

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

# **HEMOGLOBİN VARYANTLARININ DNA DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ**

Ahmet GENÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI  
Doç. Dr. M. Akif ÇÜRÜK

ADANA-2005

T.C.  
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

# **HEMOGLOBİN VARYANTLARININ DNA DİZİ ANALİZİ İLE BELİRLENMESİ**

Ahmet GENÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI  
Doç. Dr. M. Akif ÇÜRÜK

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TF2005YL2 nolu proje ile desteklenmiştir.

Tez No:.....

ADANA-2005

**KABUL VE ONAY FORMU**

**Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan  
“Hemoglobin Varyantlarının DNA Dizi Analizi ile Belirlenmesi” adlı çalışma, aşağıdaki  
jüri tarafından Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi : 21 / 07 / 2005

**İmza**

Doç. Dr. M. Akif ÇÜRÜK  
Çukurova Üniversitesi  
Jüri Başkanı

**İmza**

Prof. Dr. Kıymet AKSOY  
Çukurova Üniversitesi  
Jüri Üyesi

**İmza**

Prof. Dr. Yurdanur KILIÇ  
Çukurova Üniversitesi  
Jüri Üyesi

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulunun .....tarih ve .....  
sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Sait POLAT  
**Enstitü Müdürü**

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Prof. Dr. Kıymet AKSOY, Prof. Dr. Levent KAYRIN, Prof. Dr. Nurten DİKMEN, Doç. Dr. Abdullah TULİ, Doç. Dr. Gülen ATTİLA ve Yrd. Doç. Dr. Tamer İNAL'a teşekkür ederim.

Tez konumun seçimi ve yürütülmesinde teorik ve pratik deneyimlerinden faydalandığım, yakın ilgi ve desteğini esirgemeyen tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK' e ayrıca teşekkür ederim.

Yüksek lisans öğrenimim süresince destek ve sevgilerini esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlileri, teknik elemanları ve personeline de çok teşekkür ederim.

Tez çalışmasını TF2005YL2 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine de teşekkür ederim.

Biyolog Ahmet GENÇ

# İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	ix
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. HEMOGLOBİNLERİN YAPISI.....	3
2.1.1. Globin Gen Kümesi .....	4
2.1.2. Hemoglobin Dönüşümü .....	6
2.2. HEMOGLOBİN VARYAN TLARI.....	8
2.3. TÜRKİYE'DE GÖRÜLEN HEMOGLOBİN VARYAN TLARI .....	42
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	46
3.1. GEREÇLER.....	46
3.1.1. Cihazlar .....	46
3.1.2. Kimyasal Malzemeler.....	47
3.2. ÖRNEK TOPLAMA.....	49
3.3. YÖNTEMLER.....	49
3.3.1.1. Hemolizat ve Kontrol Kanı Hazırlama .....	49
3.3.1.2. Hemoglobin Elektrof orezi .....	49
3.3.1.2.1. Prensi p .....	49
3.3.1.2.2. Çözeltiler.....	50
3.3.1.2.3. Yöntem.....	50
3.3.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC).....	50
3.3.1.3.1. Anyon de ğiştirici HPLC .....	51
3.3.1.3.2. Katyon de ğiştirici HPLC.....	52
3.3.1.4. Mikrokolon kromatografisi ile HbA <sub>2</sub> Ölçümü.....	56
3.3.1.4.1. Prensi p .....	56
3.3.1.4.2. Çözeltiler.....	56
3.3.1.4.3. Yöntem.....	57
3.3.1.5. Alkali denatürasyon ile HbF Ölçümü .....	57
3.3.1.5.1. Prensi p .....	57
3.3.1.5.2. Çözeltiler.....	57
3.3.1.5.3. Yöntem.....	58
3.3.1.6. Oraklaşma Testi.....	58
3.3.1.6.1. Prensi p .....	58

3.3.1.6.2. Çözelti.....	58
3.3.1.6.3. Yöntem.....	59
3.3.1.6.4. Yorum.....	59
3.3.2. Tam Kandan DNA İzolasyonu .....	59
3.3.2.1. Çözeltiler .....	59
3.3.2.2. Yöntem.....	60
3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) .....	61
3.3.3.1. Çözeltiler .....	61
3.3.3.2. Yöntem.....	62
3.3.3.3 ARMS Amplifikasyon Protokolü.....	62
3.3.3.4. Termal Cyclers ile PCR Protokolü .....	63
3.3.3.5. Agaroz Jel Elektroforezi.....	65
3.3.3.5.1. Çözeltiler.....	65
3.3.3.5.2. Yöntem.....	66
3.3.3.1. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) .....	66
3.3.4. DNA Dizi Analizi .....	68
3.3.4.1. Tek Zincir DNA (ssDNA) Amplifikasyonu .....	68
3.3.4.2. Amplifiye DNA'nın Pürifikasyonu .....	71
3.3.4.3. DNA Dizi (Sekans) Analizi.....	71
3.3.4.3.1. Primer Bağlanması.....	72
3.3.4.3.2. İşaretleme.....	72
3.3.4.3.3. Sonlandırma Reaksiyonu .....	74
3.3.4.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE) .....	74
3.3.4.4.1. Jelin Hazırlanması.....	74
3.3.4.4.2. Jel Elektroforezi .....	75
3.3.4.5. Tespit (Fixing).....	75
3.3.4.6. Kurutma ve Otoradyogram.....	75
3.3.4.7. Değerlendirme (Okuma) .....	76
4. BULGULAR .....	77
5. TARTIŞMA .....	96
6.SONUÇ.....	102
7. KAYNAKLAR .....	103
ÖZGEÇMİŞ.....	108

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Alfa ve beta benzer globin genleri ile sentezinden sorumlu olduğu Hb türleri.....	4
Şekil 2.2. Embriyonik ve fetal gelişimin farklı evrelerinde globin zincir sentezi .....	7
Şekil 2.3. Dünyada yaygın olarak görülen anormal hemoglobinler ve talaseminler .....	9
Şekil 2.4. Oksijen affinitesinin artmasına neden olan $\alpha$ globindeki mutasyonların yerleri .....	13
Şekil 2.5. Oksijen affinitesinin artmasına neden olan $\beta$ globindeki mutasyonların yerleri .....	14
Şekil 3.1. Anyon değiştirici kolon ile HbF, HbA <sub>2</sub> ve HbS'in ayırımı.....	52
Şekil 3.2. Katyon değiştirici kolon ile HbF, HbA ve HbA <sub>2</sub> 'in ayırımı .....	53
Şekil 3.3. Katyon değiştirici kolon ile HbF, HbA ve HbA <sub>2</sub> 'in ayırımı .....	54
Şekil 3.4. Normal hemoglobinler ve varyantların elüsyon zamanları .....	55
Şekil 3.5. Beta globin gen dizisi, RFLP için PCR primerleri ve Dde I kesim yerleri .....	67
Şekil 3.6. Beta globin gen dizisi amplifikasyon ve sekans primerleri.....	70
Şekil 3.7. DNA dizi analizinin şematik özeti .....	73
Şekil 4.1. HbS taşıyıcısının HPLC görüntüsü. ....	87
Şekil 4.2. HbC taşıyıcısının HPLC görüntüsü.....	87
Şekil 4.3. HbD taşıyıcısının HPLC görüntüsü.....	88
Şekil 4.4. HbE taşıyıcısının HPLC görüntüsü. ....	88
Şekil 4.5. HbE-Saskatoon homozigot olgusunun HPLC görüntüsü.....	89
Şekil 4.6. HbG-Coushatta taşıyıcısının HPLC görüntüsü .....	89
Şekil 4.7. HbS mutasyonun ARMS ile belirlenmesi. ....	90
Şekil 4.8. HbS mutasyonu taşıyan allellerin RFLP yöntemi ile belirlenmesi .....	91
Şekil 4.9. HbS taşıyıcısının ( $\beta 6GAG \rightarrow GTG$ ) DNA dizi analizi.....	92
Şekil 4.10. Normal ve HbC taşıyıcısının ( $\beta 6GAG \rightarrow AAG$ ) DNA dizi analizi .....	93
Şekil 4.11. Homozigot HbE-Saskatoon ( $\beta 22 GAA \rightarrow AAA$ ) ve normal bir olgunun DNA dizi analizi .....	94
Şekil 4.12. HbG-Coushatta taşıyıcısının ( $\beta 22GAA \rightarrow GCA$ ) DNA dizi analizi ..	95

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo 2.1.</b> Embriyonik, fetal ve erişkin dönemde sentezlenen insan hemoglobinleri .....	3
<b>Tablo 2.2.</b> Alfa,beta, delta, G-gama, A-gama ve epsilon genlerinin 5'UTR, ekson, intron ve 3' UTR bölgeleri .....	6
<b>Tablo 2.3</b> 1997 yılına kadar tespit edilmiş hemoglobin varyant sayısı.....	11
<b>Tablo 2.4.</b> Tek baz değişimi sonucu meydana gelen alfa globin zincir varyantları.....	16
<b>Tablo 2.5.</b> Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları .....	21
<b>Tablo 2.6.</b> Tek baz değişimi sonucu meydana gelen <sup>G</sup> γ globin zincir varyantları .....	31
<b>Tablo 2.7.</b> Tek baz değişimi sonucu meydana gelen <sup>A</sup> γ globin zincir varyantları .....	32
<b>Tablo 2.8.</b> Tek baz değişimi sonucu meydana gelen δ globin zincir varyantları .....	33
<b>Tablo 2.9.</b> Hibrid hemoglobinler.....	35
<b>Tablo 2.10.</b> İki amino asit değişimli β globin zincir varyantları.....	36
<b>Tablo 2.11.</b> Karboksil ucundan uzamış α ve β globin zincir varyantları .....	38
<b>Tablo 2.12.</b> Amino ucundan uzamış α ve β globin zincir varyantları.....	40
<b>Tablo 2.13.</b> Bir-beş amino asit delesyonu sonucu oluşan kısa globin zincirli varyantlar ....	41
<b>Tablo 2.14.</b> Amino asit insersiyonu sonucunda oluşan uzun zincirli varyantlar .....	42
<b>Tablo 2.15.</b> Ülkemizde saptanan tek baz değişimli alfa zincir varyantları.....	42
<b>Tablo 2.16.</b> Ülkemizde saptanan tek baz değişimli beta zincir varyantları .....	44
<b>Tablo 2.17.</b> Ülkemizde saptanan unstabil hemoglobinler .....	45
<b>Tablo 2.18</b> Ülkemizde saptanan talasemik hemoglobinler. ....	45
<b>Tablo 3.1.</b> ARMS yönteminde kullanılan PCR programı. ....	63
<b>Tablo 3.2.</b> ARMS yönteminde kullanılan ortak ve kontrol primerleri.....	63
<b>Tablo 3.3.</b> ARMS yönteminde kullanılan Hb varyantları ve β-talasemi mutasyonlarına özgü primerler .....	64
<b>Tablo 3.4.</b> RFLP yönteminde kullanılan primerler. ....	66
<b>Tablo 4.1.</b> HbS taşıyıcılarına ait hematolojik veriler .....	78
<b>Tablo 4.2.</b> HbD taşıyıcılarına ait hematolojik veriler. ....	79
<b>Tablo 4.3.</b> HbE taşıyıcılarına ait hematolojik veriler.....	80
<b>Tablo 4.4.</b> HbC taşıyıcılarına ait hematolojik veriler.....	81



<b>Tablo 4.5.</b> Orak hücre anemili hastalara ait hematolojik veriler.....	82
<b>Tablo 4.6.</b> HbS- $\beta$ talasemili olguların hematolojik verileri .....	83
<b>Tablo 4.7.</b> HbDD ile HbD- $\beta$ ve HbE- $\beta$ talasemili vakaların hematolojik verileri .....	84
<b>Tablo 4.8.</b> HbSD ve HbSE olguların hematolojik veriler .....	85
<b>Tablo 4.9.</b> HbE-Saskatoon ve HbG-Coushatta taşıyıcılarına ait hematolojik veriler .....	86

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\delta$	Delta
$\epsilon$	Epsilon
$\gamma$	Gama
$G_\gamma$	G gama
$A_\gamma$	A gama
$A_\gamma^I$	A gama I
$A_\gamma^T$	A gama T
$\Psi$	Pseudo
$\zeta$	Zeta
RBC	Eritrosit hücresi (Red Blood Cell)
Hb	Hemoglobin
Hct	Hematokrit
MCH	Ortalama eritrosit hemoglobini (Mean Corpuscular Hemoglobin)
MCV	Ortalama eritrosit hacmi (Mean Corpuscular Volume)
MCHC	Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)
Kb	Kilo baz
IVS	İntron dizileri (Intervening Sequences)
3'UTR	3'kodlanmayan bölge (3' untranslated region)
5'UTR	5'kodlanmayan bölge (5' untranslated region)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
ARMS	Amplification Refractory Mutation System
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)

## ÖZET

### Hemoglobin Varyantlarının DNA Dizi Analizi ile Belirlenmesi

Hemoglobinopatiler, bir veya daha fazla globin zincir sentezinin azalması (talasemi) veya yapısal olarak anormal hemoglobinlerin sentezi (Hb) ile karakterizedir. Bir çok bölgede talasemi Hb varyantları ile birlikte bulunmakta ve bunun sonucunda çok değişik klinik ve hematolojik fenotip göstermektedir. Bu olgulara neden olan mutasyonların tanımlanması etkili tanı ve iyi bir danışmanlık için çok önemlidir. Hematolojik ve biyokimyasal araştırmalar ile aile taramaları, Hb bozukluklarının DNA tanısını kolaylaştırmakta ve molekül içi etkileşimlere önemli ipucu sağlamaktadır. Hemoglobinopatilere 1000'den fazla mutasyon neden olmasına rağmen, bunlardan sınırlı sayıdaki mutasyonlar klinik açıdan önemlidir.

Bugüne kadar ülkemizde 42 anormal hemoglobin tanımlanmıştır. Anormal hemoglobinlerin dağılımı bölgeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. ukurova bölgesinde  $\beta$ -talasemi ve HbS daha yaygın olarak görölmektedir. Bu anormal hemoglobinlerin bazıları elektroforetik yöntemlerle tanımlanması güçtür. Bu nedenle DNA dizi analizi yapılmalıdır.

**Anahtar Sözcükler:** Hemoglobin varyantları, DNA dizi analizi, talasemi.

## **ABSTRACT**

### **Identification of Hemoglobin Variants with DNA Sequencing**

The haemoglobinopathies refer to a diverse group of inherited disorders characterized by a reduced synthesis of one or more globin chains (thalassaemias) or the synthesis of a structurally abnormal haemoglobin (Hb). In prevalent regions, the thalassaemias often coexist with a variety of structural Hb variants giving rise to complex genotypes and an extremely wide spectrum of clinical and haematological phenotypes. An appreciation of these phenotypes is needed to facilitate the definitive diagnosis of the causative mutations to inform management and clinical counselling. Haematological and biochemical investigations, and family studies provide essential clues to the different interactions and are fundamental to DNA diagnostics of the Hb disorders. Although a full spectrum of >1000 mutations causing haemoglobinopathies have been documented, in practice only a limited number of mutations are associated with disease states and clinical significance.

So far up to present 42 abnormal hemoglobins have been identified in the our country. There are big differences in the distribution of abnormal hemoglobins among regions. In Çukurova region  $\beta$ -thalassemia and HbS are the most common variants. Some of abnormal hemoglobins can't be identified with electrophoretic techniques. So these case must be identified with DNA sequence.

**Key Words:** Hemoglobin variants, DNA sequencing, thalassemia,.

# 1. GİRİŞ

Hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki aminoasit değişikliği sonucu Hb varyantları meydana gelmektedir. Bu varyantlar yapısal özelliklerine bağlı olarak polimerleşme (HbS), kristallenme (HbC) veya dayanıksız olmaları nedeniyle hemolitik anemiye neden olmaktadır. Ayrıca oksijen affinitesinde artış gösteren anormal hemoglobinler eritropoezi artırırken, affinitede azalmaya neden olanlar ise siyanoz ile kendini göstermektedir. Anormal hemoglobinlerden pek çoğunun önemli bir klinik semptomu neden olmadığı da bilinmektedir<sup>1</sup>.

Anormal hemoglobinler yapısal özelliklerine göre bir veya iki aminoasit değişimi, aminoasit eklenmesi veya çıkarılması yada iki farklı polipeptidin birleşmesiyle meydana gelen (hibrit) zincirlerdir. Hemoglobin moleküllerinin yapısında yer alan zincirler üzerinde meydana gelen değişiklikler 1998 yılı uluslararası hemoglobin danışma merkezinin raporunda 750'ye ulaşmıştır. Bunlardan 217 tanesi alfa, 362 beta, 70 gama, 32 delta globin ve zincirinde iki amino asit değişimi olan 19 varyant gözlenmiştir. Bunlardan farklı olarak 10 hibrid, 13 uzamış ve 27 delesyon, insersiyon veya delesyon/insersiyonun birlikte bulunduğu zincirler belirlenmiştir<sup>2</sup>. İnternette <http://globin.cse.psu.edu> sitesindeki varyantların sayısı 925 olmuştur<sup>3</sup>. Kırk iki tane Hb varyantı ülkemizde gözlenmiş olup 7'si ilk olarak Türklerde gösterilmiştir<sup>4</sup>.

Türkiye'nin güneyinde yer alan Çukurova bölgesinde (Antakya, Adana ve İçel) orak hücre anemisi taşıyıcı (HbAS) sıklığı %8.2 olarak tespit edilmiştir. Bölgede talasemik özelliğe sahip olan HbE taşıyıcılığı da (<%1) görülmektedir<sup>5</sup>. Ayrıca HbD ve birkaç vakada HbC tespit edilmiştir<sup>6</sup>. HbS taşıyıcı oranı Antakya ilinin bazı köy ve kasabalarında %44'e kadar ulaşmaktadır<sup>7</sup>. Bu güne kadar kesin tedavisi bulunamayan bu hastalık doğum öncesi teşhis ile önlenmektedir<sup>5</sup>. Anormal hemoglobin veya talasemi taşıyıcıların evlenmesi durumunda gebeliğin 10-12. haftasında DNA analizi ile prenatal tanı yapılmaktadır<sup>8</sup>.

T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından Çukurova bölgesinde evlilik öncesi hemoglobinopati taraması zorunlu hale getirilmiştir. Tarama merkezlerinde elektroforez veya HPLC ile analizleri yapılarak HbS, C, D, E ve X (tanımlanamayan Hb) taşıyan bireyler gebeliğin 10.

haftasında Ç.Ü. Tıp Fakültesi Prenatal tanı ünitesine sevk edilmektedir. Bu örneklerde prenatal tanıdan önce mutasyonların DNA analizi ile teyid edilmesi önemlidir. Bu nedenle önce allele spesifik PCR ile elektroforeze uyumlu mutasyon analizi yapılmaktadır. Bu yöntemle kimliklendirilemeyen vakalar ise DNA dizi analizi ile teşhis edilmektedir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. HEMOGLOBİNLERİN YAPISI

Eritrositlerin içinde yer alan ve yüksek konsantrasyonda oksijen bağlama yeteneği bulunan hemoglobin (Hb) molekülü, oksijeni akciğerlerden dokulara, karbondioksit ve protonları ise dokulardan akciğerlere taşımaktadır. Eritrositlerde bulunan hemoglobin molekülünün ağırlığı 64.500 daltondur<sup>9</sup>.

Erişkin sağlıklı bir insanda % 97 oranında bulunan HbA molekülü (HbA;  $\alpha_2\beta_2$ ), her birine hem bağlanmış iki alfa ( $\alpha$ ) ve iki de beta ( $\beta$ ) globin zincirinden meydana gelen tetramer yapıda bir metaloproteindir. Fetal hayat ve yeni doğanın majör hemoglobini olan HbF, iki alfa ve iki gama ( $\gamma$ ) zincirinden ( $\alpha_2\gamma_2$ ) meydana gelmekte olup normal erişkin bir insanda miktarı %1'in altında bulunmaktadır. Yapısında iki alfa ve iki delta ( $\delta$ ) zinciri bulunan HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) ise normal erişkinde %2-3 arasında bulunmaktadır. Embriyonik hayatın erken dönemlerinde sentezlenen Hb Gower [Hb Gower I ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ) ve Hb Gower II ( $\alpha_2\varepsilon_2$ )] ve Hb Portland'ın ( $\zeta_2\gamma_2$ ) yapısında yer alan alfa benzer zinciri zeta ( $\zeta$ ), beta benzer zincirleri ise epsilon ( $\varepsilon$ ) ve gama ( $\gamma$ )dır<sup>9,10,11</sup>. Yaşamın farklı evrelerinde sentezlenen Hb molekülleri **Tablo 2.1**'de gösterilmiştir.

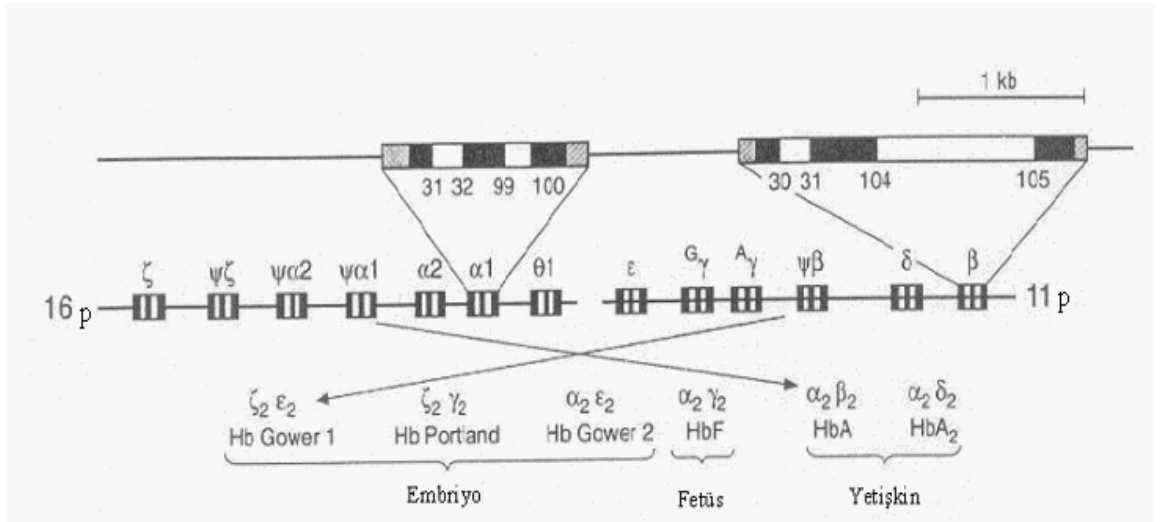
**Tablo 2.1.** Embriyonik, fetal ve erişkin dönemde sentezlenen insan hemoglobinleri.

<i>Hb ADI</i>	<i>FORMÜLÜ</i>	<i>SENTEZLENDİĞİ DÖNEM</i>
Hb Gower I	$\zeta_2\varepsilon_2$	Embriyo
Hb Gower II	$\alpha_2\varepsilon_2$	
Hb Portland I	$\zeta_2\gamma_2$	
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	Fetüs
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	Yetişkin
Hb A <sub>2</sub>	$\alpha_2\delta_2$	

Hemoglobin molekülünün yapısında yer alan her globin zincirlerine bir tane de hem plağı bağlanmıştır. Bu yapı, hemoglobin molekülüne oksijen bağlanmasını ve kanın kırmızı renkli olmasını sağlamaktadır. Hem grubu, ferröz ( $Fe^{+2}$ ) şeklinde demir atomu ve protoporfirin halka sisteminden oluşmaktadır. Hemoglobin yapısı içinde yer alan hem ve globin zincirleri hücre içinde farklı mekanizmalarla sentez edildikten sonra birleşerek hemoglobin molekülünü oluşturmaktadır<sup>12,13</sup>. Hb varyantları globin zincirleri üzerindeki amino asit değişimi sonucu meydana gelmektedir. Bu değişim ise molekülünün sentezinden sorumlu genler tarafından kodlanmakta olup 11 ve 16 nolu kromozomlar içinde yerleşmiştir<sup>9,11,12</sup>.

### 2.1.1. Globin Gen Kümesi

Beta benzer genleri ( $\epsilon$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  ve  $\beta$ ) 11. kromozomun kısa kolu üzerindeki p14 bölgesinde, alfa benzer genleri ( $\zeta$  ve  $\alpha$ ) ise 16. kromozomun kısa kolunun p13.3 bölgesinde bulunmaktadır<sup>11</sup> (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Alfa ve beta benzer globin genleri ile sentezinden sorumlu olduğu Hb türleri.



Globin genleri, embriyonik yaşandan erişkine doğru aktivasyon sırasına göre 5' ucundan 3' ucuna doğru dizilmiştirlerdir. Alfa globin gen kümesi 30 kb'lık bir alan üzerinde ve 5'- $\zeta$ - $\Psi\zeta$ - $\Psi\alpha_2$ - $\Psi\alpha_1$ - $\alpha_2$ - $\alpha_1$ - $\theta_1$ -3' olarak sıralanmaktadır. Alfa lokusunda bulunan  $\alpha_2$  ve  $\alpha_1$  genleri yapısal olarak benzer protein ürünü vermekte olup sadece kodlanmayan (UTR) 5' ve 3' bölgelerinde dizi farkı bulunmaktadır. Beta globin gen kümesi ise 5'- $\epsilon$ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\Psi\beta$ - $\delta$ - $\beta$ -3' olarak sıralanmıştır<sup>11</sup>. Beta lokusu üzerindeki  $G\gamma$  ile  $A\gamma$  genleri de yapısal olarak benzer protein ürünü vermektedirler. Gama globin zincirlerinin bu iki geni 136. pozisyonadaki amino asit farkından dolayı birbirinden ayırt edilebilir. G gama ( $G\gamma$ ) geni 136. pozisyonunda glisini kodlarken, A gama ( $A\gamma$ ) aynı pozisyonunda alanini kodlamaktadır<sup>10,14,15</sup>.

Alfa ve beta gen kümesinde yer alan püsodo genlerin ( $\Psi\zeta$ - $\Psi\alpha_2$ - $\Psi\alpha_1$  ve  $\Psi\beta$ ) bilinen bir fonksiyonu yoktur. Bu nonfonksiyonel genlerin evrimsel kalıntılar olduğu düşünülmektedir. Teta ( $\theta_1$ ) geninin korunmuş yapısı ve inaktive edici hiçbir mutasyon taşımaması fonksiyonel olabileceğini düşündürmektedir. Bu güne kadar genin protein ürünü tespit edilememiş olup  $\theta_1$ 'in rolü halâ anlaşılammıştır<sup>11</sup>.

Epsilon, gama, delta ve beta zincirleri 146, alfa zinciri ise 141 amino asitten meydana gelmektedir. Bu globinleri kodlayan genler üç ekson ve iki introndan meydana gelmektedir (**Tablo 2.2**). Beta benzer genlerinde ekson I ilk 30, ekson II takip eden 74 (31-104) ve ekson III ise kalan 42 (105-146) amino asiti kodlamaktadır. Alfa geni diğerlerinden farklı olarak ekson I ilk 31, ekson II (32-99) takip eden 67 ve ekson III ise (100-141) kalan 41 amino asidi kodlamaktadır. Tetramer oluşumu ve hem bağlanmasını sağlayan globin zincirlerinin bir kısmı ekson 2'de kodlanmaktadır. Ekson 3'te ise tetramerin subünitleri arasındaki etkileşimin sağlanması ve hemin bağlanması için gerekli amino asitlerin birçoğu kodlanmaktadır<sup>11,14</sup>.

Intronlar 117-1264 baz çifti (bç) arasında değişiklik göstermektedir. Alfa globin genlerin her iki intronu küçük (117-149 bç) iken,  $\zeta$  globin genin IVSI'i ~886 ve IVSII ise ~239 bç uzunluğundadır. Beta globin genlerin IVSI'leri 122-130 bç uzunluğunda iken IVSII ise 850-904 bç uzunluğundadır. Alfa ve beta benzer genlerin intron ve ekson uzunlukları **Tablo 2.2**'de gösterilmiştir<sup>11,14,15</sup>.

**Tablo 2.2.** Alfa, beta, delta, G-gama, A-gama ve epsilon genlerinin 5'-UTR, ekson, intron ve 3'-UTR bölgeleri

Gen	5' UTR	Ekson I	İntron I	Ekson II	İntron II	Ekson III	3' UTR	
$\zeta$	58		866		239		108	Bazlar
		1-31		32-99		100-141		Amino asitler
$\alpha 1$	40		117		142		113	Bazlar
		1-31		32-99		100-141		Amino asitler
$\alpha 2$	40		117		149		113	Bazlar
		1-31		32-99		100-141		Amino asitler
$\epsilon$	53		122		855		99	Bazlar
		1-30		31-104		105-146		Amino asitler
$A_\gamma$	53		121		866-904		66	Bazlar
		1-30		31-104		105-146		Amino asitler
$G_\gamma$	53		121		866-876		66	Bazlar
		1-30		31-104		105-146		Amino asitler
$\delta$	48		138		898		111	Bazlar
		1-30		31-104		105-146		Amino asitler
$\beta$	50		130		850		113	Bazlar
		1-30		31-104		105-146		Amino asitler

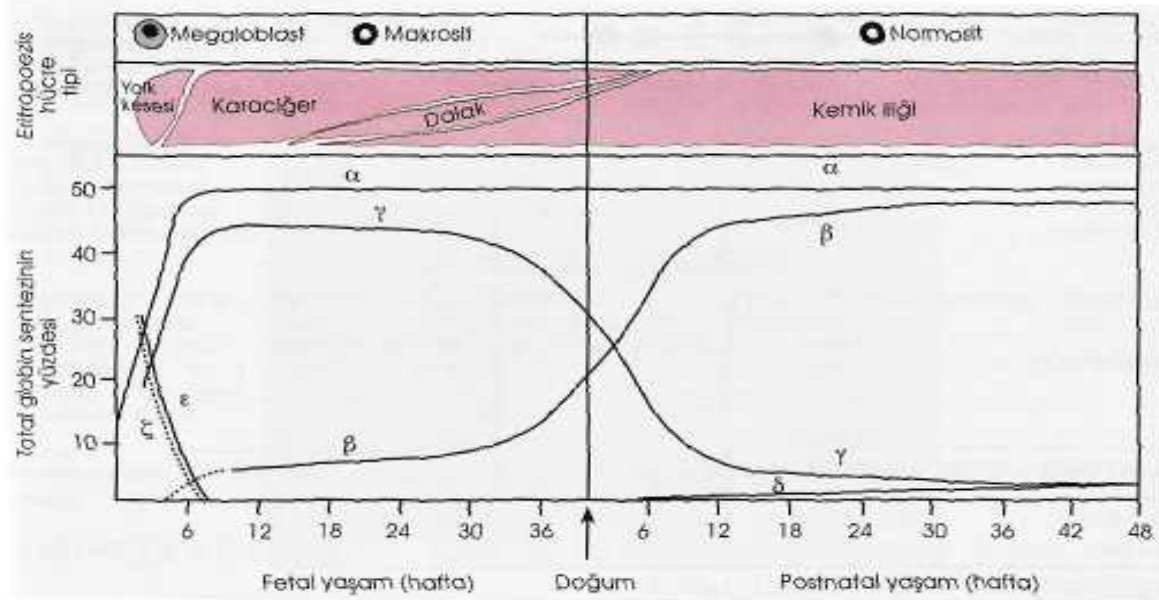
Hemoglobin sentezi gelişim esnasında değişiklik göstermektedir. Embriyoda  $\alpha$  benzer genlerden  $\zeta$ , fetüste ise  $\alpha$  aktif bir şekilde protein üretmektedir. Benzer şekilde  $\beta$  globin genlerinde de dönüşüm olmaktadır. Embriyonik safhada  $\epsilon$ , fetüste ise  $\gamma$  globin geni, erişkin bireylerde ise  $\delta$  ve  $\beta$  globin genleri aktif olmaktadır. Embriyonik, fetal ve erişkin yaşamda hemoglobinlerin birinin sentezi azalırken diğerinin artmaya başladığı aşağıdaki şekilde gösterilmektedir<sup>9,11,13,14,15</sup>.

### 2.1.2. Hemoglobin Dönüşümü

Embriyonik hayatın erken evresinde Hb sentezi, yolk kesesinde ve Hb Gover 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Hb Gover 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) ile Hb Portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ) üretimiyle sınırlıdır. Daha sonra gebeliğin yaklaşık 8. haftasında fetal karaciğer, predominant olarak HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ) ve az miktarda (<10) Hb A sentez görevini sürdürmektedir. Bunun yanında dalakta da HbF üretilmektedir. Gebeliğin 18. haftasından doğuma kadar kırmızı hücre üretim görevi yavaş yavaş fetal

karaciğerden kemik iliğine geçmektedir. Doğumdan sonra Hb F miktarı azalırken buna paralel olarak HbA üretimi artmaktadır. Bir yaşında Hb F üretimi %2, erişkinde ise %1'in altına inmektedir. Embriyonik yaşamdan iki yaşına kadar globin zincirlerinin dönüşümü grafiksel olarak aşağıda gösterilmiştir (Şekil 2.2)<sup>9,11,13,15</sup>.

Bunun yanında  $G\gamma$  ve  $A\gamma$  zincirlerinin sentezi fetal hemoglobinden yetişkin hemoglobine dönüşüm esnasında değişmektedir. Fetal kırmızı kan hücrelerinde  $G\gamma/A\gamma$  oranı 3:1 iken, erişkin fetal hemoglobinde bu oran 2:3 olmaktadır<sup>10,15</sup>.



Şekil 2.2. Embriyonik ve fetal gelişimin farklı evrelerinde globin zincir sentezi.

Alfa geni üzerinde aynı tür globin üreten iki gen ( $\alpha_2$  ve  $\alpha_1$ ) bulunmaktadır. Bu genlerin kodlayan dizileri aynı olup sadece 5'UTR ve 3'UTR uçları ile intron 2 de dizi değişiklikleri bulunmaktadır. Gelişim boyunca  $\alpha_2$ 'nin ekspresyonununun  $\alpha_1$ 'den daha fazla olduğu bilinmektedir<sup>11,14</sup>.

