
α -Talesemnin G6PD eksikliği olan bebeklerde hiperbilirubinemiye eğilimi arttıran bir etken olabileceği düşünülmüştür. Ancak α -talesemi ile birlikte G6PD

eksikliği olan bebeklerin serum bilirubin düzeyleri ve hiperbilirubinemi sıklığının sadece G6PD eksikliği olan bebeklerden farksız olduğu da saptanmıştır (Meloni ve ark. 1980).

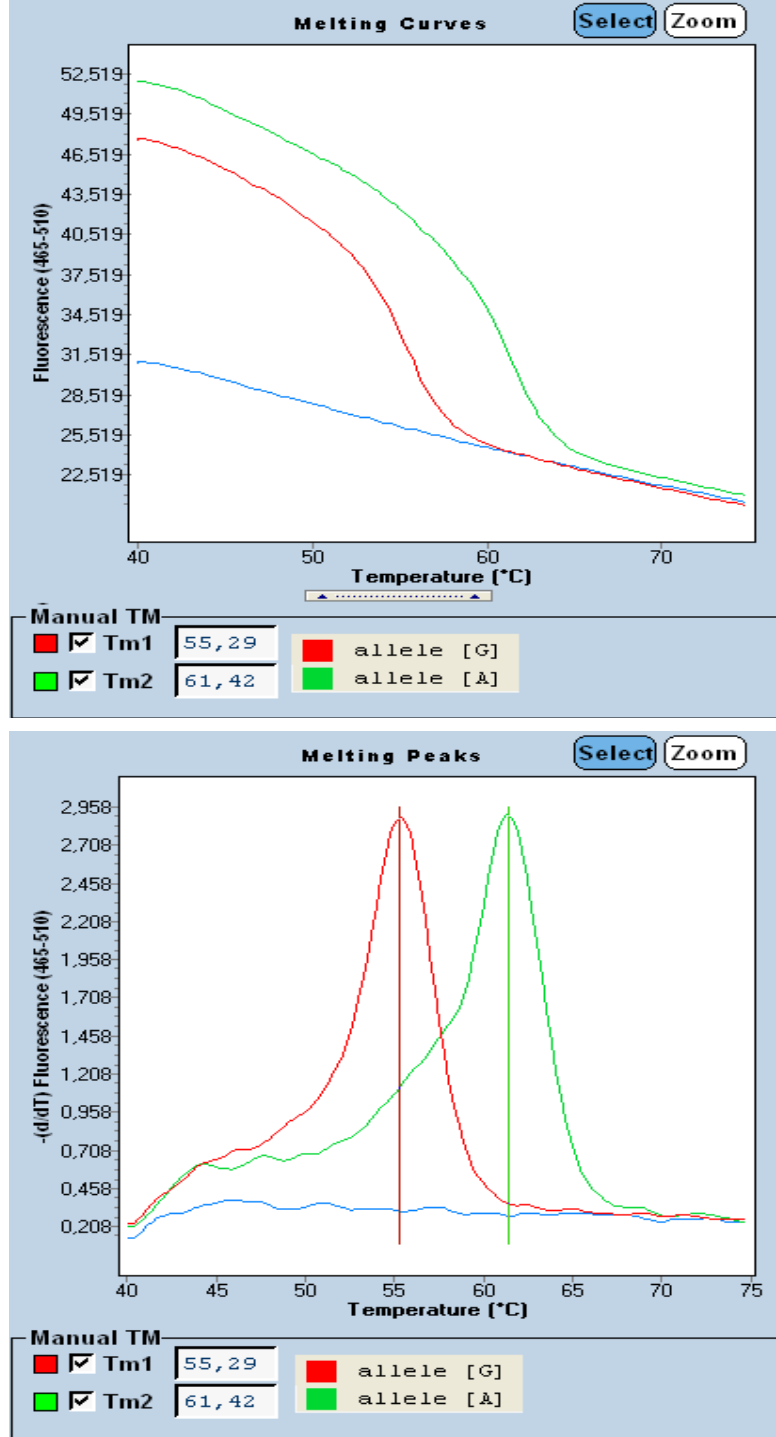
Uzakdoğu mutasyonlarından en fazla bilineni G6PD Canton'dur ve 1376. nükleotitte bir mutasyon içermektedir (Stevens ve ark. 1990, Beutler 1992). Farklı biyokimyasal varyantlar olarak tanımlanan Taiwan-Hakka, Agrigento ve Gifu tiplerinin hepsinin G6PD Canton ile aynı mutasyonu taşıdıkları bulunmuştur. Aynı şekilde sınıf-2 grubu enzim eksikliğine yol açan Kaiping, Anant, Dhon varyantlarının hepsi ortak tek bir mutasyon taşıdıkları bulunmuştur (Beutler 1994). Ayrıca G6PD Canton'un tehlikeli düzeyde hiperbilirubinemi nedeni olduğu bildirilmiştir (Bienzele ve ark. 1976).

Çalışmamız D.bakır'da G6PD özellikleri bilinmeyen kişilerde enzim eksikliğinin mutant allellerinin belirlenmesi yönünde yapılan ilk moleküler çalışmadır. Diyarbakır bölgesinde G6PD enzim eksikliğine yol açan varyantların moleküler temelini bilinmemesi, yapılan çalışmanın bölgeye ekonomik anlamda katkı sağlayacağı düşüncesi ve bölgede G6PD konusunda ileride yapılacak çalışmalara da önemli bir katkı sağlayacağı düşüncesiyle bu çalışma yapılmıştır.

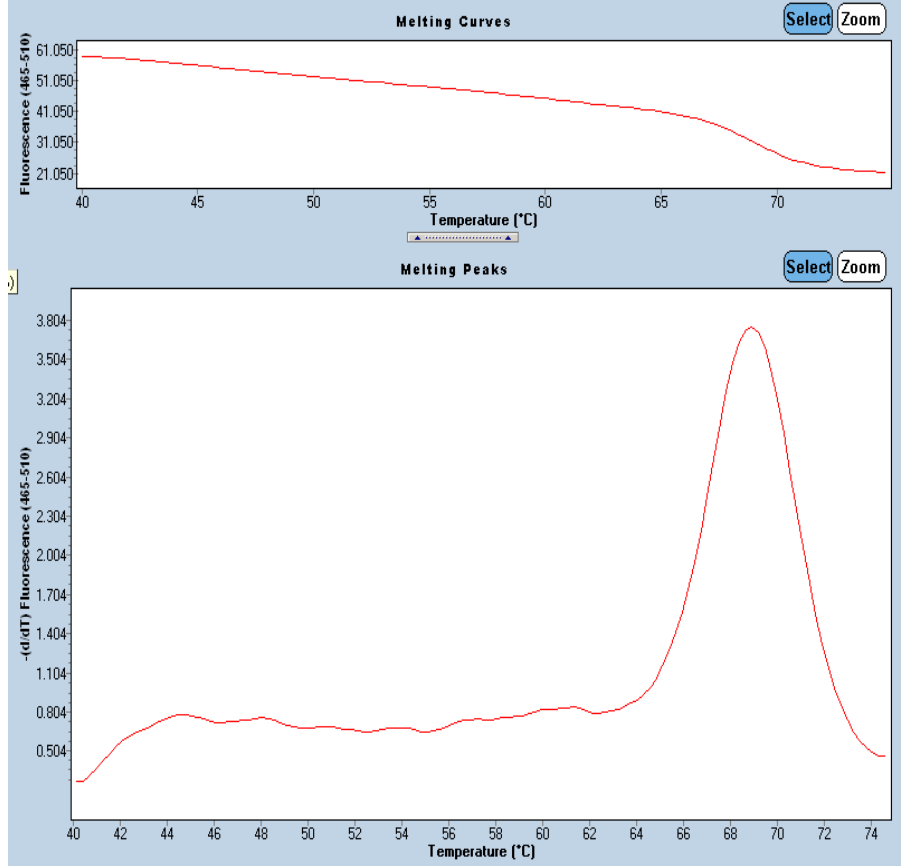
LightCycler® 480 II cihazı ile analizi yapılan mutasyonlar varlığında oluşması gereken Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm (Melting Temperature) değerleri şekil 4.1. ve şekil 4.2.'de gösterilmiştir (Roche 2005). Bulduğumuz eğrilerde pik değerleri gözlenmemiştir (Şekil 4.3.). Yapılan bu çalışma sonucunda bölgemizde Canton 1376G>T (p.Arg459Leu), Kaiping 1388G>A (p.Arg463His) ve Gaohe 95A>G (p.His32Arg) mutasyonlarına rastlanmamıştır.