## 2.2. HEMOGLOBİN VARYANTLARI

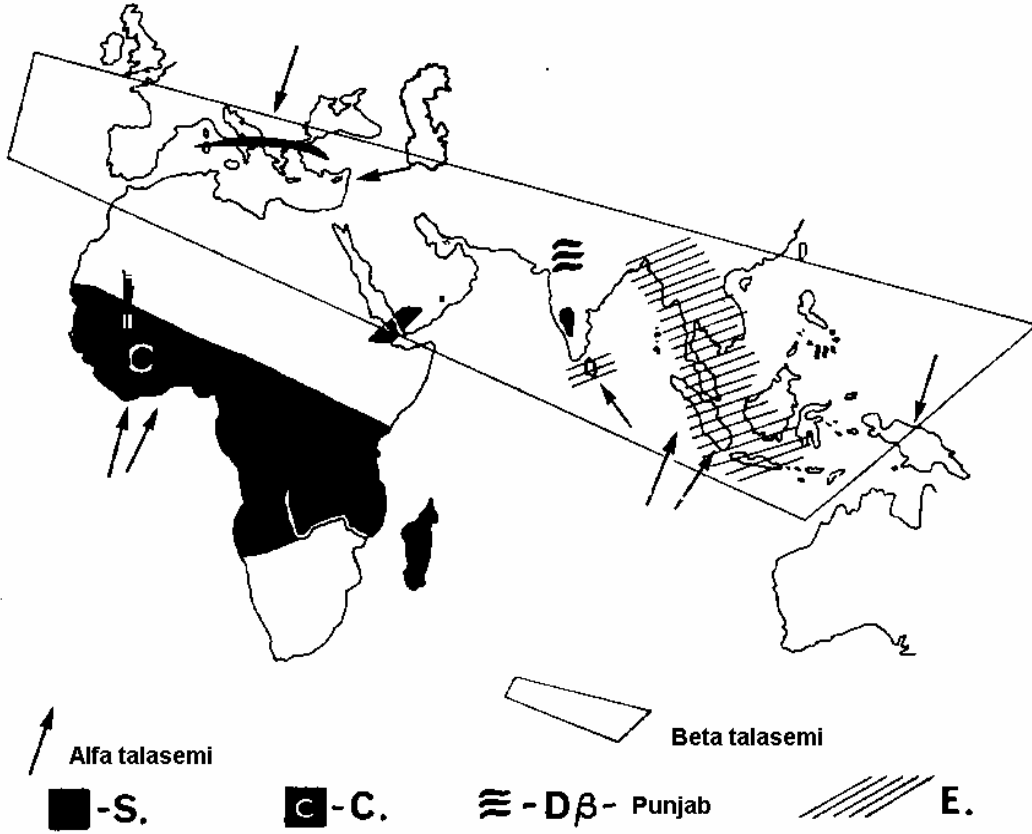
Hemoglobinin yapısında bulunan globin zincirlerinin sentezindeki azalma veya yapılarındaki amino asit değişikliği ile karakterize olaylara hemoglobinopatiler denilmektedir. Daha sonraları globin zincir sentezindeki azalma veya yokluğu sonucu ortaya çıkan sendromlara talasemi adı verilmiştir. Talaseminin patofizyolojisini globin zincir oranında ortaya çıkan dengesizlik oluşturmaktadır. Normal oranda üretilen diğer zincir göreceli olarak fazladır; tetrameri oluşturmak için komplementer zincirinin yokluğunda prematür kırmızı kan hücresi içinde çökerek hücre zarında hasara neden olmaktadır. Ayrıca kırmızı hücre içinde Hb miktarı azalarak hipokromik mikrositer anemiye neden olmaktadır. Globin zincirindeki amino asit değişikliği sonucu ise anormal hemoglobinler veya Hb varyantları meydana gelmektedir<sup>1,11,12,14</sup>.

Orak hücre anemisine neden olan HbS, 1949 yılında Pauling ve ark. tarafından keşfedilmiştir. Özellikle Afrika'da (ekvator) ve bu bölgeden göç eden siyahların yaşadığı ülkelerde, Suudi Arabistan ve Hindistan bazı eyaletlerinde, daha az olmak üzere Akdeniz ülkelerinde görülmektedir<sup>11</sup> (**Şekil 2.3**).

HbS içeren eritrositler oksijen azlığında sonucunda polimerleşerek kırmızı hücrelerin orak şeklini almasına (sickling) neden olmaktadır. Orak hücre anemisine (Sickle cell anemia) neden olan Hb molekülüne oraklaşma özelliğinden dolayı HbS olarak tanımlanmıştır. Laboratuarda oraklaşma testi ile belirlenen HbS, elektroforezde HbA'dan farklı hızda göç etmektedir. Yapılan incelemelerde HbS molekülünün beta globin zincirindeki 6. amino asitin mutasyona uğradığı belirlenmiştir. Glutamik asit yerini valin ( $\beta 6; \text{Glu} \rightarrow \text{Val}$ ) geçtiği zaman molekülünün stabilitesi ve solubilitesinde önemli değişiklikler olmaktadır. Genetik analizi yapıldığı zaman ise 6. kodonda adenin yerine timin ( $\text{GAG} \rightarrow \text{GTG}$ ) geçtiği belirlenmiştir<sup>9,11,16,17</sup>.

Dünyada ikinci sıklıkta görülen anormal hemoglobin ise HbE ( $\beta 26 \text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$ )'dir. Olguların yaklaşık %80'ni Güneydoğu Asya'da yaşamaktadır (**Şekil 2.3**). HbE'deki mutasyon 26. kodonda ( $\text{GAG} \rightarrow \text{AAG}$ ) olup meydana gelen baz değişimi sonucu,  $\beta^E$ -globin mRNA'nın normal splicinginde azalma görülmektedir. Hb varyantlarından farklı olarak eritrositlerde mikrositoz ve hipokromi ile hafif derecede anemi meydana gelmektedir. HbE

homozigotları, asemptomatiktirler ve sadece hafif anemik olmalarına rağmen, HbE mutasyonu farklı  $\beta$ -talasemi alleleriyle birlikte anormal fenotip oluşturmaktadır<sup>9,11,14,16,17</sup>.



Şekil 2.3. Dünyada yaygın olarak görülen anormal hemoglobinler ve talasemiler.

Hb C ( $\beta_6$ ; Glu→Lys veya GAG→AAG) ise dünyada üçüncü sıklıkta gözlenen Hb varyantı olup, özellikle Batı Afrika kıyılarında sık gözlenmektedir<sup>9,16,17</sup> (Şekil 2.3). HbC, HbA'dan daha az çözünür; kılcak damarlarda deformasyonu azaltıp hafif hemolitik anemiye yol açarak kırmızı hücrelerde kristalleşme eğilimi gösterir<sup>9,11,14</sup>. HbC taşıyıcılarında target

hücrelerinde hafif artış dışında herhangi bir hematolojik değişim görülmemektedir. Homozigot C ise, splenomegali ile hafif hemolitik anemi ile karakterizedir<sup>11,14,17</sup>.

HbD ( $\beta$ 121;Glu→Gln: GAG→AAG) Hb D-Los-Angeles veya HbD-Punjab olarak adlandırılmaktadır. Özellikle Hindistan'da % 2-3 oranında rastlanmaktadır (**Şekil 2.3**). HbD taşıyıcılarında klinik, hematolojik yada fizyolojik olarak bir anormallik gözlenmezken homozigot olgularda orta derecede hemolitik anemi tespit edilmektedir<sup>11,14,17</sup>.

İlk anormal hemoglobinler alfabetik harflerle isimlendirmiştir. Daha sonra yeni bulunan hemoglobine genellikle olgunun yaşadığı yerin adı verilmeye başlanmıştır. Hemoglobin varyantlarında heterozigotluk kavramı taşıyıcı olarak bilinmekte olup HbAS (sickle cell taşıyıcısı), HbAC, HbAD, HbAE şeklinde gösterilmektedir. Homozigotlar HbSS; sickle cell anemia, HbCC; HbC hastası olarak tanımlanmaktadır. Çift heterozigotluk ise her ebeveyninden gelen farklı globin zincir varyantının birlikte taşıyıcılarını (HbSE, HbSD veya HbSE gibi) tanımlamaktadır. Benzer şekilde birey hem  $\beta$  globin varyantı hem de  $\beta$  talasemi taşıyıcısı olabilir. Örneğin bir ebeveyninden S diğer ebeveyninden  $\beta$  talasemi kalıtımı söz konusu ise birey HbS- $\beta$  talasemi şeklinde isimlendirilmektedir<sup>11,17</sup>.

Bazı anormal hemoglobinler yapısal özelliklerine bağlı olarak polimerleşme (HbS), kristalleşme (HbC) veya dayanıksız olmaları nedeniyle hemolitik anemiye neden olmaktadır. Oksijen affinitesinde artış gösteren anormal hemoglobinler eritropoezi artırırken, affinitede azalışa neden olanlar ise siyanoz ile kendini göstermektedir. Bazı hemoglobin varyantları da talasemik fenotip (HbE) ile karakterizedir<sup>17</sup>. Ancak pek çok Hb varyantının hiçbir patolojiye neden olmadığı yapılan toplum taraması sonucu karakterize edildiği bilinmektedir<sup>9,17</sup>.

Toplum taramasında anormal hemoglobinler elektroforez, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), İzoelektrofokusing (IEF) yöntemleri kullanılarak analiz edilmektedir<sup>18</sup>. Bu yöntemler ile kesin tanısı konulamayan varyantlar DNA analizleri sonucunda teşhis edilmiş olup bugüne kadar 920'den fazla hemoglobin varyantı keşfedilmiştir<sup>3</sup>.

Hemoglobin varyantları, Hb molekülünü oluşturan globin genlerindeki mutasyonlar sonucu meydana gelmektedir. Bunlar mutasyon tipine göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılmaktadır<sup>2</sup>.

- Alfa ( $\alpha_2$  ve  $\alpha_1$ ) veya beta globin genleri ( $\beta$ -,  $^G\gamma$ -,  $^A\gamma$ - ve  $\delta$ ) üzerindeki tek baz mutasyonu sonucunda oluşan varyantlar,
- Alfa ve beta globin genlerinde iki mutasyonun neden olduğu iki amino asit değişimli varyantlar,
- Delta ve beta,  $\beta$  ve  $\delta$  veya  $^A\gamma$  ve  $\beta$  globin genlerin füzyonu sonucu oluşan hemoglobin varyantları,
- C- ve N-terminal uçlarının her ikisinde uzamış  $\alpha$  veya  $\beta$  globin zincirli varyantları,
- Delesyonlu ve/veya insersiyonlu  $\alpha$  veya  $\beta$  globin zincirli Hb varyantları olarak sınıflandırılması mümkündür. 1997 yılına kadar globin zincirlerindeki varyant sayısı 693 iken<sup>2</sup> (**Tablo 2.3**), 2005 yılındaki varyant sayısı 925 olarak belirlenmiştir<sup>3</sup>.

**Tablo 2.3.** 1997 yılına kadar tespit edilmiş hemoglobin varyant sayısı

<i>Tip</i>	<i>Sayısı</i>
$\alpha$ zincir varyantları	199
$\beta$ zincir varyantları	335
$\gamma$ zincir varyantları $^G\gamma=38$ , $^A\gamma=20$ ; bilinmeyen=3; özel=7	68
$\delta$ zincir varyantları	28
İki amino asit değişimli amino asitler ( $\alpha=1$ ; $\beta=17$ )	18
Hibrid zincirli varyantlar	10
Uzamış zincirli varyantlar (C-terminalde=9; N-terminalde=4)	13
Delesyonlu varyantlar (15); insersiyonlu (4); delesyonlu ve insersiyonlu (3)	22
<b>Toplam</b>	<b>693</b>

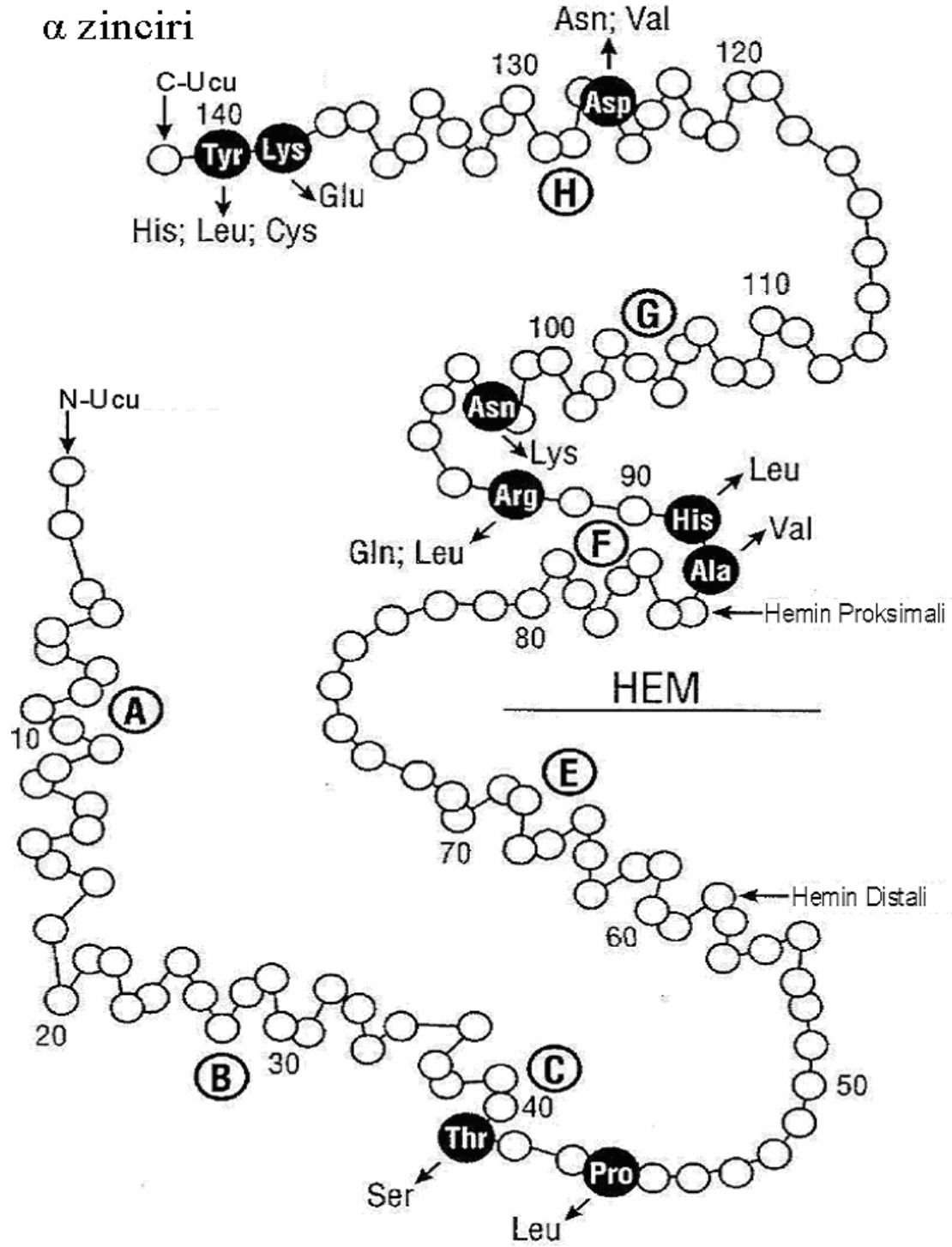
Tespit edilmiş olan hemoglobin varyantların yaklaşık  $\frac{3}{4}$ 'ü tek amino asit değişimi sonucunda oluşan varyantlardır. Bunlar dışında bazı varyantların aynı zincir üzerinde iki farklı amino asit değişimi bulunmaktadır<sup>2,11</sup>. Alfa globin zincirinin 141 amino asitinin 99'unda amino asit değişimi tespit edilmiştir; kodon 23, 75 ve 94'te beş mutasyon, kodon 141'de altı mutasyon ve diğer kodonlarda ise daha az sayıda mutasyon tespit edilmiştir. Beta globin geninin 146 kodonunun 138'inde mutasyon tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar sonucunda 355 farklı baz değişimi rapor edilmiştir; altı farklı kodonda (kodon 22, 67, 97, 121, 143 ve 146) beş ayrı mutasyon, kodon 92'de altı mutasyon ve kodon 99'da ise yedi mutasyon tespit edilmiştir<sup>2</sup>.

Hemoglobin molekülünde meydana gelen bazı mutasyonlar Hb'in oksijene olan ilgisini artırmakta veya azaltmaktadır. Bu değişimler sonucu eritrositoz meydana gelmektedir. Bazı amino asit değişikliği sonucu meydana gelen anormal hemoglobinlerde oksijene olan ilgi değişmezken, mutant globin dayanıksız olduğu için talasemiye neden olmaktadır<sup>2,12</sup>.

Yüksek oksijen affiniteli hemoglobin taşıyıcıların klinik bulguları çeşitlilik göstermektedir. Genellikle hemoglobin düzeyi yüksek ve eritrositoz ile karakterizedir. Dolayısıyla hastaların büyük bir kısmı asemptomatik olup rutin hematolojik taramalarda hafif eritrositoz vakaların araştırılmasıyla tespit edilmiştir. Moleküler oksijene ilgisi artmış olup taşıyıcılarda belirgin eritrositoza neden olan 13  $\alpha$  varyantı belirlenmiştir<sup>2</sup>.

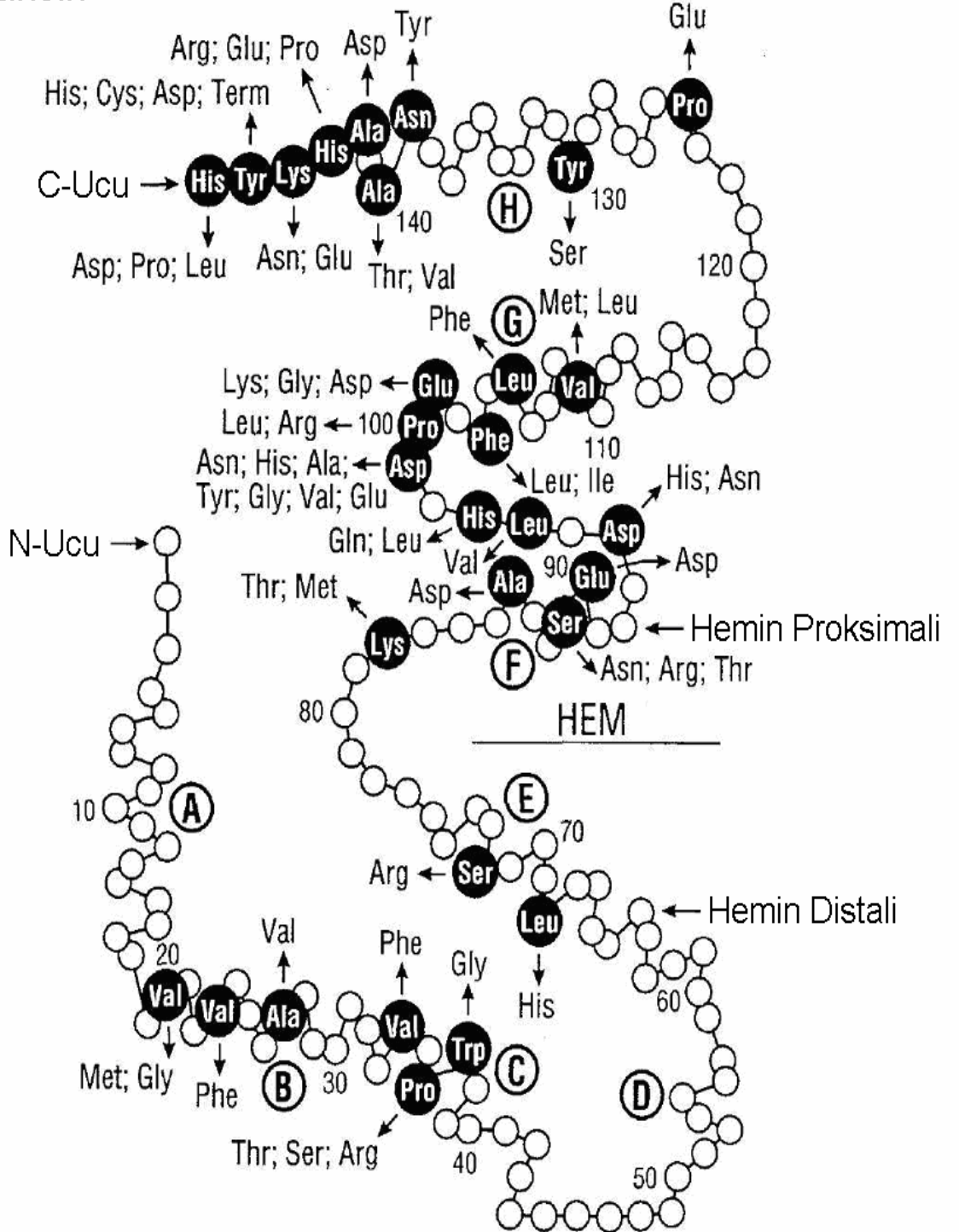
Yüksek oksijen affiniteli  $\alpha$  hemoglobin varyant taşıyıcıları, yüksek affiniteli  $\beta$  hemoglobin varyant taşıyıcılarından klinik olarak daha hafif seyretmektedir. Moleküler oksijene affinitesi artmış olan ve taşıyıcılarda belirgin eritrositoza neden olan 60 farklı  $\beta$  varyantı gösterilmiştir<sup>2</sup>. Yüksek oksijen affiniteli  $\alpha$  zincir varyantlarının çoğu C-terminalinde veya  $\alpha 1\beta 1$  ile  $\alpha 1\beta 2$  etkileşimindeki temel amino asitlerde mutasyon tespit edilmiştir. Bir çok yüksek oksijen affiniteli  $\beta$  zincir varyantı temel olarak C-terminalde (139 ile 146 rezidüleri boyunca),  $\alpha 1\beta 2$ 'nin F ile G heliksleri arasındaki 94-103 rezidüleri arasındaki etkileşim bölgesinde veya B ile C helikslerin bağlantı kurduğu  $\alpha 1\beta 1$  ve  $\alpha 1\beta 2$ 'deki mutasyonlar sonucunda oluşmaktadırlar. Yüksek oksijen affinitesine yol açan  $\alpha$  genindeki mutasyonların yerleşimi **Şekil 2.4'te**,  $\beta$  genindeki mutasyonların yerleşimi ise **Şekil 2.5'te** gösterilmiştir<sup>2</sup>.





**Şekil 2.4.** Oksijen affinitesinin artmasına neden olan  $\alpha$  globin zincirindeki amino asit değişim yerleri.

## β zinciri



Şekil 2.5. Oksijen affinitesinin artmasına neden olan β globin zincirindeki amino asit değişim yerleri.

Oksijen affinetesi azalmış Hb varyantı taşıyıcılarının cildi soluk ve siyanoz ile karakterizedir. Alfa varyantlarında siyanoz fetal yaşamdan itibaren gelişmektedir. Bu durum  $\alpha$  zincirlerinin fetal yaşamın ikinci trimesterden itibaren sentez edilmeye başlanmasından kaynaklanmaktadır. Oksijen affinetesi azalmış  $\alpha$  Hb varyantlarından Hb M-Boston [58His→Tyr] ve Hb M-Iwate [87His→Tyr] siyanoza neden olurken, Hb Moabit [86Leu→Arg] ise hafif hemolitik anemiye neden olmaktadır. Beta varyantlarında ise siyanoz bir yaşından itibaren gelişmeye başlar. Bunun nedeni de  $\beta$  zincir sentezinin perinatal dönemde etkin olmasından kaynaklanmaktadır. Heterozigotları hemolitik anemiye neden olup 23 tane oksijen affinetesi azalmış  $\beta$  globin zincir varyantı belirlenmiştir<sup>2,12</sup>.

Hemoglobin molekülünün primer yapısını etkileyen mutasyonlar, molekülün tersiyer ve kuaterner yapısını da değiştirmektedir. Bunun sonucunda hemoglobin molekülünün tetramer yapısının stabilitesi bozulmakta ve kırmızı hücrelerde presipite olmaktadır. Hemin globine bağlanması molekülün oksijen taşınması yanında stabilite ve solubilitede de önemlidir<sup>2,11,12</sup>. Hb varyantlarında stabilitenin azalmasında; hidrofilik rezidü ile molekülün interior kısmındaki hidrofobik rezidünün değişimi ile temel distal ve proksimal histidinlerin değişimi gibi birkaç mekanizma sorumludur. Unstabilite, kırmızı hücrelerde Heinz cisimcikleri, kırmızı hücre lizatlarında ısı unstabilitesi, organik bileşikler (izopropanol, n-bütanol) ve suda proteinin unstabilitesi gibi birçok metotla saptanması mümkün olmasına rağmen tanımlanması oldukça zordur. Bazen unstabilite bir metodla tespit edilirken başka bir metotta saptanmayabilir. Bundan dolayı literatürlerde birkaç Hb varyantının hafif, orta veya unstabil olarak listelenmiş görmek mümkündür<sup>2,11,12</sup>.

Özellikle birkaç unstabil Hb varyantı (temel olarak  $\alpha$  globin zincir varyantları) bazı listelerde yer almamıştır. Çünkü onların durumu hemolitik anemiden çok talasemi ile birleşmiştir. Bu varyantlar [Örneğin: Hb Agrinio ( $\alpha$ 29 Leu→Pro); Hb Quon Sze ( $\alpha$ 125 Leu→Pro); Hb Tunis-Bizerte ( $\alpha$ 129 Leu→Pro)] dayanıksız olup varlığını tespit etmek çok zordur. Tanımlanmaları ancak moleküler düzeyde DNA dizi analizi ile mümkün olmaktadır. Bunların yanında normal olarak sentezlenen ama kemik iliğinde hızlı bir şekilde yıkılan unstabil hemoglobinler hemolitik anemiye neden olmaktadır. Hemolitik anemiye neden olan unstabil 6 tane  $\alpha$  globin zincir varyantı gösterilmiştir. Unstabil hemoglobinler toplumda pek yaygın değildir. Ayrıca hemolitik anemiye neden olan 36 unstabil  $\beta$  globin zincir varyantı

tanımlanmıştır<sup>2,12,18</sup>. Tek baz değişimi sonucunda meydana gelen 199 alfa globin zincir varyantı **Tablo 2.4**'te gösterilmiştir<sup>2</sup>. Hemoglobin varyantları eski yıllarda aminoasit dizisine göre tanımlanmıştır. Parantez içindeki baz değişimi ise amino asite göre tahmin edilen mutasyonları göstermektedir.

**Tablo 2.4.** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen alfa globin zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
Chongqing	2	Leu→Arg	(CTG→CGG)
J-Toronto	5	Ala→Asp	(GCC→GAC)
Karachi	5	Ala→Pro	(GCC→CCC)
Sawara	6	Asp→Ala	(GAC→GCC)
Dunn	6	Asp→Asn	(GAC→AAC)
Ferndown	6	Asp→Val	(GAC→GTC)
Woodville	6	Asp→Tyr	(GAC→TAC)
Swan River	6	Asp→Gly	(GAC→GGC)
Tatras	7	Lys→Asn	(AAG→AAC)
Kurosaki	7	Lys→Glu	(AAG→GAG)
J-Wenchang-Wuming	11	Lys→Gln	(AAG→CAG)
Albany-Suma	11	Lys→Asn	(AAG→AAC veya AAT)
J-Paris-I	12	Ala→Asp	GCC→GAC
Evanston	14	Trp→Arg	(TGG→AGG)
I-Interlaken	15	Gly→Asp	GGT→GAT
Ottawa	15	Gly→Arg	(GGT→CGT)
I	16	Lys→Glu	AAG→GAG
Beijing	16	Lys→Asn	(AAG→AAC veya AAT)
Harbin	16	Lys→Met	(AAG→ATG)
Handsworth	18	Gly→Arg	(GGC→CGC)
Al-Ain Abu Dhabi	18	Gly→Asp	(GGC→GAC)
J-Kurosh	19	Ala→Asp	(GCC→?;GCC→GAC?)
J-Tashikuergan	19	Ala→Glu	(GCG→GAG)
Necker Enfants-Malades	20	His→Tyr	(CAC→TAC)
Le Lamentin	20	His→Gln	CAC→CAA
Hobart	20	His→Arg	(CAC→CGC)
J-Nyanza	21	Ala→Asp	(GCT→GAT)
Fontainebleau	21	Ala→Pro	(GCT→CCT)

**Tablo 2.4 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen alfa globin zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
J-Medellin	22	Gly→Asp	(GGC→GAC)
Memphis	23	Glu→Gln	(GAG→CAG)
Chad	23	Glu→Lys	GAG→AAG
G-Audhali	23	Glu→Val	(GAG→GTG)
Reims	23	Glu→Gly	(GAG→GGG)
Lisbon	23	Glu→Asp	(GAG→GAT)
Luxembourg	24	Tyr→His	(TAT→CAT)
Ramona	24	Tyr→Cys	TAT→TGT
Shenyang	26	Ala→Glu	(GCG→GAG)
Forth Worth	27	Glu→Gly	(GAG→GGG)
Spanish Town	27	Glu→Val	(GAG→GTG)
Shuangfeng	27	Glu→Lys	(GAG→AAG)
Hekinan	27	Glu→Asp	GAG→GAC
Agrinio	29	Leu→Pro	CTG→CCG
O-Padova	30	Glu→Lys	(GAG→AAG)
G-Honolulu	30	Glu→Gln	(GAG→CAG)
Prato	31	Arg→Ser	(AGG→AGC)
Queens	34	Leu→Arg	(CTG→CGG)
Bourmedès	37	Pro→Arg	(CCC→CGC)
Kariya	40	Lys→Glu	(AAG→GAG)
Kanagawa	40	Lys→Met	AAG→ATG
Miyano	41	Thr→Ser	(ACC→TCC veya AGC)
Torino	43	Phe→Val	(TTC→GTC)
Hirosaki	43	Phe→Leu	(TTC→CTC)
Milledgeville	44	Pro→Leu	(CCG→CTG)
Kawachi	44	Pro→Arg	(CCG→CGG)
Fort de France	45	His→Arg	(CAC→CGC)
Bari	45	His→Gln	(CAC→CAG)
Poitiers	45	His→Asp	(CAC→AAC)
Beilinson	47	Asp→Gly	(GAC→GGC)
Hasharon	47	Asp→His	GAC→CAC
Arya	47	Asp→Asn	(GAC→AAC)
Cordele	47	Asp→Ala	(GAC→GCC)
Kurdistan	47	Asp→Tyr	GAC→TAC
Montgomery	48	Leu→Arg	CTG→CGG
Savaria	49	Ser→Arg	(AGC→CGC)
J-Sardegna	50	His→Asp	(CAC→GAC)
Aichi	50	His→Arg	(CAC→CGC)
J-Abidjan	51	Gly→Asp	(GGC→GAC)

**Tablo 2.4 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen alfa globin zincir varyantları

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
Russ	51	Gly→Arg	(GGC→CGC)
J-Rovigo	53	Ala→Asp	(GCC→GAC)
Shimonoseki	54	Gln→Arg	(CAA→CGA)
Mexico	54	Gln→Glu	(CAA→GAA)
Thailand	56	Lys→Thr	(AAG→ACG)
Shaare Zadek	56	Lys→Glu	(AAG→GAG)
Belliard	56	Lys→Asn	(AAG→AAT veya AAC)
Port Huron	56	Lys→Arg	AAG→AGG
L-Persian Gulf	57	Gly→Arg	(GGC→CGC)
J-Norfolk	57	Gly→Asp	(GGC→GAC)
M-Boston	58	His→Tyr	(CAC→TAC)
Tottori	59	Gly→Val	(GGC→GTC)
Adana	59	Gly→Asp	GGC→GAC
Zambia	60	Lys→Asn	(AAG→AAC veya AAT)
Dagestan	60	Lys→Glu	(AAG→GAG)
J-Buda	61	Lys→Asn	(AAG→AAC veya AAT)
J-Anatolia	61	Lys→Thr	AAG→ACG
Evans	62	Val→Met	GTG→ATG
Pontoise	63	Ala→Asp	(GCC→GAC)
G-Waimanalo	64	Asp→Asn	GAC→AAC
Perspolis	64	Asp→Tyr	(GAC→TAC)
Q-India	64	Asp→His	GAC→CAC
Guangzhou-Hangzshou	64	Asp→Gly	(GAC→GGC)
G-Philadelphia	68	Asn→Lys	AAC→AAG ( $\alpha 2\alpha 1$ ) veya AAC→AAA ( $\alpha 2$ )
Ube-2	68	Asn→Asp	(AAC→GAC)
J-Habana	71	Ala→Glu	(GCG→GAG)
Ozieri	71	Ala→Val	(GCG→GTG)
Daneskgah-Teheran	72	His→Arg	(CAC→CGC)
Q-Thailand	74	Asp→His	GAC→CAC
Lille	74	Asp→Ala	(GAC→GCC)
G-Pest	74	Asp→Asn	(GAC→AAC)
Chapel Hill	74	Asp→Gly	GAC→GGC
Q-Iran	75	Asp→His	(GAC→CAC)
Duan	75	Asp→Ala	GAC→GCC
Winnipeg	75	Asp→Tyr	(GAC→TAC)
Matsue-Okı	75	Asp→Asn	(GAC→AAC)
Mizushi	75	Asp→Gly	(GAC→GGC)
Noko	76	Met→Lys	(ATG→AAG)

**Tablo 2.4 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen alfa globin zincir varyantları

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
Aztec	76	Met→Thr	(ATG→ACG)
GuiZhou	77	Pro→Arg	(CCC→CGC)
Stanleyville-II	78	Asn→Lys	(AAC→AAG)
J-Singa	78	Asn→Asp	(AAC→GAC)
Davenport	78	Asn→His	AAC→CAC
Mantes-La-Jolie	79	Ala→Thr	(GCC→ACC)
Ann Arbor	80	Leu→Arg	(CTG→CGG)
Nigeria	81	Ser→Cys	(TCC→TGC)
Garden State	82	Ala→Asp	(GCC→GAC)
Etobicoke	84	Ser→Arg	(AGC→AGG veya CGC veya AGA)
G-Norfolk	85	Asp→Asn	(GAC→AAC)
Atago	85	Asp→Tyr	(GAC→TAC)
Inkster	85	Asp→Val	GAC→GTC
Moabit	86	Leu→Arg	(CTG→CGG)
Iwata	87	His→Arg	(CAC→CGC)
M-Iwate	87	His→Tyr	CAC→TAC
Loire	88	Ala→Ser	(GCG→TCG)
Columbia Missouri	88	Ala→Val	(GCG→GTG)
Valparaiso	88	Ala→Gly	(GCG→GGG)
Luton	89	His→Leu	(CAC→CTC)
J-Broussais	90	Lys→Asn	AAG→AAT ( $\alpha 2$ ) veya AAG→AAC( $\alpha 1$ )
J-Rajappen	90	Lys→Thr	AAG→ACG
Handa	90	Lys→Met	(AAG→ATG)
Port Phillip	91	Leu→Pro	(CTT→CCT)
J-Cape Town	92	Arg→Gln	CGG→CAG
Cemenelum	92	Arg→Trp	(CGG→TGG)
Chesapeake	92	Arg→Leu	(CGG→CTG)
Titusville	94	Asp→Asn	(GAC→AAC)
Setif	94	Asp→Tyr	(GAC→TAC)
Sunshine Seth	94	Asp→His	GAC→CAC
Çapa	94	Asp→Gly	GAC→GGC
Roanne	94	Asp→Glu	(GAC→GAG)
G-Georgia	95	Pro→Leu	CCG→CTG
Rampa	95	Pro→Ser	(CCG→TCG)
Denmark Hill	95	Pro→Ala	(CCG→GCG)
St. Luke's	95	Pro→Arg	CCG→CGG
Dallas	97	Asn→Lys	AAC→AAA

**Tablo 2.4 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen alfa globin zincir varyantları

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
Turriff	99	Lys→Glu	(AAG→GAG)
Manitoba	102	Ser→Arg	AGC→CGC ( $\alpha 2$ ) veya AGC→AGA ( $\alpha 1$ )
Contaldo	103	His→Arg	(CAC→CGC)
Sallanches	104	Cys→Tyr	TGC→TAC
Suan-Dok	109	Leu→Arg	CTG→CGG
Petah Tikva	110	Ala→Asp	(GCC→GAC)
Tonosho	110	Ala→Thr	(GCC→ACC)
Anamosa	111	Ala→Val	GCC→GTC
Hopkins-II	112	His→Asp	(CAC→GAC)
Strumica	112	His→Arg	(CAC→CGC)
Twin Peaks	113	Leu→His	(CTC→CAC)
Chiapas	114	Pro→Arg	(CCC→CGC)
Nouakchott	114	Pro→Leu	(CCC→CTC)
Melusine	114	Pro→Ser	(CCC→TCC)
J-Tongariki	115	Ala→Asp	GCC→GAC
O-Indonesia	116	Glu→Lys	GAG→AAG
Ube-4	116	Glu→Ala	(GAG→GCG)
Oleander	116	Glu→Gln	(GAG→CAG)
J-Meerut	120	Ala→Glu	GCG→GAG
Owari	121	Val→Met	(GTG→ATG)
Westmead	122	His→Gln	CAC→CAG
Mulhacen	123	Ala→Ser	GCC→TCC ( $\alpha 1$ ) ve $\alpha 120'$ de GCG→GCT
Quong Sze	125	Leu→Pro	CTG→CCG
Tarrant	126	Asp→Asn	(GAC→AAC)
Sassari	126	Asp→His	(GAC→CAC)
Fukutomi	126	Asp→Val	(GAC→GTC)
Montefiore	126	Asp→Tyr	(GAC→TAC)
St. Claude	127	Lys→Thr	(AAG→ACG)
Jackson	127	Lys→Asn	(AAG→AAT veya AAC)
Tunis-Bizerte	129	Leu→Pro	CTG→CCG
Sun Prairie	130	Ala→Pro	GCT→CCT
Yuda	130	Ala→Asp	(GCT→GAT)
Questembert	131	Ser→Pro	(TCT→CCT)
Caen	132	Val→Gly	(GTG→GGG)
Val de Marne	133	Ser→Arg	(AGC→CGC)
Pavie	135	Val→Glu	(GTG→GAG)
Bibba	136	Leu→Pro	CTG→CCG



**Tablo 2.4 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen alfa globin zincir varyantları

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
Toyama	136	Leu→Arg	(CTG→CGG)
Chicago	136	Leu→Met	CTG→ATG
Attleboro	138	Ser→Pro	(TCC→CCC)
Tokoname	139	Lys→Thr	(AAA→ACA)
Hanamaki	139	Lys→Glu	(AAA→GAA)
Ethiopia	140	Tyr→His	(TAC→CAC)
Singapore	141	Arg→Pro	(CGT→CCT)
Suresnes	141	Arg→His	(CGT→CAT)
Cubujuqui	141	Arg→Ser	(CGT→AGT)
Legnano	141	Arg→Leu	(CGT→CTT)
J-Camagüey	141	Arg→Gly	(CGT→GGT)
Nunobiki	141	Arg→Cys	(CTG→TGT)

\* Parentezdeki içindeki bilgiler amino asit değişimine göre tahmin edilen mutasyonları göstermektedir.

1997 yılına kadar tespit edilen beta globin zincir varyantları **Tablo 2.5**'te gösterilmiştir. Tek baz değişimi sonucunda oluşan varyant sayısı 335 olarak tespit edilmiştir<sup>2</sup>.

**Tablo 2.5.** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
Raleigh	1	Val→Ac-Ala	GTG→GCG
Deer Lodge	2	His→Arg	(CAC→CGC)
Okayama	2	His→Gln	(CAC→CAA veya CAG)
Fukuoka	2	His→Tyr	(CAC→TAC)
Graz	2	His→Leu	CAC→CTC
Warwickshire	5	Pro→Arg	(CCT→CGT)
Tyne	5	Pro→Ser	CCT→TCT
S	6	Glu→Val	GAG→GTG
C	6	Glu→Lys	GAG→AAG
C-Makassar	6	Glu→Ala	(GAG→GCG)
Machida	6	Glu→Gln	(GAG→CAG)

**Tablo 2.5 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
G-San José	7	Glu→Gly	(GAG→GGG)
G-Siriraj	7	Glu→Lys	(GAG→AAG)
Rio Grande	8	Lys→Thr	(AAG→ACG)
J-Luhe	8	Lys→Gln	(AAG→CAG)
N-Timone	8	Lys→Glu	(AAG→GAG)
Pôrto Alegre	9	Ser→Cys	TCT→TGT
Ankara	10	Ala→Asp	(GCC→GAC)
Hamilton	11	Val→Ile	(GTT→ATT)
Windsor	11	Val→Asp	(GTT→GAT)
Washtenaw	11	Val→Phe	(GTT→TTT)
J-Lens	13	Ala→Asp	(GCC→GAC)
Sögn	14	Leu→Arg	CTG→CGG
Saki	14	Leu→Pro	(CTG→CCG)
Belfast	15	Trp→Arg	(TGG→AGG veya CGG)
Randwick	15	Trp→Gly	(TGG→GGG)
J-Baltimore	16	Gly→Asp	(GGC→GAC)
D-Bushman	16	Gly→Arg	(GGC→CGC)
Nagasaki	17	Lys→Glu	(AAG→GAG)
J-Amiens	17	Lys→Asn	(AAG→AAC veya AAT)
Nikosia	17	Lys→Gln	(AAG→CAG)
Baden	18	Val→Met	GTG→ATG
Sinai-Baltimore	18	Val→Gly	GTG→GGG
D-Ouled Rabah	19	Asn→Lys	(AAC→AAA veya AAG)
Alamo	19	Asn→Asp	(AAC→GAC)
Malay	19	Asn→Ser	AAC→AGC
Olympia	20	Val→Met	GTG→ATG
Trollhättan	20	Val→Glu	GTG→GAG
Yusa	21	Asp→Tyr	(GAT→TAT)
Connecticut	21	Asp→Gly	(GAT→GGT)
Cocody	21	Asp→Asn	(GAT→AAT)
Karlskoga	21	Asp→His	GAT→CAT
E-Saskatoon	22	Glu→Lys	(GAA→AAA)
G-Taipei	22	Glu→Gly	(GAA→GGA)
G-Coushatta	22	Glu→Ala	(GAA→GCA)
D-Iran	22	Glu→Gln	(GAA→CAA)
D-Granada	22	Glu→Val	(GAA→GTA)
Strasbourg	23	Val→Asp	(GTT→GAT)
Miyashiro	23	Val→Gly	(GTT→GGT)
Palmerston North	23	Val→Phe	(GTT→TTT)

**Tablo 2.5 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları

<b>Hb Adı</b>	<b>Amino asit sırası</b>	<b>Amino asit değişimi</b>	<b>Mutasyon*</b>
Riverdale-Bronx	24	Gly→Arg	(GGT→CGT)
Savannah	24	Gly→Val	(GGT→GTT)
Moscvva	24	Gly→Asp	(GGT→GAT)
G-Taiwan-Ami	25	Gly→Arg	(GGT→CGT)
J-Auckland	25	Gly→Asp	(GGT→GAT)
E	26	Glu→Lys	GAG→AAG
Henri Mondor	26	Glu→Val	(GAG→GTG)
Volga	27	Ala→Asp	(GCC→GAC)
Knossos	27	Ala→Ser	GCC→TCC
Grange-Blanche	27	Ala→Val	(GCC→GTC)
Saint Louis	28	Leu→Gln	(CTG→CAG)
Genova	28	Leu→Pro	(CTG→CCG)
Chesterfield	28	Leu→Arg	CTG→CGG
Lufkin	29	Gly→Asp	GGC→GAC
Tacoma	30	Arg→Ser	AGG→AGT
Monroe	30	Arg→Thr	AGG→ACG
Yokohama	31	Leu→Pro	CTG→CCG
Hakkari	31	Leu→Arg	CTG→CGG
Perth	32	Leu→Pro	(CTG→CCG)
Castilla	32	Leu→Arg	(CTG→CGG)
Muscat	32	Leu→Val	(CTG→GTG)
Pitie-Salpetriere	34	Val→Phe	(GTC→TTC)
Philly	35	Tyr→Phe	(TAC→TTC)
Linköping	36	Pro→Thr	CCT→ACT
North Chicago	36	Pro→Ser	(CCT→TCT)
Sunnybrook	36	Pro→Arg	(CCT→CGT)
Hirose	37	Trp→Ser	(TGG→TCG)
Rothschild	37	Trp→Arg	(TGG→AGG veya CGG)
Howick	37	Trp→Gly	(TGG→GGG)
Hazebrouck	38	Thr→Pro	(ACC→CCC)
Alabama	39	Gln→Lys	(CAG→AAG)
Vaasa	39	Gln→Glu	(CAG→GAG)
Tianshui	39	Gln→Arg	(CAG→CGG)
Athens-GA	40	Arg→Lys	(AGG→AAG)
Austin	40	Arg→Ser	(AGG→AGC veya AGT)
Mequon	41	Phe→Tyr	(TTC→TAC)
Denver	41	Phe→Ser	(TTC→TCC)
Hammersmith	42	Phe→Ser	TTT→TCT
Louisville	42	Phe→Leu	(TTT→CTT)

**Tablo 2.5 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
Sendagi	42	Phe→Val	(TTT→GTT)
G-Galveston	43	Glu→Ala	(GAG→GCG)
Hoshida	43	Glu→Gln	GAG→CAG
Mississippi	44	Ser→Cys	(TCC→TGC)
Cheverly	45	Phe→Ser	(TTT→TCT)
Arta	45	Phe→Cys	TTT→TGT
K-Ibadan	46	Gly→Glu	(GGG→GAG)
Gainesville-GA	46	Gly→Arg	(GGG→AGG)
G-Copenhagen	47	Asp→Asn	(GAT→AAT)
Gavello	47	Asp→Gly	(GAT→GGT)
Avicenna	47	Asp→Ala	(GAT→GCT)
Maputo	47	Asp→Tyr	(GAT→TAT)
Okaloosa	48	Leu→Arg	(CTG→CGG)
Bab-Saadoum	48	Leu→Pro	(CTG→CCG)
Las Palmas	49	Ser→Phe	(TCC→TTC)
Edmonton	50	Thr→Lys	(ACT→[AAA veya AAG])
Willamette	51	Pro→Arg	(CCT→CGT)
Osu-Christiansborg	52	Asp→Asn	(GAT→AAT)
Ocho Rios	52	Asp→Ala	(GAT→GCT)
Summer Hill	52	Asp→His	(GAT→CAT)
Jacksonville	54	Val→Asp	(GTT→GAT)
Matera	55	Met→Lys	(ATG→AAG)
J-Bangkok	56	Gly→Asp	(GGC→GAC)
Hamadan	56	Gly→Arg	(GGC→CGC)
G-Ferrera	57	Asn→Lys	(AAC→AAA veya AAG)
J-Daloa	57	Asn→Asp	(AAC→GAC)
Dhofar	58	Pro→Arg	CCT→CGT
I-High Wycombe	59	Lys→Glu	(AAG→GAG)
J-Kaohsiung	59	Lys→Thr	(AAG→ACG)
J-Lome	59	Lys→Asn	(AAG→AAC veya AAT)
Yatsushiro	60	Val→Leu	(GTG→CTG)
Collingwood	60	Val→Ala	(GTG→GCG)
Cagliari	60	Val→Glu	GTG→GAG
N-Seattle	61	Lys→Glu	(AAG→GAG)
Hikari	61	Lys→Asn	(AAG→AAC veya AAT)
Bologna	61	Lys→Met	(AAG→ATG)
Duarte	62	Ala→Pro	(GCT→CCT)
Zürich	63	His→Arg	(CAT→CGT)
M-Saskatoon	63	His→Tyr	(CAT→TAT)

**Tablo 2.5 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
Bicêtre	63	His→Pro	(CAT→CCT)
J-Calabria	64	Gly→Asp	(GGC→GAC)
J-Sicilia	65	Lys→Asn	(AAG→AAC veya AAT)
J-Cairo	65	Lys→Gln	(AAG→CAG)
J-Antakya	65	Lys→Met	(AAG→ATG)
I-Toulouse	66	Lys→Glu	(AAA→GAA)
Chico	66	Lys→Thr	(AAA→ACA)
M-Milwaukee-I	67	Val→Glu	(GTG→GAG)
Bristol	67	Val→Asp	(GTG→ATG)
Alesha	67	Val→Met	GTG→ATG
Sydney	67	Val→Ala	(GTG→GCG)
Manukau	67	Val→Gly	GTG→GGG
Mizuho	68	Leu→Pro	CTC→CCC
Brisbane	68	Leu→His	(CTC→CAC)
Rambam	69	Gly→Asp	(GGT→GAT)
City of Hope	69	Gly→Ser	GGT→AGT
Kenitra	69	Gly→Arg	(GGT→CGT)
Seattle	70	Ala→Asp	(GCC→GAC)
Christchurch	71	Phe→Ser	(TTT→TCT)
Headington	72	Ser→Arg	AGT→AGA
Vancouver	73	Asp→Tyr	(GAT→TAT)
Korle-Bu	73	Asp→Asn	(GAT→AAT)
Mobile	73	Asp→Val	(GAT→GTT)
Tilburg	73	Asp→Gly	(GAT→GGT)
Bushwick	74	Gly→Val	GGC→GTC
Shepherds Bush	74	Gly→Asp	(GGC→GAC)
Aalborg	74	Gly→Arg	(GGC→CGC)
Atlanta	75	Leu→Pro	CTG→CCG
Pasadena	75	Leu→Arg	(CTG→CGG)
J-Chicago	76	Ala→Asp	(GCT→GAT)
Calais	76	Ala→Pro	(GCT→CCT)
J-Iran	77	His→Asp	(CAC→GAC)
Fukuyama	77	His→Tyr	CAC→TAC
Quin-Hai	78	Leu→Arg	(CTG→CGG)
G-Hsi-Tsou	79	Asp→Gly	(GAC→GGC)
Tampa	79	Asp→Tyr	(GAC→TAC)
Tigraye	79	Asp→His	GAC→CAC
Yaizu	79	Asp→Asn	GAC→AAC

**Tablo 2.5 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
G-Szuhu	80	Asn→Lys	(AAC→AAA veya AAG)
Baylor	81	Leu→Arg	(CTC→CGC)
La Roche-sur-Yon	81	Leu→His	(CTC→CAC)
Providence	82	Lys→Asn→Asp	(AAG→AAT veya AAC)
Rahere	82	Lys→Thr	(AAG→ACG)
Helsinki	82	Lys→Met	(AAG→ATG)
Ta-Li	83	Gly→Cys	(GGC→TGC)
Pyrgos	83	Gly→Asp	(GGC→GAC)
Muskegon	83	Gly→Arg	(GGC→CGC)
Kofu	84	Thr→Ile	(ACC→ATC)
Buenos Aires	85	Phe→Ser	(TTT→TCT)
Olomouc	86	Ala→Asp	(GCC→GAC)
D-Ibadan	87	Thr→Lys	(ACA→AAA)
Valletta	87	Thr→Pro	ACA→CCA
Quebec-Chori	87	Thr→Ile	(ACA→ATA)
Borås	88	Leu→Arg	(CTG→CGG)
Santa Ana	88	Leu→Pro	CTG→CCG
Creteil	89	Ser→Asn	(AGT→AAT)
Vanderbilt	89	Ser→Arg	(AGT→CGT)
Villaverde	89	Ser→Thr	(AGT→ACT)
Agenogi	90	Glu→Lys	(GAG→AAG)
Roseau-Pointe a Pitre	90	Glu→Gly	(GAG→GGG)
Pierre Bènite	90	Glu→Asp	(GAG→GAC veya GAT)
Sabine	91	Leu→Pro	(CTG→CCG)
Caribbean	91	Leu→Arg	CTG→CGG
Mozhaisk	92	His→Arg	(CAC→CGC)
M-Hyde Park	92	His→Tyr	(CAC→TAC)
Newcastle	92	His→Pro	(CAC→CCC)
Saint Etienne	92	His→Gln	(CAC→CAA veya CAG)
J-Altgeld Gardens	92	His→Asp	(CAC→GAC)
Redondo	92	His→Asn→Asp	CAC→AAC
Okazaki	93	Cys→Arg	(TGT→CGT)
Barcelona	94	Asp→His	(GAC→CAC)
Bunbury	94	Asp→Asn	(GAC→AAC)
Chandigarh	94	Asp→Gly	(GAC→GGC)
N-Baltimore	95	Lys→Glu	AAG→GAG
J-Cordoba	95	Lys→Met	(AAG→ATG)
Detroit	95	Lys→Asn	(AAG→AAC veya AAT)
Regina	96	Leu→Val	CTG→GTG

**Tablo 2.5 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları.

<b>Hb Adı</b>	<b>Amino asit sırası</b>	<b>Amino asit değişimi</b>	<b>Mutasyon*</b>
Malmö	97	His→Gln	CAC→CAA ve CAC→CAG
Wood	97	His→Leu	(CAC→CTC)
Nagoya	97	His→Pro	(CAC→CCC)
Moriguchi	97	His→Tyr	(CAC→TAC)
Köln	98	Val→Met	GTG→ATG
Nottingham	98	Val→Gly	GTG→GGG
Djelfa	98	Val→Ala	(GTG→GCG)
Mainz	98	Val→Glu	(GTG→GAG)
Kempsey	99	Asp→Asn	(GAT→AAT)
Yakima	99	Asp→His	(GAT→CAT)
Radcliffe	99	Asp→Ala	(GAT→GCT)
Ypsilanti	99	Asp→Tyr	(GAT→TAT)
Hotel-Dieu	99	Asp→Gly	(GAT→GGT)
Chemilly	99	Asp→Val	(GAT→GTT)
Coimbra	99	Asp→Glu	(GAT→GAA veya GAG)
Brigham	100	Pro→Leu	(CCT→CTT)
New Mexico	100	Pro→Arg	(CCT→CGT)
British Columbia	101	Glu→Lys	(GAG→AAG)
Rush	101	Glu→Gln	(GAG→CAG)
Alberta	101	Glu→Gly	(GAG→GGG)
Potomac	101	Glu→Asp	(GAG→GAC veya GAT)
Richmond	102	Asn→Lys	(AAC→AAA veya AAG)
Kansas	102	Asn→Thr	(AAC→ACC)
Beth Israel	102	Asn→Ser	(AAC→AGC)
Saint Mandé	102	Asn→Tyr	(AAC→TAC)
Heathrow	103	Phe→Leu	TTC→TTG
Saint Nazaire	103	Phe→Ile	(TTC→ATC)
Camperdown	104	Arg→Ser	(AGG→AGC veya AGT)
Sherwood Forest	104	Arg→Thr	(AGG→ACG)
South Milwaukee	105	Leu→Phe	(CTC→TTC)
Southampton	106	Leu→Pro	CTG→CCG
Tübingen	106	Leu→Gln	CTG→CAG
Terre Haute	106	Leu→Arg	CTG→CGG
Burke	107	Gly→Arg	(GGC→CGC)
Lulu Island	107	Gly→Asp	GGC→GAC
Yoshizuka	108	Asn→Asp	(AAC→GAC)
Presbyterian	108	Asn→Lys	(AAC→AAA veya AAG)

**Tablo 2.5 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
San Diego	109	Val→Met	GTG→ATG
Johnstown	109	Val→Leu	(GTG→CTG)
Showa-Yakushiji	110	Leu→Pro	CTG→CCG
Peterborough	111	Val→Phe	(GTC→TTC)
Stanmore	111	Val→Ala	(GTC→GCC)
Indianapolis	112	Cys→Arg	(TGT→CGT)
Yahata	112	Cys→Tyr	TGT→TAT
New York	113	Val→Glu	GTG→GAG
Zengcheng	114	Leu→Met	(CTG→ATG)
Durham-N.C.	114	Leu→Pro	CTG→CCG
Madrid	115	Ala→Pro	GCC→CCC
Hradec Kralove	115	Ala→Asp	GCC→GAC
Hafnia	116	His→Gln	(CAT→CAA veya CAG)
P-Galveston	117	His→Arg	(CAC→CGC)
Saitama	117	His→Pro	(CAC→CCC)
Minneapolis-Laos	118	Phe→Tyr	(TTT→TAT)
Fannin-Lubbock	119	Gly→Asp	GGC→GAC ve kodon 111'de GTC→CTG
Bougardirey-Mali	119	Gly→Val	(GGC→GTC)
Iowa	119	Gly→Ala	(GGC→GCC)
Hijiyama	120	Lys→Glu	(AAA→GAA)
Riyadh	120	Lys→Asn	(AAA→AAC veya AAT)
Takamatsu	120	Lys→Gln	(AAA→CAA)
Jianghua	120	Lys→Ile	(AAA→ATA)
D-Los Angeles	121	Glu→Gln	GAA→CAA
O-Arab	121	Glu→Lys	GAA→AAA
St. Francis	121	Glu→Gly	(GAA→GGA)
Beograd	121	Glu→Val	GAA→GTA
D-Neath	121	Glu→Ala	(GAA→GCA)
Villejuif	123	Thr→Ile	(ACC→ATC)
Khartoum	124	Pro→Arg	(CCA→CGA)
Ty Gard	124	Pro→Gln	(CCA→CAA)
Tunis	124	Pro→Ser	(CCA→TCA)
Hofu	126	Val→Glu	GTG→GAG
Beirut	126	Val→Ala	(GTG→GCG)
Dhonburi	126	Val→Gly	GTG→GGG
Complutense	127	Gln→Glu	(CAG→GAG)
Brest	127	Gln→Lys	(CAG→AAG)
Dieppe	127	Gln→Arg	CAG→CGG



**Tablo 2.5 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
J-Guantanamo	128	Ala→Asp	(GCT→GAT)
J-Taichung	129	Ala→Asp	(GCC→GAC)
K-Cameroon	129	Ala→Asp/Glu	(GCC→GAC)
Crete	129	Ala→Pro	(GCC→CCC)
La Desirade	129	Ala→Val	(GCC→GTC)
Wien	130	Tyr→Asp	(TAT→GAT)
Nevers	130	Tyr→Ser	(TAT→TCT)
Camden	131	Gln→Glu	(CAG→GAG)
Shelby	131	Gln→Lys	CAG→AAG
Shanghai	131	Gln→Pro	(CAG→CCG)
Sarrebourg	131	Gln→Arg	(CAG→CGG)
K-Woolwich	132	Lys→Gln	(AAACAA)
Yamagata	132	Lys→Asn	AAA→AAC ve AAA→AAT
Cook	132	Lys→Thr	AAA→ACA
Extremadura	133	Val→Leu	(GTG→CTG)
North Shore	134	Val→Glu	(GTG→GAG)
Altdorf	135	Ala→Pro	(GCT→CCT)
Beckman	135	Ala→Glu/Asp	(GCT→GAT)
Hope	136	Gly→Asp	(GGT→GAT)
Brockton	138	Ala→Pro	(GCT→CCT)
Geelong	139	Asn→Asp	(AAT→GAT)
Hinsdale	139	Asn→Lys	(AAT→AAC veya AAA)
Aurora	139	Asn→Tyr	AAT→TAT
Saint-Jacques	140	Ala→Thr	(GCC→ACC)
Himeji	140	Ala→Asp	(GCC→GAC)
Puttelage	140	Ala→Val	(GCC→GTC)
Olmsted	141	Leu→Arg	(CTG→CGG)
Ohio	142	Ala→Asp	(GCC→GAC)
Toyoake	142	Ala→Pro	(GCC→CCC)
Abruzzo	143	His→Arg	(CAC→CGC)
Little Rock	143	His→Gln	(CAC→CAA veya CAG)
Syracuse	143	His→Pro	(CAC→CCC)
Rancho Mirage	143	His→Asp	(CAC→GAC)
Old Dominion	143	His→Tyr	(CAC→TAC)
Andrew-Minneapolis	144	Lys→Asn	(AAG→AAT veya AAC)
Mito	144	Lys→Glu	(AAG→CAG)
Bethesda	145	Tyr→His	(TAT→CAT)

**Tablo 2.5 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen beta globin zincir varyantları

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
Rainier	145	Tyr→Cys	(TAT→TGT)
Osler	145	Tyr→Asp/Asn	(TAT→GAT veya AAT)
McKees Rocks	145	Tyr→Term	(TAT→TAA)
Hiroshima	146	His→Asp	(CAC→GAC)
York	146	His→Pro	(CAC→CCC)
Cochin-Port Royal	146	His→Arg	(CAC→CGC)
Cowtown	146	His→Leu	(CAC→CTC)
Kodaira	146	His→Gln	CAC→CAA

\* Parantezdeki içindeki bilgiler amino asit değişimine göre tahmin edilen mutasyonları göstermektedir.

Alfa ve beta globin zincir varyantların yanında  $\gamma$  ve  $\delta$  globin zincir varyantları da tespit edilmiştir. Tespit edilen  $\gamma$  globin zincir varyant sayısı 68'dir. Bu  $\gamma$  varyantların 38'i  $^G\gamma$  geni ve 20'side  $^A\gamma$  genindeki mutasyonlar sonucu oluşmuştur. Hiçbir  $\gamma$  varyant taşıyıcısı, sağlığı etkileyecek kadar ağır değildir. Sadece bebeklerde hafif siyanoza neden olan birkaç varyantta fonksiyonel özellikler değişmektedir. Tespit edilmiş  $\gamma$  varyantların çoğunun görülme sıklığı oldukça düşük olmasına rağmen, HbF-Sardinia ( $^A\gamma^{T75}Ile\rightarrow Thr$ ) bütün toplumlarda tespit edilmiştir. Tespit edilen  $\gamma$  varyantı taşıyıcılarının çoğu DNA dizi analizi ile saptanmıştır. Tespit edilen bu varyantlar içerisinde Hb F-Poole ( $^G\gamma^{130}Trp\rightarrow Gly$ ) ve Hb F Xim Jin ( $^G\gamma^{130}Gly\rightarrow Arg$ ) unstabil, HbF Onoda ise ( $^G\gamma^{146}His\rightarrow Tyr$ ) yüksek oksijen affiniteli varyanttır<sup>2,11,12</sup>. **Tablo 2.6**'da tespit edilen  $^G\gamma$  globin zincir varyantları gösterilmiştir<sup>2</sup>.

**Tablo 2.6.** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen  $\gamma$  globin zincir varyantları.

<b>Hb Adı</b>	<b>Amino asit sırası</b>	<b>Amino asit değişimi</b>	<b>Mutasyon*</b>
F-Malaysia	1	Gly→Cys	(GGT→TGT)
F-Meinhama	5	Glu→Gly	(GAG→GGG)
F-Auckland	7	Asp→Asn	(GAC→AAC)
F-Albaicin	8	Lys→Glu veya Gln	(AAG→CAG veya GAG)
F-Heather	12	Thr→Arg	(ACA→AGA)
F-Catalonia	15	Trp→Arg	(TGG→CGG)
F-Melbourne	16	Gly→Arg	(GGC→CGC)
F-Fuchu	21	Glu→Gln	(GAA→CAA)
F-Saskatoon	21	Glu→Lys	GAA→AAA
F-Urumqi	22	Asp→Gly	(GAT→GGT)
F-Granada	22	Asp→Val	(GAT→GTT)
F-Cosenza	25	Gly→Glu	(GGA→GAA)
F-Oakland	26	Glu→Lys	(GAA→AAA)
F-Tokyo	34	Val→Ile	(GTC→ATC)
F-Austell	40	Arg→Lys	(AGG→AAG)
F-Veleta	40	Arg→Gly	AGG→GGG
F-Cincinnati	41	Phe→Ser	TTC→TCC
F-Lodz	44	Ser→Arg	(AGC→CGC)
F-Kingston	55	Met→Arg	(ATG→AGG)
F-Sacromonte	59	Lys→Gln	AAA→CAA
F-Emirates	59	Lys→Glu	(AAA→GAA)
F-M-Osaka	63	His→Tyr	(CAT→TAT)
F-Clarke	65	Lys→Asn	(AAG→AAT veya AAC)
F-Shanghai	66	Lys→Arg	(AAG→AGG)
F-Brooklyn	66	Lys→Gln	(AAG→CAG)
F-Minoo	72	Gly→Arg	(GGA→CGA)
F-Kennestone	77	His→Arg	(CAC→CGC)
F-Marietta	80	Asp→Asn	(GAT→AAT)
F-M-Fort Ripley	92	His→Tyr	CAC→TAC
F-Columbus-GA	94	Asp→Asn	(GAC→AAC)
F-La Grange	101	Glu→Lys	(GAG→AAG)
F-Macedonia-II	104	Lys→Asn	AAG→AAC
F-Malta-I	117	His→Arg	CAT→CGT
F-Caltech	120	Lys→Gln	(AAA→CAA)
F-Carlton	121	Glu→Lys	(GAA→AAA)
F-Port Royal	125	Glu→Ala	(GAG→GCG)
F-Poole	130	Trp→Gly	(TGG→GGG)
F-Onoda	146	His→Tyr	(CAC→TAC)

A-gama geninde tespit edilmiş 20 varyantın hiçbiri anormal fonksiyona sahip değildir. G-gama da olduğu gibi bu varyantlar nadir görülür. HbF-Mauritius ( $^A\gamma 23\text{Ala}\rightarrow 0$ ) diğer varyantlardan farklı olarak delesyon sonucunda oluşmuştur. Tespit edilmiş  $^A\gamma$  varyantları **Tablo 2.7**'de gösterilmiştir<sup>2,12</sup>.

**Tablo 2.7.** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen  $^A\gamma$  globin zincir varyantları

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon *
F-Macedonia-I	2	His→Gln	CAT→CAG
F-Texas-I	5	Glu→Lys	(GAG→AAG)
F-Kotobuku	6	Glu→Gly	(GAG→GGG)
F-Pordenone	6	Glu→Gln	(GAG→CAG)
F-Calluna	12	Thr→Arg	(ACA→AGA)
F-Kuala Lumpur	22	Asp→Gly	(GAT→GGT)
F-Pendergrass	36	Pro→Arg	(CCA→CGA)
F-Cobb	37	Trp→Gly	(TGG→GGG)
F-Bonaire-GA	39	Gln→Arg	(CAG→CGG)
F-Woodstock	40	Arg→Lys	AGG→AAG
F-Beech Island	53	Ala→Asp	(GCC→GAC)
F-Jamaica	61	Lys→Glu	(AAG→GAG)
F-Iwata	72	Gly→Arg	(GGA→CGA)
F-Xin-Su	73	Asp→His	(GAT→CAT)
F-Sardinia ( $^A\gamma^T$ )	75	Ile→Thr	ATA→ACA
F-Dammam	79	Asp→Asn	(GAT→AAT)
F-Victoria Jubilee	80	Asp→Tyr	(GAT→TAT)
F-Dickinson	97	His→Arg	(CAT→CGT)
F-Hull	121	Glu→Lys	GAA→AAA
F-Baskent	128	Ala→Thr	(GCT→ACT)
F-Jiangsu	134	Val→Met	(GTG→ATG)

\* Parentezdeki içindeki bilgiler amino asit değişimine göre tahmin edilen mutasyonları göstermektedir.

Tespit edilen bu mutasyonlara ek olarak F-Texas-II [6Glu→Lys (GAG→AAG)], F-Alexandra [12Thr→Lys(ACA→AAA)] ve F-Ube [108Asn→Lys (AAT→AAA)] <sup>G</sup>γ veya <sup>A</sup>γ gen ayırımı yapılamamıştır<sup>2</sup>.

1996'ya kadar 58 δ globin zincir varyantı rapor edilmiştir. Tespit edilmiş varyantların çoğu klinik olarak septom göstermez. Ayrıca elektroforez ile kolaylıkla tespit edilemezler. Bunlar ancak reverz faz HPLC veya DNA dizi analizi ile tespit edilmiştir<sup>2</sup>. HbA<sub>2</sub> Wrens (δ98Val→Met) ve HbA<sub>2</sub> Manzanares (δ121Glu→Val) unstabildir. HbA<sub>2</sub> Canada (δ99Asp→Asn) varyantı ise yüksek oksijen affiniteli olmasına rağmen eritrositöz gözlenmemektedir. Tespit edilmiş δ varyantları **Tablo 2.8**'de gösterilmiştir<sup>2,12</sup>.

**Tablo 2.8.** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen δ globin zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
A <sub>2</sub> -Niigata	1	Val→Ala	(CTG→GCG)
A <sub>2</sub> -Sphakia	2	His→Arg	(CAC→CGC)
A <sub>2</sub> -NYU	12	Asn→Lys	(AAT→AAA)
A <sub>2</sub> ' (B <sub>2</sub> )	16	Gly→Arg	GGC→CGC
A <sub>2</sub> -Roosevelt	20	Val→Glu	(GTG→GAG)
A <sub>2</sub> -Flatbush	22	Ala→Glu	(GCA→GAA)
A <sub>2</sub> -Victoria	24	Gly→Asp	(GGT→GAT)
A <sub>2</sub> -Yokoshima	25	Gly→Asp	(GGT→GAT)
A <sub>2</sub> -Puglia	26	Glu→Asp	GAG→GAC
A <sub>2</sub> -Yialousa	27	Ala→Ser	GCC→TCC
A <sub>2</sub> -Melbourne	43	Glu→Lys	(GAG→AAG)
A <sub>2</sub> -Agrinio	43	Glu→Gly	GAG→GGG
A <sub>2</sub> -Parkville	47	Asp→Val	(GAT→GTT)
A <sub>2</sub> -Adria	51	Pro→Arg	(CCT→CGT)
A <sub>2</sub> -Indonesia	69	Gly→Arg	(GGT→CGT)
A <sub>2</sub> -Grovetown	75	Leu→Val	CTG→GTG
A <sub>2</sub> -Honai	90	Glu→Val	(GAG→GTG)
A <sub>2</sub> -Sant'Antioco	93	Cys→Gly	TGT→GGT
A <sub>2</sub> -Wrens	98	Val→Met	GTG→ATG
A <sub>2</sub> -Canada	99	Asp→Asn	(GAT→AAT)
A <sub>2</sub> -Coburg	116	Arg→His	(CGT→CAT)
A <sub>2</sub> -Troodos	116	Arg→Cys	CGC→TGC

**Tablo 2.8 (Devamı).** Tek baz değişimi sonucu meydana gelen  $\delta$  globin zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit sırası	Amino asit değişimi	Mutasyon*
A <sub>2</sub> -Liangcheng	117	Asn→Asp	AAC→GAC
A <sub>2</sub> -Manzanares	121	Glu→Val	(GAA→GTA)
A <sub>2</sub> -Zagreb	125	Gln→Glu	(CAA→GAA)
A <sub>2</sub> -Babinga	136	Gly→Asp	(GGT→GAT)
A <sub>2</sub> -Pelendri	141	Leu→Pro	CTG→CCG
A <sub>2</sub> -Fitzroy	142	Ala→Asp	(GCC→GAC)

\*Parentezdeki içindeki bilgiler amino asit değişimine göre tahmin edilen mutasyonları göstermektedir.

Bazı hibrid hemoglobinler  $\beta$  ve  $\delta$  globin zincirinin bir kısmından oluşmuştur. Bir istisna olarak sadece Hb Kenya delta zinciri içermemesine rağmen  $\Lambda\gamma$  ve  $\beta$ 'nin bir kısmından oluşmuştur. Hibrid zincirli varyantlar dengesiz kromozomların crossover sonucunda oluşmaktadır. En çok gözlenen füzyon hemoglobinleri; Hb Lepore-Boston-Washington İtalyanlarda, Hb Lepore-Baltimore bazı İspanyol ailelerinde ve Hb Lepore-Hollanda ise Papau Yeni Gine'nin bazı ailelerinde tespit edilmiştir. Bu üç varyant  $\beta$  talasemi fenotipi ile karakterizedir. Hb Miyada, P-Congo, P-Nilotic, Licoln Park ve P-India "anti-Lepore" olarak adlandırılmaktadır. Hb P-Nilotic bu varyantlardan en sık gözlenendir. Delta globin zincir içermeyen Hb Kenya 81 ve 86 rezidüleri arasında crossover ile oluşan  $\Lambda\gamma\beta$  hibrid gen ürünüdür. Hb Kenya heterozigotları, normal A<sub>2</sub> düzeyi ve artmış Hb F düzeyi ile HPFH fenotipine ( $\Lambda\gamma$ -HPFH) benzemektedir. Tespit edilen füzyon hemoglobinler **Tablo 2.9**'da gösterilmiştir<sup>2,12</sup>.