Şekil 4.1. LightSNiP rs72554665 (1376 G>T>C arg459leu & arg459pro mutasyonlarının kiti) kitinin Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm değerleri (Roche 2005)



Şekil 4.2. LightSNiP rs72554664 (1388 G > A (arg463his) mutasyon kiti) kitinin Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm değerleri (Roche 2005)



Şekil 4.3. Çalışmada bulunan Melting Curve eğrileri, Melting Peakleri ve Tm değerleri

Kalıtsal metabolik rahatsızlıklar, insan yaşamında doğrudan veya koşullara bağlı olarak değişik düzeylerde sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Ancak kalıtsal hastalıklarla ilgili güncel bilimsel bilgi ve teknolojinin doğru kombinasyonunu oluşturulup uygulandığında, bu sağlık sorunlarının ortaya çıkması önlenmektedir. G6PD eksikliği bu tür kalıtsal metabolik hastalıklardan biridir. G6PD enzimi eksik olan kişilerin büyük bir kısmı asemptomatiktir. Klinik bulgu saptananlarda en sık karşılaşılan yenidoğan sarılığı dışında hemolitik anemidir. Bazı ilaçların ve besinlerin alınımıyla ölümcül olabilen akut hemolitik krize yol açar. Ayrıca doğum sonrası gelişen ciddi yenidoğan sarılığının nedenlerinden biridir. Bununla beraber G6PD enzim eksikliğinin yol açtığı bu sağlık sorunları, risk altındaki aileler doğum öncesinde veya sonrasında erken tanı ile saptandığında kesin olarak önlenebilmektedir (WHO 1989, Beutler 1994).

Bu nedenlerden dolayı bölgemizde ciddi düzeydeki G6PD eksikliğini moleküler düzeyde çalışmak, hastalığın zararlı ve ölümcül etkilerini önlemek için bilimsel verilerden yola çıkarak, ilgili alandaki güncel teknolojik gelişimi bölgeye kazandırmak

üzere bu çalışma yapılmıştır. Ayrıca bölgemizde bu tür bir çalışmanın yapılmamış olması da bu tercihi, uygulama alanına koymanın gerekliliğini göstermiştir.

Enzim eksiklikleri içerisinde en yüksek insidansı gösterdiği bilinen G6PD enzim eksikliğinin, yeryüzünde 400 milyondan fazla insanı etkilediği rapor edilmiştir. Başta sıtmanın yaygın olduğu tropikal bölgeler olmak üzere Afrika ve Akdeniz bölgesinde yoğunlaştığı görülmektedir. Dünyada bu güne kadar 400'ün üzerinde varyantı rapor edilmişken Ülkemizde bunların 20'ye yakını tespit edilmiş olup, büyük bir kısmı Çukurova ve Antalya bölgesinde saptanmıştır (WHO 1989, Beutler 1990).

Görüldüğü gibi G6PD enzimi canlılar için hayati bir önem taşımaktadır ve inhibisyonu durumunda çok ciddi sağlık problemleri ortaya çıkmaktadır. Dolayısıyla yaptığımız bu çalışmanın önemi açıktır.

Gelişen moleküler tanı yöntemleri sonucu DNA düzeyindeki çalışmalar çok hızlı kullanım alanı bulmuştur. G6PD enzim eksikliği genetik olarak heterojeniteye sahiptir. Aynı mutasyon farklı kişilerde farklı klinik belirti gösterdiği için bazı mutasyonlar kronik hemolitik anemiye neden olurken bazı olgularda ise hemoliz görülmektedir (Bruggen ve ark. 2002, Maffi ve ark. 2002).

Ching-Shan Huang ve arkadaşları (1996) bilinen dokuz mutasyonun tespiti için 4277 erkek ve 3771 kadın üzerinde G6PD aktivite taraması yapmışlardır ve bu taramada 112 erkek ve 50 kadında G6PD enzim eksikliğine rastlamışlardır. Bu örneklerden alınan tam kan örnekleri PCR ile modifiye edilmiştir. PCR amplifikasyonları DNA termal cyclers aletiyle gerekli prosedürlere uyularak yapılmıştır. PCR-SSCP yöntemi ile nt-871 mutasyonunu bulmuşlardır. Bunun yanı sıra 112 erkek üzerinde yaptıkları çalışmalarda çeşitli mutasyonların frekanslarını bulmuşlardır.

Ainoon ve arkadaşları (2002) Malezya'da 86 yenidoğan erkeğin kordon kan örneklerinden G6PD tanısı için DNA analizleri yapılmıştır. Bu analizler için PCR teknikleri, SSCP ve DNA dizi analizi kullanmışlardır. High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche) ile üretici firmanın talimatlarına göre örneklerin periferik kanlarından DNA izole edilmiştir. DNA amplifikasyon ve restriksiyon enzim analizi için

DNA termal cyclus cihazı kullanmışlardır. Bu işlemler sonunda 871G>A (G6PD Viangchan), 563 C>T (G6PD Mediterranean), 487G>A (G6PD Mahidol), 1376G>T (G6PD Canton), 383T>C (G6PD Vanua Lava), 592C>T (G6PD Coimbra), 1388G>A (G6PD Kaiping), 1360C>T (G6PD Union), 1003G>A (G6PD Chatham), 131C>G (G6PD Orissa) ve 1361G>A (G6PD Andalus) mutasyonlarını bulmuşlardır.

Chen ve arkadaşları (2010) Çin'de Shenzhen Çocuk Hastanesi'nde yaşları 0.1 ila 12 arasında değişen 104 çocuk üzerinde Çin'de görülen 17 mutasyonu araştırmışlardır. Bu araştırma için RT-PCR ve denatüre gradient jel elektroforezi (DGGE) yöntemini kullanmışlardır. Sonuç olarak 95A>G, 392G>T, 473G>A, 517T>C, 871G>A, 1024T>C, 1360C>T, 1376G>T, 1388G>A mutasyonları bulunmuştur.

Bizim çalışmamızda Real-Time PCR yöntemi kullanılmıştır. Bizim bu yöntemi kullanmadaki amacımız G6PD genindeki mutasyonları moleküler düzeyde genetik olarak incelemek ve bu gen mutasyonlarının bölgemizdeki dağılımını doğru bir şekilde tespit etmektir. Kullanılan yöntem hızlı ve güvenilir olup, sonuçlar kısa sürede alınabilmektedir. Çalışmamızda G6PD enzim eksikliğinin moleküler boyutu araştırılmıştır. Çalışmada Çin'de görülen Canton 1376 G>T (p.Arg459Leu), Kaiping 1388 G>A (p.Arg463His) ve Gaohe 95 A>G (p.His32Arg) mutasyonlarına rastlanmamıştır.

Bizim çalışmamızdaki sonuçlarla diğer çalışma sonuçları arasındaki farklılıkların nedeni, çalışmamızda sınırlı sayıya mutasyonun çalışılmış olması, hasta seçim kriterine bağlı olabileceği gibi diğer mutasyonların çalışılmamış olması ve bölgemize spesifik mutasyonların da olabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple çalışmamızın devamında çalışılmamış mutasyonların tespiti planlanmaktadır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Dünyada oldukça yaygın şekilde görülen G6PD eksikliğine, Orta Doğu ve Akdeniz ülkesi olan Türkiye’de özellikle doğu ve güney kesimlerde rastlanmaktadır. Bu hastalığı taşıyanların belirlenmesi ve bu kişilerin tedavisinde oksidan özelliği bulunan ilaçların kullanımından sakınılması veya dikkatle kullanılması önemlidir.