**Tablo 2.9.** Hibrid hemoglobinler.

<b>Hb Adı</b>	<b>Mutasyon</b>
Kenya	$\text{A}\gamma\text{-}\beta$ hibrid ( $\beta$ 'den 87 A $\gamma$ 80'e kadar)
Parchman	$\delta\text{-}\beta$ hybrid ( $\beta$ 22'den $\delta$ 12'ye kadar) VE $\beta\text{-}\delta$ hibrid ( $\delta$ 86'dan $\beta$ 50'ye kadar)
Lincoln Park	$\beta\text{-}\delta$ hibrid ( $\delta$ 22'den $\beta$ 12'ye kadar) ve $\delta$ 137Val $\rightarrow$ 0
Lepore-Hollandia	$\delta\text{-}\beta$ hibrid ( $\beta$ 50'den $\delta$ 22'ye kadar)
Lepore-Baltimore	$\delta\text{-}\beta$ hibrid ( $\beta$ 86'dan $\delta$ 50'ye kadar)
Lepore-Boston-Washington	$\delta\text{-}\beta$ hibrid ( $\beta$ 116'dan $\delta$ 87'ye kadar)
Miyada	$\beta\text{-}\delta$ hibrid ( $\delta$ 22'den $\beta$ 12'ye kadar)
P-Congo	$\beta\text{-}\delta$ hibrid ( $\delta$ 116'dan $\beta$ 22'ye kadar)
P-India	$\beta\text{-}\delta$ hibrid ( $\delta$ 116'dan $\beta$ 87'ye kadar)
P-Nilotic	$\beta\text{-}\delta$ hibrid ( $\delta$ 50'den $\beta$ 22'ye kadar)

Mutasyon analizleri sonucunda iki amino asit değişimli varyantlar da tanımlanmıştır. Beta globin geninde iki amino asit değişimli 16 varyant tespit edilmişken alfa geninde ise sadece iki varyant tespit edilmiştir<sup>2,12</sup>. İki amino asit değişimli taşıyıcıların varlığı, globin geninde bir mutasyonun önceden taşınması veya iki gen arasında crossover sonucunda olabilir. Yapılan aile taramalarında birinci ihtimalin kuvvetli olduğu gözlenmiştir. İlginç olarak şimdiye kadar her biri farklı 6  $\beta^S$  globin varyantı tespit edilmiştir. İki amino asit değişimli hemoglobinelere Hb Arlington Park ( $\beta$ 6Glu $\rightarrow$ Lys;  $\beta$ 95 Lys $\rightarrow$ Glu) ve Hb T-Cambodia ( $\beta$ 26 Glu $\rightarrow$ Lys;  $\beta$ 121 Glu $\rightarrow$ Gln) örnek verilebilir. **Tablo 2.10'**da tespit edilen iki amino asit değişimli  $\beta$  zincir varyantları gösterilmiştir<sup>2,12</sup>.

**Tablo 2.10.** İki amino asit değişimli β globin zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit değişimi	Hb Adı	Mutasyon
S-Antilles	6Glu→Val 23Val→Ile	(Hb S) (---)	GAG→GTG GTT→ATT
C-Ziquinchor	6Glu→Val 58Pro→Arg	(Hb S) (Dhofar)	GAG→GTG CCT→CGT
C-Harlem	6Glu→Val 73Asp→Asn	(Hb S) (Korle-Bu)	GAG→GTG GAT→AAT
S-Providence	6Glu→Val 82Lys→Asn→Asp	(Hb S) (Providence)	GAG→GTG AAG→AAT veya AAC
S-Oman	6Glu→Val 121Glu→Lys	(Hb S) (O-Arab)	GAG→GTG GAA→AAA
S-Travis	6Glu→Val 142Ala→Val	(Hb S) (---)	GAG→GTG GCC→GTC
Arlington Park	6Glu→Lys 95Lys→Glu	(Hb C) (N-Baltimore)	GAG→AAG AAG→GAG
T-Cambodia	26Glu→Lys 121Glu→Gln	(Hb E) (D-Los Angeles)	GAG→AAG GAA→CAA
Grenoble	51Pro→Ser 52Asp→Asn	(---) (Osu Christiansborg)	CCT→TCT GAT→AAT
Poissy	56Gly→Arg 86Ala→Pro	(Hamadan) (--)	GGC→CGC GCC→CCC
Atlanta-Coventry*	75Leu→Pro 141Leu→0	(Atlanta) (Coventry)	CTG→CCG ---
Villeparisis	77His→Tyr 80Asn→Ser	(Fukuyama) (--)	CAC→TAC AAC→AGC
Duino	92His→Pro 104Arg→Ser	(Newcastle) (Camperdown)	CAC→CCC AGG→AGC veya AGT



**Tablo 2.10 (Devamı).** İki amino asit değişimli  $\beta$  globin zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit değişimi	Hb Adı	Mutasyon
Medicine Lake	98Val→Met 32Leu→Gln	(Köln) (--)	GTG→ATG CTG→CAG
(İsimsiz)	111Val→Leu 119Gly→Asp	(--) (Fannin-Lubbock)	GTC→CTC GGC→GAC
Masuda	114Leu→Met 119Gly→Asp	(Zengcheng) (Fannin-Lubbock)	CTG→ATG GGC→GAC
Cleveland	121Glu→Gln 93Cys→Arg	(D-Los Angeles) (Okazaki)	GAA→CAA TGT→CGT

*\*Son zamanlarda yapılan çalışmalarda  $\beta 141$ . amino asit olan Lösin hidroksilösine okside olduğu tespit edilmiştir. Bu daha sonra Hb Atlanta olarak adlandırılmıştır.*

İki amino asit değişimli  $\alpha$  varyant sayısı ise sadece iki tanedir. Bunlar J-Singapore ( $\alpha 2$  veya  $\alpha 1$  78Asn→Asp VE  $\alpha 2$  veya  $\alpha 1$  79Ala→Gly) ve Mulhacen ( $\alpha 1$  123Ala→Ser ve  $\alpha 1$  120Ala→Ala) dir<sup>2,12</sup>.

Stop kodonunda tek baz değişimi, çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları veya başlangıç kodonu olan metiyonindeki mutasyonlar sonucunda uzamış hemoglobin varyantları oluşmaktadır<sup>3</sup>. Bu gruptaki hemoglobinleri C-terminal veya N-terminal uçtan uzamış hemoglobin varyantları olarak sınıflandırmak mümkündür. En önemlileri  $\alpha$ -talasemik fenotip gösteren ve  $\alpha$  genindeki stop kodonu olan TAA'daki mutasyon sonucunda oluşan beş varyanttır<sup>2</sup>. Stop kodonundaki mutasyon sonucunda mRNA, terminasyon kodonuna ulaşana kadar okumasını sürdürmektedir. Bunun sonucunda polipeptid zinciri uzamaktadır. Bunlardan en yaygın olanı HbConstant Spring, özellikle doğu toplumlarında bulunmaktadır. Bu varyantta globin zinciri +31 rezidü uzamakta ve oldukça unstabildir. HbKoya Dora ise özellikle Hindistan popölasyonlarında bulunurken diğer varyantlar ise birkaç ailede tespit edilmiştir<sup>2,12</sup>. Uzamış hemoglobin

varyantlarından birkaçı çerçeve kayması mutasyonları sonucunda oluşmaktadır. HbWayne C-terminal ucunda, kodon 138 veya 139’da bir baz delesyonu ile beş amino asit uzamış bir  $\alpha$  varyantıdır. Uzamış  $\beta$  globin zincir varyantlarının tümü çerçeve kayması mutasyonu sonucunda oluşmaktadır. Diğer C-terminalden uzamış varyantlar nadir bulunmaktadır ve uzamış proteinin özellikleri de farklılık göstermektedir. Karboksil ucundan uzamış varyantlar **Tablo 2.11**’de gösterilmiştir<sup>2,11,12</sup>.

**Tablo 2.11.** Karboksil ucundan uzamış  $\alpha$  ve  $\beta$  globin zincir varyantları.

Hb Adı		Amino asitler	Baz Değişimi
<b>Wayne</b>	$\alpha$ 139	138 139 140 141 142 Ala- <u>ASN</u> -Thr-Val-Lys- 143 144 145 146 Leu-Glu-Pro-Arg-COOH	CD 139 (-A) ( $\alpha$ 2 veya $\alpha$ 1)
<b>Constant Spring</b> (+ 31 rezidü)	$\alpha$ 142	141 142 143 144 145 146 147 Arg- <u>GLN</u> -Ala-Gly-Ala-Ser-Val- 148 149 150 151 152 153 154 Ala-Val-Pro-Pro-Ala-Arg-Trp- 155 156 157 158 159 160 161 Ala-Ser-Gln-Arg-Ala-Leu-Leu- 162 163 164 165 166 167 168 Pro-Ser-Leu-His-Arg-Pro-Phe- 169 170 171 172 Leu-Val-Phe-Glu-COOH	TAA→CAA CD 142 ( $\alpha$ 2)
<b>Icaria</b>	$\alpha$ 142	Hb Constant Spring ile aynı sadece 142. rezidü <u>LYS</u>	TAA→AAA CD 142 ( $\alpha$ 2)
<b>Koya Dora</b>	$\alpha$ 142	Hb Constant Spring ile aynı sadece 142. rezidü <u>SER</u>	TAA→TCA CD 142 ( $\alpha$ 2)
<b>Seal Rock</b>	$\alpha$ 142	Hb Constant Spring ile aynı sadece 142. rezidü <u>GLU</u>	TAA→GAA CD 142 ( $\alpha$ 2)

**Tablo 2.11 (Devamı).** Karboksil ucundan uzamış  $\alpha$  ve  $\beta$  globin zincir varyantları.

Hb Adı		Amino asitler	Baz Değişimi
<b>Pakse</b>	$\alpha$ 142	Hb Constant Spring ile aynı sadece 142. rezidü <u>TYR</u>	TAA→TAT CD 142 ( $\alpha$ 2)
<b>Saverne</b>	$\beta$ 143	142 143 144 145 146 147 148 149 Ala- <u>PRO</u> -Ser-Ile-Thr-Lys-Leu-Ala 150 151 152 153 154 155 156 Phe-Leu-Leu-Ser-Asn-Phe-Tyr-COOH	CD 143 (-A)
<b>Cranston</b>	$\beta$ 144	144 145 146 147 148 149 150 Lys- <u>SER</u> -Ile-Thr-Lys-Leu-Ala- 151 152 153 154 155 156 157 Phe-Leu-Leu-Ser-Asn-Phe-Tyr-COOH	CD 144-145 (+AA)
<b>Tak</b>	$\beta$ 147	146 147 148 149 150 His- <u>THR</u> -Lys-Leu-Ala- 151 152 153 154 155 Phe-Leu-Leu-Ser-Asn- 156 157 Phe-Tyr-COOH	CD 147 (+AC)

Alfa veya beta globin geninin birinci veya ikinci kodonlarındaki mutasyonlar başlangıç kodonu olan ATG'yi (Met) etkilemektedir. Metiyonin globin zincirlerinin translasyonda katılması gereken ilk amino asittir. Amino terminal metiyonini peptid zincirlerinin translasyonu esnasında normal olarak bölünerek ayrılmakta, böylece valin amino terminal rezidü olmaktadır<sup>2</sup>. N-terminalde meydana gelen amino asit değişimleri sonucunda metiyonin serbest kalamamakta ve bu nedenle polipeptid zinciri bir amino asit rezidü uzamaktadır<sup>12</sup>. Bu varyantlardaki amino asit değişimi sonucunda amino terminal metiyonini bölen peptidazın aktivitesinin inhibe olduğu düşünülmektedir. Uzamış globin zincir varyantların hiçbirinde herhangi bir hematolojik anormallik bulunmamaktadır. Amino ucundan uzamış  $\alpha$  ve  $\beta$  varyantları **Tablo 2.12**'de gösterilmiştir<sup>2</sup>.

**Tablo 2.12.** Amino ucundan uzamış  $\alpha$  ve  $\beta$  globin zincir varyantları.

<b>Hb Adı</b>		<b>Amino asitler</b>	<b>Baz Değişimi</b>
<b>Thionville</b>	$\alpha 1$	-1 +1 +2 <u>Met-Glu-Leu-Ser</u>	+1GTG→GAG ( $\alpha 2$ veya $\alpha 1$ )
<b>Doha</b>	$\beta 1$	-1 +1 +2 <u>Met-Glu-His-Leu</u>	+1 GTG→GAG
<b>South Florida</b>	$\beta 1$	-1 +1 +2 <u>Met-Met-His-Leu-</u>	+1 GTG→ATG
<b>Marseille</b>	$\beta 2$	-1 +1 +2 <u>Met-Val-Pro-Leu-</u>	+2 CAC→CCC

Birkaç hemoglobin varyantında ise globin zinciri kısalmıştır. Bu grupta yer alan hemoglobin varyantları nadir görülmekte ve büyük çoğunluğu crossover'ın neden olduğu bazı kodonların kaybı veya birkaç nükleotidin eklenmesiyle sonuçlanan kısa hemoglobin varyantlarıdır. HbNatal,  $\alpha$  globin zincirinde C-ucundan iki rezidünün delesyonu sonucunda TAC kodonu sonlandırıcı kodon olan TAA'ya dönüşmektedir. Bir-beş rezidünün delesyonu sonucunda oluşan kısa zincirli varyantlar **Tablo 2.13'te** gösterilmiştir<sup>2,12</sup>.

**Tablo 2.13.** Bir-beş amino asit delesyonu sonucu oluşan kısa globin zincirli varyantlar.

Hb Adı	Amino asitler	Delesyonlar
<b>Boyle Height</b>	$\alpha 6$	Asp→0
<b>Taybe</b>	$\alpha 38$ veya $\alpha 39$	Thr→0
<b>Natal</b>	$\alpha 140$ - $\alpha 141$	Tyr-Arg→0
<b>Leiden</b>	$\beta 6$ veya $\beta 7$	Glu→0
<b>Lyon</b>	$\beta 17$ - $\beta 18$	Lys-Val→0
<b>Freiburg</b>	$\beta 23$	Val→0
<b>Higashitochigi (HT)</b>	$\beta 24$ veya $\beta 25$	Gly→0
<b>Bruxelles</b>	$\beta 41$ veya $\beta 42$	Phe→0
<b>Niteroi</b>	$\beta 43$ - $\beta 45$ VEYA $\beta 42$ - $\beta 44$	Phe-Glu-Ser→0 VEYA Glu-Ser-Phe→0
<b>Tochigi</b>	$\beta 56$ - $\beta 59$	Gly-Asn-Pro-Lys→0
<b>Saint-Antoine</b>	$\beta 74$ - $\beta 75$	Gly-Leu→0
<b>Vicksburg</b>	$\beta 75$	Leu→0
<b>Tours</b>	$\beta 87$	Thr→0
<b>Gun Hill</b>	$\beta 91$ - $\beta 95$	Leu-His-Cys-Asp-Lys→0
<b>Coventry</b>	$\beta 141$	Leu→0*

\*Son zamanlarda yapılan çalışmalarda  $\beta 141$ . amino asit olan Lösin hidroksilösine okside olduğu tespit edilmiştir. Bu daha sonra Hb Atlanta olarak adlandırılmıştır.

İnseriyon sonucunda da stop kodonu değişmekte ve globin zinciri uzamaktadır. İnseriyon sonucunda uzamış globin zincirlerini içeren Hb varyantları **Tablo 2.14**'te gösterilmiştir<sup>2</sup>.

**Tablo 2.14.** Amino asit insersiyonu sonucunda oluşan uzun zincirli varyantlar.

Hb Adı	Amino asitler	İnsersiyonlar
Catonsville	$\alpha$ 37- $\alpha$ 38	37 38 Pro- <u>Glu</u> -Thr- 116 117
Zaire	$\alpha$ 116- $\alpha$ 117	Glu- <u>His</u> - <u>Leu</u> - <u>Pro</u> - <u>Ala</u> - <u>Glu</u> -Phe-
Grady	$\alpha$ 118- $\alpha$ 119	118 119 Thr- <u>Glu</u> - <u>Phe</u> - <u>Thr</u> -Pro-
Koriyama	$\beta$ 95- $\beta$ 96	95 96 Lys- <u>Leu</u> - <u>His</u> - <u>Cys</u> - <u>Asp</u> - <u>Lys</u> -Leu-

### 2.3. TÜRKİYEDE GÖRÜLEN HEMOGLOBİN VARYANLARI

Ülkemizde 42 anormal hemoglobin varyantı tanımlanmıştır. Bunlardan 13 tanesi alfa, 24 beta, 1 gama, 2 hibrid hemoglobin, 2 yapısal değişimli; 1 uzamış alfa zinciri ve 1 delesyon/insersiyon sonucunda uzamış beta zincir varyantıdır. Bu anormal hemoglobinlerden bazıları ilk defa Türk popülasyonunda tanımlanmıştır<sup>4</sup>. Türkiye’de saptanan alfa zincir varyantları **Tablo 2.15**’te gösterilmiştir.

**Tablo 2.15.** Ülkemizde saptanan tek baz değişimli alfa zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit/Değişim	Mutasyon
O-Padova	30Glu→Lys	GAG→AAG
Hasharon	47Asp→His	GAC→CAC
Montgomery	48Leu→Arg	CTG→CGG
Adana*	59Gly→Asp	GGC→GAC
J-Anatolia	61Lys→Thr	AAG→ACG
Ube-2	68Asn→Asp	AAC→GAC
Q-Iran	75Asp→His	GAC→CAC
Moabit	86Leu→Arg	CTG→CGG

**Tablo 2.15.** Ülkemizde saptanan tek baz değişimli alfa zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit/Değişim	Mutasyon
<b>M-Iwate</b>	87His→Tyr	CAC→TAC
<b>Çapa*</b>	94Asp→Gly	GAC→GGC
<b>G-Georgia</b>	95Pro→Leu	CCG→CTG
<b>Strumica</b>	112His→Arg	CAC→CGC
<b>J-Meerut (J Birming ham)</b>	120Ala→Glu	GCG→GAG

\* İlk kez Türk toplumunda bulunan anormal hemoglobinler.

Alfa zincir varyantlarından Hb Adana ( $\alpha$  59 Gly→Asp)  $\alpha^0$ -talasemi ile birlikte tespit edilmiştir ve bu hastada HbBarts, HbA'dan sonra ikinci majör hemoglobin olarak bulunmuştur<sup>19</sup>.

Beta zincir varyantlarından HbÇapa, HbAnkara, HbHakkari, HbJ-Antakya ve Hbİstanbul ilk kez Türklerde tanımlanmıştır (**Tablo 2.16**). Hbİstanbul Fransız araştırmacılar tarafından başka bir hastada HbSaint Etienne olarak rapor edilmiştir. Heterozigotlarda anormal hemoglobin miktarı %25 ve HbF düzeyi ise %20 olarak tespit edilmiştir<sup>20</sup>. İlk kez toplumumuzda tespit edilen diğer varyantlardan HbHakkari ve HbAdana oldukça unstabildir. Bu üç unstabil hemoglobine ek olarak, HbMoabit ve HbKöln de tespit edilmiştir. HbMoabit İsviçre'de yaşayan bir Türk ailesinde, HbKöln ise birkaç ülkede rapor edilmiş unstabil hemoglobinlerdir<sup>4</sup>.

Ülkemizde nadir görülen diğer bir varyant olan HbBeograd elektroforezde S/D ile aynı yere göç etmektedir. Anormal hemoglobin miktarı % 30.6 olarak tespit edilmiştir<sup>21</sup>. Hb Antalya da ise amino asit delesyonu ve insersiyonu beraber görülmüştür. Beta genindeki küçük bir delesyon ve insersiyon sonucunda mikrositoz ve yüksek HbA<sub>2</sub> düzeyi tespit edilmiştir. Elektroforezde anormal hemoglobin tespit edilmemesine rağmen klinik ve hematolojik verileri heterozigot  $\beta$ -talasemiden daha ağır bir tablo göstermektedir<sup>4</sup>.

**Tablo 2.16.** Ülkemizde saptanan tek baz değişimli beta zincir varyantları.

Hb Adı	Amino asit/Değişim	Mutasyon
S	6Glu→Val	GAT→GTG
C	6Glu→Lys	GAG→AAG
Ankara *	10Ala→Asp	GCC→GAC
E-Saskatoon	22Glu→Lys	GAA→AAA
G-Coushatta	22Glu→Ala	GAA→GCA
D-Iran	22Glu→Gln	GAA→CAA
E	26Glu→Lys	GAG→AAG
Knossos	27Ala→Ser	GCC→TCC
Hakkari *	31Leu→Arg	CTG→CGG
G-Copenhagen	47Asp→Asn	GAT→AAT
SummerHill	52Asp→His	GAT→AAT
Hamadan	56Gly→Arg	GGC→CGC
J-Antakya *	65Lys→Met	AAG→ATG
City of Hope	69Gly→Ser	GGT→AGT
J-Iran	77His→Asp	CAC→GAC
G-Szuhu	80Asn→Lys	AAC→AAA veya AAG
Istanbul Saint Etienne	92His→Gln	CAC→CAA veya CAG
N-Batimore	95Lys→Glu	AAG→GAG
Köln	98Val→Met	GTG→ATG
Los Angeles (D-Punjab)	121Glu→Gln	GAA→CAA
O-Arab	121Glu→Lys	GAA→AAA
Beograd	121Glu→Val	GAA→GTA
Sarrebourg	131Gln→Arg	CAG→CGG
Bronckton	138Gln→Arg	GCT→CCT

\* İlk kez Türk toplumunda bulunan anormal hemoglobinler.

Alfa ve beta varyantlarına ek olarak bir A gama varyantı olan HbF-Başkent (128Ala→Thr) ilk kez ülkemizde tanımlanmıştır. Hibrid hemoglobinlerden HbLepore-Boston-Washington ve HbP-Nilotic ile uzamış alfa zincir varyantlarından HbCS (Constant Spring) taşıyan vakalar da bulunmuştur. Ülkemizde tespit edilen 42 anormal hemoglobinin sekiz tanesi unstabil olup bunlar **Tablo 2.17'** de gösterilmiştir.



**Tablo 2.17.** Ülkemizde saptanan unstabil hemoglobinler

Hb Adı	Amino asit/Değişim	Mutasyon
Hasharon	$\alpha$ 47 Asp→His	GAC→CAC
Adana	$\alpha$ 59 Gly→Asp	GGC→GAC
Moabit	$\alpha$ 86 Leu→Arg	CTG→CGG
Çapa	$\alpha$ 94 Asp→Gly	GAC→GGC
Hakkari	$\beta$ 31 Lue→Arg	CTG→CGG
İstanbul (St Etienne)	$\beta$ 92 His→Gln	CAC→CAA veya CAG
Köln	$\beta$ 98 Val→Met	GTG→ATG
Constant Spring	alfa 142	
Antalya	$\beta$ zincirinde delesyon	

Ülkemizde tespit edilen talasemik hemoglobinler **Tablo 2.18'**de gösterilmiştir. HbE özellikle Çukurova bölgesinde bulunmakta ve taşıyıcı sıklığı %0.6-2.4 olarak belirlenmiştir. HbE diğer varyantlardan farklı olarak mikrositoz ve hipokroma neden olmaktadır. HbKonossos ise sadece iki vakada ve farklı  $\beta$  talasemi ile birlikte tespit edilmiştir<sup>4</sup>.

**Tablo 2.18.** Ülkemizde saptanan talasemik hemoglobinler.

Hb Adı	Amino asit/Değişim	Mutasyon
E	$\beta$ 26 Glu→Lys	GAG→AAG
Knossos	$\beta$ 27 Ala→Ser	GCC→TCC
City of Hope	$\beta$ 69 Gly→Ser	GGT→AGT

## 3. GEREÇ ve YÖNTEM

### 3.1. GEREÇLER

#### 3.1.1. Cihazlar

- Kan sayım cihazı (Coulter counter T 890)
- Hassas terazi (Mettler AJ 100)
- Otomatik pipet (Gilson 5, 10, 20,100,200, 1000 µL)
- Spektrofotometre (Spectronic 20-D)
- pH metre (Beckman, Century SS-1)
- Santrifüj (Centrikon T-124)
- HPLC (Agilent 1100)
- Mikro santrifüj (Heraeus Biofuge pico)
- Minigel elektroforez tankı (Pharmacia GNA-100)
- Düşük voltaj güç kaynağı (EPS 500/400)
- Etüv (Heraeus)
- Thermal Cyclers (Perkin Elmer Cetus 9600)
- Mikrodalga fırın (Arçelik MD 551)
- Jel elektroforez cihazı (Bio-Rad SubCell II)
- UV lamba (Cole-Parmer 9814)
- Speed Vac konsantratör (Savant SVC 100H)
- Derin dondurucu (-20°C Bosch)
- Kar makinası (Scotsman AF-10)
- Isıtıcı blok (Lab-line 2050-1)
- Yüksek voltaj güç kaynağı (Bio Rad)
- Dikey jel elektroforez cihazı (BRL Model S2)
- Jel kurutma cihazı (Drygels Model SE 1160)
- Film banyo makinası (Kodak XOMAT M20)

### 3.1.2. Kimyasal Malzemeler

- Tris (Amresco)
- Borik asit (Carlo Erba Reagenti)
- Sodyum dietil barbital (Merck)
- Dietil barbitürük asit (Merck)
- Metanol (Aldrich)
- Ponceau-S (Sigma)
- Selüloz asetat kağıdı (Sepraphore III)
- Etidyum bromür (Sigma)
- TEMED (NNN'N' tetramethylen-diamine) (Sigma)
- Akrilamid (Sigma)
- Bisakrilamid (Sigma)
- Dizi analizi kiti (Sequance Version 2.0)
- PCR purifikasyon kiti (Sigma)
- Taq polimeraz (Perkin Elmer Cetus Amlı Taq)
- <sup>35</sup>S-dATP $\alpha$  (Amersham)
- Triklor asetik asit (Merck)
- Asetik asit (Merck)
- DE-52 (Whatman)
- Glisin (Merck)
- Potasyum siyanür (Merck)
- Sodyum klorür (Merck)
- Potasyum siyanoferrat (Merck)
- Sodyum hidroksit (Merck)
- Amonyum sülfat (Sigma)
- Proteinaz K (Sigma)
- Amonyum klorür (Merck)
- Amonyum bikarbonat (Sigma)

- Sodyum dodesilsülfat (SDS) (Sigma)
- Fenol (Merck)
- Kloroform (Merck)
- Hidroksikinolin (Merck)
- Potasyum klorür (BDH)
- Jelatin (Merck)
- dNTP (Promega)
- Spermidin (Sigma)
- Agaroz (Sigma)
- Bromfenol mavisi (Sigma)
- Amonyum persülfat (Sigma)
- Formamid (Sigma)
- Ksilen siyanol (Sigma)
- Gliserol (Merck)
- EDTA Na<sub>2</sub> (Merck)
- Etil alkol (Merck)
- MgCl<sub>2</sub> (Sigma)
- Gene Amp Tüp (Perkin Elmer)
- Film (Kodak 35x43 cm)
- Whatman Kağıdı (Whatman III)
- Film kaseti (Dupont Cronex casesse)

## **3.2. ÖRNEK TOPLAMA**

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına prenatal tanı ve rutin mutasyon analizi için gelen örnekler kullanılmıştır. EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri otomatik kan sayım cihazı ile analiz edilmiştir<sup>18</sup>. Hemoglobin tipleri selüloz asetat elektroforez yöntemi<sup>22</sup> ve HPLC<sup>18,23</sup> ile, HbA<sub>2</sub> düzeyi mikrokolon kromatografisi<sup>24</sup>, HbF miktarı ise alkali denatürasyon yöntemiyle<sup>25</sup> belirlenmiştir. Örneklerin DNA'ları Poncz yöntemi ile izole edilmiştir<sup>26</sup>.

## **3.3. YÖNTEMLER**

### **3.3.1. Hematolojik İncelemeler**

Hematolojik analizlerden Hemoglobin (Hb), Hematokrit (Hct), Eritrosit sayımı (RBC), Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV), Ortalama Eritrosit Hemoglobini (MCH) ve Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu (MCHC) Coulter Counter cihazı ile yapılır<sup>18</sup>.

#### **3.3.1.1. Hemolizat ve Kontrol Hazırlama**

Tam kan örneği serum fizyolojik ile 2-3 kez yıkanır. Yıkama işlemi sonunda eritrosit pelletinden 60 µL alınıp, 1mL saf suyla karıştırılarak hemolizat hazırlanır. Hemolizat elektroforezde, HPLC analizinde, HbA<sub>2</sub> ve HbF ölçümünde kullanılır<sup>18</sup>.

Kontrol eşit hacimde HbC, HbD, HbE ve HbS taşıyıcıları kullanılarak hazırlanır. Küçük porsiyonlar halinde -20°C'de uzun süre saklanabilir. Çözülen kontrol +4 °C'de saklanarak bir hafta kullanılır.

#### **3.3.1.2. Hemoglobin Elektroforezi**

##### **3.3.1.2.1. Prensi**

Alkali pH'ta hemoglobin molekülü negatif yüklüdür ve elektriksel ortamda anoda (+) doğru göç eder. Yüzey yük değişikliği olan varyantlar ise farklı göç ederler. Alkali

ortamda sellüloz asetat kağıdına uygulanan hemolizat, elektriksel alanda göç hızlarına göre ayrıştırılarak hemoglobini tiplendirilmesi yapılır<sup>22</sup>.

#### **3.3.1.2.2. Çözeltiler**

1. Anod Tamponu (pH 9.1): 25.2 g Tris, 2.5 g EDTA ve 1.5 g Borik asit distile suda çözülerek 1 litreye tamamlanır.
2. Katod Tamponu (pH8.6): 5.15 g Sodyum dietil barbitat ve 0.92 g dietil barbiturik asit distile suda çözünerek 1 litreye tamamlanır.
3. Boyama Çözeltisi: 500 mg Ponceau-S 100 ml %5'lik Trikloroasetik asitte çözülür.
4. Yıkama Çözeltisi: % 5'lik asetik asit
5. Sellüloz asetat kağıdı
6. Whatman kağıdı

#### **3.3.1.2.3. Yöntem**

Elektroforez tankına anot ve katot tamponları konulur. Başka bir kaptaki her iki tampondan eşit hacim içeren bir karışım hazırlanır. Aplikasyon noktası, hasta adı ve tarih yazıldıktan sonra sellüloz asetat kağıdı bu karışımda 10 dakika ıslatılır. Kurutma kağıdı ile hafifçe kurutulmuş sellüloz asetat kağıdına hemolizattan 3µL aplikatör ile elektroforeze yerleştirilir. 0.75 mA/cm akım verilerek 45 dakika yürütülür. Süre sonunda Ponceau-S ile 3-5 dakika boyanır. %5'lik asetik asit içeren yıkama çözeltisi ile boya atıkları temizlenerek hemoglobini tiplendirilmesi yapılır<sup>12</sup>.

#### **3.3.1.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography)**

HPLC, hemoglobini moleküllerinin ayrıştırılması ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılan hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Zayıf iyon değiştirici (anyon veya kation değiştiriciler) kolonlar Hb'lerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca globin zincirlerinin ayrıştırılması ve miktarlarının belirlenmesinde ise reverse faz kolonu

kullanılarak analiz edilmektedir. Moleküllerin hidrofobik özelliklerinden faydalanılan bu yöntemde geniş çaplı dolgu maddesi içeren Vaydac C<sub>4</sub> kolonu kullanılmaktadır<sup>18,23,27,28</sup>.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisini oluşturan önemli parçalar şunlardır:

- İki adet pompa: Yüksek basınç sağlar (Waters 501 HPLC Pump)
- Gradient kontrolör: İki farklı tamponun karışım oranını ve akış hızını kontrol eder (Waters 721)
- Kolon: Basınca dayanması için çelikten yapılmış bir boru içerisine değişik kimyasal maddeler (anyon veya katyon değiştirici) doldurulmuştur.
- İnjektör: Sisteme numune tatbik etmek için kullanılır.
- Dedektör: Kolonda ayrıştırılan fraksiyonların absorpsiyonunu ölçer (Waters 484)
- Recorder-integratör: Dedektörden gelen sinyalleri kaydeder ve her fraksiyonun yüzde değerlerini hesaplar (Waters 740 Data Module)
- Tamponlar: Konsantrasyonları farklı ama pH'ları aynı iki çözelti kullanılır.

HPLC'de hemoglobin ve globin analizleri için farklı kolon ve tamponlar kullanılır. Ayrıştırılacak hemoglobinin özelliğine göre zayıf katyon veya anyon değiştirici kolonlar seçilir. Kullanılan kimyasal maddeler HPLC grade olmalıdır.

### **3.3.1.3.1. Anyon Değiştirici HPLC**

Alkali tamponda (pH 8.3) pozitif yüklü Hb'ler kolona bağlanmadan izole edilirken, negatif yüklüler kolona bağlandığı için artan anyon gradiyenti ile elüve edilirler. Bu analiz için HPLC'de kullanılan kolon ve tamponlar şunlardır:

- SynChropak AX-300 (CA 105-10): Zayıf anyon değiştirici rezin ile doldurulmuş olup 100x4.1 mm boyutlarında bir kolondur.
- Tampon A (pH 8.3): 30 mM Tris ve 1.5 mM KCN;
- Tampon B (pH 8.3): 30 mM Tris, 1.5 mM KCN ve 150 mM NaCl.

On dakika dengelenmiş A ve B tamponu sisteme 100-250 µg Hb aplike edilerek akış hızı dakikada 0.7 mL olacak şekilde ayarlanır. Programda ilk 17 dakika içinde B tamponunun

miktarı %45'e ulaşmaktadır. Takip eden 15 dakikada içinde B tamponu %95'e son 9 dakikada ise %99 kadar artırılarak kolondaki tüm hemoglobinler alınmaktadır.

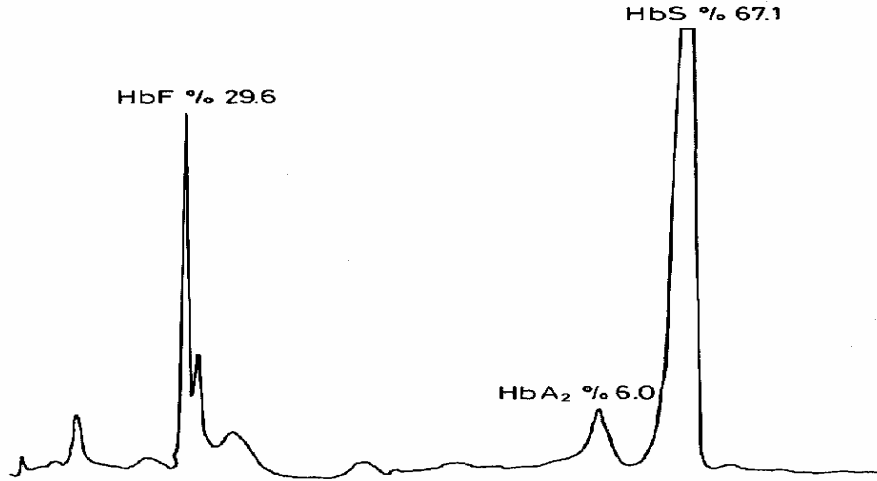
T<sub>1</sub>= 17 dak Tampon B %40 - %45

T<sub>2</sub>= 15 dak Tampon B %45 - %95

T yıkama= 9 dak Tampon B %99

T denge= 10 dak Tampon A %60 + Tampon B %40

HbF seviyesi yüksek olan bir örneğin kromatogramında hemoglobinler HbF sonra HbA<sub>2</sub> ve takiben de HbS kolondan ayrılmış olup **Şekil 3.1**'de gösterilmiştir. Bu yöntemle özellikle yenidoğanlarda HbH ve HbBarts miktarını belirlemek de mümkündür.



**Şekil 3.1.** Anyon değiştirici kolon ile HbF, HbA<sub>2</sub> ve HbS ayırımı.

### 3.3.1.3.2. Katyon Değiştirici HPLC

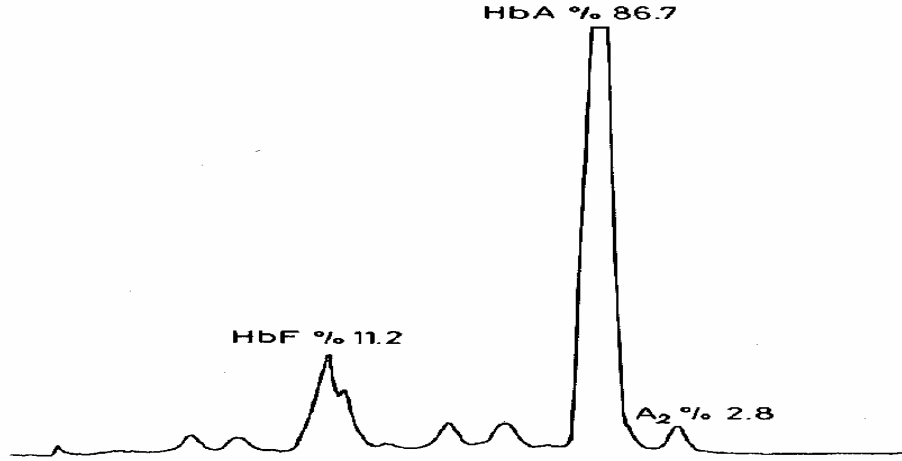
Negatif olarak yüklenen Hb'ler kolona bağlanmazken pozitif olarak yüklenenler kolonun yapısında bulunan katyon değiştirici gruplar (CM veya polyaspartate) tarafından bağlanırlar. Tamponun katyon konsantrasyonu (Na<sup>+</sup> veya NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) yavaş yavaş artırılarak pozitif yüklenen



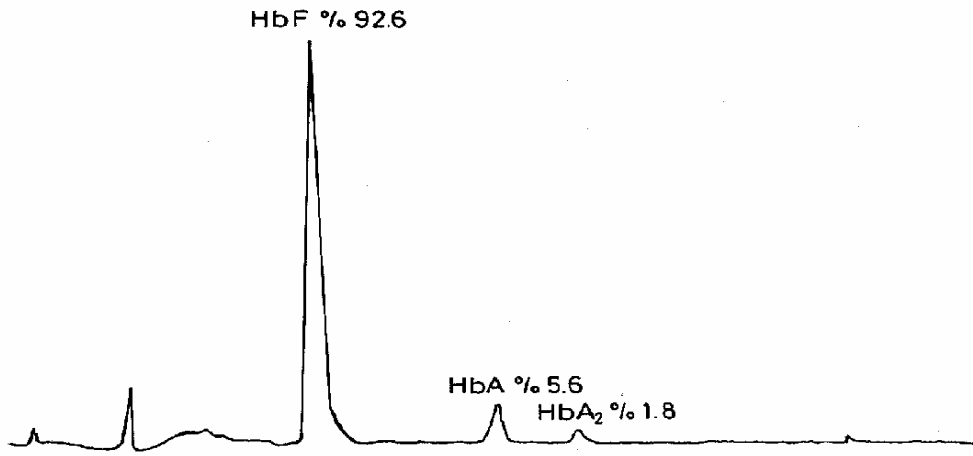
Hb'ler kolondan elüve edilirler. Bu analiz için HPLC sisteminde kullanılan kolon ve tamponlar aşağıda gösterilmiştir.

- SynChropak CM-300 kolonu (CCM 103-25): Zayıf katyon değiştirici bir rezin ile doldurulmuş olup 4.1 x 250 mm ebadındadır.
- Tampon A (pH 6.4): 30 mM Bis-Tris ve 1.5 mM KCN
- Tampon B (pH 6.4): 30 mM Bis-Tris, 1.5 mM KCN ve 150 mM sodyum asetat

Akış hızı dakikada 1 ml/dak olarak ayarlanır. Kolon %90 tampon A, %10 tampon B ile 10 dakikada dengelenir. 100-250 µg Hb (20-220 µl hemolizat) sisteme enjekte edilir. Tampon B'nin konsantrasyonu 90 dakika içerisinde %10'dan %90'a ulaşır. Beş dakika daha tampon B (%100) geçirilen sistem yeni örnek için hazır duruma gelir. Elüve edilen Hb'lerin 415 nm'de absorbansı ölçülerek grafikleri alınırken yüzde konsantrasyonları da belirlenir. İki farklı kromatogram Şekil 3.2 ve Şekil 3.3'te gösterilmiştir.



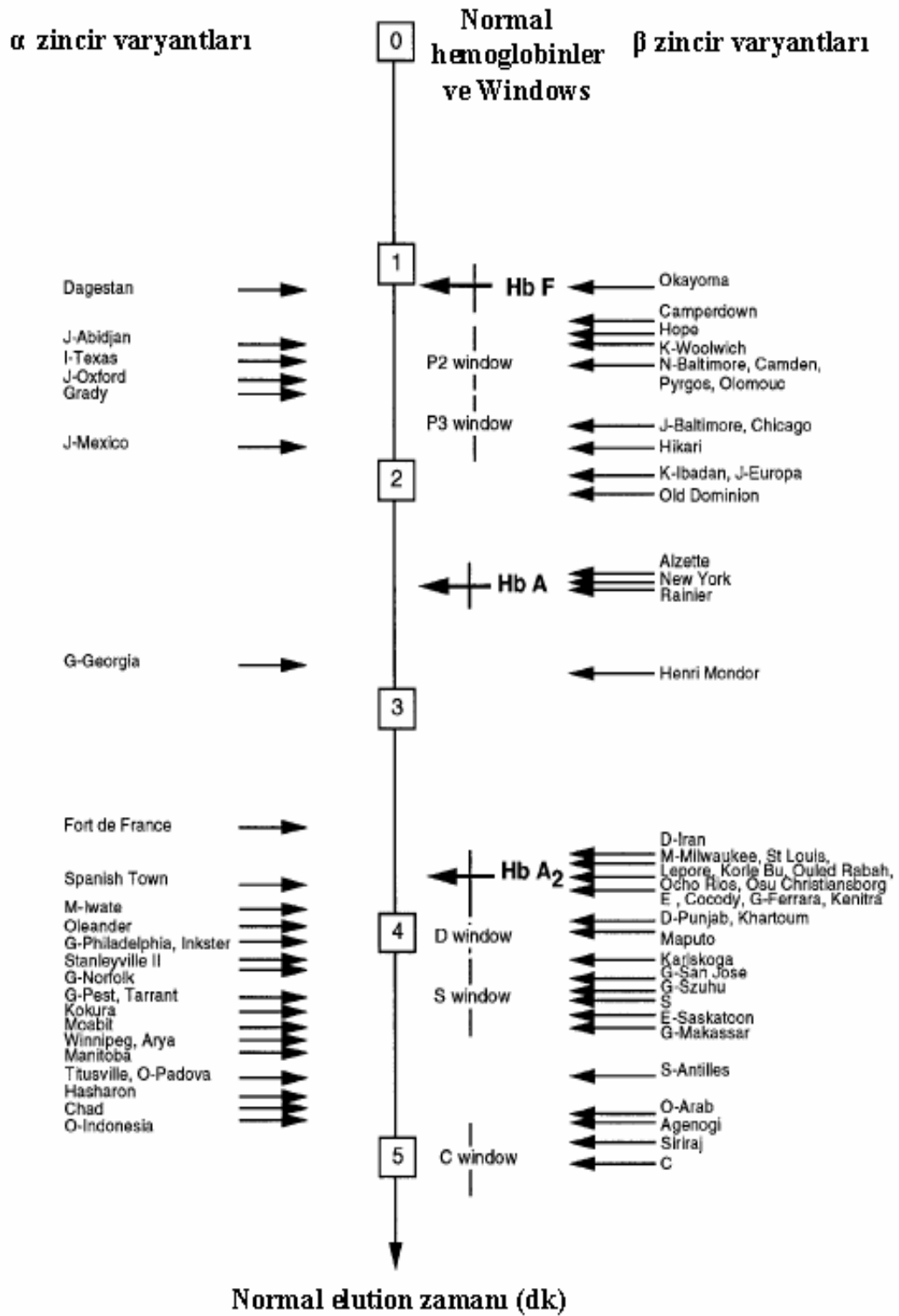
Şekil 3.2. Katyon değiştirici kolon ile HbF, HbA ve HbA<sub>2</sub> ayırımı.



**Şekil 3.3.** Katyon değiştirici kolon ile HbF, HbA ve HbA<sub>2</sub> ayırımı.

Selüloz asetat elektroforezi ile HbS, HbD ve HbG aynı yerde görölmektedir. Ayrıca HbE, HbO-Arab ve HbC ile kolayca ayrıştırılmaz. HPLC ile HbC ve HbO-Arap'ın bulunduğu örneklerde HbA<sub>2</sub> miktarı doğru olarak tayin edilebilirken HbE'den HbA<sub>2</sub> 'nin ayırımı mümkün değildir. HbA<sub>2</sub> miktarının tayini  $\beta$ -talasemi taşıyıcılarında önemli olup normal miktarının (%2.5 $\pm$ 0.9) iki katına kadar %5 ulaşabilir. Alfa talasemilerde özellikle HbH,  $\delta\beta$  talasemili erişkinlerle delesyona bağlı HPFH ve  $\delta$  talasemi taşıyıcılarında HbA<sub>2</sub> miktarı azalmaktadır.

HPLC talasemi ve anormal hemoglobinlerin saptanmasında doğru ve hassas bir metottur. Hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir olmasından dolayı talasemi taramasında tercih edilir<sup>28,29</sup>. Bu nedenle cihaz üreticileri anormal hemoglobinler ve talaseminin sık görüldüğü bölgelerde kullanılmak üzere kısa sürede çok sayıda örnek tarayacak bilgisayarlı otomatik HPLC sistemi üretmişlerdir. Ülkemizde, tarama merkezleri HPLC cihazını kit karşılığı aldığı için firmalar cihaz ile ilgili olan kolon ve tamponlar hakkında bilgi vermediği gibi sisteme müdahale konusunda da sınırlama getirmektedir. Bu şekilde Biyokimya Anabilim Dalında kullanılmakta olan Aligent marka HPLC sistemi ve çözeltileri hakkında fazla bilgi vermemiz de mümkün olmamıştır. Spesifik kolon, tampon ve bilgisayar yazılımını içeren bu sistemde hemoglobin varyantlarının elüsyon zamanı (kolondan ayrılış) tespit edilmiştir. Bu cihaz kolonu, tamponu ve programına özel olarak HbA, HbF, HbA<sub>2</sub> ve diğer  $\alpha$  ve  $\beta$  zincir varyantları ile birlikte karşılaştırılmalı olarak **Şekil 3.4**'te gösterilmiştir.



Şekil 3.4. Normal hemoglobinler ve varyantlarının elüsyon zamanları.

Çeşitli hemoglobin varyantlarının elüsyon zamanı bir kolondan başka bir kolona ve bir reaktiften başka bir reaktife göre değişiklik göstermektedir. Bununla birlikte bazı sistemler tam kan kullanırken bazıları için hemolizat hazırlanması gerekmektedir. Kullanılan kolon ve tamponlara bağlı olarak hemoglobinlerin retention zamanını “S-Window”, “D-Window”, “A<sub>2</sub>-Window” ve “C-Window” şeklinde ayarlanmıştır (Şekil 3.4). Analiz edilecek örnekler bu çerçevede değerlendirilmektedir. Bu sistemler özellikle beta talasemi, HbS, HbC, HbD gibi taşıyıcıları tespit etmek için geliştirilmiştir. HPLC ile 10 dakika gibi kısa bir sürede ve aynı tampon sistemlerini kullanarak farklı yapıda olmasına rağmen her Hb molekülün ayırımını yapması ve miktarını tayin etmesi mümkün değildir. Benzer amino asit değişimli hemoglobin varyantlarının elüvyasyon zamanları bazı vakalarda aynı bazılarında ise farklı olabilmektedir<sup>30,31</sup>.

### **3.3.1.4. Mikrokolon Kromatografisi ile HbA<sub>2</sub> Ölçümü**

#### **3.3.1.4.1. Prensip**

Mikrokolon kromatografisi ile Hb A<sub>2</sub> fraksiyonunun ayırımı, Hb molekülü üzerindeki yüklü gruplar ile iyon değiştirici reçine üzerindeki yüklü gruplar arasındaki etkileşime dayanır. Hemolizat reçine üzerine tatbik edildiğinde Hb komponenti spesifik pH’da ve tamponun (geliştirici) iyonik gücüne bağlı olarak ayrıştırılır. Her bir fraksiyonun absorbans değerleri spektrofotometrede ölçülerek konsantrasyon hesaplanır<sup>24</sup>.

#### **3.3.1.4.2 Çözeltiler**

- 1) Geliştirici A: 15 g Glisin ve 0.1 g Potasyum siyanür (KCN) distile suda çözülerek 1 L’ye tamamlanır.
- 2) Geliştirici A<sub>2</sub>: 15 g Glisin, 0.1 g Potasyum siyanür ve 1.17 g NaCl distile suda çözülerek 1 L’ye tamamlanır.
- 3) Geliştirici B: 15.0 g Glisin, 0.1 g Potasyum siyanür ve 11.7 g NaCl distile suda çözülerek 1 L’ye tamamlanır.

4) İyon değiştirici DE-52 kolonunun hazırlanması: Bir hacim DE-52 üzerine üç hacim geliştirici A eklenerek jel yıkanır. Bu yıkama işlemine en az üç kez, jelin pH'sı 7.2-7.6 arasında oluncaya kadar devam edilir.

#### **3.3.1.4.3. Yöntem**

Reçine kolonda dengelendikten sonra üzerine 60 µL hemolizat applike edilir ve tamamının reçineye adsorbe olması için beklenir. Kolon, geliştirici A ile yıkanarak 8 mL eluvat toplanır. Bu esnada HbA<sub>2</sub>'nin kolondan ayrılması sağlanmış olur. Total Hb'nin reçineden eluve edilmesi için kolon geliştirici B ile yıkanır. Toplanan eluvat saf su ile 25 mL'ye tamamlanır. İki ayrı tüpte toplanan eluvatların spektrofotometrede absorbanları 415 nm dalga boyunda saf su körüne karşı ölçülür. HbA<sub>2</sub> yüzdesi aşağıdaki formül ile hesaplanır.

$$\% \text{Hb A}_2 = \{ \text{OD HbA}_2 / (\text{OD HbA}_2 + 3.125 \times \text{OD HbA}) \} \times 100$$

#### **3.3.1.5. Alkali Denatürasyon yöntemi ile HbF Ölçümü**

##### **3.3.1.5.1. Prensi**

Hemoglobinler içinde alkaliye en dirençli olanı HbF'dir. Bu özelliğinden yararlanılarak diğer hemoglobinler NaOH ile denature edilir. Daha sonra doymuş amonyum sülfat ile denatürasyon durdurulur. Amonyum sülfat pH'yı düşürür ve denatüre hemoglobinleri presipite eder. Presipite olan hemoglobinler filtre kağıdı ile süzülür. Denatüre olmayan fetal hemoglobin miktarı 540 nm dalga boyunda saf su körüne karşı spektrofotometrede okunur<sup>25</sup>.

##### **3.3.1.5.2. Çözeltiler**

1) Siyanür çözeltisi: 0.2 g K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> ve 0.2 g KCN distile suda çözünerek 1 litreye tamamlanır.

2) Doymuş amonyum sülfat: 70 g Amonyum sülfat  $[(NH_4)_2 SO_4]$  distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanır.

3) 1.2 N Sodyum hidroksit

### 3.3.1.5.3. Yöntem

Her bir örnek için 3 deney tüpü hazırlanır. Ayıraçlar oda ısısına getirildikten sonra I. tüpe 3.8 mL siyanür çözeltisi konulur ve 0.2 mL hemolizat eklenerek karıştırılır. 10 dakika bekletilen bu karışımdan 2.8 mL II. tüpe alınır ve üzerine 1.2 N NaOH'dan 0.2 mL ilave edilerek 2 dakika bekletilir. Daha sonra II. tüpün üstüne 2 mL amonyum sülfat eklenerek 20 dakika bekletilerek filtre kağıdı ile süzülür. Total Hb tayini için I. tüpten 0.4 mL alınır ve 6.75 mL saf su ilave edilerek III. tüp hazırlanır. I. ve III. tüplerin absorbanları spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda saf su körüne karşı spektrofotometrede okunur.

Hesaplama

$$\% \text{HbF} = \left\{ \frac{\text{OD HbF süzüntü}}{\text{OD Hb total} \times 100} \right\} \times 100$$

### 3.3.1.6. Oraklaşma Testi

#### 3.3.1.6.1. Prensip

Hemoglobin S, oksijensiz ortamda veya güçlü bir indirgeyici ajan olan sodyum metabisülfid varlığında eritrositlerin orak şeklini almasıyla tanımlanmaktadır<sup>18</sup>.

#### 3.3.1.6.2. Çözelti

0.2 g Sodyum meta bisülfid ( $Na_2S_2O_5$ ) 10 mL suda çözünür ve taze hazırlanmalıdır. Yapıştırıcı olarak entellan, oje vb. kullanılabilir.

### 3.3.1.6.3. Yöntem

Tam kan örneğinden 20 µL alınarak lamın ortasına konup üzerine % 2'lik sodyum meta bisülfitten bir damla eklenir. Üzeri lamelle kapatılıp lamelin kenarları entellan veya oje gibi yapıştırıcı ile hava almaması için kapatılır. 5-30 dk. sonra mikroskofta incelenir.

### 3.3.1.6.4. Yorum

Orak hücre anemisinde eritrositlerin % 60-80'ı 5 dk. içinde orak şeklini alır. Orak hücre taşıyıcılığında ise % 5 oranında orak hücre oluşumu gözlenir.

## 3.3.2. Tam Kandan DNA İzolasyonu

EDTA'lı tüplere alınan kanın, plazması uzaklaştırılarak şekilli elemanlar yıkanır. Eritrositler hemoliz edilerek saf lökosit elde edilir. Proteinaz K, sodyum klorür ve Tris-EDTA ile muamele edilen lökositlerin hücre zarı parçalanarak proteinler hidroliz edilir. Fenol-kloroform ile hücre zarı ve atıklarından arındırılan DNA, saf etanolde çöktürülerek elde edilir<sup>26</sup>.

### 3.3.2.1. Çözeltiler

1) Parçalayıcı (Lizis) Tampon: 3.570 g Amonyum klorür ve 0.0350 g Amonyum bikarbonat distile suda çözülerek 1 L'ye tamamlanır.

2) Tampon:

4M NaCl	3.75 ml
0,5 M EDTA Na <sub>2</sub> (pH 7.5)	5.0 ml
SDS (%0.1)	100 mg
Proteinaz K (25mg/mL)	0.2 ml

Distile suda çözülerek 100 mL'ye tamamlanır

3) Doymuş Fenol Çözeltisi:

Kristal halde 250 g fenol, 50 mL distile suda eritilir. Üzerine pH'sı 8'e ayarlanmış 50 mL tampon eklenerek karıştırılır. Fenol ve su fazı ayrıldıktan sonra üstte kalan su

fazının pH'sı 8.0'ın altındaysa su fazı alınır ve pH 8 olana kadar bu işlem tekrar edilir. Son olarak üstte bir miktar tampon bırakılarak +4 °C'de ve renkli cam şişede saklanır.

4) Kloroform

5) %70'lik Etil Alkol

### 3.3.2.2. Yöntem

1) 1 mL EDTA'lı tam kan üzerine 3 mL soğuk parçalayıcı tampon eklenip 10 dakika buz içinde bekletilir

2) +4°C'de 5000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek süpernatant atılır ve bu işlem iki kez tekrarlanır

3) Lökosit pelleti üzerine 1 mL tampon eklenerek hafifçe karıştırılır ve 37 °C'de bir gece bekletilir

4) Süre sonunda tüplere 400 µL fenol, 400 µL kloroform eklenir ve bu karışım 5000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilir. Altta kalan fenol kloroform karışımı atılıp bu işlem 2 kez tekrar edilir.

5) Aynı işlem 2 kez kloroform ile tekrar edilir

6) Tüpler santrifüj edilerek süpernatant 5 mL %95'lik etil alkol içine aktarılıp tüp yavaşça altüst edilerek DNA'nın ipliksi bir görünüm alması sağlanır. DNA ipliksi bir görünüm aldıktan sonra 13.000 rpm'de 3 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltisi elde edilir

7) Süpernatant dökülerek DNA'nın kuruması için tüp ters çevrilir

8) Pelletin büyüklüğüne göre üzerine 40-100 µL saf su eklenip DNA'nın çözünmesi için bir gece 37 °C'de bekletilir

9) DNA çözüldükten sonra konsantrasyonu hesaplanır;

5 µL DNA çözeltisi 595 µL saf su ile karıştırılarak 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbansları (OD: optik dansite) ölçülür.

Konsantrasyon (µg/mL) =  $OD_{260} \times \text{Sulandırma oranı} (120) \times 50$

Verim =  $OD_{260} / OD_{280}$

Bu oranın 1.5-1.8 arasında olması istenilir.



### 3.3.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu; dizisi bilinen iki bölge arasındaki gen parçasını in vitro koşullarda çoğaltmak için kullanılır. PCR, in vitro koşullarda genomik DNA'nın istenilen bölgesine özgü primerler kullanılarak, konsantrasyonunun moleküler açıdan değerlendirilebilir düzeye çıkartılması işlemidir.

Amplifikasyon işlemi ilk önce iki oligonükleotid (primer) ve dört deoksिनükleotid trifosfatın (dNTP) varlığında DNA 95°C'ye kadar ısıtılarak denatüre edilir. İkinci aşamada ısı 55°C-65°C arasına düşürülerek spesifik primerlerin komplementer dizilerine yapışması (annealing) gerçekleştirilir. Son aşamada 72°C'de DNA polimerazın yerini tutan ve yüksek ısıdan etkilenmeyen Taq polimeraz enzimi, ortamda bulunan deoksिनükleotid trifosfatların 5'→3' yönünde eklenmesiyle zincirin uzamasını sağlar. Bu ısı değişimi döngüsünde DNA iki katına çıkmakta ve bu tekrarlanan her döngüde DNA geometrik olarak artmaktadır<sup>32,33,34,35</sup>.

#### 3.3.3.1. Çözeltiler

##### 1. 10X Tris Tamponu

2M KCl	1.25mL
1M Tris.HCl (pH 8.3)	0.5 mL
1M MgCl <sub>2</sub>	75 µL
Jelatin	5 mg
Steril distile su	3.2 mL

Jelatinin erimesi için 37 °C'de bekletilir.

##### 2. Spermidin 1 M

##### 3. PCR Karışımı (4 mL)

10X Cetus tamponu	500 µL
Steril distile su	2700 µL
1.25mM dNTP karışımı	800 µL
Spermidin 1M	4 µL

dNTP'lerin (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) her birinden (100 mM'lık stoktan) 60 µL alınıp üzerine 4740 µL steril distile su eklenerek 1.25 mM'lık çözelti hazırlanır.

### 3.3.3.2. Yöntem

Gen amplifikasyonu, Thermal Cycler ile ısıya dayanıklı mikrotüpler içerisinde yapılır. Amplifikasyon tüplerinin yerleştirildiği bir ısı bloğu ve ısı değişimlerini kısa sürede gerçekleştiren bir mikro işlemciden oluşan bu alette termal döngü protokolleri önceden belirlenerek uygulanabilir.

### 3.3.3.3. Amplification Refractory Mutation System (ARMS)

Nokta mutasyonlarının veya küçük delesyonların analizi için genel bir teknik olarak ARMS yöntemi (Amplification Refractory Mutation System) kullanılmaktadır. ARMS yönteminde 3'-OH kalıntısındaki uyumsuzluk dışında belirli DNA dizisini tanımlayıcı tepkimeden oluşur. Bu yöntemde birinci tepkime, normal DNA dizisine özgül primeri içerir ve belirli bir yerdeki mutant DNA'yı amplifiye edemez. Benzer olarak ikinci tepkime mutanta özgül primer içerir ve normal DNA'yı amplifiye edemez. Bunun sonucunda normal bir birey yalnızca normal tepkimede PCR ürünü oluştururken heterozigot her iki tepkimede, homozigot ise yalnızca mutant tepkimede PCR ürünü oluşturur<sup>32,36,37</sup>. ARMS yönteminde kullanılan PCR karışımı;

PCR karışımı	21.9 µl
5' Forward primer #11 veya 30	1.0 µl
3' Reverse primer #12 veya 40	1.0 µl
gDNA (0.5-1 µg/mL)	1.0 µl
Taq polimeraz (5 U/uL)	0.1 µl
Toplam hacim	25.0 µl'dir.

### 3.3.3.4. Termal Cycler ile PCR Protokolü

ARMS yöntemi ile amplifiye edilmek istenen DNA uzunluğuna ve primer içeriğine bağlı olarak sıcaklık ve süre değişmektedir. Bir ARMS protokolündeki sıcaklık, süre ve döngü sayısı **Tablo 3.1**'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.1.** ARMS yönteminde kullanılan PCR programı.

94°C	1 dakika	Denatürasyon	→25 döngü
65°C	1 dakika	Primer bağlanması	
72°C	1 dakika	Zincir uzaması	
72°C	3 dakika	Son döngüde zincir uzaması	→1 döngü

Bir PCR programı denatürasyon, primer bağlanması ve zincir uzaması aşamalarından oluşmaktadır. ARMS yönteminde kullanılan ortak ve kontrol primerleri **Tablo 3.2** verilmiştir.

**Tablo 3.2.** ARMS yönteminde kullanılan ortak ve kontrol primerleri

5'Ortak primer # 30	5'ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC 3'
5'Kontrol primer #15	5'CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC 3'
3'Kontrol primer #16	5'GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA 3'

**Tablo 3.2.** ARMS yönteminde kullanılan Hb varyantları ve  $\beta$ -talasemi mutasyonlarına özgü primerler

HbS (A→T) (M*)	5'-CCC ACA GGG CAG T AA CGG CAG ACT TCT GCA-3'
HbS (A→T) (N*)	5'-CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT GCT-3'
HbC (G→A) (M)	5'-CCA CAG GGC AGT AAC GGC AGA CTT CTG CTT -3'
HbC (G→A) (N)	5'-CCA CAG GGC AGT AAC GGC AGA CTT CTG CTC-3'
HbD (G→C) (M)	5'-ATA GGC AGC CTG CAC TGG TGG GGT GAG TTG -3'
HbD (G→C) (N)	5'-ATA GGC AGC CTG CAC TGG TGG GGT GAG TTC-3'
HbE (G→A) (M)	5'-TAA CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG GGC GTT-3'
HbE (G→A) (N)	5'-TAA CCT TGA TAC CAA CCT GCC CAG GGC GTC-3'
IVSI-110 (G→A) (M)	5'-ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACT-3'
IVSI-110 (G→A) (N)	5'-ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACC-3'
IVSI-1 (G→A) (M)	5'-TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAT-3'
IVSI-1 (G→A) (N)	5'-TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAC-3'
IVS1-5 (G→C) (M)	5'-CTC CTT AAA CCT GTG TTG TAA CCT TGT TAG-3'
IVS1-5 (G→C) (N)	5'-CTC CTT AAA CCT GTC TTG TAA CCT TGT TAC-3'
IVS1-6 (T→C) (M)	5'-TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATG-3'
IVS1-6 (T→C) (N)	5'-TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATA-3'
Cd 39 (C→T) (M)	5'-CAG ATC CCC AAA GGA CTC AAA GAA CCT GT-3'
Cd 39 (C→T) (N)	5'-TTA GGC TGC TGG TGG TCT ACC CTT GGT CCC-3'
Fsc 5 (-CT) (M)	5'-ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCG CGA-3'
Fsc 5 (-CT) (N)	5'-ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCG CTC-3'

\*M:mutant primer

\*N:normal primer

### 3.3.3.5. Agaroz Jel Elektrofözezi

Agaroz jel elektrofözezi; amplifiye edilmiş DNA molekülünün tanımlanması, ayrıştırılması ve saflaştırılması için kullanılır. Agaroz jelde DNA moleküllerinin içerdikleri nükleotid sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç ederler. Bu göç hızı jele eş zamanlı aplike edilen kontrol DNA ile birlikte değerlendirilir.

#### 3.3.4.5.1. Çözeltiler

1) 5×Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu pH 8.0:

Tris baz	54.0 g
Borik asit	27.5 g
EDTA [0.5 M, pH:8.0]	20 mL

Bir miktar saf suda çözünerek 1 L'ye tamamlanır.

2) Elektroförez için 0.5X TBE Tamponu:

5×TBE'den 10 ml alınarak saf su ile 200 ml'ye tamamlanır.

3) %1'lik Agaroz jel:

2 g Agaroz 100 mL 0.5×TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritilir. Hafif soğuyunca jel kaplarına dökülür.

4) Yükleme tamponu

Brom fenol Mavisi	%0.05
Gliserol	%10
Ficoll	%15

0.5×TBE tamponu ile 100 ml'ye tamamlanır.

5) Etidyum Bromür çözeltisi:

Etidyum Bromür 5 µg/µL olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanır.

### 3.3.3.5.2. Yöntem

0.5×TBE tamponu içinde mikrodalga fırında çözülen %2'lik NuSieve-Agaroz jel elektroforez kapları içine dökülür. Soğuduktan sonra 0.5×TBE tamponuyla dolu elektroforez tankı içine yerleştirilir. Jel içindeki tarak çıkarılıp aplikasyon kuyuları tampon ile temizlenir. Amplifiye örnekten 15 µL ile yükleme tamponu karıştırılarak kuyulara applike edilir. Bu jel 150 voltta 30 dakika yürütülüp elektroforez sonrası jel, etidyum bromür ile 3 dakika boyanır ve saf suda yarım saat bekletilerek boya atıklarından temizlenir. UV ışığı altında DNA fragmanlarının fotoğrafı çekilerek değerlendirilir.

### 3.3.3.6. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)

Mutasyon içeren DNA parçası PCR ile amplifiye edilerek mutasyon noktasını tanıyan bir restriksiyon endonükleaz ile inkübe edildikten sonra jel elektroforezinde ayrıştırılır. Fragment parça uzunluklarına göre genotipi belirlenir. Beta globin geni 11 ve 12 nolu primerler ile ARMS yöntemindekine benzer PCR programı (sadece 72°C'de 90 sn ve son döngüde 60 sn ek süre) kullanılmıştır. Agaroz jelde kontrol edildikten sonra 10 µL PCR ürünü bir ependorf tüpüne alınıp üzerine 1µL Dde I (5U/µL) enzimi eklenir. Bir gece 37°C de inkübe edildikten sonra %2'lik Agaroz jel (NuSieve Agaroz 1 g, Agaroz 1 g) elektroforezinde yürütülüp etidyum bromür ile boyanarak değerlendirilir. Beta globin geni üzerinde bulunan HbS mutasyonu 11 ve 12 no'lu primerler ve Dde I enzimi ile HbD ise 229 ve 230 primerleri ve EcoR I enzimi ile belirlenmektedir. RFLP analizinde kullanılan primerler **Tablo 3.4**'te gösterilmiştir<sup>32,38</sup>. Beta globin genin RFLP için PCR primerleri ve Dde I kesim yerleri **Şekil 3.5**'te gösterilmiştir.

**Tablo 3.4.** RFLP yönteminde kullanılan primerler

HbS RFLP	#11	5'-GGC CAA TCT ACT CCC AGG AG-3'
HbS RFLP	#12	5'-ACA TCA AGG GTC CCA TGA AC-3'
HbD RFLP	#229	5'-ATA CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC-3'
HbD RFLP	#230	5'-GTA TTT TCC CAA GGT TTG AAC TAG CTC-3'



Şekil 3.5. Beta globin gen dizisi, RFLP için PCR primerleri ve Dde I kesim yerleri.

### 3.3.4. DNA Dizi Analizi

Beta globin geni tek zincir halinde amplifiye edilerek (ssDNA), komplementer zincir sentezinde kalıp olarak kullanılmaktadır. Reaksiyon esnasında sekans primeri radyoaktif <sup>35</sup>S-dATPα ile işaretlenir. Daha sonra sentez dideoksi terminasyon reaksiyonu ile sonlandırılarak farklı büyüklükteki fragmanların poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) ile ayrıştırılır. Otoradyogramının alınması ve baz sırasının normal dizi ile karşılaştırılma işlemiyle değerlendirilir<sup>39,40</sup>.

#### 3.3.5.1. Tek Zincir DNA (ssDNA) Amplifikasyonu

Dizi analizi için beta globin geni iki parça halinde asimetrik olarak amplifiye edilir. Birinci parça, beta geninin 5' tarafından (-140) başlayıp IVS II'nin 71. nükleotidini (704 bp uzunluğunda promotor bölge, Ekson I, IVS I ve Ekson II) içine almaktadır. Dizi analizi için kullanılan amplifikasyon ve sequencing primerleri aşağıda verilmiştir.

PCR için forward primer	#108	5'-GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC-3'
PCR için reverse primer	#109	5'-CCCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT-3'
Sekans primeri	#410	5'-TGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGG-3'
Sekans primeri	#16	5'-GCAGGTTGGTATCAAGGTT-3'

Beta geninin ikinci kısmı; IVS II, Ekson 3 ve 5' kodlanmayan bölge ile Poli A'yı (IVSII'nin 122. nükleotidinden UTR 464'e kadar) içine alacak şekilde 1098 nükleotid uzunluğundadır. Amplifikasyon ve sequencing primerleri aşağıda gösterilmiştir.

PCR için forward primer	#143	5'-CAGTGTGGAAGTCTCAGG-3'
PCR için reverse primer	#230	5'-GTATTTTCCCAAGGTTTGAAGTACTAGCTC-3'
Sekans primeri	#229	5'-ATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACC-3'
Sekans primeri	#169	5'-GTCTGTGTGCTGGCCCATC-3'



### Reaksiyon karışımı

1 µg genomik DNA, 10xCetus Tamponu, 300 mM dNTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub> ve 1 pmol forward primer ile 100 pmol reverse primer bulunur. Primer konsantrasyonları dışında tüm ayrıntılar dsDNA amplifikasyonu ile aynıdır.

10xCetus Tamponu	2x10	20µL
dNTP mix	2x 5	10µL
Forward (En az primer; 1 pmol/µl)	2x 1	2µL
Reverse (En fazla primer; 100 pmol/µl)	2x 1	2µL

Bu karışım 200 µL'ye steril saf su ile tamamlanır ve yeterli miktarda PCR ürünü elde etmek için, bir örnek iki PCR tüpünde amplifiye edilir.

Her tüpe bu karışımdan 50 µL ilave edilip tüpler Thermocycler'a yerleştirilerek 95°C'de 6' denatüre edilir. Sürenin bitimine yakın karışımın geri kalan kısmına (50 µL) 0.5 µL Taq polimeraz (5 U/µL) ilave edilir. Denatürasyonun (6 dakika) bitiminde her tüpe 50 µL enzim içeren reaksiyon karışımı ilave edilir.

	Sıcaklık	Siklus I	Siklus II	Siklus III
Denatürasyon	94°C	4'30"	1'30"	1'15"
Yapışma	55°C	1'30"	1'30"	1'30"
Uzama	72°C	6'00"	5'30"	10'00"
Tekrar	1	32	1	1

Toplam 34 döngünün tamamlanması sonucunda her bir tüpden 5 µl alınarak %1.5'lük agaroz jelde amplifikasyon ürünü kontrol edilir. Beta globin geni üzerindeki amplifikasyon ve reaksiyon primerleri **Şekil 3.6** gösterilmiştir.