Yapılan araştırmalarda G6PD enzim eksikliğinin neden olduğu yenidoğan sarılıklarında kernikterus riskinin arttığı görüşü ortaya çıkmıştır. Ülkemizde yapılan bir çalışmada, G6PD enzim eksikliği kernikterusla sonuçlanan indirekt hiperbilirubinemiye yol açan bir enzim eksikliğidir, sonucuna da varılmıştır (Atay ve ark. 2005). Oman’da yapılan bir çalışmada G6PD eksikliğinin kernikterus riskini arttırdığı da saptanmıştır (Nair ve Al Khusaiby 2001).

Yapılmış olan bu proje tanımlanan sınırlar içerisinde Dünya Sağlık Örgütü G6PD Eksikliği Çalışma Komitesi’nin güncelleştirilmiş uluslar arası standartlarına ve bilimin evrensel kriterlerine uyularak yürütülmüştür. Yapılan bu çalışma sonucunda bölgemizde G6PD Canton, Kaiping, Gaohe mutasyonlarına rastlanmamıştır. Ayrıca bu çalışma bölgemizde moleküler düzeyde yapılan ilk çalışmadır.

Çalışmamızda gen seviyesinde bir mutasyon olup olmadığı araştırılmıştır. Çalışmamızın G6PD enzim eksikliğinin tedavi yaklaşımı ve ailelere genetik danışmanlık açısından oldukça önemli olduğu düşüncesiyle birlikte daha fazla olgu saptanarak diğer mutasyonların da araştırılmasının gerekliliğini ve bu çalışmanın, ileride yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalara önemli bir katkı sağlayacağını düşünmekteyiz. Yine ülkemizde G6PD eksikliği hastalığının yayılımının belirlenmesi önemli olup bu amaçla ciddi edipemiyolojik araştırmaların yapılması gerekmektedir. Çünkü ülkemizde daha çok bölgesel ve dar kapsamlı çalışmalar vardır.

6.KAYNAKLAR

- Abbas, A., Lepelley, M., Lechevrel M., Sichel, F. 2004. Assessment of DHPLC usefulness in the genotyping of GSTP1 exon 5 SNP: comparison to the PCR-RFLP method. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 59(2): 121-126.
- Ahsen, N., Armstrong, V. W., Oellerich, M. 2004. Rapid, Long-Range Molecular Haplotyping of Thiopurine S-methyltransferase (TPMT) *3A, *3B, and *3C. *Clinical Chemistry*, 50: 9.
- Ahsen, N., Oellerich, M., Schütz E. 2000. Use of Two Reporter Dyes without Interference in a Single-Tube Rapid-Cycle PCR: α 1-Antitrypsin Genotyping by Multiplex Real-Time Fluorescence PCR with the LightCycler. *Clinical Chemistry*, 46: 156-161.
- Ainoon, O., Boo, N. Y., Yu, Y. H., Cheong, S. K., Hamidah, H. N, Amir Muhriz, A. L. 2002. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Variants in Malaysian Malays. *Human Mutations* 574.
- Ainoon, O., Boo, N. Y., Yu, Y. H., Cheong, S. K., Hamidah, H. N, Lim, J. H. 2004. Complete molecular characterisation of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in a group of Malaysian Chinese neonates. *Malays J Pathol*, 26(2): 89-98.
- Aksoy, K., Yureğir, G. T., Dikmen, N., Ünlükurt, I. 1987. Three New G6PD Variants, G6PD Adana, G6PD Samandag, And G6PD Balcali In Cukurova, Turkey. *Hum. Genet.*, 76(2): 199- 201.
- Alizadeh, M., Bernard, M., Danic, B., Dauriac, C., Birebent, B., Lapart, C., Lamy, T., Prise P. Y., Beauplet, A., Bories, D., Semana, G., Quelvennec, E. 2002. Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* June, 99(12): 4618- 4625.
- Alonso, A., Martin, P., Albarran, C., Garcia, P., Garcia, O., Simon, L. F., Garcia-Hirschfeld, J., Sancho, M., La, Rua, C., Fernandez-Piqueras, J. 2004. Real-time PCR designs to estimate nuclear and mitochondrial DNA copy number in forensic and ancient DNA studies. *Forensic Sci Int.*, 28;139 (2-3):141-9.
- Ambrosio, G., Santoro, G., Tritto, I. 1992. Effects Of Ischemia And Reperfusion On Cardiac Tolerance To Oxidative Stres. *Am J Physiol*, 262: H23-H30.
- Altikat, S., Ciftci, M., Buyukokuroglu, M. E. 2002. In Vitro Effects Of Some Anesthetic Drugs On Enzymatic Activity Of Human Red Blood Cell Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. *Pol J Pharmacol*, 54(1): 67-71.
- Antonenkov, V. D. 1989. Dehydrogenases Of The Pentose Phosphate Pathway In Rat Liver Peroxisomes. *Eur J Biochem*, 183: 75-82.

Apak, M. Y., Semerci, C. N. 2005. Tek gen hastalıkları ve genetik danışma. Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci, 1(2): 24-9.

Atay, E., Bozaykut, A., Özahi İpek, İ. 2005. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency in neonatal hyperbilirubinemia . Journal of Tropical Pediatrics, 52 : 56-58

Au, S. W., Gover, S., Lam, V. M., Adams, M. J. 2000. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. Structure, 8: 293–303.

Barletta, J. M., Edelman, D. C., Constantine, N. T. 2004. Lowering the detection limits of HIV-1 viral load using real-time immuno-PCR for HIV-1 p24 antigen. Am J Clin Pathol.,122(1): 20-7.

Barrois, M., Bieche, I., Mazoyer, S., Champeme, M. H., Bressac-de Paillerets, B., Lidereau, R. 2004. Real-time PCR-based gene dosage assay for detecting BRCA1 rearrangements in breast-ovarian cancer families. Clin Genet., 65(2):131-6.

Battistuzzi, G., D’Urso, M., Toniolo, D., Persico, G. M., Luzzatto, L. 1985. Tissue-Spesifik Levels Of Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Correlate With Methylation Of Spesifik Sites At The 3’ End Of The Gene. Proc Natl Acad Sci, 82(5): 1465-1469.

Bautista, J. M., Mason, P. J., Luzatto, L. 1992. Purification and properties of human glucose 6-phosphate dehydrogenase made in E.coli. Biochim. Biophys. Acta, 1119: 74-80.

Bennett, C. D., Campbell, M. N., Cook, C. J., Eyre, D. J., Nay, L.M., Nielsen, D. R., Rasmussen, R. P., Bernard, P. S. 2003. The LightTyper: high-throughput genotyping using fluorescent melting curve analysis. Biotechniques, 34(6):1288-92.

Beutler, E. 1978. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Editörler: Wintrobe, M. M. Red Cell Metabolism in Hemolytic Anemia, New York: Plenum Press.

Beutler, E. 1990. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Editors Williams, W. J., Beutler, E. Hematology, International edition 591-606. New York.

Beutler, E. 1992. The Molecular biology of G6PD variants and other red cell enzyme defects. Annu. Rev. Med., 43: 47-59

Beutler, E. 1994. G6PD Deficiency. Blood, 84(11): 3613-3636.

Beutler, E. 1996. G6PD: Population Genetics And Clinical Manifestations, Blood Rev, 10: 45-52

Beutler, E., Dupare, S. 2007. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency And Antimalarial Drug Development. American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene, 77(4): 779-789.

Beutler, E., Kuhl, W., Gelbart, T., Forman, L. 1991. DNA Sequence Abnormalities Of Human Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Variants. J Biol Chem, 206: 4145-4150

Beutler, E., Mathai, C. K., Smith, J. E. 1968. Biochemical variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic disease. *Blood*, 31: 131-150.

Beutler, E., Vulliamy, T. J. 2002. Hematologically Important Mutations: Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis*, 28(2): 93-103.

Beutler, E., Westwood, B., Melemed, A., Dal Borgo, P., Morgolis, D. 1995. Three New Exon 10 Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Mutations. *Blood Cells Mol Dis*, 21: 64-72.

Beutler, E., Westwood, B., Prchal, J. T., Vaca, G., Bartsocas, C. S., Baroncioni, L. 1992. New Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Mutations From Various Ethnic Groups. *Blood*, 1(80): 255-256

Bieche, I., Olivi, M., Champeme, M. H., Vidaud, D., Lidereau, R. R., Michel Vidaud, M. 1998. Novel approach to quantitative polymerase chain reaction using real-time detection: Application to the detection of gene amplification in breast cancer. *International Journal of Cancer*, 78(5): 661-666.

Bienzle, U., Effiong, C., Luzatto, L. 1976. Erythrocyte glucose-6-phosphate deficiency (G6PD Type A⁻) and neonatal jaundice. *Acta paediatr Scand*, 65: 701-703.

Bilmen, S., Aksu, T. A., Gumuslu, S., Korgun, D. K., Canatan, D. 2001. Antioxidant Capacity Of G-6-PD Efficient Erythrocytes. *Clin Chim Acta.*, 303: 83-86.

Bruggen, R., Bautista, J. M., Petropoulou, T., Boer, M., Zwieten, R., Gomez-Gallego, F., Belohradsky B. H., Hartwing, N. G., Stevens, D., Mason, P. J., Roos, D. 2002. Deletion of leucine 61 in glucose-6-phosphate leads to chronic nonspherocytic anemia granulocyte dysfunction and increased susceptibility to infections. *Blood*, 100: 1026-1030.

Boyer, S. H., Graham, J. B. 1965. Linkage between the X chromosome loci for glucose-6-phosphate dehydrogenase electrophoretic variation and hemophilia A. *Am. J. Hum. Genet.*, 17: 320-324

Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using realtime reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25:169-93.

Büyükokuroğlu, M. E., Altıkat, S., Çiftçi, M., Banoğlu, Z. N., Göçer, F. 2001. Klorpromazin ve Haloperidol'ün İnsan Eritrosit Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzimi Üzerine İnvitro Etkileri. *Klinik Psikofarmakoloji Bülteni*, 11: 101-105.

Cappellini, M. D., Montemuros, F. M., Bellis, G.D., Debernardi, S., Dotti, C., Fiorelli, G. 1996. Multiple G6PD Mutations Are Associated With A Clinical And Biochemical Phenotype Similar To That Of G6PD Mediterranean. *Blood*, 87(9): 3953-3958.

Calabro, V., Giacobbe, A., Vallone, D., Montanaro, V., Cascone, A., Filosa, S., Battistuzzi, G. 1990. Genetic Heterogeneity At The Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Locus In Southern Italy. *Hum Genet*, 86: 49-53.

Carson, P. E., Flanagan, C. L., Ickes, C. E., Alving, A. S. 1956. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*, 124: 484-485.

Champe, P.C., Harvey, R. A. 1997. Glikozaminoglikanlar. Editörler; A. Tokullugil, M. Dirican, E. Ulukaya. Lippincott's illustrated reviews serisinden: Biyokimya. İkinci baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul, s. 147-156.

Chen, X., Yue, L., Li, C., Li, C. 2010. A novel G473A mutation in the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene. *Pediatr Blood Cancer*. 55(2): 383-5.

Chen, E. Y., Cheng, A., Lee, A., Kuang, W. J., Hillier, L., Green, P., Schlessinger, D., Ciccodicola, A., D'Urso, M. 1991. Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. *Genomics*, 10: 792-800.

Childs, B., Zinkham, W., Browne, E. A., Kimbro, E. L., Torbert, J. V. 1958. A genetic study of a defect in glutathione metabolism of the erythrocytes. *Bull Johns Hopkins Hosp*, 102: 21-37.

Chun, D., Chun-Bao, G., You-Hua, X., Bing, D., Jia-Lin, Yu. 2007. Three mutations analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in neonates in South-west China. *Pediatrics International*, 49: 463-467.

Ciftci, M., Ozmen, I., Buyukokuroglu, M. E., Pence, S., Kufrevioglu, O. I. 2001. Effects Of Metamizol And Magnesium Sulfate On Enzyme Activity Of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase From Human Erythrocyte In Vitro And Rat Erythrocyte In Vivo. *Clin Biochem*, 34(4): 297-302.

Cilloni, D., Gottardi, E., De Micheli, D., Serra, A., Volpe, G., Messa, F., Rege-Cambrin, G., Guerrasio, A., Divona, M., Lo Coco, F., Saglio, G. 2002. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia*, 16(10): 2115-2121.

Cleary, T. J., Roudel, G., Casillas, O., Miller N. 2003. Rapid and Specific Detection of Mycobacterium tuberculosis by Using the Smart Cycler Instrument and a Specific Fluorogenic Probe. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(10): 4783-4786.

Cochrane, C. G. 1991. Cellular Injury By Oxidants. *Am J Med*, 3C23-3C30.

Cotron, R. S., Kumar, V., Collins, T. R. 1999. Pathological Basis Of Disease, 601-643.

Cottrell, S. E., Distler, J., Goodman, N. S., Money, S.H., Kluth, A., Olek, A., Schwoppe, I., Tetzner, R., Ziebarth, H., Berlin, K. 2004. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Res.*, 32(1): 10.

- Das, D., Banerjee, R. K. 1993. Effect Of Stress On The Antioxidant Enzymes And Gastric Ulceration. *Mol Cell Biochem*, 125: 115-125.
- De Angioletti, M., Rovira, A., Notaro, R., Camacho Vanegas, O., Sadelain, M., Luzzatto, L. 2001. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Expression Is Less Prone To Variegation When Driven By Its Own Promoter. *Gene*, 267(2): 221-231.
- Deneke, S. M., Fanburg, B. L. 1989. Regulation Cellular Glutathione. *Am J Physiol*, 257: L163-L173.
- Dietmaier, W., Hofstadter, F. 2001. Detection of microsatellite instability by real time PCR and hybridization probe melting point analysis. *Lab Invest*, 81(10): 1453-6.
- Doğan, H. 2007. Doğu Anadolu Bölgesinde hemolitik anemili çocuklarda glukoz 6-fosfat dehidrogenaz genindeki mutasyonların mikroarray sistemi ile tespiti, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ABD, Erzurum.
- Donohoe, G. G., Laaksonen, M., Pulkki, K., Rönnemaa, T., Kairisto, V. 2000. Rapid single-tube screening of the C282Y hemochromatosis mutation by real-time multiplex allele-specific PCR without fluorescent probes. *Clin Chem.*, 46(10):1540-7.
- Du, C. S., Hua, X. Y., Wu, Q. L., Li, C. Q., Zheng, J. F., Li, H. L. 1967. Studies on erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Chinese. IV. Gd(-) Gaohe associated with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Chinese J. Pathophysiol*, 1: 12-15
- Du, C. S., Xu, Y. K., Hua, X. Y., Wu, Q. L., Liu, L. B. 1988. Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants and their frequency in Guangdong, China. *Hum. Genet.*, 80: 385-388.
- Elmağaçlı, A. H. 2002. Real-time PCR for monitoring minimal residual disease and chimerism in patients after allogeneic transplantation. *Int J Hematol*. 76(2):204-5.
- Fairbanks, V. F., Klee, G. G. 1994. *Biochemical Aspects Of Hematology*, Edt.; Burtis, C. A., Ashwood, E. R. Tietz Textbook Of Clinical Chemistry, W. B. Saunders Co., 1974-1979.
- Filosa, S., Calabro, V., Vallone, D., Poggi, V., Mason, P. 1992. Molecular Basis Of Chronic Non-Spherocytic Hemolytic Anemia: A New G-6-PD Variant (393 Arg-His) With Abnormal KmG6P And Marked In Vivo Instability. *Br J Haematol*, 80: 111-116.
- Fraga, D., Meulia, T., Fenster, S. 2008. Real-Time PCR, *Current Protocol Essential Laboratory Techniques (Unit 10.3)*.
- Fumihiko, K., Hiroyuki, M., Toshio, K., Tantular, I. S., Suhintam, P., Henyo, I. K., Wera, D., Dominikus, M., Yoes, P. D. 2006. Further investigations of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Flores Island, eastern Indonesia. *J Hum Genet*, 51: 952-957
- Gabert, J., Beillard, E., van der Velden, V. H., Bi, W., Grimwade, D., Pallisgaard, N., Barbany, G., Cazzaniga, G., Cayuela, J. M., Cave, H., Pane, F., Aerts, J. L., De Micheli, D., Thirion, X., Pradel, V., Gonzalez, M., Viehmann, S., Malec, M., Saglio, G., van Dongen, J. J.