108 410

-148 ccagaagagc **caaggacagg tacggctgtc** atcacttaga cctcaccctg **tggagccaca**  
-88 **ccctaggggtt** ggccaatcta ctcccaggag cagggagggc aggagccagg gctgggcata  
-28 aaagtcaggg cagagccatc tattgcttAc atttgcttct gacacaactg tgttcactag  
+24 caacctcaaa cagacacc  
Ekson 1 ATG GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG  
Cd 16 GGC AAG CTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG GCC CTG **GGC AG**  
16  
IVS1 1 **gttggtatca aggtt**acaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg catgtggaga  
61 cagagaagac tcttggggtt ctgataggca ctgactctct ctgcctattg gtctatatttc  
121 ccacccttag  
Ekson 2 G CTG CTG GTG GTC TAC CCT TGG ACC CAG AGG TTC TTT GAG TCC TTT GGG  
Cd 47 GAT CTG TCC ACT CCT GAT GCT GTT ATG GGC AAC CCT AAG GTG AAG GCT  
Cd 63 CAT GGC AAG AAA GTG CTC GGT GCC TTT AGT GAT GGC CTG GCT CAC CTG  
Cd 79 GAC AAC CTC AAG GGC ACC TTT GCC ACA CTG AGT GAG CTG CAC TGT GAC  
Cd 95 AAG CTG CAC GTG GAT CCT GAG AAC TTC AGG  
109  
IVS2 1 gtgagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt **ttctatgggtt aagttcatgt**  
61 **cataggaagg** ggagaagtaa cagggtagag tttagaatgg gaaacagacg aatgattgca  
143  
121 **tcagtgtgga agtctcagga** tcgttttagt ttcttttatt tgctgttcat aacaattggt  
181 ttcttttgtt taattcttgc tttctttttt tttcttctcc gcaattttta ctattatact  
241 taatgcctta acattgtgta taacaaaagg aaatatctct gagatacatt aagtaactta  
301 aaaaaaaact ttacacagtc tgcctagtag attactattt ggaatatatg tgtgcttatt  
361 tgcataattca taatctccct actttatttt cttttatttt taattgatac ataactatta  
421 tacataattta tgggttaaag tgtaatgttt taatatgtgt acacataattg accaaatcag  
481 ggtaattttg catttgtaat tttaaaaaat gctttcttct tttaatatac ttttttgttt  
541 atcttatttc taatactttc cctaactctt ttctttcagg gcaataatga **tacaatgtat**  
229  
601 **catgcctctt tgcaccattc** taaagaataa cagtgataat ttctggggtta aggcaatagc  
661 aatattttctg catataaata tttctgcata taaattgtaa ctgatgtaag aggtttcata  
721 ttgctaatag cagctacaat ccagctacca ttctgctttt attttatggt tgggataagg  
781 ctggattatt ctgagtccea gctaggccct tttgctaate atgttcatac ctcttatctt  
841 cctcccacag  
169  
Ekson 3 CTC CTG GGC AAC GTG CTG **GTC TGT GTG CTG GCC CAT** CAC TTT GGC AAA  
Cd 121 GAA TTC ACC CCA CCA GTG CAG GCT GCC TAT CAG AAA GTG GTG GCT GGT  
Cd 137 GTG GCT AAT GCC CTG GCC CAC AAG TAT CAC TAA  
UTR 1 gctcgcttct ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttccctaa gtccaactac  
UTR 61 taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcctAAT AAAAAacatt  
UTR 121 tattttcatt gcaatgatgt atttaaatta tttctgaata ttttactaaa aagggaaatgt  
UTR 181 gggaggtcag tgcatttaaa acataaagaa atgaagagct **agttcaaacc ttgggaaaaat**  
UTR 241 acactataatc ttaaactcca tgaaagaagg tgaggctgca aacagctaag gcacattggc  
UTR 301 aacagccctg atgcctatgc cttattcatc cctcagaaaa ggattcaagt agaggcttga  
UTR 361 tttggaggtt aaagttttgc tatgctgtat tttacattac ttattgtttt agctgtcctc  
UTR 421 atgaatgtct tttcactacc catttgctta **tcctgcatct ctcagccttg actc**actca  
230

*Amplifikasyon Primerleri (#108, #109, #143 ve #230) Dizi Analizi Primerleri (#410, #16, #229 ve #169)*

**Şekil 3.6.** Beta globin gen dizisi amplifikasyon ve sekans primerleri.

### 3.3.4.2. Amplifiye DNA'nın Pürifikasyonu

PCR ürünü bir kollektör tüpünde (Sigma) toplanır. Kollektör içindeki reçineye bağlanması için "binding" solüsyonundan 400 µL eklenir. Tüpler santrifüj edilip üzerine 600 µL "wash" "solüsyonu eklenir. Bağlı DNA iki defa wash solüsyonuyla yıkanıp daha sonra filtre temiz bir kollektör tüpüne aktarılarak üzerine 40 µL "eluate" solüsyonundan eklenerek bağlı DNA saf olarak elde edilir. Pürifikasyondan sonra 1 mL elüat %1.5'lik agaroz jelde, 150 V'ta 30 dk yürütülerek kontrol edilir.

### 3.3.4.3. DNA Dizi (Sekans) Analizi

"Sequence Version 2" enzimi bir DNA polimerazdır. Bakteriyofaj T7 DNA polimerazının genetik bir varyantı olan bu enzimin genetik bir modifikasyonla 3'→5' eksonükleaz aktivitesi yok edilmiştir. Dizi analizi için nükleotid analoglarına hassasiyeti, hızlı kapasitesi ve 3'→5' eksonükleaz aktivitesinin bulunmaması bu alandaki kullanılabilirliğini artırmıştır. Sekans reaksiyonu, primer bağlanması, işaretleme ve zincir sonlandırma olmak üzere üç basamaktan meydana gelmektedir. Birinci basamakta primer bağlanmakta ikinci basamakta ise deoksinükleosid trifosfatların dCTP, dGTP, TTP ve <sup>35</sup>S-dATP-α (deoksiadenosine 5'[α-thio] triphosphate, spesifik aktivite 1325 Ci/mmol, konsantrasyonu 12.5 mCi/ml "Dupont") sınırlı miktardaki konsantrasyonları primerleri uzatır. Üçüncü basamakta ise deoksinükleosid trifosfatların konsantrasyonu artırılırken dideoksi nükleosid trifosfatlar da eklenir. Uzayan zincirler dideoksinükleosid trifosfatlar tarafından sonlandırılır. Bu basamak 5 dakika sonra stop solüsyonu ile (EDTA ve formamid varlığında) durdurulur. Tüm sekans reaksiyonları 1.5 ml'lik ependorf tüpleri içerisinde yapılır. Buharlaşmayı önlemek amacıyla kapakları daima kapalı tutulur.

### 3.3.4.3.1. Primer Bağlanması

DNA sequencing kiti ve primerler  $-20^{\circ}\text{C}$ 'den çıkarılarak oda ısısında çözülür ve santrifüj edilir. Genomik DNA'ya primer bağlanması için uygun sıcaklık  $68^{\circ}\text{C}$ 'dir. Primer bağlanması için aşağıdaki maddeler eklenir;

Purifiye DNA	7 $\mu\text{L}$
Primer	1 $\mu\text{L}$
Sequence tamponu	2 $\mu\text{L}$

Üstteki karışım bir ependorf tüpüne konular ve 3 dk  $68^{\circ}\text{C}$ 'de primer bekletilir. Primer bağlama aşamasından sonra tüpler hemen buza alınmalıdır.

### 3.3.4.3.2. İşaretleme

Bir ependorf tüpüne 1  $\mu\text{L}$  işaretleme karışımı ve 8  $\mu\text{L}$  saf su konularak karıştırılır. Diğer bir tüpe 7  $\mu\text{L}$  enzim seyreltme tamponu alınıp üzerine 1  $\mu\text{L}$  enzim (Sequence versiyon 2.0) eklenir. Enzim seyreltmesi tam kullanılacağı anda yapılmalıdır. Enzim kesinlikle oda ısısına çıkarılmaz, gerektiğinde dondurucu açılarak enzimden yeterli miktarda otomatik pipetle alınır ve tekrar dondurucuya ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) geri konular. Dilüe edilen enzim buz içerisine alınarak hemen kullanılır. Primer bağlanmış DNA örneği üzerine aşağıdaki maddeler eklenir.

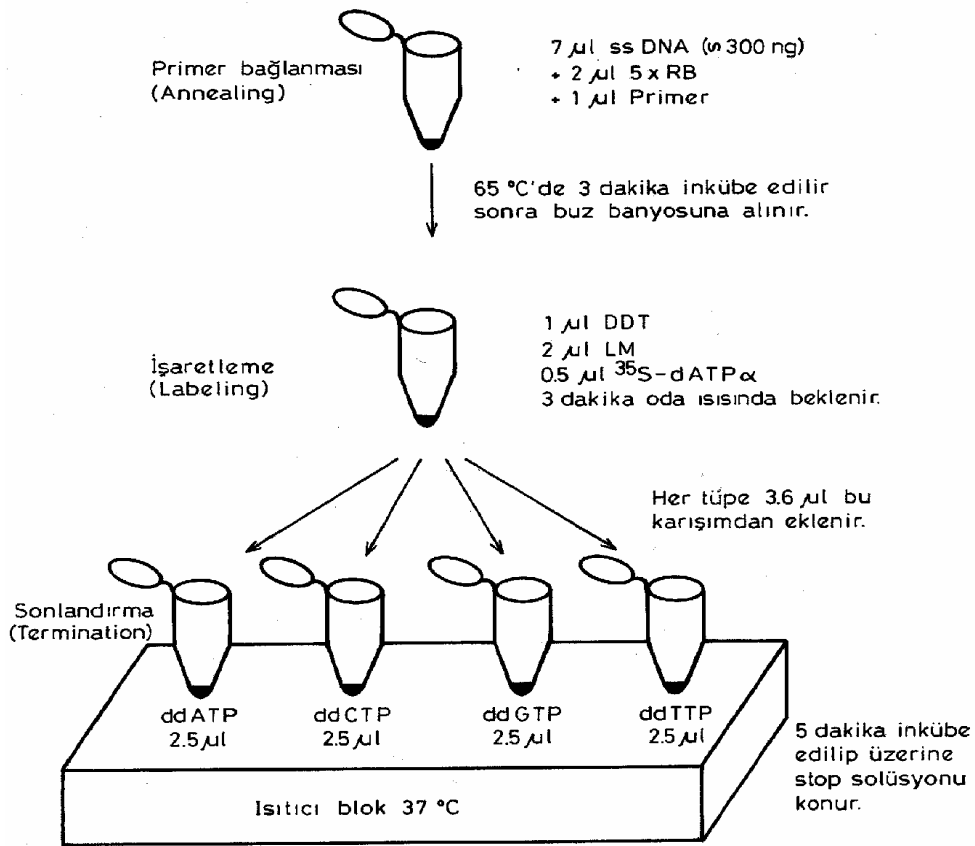
DDT (0.1 M)	1.0 $\mu\text{L}$
Seyrelmiş işaretleme karışımı	2.0 $\mu\text{L}$
$^{35}\text{S}$ dATP $\alpha$	0.5 $\mu\text{L}$
Seyreltilmiş enzim	2.0 $\mu\text{L}$

Hafifçe karıştırılan tüp 5 saniye kadar santrifüj edilerek oda ısısında 3' bekletilir.

Dört tane ependorf tüpünün kapağına A,C,G ve T harfleri yazılır. A ile işaretlenmiş tüpe 2.5  $\mu\text{L}$  dideoksi ATP (ddATP) eklenir. Aynı şekilde C, G ve T tüplerine de aynı miktarda

ddCTP, ddGTP ve ddTTP eklenir. Bu işlem tek zincir DNA'a bağlanmış primer karışımının oda ısısına kadar soğuması ve işaretleme için geçen zamanda hazırlanır.

İşaretleme süresince dideoksi tüpleri 37°C'deki ısıtıcı blokta preinkübasyona tabi tutulur. İşaretleme süresi biter bitmez, 15.5 µl reaksiyon karışımından 3.6 µl A tüpüne alınarak, karıştırılır. Aynı şekilde C, G ve T ile işaretli tüplere de aynı hacimde eklenerek karıştırılır. Bu dört tüp santrifüje konularak 5-10" çevrilir ve tekrar 37°C'ye alınarak 5 dakika inkübe edilir. Santrifüj işlemi ve tekrar 37°C' ye transfer işlemi mümkün olduğu kadar kısa süre içerisinde yapılır. Bu işlemlerin şemataik özeti Şekil 3.7'de gösterilmiştir.



Şekil 3.7. DNA dizi analizinin şemataik özeti.

### 3.3.4.3.3. Sonlandırma Reaksiyonu

Reaksiyon süresinin bitiminde her tüpe 4 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulur. Reaksiyon durdurulduktan sonra tüpler santrifüj edilerek, 95°C'de 5' denatüre edilir ve örnekler hemen buz içerisine alınır.

### 3.3.4.4. Poliakrilamid Jel Elektroforezi (PAGE)

Jel hazırlanmasında bir çift cam kullanılır. Kalınlığı 3 mm olan camların boyutları 33x38 ve 33x40 cm'dir. Deterjanla çok iyi yıkanmış ve etil alkol ile silinmiş bu camların arasına 0.4 mm kalınlığında ve 1 cm eninde polikarbonat "şeritler" yerleştirilir. Bunlar camın alt, sağ ve sol tarafına gelecek şekilde ayarlanarak plastik yapıştırıcı ile etrafı sarılır, yada %1'lik agaroz ile yapıştırılıp (klemp) kısıkaç ile sıkıştırılır. Camların üst kısmı farklı uzunluklarda olup jel dökerken uzun olan alt tarafa yatay düzlemle 45° açı oluşturacak şekilde ayarlanır. Hazırlanan jel buradan iki cam arasına dökülerek doldurulur.

#### 3.3.4.4.1. Jelin hazırlanması

Akrilamide/Bisakrilamide 19:1 oranında karıştırılmış olarak International Biotechnologies Inc (IBI)'den sağlanabilir. İkiyüz gram karışım üzerine 352 ml saf steril su ilave edilerek tamamen çözünmesi için magnetik karıştırıcı ile karıştırılır. Bu %40'luk stok solüsyon +4°C'de uzun süre saklanabilir. Bu solüsyondan 10.5 ml alınıp, üzerine 10 ml 10xTBE tamponu (1 M Tris, 1 M Borik asit, 20 mM EDTA Na<sub>2</sub>; pH:8.3), 25 ml saf su ve 29.4 g üre konarak magnetik karıştırıcıda çözününceye kadar karıştırılır. Whatman kağıdı ile süzülükten karışım bir şişeye transfer edilir. Bu şişeye 350 µl taze hazırlanmış %10'luk amonyum persulfat (Electrophoresis Grade, BRL) ve 35 ml N,N,N',N'-Tetamethylethylenediamine (TEMED, electrophoresis grade, BRL) eklenir. Amonyum persulfat saf suda çözülür, en fazla bir hafta kullanılır. Bu jel iki cam arasına hava kabarcığı girmemesine dikkat edilerek dökülür. Eğer kabarcık girmişse cam yere dikey olarak tutulur ve kabarcıkların çıkması beklenir ve tekrar 45°C açı yapacak şekilde konularak tarak bu iki cam arasına ters olarak yerleştirilir. Camların üst kısmı klemplerle sıkıştırılarak jelin polimerleşmesi beklenir. Bunu kontrol edebilmek için bir ependorf tüpüne yaklaşık 1 ml jel solüsyonundan alınır. 15-20 dakika sonra kontrol edilir. Polimerleşme gerçekleştikten sonra jel kullanıma hazırdır. Eğer

jel hazırlama aşamasında erken polimerize oluyor ise (5-6 dakika içerisinde) amonyum persülfat konsantrasyonu azaltılır, polimerleşme zamanı 15' dan fazla ise artırılır.

#### **3.3.4.4.2. Jel Elektroforezi**

Önceden hazırlanan jelin üst kısmına koyduğumuz klempler ile tarak çıkarılır, alt kısımdaki bant sökülerek dikey elektroforez cihazına (Bethesda Research Laboratories, Life Technologies Inc Model S2) yerleştirilir . Boyu kısa olan cam cihazdan tarafa getirilerek yandaki vidalarla sabitleştirilir. Cihazın alt ve üst rezervuarına 1 x TBE tampon konulur. Jelin tampon ile temas ettiği yerde oluşan hava kabarcıkları, kristalleşen üre ve akrilamid jel artıkları temizlenir. Jelin üst kısmından ayrılan tarak bu sefer dişleri jele hafifçe bastırılarak küçük klemplerle sabitleştirilir. Sekans kiti içerisindeki stop solüsyonundan (fenol mavisi içeren) jelin üst kısmına otomatik pipetle biri dolu diğeri boş olmak üzere ardışık olarak her birine 1 µL uygulanır. Yüksek voltaj güç kaynağına (LKB Browma; 2297-Macrodrives) bağlanan jel elektroforez cihazına 75 W (~1500 Volt,50 mA) akım yüklenir. Örnekleri applike etmeden 1-1.5 saat yürütülerek camların ısınması sağlanır. Bromfenol mavisinin jeldeki hareketi gözlenir. Her örnek için hazırlanan A,C,G ve T tüpleri 95°C'de 5' denatüre edilir. Bu sürede güç kaynağı kapatılarak tarak dişleri arasında oluşan hava kabarcıkları temizlenir. Denatürasyonun tamamlanması ile 95°C'den alınan bu 4 tüp buz içerisine daldırılır. A tüpünden alınan 2.5-3.0 µL'lik örnek jele (tarak dişleri arasına) applike edilir. Sırasıyla aynı miktarda C, G ve T tüplerinden alınarak applike edilir. Tekrar güç kaynağı açılarak aynı miktarda akım üç saat süre ile uygulanır.

#### **3.3.4.5. Tespit (Fixing)**

Elektroforez bitiminde güç kaynağı kapatılarak cam cihazdan ayrılır. Sandeviç şeklinde olan camlar bir bıçak yardımıyla ayrılır. Jeli üzerinde taşıyan cam, bir kap içerisine alınarak üzerine tespit solüsyonu (%10 asetik asit, %12 Metanol) eklenir. Tespit esnasında jel büyüklüğünde bir tane Whatman 3 kağıdı kesilir. 20 dakika tespit işlemi tamamlanırken solüsyon aspire edilerek alınır. Cam ve jel hafifçe eğilir, üzerindeki fazla solüsyon akıtılır. Kesilen whatman kağıdı jel üzerine kapatılıp kağıt kaldırılarak ters çevrilip jelin üste gelmesi sağlanır.

### **3.3.4.6. Kurutma ve Otoradyogram**

Whatman kağıdı üzerine alınan jel, Saran Wrap ile kaplanarak vakuma bağlı jel kurutucusunda 80°C de 1 saat kurutulur. Saran Wrap ayrılarak, jel kaset içerisine yerleştirilip üzerine film konarak bir gece ekspozitör edilir. Filmin banyosu otomatik banyo cihazı kullanılarak yapılır.

### **3.3.5.7. Değerlendirme (Okuma)**

Film üzerinde elde edilen görüntü beta globin gen dizisi ile karşılaştırılarak kontrol edilir. Bir nükleotidin diğerine değişimi, eksilmesi veya yeni bir nükleotidin araya girmesi gibi değişimlerin varlığı kontrol edilir.



## 4. BULGULAR

T.C. Sağlık Bakanlığı birinci basamak merkezlerinde evlilik öncesi tarama sonucu anormal hemoglobin taşıdığı belirlenen çiftler Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Prenatal Tanı Ünitesine başvurmuştur. Ayrıca Balcalı Hastanesi çocuk ve dahiliye hematoloji kliniklerinde tedavi gören orak hücre anemili hastalar ve bunların anne-babasından kan örnekleri alınmıştır. Biyokimya Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarında örneklerin hemoglobin elektroforezi ile uyumu DNA seviyesinde ARMS ve RFLP ile analiz edilmiştir. Hb varyantları ile kombine olabilecek diğer varyantlar ve beta talasemi mutasyonlarının tayini de yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Prenatal Tanı Ünitesine ve mutasyon analizi için Biyokimya Ana Bilim Dalı'na başvuran olguların mutasyon analizi yapılmıştır. Hemoglobin elektroforezi ile uyumu ARMS ve RFLP yöntemi ile tanımlanamayan örnekler dizi analizi ile tanımlanmıştır.

Çukurova bölgesinde, orak hücre anemisine neden olan HbS'in taşıyıcılık oranı %8.2 olarak belirlenmiştir. HbS insidansının yüksek olmasından dolayı prenatal tanı için gelen ailelerin çoğu HbS taşıyıcısıdır. Benzer şekilde beta talasemi taşıyıcılığının yüksek olmasından dolayı HbS/beta talasemi kombinasyonları da bulunmaktadır.

Bu çalışmada HbS taşıyan 22 örneğin hematolojik bulguları **Tablo 4.1**'de gösterilmiştir. Bu olguların hematolojik verileri normaldir. Bu tabloda HbS ile karışması muhtemel diğer anormal hemoglobinleri ayırmak için oraklaşma testi yapılarak hepsinin pozitif olduğu görülmüştür. Alkali pH'da yapılan Hb elektroforezi ile HbD ve HbG, HbS ile aynı yere göç etmektedir. Moleküler analizler yapılmadan (ARMS, RFLP gibi yöntemler) önce oraklaşma testi yapılarak bu olguların HbS veya HbD/G ayrımı yapılmaktadır. Bu olguların HPLC veya IEF gibi yöntemlerle analizi vakaların daha kolay çözümünü sağlamaktadır.

**Tablo 4.1.** HbS taşıyıcılarına ait hematolojik veriler.

Sıra No	Adı Soyadı	RBC 10 <sup>12</sup> /L	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elektr.	Sickling
1	O. B.	5.10	15.9	46.1	90.3	31.2	34.6	AS	(+)
2	K. B.	4.87	14.1	42.0	86.2	29.0	33.7	AS	(+)
3	Ü. Ö.	5.57	15.6	45.7	81.9	28.0	34.2	AS	(+)
4	R. K.	5.73	16.4	48.0	83.7	28.6	34.2	AS	(+)
5	E. A.	5.13	14.4	42.8	83.5	28.0	33.6	AS	(+)
6	N. V.	5.51	16.3	46.8	85.0	29.6	34.9	AS	(+)
7	Ş. F.	5.40	15.3	44.6	82.6	28.3	34.2	AS	(+)
8	C. D.	4.83	14.5	43.1	89.1	30.0	33.7	AS	(+)
9	B. Y.	5.09	14.2	45.5	89.1	27.8	31.2	AS	(+)
10	R. U.	5.30	15.1	44.6	84.1	28.6	33.9	AS	(+)
11	M. U.	5.39	16.4	47.5	88.0	30.5	34.6	AS	(+)
12	Ş. Y.	4.90	13.8	39.7	81.1	28.2	34.8	AS	(+)
13	U. Y.	5.17	14.4	41.8	80.8	27.8	34.4	AS	(+)
14	A. Ç.	5.30	15.4	44.1	83.3	29.1	35.0	AS	(+)
15	K. Ş.	5.04	15.1	43.2	85.8	30.0	34.9	AS	(+)
16	B. Y.	5.78	16.4	47.8	82.8	28.4	34.4	AS	(+)
17	İ. Y.	5.27	14.9	43.0	81.6	28.4	34.7	AS	(+)
18	G. M.	5.27	16.1	46.4	87.9	30.6	34.9	AS	(+)
19	M. N.	4.92	14.1	42.9	87.2	28.7	32.9	AS	(+)
20	A. Ç.	4.63	14.9	43.4	93.6	32.1	34.2	AS	(+)
21	S. D.	5.05	14.8	38.9	81.8	28.4	34.3	AS	(+)
22	H. G.	4.97	14.4	42.8	83.6	28.1	33.6	AS	(+)

HbD taşıyıcılarının hematolojik değerleri genellikle normaldir. Bazı örneklerde Hb düzeyleri biraz düşük ve RBC değeri ise hafif artış görülmektedir. HbD taşıyıcılarına ait hematolojik veriler **Tablo 4.2**'de gösterilmiştir. MCV değerleri genelde normal olmakla birlikte 25, 27, 30, 33, 34, 36, 41 ve 42 nolu örneklerin MCV değeri düşük bulunmuştur. Benzer olarak Hb değerleri genel olarak normal olmakla birlikte birkaç olguda (27, 28, 30, 35 ve 42 nolu örnekler) Hb düşük bulunmuştur.

**Tablo 4.2.** HbD taşıyıcılarına ait hematolojik veriler.

Sıra No	Adı Soyadı	RBC 10 <sup>12</sup> /L	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elektr.	Sikling
23	M. K.	5.69	14.9	46.0	80.8	26.2	32.4	AD	(-)
24	H. K.	4.43	12.5	38.2	86.2	28.1	32.7	AD	(-)
25	M. K.	6.27	13.2	43.5	69.4	21.1	30.3	AD	(-)
26	M. G.	5.63	16.1	47.8	84.8	28.5	33.6	AD	(-)
27	M. D.	5.70	10.9	34.7	60.9	19.2	31.5	AD	(-)
28	E. H.	3.89	11.4	35.6	91.5	29.3	32.0	AD	(-)
29	T. H.	5.11	16.6	50.2	98.3	32.5	33.1	AD	(-)
30	F. Ö.	3.70	7.7	26.4	71.2	20.7	29.1	AD	(-)
31	A. Ö.	5.41	16.3	47.2	87.2	30.1	34.5	AD	(-)
32	T. K.	4.34	12.8	39.3	90.7	29.5	32.5	AD	(-)
33	E. G.	5.77	13.4	41.9	72.6	23.2	31.9	AD	(-)
34	N. D.	5.11	13.4	39.2	76.7	26.3	34.3	AD	(-)
35	F. D.	4.15	11.8	34.8	83.8	28.4	34.0	AD	(-)
36	S. D.	6.32	13.9	43.4	68.7	22.0	32.0	AD	(-)
37	F. K.	4.87	13.7	42.9	88.2	28.1	31.9	AD	(-)
38	M. A.	5.68	16.4	47.8	84.1	28.9	34.3	AD	(-)
39	S. N.	3.98	12.3	34.7	87.2	31.0	35.6	AD	(-)
40	İ. N.	5.61	15.7	44.7	80.0	28.0	34.9	AD	(-)
41	D. C.	4.86	12.5	36.3	74.7	25.8	34.5	AD	(-)
42	Y. C.	4.82	10.5	32.7	67.8	21.8	32.1	AD	(-)

HbE taşıyıcıları klinik olarak herhangi bir bulgu göstermemektedir. Bu olguların Hb düzeyleri normal, eritrositler hafif hipokrom ve mikrositerdir. HbE taşıyıcılarına ait hematolojik veriler **Tablo 4.3**'te verilmiştir. Bu olgularda Hb değeri genelde biraz düşük olmakla birlikte 43, 44, 46, 50, 55, 57, 60 ve 64 nolu örnekler normal değerlerde tespit edilmiştir. Bununla birlikte bazı olguların MCV ve MCH değerleri düşük 44, 46, 57 ve 59 nolu örnekler ise normal bulunmuştur.

**Tablo 4.3.** HbE taşıyıcılarına ait hematolojik veriler.

Sıra No	Adı Soyadı	RBC 10 <sup>12</sup> /L	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elektr.
43	B. S.	5.29	12.2	37.1	70.3	23.1	32.9	AE
44	L. B.	4.88	14.1	44.7	91.6	28.9	31.5	AE
45	B. B.	4.36	11.0	34.0	77.8	25.1	31.8	AE
46	Z. B.	5.40	14.5	44.2	81.9	26.8	32.8	AE
47	E. O.	4.47	10.7	34.4	77.0	24.0	31.1	AE
48	Ö. Ö.	3.85	10.0	30.5	79.1	25.9	32.8	AE
49	N. R.	4.64	10.6	32.0	68.8	22.9	33.2	AE
50	M. E.	6.09	15.7	44.7	73.4	25.8	35.2	AE
51	V. Y.	3.49	8.8	25.5	73.0	25.1	34.4	AE
52	G. E.	4.66	11.4	34.9	75.0	24.4	32.6	AE
53	Y. Ş.	4.98	11.7	35.9	72.0	23.4	32.5	AE
54	A. Ö.	4.69	11.3	33.7	71.8	24.0	33.4	AE
55	M. E.	5.84	14.1	42.3	72.5	24.1	33.3	AE
56	Y. H.	6.78	15.7	47.5	70.0	23.1	33.0	AE
57	K. D.	4.44	14.2	37.4	84.3	27.5	32.7	AE
58	E. B.	4.74	10.0	32.0	67.5	21.1	31.3	AE
59	S. Y.	4.23	11.2	34.0	80.3	26.4	32.9	AE
60	B. Y.	6.23	16.8	46.2	74.1	26.9	36.3	AE
61	M. B.	4.40	11.0	33.4	76.0	24.9	32.8	AE
62	S. T.	5.50	11.0	36.5	66.3	20.0	30.2	AE
63	O. O.	4.80	11.5	34.3	71.5	24.0	33.5	AE
64	S. O.	5.25	13.9	40.0	76.3	26.5	34.7	AE

HbE, alkali tampon ile yapılan selüloz asetat elektroforezinde HbC ve HbA<sub>2</sub> ile aynı yerede göç etmektedir. Bunlar HPLC, IEF veya asit pH'ta agar jel elektroforezi ile ayrıştırılmaktadır.

HbC, Çukurova bölgesinde çok nadir rastlanan bir hemoglobin varyantıdır. HbC taşıyıcısı olarak tespit edilen bireylerde MCV değerleri hafif düşük ama Hb değerleri normal değerlerde bulunmuştur. HbC taşıyıcılarına ait hematolojik veriler **Tablo 4.4**'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.4.** HbC taşıyıcılarına ait hematolojik veriler.

Sıra No	Adı Soyadı	RBC 10 <sup>12</sup> /L	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elektr.
65	N. S.	6.06	16.5	46.7	77.0	27.2	35.3	AC
66	C. D.	8.7	16.1	45.2	77.4	27.6	35.6	AC
67	D. K.	5.0	12.9	38.2	76.3	25.9	33.9	AC
68	H. K.	5.84	16.6	45.9	78.6	28.4	26.2	AC
69	A. K.	5.75	16.3	45.5	79.1	28.3	35.7	AC

Orak hücre anemili (HbSS) hastalar klinik olarak ciddi hemolitik anemi tablosu ile seyrederek. Hastalarda anemi doğumdan birkaç ay sonra başlar. Bu hastalarda HbF değerlerinin %1-2 ile 30 arasında değiştiği görülmüştür. HbF değerinin yüksek olması genetik bir faktöre bağlı olup sickle cell krizlerinin azalmasına neden olmaktadır. HbF'in oksijen azlığında eritrositler içinde polimerleşen HbS moleküllerini interfere ettiği bilinmektedir. Orak hücre anemili hastaların HbF miktarı alkali denatürasyonla ölçülmüştür.

Orak hücre hastaların elektroforezinde HbF bandı yoksa, alkali denatürasyon testi ile HbF miktarı da düşük bulunmuş, elektroforezde HbF bandı bulunan örneklerin % HbF miktarı yüksek bulunmuştur ve bu olguların elektroforezleri HbSS(F) şeklinde gösterilmiştir. Çukurova bölgesinde HbS taşıyıcı sıklığının yüksek olmasından dolayı orak

hücre anemili hastaların sayısı da fazladır. Orak hücre anemili hastalara ait hematolojik veriler **Tablo 4.5**'te gösterilmiştir.

**Tablo 4.5.** Orak hücre anemili hastalara ait hematolojik veriler.

Sıra No	Adı Soyadı	RBC 10 <sup>12</sup> /L	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elektr.	HbF %
70	S. S.	3.07	7.6	24.9	81.1	24.8	30.5	SS(F)	6.5
71	C. K.	3.58	9.9	30.5	85.4	27.8	32.6	SS(F)	9.0
72	Z. K.	2.83	8.9	26.0	91.8	29.2	33.0	SS(F)	7.9
73	G. A.	2.70	5.8	21.0	77.7	21.5	27.6	SS(F)	5.1
74	O. Z.	3.20	9.9	28.1	87.7	30.8	35.1	SS	1.9
75	Z. D.	2.95	9.2	28.4	103.3	33.3	32.2	SS(F)	22.0
76	A. Ç.	2.9	7.8	24.6	84.5	26.7	31.6	SS(F)	14.6
77	A. F.	3.01	10.1	30.1	99.9	33.5	33.5	SS(F)	5.8
78	Ö. G.	1.83	5.8	18.1	98.8	31.7	32.1	SS(F)	12.0
79	U. D.	5.68	12.1	37.0	65.1	21.2	32.7	SS(F)	7.8
80	E. K.	2.32	8.4	25.0	107.7	36.3	33.7	SS(F)	8.0
81	A. F.	1.98	9.9	30.3	101.8	33.3	32.7	SS(F)	10.5
82	A. U.	2.79	7.5	23.1	83.0	26.9	32.3	SS	2.0
83	M.D.	2.87	8.2	25.4	88.3	28.7	32.4	SS(F)	9.0
84	R. Z.	2.08	6.2	19.5	93.6	29.8	31.9	SS(F)	10.2
85	Z. E.	2.49	7.7	23.0	92.5	31.1	33.6	SS	1.0
86	B. T.	2.63	8.7	25.8	98.1	33.1	33.8	SS(F)	15.0
87	İ. D.	1.44	4.7	14.9	103.2	32.5	31.5	SS(F)	4.2
88	N. H.	3.09	9.4	28.7	93.0	30.5	32.8	SS(F)	14.2
89	F. S.	3.37	9.5	28.6	84.9	28.1	33.1	SS(F)	4.5
90	F. E.	2.08	7.0	20.3	97.7	33.8	34.6	SS(F)	8.3
91	M. B.	2.83	10.3	29.0	102.2	36.5	35.7	SS(F)	18.3

Yöremizde beta talasemi taşıyıcılığı da yüksek oranda (%3.9) görülmektedir. Bazı hastaların HbS ile beta talasemi allelini birlikte taşıdığı görülmektedir. Olguların Hb elektroforezinde HbSS olarak tespit edilmiş olmasına rağmen moleküler analizleri sonucunda (ARMS, RFLP) HbS taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle beta talasemi mutasyon taramasına gereksinim duyulmuştur.

HbS ve beta talasemi kombinasyonunu taşıyan hastaların klinik tabloları değişkendir. Bu değişkenlik HbS ile birlikte taşıdığı beta talasemi mutasyonu tipine bağlıdır. HbS ile birlikte  $\beta^0$  talasemi taşıyıcılığı durumunda hastalık orak hücre hastalığına benzemekte,  $\beta^+$  talasemi taşıyıcılığı durumunda ise klinik olarak orak hücre anemisinden daha hafif bir seyir göstermektedir. HbS ile kombine beta talasemi taşıyıcılarına ait hematolojik veriler **Tablo 4.6**'te gösterilmiştir. Bu olguların HbF değerleri birbirinden farklı olarak tespit edilmiştir.