2003. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*, 17(12): 2318-57.

Gibbs, P. J., Tan, L.C., Sadek, S. A., Howell, W. M. 2003. Comparative evaluation of 'TaqMan' RT-PCR and RT-PCR ELISA for immunological monitoring of renal transplant recipients. *Transplant Immunology*, 11(1): 65-72.

Gibson, U. E., Heid, C. A., Williams, P. M. 1996. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res*, 6: 995-1001.

Ginzinger, D. G., Godfrey, T. E., Nigro, J., Moore, D. H., Suzuki, S., Pallavicini, M. G., Gray, J. W., Jensen, R. H. 2000. Measurement of DNA Copy Number at Microsatellite Loci Using Quantitative PCR Analysis. *Cancer Research*, 60; 5405.

Giulietti, A., Overbergh, L., Valckx, D., Decallonne, B., Bouillon, R., Mathieu, C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *PubMed*, 25(4): 386-401.

Goldin, E., Ardite, E., Elizalde, J. I. 1997. Gastric Mucosal Damage In Experimental Diabetes In Rats: role of endogenous glutathione. *Gastroenterology*, 112: 855-863.

Guindo, A., Fairhurst, R. M., Doumbo, O. K., Wellems, T.E., Diallo, D. A. 2007. X-linked G6PD deficiency protects hemizygous males but not heterozygous females against severe malaria. *Plos Med.*, 4(3): 516 - 522.

Gupta, M., Song, P., Yates, C.R., Meibohm, B. 2004. Real-time PCR-based genotyping assay for CXCR2 polymorphisms. *Clinica Chimica Acta*, 341(1): 93-100.

Gurbuz, N., Aksu, T. A., Van Noorden, C. J. 2005. Biochemical And Cytochemical Evaluation Of Heterozygote Individuals With Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Acta Histochem*, 107(4): 261-267.

Gürbüz, N. 2003. Glukoz -6-Fosfat Dehidrogenaz (G6PD) Yetmezliğinde Heterozigot Vakaların Eritrosit Deformabilitesi Ölçümü ve G6PD Boyanması tekniği ile Değerlendirilmesi, Yüksek Lisans Tezi, Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya ABD, Antalya.

Hansen, R. S., Canfield, T. K., Fjeld, A. D., Gartler; S. M. 1996. Role of late replication timing in the silencing of X-linked genes. *Hum Mol Genet.*, 5(9): 1345-1353.

Harries, L. W., Wickham, C. L., Evans, J. C., Rule, S. A., Joyner, M. V., Ellard, S. 2005. Analysis of haematopoietic chimaerism by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant*, 35(3):283-90.

Hazbon, M. H., Hairpin, D. A. 2004. Primers for Simplified Single-Nucleotide Polymorphism Analysis of Mycobacterium tuberculosis and Other Organisms. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(3): 1236-1242

He, L., Chinnery, P. F., Durham, S. E., Blakely, E. L., Wardell, T. M., Borthwick, G. M., Taylor, R. W., Turnbull, D. M. 2002. Detection and quantification of mitochondrial DNA deletions in individual cells by real-time PCR. *Nucleic Acids Res.*, 15;30(14): 68.

Herrmann, M. G., Durtschi, J. D., Bromley, L. K., Wittwer, C. T., Voelkerding, K. V. 2006. Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping: Cross-Platform Comparison of Instruments and Dyes. *Clinical Chemistry*, 52(3): 494-503.

Hirono, A., Kuhl, W., Gelbart, T., Formon, L., Fairbanks, V. F., Beutler, E. 1989. Identification Of The Binding Domain For NADP+ Of Human Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase By Sequence Analysis Of Mutants. *Proc Natl Sci*, 86(24): 10015-10017.

Hollenberg, P. F. 1992. Mechanisms Of Cytochrome P-450 And Peroxidase-Catalyzed Xenobiotic Metabolism. *Fasep J*, 686-694.

Huang, C. S., Hung, K. L., Huang, M. J., Li, Y. C., Liu, T. H., Tang, K.T. 1996. Neonatal Jaundice and Molecular Mutations in Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficient Newborn Infants. *American Journal of Hematology*, 51 :19-25.

Human Gene Mutation Database (AGMD). Erişim: [http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php] Erişim Tarihi: 22.05.2010

Hunsdoerfer, P., Vetter, B., Klozik, A. E. 2002. Chronic Hemolytic Anemia And G-6-PD Deficiency. *Acta Haematol*, 108: 102-105.

Iwai, K., Hirono, A., Matsuoka, H., Kawamoto, F., Horie, T., Lin, K., Tantular, I. S., Dachlan, Y. P., Notopuro, H., Hidayah, N. I., Salim, A. M. A., Fujii, H., Miwa, S., Ishii, A. 2001. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Southeast Asia. *Hum. Genet*, 108: 445-449.

Izawa, S., Maeda, K., Miki, T., Mano, J., Inoue, Y., Kimura, A. 1998. Importance Of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase In The Adaptive Response To Hydrogen Peroxide In *Saccharomyces Cerevisiae*. *Biochem J*, 330: 811-817.

Kanavakis, E., Traeger-Synodinos, J., Vrettou, C., Maragoudaki, E., Tzetis, M., Kattamis, C. 1997. Prenatal diagnosis of the thalassaemia syndromes by rapid DNA analytical methods. *Mol Hum Reprod*, 3(6):523-8.

Kariyazono, H., Ohno, T., Ihara, K., Igarashi, H., Joh, K., Ishikawa, S., Hara, T. 2001. Rapid detection of the 22q11.2 deletion with quantitative real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 15(2): 71-73

Kayaalp, S. O. 1998. Rasyonel Tedavi Yönuinden Tıbbi Farmakoloji, Feryal Matbaacılık, Sayfa: 153-154. Ankara.

Kayaalp, S. O. 2000. Rasyonel Tedavi Yönuinden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe Taş Kitapcılık, Yayın No: 9, Sayfa: 155-156. Ankara

Kearns, A.M., Graham, C., Burdess, D., Heatherington, J., Freeman R. 2002. Rapid Real-Time PCR for Determination of Penicillin Susceptibility in Pneumococcal Meningitis, Including Culture-Negative Cases. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(2): 682-684.

Kotaka, M., Gover, S., Vandeputte-Rutten, L., Au, S. W., Lam, V. M., Adams, M. J. 2005. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 61: 495–504.

Kraus, G., Cleary, T., Miller, N., Seivright, R., Young, A.K., Spruill, G., Hnatyszyn, H.J. 2001. Rapid and specific detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex using fluorogenic probes and real-time PCR. *Molecular and Cellular Probes*, 15(6): 375-383

Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27: 95-125.

Kurdi-Haidar, B., Mason, P. J., Berrebi, A., Ankra-Badu, G., Al- Ali, A., Oppenheim, A., Luzzatto, L. 1990. Origin And Spread Of The Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Variant (G6PD-Mediterranean) In The Middle East. *Am J Hum Genet*, 47(6): 1013-1019.

Laosombat, V., Sattayasevana, B., Chotsampancharoen, T., Wongchanchailert, M. 2006. Glucose -6-Phosphate Dehydrogenase Variants Associated with Favism in Thai Children. *International Journal of Hematology*, 83: 139-143

Laurendeau, I., Bahuau, M., Vodovar, N., Larramendy, C., Olivi, M., Bieche, I., Vidaud M., Vidauda, D. 1999. TaqMan PCR-based Gene Dosage Assay for Predictive Testing in Individuals from a Cancer Family with INK4 Locus Haploinsufficiency. *Clinical Chemistry*, 45: 982-986.

Lawrence, D. R., Bennett, P. N., Brown, M. J. 1997. Editors;. Unwanted effects and adverse drug reactions. In Lawrence, D. R., Bennett, P. N., Brown, M. J. *Clinical Pharmacology* 8th Edn Longman Singapore Publishers, 121–137 Singapore.

Levy, H. R. 1979. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenases, Meister, A. Edt.; *Advan Enzymol*, John Wiley And Sons Inc., 48: 97-191. New York.

Lind, K., Kubista, M. 2005. Development and evaluation of three real-time immuno-PCR assemblages for quantification of PSA. *J Immunol*, ;304(1-2):107-16.