**Tablo 4.6.** HbS-  $\beta$  talasemili olguların hematolojik verileri.

Sıra No	Adı Soyadı	RBC $10^{12}/L$	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elektr	HbF %	Mutasyon
92	G. G.	4.16	8.5	29.5	70.9	20.6	30.7	SS(F)	3.4	S/IVSI-1
93	G. A.	5.03	10.5	33.0	65.6	20.9	31.8	SF	15.8	S/IVSI-5
94	İ. T.	6.10	13.1	39.5	67.6	22.5	37.5	SS	1.7	S/IVSI-6
95	S. S.	3.94	8.5	26.5	67.2	32.1	21.6	SS(F)	3.7	S/IVSI-110
96	S. K.	4.70	10.6	33.4	71.0	22.0	31.8	SS(F)	5.6	S/IVSI-110
97	C. Y.	3.41	6.9	23.5	68.9	20.3	29.5	SS(F)	3.2	S/IVSI-110
98	H. K.	4.66	10.2	32.8	70.4	22.1	31.4	SS(F)	7.0	S/IVSI-110
99	İ. Ö.	3.53	7.9	25.5	72.1	22.4	31.1	SS	1.6	S/IVSI-110
100	E. B.	4.72	10.4	34.3	72.5	22.1	30.5	SS	2.0	S/IVSI-110
101	M. K.	3.89	8.7	29.5	75.9	22.4	29.6	SS(F)	4.7	S/IVSI-110
102	S. U.	3.62	7.8	24.9	68.7	21.6	31.4	SS(F)	4.5	S/IVSI-110
103	H. Ö.	4.55	8.8	29.4	64.5	19.4	30.1	SS	2.0	S/IVSI-110
104	A. Ç.	3.71	9.1	28.6	77.1	24.4	31.6	SS(F)	7.7	S/IVSI-110
105	S. K.	3.26	7.3	22.8	70.0	22.3	31.8	SF	17.0	S/Cd 39
106	A. K.	2.75	6.0	19.4	70.5	21.6	30.7	SF	10.0	S/Cd 39
107	D. G.	4.49	9.8	32.3	72.1	21.9	30.4	SS	1.9	S/Cd 39
108	S. B.	2.99	9.5	28.9	96.4	31.7	32.9	SS	0.9	S/Fsc 5

Yöremizde HbD-beta talasemi ve HbE-beta talasemi birlikteliği de tespit edilmiştir. HbS-beta talasemi birlikteliği gibi bu olgular elektroforezde homozigot (HbDD veya HbEE) ama moleküler analizlerinde taşıyıcı olarak tespit edilmektedir. Bu nedenle olgularda beta talasemi mutasyonları taranmıştır. 109 ve 110 nolu olgular elektroforezde HbDD olarak belirlenmiş ve moleküler analizler ile doğrulanmıştır. Bazı homozigot HbD vakalarında Hb ve MCV değerleri biraz düşük bulunmuştur. HbD-beta talasemi taşıyıcıların hematolojik verileri homozigot HbD taşıyıcılarına göre daha düşük bulunmuştur. HbDD ve HbD ile birlikte beta talasemi oldukları tespit edilen hastaların hematolojik verileri **Tablo 4.7**'de gösterilmiştir.

HbE olguları ile birlikte beta talasemi taşıyıcılığı da tespit edilmiştir. Mutasyona bağlı olarak hematolojik verileri değişmektedir. Bu olgularda (117 ve 118 nolu olgular) Hb değeri ile MCH değeri düşük bulunmuştur. HbE- $\beta$  talasemi taşıyıcılarının hematolojik verileri **Tablo 4.7**'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.7.** HbDD ile HbD- $\beta$  ve HbE- $\beta$  talasemili vakaların hematolojik verileri.

Sıra No	Adı Soyadı	RBC $10^{12}/L$	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elektr.	HbF %	Mutasyon
109	N. H.	4.24	11.4	32.8	77.5	26.8	34.6	DD	0.4	DD
110	S. D.	4.67	11.7	39.2	73.3	25.1	34.2	DD	1.7	DD
111	C. G.	6.06	12.3	39.8	65.6	20.3	30.9	DD	1.4	D/IVSI-1
112	M. A.	6.92	14.9	43.9	63.4	21.5	33.9	DD	0.5	D/IVSI-110
113	Z. A.	7.54	14.6	48.7	64.5	19.4	30.1	DD	2.4	D/IVSI-110
114	H. A.	6.08	12.5	38.2	62.9	20.6	32.7	DD	1.5	D/IVSI-110
115	S. A.	5.34	11.1	33.9	63.4	20.8	32.9	DD	1.1	D/IVSI-110
116	M. B.	5.98	12.1	38.6	64.6	20.3	31.3	DD	1.7	D/IVSI-110
117	B. G.	4.67	8.5	28.1	60.1	18.2	30.4	EE	1.2	E/IVSI-6
118	B. D.	4.26	10.4	35.4	83.2	24.5	29.4	EF	10.0	E/IVSI-110



Anormal hemoglobinler açısından çift heterozigotluk durumunda kombinasyona göre hematolojik veriler değişmektedir. Örneğin HbSD hastalığında klinik olarak orak hücre anemisine benzemekte iken HbSE hastalarında ise klinik tablo hafif anemik olmaktadır. HbSD ve HbSE taşıyıcılarına ait hematolojik veriler **Tablo 4.8**'de gösterilmiştir.

**Tablo 4.8.** HbSD ve HbSE olguların hematolojik verileri

Sıra No	Adı Soyadı	RBC 10 <sup>12</sup> /L	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elektr.
119	A. A.	2.67	6.6	22.7	85.0	24.6	28.9	SD
120	M. Y.	5.18	11.7	37.9	73.2	27.7	31.0	SE
121	H. A.	5.34	13.4	38.9	74.9	25.1	34.4	SE
122	G. M.	5.42	13.3	41.9	77.2	24.5	31.7	SE
123	İ. K.	5.61	12.8	41.7	74.3	22.9	30.8	SE

Çukurova bölgesinde bulunan S, E, D ve C gibi anormal Hb'ler yanında ülkemizde nadir görülen 40 yakın Hb varyantı tespit edilmiştir. Bu anormal Hb'lerden bazılarında Çukurova bölgesinde de rastlanmış olup hematolojik verileri **Tablo 4.9**'da gösterilmiştir. 124 nolu olgu elektroforezde HbE/C olarak göç etmesine rağmen HPLC'de HbD olarak belirlenmiştir. Moleküler analizlerde HbE, HbC ve HbD mutasyonu tespit edilememiştir. Bu olgu dizi analizi ile HbE-Saskatoon olarak tanımlanmıştır. Prenatal tanı için başvuruda bulunan #125 nolu olgu hemoglobin elektroforezinde HbEE olarak belirlenmiştir. #124 nolu olguya benzer olarak HPLC analizinde bu olgu homozigot HbD olarak tanımlanmıştır. Bu olgunun moleküler analizleri sonucunda HbE, HbC ve HbD mutasyonu tespit edilememiştir. Dizi analizi yapılarak bu olgunun homozigot HbE-Saskatoon olduğu tespit edilmiştir. Bu allellerden birinin fetusa da geçtiği DNA dizi analizi ile gösterilmiştir.

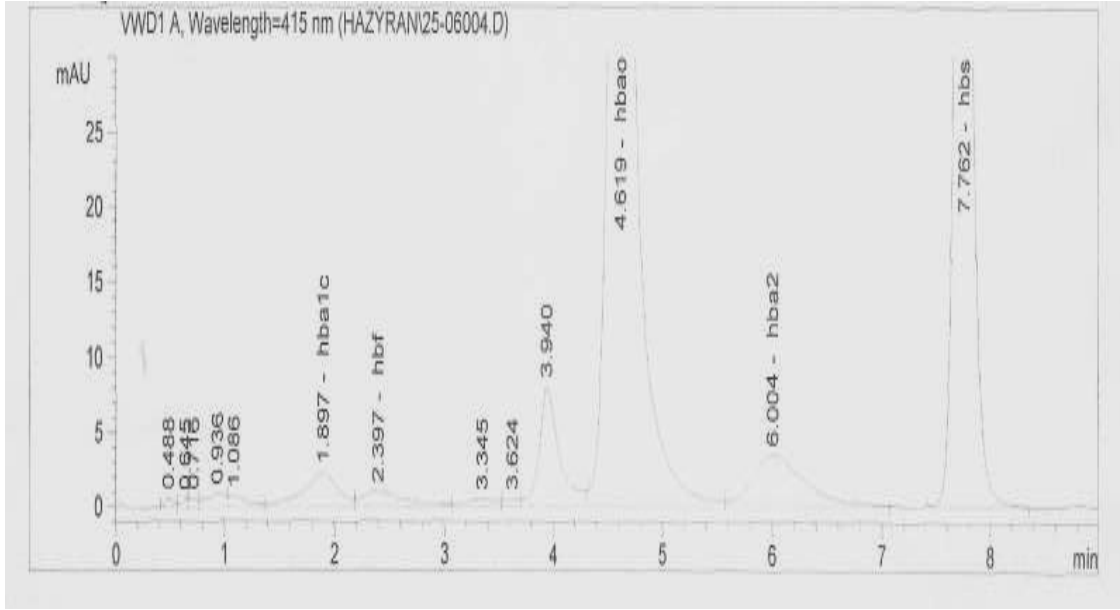
**Tablo 4.9.** HbE-Saskatoon ve HbG-Coushatta taşıyıcılarına ait hematolojik veriler.

Sıra No	Adı Soyadı	RBC 10 <sup>12</sup> /L	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH Pg	MCHC g/dL	Hb Elektr.	Mutasyon
124	A. S.	5.99	15.1	44.6	74.5	25.3	33.9	AE	AE-Saskatoon
125	S.A.	4.28	12.4	36.3	84.9	29.0	34.1	EE	EE-Saskatoon
126	T. B.	4.46	11.0	34.1	76.5	24.7	32.3	AS	AG-Coushatta
127	Z. B.	4.64	12.5	38.2	82.4	26.9	32.7	AS	AG-Coushatta

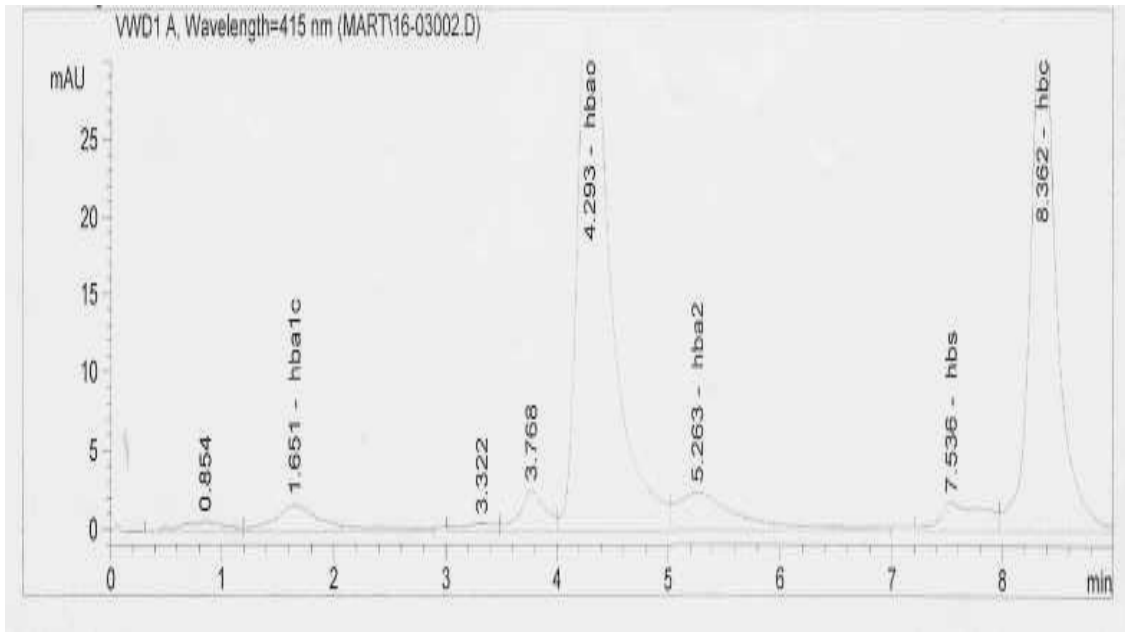
Bir diğer ailenin iki bireyi (#126 ve #127) Hb elektroforezinde HbS/D olarak belirlenmiş, HPLC analizinde ise HbE olarak tanımlanmıştır. Bu olguların ARMS ve RFLP ile moleküler analizlerinde HbS, HbD ve HbE mutasyonu tespit edilememiştir. Bu nedenle bu olguların DNA dizi analizi yapılarak HbG-Coushatta olarak tanımlanmıştır.

Bu çalışmada anormal hemoglobin taşıyan vakalar HPLC ile analiz edilmiş olup, bu anormal hemoglobine ait kromatogramlar **Şekil 4.1-4.6**'da gösterilmiştir. HPLC ile yapılan analizler 10 dk gibi kısa bir sürede analiz edilebilmektedir.

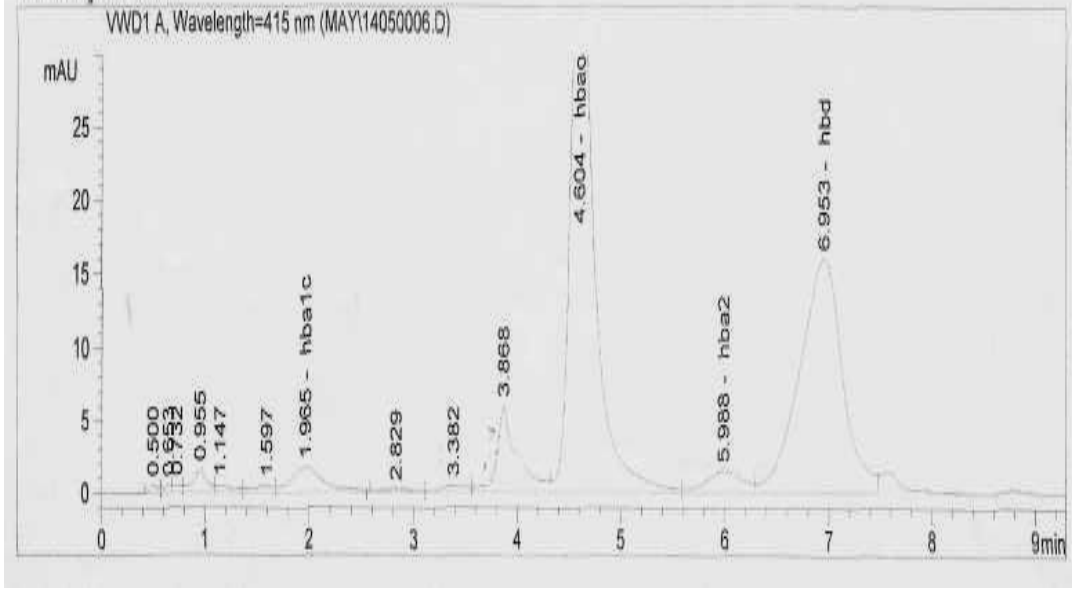
HbS taşıyan bir örnek HPLC ile zayıf katyon değiştirici bir kolon kullanılmış ve bu örneğe ait kromatogram **Şekil 4.1**'de gösterilmiştir. Bu kromatogramda olgunun Hb molekülleri ve kromatogramın X ekseninde ise kolonu terk etme süreleri görülmektedir. HbS taşıyıcısının HPLC analizinde sırasıyla HbF, HbA, HbA<sub>2</sub> ve HbS kolondan ayrılmıştır. HbC taşıyıcısının kromatogramı HbS taşıyıcısına benzemekta yalnız HbC molekülü kolonu daha geç terk etmektedir (**Şekil 4.2**). HbD molekülü HbS'ten önce kolondan ayrılmaktadır. HbD taşıyıcısına ait HPLC kromatogramı **Şekil 4.3**'te gösterilmiştir. HbE molekülü ise HbA'dan sonra HbA<sub>2</sub>'den önce kolonu terk etmektedir (**Şekil 4.4**). HPLC analizinde nadir bulunan Hb varyantları kolondan ayrılma zamanına bağlı olarak HbF, HbA, HbE, HbD, HbS veya HbC olarak tanımlanmaktadır. Örneğin HbE-Saskatoon HbD ile aynı zamanda kolondan ayrıldığından HbD olarak (**Şekil 4.5**) tanımlanırken, HbG-Coushatta ise HbE olarak (**Şekil 4.6**) tanımlanmaktadır.



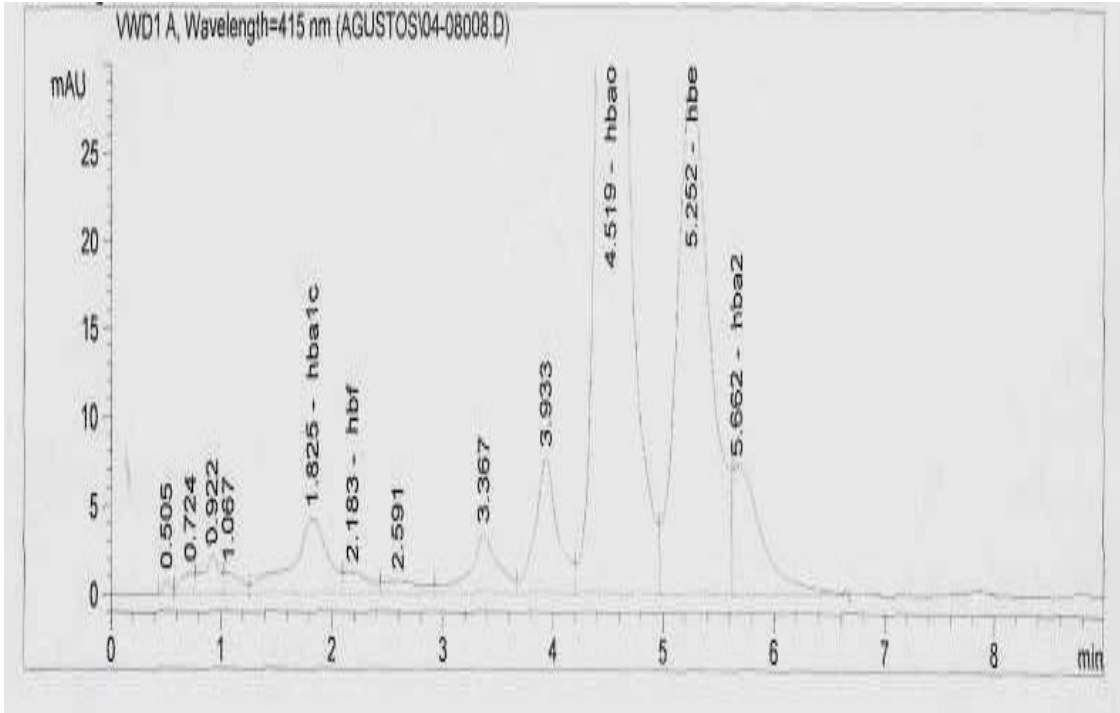
Şekil 4.1. HbS taşıyıcısının HPLC görüntüsü.



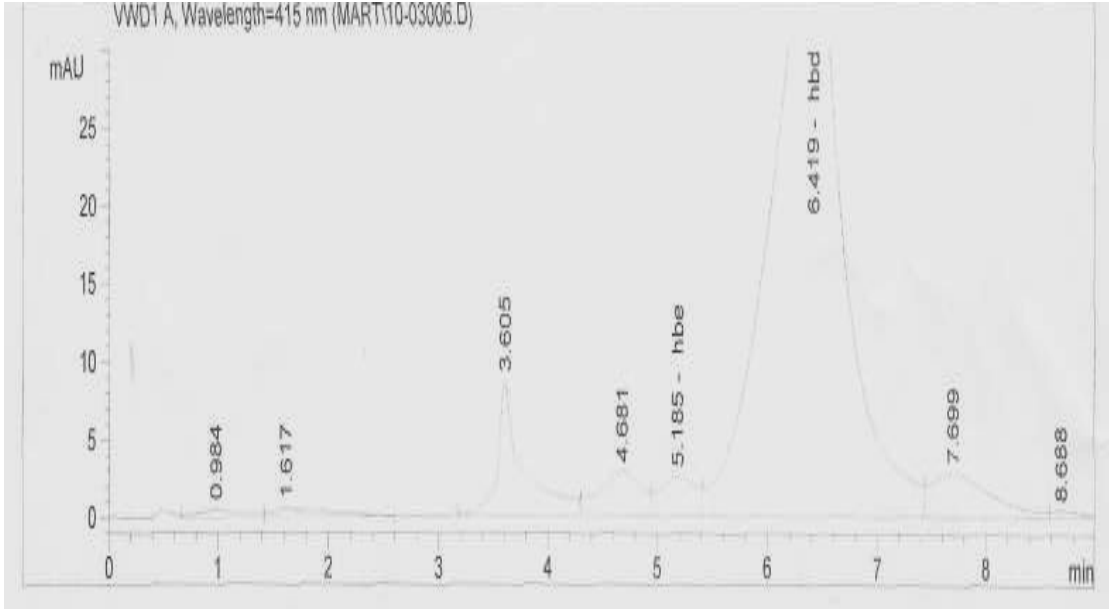
Şekil 4.2. HbC taşıyıcısının HPLC görüntüsü.



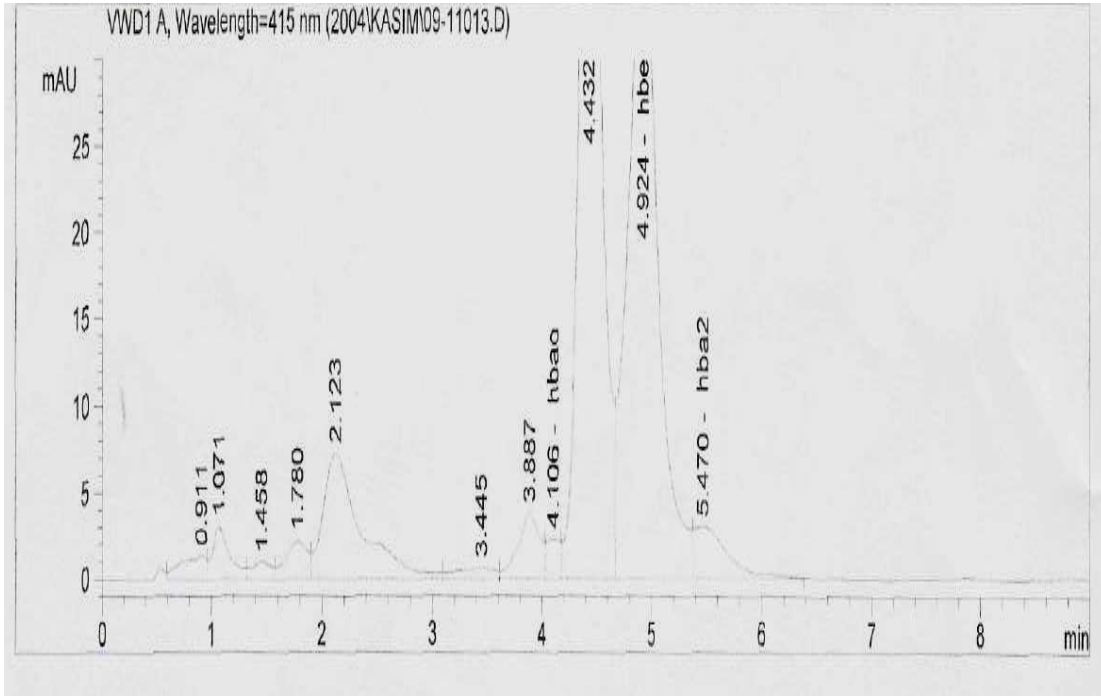
Şekil 4.3. HbD taşıyıcısının HPLC görüntüsü.



Şekil 4.4. HbE taşıyıcısının HPLC görüntüsü.

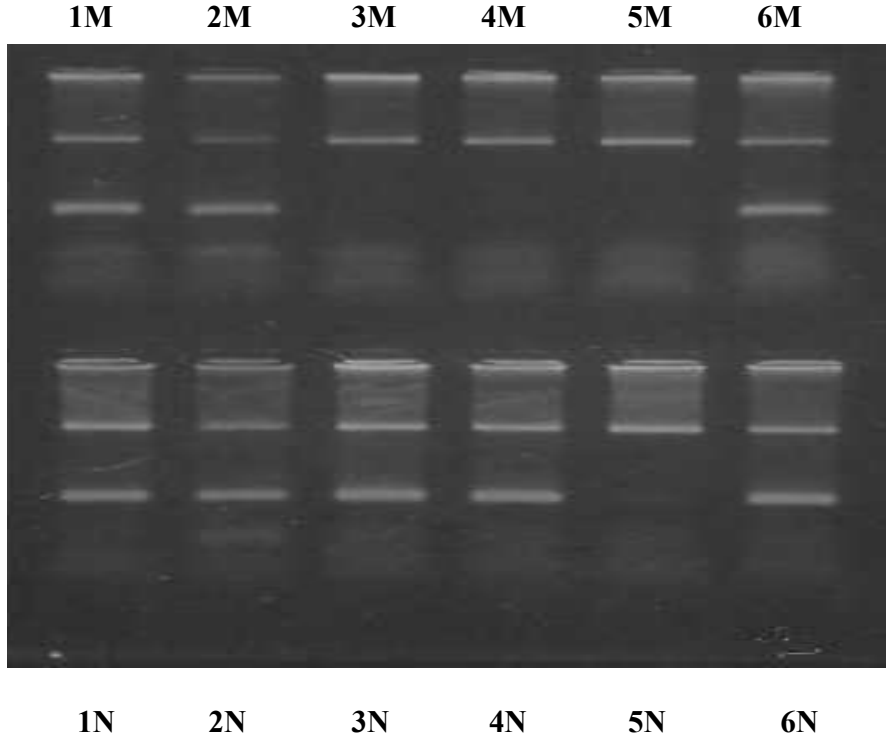


Şekil 4.5. Homozigot HbE-Saskatoon vakasının HPLC görüntüsü.



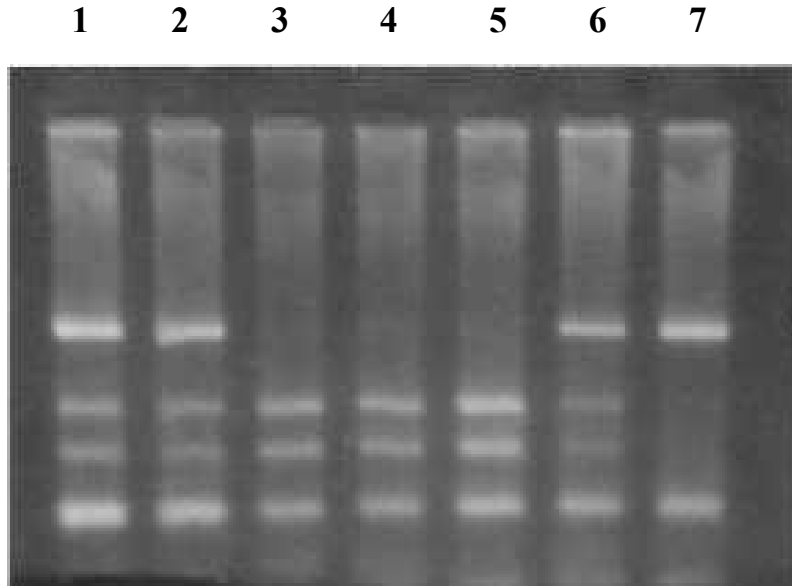
Şekil 4.6. HbG-Coushatta taşıyıcısının HPLC görüntüsü.

Prenatal tanı için gelen HbS taşıyıcısı olan #1 ve #2 nolu olgular ARMS yöntemi analiz edilmiş olup, bu ailenin sonucu **Şekil 4.7**'de gösterilmiştir. ARMS yönteminde mutasyona spesifik primerler kullanılarak tek aşamada teşhis yapılmaktadır. Her mutasyon için biri normal, diğeri mutant alleli belirlemek üzere iki PCR reaksiyonu yapılmaktadır. #1 nolu anne ve #2 nolu babada hem mutant hem de normal primer ile amplifiye olduğu için taşıyıcı olarak tespit edilmişken, CVS sadece normal primer ile amplifiye olduğundan HbAA olarak belirlenmiştir.



**Şekil 4.7.** HbS mutasyonunun ARMS ile belirlenmesi. 1 anne (#1), 2 baba (#2), 3 ve 4 CVS, 5 negatif kontrol ve 6 pozitif kontrol.

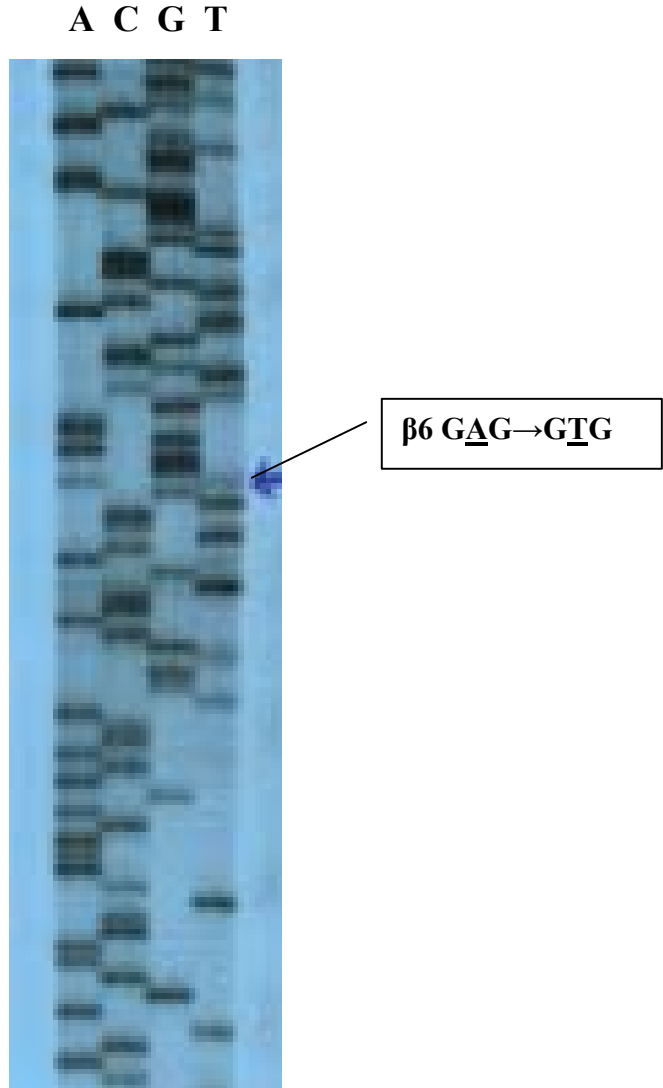
Bazı mutasyonlar PCR-RFLP yöntemi ile tanımlanabilmektedir. Altıncı kodondaki A→T değişimi sonucu meydana gelen HbS ve beşinci kodondaki çerçeve kayması (Fsc5) DdeI enziminin bu noktadaki kesim yerini yok etmektedir. 11 ve 12 nolu primerlerle amplifiye edilen normal bir örnek (HbAA) DdeI enzimi 146, 201, 88, 89, 37 ve 38 bç uzunluklarında 6 parça ürün vermektedir. Orak hücre taşıyan olgularda enzim bir allelinde kesim yerini kaybettiği için 347, 146, 201, 88, 89, 37 ve 38bç'lik 7 parça, orak hücre hastalarında ise 347, 88, 89, 37 ve 38 bç'lik 5 parça oluşmaktadır. Agaroz jelde yürütülen örnekler 88 ve 89 bç'lik parçalar ile 37 ve 38 bç'lik parçalar birbirinden ayrılmadığı için tek bant şeklinde görülmektedir. Ayırıcı tanı 347, 201 ve 146 bç'lik parçalar ile yapılmaktadır.



**Şekil 4.8.** HbS mutasyonu taşıyan allellerin RFLP yöntemi ile belirlenmesi. 1 anne, 2 baba 3 ve 4 CVS, 5 HbAA kontrol, 6 HbAS kontrol, 7 HbSS kontrol.

ARMS ve RFLP yöntemi ile mutasyonu tespit edilemeyen olgular DNA dizi analizi ile tanımlanmaktadır. HbS taşıyıcısına ( $\beta_6$ ;GAG→GTG) ait dizi analizi **Şekil 4.9**'da

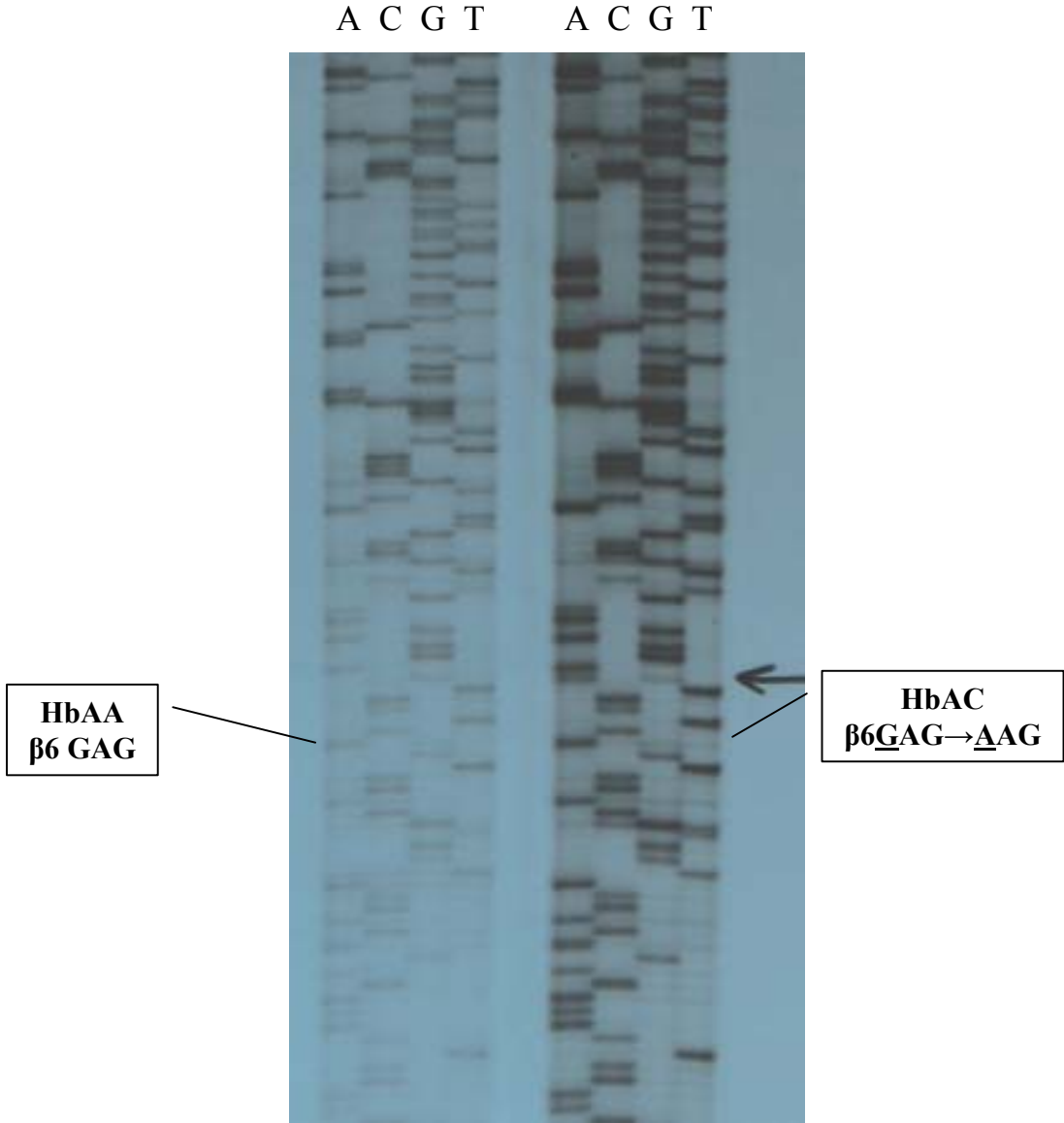
gösterilmiştir. Normal bir olguda  $\beta$  globin geninin 6. kodonunda GAG nükleotidleri bulunmaktadır. HbS taşıyıcısında ise normal allelinde GAG nükleotidi bulunurken S allelinde ise GTG nükleotidleri bulunmaktadır.