Linzmeier, R. M., Ganz, T. 2005. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in alpha- and beta-defensin regions at 8p22-p23. *Genomics*, 86(4):423-30.

Litz, C. E., Mc Clure, J. S., Burning, R. D. 1996. *Blood And Bone Marrow*. Edt. Damjanov, I., Linder, J. *Anderson's Pathology*, Mosby-Year Book, 1063-1114. Missouri Liu, C. S., Tsai, C. S., Kuo, C. L., Chen, H. W., Lii, C. K., Ma, Y. S., Wei, Y. H. 2003. Oxidative

stress-related alteration of the copy number of mitochondrial DNA in human leukocytes. *Free Radic Res.*, 37(12):1307-17.

Lohmann, S., Lehmann, L., Tabiti, K. 2000. Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System. Erişim: [http://www.roche-applied-science.com/PROD_INF/BIOCHEMI/no4_00/PDF/23-28.pdf]. Erişim tarihi: 12.12.2010

Long, K. S., Roll, B., Myssina, S., Schittenhelm, M. 2002. Enhanced Erythrocyte Apoptosis In Sickle Cell Anemia, Thalassemia And G6PD Deficiency, *Cell Physiol Biochem*, 12: 365-12

Lovatt, A. 2002. Applications of quantitative PCR in the biosafety and genetic stability assessment of biotechnology products. *J Biotechnol*, 82(3):279-300.

Luzzatto, L. 1987. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase: Genetic Haematological Aspects. *Cell Bio Fun*, 5: 101-107.

Luzzatto, L. 1999. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency And Hemolytic Anemia, Edt;. Nathan, D. G.; Orkin, S. H. , 704-726. W. B. Saunders Co, Philadelphia

Luzzatto, L., Mehta, A. 1995. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. Editors;. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*. New York: McGraw-Hill, 3367–3398.

Luzzatto, L., Metha, A., Vulliamy, T. 2001. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. Editörler;. In: Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S . *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, 8th edn. Columbus: McGraw-Hill, 4517–53.

Luzzatto, L., Usanga, E. A., Reddy, S. 1969. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science*, 164: 839-842.

Lyon, E. 2001. Mutation detection using fluorescent hybridization probes and melting curve analysis. *Expert Rev Mol Diagn*, (1): 92-101.

Mackay, I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect*, 10(3): 190-212

Maeda, M., Constantoulakis, P., Chen, C. S., Stamatoyannopoulos, G., Yoshida, A. 1992. Molecular abnormalities of a human glucose 6-phosphate dehydrogenase variant associated with undetectable enzyme activity and immunologically crossreacting material. *Am. J. Hum. Genet.*, 51: 386-395.

Maffi, D., Pasquino, M. T., Caforio, M. P., Sorrentino, F., Cappabianca, M. P., Salvati, A. M.. 2002. Identification of G6PD Mediterranean mutation by amplification refractory mutation system. *Clinica Chimica Acta.*, 321: 43-47.

Martinez di Montemuros, F., Dotti, C., Tavazzi, D., Fiorelli, G., Cappellini, M. D. 1997. Molecular Heterogeneity Of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Variants In Italy. *Haematologica*, 82(4): 440-445.

Martini, G., Toniolo, D., Vulliamy, T. 1986. Structural Analysis Of The X-Linken Gene Encoding Human Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. *EMBO J*, 5(8): 1849-1855.

Martini, G., Ursini, M. V. 1996. A New Lease Of Life For An Old Enzyme. *Bioessays*, 18: 631-637.

Matsuoka, H., Arai, M., Yoshida, S., Tantular, I. S., Pusarawati, S., Kerong, H., Kawamoto, F. 2003. Five different glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants found among 11 G6PD-deficient persons in Flores Island, Indonesia. *J Hum Genet*, 48: 541-544.

Mc Curdy, P. R., Kirkman, H. N., Naiman, J. L., Jim, R. T. S., Pickard, B. M. 1966. A Chinese variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Lab. Clin. Med.*, 67: 374-385.

Mc Milan, D. C., Bolchoz, L. J., Jollow, D. J. 2001. Favizm: effect of divicine on rat erythrocyte sulfhydryl status, hexose monophosphate shunt activity, morphology, and membrane skeletal proteins. *Toxicol Sci.*, 62(2): 353-359.

Meister, A., Anderson, M. E. 1983. Glutathione. *Ann Rev Biochem*, 52: 711-760.

Mehta, A., Mason, P. J., Vulliamy, T. J. 2000. Glucose 6- Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Bailliers Best Practice & Research Clinical Haematology*, 13(1): 21-38.

Meister, A. 1983. Selective Modification Of Glutathione Metabolism. *Science*, 220: 472-477.

Meister, A. 1994. Glutathione, Ascorbate And Cellular Protection. *Cancer Res*, 954: 1969-1975.

Meloni, T., Corti, R., Costa S., Mele, G., Franca, V. 1980. α -Thalassaemia and hyperbilirubinaemia in G6PD deficient newborns. *Arch Dis Child*, 55 (6): 482-484.

Mengelle, C., Pasquier, C., Rostaing, L., Sandres-Saune, K., Puel, J., Berges, L., Righi, L., Bouquies, C., Izopet, J. 2003. Quantitation of human cytomegalovirus in recipients of solid organ transplants by real-time quantitative PCR and pp65 antigenemia. *J Med Virol*, 69(2): 225-31.

Menounos, P. G., Garinis, G. A., Patrinos, G. P. 2003. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency Does Not Result From Mutations In The Promoter Region Of The G6PD Gene. *J Clin Lab Anal*, 17(3): 90-92

Menounos, P. G., Zervas, C., Garinis, G. A., Doukas, C., Kolokithopoulos, D., Tegos, C., Patrinos, G. P. 2000. Molecular Heterogeneity Of The Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency In The Hellenic Population. *Hum Hered*, 50(4): 237-241.

Mhlanga, M. M., Malmberg, L. Using molecular beacons to detect single-nucleotide polymorphisms with real-time PCR. *PubMed*, 25(4): 463-71.

Michael Adler, M., Ron Wacker, R., Niemeyer, C. M. 2003. A real-time immuno-PCR assay for routine ultrasensitive quantification of proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 308(2): 240-250.

Miwa, S., Fujii, H. 1996. Molecular basis of erythroenzymopathies associated with hereditary hemolytic anemia: tabulation of mutant enzymes. *Am. J. Hemat.* 51: 122-132.

Mocellin, S., Rossi, C. R., Pilati, P., Nitti, D., Marincola, F. M. 2003. Quantitative real-time PCR: a powerful ally in cancer research. *Trends Mol Med*, 9(5): 189-95.

Nair, K. A. P., Al Khusaiby, S. M. 2001. Kernicterus and G6PD Deficiency- a case series from Oman. *Journal of Tropical Pediatrics* 49(2) : 74-77 .

Nelson, D. L., Cox, M. M. 2005. *Lehninger Principles Of Biochemistry*, 551-557.

Niesters, H.G. Quantitation of viral load using real-time amplification techniques. 2001. *PubMed*, 25(4):419-29.

Noori-Dalooi, M. R., Najafi, L., Mohammad Ganji, S., Hajebrahimi, Z., Sanati, M. H. 2004. Molecular Identification Of Mutations In G6PD Gene In Patients With Favism In Iran. *J Physiol Biochem*, 60(4): 273-277.

Nuchprayoon, I., Sanpavat, S., Nuchprayoon, S. 2002. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) Mutations in Thailand: G6PD Viangchan (871G>A) Is the Most Common Deficiency Variant in the Thai Population. *Hum Mutat.*, 19(2):185.

Oppenheim, A., Jury, C. L., Rund, D., Vulliamy, T. J., Luzzatto, L. 1993. G6PD Mediterranean accounts for the high prevalence of G6PD deficiency in Kurdish Jews. *Hum. Genet.*, 91: 293-294.

Ozmen, I., Ciftci, M., Kufrevioglu, O. I., Curuk, M. A. 2004. Investigation Of The Mutation Points And Effects Of Some Drugs On Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficient People In The Erzurum Region, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 19(4): 355-360.

Ozmen, I., Kufrevioglu, O. I., Gul, M. 2005. Effects Of Some Antibiotics On Activity Of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase, From Human Erythrocytes In Vitro And Effects Of Isepamicin Sulfate On Activities Of Antioxidant Enzymes IN Rat Erythrocytes. *Drug Chem Toxicol*, 28: 433-445.

Özmen, İ. 2002. Erzurum Yöresinde Yaşayan Glukoz 6- Fosfat Eksikliği Tespit Edilen Şahıslarda Glukoz 6- Fosfat Dehidrogenaz Kinetiğinin İncelenmesi Ve Mutasyon Noktalarının Moleküler Tekniklerle Taranması, Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya ABD, Erzurum.

Perandin, F., Manca, N., Calderaro, A., Piccolo, G., Galati, L., Ricci, L., Medici, M.C., Arcangeletti, M.C., Snounou, G., Dettori, G., Chezzi, C. 2004. Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis. *J Clin Microbiol*, 42(3):1214-9.

Persico, M. G., Viglietto, G., Martini, G. 1986. Isolation Of Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase(G6PD) cDNA Clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucleic Acids Res.*, 14(6): 2511-2522.

Persing, D. H., Tenover, F. C., Versalovic, J., Tang, YI.-WEI., Unger, E. R., Relman, D. A., J, Thomas. 2006. *Molecular Microbiology: diagnostic principles and practice*. Editors Persing, D. H.;Tenover, F. C.;Versalovic, J.;Tang, YiWei, Unger, E. R., Relman, D. A., *Real-Time PCR*, 71.

Phillip, Belgrader., William, Benett., Dean, Hadley., James, Richards., Paul, Stratton., Raymond, Mariella., Fred, Milanovich. 1999. PCR Detection of Bacteria in Seven Minutes, *Infectious Disease*, 5413 pp. 449-450

Pietropetrosa, A., Palma, A., Companole, D., Delios, G., Vitucci, A., Tannoia, N. 2001. Genotype And Phenotype Correlation In Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. *Haematologica*, 86: 30-35.

Porter, I. H., Boyer, S. H., Watson-Williams, E. J., Adam, A., Szeinberg, A., Siniscalco, M. 1964. Variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase in different populations, *Lancet* 283: 895-899.

Quesada, J. M., Casado, A., Diaz, C., Barrios, L., Cuenca-Acevedo, R., Dorado, G. 2004. Allele-frequency determination of BsmI and FokI polymorphisms of the VDR gene by quantitative real-time PCR (QRT-PCR) in pooled genomic DNA samples. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* , 89-90: 209-214.

Raja, S., El-Hefnawy, T., Kelly, L. A., Chestney, M. L., Luketich, J. D., Godfrey, T. E. Temperature-controlled Primer Limit for Multiplexing of Rapid, Quantitative Reverse Transcription-PCR Assays: Application to Intraoperative Cancer Diagnostics. *Clinical Chemistry*, 48: 1329-1337.

Rang, H. P., Dale , M. M., Ritter , J. M. 1999. *Pharmacology*, 746-756, Churchill Livingstone.

Robert, A., Palais, M. A. 2005. Liew, T., Wittwer, C. T. 2005. Quantitative heteroduplex analysis for single nucleotide polymorphism genotyping. *Analytical Biochemistry*, 346(1): 167-175

ROCHE Diagnostic Corporation- Roche Applied Science.2009. SNP Analysis and Genotyping Using Melting Curves, Erişim: [<http://www.roche-applied-science.com>], Erişim Tarihi: 20.12.2010.

ROCHE, 2005. Applied Science Technical Note.. s:2-4-5-6. Erişim: [<http://www.roche-applied-science.com>], Erişim Tarihi: 20.12.2010.

ROCHE, 2007. MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I, s:3, Germany.

Sabek, O., Dorak, M. T., Kotb, M., Gaber, A. O., Gaber, L. 2002. Quantitative detection of T-cell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. *Transplantation*, 15;74(5):701-7

Saha, S., Saha, N., Tay, J. S. H., Jeyaseelan, K., Basair, J. B., Chew S. E. 1994. Molecular characterisation of red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Singapore Chinese. *American Journal of Hematology*, 273–277.

Salvati, A. M., Moffi, D., Caprari, P., Pasquino, M. T., Caforio, M. P., Tarzia, A. 1999. Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency And Hereditary Hemolytic Anemia. *Ann Ist Super Sanita*, 35: 193-203

Sanchez, J. A., Pierce, K. E., Rice, J. E., Wangh, L. J. 2004. Linear-After-The-Exponential (LATE)-PCR: An advanced method of asymmetric PCR and its uses in quantitative real-time analysis, *PNAS*, 101(7): 1933-1938

Sayitoğlu, M. A. Hematoloji'de Real Time PCR, Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi -Temel Moleküler Biyoloji Kursu, 12-13 Mart 2005, 20-22.

Sarris, A. H., Jiang, Y., Tsimberidou, A. M., Thomaides, A., Rassidakis, G. Z., Ford, R. J., Medeiros, L. J., Cabanillas, F., McLaughlin, P. 2002. Quantitative real-time polymerase chain reaction for monitoring minimal residual disease in patients with advanced indolent lymphomas treated with rituximab, fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone. *Semin Oncol.*, 48-55.

Schlorff, E. C., Husain, K., Somani, S. M. 1999. Dose-and time-dependent effects of ethanol on antioxidant system in rat testes. *Alcohol*, 18(2-3): 203-214

Scot, M. D., Zuo, L., Lubin, B. H., Chiu, D. T. Y. 1991. NADPH, Not Glutathione, Status Modulates Oxidant Sensitivity In Normal And Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficient Erythrocytes. *Blood*, 77: 2059-2064.

Siems, W. G., Sommerburg, O., Grune, T. 2000. Erythrocyte Free Radical And Energy Metabolism. *Clin Nephrol*, 53: 9-17.

Sodeman, W. A., Sodeman, T. M. 1985. Sodeman's Pathologic Physiology Mechanism of Disease, 1985. Çev: kurul, Fiziopatoloji cilt-2, Türkiye Klinikleri Yayınevi, 1991:720-724. Ankara.

Soheili, Z.; Samiei, S. 2005. Real Time PCR: Principles and Applications. *Hepatitis Monthly*, 5(3): 83-87.

Solinas, A., Brown, L.J., McKeen, C., Mellor, J. M., Nicol, J., Thelwell, N., Brown, T. 2001. Duplex Scorpion primers in SNP analysis and FRET applications. *Nucleic Acids Res.*, 29(20): 96.

“Standardization Of Procedure For G6PD Deficiency” Report of WHO Scientific Group, 1967. WHO Technical Report Series, Sr. No 366.

Stevens, J., Wanachiwanawin, W., Mason, P. J., Vulliamy, T. J., Luzzatto, L. 1990. G6PD Canton a common deficient variant in South East Asia caused by a 459 Arg-Leu mutation. *Nucleic Acids Reserarch*, 18:23.

Szweda, L. I., Stadtman, E. R. 1992. Iron-Catalyzed Oxidative Modification Of Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase From *Leuconostoc Mesenteroides*, Structural And Functional Changes. *J Biol Chem*, 267(5): 3096-3100.

Tabata, M., Kido, T., Totani, M., Murachi, T. 1985. Direct Spectrophotometry Of Magnesium In Serum After Reaction With Hexokinase And Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase. *Clin Chem*, 31(5): 703-705.

Takizawa, T., Huang, I.Y., Ikuta, T., Yoshida, A. 1986. Human Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase: primary Structure and CDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci*, 83(3): 4157-4161.

Tamer, I., Ünal, B., Aksoy, K. 1998. Glukoz 6-Fosfat Dehidrogenaz Enzim Eksikliği Gözlenen Olgularda Eritrosit Zarı Na⁺- K⁺/Mg⁺⁺ Adenozin 5'- Trifosfat, Eritrosit Süperoksit Dismutaz Ve Plazma Malandialdehid Düzeyleri, *Ç.Ü. Tıp Fakültesi Dergisi*, 23: 114-118.

Tan, K.L., Boey, K. W. 1989. Clinical experience with phototherapy. *Ann Acad Med Singapore*, 18:43-48.