**Şekil 4.9.** HbS taşıyıcısının ( $\beta 6$ GAG $\rightarrow$ GTG) DNA dizi analizi.

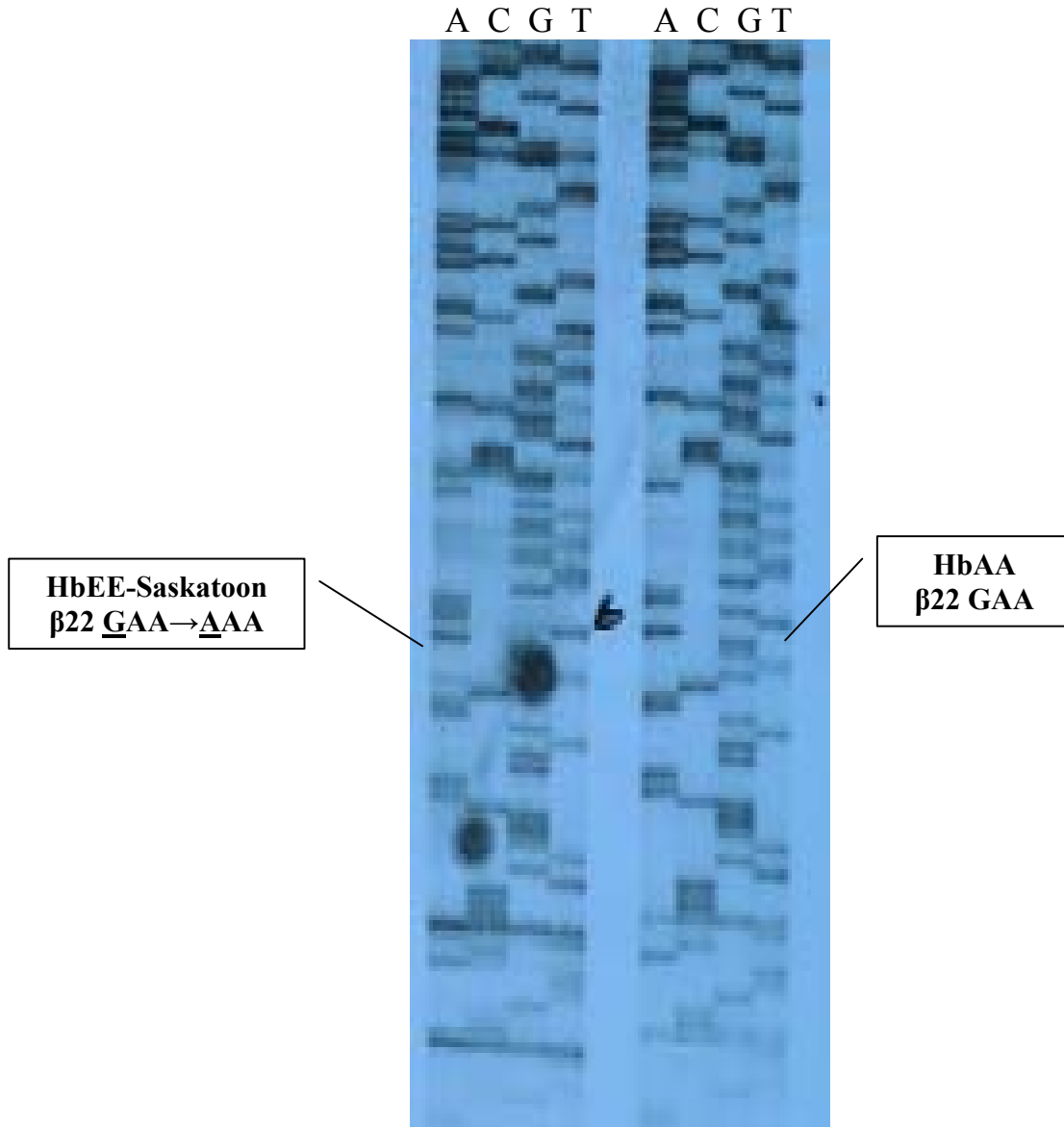


HbAA ve HbC taşıyıcısına ( $\beta 6 \text{GAG} \rightarrow \text{AAG}$ ) ait dizi analizi **Şekil 4.10**'da gösterilmiştir.



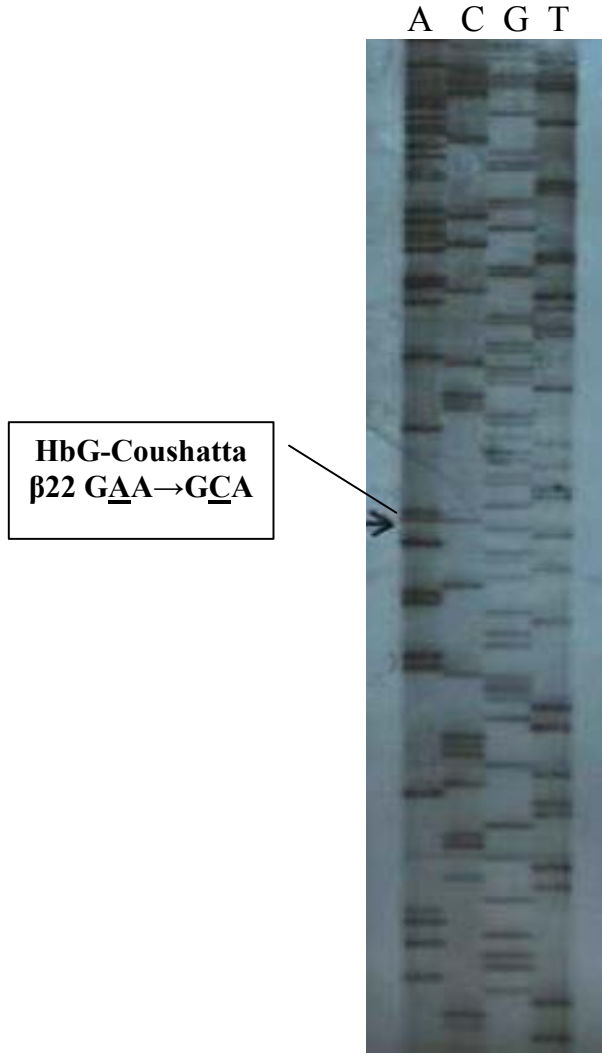
**Şekil 4.10.** Normal HbAA'lı ve HbC taşıyıcısı ( $\beta 6 \text{GAG} \rightarrow \text{AAG}$ ) olgularına ait DNA dizi analizi.

Normal HbAA'lı olguda görüldüğü gibi 22. kodonda GAA nükleotid sıraları görülmekte, aynı pozisyonda homozigot HbE-Saskatoon olgusunda AAA nükleotid sıraları görülmektedir (Şekil 4.11).



Şekil 4.11. Homozigot HbE-Saskatoon ( $\beta 22 \underline{G}AA \rightarrow \underline{A}AA$ ) ve normal bir olgunun DNA dizi analizi.

HbG-Coushatta taşıyıcısına ( $\beta 22G\underline{A}A \rightarrow G\underline{C}A$ ) ait DNA dizi analizi **Şekil 4.12**'de gösterilmiştir.



**Şekil 4.12.** HbG-Coushatta taşıyıcısının ( $\beta 22G\underline{A}A \rightarrow G\underline{C}A$ ) DNA dizi analizi.

## 5. TARTIŞMA

Hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki aminoasit değişikliği sonucu Hb varyantları meydana gelmektedir<sup>2</sup>. Dünyada bugüne kadar 925 Hb varyantı tanımlanmıştır<sup>3</sup>. Bu Hb varyantlarının bir çoğunun fonksiyonu normal olup, klinik bir septom göstermemektedir. Bu varyantlardan bazıları yapısal özelliklerine bağlı olarak polimerleşme (HbS), kristallenme (HbC) veya dayanıksız olmaları nedeniyle hemolitik anemiye neden olmaktadır<sup>1</sup>. Anormal hemoglobinler; yapısal özelliklerine göre bir veya iki aminoasit değişimi, aminoasit eklenmesi veya çıkarılması yada iki farklı polipeptidin birleşmesiyle meydana gelen (hibrit) zincirlerdir<sup>2</sup>.

Hemoglobinopatiler dünyadaki en yaygın tek gen hastalıkları olup önemli morbititiye neden olurlar. Dünya sağlık örgütü (WHO) dünya nüfusunun yaklaşık %5'inde klinik olarak önemli hemoglobin hastalıklarına neden olan genleri taşıdığı bildirmiştir<sup>9,11</sup>. Anormal hemoglobinlerin dünyadaki dağılımı coğrafi bölgelere ve etnik gruplara göre değişmektedir. Milyonlarca insanın etkilendiği anormal hemoglobinlerden en yaygın olanları sırasıyla HbS, HbE, HbD ve HbC'dir<sup>1</sup>.

Orak hücre anemisine neden olan HbS, 1949 yılında Pauling ve ark. tarafından keşfedilmiştir. Özellikle Afrika'da (ekvator) ve bu bölgeden göç eden siyahların yaşadığı ülkelerde, Suudi Arabistan ve Hindistan bazı eyaletlerinde, daha az olmak üzere Akdeniz ülkelerinde görülmektedir<sup>9,11</sup>.

Ülkemizde HbS'in varlığı ilk kez 1950'li yıllarda Aksoy ve ark. tarafından rapor edilmiştir. Bunu takiben ülkemizde bulunan HbE, HbC, HbO-Arab homozigot ve heterozigot olarak, HbS ile çift heterozigotluk veya beta talasemi ile kombinasyonu aynı yazar tarafından rapor edilmiştir. Ülkemizde son 40 yıl boyunca anormal hemoglobinler ve beta talasemi taramaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar sonucunda HbS'i takiben HbD-Los Angeles, HbE ve HbO-Arab gibi bir çok anormal hemoglobin tespit edilmiştir<sup>4</sup>.

Türkiye'nin güneyinde yer alan Çukurova bölgesinde HbS taşıyıcılığı %8.2, beta talasemi taşıyıcı sıklığı %3.9 olarak belirlenmiştir. HbS taşıyıcılığı bazı yörelerde %44'e kadar ulaşmaktadır<sup>5,7,41</sup>. Orak hücre taşıyıcıları hipoksi gibi ekstrem koşullarda oluşan intravasküler sikling dışında herhangi bir anormal klinik bulgu gözlenmemektedir<sup>9,11,14</sup>.

Ülkemizde en çok tespit edilen ikinci anormal hemoglobin, HbD-Los Angeles olup görülme sıklığı %0.2 olarak tespit edilmiştir<sup>42,43</sup>. HbD taşıyıcıları ve homozigotları genellikle asemptomiktir. Bu olguların Hb düzeyleri normal veya hafif düşüktür<sup>11,14</sup>. Bununla birlikte HbS ve HbD'nin çift heterozigotluk durumunda hastalık ağır seyretmektedir. Klinik ve hematolojik olarak homozigot HbS'li bireylerden ayırt edilememektedir<sup>44</sup>.

HbE ülkemizde üçüncü sıklıkta gözlenen anormal hemoglobindir. HbE'de mutasyon kodlanan bölgede olmasına rağmen,  $\beta^E$  globin RNA'nın normal spicingde azalma izlenir ve bu nedenle hafif talasemi gözlenir. HbE taşıyıcıları klinik olarak herhangi bir anormal bulgu göstermemektedir. Bu olguların Hb düzeyleri normal, eritrositler hafif hipokrom ve mikrositerdir. Benzer şekilde HbE homozigot olguları asemptomatik olup heterozigot  $\beta$  talasemi olgularına benzemektedir. HbE ve beta talasemi birlikteliğinde klinik olarak  $\beta$  talaseminin hafif formu olan intermedia ile homozigot  $\beta$  talasemi arasında değişiklik göstermektedir<sup>4,9,11,14</sup>.

Eti Türklerinde HbE'nin taşıyıcı sıklığı %0.16-2.4 olarak tespit edilmiştir<sup>4</sup>. HbE'nin yanında Antalya, Aksaray ve Kayseri'de akraba olmayan üç ailede HbE-Saskatoon tespit edilmiştir. HbE-Saskatoon ilk kez Kayseri'de akut lösemili bir hastada tespit edilmiştir<sup>45</sup>. Tespit edilen bu olguların biri homozigot HbE-Saskatoon olarak tespit edilmiştir. HbE'li olgularda Hb yüzdesi HbE-Saskatoon olgularından daha az olarak tespit edilmektedir. Ayrıca HbE'li olgular mikrositer ve hipokrom özelliği göstermektedir. Bu özelliklerinden dolayı bu iki varyant kolaylıkla birbirinden ayırt edilebilmektedir<sup>4,46,47</sup>.

HbC HbA'dan daha az çözüldüğünden kırmızı hücrelerde kristalize olmaya eğimlidir. HbC taşıyıcıları anormal bir klinik bulgu göstermemektedir. Homozigot HbC olgularında hafif hemolitik anemi ile birlikte splenomegali gözlenmektedir<sup>11,14</sup>.

Orak hücre anemisi klinik olarak, ciddi hemolitik hastalık tablosu ile seyredir. Bu klinik tablo, alyuvarların deformabilite özelliğinin kaybolması ve yıkılması yanı sıra; oraklaşan alyuvarların oluşturduğu tıkanıklıklar sonucu oluşan iskemik değişikliklerle karakterizedir. Bu klinik tablolar, "kriz" denilen ara sıra oluşan ataklarla seyredir. Hastalarda anemi doğumdan birkaç ay sonra başlar. Bu hastalarında HbF değerlerinin %1-2 ile 30 arasında değiştiği görülmüştür<sup>11,12,14</sup>.

Yöremizde beta talasemi taşıyıcılığı yüksek oranda (%3.9) görülmektedir<sup>5,7</sup>. Bazı hastaların HbS ile beta talasemi allelini birlikte taşıdığı görülmektedir. Klinik olarak HbS-beta talasemi taşıyıcılığı ağır seyreder<sup>11,12,14</sup>.

HbS alkali pH elektroforezinde HbD ile aynı yer göç etmektedir. Moleküler analizler yapılmadan önce HbS/D ayırımı oraklaşma testi, IEF, HPLC gibi tekniklerle birbirinden ayırılarak vakanın çözümü kolaylaşmaktadır. HPLC ile ayırımı yapılması yanında anormal hemoglobinin miktarının ölçülmesi açısından kolaylık sağlamaktadır<sup>18</sup>. HbS taşıyıcısına ait HPLC kromatogramı **Şekil 4.1**'de gösterilmiştir.

Hb elektroforezinde S/D olarak tespit edilen vakaların oraklaşma testi de pozitif ise ARMS ve RFLP yöntemleri ile HbS mutasyonunu taşıyıp taşımadıkları doğrulanmaktadır. HbS taşıyıcısı olan #16 ve #17 numaralı iki olgunun ARMS yöntemi ile prenatal tanı sonucu **Şekil 4.7**'de gösterilmiştir. Anne (1) ve baba (2) hem HbS mutant primeri hem de normal primer ile amplifiye olduğundan HbS taşıyıcısıdırlar. CVS ise (3 ve 4) sadece normal primerle amplifiye olduğundan HbAA olarak teşhis edilmiştir. Aynı aile RFLP ile analiz sonucu **Şekil 4.8**'de gösterilmiştir. Anne (1) ve baba (2) orak hücre taşıyıcısı ve CVS (3 ve 4) ise normal HbAA olduğu RFLP ile doğrulanmıştır. **Şekil 4.9**'da ise HbS taşıyan bir olgunun DNA dizi analizi gösterilmiştir. HbS taşıyıcı olgularında beta globin genin 6. kodonun GAG nükleotid dizisinde Adenin (A) karşısında Timin (T) bulunmaktadır.

Yöremizde tespit edilmiş HbD taşıyıcılarına ait hematolojik veriler **Tablo 4.2**'de verilmiştir. HbD taşıyıcılarından #27, #30 ve #42 numaralı vakalarda Hb değeri düşük bulunmuştur. Oraklaşma testi negatif çıkan bu olguların HPLC ile analizlerinde de HbD olarak tanımlanmaktadır (**Şekil 4.3**). HPLC'de HbD, HbS'ten sonra kolondan ayrılmaktadır. Bu olgular moleküler analizler ile de HbD mutasyonunu taşıdıkları doğrulanmaktadır.

Bölgemizde tespit edilen HbE vakalarının bir kısmı **Tablo 4.3**'te gösterilmiştir. Bu olgulardan #44, #46, #57 ve #59'un MCV değeri normal diğerleri düşük bulunmuştur. Başka araştırmacılar tarafından MCV değerinin 84 fL olmasına rağmen hastada talasemik eritrosit morfolojisi tespit edilmiştir<sup>48</sup>.

HbE, alkali pH elektroforezinde HbA<sub>2</sub> ile aynı yere göç etmektedir. Benzer şekilde HbC'de aynı yere göç etmektedir. HbE/C ayırımı asit pH'ta agar jel elektroforezi, HPLC veya IEF gibi yöntemlerle yapılabilmektedir<sup>18</sup>. Bir HbE olgusuna ait HPLC kromatogramı **Şekil 4.4**'te gösterilmiştir. HbE, HbA ve HbA<sub>2</sub>'nin kolonu terk etme süreleri arasında ayrılmaktadır. Elektroforezde HbE/C olarak tespit edilen olguların analizleri ARMS ile yapılarak ayırımı yapılmaktadır.

Bu yörede nadir HbC taşıyıcılığı tespit edilmiştir. HbC taşıyıcısı olarak tespit edilen bireylerde MCV değerleri hafif düşük ama Hb değerleri normal değerlerde bulunmuştur. HbC taşıyıcılarına ait hematolojik veriler **Tablo 4.4**'te gösterilmiştir. Bu varyantın HPLC analizinde kolonu en son terk etmektedir. HbC taşıyıcısı olan #67 numaralı olgunun HPLC kromatogramı **Şekil 4.2**'de gösterilmiştir. Bu olgunun DNA dizi analizi **Şekil 4.10**'da gösterilmiştir.

Çukurova bölgesinde HbS taşıyıcı sıklığının yüksek olmasından dolayı orak hücre anemili hastaların sayısı da fazladır. Orak hücre anemili hastalara ait hematolojik veriler **Tablo 4.5**'te gösterilmiştir. Elektroforezde HbF bandı belirgin olan orak hücre anemili hastaların elektroforez sonuçları HbSS(F) şeklinde gösterilmiştir ve bu olguların HbF miktarı alkali denatürasyonla ölçülmüştür. Elektroforezde HbF bandı yoksa, alkali denatürasyon testi ile de HbF miktarı düşük bulunmuştur ve bu olguların elektroforez sonuçları HbSS şeklinde gösterilmiştir. Bu olguların moleküler analizleri ARMS ve RFLP ile yapılmıştır.

Yöremizde HbS taşıyıcılığı ile beta talasemi taşıyıcılığı insidansının yüksek olmasından dolayı HbS-beta talasemi kombinasyonu bulunmaktadır. Bu olgular Hb elektroforezinde HbSS moleküler analizlerde (ARMS, RFLP) ise HbS taşıyıcısı oldukları tespit edilmiştir. Bu nedenle beta talasemi mutasyon taramasına da gereksinim duyulmuştur. HbS ile birlikte beta talasemi taşıyıcılarına ait hematolojik veriler **Tablo 4.6** gösterilmiştir. HbS hastalarında olduğu gibi HbF düzeyleri farklılık göstermektedir.

Yöremizde iki vakada homozigot HbD tespit edilmiştir. Bu vakalarda Hb ve MCV değerleri düşük bulunmuştur. Ayrıca HbD-beta talasemi taşıyıcılığı ile HbE-beta talasemi taşıyıcılığı da tespit edilmiştir. **Tablo 4.7**'de bu olgulara ait hematolojik veriler gösterilmiştir. Ülkemizde bir hastada tespit edilen HbD/IVSI-110 olgusunda da Hb değeri

yüksek ve olgunun eritrositozisi bulunmuştur<sup>49</sup>. HbS-beta talasemi taşıyıcılığında olduğu gibi bu vakalar elektroforezde homozigot, moleküler analizlerde ise heterozigot olarak tespit edilmiştir. Bu nedenle bu olgularda beta talasemi mutasyonları taranmıştır. HbD-beta talasemi taşıyıcılarının MCV ve MCH değerleri homozigot HbD olgularından daha düşük bulunmuştur.

Anormal hemoglobinler açısından çift heterozigotluk durumunda hematolojik veriler değişmektedir. Örneğin HbSD hastalığı klinik tablo orak hücre anemisine benzemekte<sup>44</sup> iken HbSE hastalarında bu tablo hafif anemik olmaktadır<sup>11,14</sup>. HbSD ve HbSE taşıyıcılarına ait hematolojik veriler **Tablo 4.8**'da gösterilmiştir.

Çukurova bölgesinde bulunan S, E, D ve C gibi anormal Hb'ler yanında ülkemizde de nadir görülen Hb varyantları tespit edilmiştir. Tespit edilen bu anormal hemoglobinlerin çoğu heterozigot olarak bulunduğundan genellikle asemptomatik olmakta ve tesadüfen tarama çalışmaları ile tanımlanabilmektedir. Ancak anormal hemoglobin homozigot halde bulunursa veya beta talasemi ile kombine olursa klinik belirti verebilir<sup>10</sup>.

Yöremizde yaygın olarak bulunan anormal hemoglobinler dışında tespit edilen HbE-Saskatoon taşıyıcısı, homozigot HbE-Saskatoon ve HbG Coughatta'ya ait hematolojik veriler **Tablo 4.9**'da gösterilmiştir. #124 numaralı olgu elektroforezde E/C olarak tespit edilmişken HPLC ile analizi sonucunda HbD olarak tanımlanmıştır. Bu olgunun ARMS ve RFLP ile yapılan moleküler analizleri sonucunda HbE, HbC ve HbD mutasyonunu taşımadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle bu olgunun dizi analizi yapılmış ve dizi analizi sonucunda HbE-Saskatoon taşıyıcısı olarak tanımlanmıştır.

Prenatal tanı için başvuruda bulunan bir anne (#125) elektroforezde homozigot HbE olarak tespit edilmiştir. Rutin hematolojik ve klinik taramada herhangi bir anormalliği bulunmamaktadır. Ülkemizde tanımlanan homozigot HbE-Saskatoon verileri ile uyumlu olduğu bulunmuştur<sup>46</sup>. Bu olgu HPLC analizinde HbD olarak tanımlanmış (**Şekil 4.5**), moleküler analizlerinde HbE, HbC ve HbD mutasyonu bulunamamıştır. Dolayısıyla dizi analizinde bu olgu homozigot HbE-Saskatoon olarak tanımlanmıştır (**Şekil 4.11**).

İki kardeşin (#126 ve #127) alkali pH'ta yapılan elektroforez sonucunda HbS ve HbD gibi göç ettiği belirlenmiştir. Bu iki olgunun HPLC analizinde ise HbE olarak tespit edilmiştir (**Şekil 4.6**). Bu iki olgunun ARMS ve RFLP ile yapılan moleküler analizlerinde



HbE, HbC ve HbD mutasyonunu taşımadıkları belirlenmiştir. Bu nedenle DNA dizi analizi yapılan bu olguların HbG-Coushatta olduğu tespit edilmiştir (**Şekil 4.12**). HbG-Coushatta ülkemizde ilk önce Kastamonu ilinde daha sonraları Denizli ve Nazilli’de tespit edilmiştir<sup>50,51,52</sup>.

## 6. SONUÇ

Biyokimya Anabilim Dalı'na tarama merkezlerinden anormal hemoglobin taşıdığı tespit edilerek prenatal tanı için gönderilen olgular değerlendirilmiştir. Bu yörede taşıyıcı sıklığı yüksek olan HbS, HbD ve HbE varyantları ile beta talasemi mutasyonları ARMS ve RFLP analizleri ile kolaylıkla tanımlanmaktadır.

HbS hariç diğer anormal hemoglobinler ülkemizde nadir gözlenmektedir. Bu anormal hemoglobinlerin homozigot durumları dahi herhangi bir sağlık sorununa neden olmamaktadır. Beta talasemi majör, orak hücre hastalığı ve orak hücre/beta talasemi ise önemli sağlık sorunlarına neden olmaktadır. İlerleyen teknolojik gelişimlere rağmen kalıtsal hastalıkların tedavisi hala mümkün değildir. Bununla birlikte ancak doğum öncesi tanı ile hasta çocukların doğması önlenmektedir.

Prenatal tanıda HPLC veya elektroforez ile belirlenen vakalar DNA analizi ile teyit edilmesi gerekmektedir. HbS, D ve E gibi Hb varyantları ARMS gibi yöntemlerle tanımlanabilirken, nadir görülen varyantlar için DNA dizi analizinden faydalanılmaktadır.

## KAYNAKLAR

1. **Lukens J N.** The abnormal hemoglobins: General principles. In: Lee G R, Foerster J, Lukens J, Poraskev F, Greer J, Rodgers G M. Eds. Wintrobe's Clinical Hematology, 10th ed., Eygp: Mass Publishing Co., **1999**; 1329-1343.
2. **Huisman T H J, Carver M F H and Efremov G D.** Syllabus of Human Hemoglobin Variants. Augusta: The Sickle Cell Anemia Foundation, **1996**.
3. **<http://globin.csu.edu>.** Erişim Tarihi: 22/08/2005
4. **Altay .** Anormal Hemoglobins in Turkey. *TJH*, **2002**;19 (1): 63-74.
5. **Yüregir G T, Arpacı A, Aksoy K, Dikmen N, Özgönen T, Kılınç Y.** Population at risk for hemoglobinopathies in ukurova. Türkiye: Need for prenatal diagnosis. *Ann Med Sci*, **1995**; 4: 61-69.
6. **Gonzales-Redondo J M, Kutlar F, Kutlar A, Stroming T A, Pablos J M, Kılınç Y, Huisman T H J.** HbS (C)  $\beta$ -thalassemia: different mutations are associated with different leves of normal HbA. *Brit J Haematol*, **1988**; 70: 85-89.
7. **Yüregir G T, Donma O, Dikmen N, İspir T and ınar M.** Population studies of hemoglobin S and other variants in ukurova. The Southern Part of Turkey. *Acta Haematol*, **1987**; 50:757-765.
8. **Atilla G, ürük M A, Arpacı A, Özgünen F T, Kılınç Y, Aksoy K and Yüregir G T.** Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Southern Turkey. *Ann Med Sci*, **1999**;8: 93-97.
9. **Thompson M, Mcinnes R R, Willard H F.** Genetics in Medicine. 5<sup>th</sup> ed., Philadelphia: B. Saunders Comp., **1991**: 247-270.
10. **Gürgey A.** Talasemi ve hemoglobinopatilerde yeni görüşler. TUBİTAK Yayınları No:628, Ankara, **1986**.
11. **Weatherall D J, Clegg J B, Higgs D R and Wood W G.** The Hemoglobinopathies. **Scriver C R, Beudet A L, Sly W S, Valle D.** The Metabolic and Molecular Bases of Inherrited Disease, Volume III. Eighth edition, U.S.A: International Edition, **2001**: 4571-4627.

12. **Nagel R L.** Disorder of Hemoglobin Function and Stability. **Handin R I, Lux S E and Stossel T P.** Blood: Principles and Practice of Hematology. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, **2003**: 1597-1654.
13. **Şişli N.** Vücut Proteinleri ve Fonksiyonları. **Onat T, Emerk K, Sözmen e Y.** İnsan biyokimyası. Ankara: Palme yayıncılık, **2002**: 135-144.
14. **Weatherall D J and Clegg J B.** The Thalassaemia Syndromes. 4<sup>th</sup>.Ed., Blackwell science, **2001**:64-120.
15. **Stamatoyannopoulos G and Grosveld F.** Hemoglobin Switching. **Stamatoyannopoulos G, Majerus P W, Perlmutter R M and Varmus H.** The Molecular Basis of Blood Diseases. Third edition, Philadelphia: W.B Saunders Company, **2001**: 135-182.
16. **Weatherall D J.** The New Genetics and Clinical Practice. 3<sup>nd</sup> ed., New York: Oxford University Press, **1991**.
17. **Bunn H F, Forget B G.** Hemoglobin; Molecular Genetic and Clinical Aspects. Philadelphia W.B. Saunders Comp., **1986**: 60-90.
18. **Huisman T H J, Jonxis J H P.** The hemoglobinopathies, Techniques of Identification. New York: Marcel Dekker Inc, **1977**.
19. **Çürük M A, Dimovski A J, Baysal E, Gu L H, Kutlar F, Molchanova T P, Webber B B, Altay Ç, Gürgey A, Huisman T H.** Hb Adana or alpha 2 (59) (E8) Gly→Asp beta 2, a severely unstable alpha 1-globin variant, observed in combination with the-(alpha) 20.5 Kb alpha-thal-1 deletion in two Turkish patients. Am J Hematol **1993**;44:270-275.
20. **Aksoy M, Erdem Ş, Efremov G D, Wilson J B, Huisman T H J, Schroeder J R, Shelton J B, İlitin O N and Müftüoğlu A.** Hemoglobin İstanbul: Substitution of Glutamine for Histidine in a Proximal Histidine (F8(92)β). The Journal of Clinical Investigation, **1972**; 51: 1380-1387.
21. **Akar E, Tunç Ş, Arcasoy A, Öztürk A, Akar N.** Further observation of Hemoglobin Beograd (β121Glu→Val) in Turkish population. Turk J Haematol, **2004**; 21(3): 149-151.
22. **Kohn J.** Separation of hemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Pathol*, **1969**; 22: 109-110.
23. **Çürük M.** Anormal Hemoglobinler ve Talasemiler. Ç.Ü. Basımevi; **2005**.
24. **Huisman T H J, Schroeder W A, Brodie A N, Mayson M, Jakway J.** Microchromatography of hemoglobin. III. A simplified procedure for determination of hemoglobin A<sub>2</sub>. J Lab Clin Med, **1975**: 86; 700-702.

25. **Singer K, Chernoff AA, Singer L.** Studies on abnormal hemoglobins. Alkali denaturation. *Blood*, **1951**; 6: 413-423.
26. **Poncz M, Solowiejzk D, Harpel B, Mory Y, Schwartz E, Surrey S.** Construction of human gene library from small amounts of peripheral blood. Analysis of  $\beta$ -like globin genes. *Hemoglobin*, **1982**; (6), 27-36.
27. **Huisman T H J.** High Performance Liquid Chromatography as a method to identify Haemoglobin abnormalities. *Acta Haemat*, **1987**; 78-123
28. **Focharoen S, Winichagoon P, Wisedpanichkij, Sae-Ngow B, Spriphanich R, Oncoung W, Muangsapaya W, Chowthaworn J, Kanokpongsakdi S, Bunyaratvej A, Piankijagum A and Dewaele C.** Prenatal and Postnatal diagnoses of thalassemias and hemoglobinopathies by HPLC. *Clinical Chemistry*, **1998**; 44 (4): 740-748.
29. **Clarke G M and Higgins T N.** Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Revies and Update. *Clinical Chemistry*, **2000**; 46 (8B): 1284-1290.
30. **Riou J, Godart C, Hurtrel D, Mathis M, Bimet C, Bardakjian-Michau J, Prehu C, Wajcman H and Galacteros F.** Cation-exchange HPLC evaluated for presumptive identification of hemoglobin variants. *Clinical Chemistry*, **1997**; 43 (1): 34-39.
31. **Chapman C S.** Neonatal screening for haemoglobinopathies. *Clin Lab Haem*, **1996**; 21: 229-234.
32. **Kayrın L, Aksoy K, Tuli A, Çürük M A, Attila G.** *Tanıda DNA teknikleri*. Adana: 6.Biyokimya Yaz Okulu, **2003**.
33. **Erlich H A.** PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, **1989**.
34. **Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J.** PCR Protocols: A Guide to methods and Applications, Acedemic Press Inc., San Diego, Calofornia, **1990**.
35. **White B A.** PCR Protocols: Current Methods and Applications for DNA Amplification, Humana Press, Totowa New Jersey, **1993**.
36. **Newton C R, Graham A, Heptinstall L E, Powell S J, Summers C, Kalssheker N, Smith J C, Markham A F.** Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res*, **1989**; 17:2503-2516.

37. **Tanrıverdi K.** Çukurova bölgesinde beta talasemi mutasyonları, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, **1993**.
38. **Çürük M A, Aksoy K, Arpacı A, Kılınç Y ve Yüreğir G T.** “Orak hücre anemisinin DNA gen amplifikasyonu ve restriksiyon endonükleaz analizi ile saptanması”. Ç. Ü. Tıp Fak. Der. **18**, 55-58 (1993).
39. **Çürük M A.** Azerbaycan Türklerinde Beta Talasemi'nin DNA ve Globin Zincir Analizi ile Belirlenmesi Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana, **1994**.
40. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA, **1977**; 5463-5467.
41. **Çürük M A, Attila G, Tuli A, Arpacı A, Evrücke C, Özgünen F T, Kılınç Y, Aksoy K, Yüreğir G T.** Çukurova bölgesinde orak hücre anemisi ve beta talasemi sıklığı; 537 prenatal sonucu. 1st International Summerschool on thalassemia. Antalya-TURKEY, 22-26 April **2000**: 133-134.
42. **Yüreğir G T, Kılınç M, Ekerbiçer H, Bilaloğlu N ve Tekin N.** Screening of Hemoglobinopathies in Kahramanmaraş, TURKEY. Turk J Haematol, **2001**; 18 (2): 79-83.
43. **Canatan D, Arcasoy A, Bor S, Yeşil N.** Screening of abnormal hemoglobins and high HbA2 beta-thalassemia in Elbistan area. Doğa Tr J Med Sci, **1990**;14: 555-561.
44. **Fodor F H and Eng C M.** Molecular Exclusion of Hemoglobin SD disease by Prenatal Diagnosis. Prenat. Diagnn., **1999**; 19: 58-60.
45. **Prozorova V, Özsoylu S, Aksoy M, Headlee M G, Lam H, Wilson J B, Altay Ç, Huisman T H J.** HbE and HbE-Like Variants in Individuals from Turkey. Hemoglobin, **1981**; 5 (7&8): 743-748.
46. **Birden E, Öner R, Öner C, Gümrük F, Gürgey A, Altay Ç.** Homozygosity for HbE Saskatoon [beta22 (B4) Glu→Lys] in a Turkish patient. Hemoglobin, **2001**; 25: 409-415.
47. **Gurgey A, Sipahioğlu M, Aksoy M.** Compound heterozygosity for HbE-Saskatoon or  $\alpha_2\beta_2$ 22 (B4) Glu→Lys and  $\beta$ -Thalassemia Type IVSI-6 (T→C). Hemoglobin, **1990**; 14 (4): 449-451.
48. **Benz E J, Berman B W, Tonkonow B L, Courpal E, Coates T, Boxer L A, Altman A and Adams J G.** Molecular Analysis of the  $\beta$ -Thalassemia Phenotype Associated with Inheritance of Hemoglobin E ( $\alpha_2\beta_2$ <sup>26</sup>Glu→Lys). J Clin Invest, **1981**; 68: 118-126.
49. **Canatan D, Akar N, Acasoy A.** HbD Los Angels/B IVSI-110 (G→A) combination in a Turkish woman. Doğa Tr J of Medical Sciences, **1992**; 16: 585-586.

50. **Dinçol G, Dinçol K, Erdem Ş.** Hb G-Coushatta or ( $\alpha_2\beta_2$  22(B4) GLU-ALA) in a Turkish male. Hemoglobin, **1989**; 13: 75-77.
51. **Sözmen M, Uysal Z, Akar N.** Hb G-Coushatta ( $\alpha_2\beta_2$  22(B4) GLU-ALA) in a Turkish Family. Tr J Med Science, **1990**; 14: 512.
52. **Yenice Ş, Kemahlı S, Bilenoğlu O.** Two Rare Hemoglobin Variants in the Turkish Population [Hb G-Coushatta (B 22 (B4) GLU-ALA and Hb J Iran (B 77 (EF1) HIS-ASP)]. Turk J Haematol, **2000**;17 (1): 27-28.

## 7. ÖZGEÇMİŞ

Ahmet GENÇ 1979 yılında Hatay ilinin Antakya ilçesinde dünyaya geldi. Serinyol Beldesinin Serinyol Lisesi'nden 1996 yılında mezun olduktan sonra, 1997 yılında Muğla Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde okumaya hak kazandı. 1999 yılında Çukurova Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'ne yatay geçiş yaparak 2002 yılında adı geçen üniversiteden mezun oldu. 2003-2004 öğretim yılında Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans programına kayıt oldu. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans eğitimini 2005 yılında "Hemoglobin Varyantlarının DNA Dizi Analizi ile Belirlenmesi" adlı tezi bitirdi.