Tang, T. K., Huang, C.S., Huang, M. J., Tam, K. B., Yeh, C. H., Tang, C. J. C. 1992. Diverse point mutations result in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) polymorphism in Taiwan. *Blood*, 79: 2135-2140

Tantular, I. S., Iwai, K., Lin, K., Basuki, S., Horie, T., Htay, H. H., Matsuoka, H., Marwoto, H., Wongsrichanalai, C., Dachlan, Y.P., Kojima, S., Ishii, A., Kawamoto, F. 1999. Field trials of a rapid test for G6PD deficiency in combination with a rapid diagnosis of malaria. *Trop Med Int Health*, 4:245-250.

Tapp, I., Malmberg, L., Rennel, E., Wik, M., Syvanen, A. C. 2000. Homogeneous scoring of single-nucleotide polymorphisms: comparison of the 5'-nuclease TaqMan assay and Molecular Beacon probes. *Biotechniques*, 28(4): 732-8.

Telefoncu, A., Telefoncu, F. 1989. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Aktivitesine Primaquine'nin Etkisi. *Tr J Medical Sci*, 14: 57-63.

Tetzner, R., Ziebarth, H., Berlin, K. 2004. A real-time PCR assay for DNA-methylation using methylation-specific blockers. *Nucleic Acids Res.*, 3;32(1):10.

Thiede, C. 2004. Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am J Pharmacogenomics*, 4(3):177-87.

Thomassin, H., Kress, C., Grange, T. 2004. MethylQuant: a sensitive method for quantifying methylation of specific cytosines within the genome. *Oxford Journals*, 32(21): 168.

Tishkoff, S. A., Varkonyi, R., Cahinhinan, N. 2001. Haplotype Diversity And Linkage Disequilibrium At Human G6PD: Recent Origin Of Alleles That Confer Malarial Resistance. *Science*, 293: 455-462.

Torresa, M. J., Criadoa, A., Ruizb, M., Llanosb, A. C., Palomaresa, J.C., Aznarab J. 2003. Improved real-time PCR for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. *Elsevier Science*, 45(3): 207-212.

Trinh, B. N., Long, T. I., Laird, P. W. 2001. DNA methylation analysis by MethyLight technology. *PubMed*, 25(4):456-62.

Van der Velden, V. H., Hochhaus, A., Cazzaniga, G., Szczepanski, T., Gabert, J., van Dongen, J. J. 2003. Detection of minimal residual disease in hematologic malignancies by real-time quantitative PCR: principles, approaches, and laboratory aspects. *Leukemia*, 17(6): 1013-34.

Uhl, J.R., Bell, C.A., Sloan, L.M., Espy, M.J., Smith, T.F., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R. 2002. Application of rapid-cycle real-time polymerase chain reaction for the detection of microbial pathogens: the Mayo-Roche Rapid Anthrax Test. *Mayo Clin Proc.*, 77(7): 673-80.

Vrettou, C., Traeger-Synodinos, J., Tzetis, M., Malamis, G., Kanavakis, E. 2003. Rapid Screening of Multiple β -Globin Gene Mutations by Real-Time PCR on the LightCycler: Application to Carrier Screening and Prenatal Diagnosis of Thalassemia Syndromes. *Clinical Chemistry*, 49: 769-776.

Vrettou, C., Traeger-Synodinos, J., Tzetis, M., Palmer, G., Sofocleous, C., Kanavakis, E. 2004. Real-time PCR for single-cell genotyping in sickle cell and thalassemia syndromes as a rapid, accurate, reliable, and widely applicable protocol for preimplantation genetic diagnosis. *Human Mutation*, 23(5): 513-521.

Vulliamy, T. J., Urso, M. D., Battistuzzi, G. 1988. Diverse Point Mutations In The Human Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Gene Cause Enzyme Deficiency And Mild Or Severe Hemolytic Anemia. *Proc. Nati. Acad. Sci.*, 85: 5171-5175.

Wang, J., Matsuka, H., Makota, H., Ling, M., Laindi, Y. E. 2010. The First Case of a Class I Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Deficiency, G6PD Santiago de Cuba (1339 G>A), in a Chinese Population as Found in a Survey for G6PD Deficiency in Northeastern and Central China. *Acta Med.*, 64(1): 49-54.

Waterfall, C. M., Cobb, B. D. 2002. SNP genotyping using single-tube fluorescent bidirectional PCR. *Biotechniques*, 33(1): 80-82.

Watzinger, F., Suda, M., Preuner, S., Baumgartinger, R., Ebner, K., Baskova, L., Niesters, H. G. M., Lawitschka, A., Lion T. 2004. Real-Time Quantitative PCR Assays for Detection and Monitoring of Pathogenic Human Viruses in Immunosuppressed Pediatric Patients. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11): 5189-5198.

Weiyang, J., Guolong, Y., Peng, Liu., Qian, G., Luming, C., Qundi, L. X. R., Wenhong, Y., Yongshu, H. Y. G., Shan, D., Jing, W., Haiyuan, L. Y. Q., Chengrui, J., Yongmei, Z. C. L., En, S., Qin, Z., Qihong, T. C. D. 2006. Structure and function of glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants in Chinese population. *Hum Genet*, 119: 463-478.

Weksler, B. B., Moore, A., Tepler, J. 1990. Cecil Essentials Of Medicine, Edt.; Andreoli, T. E.; Carpenter, C. C. J.; Plum, F.; Smith, L. H., Philadelphia, W. B. Saunders Co, 341-363

WHO Report of Advisory Group. 1985. Community Approaches to the control of hereditary diseases. <http://www.who.int/genomics/publications/WHOHGNWG85.10.pdf>
Erişim tarihi: 25.12.2010.

WHO Working Group. 1989 Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Bull World Health Organ*, 67(6):601-611.

Wittwer, C. T., Dietmaier, W., Sivasubramanian, N. 2002. Rapid Cycle Real-Time PCR: Genetics and Oncology. Springer Verlag, 15-25.

Wittwer, C. T., Herrmann, M. G., Gundry, C. D., Elenitoba, K. S. J. 2001. Real-Time Multiplex PCR Assays. Elsevier Science, 25:430-442.

Wolfe, L., Monley, P.E. 2006. Disorders Of Erythrocyte Metabolism Including Porphyria, Edt.; Hann, I. M., Smith, O. P. Pediatric Hematology, Thirded Oxford, Blackwell Publishing Ltd, 171-212.

Yalın, S., Yalın, E., Ünlükurt, İ., Aksoy, K. 2001. Çukurova Bölgesi'nde Saptanan G6PD Varyantlarının Kinetik Özellikleri. *Türk Biyokimya Dergisi*, 26: 83-89.

Yan, T., Cai, R., Mo, O., Zhu, D. 2006. Incidence and complete molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Guangxi Zhuang autonomous region of southern China: description of four novel mutations. *Haematologica*, 91(10):1321-1328

Yoshida, A. 1967. A single amino acid substitution (asparagine to aspartic acid) between normal (B plus) and the common Negro variant (A plus) of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 57: 835-840.

Yoshida, A., Beutler, E., Motulsky, A. G. 1971. Table of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *Bull. WHO*, 45: 243-253.

Yusoff, N. M., Shirakawa, T., Kaoru, N., Selamah, G., Choo, K. E., Ayako, O., Wan, Z. A., Mohd, N. I., Hans, V. R., Masafumi, M. 2002. Molecular Heterogeneity of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency in Malays in Malaysia. *Int J Hematol.* 76(2): 149-52.

Zinkham, W. H. 1961. A deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in lens from individuals with primaquine-sensitive erythrocytes. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 109: 206-216.

Zhou, L., Wang, L., Palais, R., Pryor, R., Wittwer, C. T. 2005. High-Resolution DNA Melting Analysis for Simultaneous Mutation Scanning and Genotyping in Solution. *Clinical Chemistry*, 51: 1770-1777.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Kadir Sinan ASLAN

Doğum Yeri : Adana

Doğum Tarihi : 09 / 07 / 1980

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve yıl)

Lise : Adana Erkek Lisesi

Lisans : Dicle Üni. Eğitim Fakültesi Biyoloji

Yüksek Lisans : Dicle Üni. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı