

156852

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

**ANAMUR BÖLGESİNİN
GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİM
YAPISI VE MOLEKÜLER ÖZELLİĞİ**

Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI
Prof.Dr. Kıymet AKSOY

Bu tez Çukurova Üniversitesi Araştırma Projeleri Birimi tarafından
SBE.2002.D.32 nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No:.....

Adana-2004

KABUL VE ONAY SAYFASI

Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan “Anamur Bölgesinin Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzim Yapısı ve Moleküler Özelliği” adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 30 / 01 / 2004



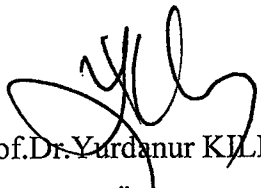
Prof.Dr. Kıymet AKSOY
Çukurova Üniversitesi
Jüri Başkanı



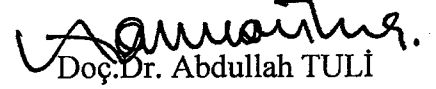
Prof.Dr.Ferhan TEZCAN
Hacettepe Üniversitesi



Prof.Dr.Levent KAYRIN
Çukurova Üniversitesi

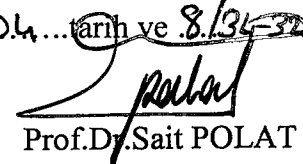


Prof.Dr.Yurdanur KILINÇ
Çukurova Üniversitesi



Doç.Dr. Abdullah TULİ
Çukurova Üniversitesi

Yukarıdaki tez, Yönetim kurulunun 05.03.2004... tarih ve 8.134-32 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof.Dr.Sait POLAT
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Biyokimya Anabilim Dalı'nda görev yaptığım sürece biyokimya bilgi ve birikimiyle eğitimimi pekiştiren tez dönemim boyunca beni sürekli destekleyen tez yöneticim sayın Prof.Dr.Kıymet AKSOY'a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince bilimsel ve sosyal katkılarını esirgemeyen, her zaman bana destek olan sayın Prof. Güneş YÜREGİR'e, Prof.Dr. Levent KAYRIN'a, Prof.Dr. Nurten DİKMEN'e, Doç.Dr. Abdullah TULİ'ye, Doç.Dr.Akif ÇÜRÜK'e Doç.Dr. Gülen ATTİLA'ya ve Yrd.Doç. Tamer İNAL'a ve çalışma arkadaşlarıma ayrı ayrı teşekkür ederim.

Deneyisel çalışmalarım boyunca katkı ve desteklerini esirgemeyen İçel Muzaffer AKSOY Kalıtsal Kan Hastalıkları Tanı Merkezi'nden Dr. Fatma TOSUN'a, Anamur 2 no'lu Sağlık ocağı hemşireleri Ayşegül ÇETİN ve Yadigar UÇAR ile Uzm. İsa ÜNLÜKURT ve Tek.Halil GÜLSEV'e de ayrıca teşekkür ederim. Anneme şükranlarımı sunuyorum, babamı da saygı ve rahmetle anıyorum.

Tez çalışmamı SBE.2002.D.32 No'lu proje olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü'ne ve Araştırma Projeleri Birimi'ne ayrıca teşekkür ederim.

Kimyager Şule S. MENZİLETOĞLU YILDIZ

Adana / 2004

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
ÖZET	xiv
ABSTRACT	xv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	4
2.1. GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN GÖREVİ	4
2.2. PENTOZ FOSFAT YOLU	5
2.2.1. YAĞ ASİTİ SENTEZİ	6
2.2.2. REDÜKTE GLUTATYON SENTEZİ	6
2.2.3. METHEMOGLOBİN REDÜKSİYONU	6
2.2.4. KOLESTEROL BİYOSENTEZİ	7
2.2.5. STEROİD HORMON SENTEZİ	7
2.2.6. BAZI AMİNO ASİTLERİN SENTEZİ	8
2.2.7. NÜKLEİK ASİT, KOENZİM ve HÜCRE DUVARI SENTEZİ	8
2.3. PENTOZ FOSFAT YOLU REAKSİYONLARI	9
2.3.1. PENTOZ FOSFAT YOLUNUN DÜZENLENMESİ	15
2.4. GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROGENAZ ENZİMİNİN ÖNEMİ ve ÖZELLİKLERİ	16
2.4.1. G6PD'nin KLİNİK ÖZELLİKLERİ	16
2.4.1.1. İLAÇ ALIMINA BAĞLI HEMOLİTİK ANEMİ	16
2.4.1.2. FAVİZM	17
2.4.1.3. ENFEKSİYONA BAĞLI HEMOLİTİK ANEMİ	18
2.4.1.4. HEREDİTER NON-SFEROSİTİK HEMOLİTİK ANEMİ	18
2.4.1.5. YENİ DOĞAN SARILIĞI	19
2.4.1.6. DİYABETİK KETOASİDOZ	19
2.4.1.7. DİĞER DOKULAR	19
2.5. G6PD'nin GENETİK ÖZELLİKLERİ	20
2.6. G6PD'nin YAPISAL ÖZELLİKLERİ	21
2.6.1. NADP BAĞLAMA BÖLGESİ	23
2.6.2. N-TERMINAL BÖLGE ve DİSÜLFİT KÖPRÜSÜ	23
2.6.3. KOENZİM BAĞLAMA BÖLGESİ	24
2.6.4. G6PD EKSİKLİĞİ ve ÜÇ BOYUTLU YAPISI	24

2.6.5. DİMER YÜZEYİNDEKİ SINIF I MUTASYONLAR	25
2.6.6. DİSÜLFİT KÖPRÜSÜ ile İLİŞKİLİ MUTASYONLAR	26
2.7. GENETİK POLİMORFİZM, POPULASYON GENETİĞİ ve SITMA	26
2.8. G6PD ENZİMİ ve VARYANLARI	28
2.9. TÜRKİYE’de SAPTANAN G6PD VARYANLARI	30
2.10. G6PD ENZİMİNİN PATOFİZYOLOJİSİ	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1.GEREÇLER	33
3.1.1. CİHAZLAR	33
3.1.2. KİMYASAL MADDELER	34
3.2. ÖRNEKLEME	36
3.3. YÖNTEMLER	36
3.3.1. HEMATOLOJİK ÇALIŞMALAR	36
3.3.1.1. HEMOGLOBİN ELEKTROFOREZİ	36
3.3.1.1.1. AYIRAÇLAR	36
3.3.1.1.2. YÖNTEM	37
3.3.1.2. MİKROKOLON KROMATOĞRAFİSİ ile Hb A ₂ ÖLÇÜMÜ	38
3.3.1.2.1. AYIRAÇLAR	38
3.3.1.2.2. YÖNTEM	38
3.3.1.3. MODİFİYE BETKE YÖNTEMİ ile FETAL HEMOGLOBİN (Hb F) ÖLÇÜMÜ	39
3.3.1.3.1. AYIRAÇLAR	39
3.3.1.3.2. YÖNTEM	40
3.3.1.4. SİYANO METHEMOGLOBİN YÖNTEMİ ile HEMOGLOBİN ÖLÇÜMÜ	40
3.3.1.4.1. AYIRAÇ	40
3.3.1.4.2. YÖNTEM	41
3.3.2. OKSİDATİF HASARIN ÖLÇÜMÜ	41
3.3.2.1. MALONDİALDEHİT ÖLÇÜMÜ	41
3.3.2.1.1. AYIRAÇLAR	41
3.3.2.1.2. STANDART EĞRİ ÇİZİMİ	42
3.3.2.1.3. YÖNTEM	43
3.3.3. KİNETİK ÇALIŞMA	44
3.3.3.1. G6PD ENZİM AKTİVİTESİNİ KANTİTATİF ÖLÇÜMÜ	44
3.3.3.1.1. HEMOLİZAT HAZIRLANMASI	44
3.3.3.1.2. YÖNTEM	45
3.3.3.2. G6PD ENZİMİNİN KISMİ SAFLAŞTIRILMASI	46
3.3.3.2.1. AYIRAÇLAR	46

3.3.3.2.2 YÖNTEM	47
3.3.3.3. KISMİ SAFLAŞTIRILAN ENZİMİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ	48
3.3.3.3.1. AYIRAÇLAR	48
3.3.4. ELEKTROFORETİK ÇALIŞMA	52
3.3.4.1.ERİTROSİT MEMBRAN PROTEİNLERİNİN DODGE YÖNTEMİNE GÖRE HAZIRLANMASI	52
3.3.4.1.1. AYIRAÇLAR	52
3.3.4.1.2. YÖNTEM	52
3.3.4.1.3. SOLUBİLİZASYON	53
3.3.4.1.3.1. AYIRAÇLAR	53
3.3.4.1.4.1. YÖNTEM	53
3.3.4.2. SDS-POLİAKRİLAMİD JEL ELEKTROFOREZİ	54
3.3.4.2.1. AYIRAÇLAR	54
3.3.4.2.2. YÖNTEM	56
3.3.4.3. G6PD ENZİMİNİN PAGE ile KONTROLÜ	56
3.3.4.3.1. AYIRAÇLAR	56
3.3.4.3.2. YÖNTEM	57
3.3.5. MOLEKÜLER ÇALIŞMA	58
3.3.5.1. DNA ELDESİ	58
3.3.5.1.1. AYIRAÇLAR	58
3.3.5.1.2. YÖNTEM	59
3.3.5.2.POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU	60
3.3.5.2.1. AYIRAÇLAR	60
3.3.5.2.1.1.AMPLİFİYE G6PD GEN ÜRÜNÜNÜN RESTRİKSİYON ENDONÜKLEAZ İLE KESİMİ	61
3.3.5.2.1.2. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ	62
3.3.5.2.1.3. AYIRAÇLAR	62
3.3.5.2.1.4. YÖNTEM	63
4. BULGULAR	65
4.1. HEMATOLOJİK ve KİNETİK BULGULAR	65
4.2. MOLEKÜLER BULGULAR	112
5. TARTIŞMA	118
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	124
7. KAYNAKLAR	125
EK-1	137
ÖZGEÇMİŞ	142

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan G6PD'sinin 3 boyutlu yapısı	22
Şekil 2.2. Pentoz fosfat yolu (oksidatif yol)	13
Şekil 2.3. Pentoz fosfat yolu (non-oksidatif yol)	14
Şekil 2.4. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz geni	20
Şekil 2.5. G6PD'nin tetramer yapısı	22
Şekil 2.6. G6PD varyantlarının dünya üzerindeki dağılımı	26
Şekil 2.7. G6PD eksikliğinin dünya üzerindeki dağılımı	27
Şekil 2.8. Eritrositlerdeki G6PD'nin oksidan ajanlara karşı ana metabolik rolü	28
Şekil 3.1. Malondialdehit standart eğrisi	43
Şekil 4.1. N ailesinin soyağacı	72
Şekil 4.2. İ.N'nin G6PD enziminin saflaştırılması grafiği	76
Şekil 4.3. İ.N'nin G6P kinetik çalışması	77
Şekil 4.4. İ.N'nin NADP kinetik çalışması	77
Şekil 4.5. İ.N'nin G6PD enziminin pH stabilitesi	78
Şekil 4.6. İ.N'nin G6PD enziminin ısı stabilitesi	78
Şekil 4.7. B ailesinin soyağacı	79
Şekil 4.8. A.B'nin G6PD enziminin saflaştırılması grafiği	82
Şekil 4.9. A.B'nin G6P kinetik çalışması	83
Şekil 4.10. A.B'nin NADP kinetik çalışması	83
Şekil 4.11. A.B'nin G6PD enziminin pH stabilitesi	84

Şekil 4.12. A.B 'nin G6PD enziminin ısı stabilitesi	84
Şekil 4.13. D ailesinin soyağacı	85
Şekil 4.14. V.D'nin G6PD enziminin saflaştırılması grafiği	87
Şekil 4.15. V.D'nin G6P kinetik çalışması	88
Şekil 4.16. V.D'nin NADP kinetik çalışması	88
Şekil 4.17. V.D'nin G6PD enziminin pH stabilitesi	89
Şekil 4.18. V.D'nin G6PD enziminin ısı stabilitesi	89
Şekil 4.19. T ailesinin soyağacı	91
Şekil 4.20. A.Ö.T'nin G6PD enziminin saflaştırılması grafiği	94
Şekil 4.21. A.Ö.T 'nin G6P kinetik çalışması	95
Şekil 4.22. A.Ö.T 'nin NADP kinetik çalışması	95
Şekil 4.23. A.Ö.T' nin G6PD enziminin pH stabilitesi	96
Şekil 4.24. A.Ö.T'nin G6PD enziminin ısı stabilitesi	96
Şekil 4.25. E ailesinin soyağacı	97
Şekil 4.26. H.B.E'nin G6PD enziminin saflaştırılması grafiği	100
Şekil 4.27. H.B.E 'nin G6P kinetik çalışması	101
Şekil 4.28. H.B.E 'nin NADP kinetik çalışması	101
Şekil 4.29. H.B.E 'G6PD enziminin pH stabilitesi	102
Şekil 4.30. H.B.E 'nin G6PD enziminin ısı stabilitesi	102

Şekil 4.31. F.E'nin G6PD enziminin saflaştırılması grafiği	103
Şekil 4.32. F.E 'nin G6P kinetik çalışması	104
Şekil 4.33. F.E 'nin NADP kinetik çalışması	104
Şekil 4.34. F.E 'G6PD enziminin pH stabilitesi	105
Şekil 4.35. F.E 'nin G6PD enziminin ısı stabilitesi	105
Şekil 4.36. H.E'nin G6PD enziminin saflaştırılması grafiği	106
Şekil 4.37. H.E 'nin G6P kinetik çalışması	107
Şekil 4.38. H.E 'nin NADP kinetik çalışması	107
Şekil 4.39. H.E 'G6PD enziminin pH stabilitesi	108
Şekil 4.40. H.E 'nin G6PD enziminin ısı stabilitesi	108
Şekil 4.41. N ailesinin Gd Akdeniz mutasyonunun elektroforetik görünümü	113
Şekil 4.42. B ailesinin Gd Akdeniz mutasyonunun elektroforetik görünümü	114
Şekil 4.43. D ailesinin Gd Akdeniz mutasyonunun elektroforetik görünümü	115
Şekil 4.44. T ailesinin Gd Akdeniz mutasyonunun elektroforetik görünümü	116
Şekil 4.45. E ailesinin Gd Akdeniz mutasyonunun elektroforetik görünümü	117

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Hemolize yol açan ilaç ve kimyasallar	17
Çizelge 2.2. İnsan G6PD'sinin moleküler özellikleri	21
Çizelge 2.3. En yaygın gözlenen G6PD varyantlarının kinetik özellikleri	30
Çizelge 2.4. Türkiye'de saptanan G6PD varyantları	31
Çizelge 3.1. Hemogloblin ölçümü	41
Çizelge 3.2. MDA'nın standart eğrisi	42
Çizelge 3.3. MDA ölçümü	43
Çizelge 3.4. G6PD ölçümü	45
Çizelge 3.5. Kısmi saflaştırılan G6PD enzimine ait K_m^{NADP} değerinin saptanması	49
Çizelge 3.6. Kısmi saflaştırılan G6PD enzimine ait K_m^{G6P} değerinin saptanması	50
Çizelge 3.7. Kısmi saflaştırılan G6PD enzimine ait analog çalışması	51
Çizelge 3.8. PCR karışımı	61
Çizelge 3.9. RFLP karışımı	62
Çizelge 4.1. Olguların hematolojik verileri	66
Çizelge 4.2. MCV düzeyi 79fL'nin altında ve HbA ₂ düzeyi 3,7'den yüksek olan olguların hematolojik verileri	70
Çizelge 4.3. İ.N'nin kinetik verileri	73
Çizelge 4.4. İ.N ve H.T'nin membran proteinleri verileri	74
Çizelge 4.5. N ailesinin Gd Akdeniz mutasyon verileri	74

Çizelge 4.6. N ailesinin hematolojik bulguları	75
Çizelge 4.7. N'nin analog kullanımı	78
Çizelge 4.8. A.B'nin kinetik verileri	80
Çizelge 4.9. A.B'nin membran proteinleri verileri	80
Çizelge 4.10. B ailesinin Gd Akdeniz mutasyon verileri	81
Çizelge 4.11. B ailesinin hematolojik bulguları	81
Çizelge 4.12. A.B'nin analog kullanımı	84
Çizelge 4.13. V.D'nin kinetik verileri	86
Çizelge 4.14. V.D'nin membran proteinleri verileri	86
Çizelge 4.15. D ailesinin Gd Akdeniz mutasyon verileri	86
Çizelge 4.16. D ailesinin hematolojik bulguları	86
Çizelge 4.17. D'nin analog kullanımı	89
Çizelge 4.18. A.Ö.T'nin kinetik verileri	90
Çizelge 4.19. A.Ö.T'nin membran proteinleri verileri	92
Çizelge 4.20. T ailesinin Gd Akdeniz mutasyon verileri	92
Çizelge 4.21. T ailesinin hematolojik bulguları	93
Çizelge 4.22. A.Ö.T.'nin analog kullanımı	96
Çizelge 4.23. E ailesinin kinetik verileri	98
Çizelge 4.24. E ailesinin membran proteinleri verileri	98
Çizelge 4.25. E ailesinin Gd Akdeniz mutasyon verileri	98

Çizelge 4.26. E ailesinin hematolojik bulguları	99
Çizelge 4.27. H.B.E'nin analog kullanımı	102
Çizelge 4.28. F.E'nin analog kullanımı	105
Çizelge 4.29. H.E'nin analog kullanımı	108
Çizelge 4.30. G6PD enzim aktivitesi eksik ve yüksek olan olguların kinetik verileri	109
Çizelge 4.31. G6PD enzim aktivitesi eksik ve yüksek olan olguların membran proteinleri verileri	110
Çizelge 4.32. Gd Akdeniz mutasyonu içeren olguların verileri	110
Çizelge 4.33. Gd Akdeniz mutasyonu içermeyen olguların verileri	111



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bç	Baz çifti
G6P	Glukoz-6-fosfat
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
Gal-6-P	Galaktoz-6-fosfat
Gd A ⁻	A ⁻ tipi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz varyantı
Gd ⁺	A ⁺ tipi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz varyantı
Gd B	B tipi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz varyantı
Gd Med	Akdeniz tipi glukoz-6-fosfat dehidrogenaz varyantı
GSH	Redükte glutatyon
GSSH	Okside glutatyon
HMY	Heksoz monofosfat yolu
MTT	3-(4,5-dimetiltiyazolil-2-)-2,5-difenil tetrazolum bromür
NAD	Nikotinamit adenin dinükleotit
NADP	Nikotinamit adenin dinükleotit fosfat
NADPH	Redükte nikotinamit adenin dinükleotit fosfat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
SDS-PAGE	Sodyum dodesül sülfat poliakrilamid jel elektroforezi

ÖZET

Anamur Bölgesinin Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz Enzim Yapısı ve Moleküler Özellikleri

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi pentoz fosfat yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimidir. G6PD eksikliği bilinen en yaygın kalıtsal enzim defektidir ve dünyada 400 milyondan fazla insanı etkilemektedir. Bugün genetik olarak tanımlanmış yaklaşık 140 G6PD varyantı bulunmaktadır. Çukurova bölgesinde yapılan tarama çalışmaları ile G6PD eksikliğinin %8,2 oranında olduğu bildirilmiştir.

Bu çalışmada Anamur bölgesinin G6PD enziminin haritasının çıkarılması amacı ile G6PD enzimin aktivitesi, kinetik ve moleküler özellikleri çalışılmıştır. G6PD aktivitesi Beutler yöntemi modifiye edilerek ölçülmüş, enziminin kinetik özellikleri Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterleri kullanılarak çalışılmış, Gd Akdeniz mutasyonu moleküler düzeyde RFLP yöntemi ile saptanmıştır.

Anamur bölgesinin G6PD enzim aktivite düzeyi 0-77,5 U/gHb arasında saptanmış ayrıca MDA ve membran proteinleri de çalışılmıştır. G6PD aktivitesi sıfır ve yüksek olan 5 ailenin kinetik çalışması yapıldığında bütün olguların Gd B ve Gd Akdeniz varyantından farklı kinetik özelliklere sahip olduğu, aynı olguların membran proteini, MDA düzeyleri ve kinetik özellikleri arasında ilişki bulunamamıştır. Enzim aktivitesi 5,1-7,1 U/gHb arasında olan 5 olgunun Gd Akdeniz mutasyonu içerdiği bulunmuştur. Ayrıca enzim aktivitesi 0,0 U/g Hb olan bir kadın olgunun Gd Akdeniz mutasyonu açısından homozigot olduğu gözlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Enzim eksikliği, Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, G6PD Akdeniz varyantı, moleküler analiz

ABSTRACT

Molecular Features and Sturcture of the Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Enzyme in Anamur Region

Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzyme is the fist and rate limiting enzyme of pentose phosphate pathway. Deficiency of G6PD is the most common inherited enzyme defect which affects more than 400 million people worldwide. There are about 140 variants of G6PD which is genetically described. The incidence of G6PD deficiency is reported as 8,2% according to population surveys investigated in Çukurova region.

The aim of this study is to get a genetic map of G6PD enzyme in Anamur Region in order to study kinetic and molecular properties of G6PD enzyme. Enzyme activity of G6PD was determined by modifying Beutler methods and variants were analysed by RFLP methods and kinetic properties of G6PD were determined according criteria used in WHO.

We studied on kinetic properties of five families whose G6PD activities were zero or high and kinetic properties in all cases were different from Gd B and Gd Mediterranean. In addition, there was no relationship among membrane proteines,MDA levels and kinetic properties. Five cases the enzyme activity of which is between 5,1-7,1 U/gHb contains G6PD Mediterranean mutation. Besides, in one female case, enzyme activitiy was determined 0,0 U/gHb and she was found to be G6PD Mediterranean homozigous.

Key words: Enzyme deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD Mediterranean variant, molecular analysis

1.GİRİŞ ve AMAÇ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) enzimi pentoz fosfat yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimidir. G6PD eksikliği bilinen en yaygın kalıtsal enzim defektidir ve dünyada 400 milyondan fazla insanı etkilemektedir. G6PD enzimi eritrositlerin stabilitesinin ve yaşama kabiliyetinin teminatıdır. Eritrositlerde G6PD enzim eksikliğinin ortaya çıkarılması hematoloji adına 1950'li yıllarda atılmış büyük bir adımdır. Eritrositlerin temel enerji kaynağı glukozdur. Glukoz heksokinaz ile fosfatlanıp glukoz-6-fosfatı oluşturduktan sonra iki metabolik yoldan birini seçer¹:

- a) Embden-Meyerhof Yolu
- b) Pentoz Fosfat Yolu

Embden-Meyerhof Yolu, eritrositlere iyon pompalarını aktif hale geçirebilmeleri ve membran proteinlerini fosfatlayabilmeleri için gerekli olan enerjiyi ATP olarak sağlar ve ayrıca hemoglobini indirgenmiş halde koruyabilmeleri için NADH'yi sağlar. Ayrıca bu yolla hemoglobinin oksijene bağlanma özelliğini de allosterik olarak etkileyerek 2,3difosfogliserat oluşumunu sağlar².

Pentoz Fosfat Yolunun temel görevi organizmaya NADPH ve riboz fosfatları sağlamaktır. Oksidatif ve non oksidatif olmak üzere iki kısımdan oluşur ve bu metabolik yolda ne ATP üretimi ne de kullanımı vardır. Pentoz fosfat yolu hücrenin sitozolünde gerçekleşir ve her bir glukoz-6-fosfata karşılık 2 mol NADPH üretilir^{2,3}.

G6PD enzim eksikliği, eritrositlerin genel özellikleri ile çevresel faktörlerin birbirini etkileyerek hemolize nasıl yol açtıklarını araştırılmasında bir model oluşturmaktadır. İlaç alımına (ör: antimalaryal ilaçlar) bağlı hemolitik anemi, enfeksiyona bağlı hemolitik anemi ve yenidoğan sarılığı, G6PD enzim eksikliği ile ilgili patolojilerdir. Bunlardan başka çocuklarda yetişkinlere göre daha sık görülen favizm, G6PD enzim eksikliğine bağlı olarak geliyorsa da her G6PD enzim eksikliği favizme yol açmaz. Yenidoğan sarılığı G6PD enzim eksikliğinin yaşamı tehdit eden sonuçlarından birisidir. Kinetik çalışmalar, G6PD enzim eksikliği olan yeni doğanlarda şiddetli hiperbilirubinemiye eğilim olduğunu göstermektedir⁴.

G6PD enzim eksikliği olan bireylerde ölümlle sonuçlanan hemolitik krizlere yol

açan ilaçların ortak özelliği oksidan ajan olmalarıdır. Bu durum eritrositlerin G6PD enzim eksikliğinde oksidatif strese karşı koyamadıklarını diğer bir deyişle redüktan ajan üretme mekanizmalarında bir sorun yaşandığını göstermektedir.

Dünya Sağlık Örgütü'nün kriterlerine göre (biyokimyasal, kinetik ve klinik) 442 farklı G6PD varyantı tanımlamıştır. Yapılan tarama çalışmaları ile Çukurova bölgesinde G6PD eksikliğinin %8,2 oranında olduğu bildirilmiştir. Adana, Balcalı ve Samandağ isimleriyle rapor edilen varyantlar elektroforezde kat ettikleri yol, optimum pH, K_m değerleri, substrat analoglarını kullanabilme yetenekleri, inhibitörleri ve sıcaklık stabiliteleri normal enzim ile karşılaştırılarak saptanmıştır. Ancak son yıllarda bu yöntemlere ilaveten enzimin amino asit dizisinden ve oligonükleotit problemlerinin hazırlanması ile cDNA dizisindeki nükleotit farklılığından yararlanılarak moleküler düzeyde varyant analizi yapılmaya başlanmıştır⁵.

G6PD geni 13 eksondan ve 12 introndan oluşmaktadır. Enzimin fonksiyonunu belirleyen G6PD genini 515 amino asit kodlamakta olup mRNA'sı 18 500 baz çifti uzunluğundadır. Genel olarak birden fazla alt birimden oluşan G6PD'nin sentezinden yalnız bir yapısal gen sorumlu olduğu için enzim tek tip alt birim içermektedir. İnsana ait G6PD enziminin aktif formda iken moleküler ağırlıkları 59 265 dalton olan 2 veya 4 alt birimden oluşmaktadır^{2,6}.

G6PD geni insanda X kromozomunun q28 bandında yer almaktadır. Daha kesin olarak ise G6PD enzimini şifreleyen gen, telomerden 2 megabaz uzaklıkta Faktör-8'i kodlayan F8C genine proksimal, kırmızı yeşil opsin genlerine (R/G-CV) distal olacak şekilde yerleşmiştir. G6PD geni X kromozomuna yerleşmiş olduğu için G6PD enzim eksikliği daha çok erkek bireyleri etkilemektedir. İki X kromozomuna yani iki tane G6PD sentezleyen gene sahip olmalarına rağmen dişilerde erkeklere göre iki kat fazla G6PD enzim aktivitesi gözlenmez⁷.

Dünyada en yaygın olarak bulunan enzim tipi diğer varyantların tanımlanmasında ölçüt olarak kullanılan GdB⁺dir. Tüm populasyon gruplarında çalışılmış en genel enzim tipidir. Gd Mediterranean (Gd Med) elektroforetik olarak normal bir hareketliliğe sahip %0-10 arasında bir aktivite gösteren ve Akdeniz bölgesindeki beyazlarda daha sık olarak gözlenen bir varyanttır. Bu varyantın kinetik özellikleri Gd B, Gd A⁺ ve Gd A⁻ varyantlarından büyük farklılık göstermektedir⁸.

Türkiye'nin çeşitli yörelerinin G6PD enzim düzeyleri ve yapıları konusunda

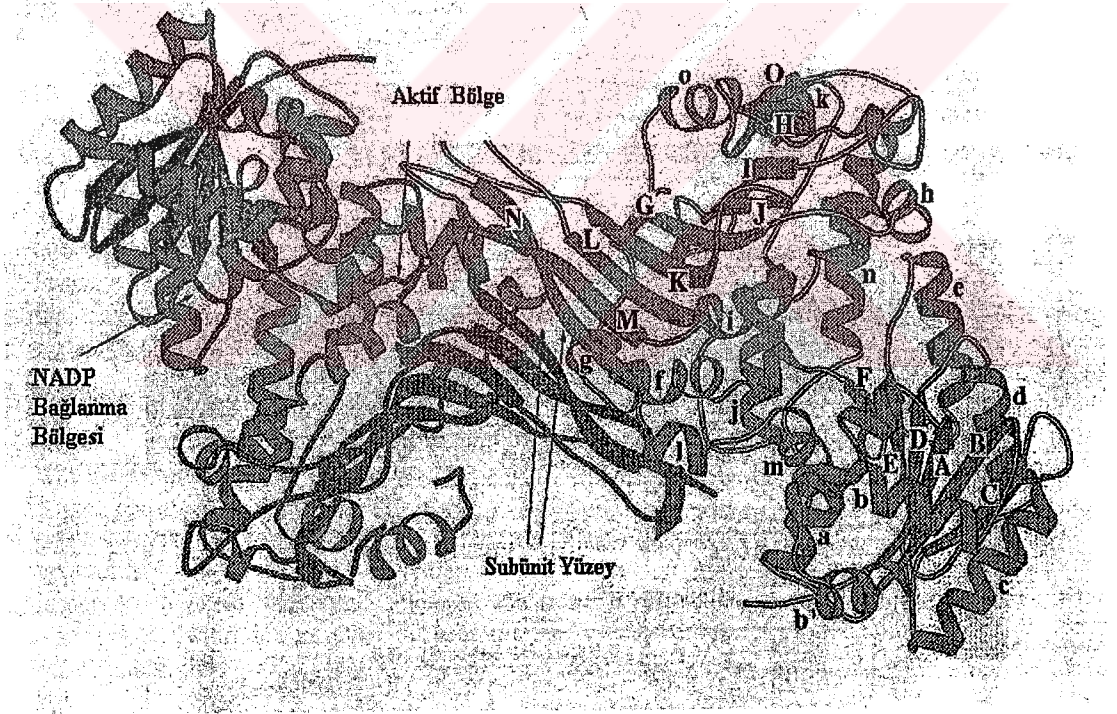
birçok araştırma yapılmıştır. Yapılan bu araştırmalarda Türkiye'de bir çok G6PD varyantının olduğu saptanmıştır. Anamur bölgesi G6PD enzim düzeyi ve yapısı bakımından bu güne kadar hiç araştırılmamıştır. Ayrıca Anamur bölgesi sosyal yapı olarak kapalı bir toplum özelliği göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı tez kapsamına Anamur bölgesi alınarak G6PD enzim aktivite düzeyi ile enzimin kinetik ve moleküler yapısı incelenmiştir.



2. GENEL BİLGİ

2.1. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Görevi

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD, E.C: 1.1.1.49, β -D-Glukoz-6-Fosfat, NADP oksidoredüktaz) pentoz fosfat yolunun ilk ve hız kısıtlatıcı enzimidir (Şekil 2.1.). G6PD enzimi ilk defa 1931 yılında Warburg ve Cristian tarafından keşfedilmiş ve "Zwischenferment" olarak adlandırılmıştır. Enzimin tanımlanması daha sonraki yıllarda koenzim nikotinamid adenin dinükleotit fosfatın (NADP⁺) keşfine neden olmuştur^{9,10}.



Şekil 2.1. İnsan G6PD'sinin 3 boyutlu yapısı

G6PD enzim eksikliği ilk tanımlanan enzim eksikliğidir. G6PD enzim eksikliği 1950'li yıllarda antimalaryal ilaçlardan primakinin hemolitik etkisinin araştırılması sonucunda tanımlanmıştır. Bu yıllardaki çalışmalar G6PD enzim eksikliğinin X'e bağlı

kalıtıldığını ve yaşlı eritrositlerin daha çok etkilendiğini göstermiştir. G6PD enzim eksikliği Akdeniz, Afrika ve Doğu Asya kökenli kişilerde daha çok görülmektedir. Dünyada 400 milyondan fazla insanın G6PD enzim eksikliğinden etkilendiği düşünülmektedir ^{1,6}.

G6PD enzim eksikliğinden bazı toplumlarda halkın % 20'sinden fazlası etkilenmektedir. G6PD A⁻, G6PD Akdeniz ve G6PD Kanton gibi bazı polimorfik formlar enfeksiyon, oksidanlara maruz kalma ve bakla yenilmesinden sonra hemolize uğramaktadır. Bilirubin konjugasyonundaki bir defekt nedeni ile meydana gelen yeni doğan sarılığı G6PD eksikliğinin en ciddi klinik komplikasyonudur. G6PD enzim eksikliği olan hastaların bir kısmı da non-sferositik hemolitik anemi ile karşı karşıya kalmaktadır. G6PD enzim eksikliği eritrositlerin genetik özellikleri ile çevresel faktörlerin birbirini etkileyerek hemolize nasıl yol açtıklarının araştırılmasında bir model oluşturmaktadır ^{2,3,8,11,12}.

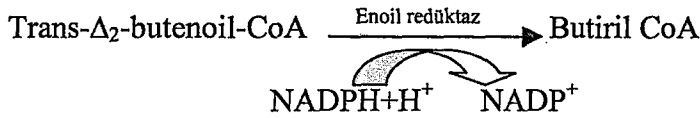
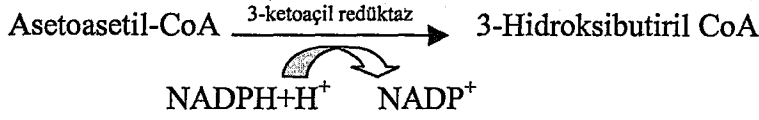
2.2. Pentoz Fosfat Yolu

Pentoz fosfat yolu, heksozmonofosfat yolu ve fosfoglukonat yolu olarak da bilinmektedir. Pentoz fosfat yolunun temel amacı, redükleyici güce sahip olan NADPH+H⁺ moleküllerini üretmektir. Ayrıca bu yolda üretilen D-riboz-5-fosfat ve D-deoksiriboz-5-fosfat nükleik asitlerin sentezinde kullanılır. Pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH+H⁺ ve D-riboz-5-fosfattan birçok molekülün sentezi gerçekleşmektedir. Bunları aşağıdaki gibi sıralayabiliriz (Şekil2.2.). ^{1,13,14}

1. Yağ asiti sentezi
2. Redükte glutatyon sentezi
3. Methemoglobin redüksiyonu
4. Kolesterol sentezi
5. Steroid hormon sentezi
6. Bazı amino asitlerin sentezi
7. Nükleik asit, nükleotit yapılı koenzim ve hücre duvarı sentezi

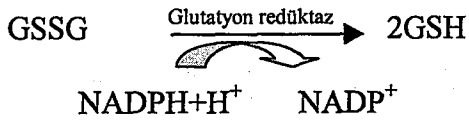
2.2.1. Yağ Asiti Sentezi

Yağ asiti biyosentezi yapılırken başlıca iki kademede β -ketoasilredüktaz ve enoil redüktaz kademelerinde $\text{NADPH}+\text{H}^+$ molekülleri redüktör molekül olarak kullanılmaktadır¹⁴.



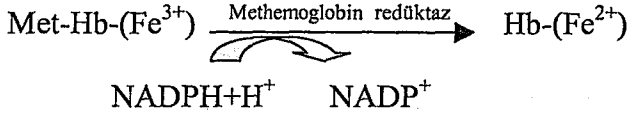
2.2.2.Redükte Glutasyon Sentezi

Hücrede bulunan glutasyon (GSH), çevresel oksidan ajanların etkisini kendi üzerine çekerek hücrenin fonksiyonel proteinlerini okside olmaktan korur. Bu sırada glutasyonun kendisi oksitlenir (GSSG) ve iki glutasyon molekülü disülfit bağı ile birbirine bağlanır. Bu molekülün fonksiyonunu yapabilmesi için ancak redükte $\text{NADPH}+\text{H}^+$ 'ların kullanılması ve glutasyon redüktaz enziminin aracılığı ile glutasyonun tekrar redükte hale geçmesi ile mümkündür¹⁵.



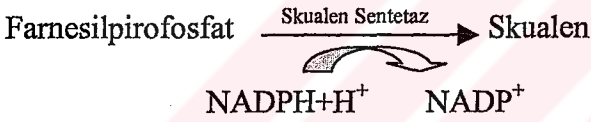
2.2.3.Methemoglobin Redüksiyonu

Eritrositler üzerinde bulunan methemoglobin oksijeni yüzeyine bağlayamaz ve taşıyamaz. Ancak redükte $\text{NADPH}+\text{H}^+$ 'lar harcanarak methemoglobin redüktaz enzimi tarafından redüklendikten sonra oksijen taşıyabilir duruma gelmektedir. Hücre ve dokuların oksijen gereksinimleri ancak bu sayede karşılanmaktadır¹⁶.



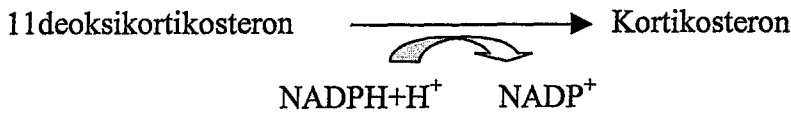
2.2.4. Kolesterol Biyosentezi

Kolesterol sentez edilirken başlıca üç basamakta hidrosimetilglutaril CoA redüktaz, skualen sentetaz ve desmosterol'ün kolesterole dönüştüğü kademelerde yine redüktör molekül olarak NADPH+H⁺'lar kullanılmaktadır¹⁷.



2.2.5. Steroid Hormon Sentezi

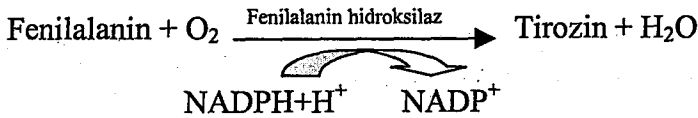
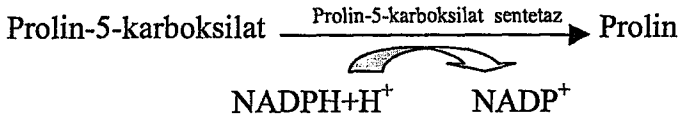
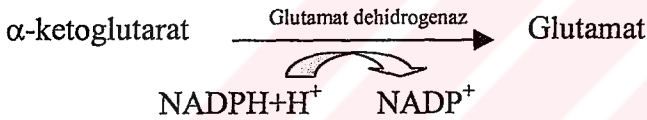
Steroid hormon sentezinde yine birçok basamaklarda NADPH+H redüktör molekül olarak kullanılmaktadır. Örneğin 11deoksikortikosteron NADPH+H molekülleri aracılığı ile kortikosterona, pregnesteron ise 21 hidrokspregesterona dönüşmektedir.





2.2.6. Bazı Amino Asitlerin Sentezi

α -ketoglutarik asite amonyum grubunun eklenmesi reaksiyonu glutamat dehidrogenaz tarafından gerçekleştirilirken yine NADPH+H⁺'lar kullanılmakta ve glutamik asit sentezlenmektedir. Aromatik amino asitlerden fenilalanin NADPH+H⁺'nın harcanması ve fenilalanin hidroksilaz enziminin aracılığı ile tirozine dönüşmektedir. Bu reaksiyonda ortaya çıkan dihidrobiopterin, dihidrobiopterin redüktaz enzimi yardımıyla ve NADPH+H⁺'ların redüklenme özelliği sayesinde tekrar redükte hale yani tetrahidrobiopterin haline dönüşmektedir. Bunlara ilave olarak NADPH+H⁺ prolin-5-karboksilik asitin proline dönüşmesini sağlayarak prolin amino asitinin sentezine de katılmaktadır. Ayrıca hidroksifolik asitin sentezine de eşlik ettiği bilinmektedir⁴.



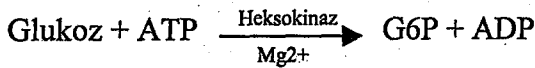
2.2.7. Nükleik Asit, Koenzim ve Hücre Duvarı Sentezi

Pentoz fosfat yolunda sentezlenen riboz, deoksiriboz ve ribitol nükleik asitlerin, nükleotit yapıdaki koenzimlerin ve bazı organizmaların hücre duvarının sentezine katılmaktadır. Bütün bu faaliyetlerin aksamadan düzenli bir şekilde başarılması

bir yerde bu metabolik yolun ilk ve düzenleyici enzimi olan G6PD enziminin faaliyetine bağlıdır. Bu biyosentez olayları hücrenin canlılığını sağlamak bakımından son derece önemlidir. Enzimin faaliyeti NADP / NADPH+H⁺ oranına bağlıdır. Eğer oran NADP⁺ lehine ise glukoz-6-fosfat, ribuloz-5-fosfata ve CO₂'ye yıkılmaktadır. Eğer hücrede G6PD bozukluğu varsa NADPH+H⁺ sentezi ve buna bağlı olarak metabolik olaylar yavaşlar. Bu durum hücrenin harabiyetine neden olur. Örneğin enzim bozukluğu olan eritrositlerde yeteri kadar NADPH+H⁺ sentezi yapılamadığı için redükte glutatyon seviyesi düşer. Glutatyonu kofaktör olarak kullanan glutatyon redüktaz enzimi az çalışır, katalaz düzeyi düşer. Eritrositlerde düşük oranda da olsa devam eden lipid sentezi tamamen durur veya çok azalır. Redükte glutatyon azlığı nedeni ile hemoglobin korunamaz -SH grupları okside olur. Protein denatüre olarak Heinz cisimcikleri halinde sferik inklüzyonlar oluşur ve sonunda eritrositler daha fazla hayatta kalamayarak hemoliz olurlar¹⁶.

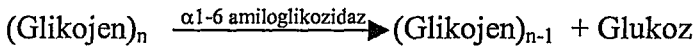
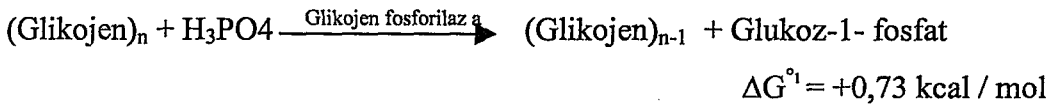
2.3. Pentoz Fosfat Yolu Reaksiyonları

Pentoz fosfat yolu, heksozmonofosfat yolu yada fosfoglukonat metabolik yolunun temel amacı redükleyici özelliği olan NADPH+H⁺ molekülünü üretmektir. (Şekil 2.3.). Bu metabolik yolda kullanılan glukoz-6-fosfat iki şekilde meydana gelmektedir. Besinlerle alınan glukoz, ATP varlığında heksokinaz enzimi aracılığı ile G6P'ye dönüşmektedir. Olay bir transfosforilasyondur. ATP'nin son fosfat grubu glukozun 6. karbonundaki hidroksil grubuna transfer edilmektedir¹⁷.

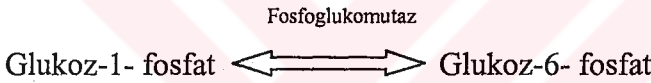


Glukoz, glikojen şeklinde depo edilmektedir. Metabolik denge glikojenin yıkımı yönüne kayınca glikojen başlıca fosforilaz a ve α -1,6-amiloglikozidaz tarafından yıkılmaktadır. Parçalanmadaki ilk kademe fosforilaz a tarafından katalize edilmekte ve glikojen polimerinin nonredükte ucundan glukoz üniteleri fosforik asit kullanılarak hidrolize edilmektedir. Bu reaksiyon sonunda glukoz-1-fosfat oluşur. Ancak fosforilaz a

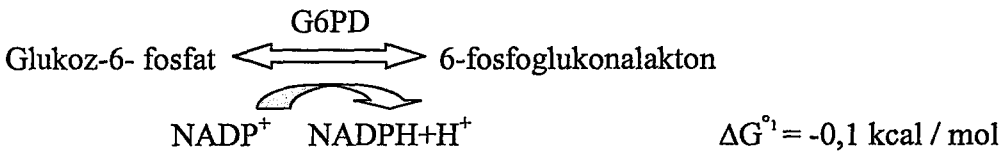
tek başına glikojeni parçalayamaz. Çünkü fosforilaz a glikojen molekülünün α -1,6 dallanma noktasına kadar etki eder. Geri kalan kısım limit dekstrini oluşturur. Bu dallanma noktasında glukozun bir numaralı karbonundaki hemiasetalden ana zincirdeki glukozun 6 numaralı karbonuna glikozidik bağ ile bağlanmıştır. Bu sırada α -1,6 aminoglikozidaz devreye girer, limit dekstrine etki ederek dallanma noktasında bulunan bir tek ünitelik glukozun α 1-6 bağını kırarak molekülü limit dekstrinden uzaklaştırır. Geriye ana zincir üzerinde α 1-4 glikozidik bağlı glukoz üniteleri kalır¹⁸.



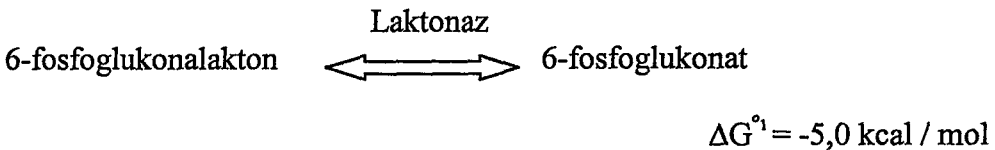
Oluşan glukoz-1- fosfat, fosfoglukomutaz enzimi tarafından glukoz-6- fosfata dönüştürülmektedir.



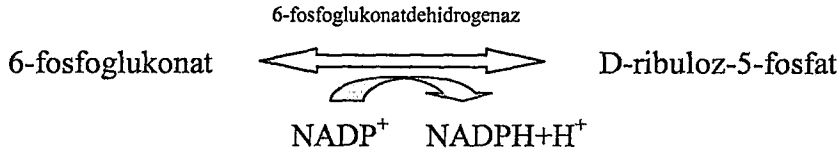
Bu noktaya kadar glikolitik yol ve pentoz fosfat yolu ortaktır. Bu noktadan sonra her iki metabolik yol farklı bir şekilde işlemektedir. Pentoz fosfat yolunun ilk reaksiyonu G6P'den hidrojenler alınarak 6-fosfoglukonalaktonun oluşumudur.



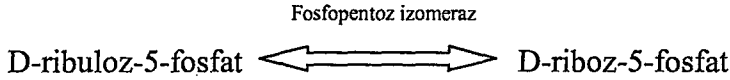
6-fosfoglukonalakton, spesifik bir laktonaz ile 6-fosfoglukonata dönüşmektedir.



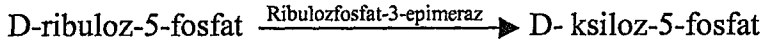
Bir basamak sonra 6-fosfoglukonat, 6-fosfoglukonatdehidrogenaz tarafından oksidasyona ve dekarboksilasyona uğratarak karboksil grubu CO₂ haline getirilmekte ve D-ribuloz-5-fosfat oluşmaktadır.



Bu basamaktan sonra D-ribuloz-5-fosfat, fosfopentoz izomerazenzimi tarafından D-riboz-5-fosfata dönüşmektedir.



Oluşan D-riboz-5-fosfat, ribulozfosfat-3-epimeraz enzimi ile D-ksiloz -5-fosfata dönüşür. Burada 3. karbondaki bulunan hidroksil grubu sağ taraftan sol tarafa transfer edilmektedir.



Transketolaz enzimi yüzeyine sıkıca bağlanmış tiaminpirofosfat içermektedir. Ortamda magnezyum varlığında D-ksiloz-5-fosfattan glikolaldehit grubunu D-riboz-5-fosfata transfer ederek D-sedoheptuloz-7-fosfat ve D-gliseraldehit-3-fosfat sentezlenmesine neden olmaktadır¹⁴.

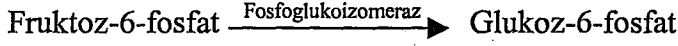
Bilindiği gibi gliseraldehit-3-fosfat glikolitik yolun ara metabolitlerinden birisidir. Bu reaksiyonda glikolaldehit grubu önce D-ksiloz-5-fosfattan enzime bağlı tiamin pirofosfatın tiazol halkasına transfer edilerek tiamin pirofosfatın α,β hidroksietil türevi oluşur. Tiamin pirofosfat bu reaksiyonda aracı molekül rolü oynamakta ve glikol aldehit grubunu D-riboz-5-fosfata taşımaktadır. Transketolaz enzimi aynı zamanda başka bir ketoz şeker olan D-riboz fosfatın glikolaldehit grubunu başka bir şeker olan D-ksiloz-5-fosfatın 1. karbonuna da taşıma özgülüğüne sahiptir¹⁴.

Transaldolaz enzimi, D-sedoheptuloz-7-fosfattan ve D-gliseraldehit-3-fosfattan 6 karbonlu D-fruktoz-6-fosfat ve D-eritroz-4-fosfatı sentez etmektedir. Bu reaksiyonda D-sedoheptuloz-7-fosfatın 1,2 ve 3 numaralı karbonlarına bağlı olan dihidroksiaseton grubu D-gliseraldehit-3-fosfatın 1.karbonuna transfer edilerek D-fruktoz-6-fosfat meydana gelmekte ve geriye D-eritroz-4-fosfat kalmaktadır¹⁴.

Transketolaz enzimi tarafından katalizlenen diğer bir reaksiyonda D-ksiloz-5-fosfat ve D-eritroz-4-fosfattan, D-fuktoz-6-fosfat ve D-gliseraldehit-3-fosfat sentez edilmektedir. Yani pentoz fosfat yolunun ara metabolitleri sonunda glikolitik yolun ara

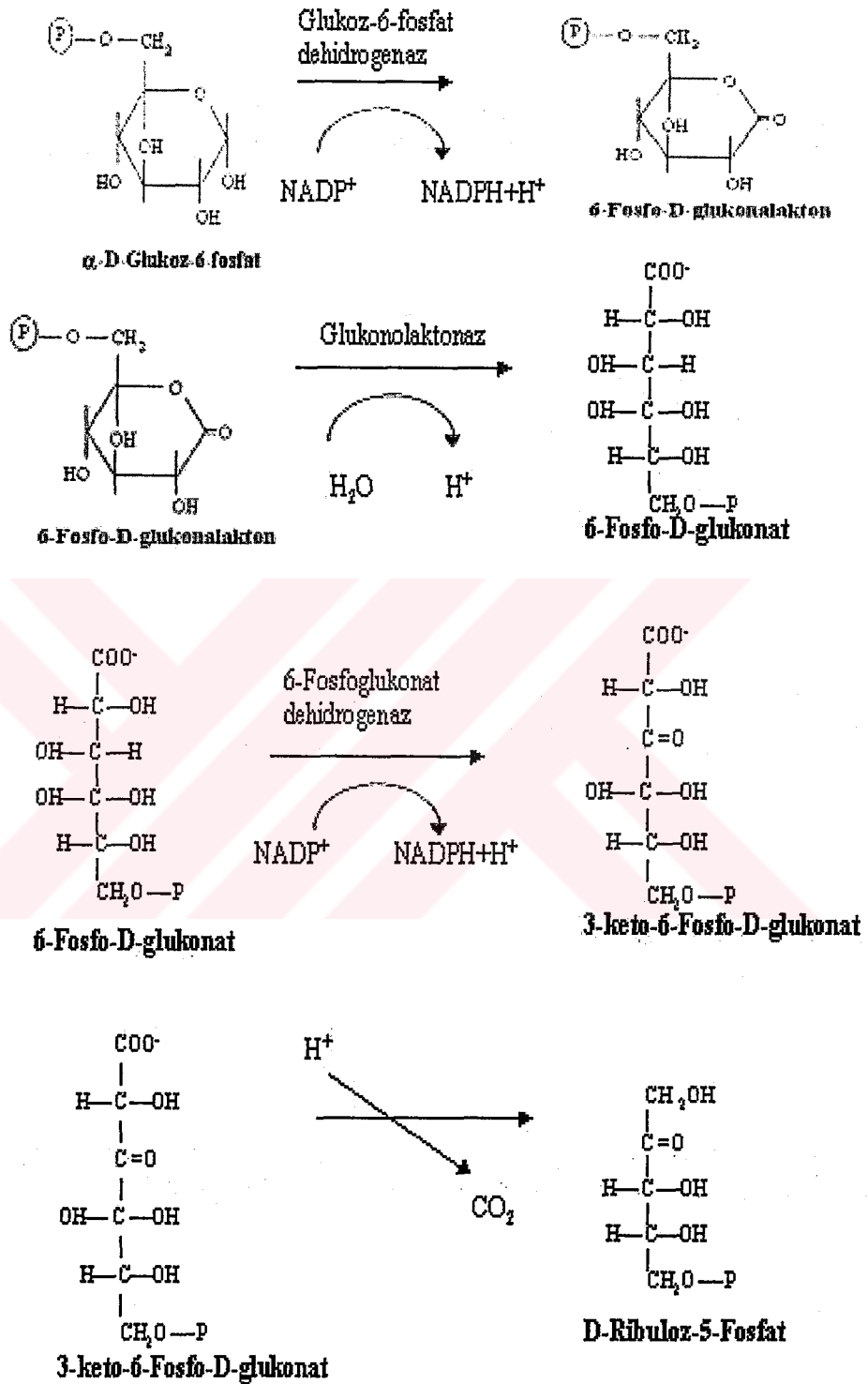
metabolitlerine dönüşmektedir¹⁴.

Transaldolaz ve transketolaz reaksiyonlarından sonra oluşan fruktoz-6-fosfatlar fosfoglukoizomeraz tarafından glukoz-6-fosfata dönüşmektedir.

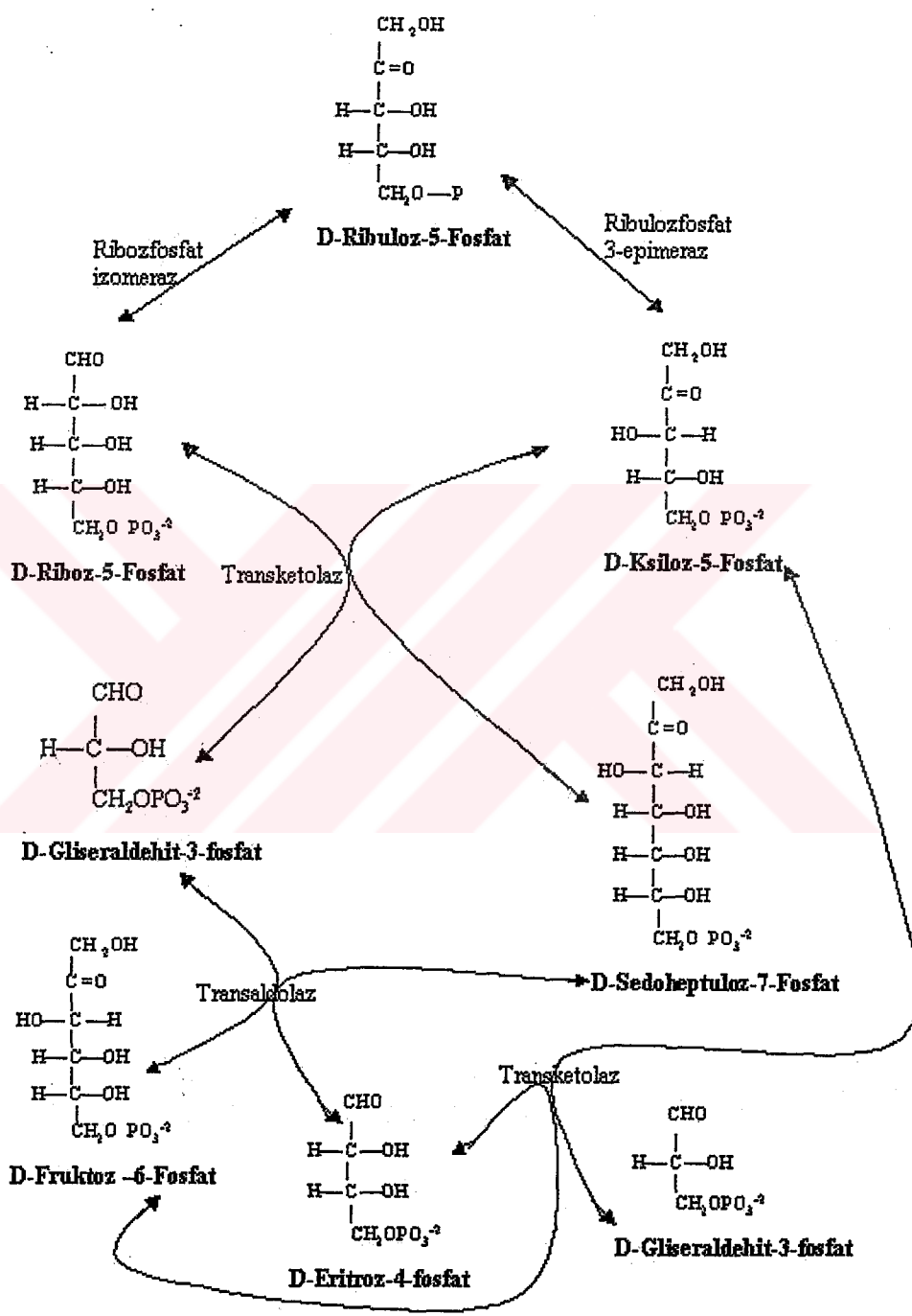


Oluşan G6P tekrar pentoz fosfat yoluna girerek NADPH+H⁺ ve riboz-5-fosfat sentezlemektedir. G6P'nin bir karbonunun CO₂ haline dönüşmesi durumunda 2NADPH+H⁺ sentezlenmektedir. 6 karbonlu glukozun bu yolda tamamen harcandığı düşünülürse 12NADPH+H⁺ sentezlenmektedir¹⁴.

İki hücre grubu alınıp birine 1. karbonundan radyoaktif işaretli glukoz1-¹⁴C diğerine ise 6. karbonundan radyoaktif işaretli glukoz6-¹⁴C verildiğinde glikolitik ve sitrik asit döngüleri sonundaki reaksiyonlarda hem birinci hem de 6. karbondan işaretli ¹⁴CO₂'lerin yaklaşık eşit oranda ortaya çıktığı görülmüştür. Fakat pentoz fosfat yolunda meydana gelen ¹⁴CO₂'lerin glukozun 1. karbonundan orijin aldığı ortaya çıkmıştır. O halde glikolitik yol ve sitrik asit döngüsünde hem 1. hem de 6. karbonlar ¹⁴CO₂ halinde çıkarken, pentoz fosfat yolunda sadece glukozun 1. karbonunun ¹⁴CO₂ halinde ortaya çıktığı görülmüştür¹⁸.



Şekil 2.2. Pentoz fosfat yolu (oksidatif yol)



Şekil 2.3. Pentoz fosfat yolu (non-oksidatif yol)

2.3.1. Pentoz Fosfat Yolunun Düzenlenmesi

Pentoz fosfat yolu, eritrositler, karaciğer, yağ dokusu ve böbrek için çok önemlidir. Pentoz fosfat yolu reaksiyonları sitoplazmada oluşur. Bu yolun düzenlenmesi başlıca D-glukoz-6-fosfat dehidrogenaz tarafından sağlanır. G6PD enzimi diyet büyük miktarlarda karbonhidrat içeriğinde artar. Karaciğerde 10 kez artış kişiler bir açlık döneminden diğerine geçerken artan karbonhidratın yağ asidine dönüştüğünde izlenmiştir. Bu kaba düzenleme yarışmalı inhibitör gibi hareket eden $k_1=7\mu\text{mol/L}$ NADP ile enzim aktivitesinin kontrolü ile gerçekleşir. NADPH'nin konsantrasyonunun NADP⁺ konsantrasyonuna oranı 10'dan büyük olursa inhibisyon %90'dan fazladır. İnhibisyon sadece NADPH'nin NADP⁺'ya oksidasyonu ile değil spesifik olarak hareket eden okside glutatyon ile de sağlanır. Bu gözlem neden G6PD enziminin NADPH konsantrasyonunun NADP⁺'dan 100 kez fazla olduğunu karaciğerde aktif olduğunun açıklanmasında önemlidir. D-glukoz-6-fosfatın hücre konsantrasyonu yaklaşık olarak 1mmol/L'dir. Bu mikromolar düzeyde K_m 'e sahip dehidrogenaz aktivitesi üzerinde küçük bir sınırlama koyar. Hücrenin ihtiyacına bağlı olarak pentoz fosfatın heksoz fosfata çevrilmesi zorunlu olmayabilir^{4,18}.

Reaksiyonun fosfoglisitlerin veya triaçilgliserolün biyosentezi veya pentoz fosfat yolunun çok belirgin olduğu eritrositlerde trioz fosfatın, 2,3bifosfogliserata çevrilmesi için gliserol-3-fosfat oluşturmaya eğilimi olabilir. Hücrenin ihtiyacına bağlı olarak glikolitik ve pentoz fosfat yollarındaki ara bileşiklerin akışının kombinasyonu; NADPH, riboz-5-fosfat veya 2,3 bifosfogliseratin uygun miktarlarını üretebilir¹⁴.

2.4. Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Enziminin Önemi ve Özellikleri

2.4.1. G6PD'nin Klinik Özellikleri

G6PD enzim eksikliğinin en önemli etkisi hemolitik anemidir. Genelde hemoliz ilaç alımına, bakla yenilmesine, enfeksiyona, yeni doğan periyoduna ve diyabetik ketoasidoza bağlıdır^{2,19,20}.

2.4.1.1. İlaç Alımına Bağlı Hemolitik Anemi

İlaçların bir kısmı ve bazı kimyasallar G6PD enzim eksikliği olan bireylerde hemolitik anemiye yol açmaktadır (Çizelge 2.1). Kloramfenikol gibi bazı ilaçlar G6PD Akdeniz varyantında ılımlı hemolize neden olurken G6PD A⁻ ve G6PD Kanton varyantlarında etkisizdir. Yani farklı G6PD varyantı taşıyan bireylerde aynı ilaç farklı reaksiyon göstermektedir. G6PD enzimi eksik olan bireylerde ilaç alımına bağlı olarak hemoliz, ilaç alımından 1-3 gün sonra başlar. Eritositlerde oksidan varlığında özellikle hemoglobin ve stromal proteinlerin denatürasyonu sonucu Heinz cisimcikleri görülür. Hemoglobin düzeyi hızlı bir şekilde azalır. İdrar rengi koyulaşır hatta siyah olabilir.4-6 gün sonra retikülosit sayısında artış olur²¹⁻²⁴.

Çizelge 2.1.Hemolize yol açan ilaç ve kimyasallar

Akotanilid	Nitrofurantian
Anilin	Nitrofurazon
Antistin	Pamakin
Asetil salisilik asit	Paraaminobenzoik asit
Asetofenitidin	Paraaminofenol
Askorbik asit (1500mg)	Parahidroasetanilid
Bakla	Pentakuin
Benemid	Pnimakin
Daraprim	Primakin
Diaminodifenilstülfan	Salisilazosülfapiridin
Dimerkaprol	Sülfametoksipiridazin
Fenilhidrazin	Sülfadiazin
Furaltadone	Sülfamerazin
Furazoladon	Sülfametaksazol (Bactrim)
Kinakrin (Atabrin)	Sülfanitamid
Kinin	Sülfapiridin
Kloramfenikol	Sülfasetamid
Klorokin	Sülfisoksazol
Kuinidin	Sülfokzon
Kuinosidin	Sülfotiozol
Metilen mavisi	Tiazolsülfan
Naftalan	Trinitrotoluen
Nitrit	Vitamin K ₁

2.4.1.2. Favizm

Bakla (*vicia faba*) bitkisinin neden olduğu hemolitik anemi favizm olarak adlandırılır ve G6PD enzim eksikliği olan bireylerde hemolitik anemiye yol açan tek bitkidir. M.Ö. 2000 yıllarında Herodot'un yazdığına göre 'istenmeyen bir takım etkilerinden dolayı bakla yenilmesi Mısırlı rahipler tarafından yasaklanmıştır.' Hatta Yunanlı matematikçi Pythagoras'un bakla tarlasından geçerek kaçmayı reddettiği için öldürüldüğü düşünülmektedir. Bakla bitkisinin polenlerinin teneffüsü bile bazı kişilerde hemolize yol açabilmektedir. Favizm oluşumuna özellikle ilkbaharda Akdeniz ülkelerinde rastlanmaktadır. Süt veren annelerin bebeklerinde de hemoliz rapor edilmiştir. Favizm'li tüm bireyler G6PD enzim eksikliğine sahipken, her G6PD enzimi eksik olan bireyde bakla yenilmesi sonrasında hemoliz görülmeyebilir. Hemolitik krize neden olan G6PD enzim eksikliği ile birlikte genetik faktörlerin varlığı söz konusudur. Favizm sadece Akdeniz tipini etkiler, Afrika tipi genelde etkilenmez. Yetişkinlere göre

çocuklarda daha sık favizm olgusuna rastlanmaktadır^{17,22,24-27}.

Bakla, kuru ağırlığının yaklaşık % 2'sini oluşturan iki glikozidik bileşik olan visin ve konvisinden zengindir. Bakla yenilmesinden sonra glikozidler enzimatik olarak hidroliz olur, pirimidin aglikon, divisin ve izouramil oluşur. Favizm nedeni olarak önerilen mekanizmada bu yeni bileşikler redoks siklusüne girip redükte glutasyonu tüketir, bu sayede serbest radikal ve H₂O₂ oluşumuna yol açar^{12,28,29}.

2.4.1.3. Enfeksiyona Bağlı Hemolitik Anemi

G6PD enzim eksikliği olan hastalarda spontan veya enfeksiyona bağlı hemolizin mekanizması çok anlaşılır değildir. Bu hemolitik reaksiyonların bu tipinde rol alan lökositlerin fagositozu ile H₂O₂'in oluşumu tartışmalıdır².

G6PD enzim eksikliği gözlenen bireylerde ateşli hastalık sonrası ılımlı anemi aniden gelişebilir hatta bazı olgularda ağır anemi yani hemoglobinin düzeyi 3-4g/dL'ye düşebilir. Birçok virüs ve bakterinin hemolize neden olduğu rapor edilmişse de en önemli olanları hepatit, pnömoni ve tifodur. Üst solunum yolları veya sindirim sistemini etkileyen viral enfeksiyonların G6PD enzim eksik olan çocuklarda bakteriyel enfeksiyonlara göre daha şiddetli hemolize neden olduğu rapor edilmiştir^{2,30}.

2.4.1.4. Herediter Non-sferositik Hemolitik Anemi

Herediter non-sferositik hemolitik anemi, G6PD enzim eksikliğinin oldukça nadir gözlenen bir sonucudur ve nadir mutasyonlara sahip bireylerde ortaya çıkmıştır.. İlk defa yeni doğan ve çocukluk çağında rapor edilmiştir. G6PD Akdeniz varyantını taşıyan bazı hastalarda da herediter non-sferositik hemolitik anemiye rastlanmış ve bazılarında da hemoliz gözlenmiştir. Oldukça hafif seyreden olguların olmasına rağmen transfüzyona bağımlı hastalar da rapor edilmiştir. Morfolojik olarak anemi, normokrom ve normositerdir. Retikülositoz gözlenirken aşırı miktarda sferosite rastlanmadığı için herediter non-sferositik hemolitik anemi adını almıştır^{12,31-36}.

2.4.1.5. Yeni doğan Sarılığı

Yeni doğan sarılığı tüm yeni doğan da görülebilir fakat kalıcı olduğunda G6PD bundan sorumlu tutulabilir. Yeni doğan sarılığı 15 mg/dL'den yüksek serum bilirubin düzeyi ile tanımlanmıştır. Klinik çalışmalar G6PD enzim eksikliği olan yeni doğanlarda şiddetli hiperbilirubinemiye eğilim olduğunu göstermiştir. Sarılık oldukça ciddidir ve eğer tedavi edilmezse kernikterus ile sonuçlanabilir. Yeni doğan sarılığı ölüme veya kalıcı nörolojik hasarlara neden olabilmektedir^{21,37-39}.

G6PD enzim eksikliği olan yeni doğanın immatur karaciğerleri bilirubini yetersiz olarak metabolize eder. Bu yeni doğanda anemi görülmez, CO düzeyinde artış ve eritrosit ömürleri kısalmır. Yeni doğanda üridindifosfoglukuronatglukuronosil transferaz 1 (UDPGT-1) geninin promotor yöresindeki bir mutasyon yetişkinlerde Gilbert sendromu ile ilişkilidir^{2,36}.

2.4.1.6. Diyabetik Ketoasidoz

Diyabetik ketoasidozun G6PD enzim eksikliği olan bireylerdeki hemolizin bir nedeni olabileceği düşünülmektedir. Ancak G6PD enzim eksikliği olan diyabetik ketoasidozlu 36 olgudan sadece 10'unda hemoliz görülmüştür².

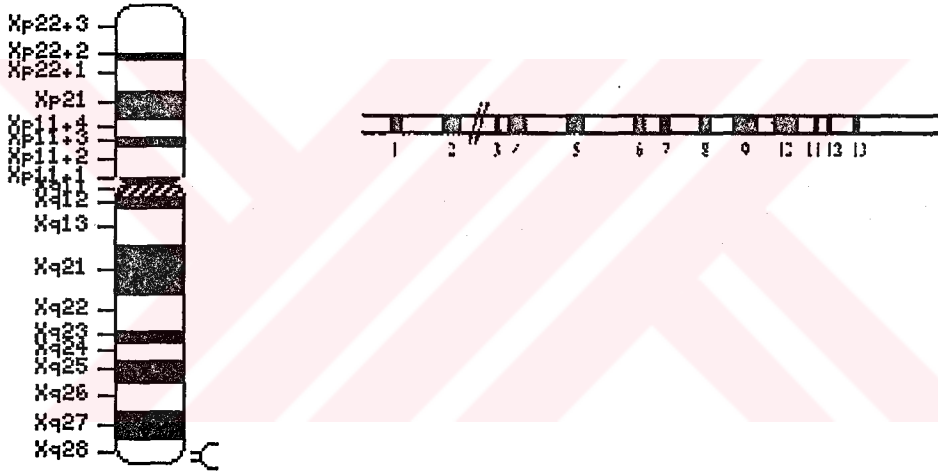
2.4.1.7. Diğer Dokular

G6PD Akdeniz, G6PD A⁻ gibi çok rastlanan G6PD varyantı taşıyan bireylerin lökosit sayıları ve fonksiyonlarında bir defekt olduğu birkaç olguda bildirilmiştir. G6PD enziminin düşük aktivite göstermesi veya bozuk sentezine bağlı olarak gözde katarakt oluşumuna neden olmaktadır. Göz merceği sülfidril gubu bakımından zengin bir protein içermektedir. Okside ajanlar tarafından redükte glutatyon düzeyinin azalması veya enzimin yeterince çalışmaması göz merceği proteinlerinin okside olmasına yol açmaktadır. Bu proteinlerin -SH gruplarının okside edilmesiyle proteinler denatüre olmakta ve inklüzyon cisimcikleri halinde çökerek katarakt oluşumuna neden olmaktadır^{2,40-42}.

ACHT stimülasyonu sonrası kortizol seviyesindeki artışın ve insulin salınımındaki azalmanın G6PD enzim eksikliği olan erkeklerde görüldüğü rapor edilmiştir. Ayrıca zencilerde yapılan bir araştırmada ise hipertansiyonun G6PD A ve G6PD A⁻ varyantını taşıyan bireylerde daha sık olduğu bildirilmiştir².

2.5. G6PD'nin Genetik Özellikleri

G6PD'nin yapısını oluşturan gen X kromozomunun subtelomerik yöresinde q28 lokusunda yerleşmiştir. G6PD geninin X kromozomu üzerindeki genel yerleşimi Şekil 2.4'de gösterilmiştir⁴³⁻⁴⁷.



Şekil 2.4. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz geni

G6PD geni 13 eksondan ve 12 introndan oluşur. Enzimin fonksiyonunu belirleyen G6PD geninin bu genin kodladığı mRNA amino asit dizisi ve büyüklüğüdür. G6PD geni 18,5 kb ve genin kodladığı mRNA ise 2269 baz çifti uzunluğundadır⁴⁸⁻⁵¹.

Kodlama dizisi ekson 2'den başlar, ekson 2 ve 3 arasındaki intron 9857 baz çiftinden oluşmuş olup çok uzundur. Bir düzenleme fonksiyonu olduğu düşünülen sitidinlerin metilasyonu 3' ucunda gerçekleşmektedir. Genin kodlama dizilimi 1545 baz çifti uzunluğunda olup 515 amino asitlik G6PD proteinini üretmektedir. Aktif enzim

formunda her biri 59,265dalton moleküler ağırlığa sahip 2 veya 4 aynı alt birimden oluşabilir. G6PD enzimi sülfidril gruplarınca zengindir ve her alt birim 11 sülfidril grubu içerir^{35,52-54}.

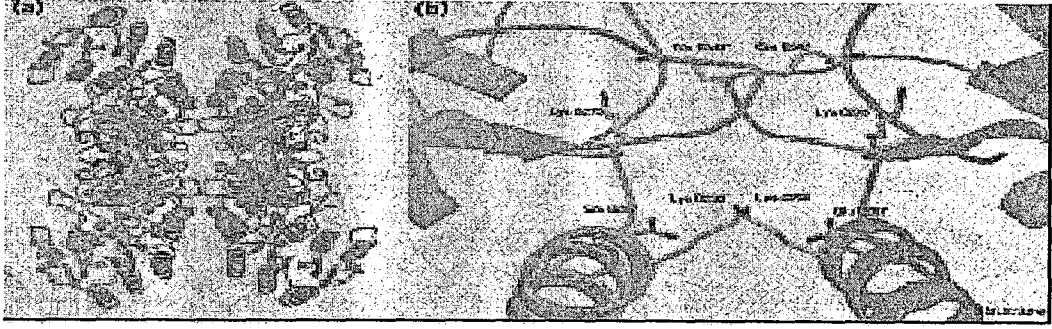
Çizelge 2.2. İnsan G6PD'sinin Moleküler Özellikleri

DNA	
Gen uzunluğu	18,5
Ekson sayısı	13
Kodlanan eksonlar	12
MRNA	
Nükleotit sayısı	2269
5' kodlanmayan bölge	69
Kodlanan bölge	1545
3' kodlanmayan bölge	655
Protein	
Amino asit sayısı	515
Moleküler ağırlık	59,265
Aktif enzimin moleküllerinin subünit sayısı	2 veya 4
Her subünitteki NADP'ye bağlanan molekül sayısı	1
Moleküler spesifik aktivite (IU/ nmol)	13

2.6. G6PD'nin Yapısal Özellikleri

Aktif G6PD enzimdeki dimer \leftrightarrow tetramer formları denge halindedir. Yüksek pH ve iyonik şiddet yapıyı dimer haline geçirirken düşük pH tetramer yapının oluşmasını sağlar. Ayrıca EDTA, NADPH ve G6P dimer yapının oluşumuna engel olurken NADP ve metal iyonları tetramer yapının oluşumunu sağlar (Şekil 2.5.)⁵⁵.

Dimer ve tetramer formlarının katalitik bölgeleri içinde inaktif monomerlerin birikimi NADP'nin varlığına ihtiyaç duymaktadır. Böylece NADP'nin hem bir yapısal komponent hem de reaksiyonun bir substratı olarak enzime bağlandığı görülmektedir. *Leuconostoc mesenteroides*'ten izole edilen G6PD'nin kristal yapısında 386-387. bölgelerinden 36Å uzaktaki bağlanma bölgesinin histidin 201 olduğu rapor edilmiştir^{56,57}.



Şekil 2.5. a) G6PD'nin tetramer yapısı b) Tuz köprüleri

İnsan G6PD'si ve diğer türlerin G6PD dizisi karşılaştırıldığında %30 homoloji bulunduğu gözlenmiştir. Bu dizilerden ancak iki sıranın korunduğu rapor edilmiştir⁵⁷.

1. 198-205 rezidüsü (RIDHYLGK)

2. 38-44 rezidüsü (G_{xx}GDL_x)

38-44 rezidüsü dinükleotit bağlanma bölgesidir ve parmak izi bölgesi olarak adlandırılır. *Leuconostoc mesenteroides*'ten izole edilen G6PD'nin üç boyutlu yapısı insan G6PD'si ile homoloji gösterdiği için model olarak seçilmiştir⁵⁸.

G6PD'nin kristal yapısı asimetrik yapıda olan 8 monomerdan (tetramer ABCD ve EFGH) oluşur. Koenzim domaininin çoğu rezidüsü ve $\beta+\alpha$ domaininin hemen hemen bütün rezidüleri nonkristalografik simetri (NCS) ile belirlenmiştir. C terminalindeki 4 rezidünün, koenzim domainindeki 10 rezidünün ve N terminal bölgenin düzensiz olduğu belirlenmiştir. Ayrıca her dimer ve tetramer yapıda asimetrik yapıların (AB,AC,AD,EF,EG,EH gibi) aynı olduğu da gösterilmiştir⁵⁹.

Klasik bir $\beta-\alpha-\beta$ dinükleotit bağlanma domaini olarak kabul edilen 31-200 rezidüsü, β ucundaki GASGDLA parmak izi dizisinden katlanmaktadır. $\beta+\alpha$ domaini ise (201-515 rezidü) antiparalel β tabakanın 9 kere katlanmasıyla oluşmaktadır. Lis (205)'in insan G6PD'sinin katalizlenmesi için esansiyel olduğu ve 201. (His)'in de *Leuconostoc mesenteroides*'ten izole edilen G6PD enziminde substrat bağlanma bölgesi için önemli olduğu bildirilmiştir^{59,60}.

İnsan G6PD'sinin dimer uzama bölgesi A ve B subunitlerinin $\beta+\alpha$ domainleri arasındadır. Dimer şekli toplam 2856 Å² dir ve monomer yüzeyinin % 13'ünü oluşturmaktadır. 31'i hidrofilik rezidü olmak üzere toplam 57 rezidü içerir. Bu rezidüleri yüksek oranda yapılarını koruyamazlar. Hidrofilik ve yüklü yüzey, β tabakanın N

terminaline katılan 421.Asp ile hidrojen bağı oluşturur. Yüzey dimerlerinin her birinde Glu (206)- Lys (407) ve Glu (419)-Arg (427) arasında tuz köprüsü vardır. Bunlardan sadece 407.Lys tamamen korunmuştur⁵⁹.

2.6.1. NADP Bağlanması

İyi düzenlenmiş NADP⁺, her bir subunitin C terminal bölgesiyle β tabakası arasında bulunan $\beta+\alpha$ domainine oturmaktadır. Bu atomlardan herbiri aktif bölgeye 16 Å uzaklıktadır. NADP'nin bağlanma bölgesi yapısal olarak önem taşımasına rağmen koenzim olarak önemli değildir. Proteinin hemen hemen tamamen pozitif yüklü olan bağlanma bölgesi %50 hidrofilik ve %50 hidrofobik yüzeyden oluşur ve NADP protein içine %77 oranında gömülüdür. Proteine bağlanan bir nükleotit parmak izi dizisi yoktur ve hepsi bir subunitin yan zincir atomlarından yapılmıştır. NADP'nin aromatik halkası π elektron bulutları arasında sandeviç yapıdadır. Adenin bazı (Tyr) 503 ve (Arg) 487 arasında, nikotinamid ise (Try) 509 ve (Try) 401 arasında yer alır. 2' fosfat ise (Arg) 487, (Arg) 357, (Lys) 238 ve (Lys) 366 amino asitlerine hidrojen bağları ile bağlıdır. Nikotinamitin amid fonksiyonu ile (Arg) 393 ve (As) 421 interaksiyondayken bifosfat diğer arjinin ile interaksiyona girer. (Arg) 487'nin rolü birkaç enzimdeki NADP⁺ bağlanma bölgesinde olduğu gibi tipiktir. Her bir NADP⁺ bir subunitte tamamen bağlıdır. Bununla birlikte ikinci subunitin protein rezidüsünden sadece 7Å, dimerden ise 14 Å uzaktadır. NADP⁺ ligantlarından birisi olan 421.Asp dimer yüzeyinin merkezinde yer alır. NADP yerinden çıkarıldığında subunitin konformasyonu kadar subunitlerin fonksiyonları da etkilenir⁵⁹⁻⁶¹.

2.6.2. N-Terminal Bölge ve Disülfid Köprüsü

İnsan G6PD'sinin ilk 30 rezidüsünde yoğunluk gözlenmemiştir. Sürekli elektron yoğunluğu N-terminal bölgeden çok uzakta olmayan 446.Cys rezidüsünde gözlenmiştir. Bu elektron yoğunluğu elektron haritalamasında kolaylıkla görülebilmektedir. Bütün subunitlerdeki 7 rezidüden 3'ü bu yoğunluk içindeki bir polialanin zincirini oluşturur.

Cys(13) ile bir disülfit köprüsünün C,D,E,F ve H subunitleri arasında olduğu açıktır. Kristalografik çalışmalar N-terminal bölgesinin simetri göstermediği için tetramer yüzeyine ulaşmadığı ve bundan dolayı tetramerin geri kalan kısmıyla temas etmediği gösterilmiştir. Rezidülerin arasındaki disülfit köprülerinin birçok hastalığa zemin oluşturabileceği konusu tartışmalıdır. Fakat subunitlerdeki sistein rezidüleri aktif moleküldeki disülfit köprüsünü oluşturmaktadır. Glisinle yer değiştiren hem 13.Cys hem de 446.Cys enzim aktivitesini düşürmektedir ve bu da bazı mutasyonlarda gösterilmiştir. Fakat N-terminal uçundaki ilk 25 rezidüdeki mutasyonlarda normal enzim aktivitesi ve artan termostabilite gösterilmiştir. Disülfit köprüsünün, enzimin katalitik aktivitesine veya dimerizasyonuna etki ederek mobil N-terminal bölgeyi önlediği düşünülmektedir⁵⁹.

2.6.3. Koenzim Bağlanma Bölgesi

Koenzim bağlanma domaininin β tabakasının C terminalindeki genel koenzim bağlanma bölgesi Arg(72) içermektedir. Bu bölgedeki mutasyonların kinetik ve yapısal analizleri etkilediğini göstermiştir. NADP⁺'nin fosfatının G6PD'ye bağlandığı ve koenzimin spesifitesinde kritik bir rolü olduğu gösterilmiştir. Yapılan araştırmalar sonucunda parmak izi peptidinden bağlanma olduğuna dair bazı kanıtlar vardır. Aynı zamanda subunit E'nin 72.Arg yakınlarındaki 4σ seviyesindeki elektron yoğunluğu farkı NADP'nin bu bölgeye bağlanabileceğini göstermektedir^{59,62}.

2.6.4. G6PD Eksikliği ve Üç Boyutlu Yapısı

G6PD enzim eksikliğinin biyokimyasal özellikleri ile moleküler özellikleri arasında bir ilişki olduğunun anlaşılması çok önemlidir. Mutasyon bölgelerinin büyük çoğunluğu (yaklaşık 60 tanesi) sınıf 1 olarak bilinen enzim eksikliğini kapsamaktadır. Sınıf 1'deki enzim eksikliğinde düşük stabilite ve aktivite gözlenir. Buradaki varyantların eksternal looptan 2-7 rezidü çıkarılması ile oluştuğu düşünülmektedir^{59,63}.

2.6.5. Dimer Yüzeyindeki Sınıf 1 Mutasyonları

Daha önceki çalışmalar, NADP⁺'nin her tetramer yapı için en fazla 8 ve en az 4 bağlanma bölgesinin olduğunu göstermiştir. Ayrıca ekson 10'daki mutasyonların dimer yüzeyi ile yakından ilişkili olduğu düşünülmüştür. Böylece dimer yüzeyinin enzim aktivitesi için çok önemli olduğu kabul edilmiştir. X Ray yapısı yüzeye yakın subunitlerin her birinin içinde NADP⁺ olduğunu göstermiştir. Dimer yüzeyine yakın mutasyonlar bu yapılanmayı etkilemektedir Sınıf 1'deki dimer yüzeyinde olan 14 mutasyon NADP⁺ molekülünün yapısıyla çok yakından ilişkilidir. E274K tetramer yüzeyinde olmasına rağmen E389G, R393G, R393H, V394L ve E398K her iki kategoriye de girer^{59,64}.

Hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağları ve tuz köprüleri büyük grupların bağlanmasını engeller. Bu güne kadar saptanan mutasyonlar genellikle K386E ve R387H, β tabakasında olduğu gözlenmiştir. Ana zincirdeki atomlar dimer yüzeyin oluşumunu sağlamaktadır. Bu varyantlar NADP⁺'den 8Å uzakta olmasına rağmen düşük NADP⁺ konsantrasyonuna karşı sensitiftir. Farklı yükler dimer yüzeyini etkileyerek ana zincir üzerinde modifikasyonlara neden olabilirler. β L, β M ve β N hem NADP⁺ bağlanma rezidüsü hem de yüzey olarak hareket ettiği için, NADP⁺ konsantrasyonu ile stabilite arasında bir ilişki olduğunu düşündürmektedir⁵⁹.

β M ve β N, M405F ve E416K arasındaki sınıf 1 mutasyonları NADP⁺ den uzakta, uç kısımdaki dimer yüzeyinin bir bölümünde bulunmaktadır. Hem yan zincir hem ana zincir atomlarıyla dimer oluşturabilen bu bölge, çeşitli mutasyonlarla engellenmektedir⁵⁹.

β M ve β N dönüşü içindeki G410C ve G410D mutasyonları da dimer yüzeyinde bulunmaktadır. Büyük rezidüler gizlenmiş durumdadır ve bu varyantların düşük termostabilitesi ana zincir konformasyonundaki glisin yer değişimiyle oluştuğunu ve bunun da stabiliteyi etkilediğini düşündürmüştür.

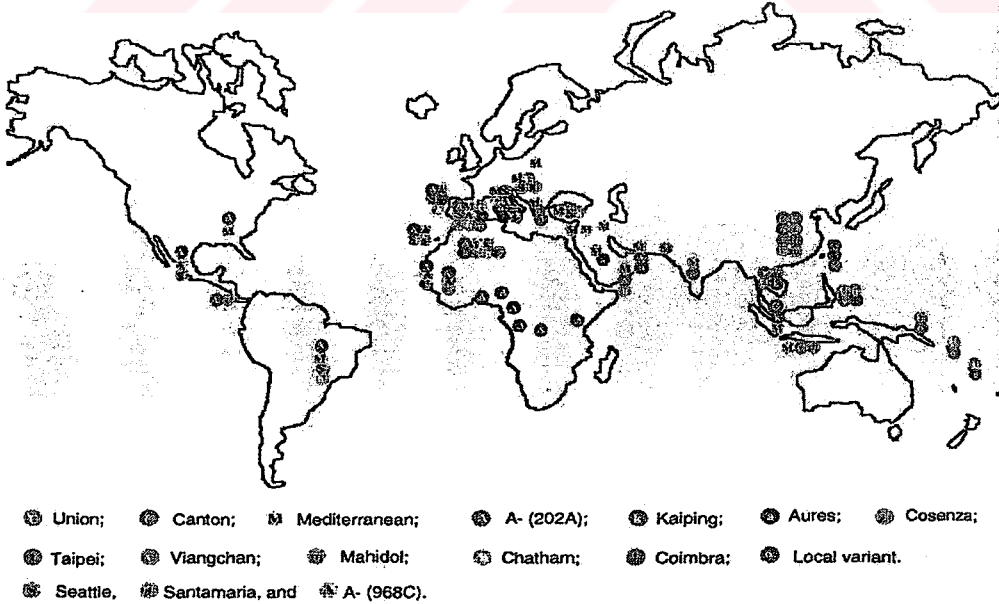
X-Ray yapısı NADP⁺'nin doğrudan bağlandığı rezidülerin mutasyonlarıyla sınıf 1 enzim eksikliklerinin nedenini açıklayabilmektedir. K238R'nin arjinini, 2-fosfatla bağ yapabilir ve R393H'nin histidini NADP⁺ ile zayıf interaksiyon yapar. α O- β O dönüşündeki G488V, G488S ve P489L sınıf 1 mutasyonları, adenin ve 2-fosfatla Arg(487) arasındaki interaksiyondaki glisin ve prolinin konformasyonel özelliklerinin önemini göstermektedir⁶⁵.

2.6.6. Disülfit Köprüsü ile İlişkili Mutasyonlar

13-446 disülfit köprüsü ile komşu rezidülerin bilinen üç mutasyonu vardır. G447R sınıf 1 mutasyonudur. α -heliksin sonundaki küçük ve fleksible glisin olmaksızın köprü oluşamaz. N-terminal ucundaki G14R'ye komşu 13.Cys mutasyonu, 447'deki aynı mutasyondan daha az etkilidir. Bu varyant sınıf 2'ye girer. Aynı şekilde sınıf 3 varyantı olan V12L terminal bölgedeki mutasyon da aynıdır. Böylece enzim daha az stabil hale gelmektedir. Disülfit köprüsünün sonundaki sterik etkileşimlerin daha az olduğu konusu tartışmalıdır⁵⁹.

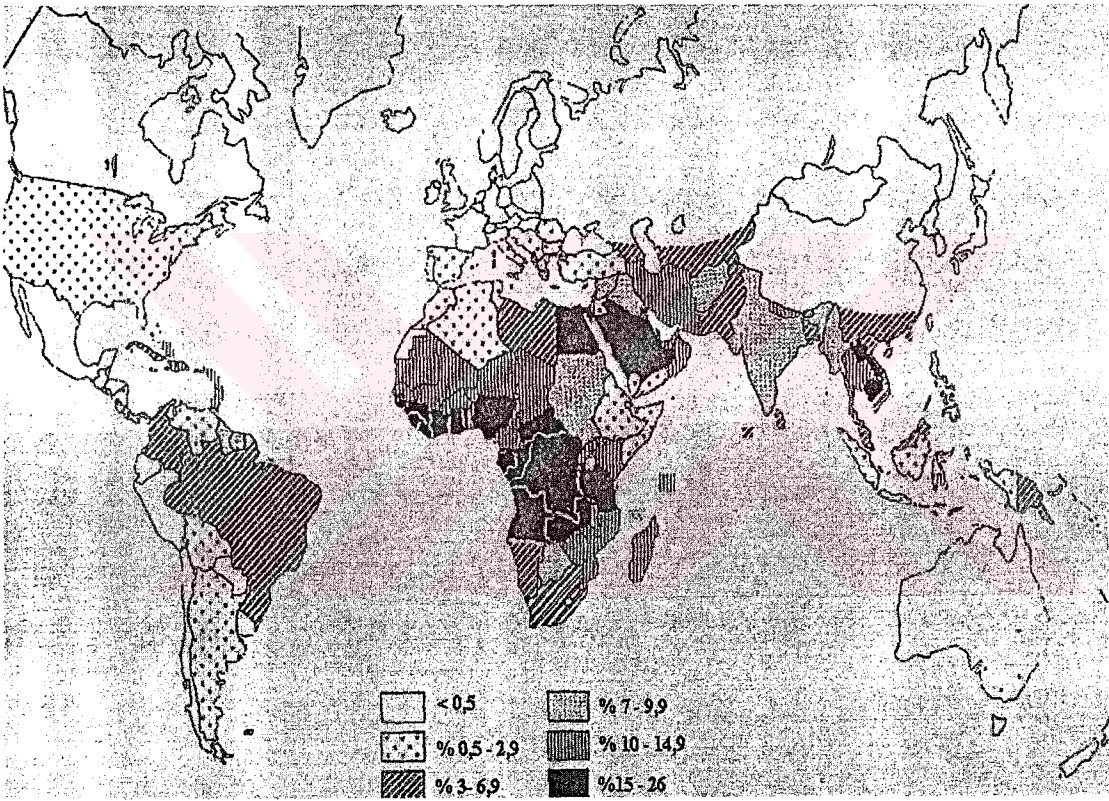
2.7. Genetik Polimorfizm, Populasyon Genetiği ve Sıtma

G6PD enzim eksikliği eritrositlerin en genel metabolik hastalığıdır. Dünyada 400 milyondan fazla insanın etkilendiği düşünülmektedir. G6PD enzim eksikliğinin dağılımı küresel olmasına rağmen tropikal ve subtropikal bölgelerde daha fazla rastlanmaktadır. İlk araştırmalar Beutler tarafından Yunanistan, Güney Çin ve Kanarya Adalarında yapılmıştır. Haplotip analizleri ise orijin belirlemede önemli bir yer tutmaktadır (Şekil2.6.).^{21,28,66-68}



Şekil 2.6. G6PD varyantlarının dünya üzerindeki dağılımı

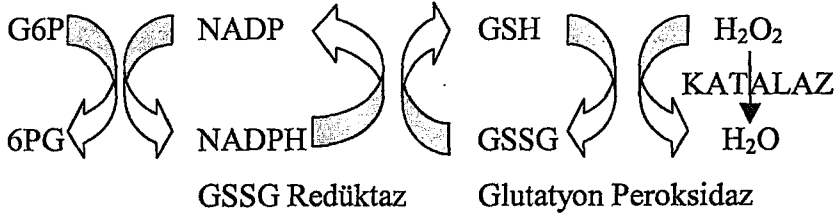
G6PD enzim eksikliği Afrikalı Bantu erkeklerinde %20, Afrika asıllı Amerikalılarda %12 ve Brezilya zencilerinde %8 oranında gözlenmektedir. Afrika asıllı Amerikalılarda kadınların %22'sinin heterozigot ve %1'inin de homozigot olduğu belirlenmiştir. Sardinya'nın bazı bölgelerinde bu oran %35'e kadar çıkarken İspanyol musevilerinde %60-70 oranında G6PD enzim eksikliği görülmektedir. Asya popülasyonundaki erkeklerde örneğin Kamboçya'da %14, Kuzey Çin'de %5,5 Hindistan'da %2,6, Japonya'da %0,1 ve Amerikan yerlilerinde de ender olarak rastlanmaktadır (Şekil 2.7.).^{21,69-71}



Şekil 2.7. G6PD eksikliğinin dünya üzerindeki dağılımı

G6PD enzim eksikliği sıtmanın yaygın olduğu bölgelerdeki hemizigot erkek ve özellikle heterozigot kadınlarda incelenmiş ve bu kişilerin *p falciparum*'un neden olduğu sıtmaya karşı dirençli oldukları saptanmıştır.^{25,72} Çünkü eritrosit içine giren parazit oksidatif stresi indükleyebilir. Enfekte hücre oksidatif pentoz fosfat yolundaki

G6P'nin artışı ile bu stresi kompanse edemez. Böylece GSH düzeyi düşer. G6PD normal ve defektif hücrelerin daha iyi korunması ve heterozigotlardaki makrofajların yüksek kapasitesi, G6PD mozaizmindeki artışın bir nedenidir. Bunun tersi olarak hemizigotlardaki makrofajlarının düşük oksidatif kapasiteleri nedeniyle enfekte hücreler yetersiz bir şekilde dışarı atılırlar. Ayrıca G6PD geninin polimorfizm dengesinin bu mekanizmada önemli olduğu düşünülmektedir (Şekil2.8).^{73,74}



Şekil 2.8 . Eritrositlerdeki G6PD'nin oksidan ajanlara karşı ana metabolik rolü

2.8. G6PD Enzimi ve Varyantları

Monomerik G6PD enzimi 515 amino asit içerir ve 59 000 Dalton ağırlığa sahiptir. *In vivo* G6PD'nin aktif formu NADP ile sıkıca bağlanmış bir dimer formundadır. G6P bağlanma bölgesi 205. amino asit, NADP'nin bağlanma bölgesi ise 386-387. amino asitlerdir^{50,75}.

Uluslararası anlaşmalarla enzim varyantları, biyokimyasal özellikleri (kinetik aktivite, elektroforetik mobilite, Km G6P ve NADP, farklı analogların kullanımı, ısı stabilitesi ve optimum pH) standardize yöntemlerle belirlenmiştir. Bugüne kadar 442 varyant bildirilmesine rağmen birçok varyantın moleküler düzeyde aynı olduğu ve bu mutasyon sayısının 140 kadar olduğu bildirilmiştir. Bunlardan çoğu missense mutasyonu taşımaktadır. Çok büyük delesyonlar ve çerçeve kayması mutasyonları hiç rapor edilmemiştir. Enzimin G6P ve NADP bağlanma bölgesinde mutasyon var ise bunun kronik hemolize neden olduğu bildirilmiştir (Çizelge 2.3.).⁷⁶⁻⁷⁸

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), G6PD enzim eksikliklerini hemoliz düzeyine göre beş sınıfa ayırmıştır⁷⁹.

Sınıf I : G6PD aktivitesi normalin %10 kadar altında ve kronik hemolitik anemiye neden olan varyantlar

Sınıf II : Şiddetli enzim eksikliği olan ve ılımlı hemoliz görülen varyantlar

Sınıf III : Normalin %10-60'ının altında aktiviteye sahip, ilaçlarla ve enfeksiyonla birlikte ılımlı hemoliz görülen varyantlar

Sınıf IV : Enzim eksikliği olan fakat hemoliz görülmeyen varyantlar

Sınıf V: Enzim aktivitesi yüksek olan varyantlar

Sınıf IV ve V varyantları klinik olarak belirti vermezler. Bunun için daha çok biyologların, genetikçilerin ve antropologların ilgisini çekmiştir.

G6PD B⁺: Enzimin doğal formudur ve diğer varyantların belirlenmesinde kullanılır. G6PD B⁺ 'ye çoğunlukla Kafkaslarda, Asyalılarda ve zencilerde rastlanmaktadır. Aktivitesi normal olup hemoliz görülmez⁷⁹.

G6PD A⁺ : İlk kez 1966 yılında saptanan G6PD A⁺, normal enzim aktivitesi gösterir ve G6PD B⁺'ye göre elektroforetik olarak daha hızlı göç eder. Bu varyantın oluşumuna 376. nükleotitteki A→G değişimi sonucu aspartik asitin asparajine dönüşümü neden olmaktadır⁸⁰⁻⁸³.

G6PD A⁻ : G6PD'nin en çok görülen varyantı G6PD A⁻'dir. Afrikalı zencilerde %20-30 oranında görülür. Normal katalitik özelliklere sahiptir, hemolize neden olmaz (Sınıf IV). G6PD B'den en önemli farkı elektroforetik olarak hızlı göç etmesidir. G6PD A⁺'dan ise yapısal olarak farklıdır. 126. amino asitinde asparajin yerine aspartat geçmiştir. G6PD A⁻ zencilerde primakine karşı hassasiyetten sorumludur. İlimli hemoliz görülür (Sınıf 3). Bu varyant Afrika asıllı Amerikalılarda %10-15 oranında görülür. Bu oran orta ve batı Afrika da da aynıdır. Ayrıca İtalya, İspanya gibi Güney Avrupa, Güney Doğu Asya, Orta Doğu ve Güney Amerika kökenli beyazlarda da görülmektedir. G6PD A⁻ varyantı taşıyan kişilerin kemik iliği hücreleri ve retikülositleri normal kişilere yakın olduğu halde yaşlı eriroisit sayıları azalmıştır. Hem enzim hem de aktivitesi unstabildir^{80,84-91}.

G6PD Akdeniz: G6PD Akdeniz varyantı 563. nükleotitteki C→T (Serin→Fenil alanin) değişimi sonucu meydana gelir ve ilk defa 1988 yılında rapor edilmiştir. Kafkaslarda ve Akdeniz kökenli insanlarda en çok rastlanan varyanttır. Enzimin aktivitesi oldukça azalmıştır ve şiddetli hemolize neden olur. Elektroforetik mobilitesi normaldir (Sınıf 2). Kinetik özellikleri ise Gd B, Gd A⁻ ve A⁺'dan oldukça farklıdır⁹²⁻⁹⁷.

Çizelge 2.3. En yaygın gözlenen G6PD varyantlarının kinetik özellikleri

Kinetik Özellikler	Gd B ⁺	Gd A ⁺	Gd A ⁻	Gd Akdeniz
% Eritrosit aktivitesi	100	90±10	14±6	<10
Elektroforetik göç	100	110	110	100
Km NADP (µM)	2,9-4,4	2,9-4,4	2,9-4,4	1,4±0,2
Km G6P (µM)	60±10	60±10	60±10	22,5±3,5
Analog kullanımı				
2dG6P	<4	<4	<4	25±2
Gal6P	7-15	-	-	20
dNADP	55-60	55	55	350
Ki NADP	9	6,7	13	16
Isı kararlılığı	Normal	Normal	Normal	Düşük
pH kararlılığı	Normal	Normal	Normal	Bifazik

2.9. Türkiye’de Saptanan G6PD Varyantları

G6PD enzim eksikliği dünya genelinde yaygın olduğu için en çok çalışılan kalıtsal hastalıklardan birisidir. Türkiye’de G6PD üzerine ilk çalışmalar 1949 yılında Demirağ, 1951 yılında Fakacelli ve Konstantinidu tarafından yapılmış ve favizm olguları olarak bildirilmiştir. G6PD eksikliği ile ilgili tarama çalışmalarında Türkiye genelinde enzim eksikliği %0,5, Eti Türklerinde ise %8,2 olarak saptanmıştır. Sipahioğlu Ege bölgesinde enzim eksikliğinin %2-9 oranında olduğunu rapor etmiştir. Çukurova’da 1979 yılında sıtmanın yaygınlaşması ve 30 000 dolayında sıtma olgusunun görülmesini takiben hastalığa karşı koruyucu bir ilaç olarak primakinin kullanımı sonucu ortaya çıkan hemolitik anemi olguları dikkati G6PD enzimi üzerine çekmiştir. Bölgede yapılan kalitatif tarama çalışmalarında G6PD enzim eksikliğinin yaygın olduğu gözlenmiştir. Bu güne kadar değişik araştırma gruplarının yaptığı tarama çalışmalarında enzim eksikliğinin frekansı farklı olarak rapor edilmiştir. Yüregir ve arkadaşlarının sayıca büyük bir grup üzerinde yaptığı çalışmada ise G6PD eksikliğinin %8,2 olduğunu bildirilmiştir. Tufanbeyli (%3,7) ve Ceyhan (%1,2) yörelerinde oran düşük olmasına karşılık Tarsus ve Antakya’da %17’ye varan enzim eksikliği saptanmıştır. Akoğlu ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır⁵.

Aksoy ve arkadaşları 1987’de Çukurova bölgesinde yaptıkları kinetik çalışmada Gd Adana, Gd Samandağ ve Gd Balcalı varyantlarını tarif etmişlerdir. Daha sonra Gd

Adana varyantının Gd Akdeniz ve 1311 polimorfik yöre mutasyonu taşıdığını göstermişlerdir. Aynı çalışma grubu 1989 yılında birisi ısıya dayanıklı üç yeni varyant daha tanımlamıştır. Türkiye’de ve Türk ailelerinde saptanan varyantlar Çizelge 2.4’de gösterilmiştir ^{5,98,99}.

Çizelge 2.4. Türkiye’de saptanan G6PD varyantları

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

2.10. G6PD Enziminin Patofizyolojisi

Normal enzim (G6PD B), in vivo şartlarda 62 gün yarılanma ömrüne sahiptir. Enzim aktivitesi azaldığı zaman bile yaşlı eritrositler yeterli G6PD aktivitesine sahiptir ve oksidatif strese karşı GSH düzeyleri korunur. Ancak hemoliz görülen G6PD varyantlarının yarılanma ömrü kısalmıştır. Retikülositlerdeki G6PD A⁻’nin aktivitesi normaldir ancak yarılanma ömrü 13 güne kadar düşmüştür. G6PD Akdenizin stabilitesi düşüktür ve yarılanma ömrü saatlerle ifade edilebilir²⁸.

G6PD enzimi eksik olan eritrositler enfeksiyon, ilaçlar ve bakla gibi oksidanlarla

karşılaştığı zaman GSH'ı hızla tüketir. Bu reaksiyon hücre yaralanmasının merkezini oluşturmaktadır. Sülfidril grubu içeren proteinlerin oksidasyonda görev aldığı ve GSH düzeyini düşürdüğü rapor edilmiştir. Denatüre sülfhemoglobin veya globinin oluşumu hemoglobin üzerindeki sülfidril gruplarının okside olmasına yol açar. Daha sonra insoluble yapılar, Heinz cisimcikleri ve disülfid köprüleri hücre membranına yapışır. Hemoglobin oksidasyonuna ek olarak spektrin dimerleri ve spektrin ile diğer proteinler arasında disülfid köprülerinin oluşması nedeni ile membran polipeptit agregatlarının birikmesi, membran sülfidril gruplarının direkt oksidasyonuna zemin oluşturmaktadır^{21,100-102}.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Cihazlar

1. Kan Sayım Aleti	Coulter Counter 1-890
2. Spektrofotometre	Shimadzu UV 260, Shimadzu UV 1601, 120-02
3. Hassas terazi	Mettler AJ100
4. Normal terazi	Mettler P1210
5. Çalkalayıcı	Köttermann, IRMA-Shaker
6. Derin dondurucu	Bosch
7. Buz makinası	Scotsman AF-10
8. PAGE sistemi	BIO-RAD
9. Manyetik karıştırıcı	Cambiamag RCD
10. Vorteks	Nüve NM 110, Electromag m16
11. Santrifüj	Eppendorf 5403, Sorvall GLC-2
12. Güç Kaynağı	Shandon Southern, Gelman Hawksley
13. Mikrosantrifüj	Beckman Microfuge E
14. Mikrodalga fırın	Arçelik
15. Elektroforez Tankı	Gelman, Pharmacia LKB, Bio-Rad
16. Etüv	Nüve EN500
17. pH metre	Hanna Instruments HI 8521
18. Otomatik pipetler	Gilson 0-10 μ L, 0-20 μ L, 0-100 μ L, 0-200 μ L 0-1000 μ L
19. Yüksek hızlı santrifüj	Sorvall RC5C
20. Isısal döngü cihazı	Pelkin Elmer Cetus DNA Thermal Cycler
21. DNA elektroforez sistemi	BIO-RAD
22. Fotoğraf makinası	Polaroid MP4
23. Filmler	Polaroid/siyah-beyaz Tip 52, 57

24. UV kaynagi FotoDyne

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- | | |
|--|---------------|
| 1) DE-52 | Whatman |
| 2) Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | Merck |
| 3) NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O | Merck |
| 4) EDTA | Sigma |
| 5) NAD | BDH Chemicals |
| 6) 2- Merkaptoetanol | Sigma |
| 7) Dijitonin | Sigma |
| 8) β-NADP | Sigma |
| 9) D-glukoz-6-fosfat | Sigma |
| 10) deamino NADP | Sigma |
| 11) D-galaktoz-6-fosfat | Sigma |
| 12) 2-deoksi-glukoz-6-fosfat | Sigma |
| 13) MgCl ₂ ·6H ₂ O | Merck |
| 14) Tris-HCl | Sigma |
| 15) Tris-Baz | Sigma |
| 16) MTT | Sigma |
| 17) PMS | Sigma |
| 18) KCl | Merck |
| 19) NaCl | Merck |
| 20) NH ₄ Cl | Sigma |
| 21) NH ₄ HCO ₃ | Sigma |
| 22) Proteinaz K | Sigma |
| 23) Fenol | Merck |
| 24) Kloroform | Merck |
| 25) Sodyum Dodesül Sülfat | Sigma |
| 26) TEMED | Merck |
| 27) APS | Sigma |
| 28) Agaroz | Sigma |
| 29) Akrilamid | Merck |
| 30) Bisakrilamid | Sigma |

- | | |
|--------------------------|------------|
| 31) Ethidium bromür | Boehringer |
| 32) Gliserol | Merck |
| 33) Hidroklorik asit | Merck |
| 34) Sığır serum albumini | Sigma |
| 35) Taq polimeraz | Boehringer |
| 36) Nükleotid karışımı | Promega |
| 37) Primer B | |
| 38) Primer J | |
| 39) Taq DNA Polimeraz | Boehringer |
| 40) MboII Enzimi | |



3.2. Örnekleme

Kan örnekleri İçel ili Anamur ilçesi 2 nolu sağlık ocağı ile ortaklaşa tarama amaçlı olarak toplanmıştır. Kan örnekleri yaklaşık 5mL×2 EDTA'lı tüplere alınmış ve laboratuvara transfer edilmiştir. Laboratuvara gelen kan örneklerine protokol numarası verilerek kan sayımları, hemoglobin elektroforezleri Hb A₂ ve Hb F ve G6PD enzim düzeyleri belirlenmiştir.

Enzim düzeyi düşük olan örnekler DE-52 iyon değiştirici kolonuyla kısmi olarak saflaştırılıp kinetik çalışma yapılmıştır. Ayrıca saflaştırılan örneklerin DNA'ları izole edilerek moleküler düzeyde çalışılmıştır.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hematolojik Çalışma

3.3.1.1. Hemoglobin Elektrofrez

Alkali pH' da hemoglobin molekülü negatif yüklüdür ve elektriksel alanda anoda doğru göç eder. Yüzey yük değişikliği olan yapısal varyantlar ise farklı göç eder. Alkali ortamda selüloz asetat kağıdı üzerine uygulanan kan örneklerine, elektriksel güç uygulanarak hemoglobin tiplendirilmesi yapılır¹⁰³.

3.3.1.1.1. Ayıraçlar

1.Katot tamponu	pH 8.6
Na- barbital	5.15 g
Barbital	0.92 g

Bir miktar distile suda çözülür, pH'sı 8,6'ya ayarlanarak 1 litreye distile su ile

tamamlanır.

2. Anot tamponu	pH 9.1
Tris	25.2 g
EDTA	2.5 g
Borik asit	1.9 g

Bir miktar distile suda çözülür, pH'sı 9,1'e ayarlanarak 1 litreye distile su ile tamamlanır..

3. Boya

5mg Ponceau S 100mL %5'lik trikloroasetik asitte çözülür.

4.Yıkama ayıracı

Asetik asit %5'lik

5. Elektforez koşulları

Süre	45dk
Voltaj	190-200 volt
Amper	0.75 mA/ cm

3.3.1.1.2. Yöntem

1.Hemolizat hazırlanması: EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri santrifüj edilerek plazmasından ayrılır.

2. Eritrositler serum fizyolojik ile üç defa yıkanır.

3. Hemoliz edici olarak 800 µl saf su, 60 µl eritrosit üzerine eklenerek karıştırılır.

4.Eşit hacimde anot ve katot tamponu (100mL + 100mL) içerisinde sellüloz asetat kağıdı ıslatılır.

5. Filtre kağıdının arasında hafifçe kurutularak üzerine hemolizat tatbik edilir.

6.Numune katotik olarak uygulanır.

7.Elektroforez bitiminde kağıtlar 5 dk ponceau S içerisinde boyanır.

8.Boya artıkları %5'lik asetik asit ile temizlenir.

9.Fraksiyonların miktarlarını bulunmak için dansitometrede değerlendirilir.

3.3.1.2. Mikrokolon Kromatografisi ile Hb A₂ Ölçümü

Mikrokolon kromatografisi ile Hb A₂ fraksiyonunun ayırımı hemoglobin molekülü üzerindeki yüklü gruplar ile iyon değiştirici rezin üzerindeki yüklü gruplar arasındaki etkileşime dayanır.

Hemolizat rezin üzerine adsorbe edildiğinde özel hemoglobin komponenti spesifik pH'da ve / veya iyonik gücü olan tampon (geliştirici) kullanılarak kolondan süzülür. Geliştiricinin pH ve iyonik gücü değiştirilerek diğer komponentlerin süzülmesi sağlanır. Böyle bir sistemde Hb komponentlerinin ayırımı; geliştiricinin pH yada iyonik gücü, rezin tipi, örnek miktarı, kolon boyutları, gradyan ve akım hızı gibi faktörlere bağlı olarak gerçekleştirilir.

Kolon kromatografisi yöntemi ile Hb A₂'nin uygun pH'da glisin- KCN geliştiricileri kullanılarak kantitatif olarak ölçülmesi esasına dayanır.¹⁰⁴

3.3.1.2.1. Ayıraçlar

1.Geliştirici A:

Glisin	0.2 M
KCN	0.01 M

1 litre saf suda çözülür.

2.Geliştirici A 200

Glisin	0.2 M
KCN	0.01M
NaCl	0.2 M

1 litre saf suda çözülür.

3.3.1.2.2. Yöntem

1.Bir birim DE-52 üzerine yaklaşık olarak üç birim geliştirici A eklenerek karıştırılır ve süpernatant atılır. Bu işlem en az 3-4 kez tekrarlanır. Reçine kullanıma

hazırdır. Reçine 3-4 hafta saklanabilir.

2.Reçine ile kolon doldurulur.

3.Kolon dengelenir.

4.Reçine kurumaya başlamadan 60 µL hemolizat aplike edilir.

5.Hemolizatın reçineye adsorbe olması için 4-5dk beklenir.

6.Kolona geliştirici A eklenir. Kolon, süzüntü 8mL olana kadar yıkanır.

7.Geriye kalan hemoglobinler geliştirici A200 eklenerek başka bir temiz tüpe toplanır. Bu süzüntü daha sonra geliştirici A200 ile 25mL'ye tamamlanır.

8.İki ayrı tüpte toplanan fraksiyonların absorbanı 415nm'de saf suya karşı spektrofotometrik olarak ölçülür. Aşağıdaki hesaplama yapılır.

$$\% \text{HbA}_2 = \frac{\text{ODA}_2 \times 100}{\text{ODA}_2 + 3,125} \times \text{OD Total}$$

3.3.1.3. Modifiye Betke Yöntemiyle Fetal Hemoglobin (Hb F) Ölçümü

Hemoglobinler içinde alkaliye karşı en dirençli olanı Hb F'dir. Bu özelliğinden faydalanılarak Hb F miktarı belirlenmektedir. NaOH ile denatürasyondan sonra diğer hemoglobinler amonyum sülfatla çöktürülerek filtre kağıdından süzülür. Hb F içeren berrak süpernatant solüsyonunun absorbanı 540nm'de okunur. Daha sonra total hemoglobinin absorbanı ile karşılaştırılarak yüzdesi hesaplanır.

3.3.1.3.1. Ayıraçlar

1.Siyantür ayırıcı

$\text{K}_3\text{Fe}_3(\text{CN})_6$ 0.2g

KCN 0.2g

1 litre saf suda çözülür.

2.Doymuş amonyum sülfat

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70g

1 litre saf suda çözülür.

3.3.1.3.2. Yöntem

1. Tüm ayıracılar kullanım öncesi oda sıcaklığına getirilir.

2. 0.2 mL hemolizat üzerine siyanür ayracı eklenerek vortekslenir ve 10dk bekletilir.

3. Bu karışımdan 2.8 mL alınarak üzerine 0.2 mL NaOH eklenir ve vortekslenir. Tam 2dk bekletilir.

4. İki dakika sonunda bu ayıracının üzerine 2mL doymuş (NH₄)₂SO₄ eklenir ve vortekslenir. 15-20dk bekletilerek filtre kağıdından geçirilerek süzülür.

5. Süzüntü 540nm'de okunur.

6. Total hemoglobinin belirlenmesi için ilk karışımdan 0.4 mL alınarak üzerine 6.75mL saf su eklenip karıştırılır ve yine 540nm'de okunur. Hb F oranı aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$\text{Hb F} = \frac{\text{OD F} / \text{OD Total}}{10,1} \times 100$$

3.3.1.4. Siyanomethemoglobin Yöntemi ile Hemoglobin Ölçümü

Drabkin ayracında bulunan ferrisiyanür, hemoglobindeki +2 değerlikli demiri +3 değere yükseltgeyerek, hemoglobini methemoglobine dönüştürür. Bu ise potasyum siyanür ile birleşerek stabil olan siyanomethemoglobini oluşturur. Siyanomethemoglobinin 540 nm dalga boyunda verdiği optik dansite ölçülerek hemoglobin miktarı saptanır¹⁷.

3.3.1.4.1. Ayıraç

1. Drabkin ayracı

K₃Fe (CN)₆ 0.20 g

KCN 0.05 g

NaHCO₃ 1 g

Saf su ile 1000 mL' ye tamamlanır.

3.3.1.4.2. Yöntem

Ayıraçlar tüplere aşağıdaki şekilde konulur (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. Hemoglobin ölçümü

Ayıraç	Kör	Örnek
Hemolizat (µL)	-	20
Drapkin ayıracağı (mL)	5	5

15 dakika oda ısısında bekletilip spektrofotometrede 540 nm dalga boyunda transmittans okunarak standart eğriden değerlendirilir.

3.3.2. Oksidatif Hasarın Ölçümü

3.3.2.1. Malondialdehit (MDA) Ölçümü

Malondialdehit lipid peroksidasyonunun sekonder bir ürünü olup, lipitlere ait peroksidasyonun belirlenmesinde kullanılan önemli bir parametredir. MDA, aerobik şartlarda, pH 3.4'te tiyobarbitürik asit (TBA) ile 95°C'de inkübasyonu sonucu pembe renkli bir kompleks oluşturur, bu kompleks spektrofotometrede 532nm'de ölçülür¹⁰⁶.

3.3.2.1.1. Ayıraçlar

1. %8.1'lik Sodyum Dodesül Sülfat (SDS)
2. %20'lik Asetik Asit (CH₃COOH)
Doymuş NaOH ile pH:3.5'e ayarlanır.
3. %0.8'lik Tiyobarbitürik asit (TBA)
Doymuş NaOH ile pH: 3.5' e ayarlanır

4. n-Butanol/Piridin (nBu/Pri) Ayıracı (15/1)

n-Butanol 14 mL

Piridin 1 mL

Günlük olarak hazırlanır.

5. Stok Standart

1,1, 3,3 tetramethoksiopropan (yoğunluk= 0.99 g/mL).

3.3.2.1.2. Standart Eğri Çizimi

Stok standarttan 6.6 µL alınıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanarak günlük standart hazırlanır. 10, 20, 40, 60, 80 ve 100 nmol/mL konsantrasyonunda çalışma standartları hazırlanır. (Çizelge 3.2)

Çizelge 3.2. MDA standart eğrisi

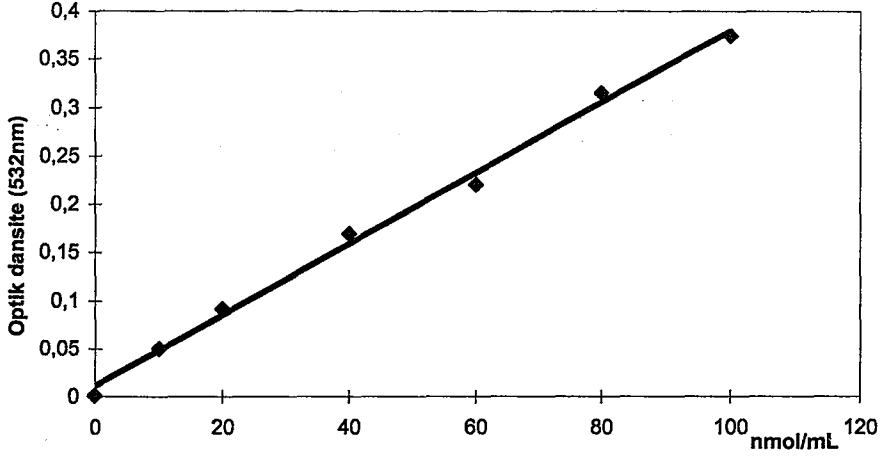
Ayıraçlar	0	1	2	3	4	5	6
Konsantrasyon (nmol/ mL)	0	10	20	40	60	80	100
Standart (mL)	-	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
%8.1 SDS (mL)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
%20 HAc (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
%0.8 TBA (mL)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Saf Su (mL)	0.8	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7

95°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra soğutularak üzerine n-butanol/ piridin ilave edilip vortekslenir.

Saf su (mL)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
nBu/Pri (mL)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir üstteki organik kısım alınıp 532 nm'de

absorbans okunur. Standart eğri grafiği çizilir (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Malondialdehit standart eğrisi.

3.3.2.1.3. Yöntem

Örnek çalışması için ayraçlar aşağıdaki çizelgede belirtildiği şekilde hazırlanır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.3. MDA ölçümü

Ayraçlar	Kör (mL)	Standart (mL)	Örnek (mL)
Std (10 nmol/ μ L)	-	0.1	-
Plazma (mL)	-	-	0.1
%8.1 SDS (mL)	0.2	0.2	0.2
%20 Asetik asit (mL)	1.5	1.5	1.5
%0.8 TBA (mL)	1.5	1.5	1.5
Saf su (mL)	0.8	0.7	0.7

95°C'de 30 dakika inkübe edilip, soğutulur.

Saf su (mL)	1.0	1.0	1.0
-------------	-----	-----	-----

nBu/Pri (mL)	5.0	5.0	5.0
--------------	-----	-----	-----

Ayrıçlar vortekslenir. Daha sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilip üstteki organik kısım alınarak 532 nm'de absorbans okunur.

Hesaplama

Optik dansite standart eğriden karşılaştırılarak MDA düzeyi nmol/mL olarak hesaplanır.

3.3.3. Kinetik Çalışma

3.3.3.1. G-6-PD Enzim Aktivitesinin Kantitatif Ölçümü

G6P, G6PD enzimi varlığında 6-fosfoglukolaktone dönüşmektedir. Yöntem bu dönüşüm sırasında indirgenen NADP'nin 340nm'deki absorbans değişikliğinin belirli bir süre (5dak) ölçümü temeline dayanmaktadır. Reaksiyon 37 °C'de, ışık yolu 1cm olan kuvarz küvetlerde gerçekleştirilmekte ve hesaplamalar absorbans artışının 5 dakika boyunca doğrusal olduğu zaman aralığında OD değerleri dikkate alınarak yapılır¹⁶.

3.3.3.1.1. Hemolizat Hazırlanması

1. EDTA'lı tüpe alınan 5 mL kan, 5 dakika boyunca 2500-3000 devirde santrifüj edilir.

2. Plazma atılır, serum fizyolojik eklenir ve yavaşça karıştırılır. 5 dakika daha 2500-3000 devirde santrifüj edilir. İşlemler iki kere daha tekrarlanır.

3. 1 hacim eritrosit pelleti

2 hacim 5 mM sodyum fosfat tamponu

1 hacim % 0,02 Digitonin

Eritrositler hemoliz edilir.

4. Hazırlanan hemolizata ait G-6-PD enzim aktivitesi saptanır ve hemoglobin içeriği siyanmethemoglobin yöntemi ile ölçülür.

3.3.3.1.2. Yöntem: G-6-PD enzim aktivite tayini (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4. G6PD ölçümü

Ayıraç	Örnek (mL)	Kör (mL)
Saf su	1,95	3,0
1 M Tris tamponu	0,3	—
0,1 M MgCl ₂	0,3	—
2 mM NADP	0,3	—
6 mM G6P	0,3	—
Hemolizat	0,15	—
Toplam Hacim	3,0	3,0

Hazırlanan örnek tüpündeki tepkime, 1 cm ışık yollu kuvars küvetlerde, 37°C’de, spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda 5 dakika boyunca takip edilir. Oluşan NADPH’ in oluşturduğu optik dansite farkından yola çıkılarak örneğin G-6-PD enzim aktivitesi saptanır.

$$\text{Enzim aktivitesi (Ü/mL)} = \frac{\Delta\text{OD}}{\text{Zaman (dk)}} \times \frac{\text{toplam hacim}}{\text{hemolizat/elüsyon hacmi}} \times \frac{1}{6,22^*}$$

Bu formüle göre hesaplanan G-6-PD enzim aktivitesi Ü/gHb olarak verilir.

*1µmol NADP, 1cm ışık yoluna sahip küvette 6,22 OD₃₄₀ değeri vermektedir.

3.3.3.2. G-6-PD Enziminin Kısmi Saflaştırılması

İyon değiştirici kromatografi, iyonik yüklerin işaret ve büyüklük bakımından gösterdikleri farklılıklar saflaştırma işleminde esas alınır. Bu teknik inorganik iyonların, amino asitlerin, nükleotitlerin ve proteinlerin ayrıştırılmasında yaygın olarak kullanılır. Katyonları ayırmada kullanılan materyallere katyon-değiştirici reçine denilir ve negatif yüklü grupların varlığı ile karakterize edilir. Bunlar, sülfonat iyonları gibi güçlü asidik gruplar olabileceği gibi zayıf asit özelliği de gösterebilirler. Anyon-değiştirici reçineler ise pozitif yüklü trietilaminoetil grupları gibi güçlü bazik kuaterner aminlerin veya aminoetil, dietilaminoetil (DEAE) veya guanidoetil gibi zayıf bazik gruplardan oluşurlar. Reçineler üzerindeki zayıf asidik veya bazik grupların varlığı matriksin asit-baz seçiciliğini arttırırken pH değişiklikleri sadece saflaştırılmaya çalışılan bileşiğin değil reçinenin de yükünü etkiler. G-6-PD enziminin kısmi saflaştırılmasında kullanılan anyon değiştirici dietilaminoetil (DEAE)'in fonksiyonel grubu $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ olup zayıf iyon değiştiricidir ^{107,108}.

3.3.3.2.1. Ayıraçlar

1. 50 mM Sodyum Fosfat Tamponu : pH 7,0

$\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 3,12 g

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5,34 g

Son hacim 1litre ve pH 7,0 olacak şekilde saf suda çözündür.

2. 5 mM Sodyum Fosfat Tamponu : pH 7,0

50 mM Sodyum Fosfat Tamponu: pH 7,0 100 mL

Na-EDTA 0,372 g

β -NADP 0,0157 g

2-merkaptoetanol 0,07 mL

Son hacim 1 litre ve pH 7,0 olacak şekilde saf suda çözünür.

3. % 0,9 NaCl

NaCl 9 g

Son hacim 1 litre olacak şekilde saf suda çözünür.

4. % 0,02 digitonin

Digitonin 0,2 g

Son hacim 1 litre olacak şekilde saf suda çözünür.

5. 0,25 M KCl içeren 5 mM Sodyum Fosfat Tamponu pH 7,0

KCl 18,64 g

Son hacim 1 litre ve pH 7,0 olacak şekilde 5 mM Sodyum Fosfat tamponunda çözünür.

3.3.3.2.2. Yöntem

Anyon Değiştirici Reçinenin (DE-52) Hazırlanması: 5 mM sodyum fosfat tamponunda bir gece şişirilen 25 g DE-52 anyon-değiştirici reçine pH'sı 7,0 olana kadar tamponla yıkanır.

Hemolizatın anyon değiştirici reçineye bağlanması

Hazırlanan hemolizat ile anyon değiştirici reçine 1:3 oranında karıştırılarak +4°C'de, bir gee boyunca düşük devirli çalkalayıcı ile karıştırılır.

Bağlanmayan proteinlerin anyon değiştirici reçineden sökülmesi

1.Hemolizat ve anyon değiştirici reçine karışımına ait süpernatant her seferinde protein aktivitesi ölçülerek (280 nm'deki optik dansite okunarak) aspire edilir.

2.Karışım, protein aktivitesi sıfır olana kadar 5 mM sodyum fosfat tamponu ile yıkanır.

Bağlanan proteinlerin anyon değiştirici reçineden sökülmesi

1.Hemolizat ve anyon değiştirici reçine karışımı, ucuna cam pamuğu yerleştirilmiş kolona aktarılır.

2.Kolon 0,25 M KCl içeren 5 mM sodyum fosfat tamponu ile yıkanır.

3.Elüsyonlar toplanarak protein konsantrasyonları ölçülür.

4.Protein konsantrasyonu yüksek olan elüsyonların G-6-PD enzim aktiviteleri ölçülür. En yüksek aktiviteye sahip elüsyonun G-6-PD enzim kinetiği çalışılır.

3.3.3.3. Kısmi saflaştırılan enziminin kinetik özelliklerinin incelenmesi

Glukoz-6-fosfatın 6-fosfoglukonata dönüşümü sırasında oluşan NADPH miktarı, tepkimeyi katalizleyen G-6-PD enziminin aktivitesi ile doğru orantılıdır. In vitro koşullarda gerçekleştirilen tepkime sırasında oluşan NADPH'a ait 340 nm dalga boyundaki optik dansite farkından hesaplanır.

3.3.3.3.1. Ayıraçlar

1. 0,1 M MgCl₂

MgCl₂.6H₂O 2,033 g

Son hacim 100 mL olacak şekilde saf suda çözünür.

2. 1 M Tris tamponu: pH 8,0

Tris-HCl 8,84 g

Tris Baz 5,30 g

Son hacim 100 mL olacak şekilde saf suda çözünür.

3. 2 mM NADP

β-NADP 15,3 mg

Son hacim 10 mL olacak şekilde saf suda çözünür.

4. 400 μM NADP

β-NADP 3,06 mg

Son hacim 10 mL olacak şekilde saf suda çözünür.

5. 6 mM G6P

D-glukoz-6-fosfat 16,9 mg

Son hacim 10 mL olacak şekilde saf suda çözünür.

6.2 mM G6P

D-glukoz-6-fosfat 5,6 mg

Son hacim 10 mL olacak şekilde saf suda çözünür.

7.2 mM deamino-NADP

Deamino-NADP 15,8 mg

Son hacim 10 mL olacak şekilde saf suda çözünür.

8.6 mM Galaktoz-6-P

D-galaktoz-6-fosfat 18,2 mg

Son hacim 10 mL olacak şekilde saf suda çözünür.

9.2 mM NAD

NAD 13,3 mg

Son hacim 10 mL olacak şekilde saf suda çözünür.

Kısmi saflaştırılan G-6-PD enzimine ait K_m^{NADP} değerinin saptanması

Hazırlanan örnek tüpündeki tepkime, 1 cm ışık yollu kuvars küvetlerde, 37°C'de, spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda 5 dakika boyunca takip edilir. Kör olarak saf su kullanılır. Oluşan NADPH'nin yarattığı optik dansite farkından yola çıkılarak her bir örneğin G-6-PD enzim saptanır. Hesaplanan enzim aktiviteleri arasındaki fark, her tüpün farklı NADP konsantrasyonuna sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Lineweaver-Burke grafiğine dönüştürülen bu değerlerle K_m^{NADP} değeri saptanır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Kısmi saflaştırılan G-6-PD enzimine ait K_m^{NADP} değerinin saptanması

Ayırıcılar	1	2	3	4	5	6	7	8
Saf su	1,75	1,80	1,85	1,90	1,95	1,975	2,0	2,025
0,1M MgCl ₂	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
1M Tris tamponu	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
6mM G6P	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
400 µM NADP	0,3	0,25	0,2	0,15	0,10	0,075	0,050	0,025

Elüsyon	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050
---------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

Tüm hacimler mL olarak verilmiştir.

Kısmi saflaştırılan G-6-PD enzimine ait K_m^{G6P} değerinin saptanması

Hazırlanan örnek tüpündeki tepkime, 1 cm ışık yollu kuvars küvetlerde, 37°C'de, spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda 5 dakika boyunca takip edilir. Kör olarak saf su kullanılır. Oluşan NADPH'nin yarattığı optik dansite farkından yola çıkılarak her bir örneğin G-6-PD enzim aktivitesi saptanır. Hesaplanan enzim aktiviteleri arasındaki fark, her tüpün farklı NADP konsantrasyonuna sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Lineweaver-Burke grafiğine dönüştürülen bu değerlerle K_m^{G6P} değeri saptanır (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6. Kısmi saflaştırılan G-6-PD enzimine ait K_m^{G6P} değerinin saptanması

Ayırıklar	1	2	3	4	5	6	7	8
Su (mL)	1,75	1,80	1,85	1,90	1,95	1,975	2,0	2,025
0,1M MgCl ₂ (mL)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
1M Tris tamponu (mL)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
2mM NADP (mL)	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
2mM G6P (mL)	0,3	0,15	0,12	0,09	0,075	0,060	0,045	0,050
Elüsyon (mL)	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050

Kısmi saflaştırılan G-6-PD enzimine ait analog çalışması

Hazırlanan örnek tüpündeki tepkime, 1 cm ışık yollu kuvars küvetlerde, 37°C'de, spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda 5 dakika boyunca takip edilir. Kör olarak saf su kullanılır. Oluşan optik dansite farkından yola çıkılarak her bir örneğin G-6-PD enzim aktivitesi tespit edilir. Hesaplanan enzim aktiviteleri arasındaki fark, her tüpün farklı substrat içermesinden kaynaklanmaktadır. Analog çalışması yapılan

elüsyonun bilinen G-6-PD enzim aktivitesi % 100 kabul edilerek, diğer analogların ne ölçüde kullanıldığı yüzde olarak hesaplanır (Çizelge 3.7).

Çizelge 3.7. Kısmi saflaştırılan G-6-PD enzimine ait analog çalışması

Ayrıraçlar	1	2	3	4
Su (mL)	1,75	1,80	1,85	1,90
0,1M MgCl ₂ (mL)	0,3	0,3	0,3	0,3
1M Tris tamponu (mL)	0,3	0,3	0,3	0,3
2mM NADP (mL)	--	--	0,3	0,3
6mM G6P (mL)	0,3	0,3	--	--
2mM d-NADP (mL)	0,3	--	--	--
2mM NAD (mL)	--	0,3	--	--
6mM Gal-6-P (mL)	--	--	0,3	--
6mM 2-d-G6P (mL)	--	--	--	0,3
Elüsyon (mL)	0,050	0,050	0,050	0,050

Kısmi saflaştırılan G-6-PD enziminin pH stabilitesinin incelenmesi

pH stabilitesi çalışılacak olan elüsyondan yaklaşık 200'er µl membranlara aktarılır. Membranlar farklı pH'lara ayarlanmış 5 mM sodyum fosfat tamponu içerisinde, bir gece boyunca, +4°C'de diyaliz edilir ve diyaliz sonucunda G-6-PD enzim aktivitesi saptanır.

Kısmi saflaştırılan G-6-PD enziminin ısı stabilitesinin incelenmesi

Isı stabilitesi çalışılacak olan elüsyon, 46°C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilir. 0., 10., 20. ve 60. dakikada, elüsyonun G-6-PD enzim aktivitesi saptanır. Sıfıncı dakikadaki enzim aktivitesi % 100 kabul edilir ve diğer dakikalardaki yüzde değişim, elüsyonun ısı stabilitesini belirler.

3.3.4. Elektroforetik Çalışma

3.3.4.1. Eritrosit Membranının Dodge Yöntemine Göre Hazırlanışı

Eritrositler izotonik ortamda yıkanıp, hipotonik solusyonla hemoliz edildikten sonra yüksek devirde santrifüj işlemiyle hemoglobinden arındırılması esasına dayanır¹⁰⁹.

3.3.4.1.1. Ayıraçlar

1. 310 mOsm pH 7.4 Fosfat Tamponu

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8,324g

Na_2HPO_4 9,589g

Saf su ile 1000mL'ye tamamlanır.

2. 20 mOsm pH 7,4 Fosfat Tamponu

1.ayıraçdan 64,48mL alınarak litreye saf su ile tamamlanır.

3.3.4.1.2. Yöntem

Tam kan 310 mOsm pH 7.4 tamponuyla karıştırılıp. 2000 rpm'de 20 dakika santrifüj edilerek eritrositler çöktürülerek plazma kısmı aspire edilir. Eritrosit pelletleri izotonik 310 mOsm'lık fosfat tamponu ile üç defa yıkanır. Her yıkama sonunda tüpler

20 dakika 2000 rpm'de santrifüj edilir ve üstündeki süpernatant kısmı aspire edilir. Bu işlemden sonra yıkanmış eritrositlerden 2 mL alınıp 40 mL'lik büyük santrifüj tüplerine konularak üstüne 28 mL 20 mOsm fosfat tamponu eklenir. Bu tüpler 4°C'de 11 000 rpm'de 40 dakika santrifüj edilir. Her yıkamada üstteki süpernatant kısmı çok dikkatli bir şekilde aspire edilir ve geri kalan kısma tekrar 28 mL 20 mOsm fosfat tamponu eklenir. Bu işlem süpernatant renksiz veya çok hafif pembe olana kadar yaklaşık dört defa devam tekrar edilir.

3.3.4.1.3. Solubilizasyon

3.3.4.1.3.1. Ayıraçlar

1. 8 M Üre

48g üre 100 mL'ye saf su ile tamamlanır.

2. % 2'lik 2-merkapt-etanol:

% 98'lik 2-merkapt-etanol'den 2 mL alınıp 100 mL'ye saf su ile tamamlanır.

3. % 2 SDS

% 20'lik SDS'den 1 mL alınıp 10 mL'ye saf su ile tamamlanır.

3.3.4.1.4.1.Yöntem

Eritrosit membran proteinlerinin solubilizasyonunda 8 M üre, % 2 SDS ve %2'lik 2-merkapt-etanol karışımı kullanılır. Solubilizasyon işleminde, eritrosit membran hacmi kadar solubilizasyon solusyonundan (1/1 oranında) ilave edildikten sonra kaynar su banyosunda 5 dakika bekletilir. Böylece SDS-PAGE yöntemi için gerekli örnek hazırlanır.

3.3.4.2. SDS-Poliakrilamid Jel Elektrofrez (SDS-PAGE)

SDS anyonik bir deterjan olup membran proteinlerini lipid tabakasından ayrıştırmak amacıyla kullanılır. SDS amfipatik özellik gösterip membran proteinlerinin solubilizasyonunda oldukça etkili bir deterjandır. SDS, proteinlerin yapısını değiştirmeden molekölü sararak dış yüzeyi (-) yükle kaplamaktadır. Böylece poliakrilamid jel elektrofrez (PAGE) membran proteinleri anota göç ederek moleköler ağırlıklarına göre ayrıştırlırlar.

3.3.4.2.1. Ayıraçlar

1. Akrlamid Ayıracı

Akrlamid 40 g

N,N-Metilen-bis-Akrlamid 1.5 g

Saf su ile 100 mL'ye tamamlanır.

2. Elektrofrez Tampon (10×Buffer) Ayıracı

1.0 M Tris

60.57 g tris-baz 500 mL'ye saf su ile tamamlanır.

2.0 M Sodyum Asetat

27.2 g sodyum asetat 100 mL'ye saf su ile tamamlanır.

0.2 M EDTA

7.4448 g EDTA 100 mL'ye saf su ile tamalanır.

Bu ayıraçlar hazırlandıktan sonra:

1 M Tris 400 mL

2 M Sodyum Asetat 100 mL

0.2 M EDTA 100 mL

alınır. Karışımın pH'sı 7.4'e asetik asitle ayarlandıktan sonra 1000 mL'ye saf su ile tamamlanır.

3.Sodyum Dodesül Sülfat (SDS) (% 20'lik)

20 g SDS 100 mL'ye saf su ile tamamlanır.

4. Amonyum persülfat (15 mg/mL)

30 mg amonyum persülfat 2 mL saf suda çözülür (günlük olarak hazırlanır).

5. TEMED

30 mL/20 mL jel olmak üzere ayarlanır.

6. Boya Ayraçları

Coomassie Brilliant Blue

1.25 g coomassie brilliant blue % 50'lik 454 mL etanol ve 46 mL glasiyel asetik asitte çözülür.

Bromfenol Mavisi

5 mg bromfenol mavisi 100 mL'ye saf su ile tamamlanır.

7. Arındırma Solusyonu:

Metanol, asetik asit ve saf su (5:1:5 oranında) karıştırılır.

3.3.4.2.2. Jelin Hazırlanışı

Jel Ayracı

Akrilamid solusyonu 4 mL

10×Buffer 3 mL

% 20 SDS 1 mL

H₂O 10 mL

Amonyum persülfat 2 mL

Disk şeklindeki tüpler alkolle temizlenip kurutulduktan sonra tüplerin boyları ayarlanıp alt kısımları parafilmle kapatılır. Jel ayıracı hava kabarcığı olmayacak şekilde tüplere doldurulur. Üzerine saf su eklenerek jel yüzeyinin düzgün bir şekilde polimerize olması sağlanır ve jelin kuruması engellenir. Bir gece oda ısısında polimerizasyon için bekletilir.

3.3.4.2.3. Yöntem

Elektroforez tankına yeteri kadar tampon konulduktan sonra tanka jeller yerleştirilir. 100 µL ghost, 10 µL bromfenol mavisi ve bir damla gliserol karışımının 100 µL'si jellerin üzerine aplik edilir. Materyalin jele adsorbe olması için birkaç dakika beklendikten sonra pastör pipeti ile tüplerin üzerine tampon eklenir ve tankın üst kısmı da tampon ile doldurularak tankın kapağı kapatılır. Her tüpe 6 mAmp düşecek şekilde akım verilir ve elektroforez 2.5-3 saatlik bir sürede gerçekleşir. Bromfenol mavisi jelin alt ucuna yaklaşık 1 cm kalana kadar elektroforez devam ettirilir.

Elektroforez bitiminde jeller tüpten çıkartılıp Coomassie Brilliant Blue'da oda ısısında bir gece inkübe edilerek boyanır. Jeller arındırma ayıracında 6 saat tutulur ve daha sonra % 7.5'lük asetik asitte muhafaza edilir. Jellerin absorpsiyon pikleri dansitometrede 545 nm çizilir.

3.3.4.3. G6PD Enzim Aktivitesinin PAGE ile Kontrolü

Örnekler, % 6,5'lük poliakrilamid jel elektroforeziyle kontrol edilir.

3.3.4.3.1. Ayıraçlar

1.% 6,5 Akrilamid solüsyonu

14,4 g akrilamid

0,43 g N-N-Metilen bisakrilamid

Bir miktar saf suda eritilip 100 mL'ye tamamlanır.

2.Jel tamponu

0,24 M Tris-HCl pH 8,0

3. Elektroforez tamponu

0,08 M Tris-HCl pH 8,0

4. Amonyum persülfat (15 mg/mL)

5. TEMED

1,5µL/ mL jel olmak üzere ayarlanır

6. Bromfenol mavisi

5 mg bromfenol mavisi bir miktar saf suda eritilip 100 mL'ye tamamlanır.

7.Jel boya ayıracı

17,6 mM G6P

1,6 mM NADP

2,8 mM MTT

0,3 mM PMS

3.3.4.3.2. Yöntem

A) Jelin hazırlanışı:

9 mL akrilamid solüsyonu

10mL jel tamponu

1 mL amonyum persulfat

30 µL TEMED

bir erlene konulup karıştırılır.

1. Disk şeklindeki tüpler alkolle temizlenip kurutulur.

2. Tüplerin boyları ayarlanıp alt tarafı parafilmle kapatılır.

3. Jel ayıracı hava kabarcığı olmayacak şekilde tüplere doldurulur.

4. Tüplerin üzerine saf su konularak hava ile teması kesilir.

5. Polimerizasyon oluşması için tüpler +4°C'de bir gece bekletilir.

B) Numune hazırlanışı:

1. 0,5 mL'lik bir eppendorf tüp içerisine

100 µL enzim

10 µL bromfenol mavisi

1 damla gliserol

konulup vorteks ile karıştırılır.

2. Elektroforez tankına 0,08 M Tris-HCl pH 8,0 tamponu konulup jeller tanka yerleştirilir. Jel tüplerine hazırlanan örnekden 100 µL applike edilir. Her bir jel için 5 mA akım verilerek elektroforez oda ısısında yaklaşık 3 saat devam ettirilir. Elektroforez bitiminde jeller tüpten saf su dolu bir enjektör ile çıkartılır. 37°C'de 30 dakika jel boya ayırıcı içerisinde inkübe edilir. Boya artıkları saf su ile temizlenir.

3.3.4. Moleküler Çalışma

3.3.4.1. DNA Eldesi

DNA'sı izole edilmek istenen kan örneği EDTA'lı tüpe alınıp önce plazması uzaklaştırılır ve daha sonra şekilli elemanlar yıkanır. Eritrositleri hemoliz edilerek saf lökositler elde edilir. Lökosit pelleti süspansiyon edilir. Sodyum dodesül sülfat (SDS) ve Proteinaz K ile hücre zarları ve proteinler hidroliz edilir. Bir gece inkübe edildikten sonra, bu homojen karışım fenol ile ekstre edilir ve sulu fazda bulunan DNA alkol varlığında çöktürülür¹¹⁰.

3.3.4.1.1. Ayıraçlar

1. Parçalayıcı Tampon

NH₄Cl 131 mM

NH₄HCO₃ 0,9 mM

2. NaCl 4 mM

3. Na₂EDTA 0,5 mM pH 7,5

4. SDS ayıracı % 10'luk
5. Proteinaz K 1mg / mL

6. Doymuş fenol ayıracı: 250 g kristalize fenol 50 mL saf suda çözünür. Son derişimi % 0,1 olacak şekilde 8-hidroksikinolin ilave edilir. Eşit hacimde 0,5 M Tris-HCl tamponu (pH 8,0) eklenerek manyetik karıştırıcıda 15 dakika çalkalanır. Ayıraç iki faza ayrıldığında üst faz aspire edilir. Üzerine eşit hacimde 0,1 M Tris-HCl tamponu eklenerek aynı işlem tekrarlanır. Bu işleme fenol fazının pH'sı 8,0 olana kadar devam edilir. En son % 0,2'lik β -merkaptöetanol içeren 0,1 M Tris-HCl tamponu (pH 8,0) eklenir.

7. Saf, soğuk etanol

8. % 70'lik etanol

3.3.4.1.2. Yöntem

1. EDTA'lı tüpe alınan kanın plazması atılır.
2. 5 mL'lik tüpe aktarılan çökeltiyeye eşit miktarda 4mL parçalayıcı tampon eklenir.
3. Tüpler 10 dakika buzda bekletildikten sonra +4°C'de 5000 rpm'de santrifüj edilir. Lökosit tabakasına dikkat edilerek üst faz aspire edilir.
4. Parçalayıcı tampon ile yıkama işlemi iki kere daha tekrar edilir.
5. Elde edilen lökosit pelleti, üzerine % 10'luk SDS ayırıcından 300 μ L ve Proteinaz K ayırıcından 75 μ L ilave edilerek 37 °C'de bir gece inkübe edilir.
6. Ertesi gün vizköz bir hal alan ayıraca 1 mL fenol eklenir.
7. 10 dakika boyunca şiddetle çalkalanan karışım, +4 °C'de 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
8. Dipteki berrak faz atılır. Fenol ekleme aşaması tekrarlanır.
9. Ayıraç üzerine 1mL kloroform eklenir.
10. Karıştırılır +4 °C'de 5000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
11. Dipteki berrak faz atılır. Kloroform ekleme aşaması tekrarlanır.
12. Üstteki berrak faz ile soğuk etanol içine aktarılır ve DNA'nın hava kabarcıkları şeklinde presipite olduğu gözlenir.
13. DNA'lar bir ependorf tüpüne alınıp 13000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilir.

14.Elde edilen DNA pelletine 100 µL steril saf su ilave edilerek bir gece 37°C'de bekletilir.

15.Ertesi gün, 20 µL DNA ayırıcı 980 µL steril saf su ile çözülerek 260 ve 280 nm dalga boylarındaki optik dansiteleri spektrofotometrede okunur.

16.Elde edilen DNA'nın derişimi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanır.

$$\text{DNA derişimi } (\mu\text{g} / \text{mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{sulandırma faktörü (50)} \times 50 *$$

*1cm ışık yollu küvette 1 OD'ye karşılık gelen µg / mL biriminden DNA miktarı.

3.3.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PCR, in vitro şartlarda DNA çoğaltma yöntemidir.¹¹¹

3.3.4.2.1. Ayıraçlar

1. 20X PCR Tamponu (pH: 8,8)

Tris-HCl	680 mM
Amonyum sülfat	166 mM
MgCl ₂	68 mM
BSA	1700 µg/mL

2. 2,5 mM dNTP Karışımı

100 mM stok dATP, dCTP, dGTP, dTTP'de son derişim 2,5 mM olacak şekilde dNTP karışımı hazırlanır.

3. % 50 Dimetilsülfoksit (DMSO)

4. Genomik DNA

Genomik DNA'lar amplifikasyonda son derişimi 1µg/100 µL olacak şekilde kullanılır.

5. Taq Polimeraz Enzimi (5 Ü / mL)

Nükleotit dizileri verilmiş olan B ve J primerleri G-6-PD genine ait ekson 6'yı amplifiye etmek amacıyla kullanılmaktadır.

Primer B ⇒ ACTCCCCGAAGAGGGGTTCAAGG-

Primer J ⇒ CCAGCCTCCCAGGAGCGCGGAAG-

Taq DNA polimeraz eklenmeksizin son hacim 100 µL olacak şekilde amplifikasyon tüpü içerisinde hazırlanan PCR karışımı vorteks yardımıyla karıştırılır ve santrifüj edilir. Bu karışım 6 dakika 99 °C'de inkübe edilerek DNA'nın denatürasyonu sağlanır. Sıcaklık 56 °C'ye ulaşıncaya Taq DNA polimeraz ilave edilir Her bir döngü için aşağıdaki sıcaklıklar uygulanır.

94 °C	45 saniye
56 °C	45 saniye
72 °C	45 saniye

Çizelge 3.8'de PCR karışımı verilmiştir.

Çizelge 3.8. PCR karışımı

Ayıraç	Miktar(µL)	Son Derişim
10X Tampon	5	1XPCR tamponu
dNTP (2,5mM)	10	0,250 nM
DMSO (%50)	10	%5
DNA	Değişken	1 µL
Primer (150ngl/µL)	1	150ng/100µL
Primer (150ng/µL)	1	150ng/100µL
Taq Polimeraz (5Ü/µL)	0,4	2Ü/100µL
Steril distile su	50µL'ye tamamlanır	
Toplam hacim (µL)	50 µL	

3.3.4.2.1. Amplifiye G6PD Gen Ürününün Restriksiyon Endonükleaz ile Kesilmesi (RFLP)

Restriksiyon endonükleazlar, genom içinde var olan kesim yerlerini ortadan kaldırır veya yeni kesim yerleri oluşturur. Bu değişim jel elektroforezi ile gösterilir^{112,113}.

Ayır a lar

1. 10X PCR Tamponu (pH: 8,8)

Tris-HCl	6 mM
NaCl	50 mM
MgCl ₂	6 mM
DTT	1mM

2. MboII Restriksiyon Enzimi

Enzimin son derişimi 0,5 Ü / 20µL olacak şekilde kullanılır.Enzimin tanıdığı özgün dizi ve kesim yeri aşağıdaki gibidir.

5'...GAAGA(N)₈...3'

3'...CTTCT(N)₇...5'

3.Amplifiye Genomik DNA

Çizelge 3.9. RFLP karışımı

Ayır�a�	Miktar(µL)	Son Derişim
10X Tampon	2	1XPCR tamponu
Amplifiye DNA	10	6 µg/ 20µL
MboII Enzimi (0,5Ü/mL)	1	0,5 Ü/20µL
Steril distile su	7	

Çizelge 3.9'daki karışım37°C'de bir gece inkübe edilir.

3.3.4.2.2. Agaroz Jel Elektroferezi

DNA molekülünün tanımlanması için agaroz jel kullanılarak nükleotidin baz çifti sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç etmesidir¹¹².

3.3.4.2.2.1. Ayıraçlar

1. 5X Tris –Borat (TBE) Tamponu (pH: 8,3)

Tris-Baz	54 g
Borik Asit	27,5 g
0,5 M EDTA pH :8,0	20 mL

Bir miktar distile suda çözülüp pH'sı 8,3'e ayarlanarak 1000mL'ye distile su ile tamamlanır.

2. 1X Tris –Borat (TBE) Tamponu (pH: 8,3)

5X TBE Tamponu	200mL
Distile su	800mL

3. Yükleme Tamponu

Bromfenol mavisi	% 0,25
Ksilen Siyanol FF	% 0,25
Sukroz	%40

Distile suda çözülülerek +4 °C'de saklanır.

4. %2'lik agaroz jel

2g agaroz tartılarak 100 mL distile su eklenerek mikrodalga fırında homojen bir ayıraç olana kadar ısıtılır.

5. Stok Etidiyum Bromür (EtBr) Ayırıcı

10 mg/ mL olacak şekilde EtBr tartıtıp distile suda çözülerek oda sıcaklığında koyu renkli şişede saklanır.

6. Etidiyum Bromür Çözeltisi

0,5 µg/mL olacak şekilde stok EtBr distile su içinde çözülür.

7. φ X 174 HaeIII Markeri

Jel kuyusuna 100-500 ng/10 µL derişiminde uygulanır.

3.3.4.2.2.2. Yöntem

%2 oranında hazırlanan agaroz jel ayırıcı elektroforez kaplarına dökülerek polimerize olması sağlanır.Elektroforez tarakları yardımı ile oluşan kuyulara restriksiyon enzimi ile kesilen PCR ürününden 20 µL DNA ve 2 µLyükleme tamponu

karıştırılıp agaroz jele yüklenir.

Elektroforez 1-5 V/cm (elektrotlar arasındaki uzaklık) akım şiddetinde yükleme tamponundaki bromfenol mavisi ve ksilen siyanol FF uygun uzaklığa erişinceye kadar yürütülürElektroforez bitiminde jeller EtBr ile oda sıcaklığında boyanır ve boya artıkları distile suyla temizlenerek UV ışık altında değerlendirme yapılır.



4. BULGULAR

4.1. Hematolojik ve Kinetik Bulgular

Anamur bölgesinden bu çalışma için toplam 133 olgudan kan örneği alınmıştır. Tüm olguların 83'i kadın, 50'si erkek olup yaş sınırları 3-73 yıl arasında değişmektedir. Tarama çalışmasına katılan toplam 133 olgudan EDTA'lı tüplere 5'er mL kan örnekleri alınarak tüm olguların hematolojik bulguları, elektroforez tipleri, Hb A₂ ve Hb F düzeyleri ile G6PD enzim aktivitesi ölçülmüştür (Çizelge 4.1). Bu çizelgede gözleendiği gibi 6 olgunun G6PD aktivitesi 0,0 U/gHb, 3 olgunun G6PD aktivitesi 5,0 U/gHb'nin altında (3,9-4,4 U/g Hb), 80 olgunun 5,1-12,0 U/gHb arasında ve diğeri 44 olgunun da G6PD aktivitesi 12,0 U/gHb'nin üzerinde (12,2-77,5 U/gHb) bulunmuştur. Olguların hemoglobin tipleri incelendiğinde 1 olgunun Hb AE ve 1 olgunun da Hb EF olduğu diğeri ise Hb AA olduğu gözlenmiştir. MCV değeri 79,0 fl'den düşük ve Hb A₂ düzeyi %3,7'den yüksek olan olguların hematolojik verileri ise çizelge 4.2'de verilmiştir.

G6PD aktivitesi 0,0 U/gHb olan 4 aile ile G6PD aktivitesi 20,0 U/gHb'den yüksek olan 1 ailenin ve ulaşılabilen aile bireylerinin kan örnekleri alınarak 5 ailenin soy ağacı çizilmiştir. Soy ağacındaki bazı olguların G6PD enzimi, DE-52 anyon değıştirici reçineyle kısmi olarak saflaştırılarak enzim aktivitesi PAGE elektroforezi ile kontrol edildikten sonra enziminin kinetik özellikleri çalışılmıştır. Yine aynı olguların membran proteinleri, MDA düzeyleri ve Gd Akdeniz mutasyonu moleküler düzeyde çalışılmıştır. (Şekil 4.1-4.37.)

Cizelge 4.1. Olguların hematolojik verileri

No	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elek	Hb A ₂ %	Hb F %	G6PD (U/gHb)
25670	5,31	15,5	45,3	85,2	29,2	34,2	AA	2,5	1,0	0,0
25209	4,87	14,9	45,9	94,3	30,6	32,5	AA	2,7	1,2	0,0
25208	4,10	12,1	37,3	90,8	29,5	32,4	AA	3,1	0,6	0,0
25124	5,71	12,0	39,3	68,9	20,9	30,4	AA	5,4	0,7	0,0
25536	4,48	12,4	45,1	100,6	27,6	27,4	AA	3,0	2,0	0,0
25148	5,37	11,1	37,0	68,9	20,8	30,2	AA	5,6	1,3	0,0
25181	4,24	12,8	39,9	94,1	30,1	32,0	AA	2,6	0,6	3,9
25201	4,35	12,8	39,7	90,5	29,4	32,5	AA	2,8	0,4	4,3
25173	4,23	12,5	39,1	92,4	29,6	32,0	AA	2,5	0,6	4,4
25169	4,34	12,3	38,2	88,0	28,3	32,2	AA	2,8	0,4	5,1
25535	4,57	11,5	41,9	91,6	25,2	27,5	AA	2,8	2,0	5,5
25178	4,11	11,4	36,5	88,9	27,9	31,3	AA	1,7	0,5	5,6
25183	4,46	12,2	42,5	95,4	27,5	28,8	AA	3,4	1,2	5,7
25176	4,19	11,0	35,1	83,7	26,2	31,3	AA	2,5	0,5	5,8
25718	4,83	15,0	44,3	91,6	31,2	34,0	AA	3,1	1,8	5,9
25189	4,63	14,4	45,0	97,0	31,1	32,0	AA	2,6	0,4	6,1
25190	5,11	15,1	46,1	90,2	29,6	32,8	AA	3,0	0,4	6,2
25182	4,43	12,8	40,5	91,5	29,0	31,7	AA	2,8	0,5	6,3
25191	4,43	13,2	41,0	92,7	29,9	32,2	AA	2,9	0,4	6,3
25120	6,81	13,0	43,3	63,5	19,0	30,0	AA	4,2	1,4	6,3
25144	4,73	10,4	34,5	73,0	21,9	30,1	AA	5,0	0,5	6,3
25207	4,99	15,1	47,2	94,6	30,3	32,0	AA	2,3	1,2	6,5
25132	5,54	11,3	37,8	68,2	20,3	29,8	AA	4,8	1,9	6,5
25192	4,45	13,4	42,0	94,2	30,1	32,0	AA	2,7	0,6	6,7
25153	4,24	13,2	39,4	93,1	31,2	33,6	AA	2,8	0,5	6,8
25108	5,28	10,8	35,9	68,0	20,4	30,0	AA	3,8	1,3	6,9
25180	4,78	13,1	41,1	86,1	27,4	31,8	AA	2,3	0,6	7,0
25675	4,47	11,6	35,7	79,8	25,9	32,5	AA	2,7	2,0	7,0
25171	4,10	11,5	37,3	90,9	28,0	30,8	AA	2,2	2,1	7,1
25170	4,13	11,9	36,9	89,3	28,7	32,2	AA	2,5	2,6	7,1
25210	4,07	12,3	38,2	93,9	30,2	32,1	AA	2,6	0,5	7,1
25166	4,63	13,6	42,4	91,5	29,3	32,0	AA	1,8	0,8	7,2
25164	4,63	11,9	38,6	83,3	25,6	30,8	AA	2,7	0,4	7,3
25193	6,06	17,1	54,0	90,4	28,1	31,1	AA	2,9	1,2	7,3
25130	5,78	12,1	41,6	72,1	21,0	29,1	AA	5,1	1,1	7,3
25194	4,47	12,6	39,3	87,9	28,3	22,2	AA	1,8	1,3	7,4
25198	4,96	13,2	41,4	83,3	26,5	31,8	AA	2,9	0,6	7,4
25167	4,08	12,1	38,3	93,8	29,7	31,6	AA	2,3	0,2	7,7
25168	4,47	12,7	40,1	89,8	25,5	31,5	AA	3,0	0,3	7,8
25172	4,33	11,9	37,3	86,2	27,6	32,0	AA	2,7	0,2	8,0
25162	4,46	11,7	37,2	83,5	26,2	31,4	AA	2,5	0,2	8,1
25146	4,57	10,9	36,5	79,7	23,8	29,9	AA	2,4	0,9	8,2
25125	4,41	9,1	30,7	69,5	20,7	29,7	AA	3,8	0,6	8,2

No	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elektro	Hb A ₂ %	Hb F %	G6PD (U/gHb)
25187	4,59	14,9	44,8	97,6	32,5	33,3	AA	2,7	0,4	8,3
25114	6,03	12,4	40,5	67,2	20,5	30,5	AA	4,2	0,8	8,3
25141	6,23	13,7	44,8	71,9	22,0	30,5	AA	4,5	0,8	8,3
25679	5,40	11,3	35,8	66,3	20,9	31,5	AA	5,0	1,8	8,4
25196	4,63	12,1	38,3	82,8	26,1	31,5	AA	2,8	0,9	8,5
25165	3,78	9,6	32,2	85,2	25,4	29,8	AA	3,6	0,4	8,5
25195	4,20	11,6	35,6	84,8	27,6	32,6	AA	2,3	0,8	8,6
25188	4,96	13,9	43,7	88,3	28,0	31,8	AA	2,4	1,1	8,6
25118	5,25	11,1	36,5	69,7	21,2	30,4	AA	3,8	0,9	8,6
25185	4,71	14,0	44,3	94,0	29,7	31,6	AA	1,8	0,4	8,7
25131	6,73	13,5	45,7	68,0	20,0	29,4	AA	4,9	1,1	8,7
25123	5,16	11,2	36,6	71,0	21,6	30,5	AA	3,2	0,5	8,9
25126	5,26	11,4	36,0	68,5	21,7	31,7	AA	4,7	0,4	8,9
25177	3,71	8,9	30,3	81,8	24,2	29,5	AA	2,4	0,4	9,0
25203	5,33	14,7	47,5	89,0	27,6	31,0	AA	2,4	0,8	9,2
25202	4,23	13,0	39,1	92,3	30,8	33,4	AA	2,8	4,2	9,2
25143	4,72	14,4	40,0	93,2	30,5	32,7	AA	1,8	0,4	9,3
25211	4,31	12,6	38,8	90,1	29,2	32,4	AA	3,0	0,6	9,3
25138	5,37	11,1	37,2	69,3	20,6	29,7	AA	5,1	0,6	9,5
25184	4,70	14,9	45,5	96,9	31,8	32,8	AA	2,5	1,1	9,7
25151	4,85	13,2	41,0	84,5	27,2	32,2	AA	3,0	1,0	9,7
25134	4,84	10,1	33,9	70,0	20,9	29,8	AA	4,6	0,5	9,7
25128	5,41	15,6	48,7	90,0	28,9	32,1	AA	2,7	0,4	9,9
25666	4,72	14,2	40,6	86,0	30,1	35,0	AA	2,9	0,9	10,0
25667	4,93	14,9	43,1	87,4	30,2	34,5	AA	2,9	1,3	10,0
25152	4,53	12,7	38,4	84,7	28,1	33,2	AA	3,0	0,3	10,0
25137	5,66	11,3	37,8	66,8	20,0	29,9	AA	5,2	0,9	10,0
25150	4,89	10,7	37,2	76,0	22,0	29,0	AA	5,8	1,0	10,3
25160	6,42	13,9	45,9	71,5	21,7	30,4	AA	5,5	0,4	10,4
25145	5,00	10,9	36,6	73,2	21,9	29,9	AA	5,1	1,3	10,6
25139	4,32	9,9	32,5	75,2	22,8	30,3	AA	5,4	0,8	10,7
25119	5,63	10,0	34,3	61,0	17,7	29,0	AA	4,0	0,8	10,8
25129	4,76	10,0	33,2	69,7	21,0	30,1	AA	4,7	0,8	10,9
25668	5,24	15,4	44,5	84,9	29,4	34,7	AA	2,7	0,7	11,0
25686	4,71	12,6	37,7	80,0	26,9	33,5	AA	2,8	0,5	11,0
25200	4,78	13,2	41,4	86,7	27,5	31,7	AA	2,8	0,7	11,0
25186	4,50	9,7	33,9	75,3	21,6	28,6	AA	4,0	0,9	11,0
25157	6,33	12,9	42,4	67,0	20,4	30,5	AA	5,5	0,9	11,2
25111	5,78	11,8	39,7	68,8	20,5	29,8	AA	2,2	0,9	11,3
25199	4,42	12,1	37,2	84,2	27,5	32,6	AA	3,0	1,3	11,3
25140	6,13	12,7	41,6	67,7	20,7	30,5	AA	5,9	0,6	11,3
25683	4,46	14,1	41,3	92,7	31,7	34,2	AA	2,7	1,2	11,5
25133	5,40	10,8	36,8	68,1	20,1	29,4	AA	5,4	0,5	11,5
25158	5,30	10,8	36,3	68,4	20,4	29,8	AA	4,9	0,6	11,7

No	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elek	Hb A ₂ %	Hb F %	G6PD (U/gHb)
25671	4,47	12,9	38,2	85,6	28,9	33,8	AA	2,7	1,8	11,8
25147	6,38	12,7	43,1	67,5	20,0	29,6	AA	4,7	0,8	12,0
25719	6,32	12,8	41,8	66,1	20,3	30,7	AA	4,9	1,7	12,2
25174	3,39	8,3	29,8	88,0	24,4	27,8	AA	4,4	5,6	12,3
25688	5,07	12,8	38,9	76,7	25,4	33,1	AA	3,0	1,3	12,5
25672	4,83	13,8	40,0	82,9	28,5	34,4	AA	2,5	0,7	12,6
25687	4,56	13,7	39,4	86,3	30,0	34,7	AA	3,5	0,7	12,6
25695	4,55	12,9	37,2	81,7	28,4	34,7	AA	3,2	1,8	12,7
25159	5,79	11,0	36,7	63,4	19,0	30,0	AA	5,5	0,3	12,8
25112	6,69	13,8	45,2	67,5	20,6	30,5	AA	1,5	0,9	12,9
25127	5,26	11,3	37,1	70,6	21,5	30,5	AA	4,7	2,7	12,9
25155	6,45	12,6	41,6	64,5	19,5	30,3	AA	5,1	0,7	12,9
25197	3,26	9,5	30,2	92,6	29,2	31,5	AA	2,4	0,5	13,0
25692	4,52	12,1	36,0	79,7	26,9	33,7	AA	3,1	1,6	13,0
25175	3,60	9,4	31,4	87,3	26,0	29,8	AA	5,4	2,2	13,0
25117	6,57	13,0	43,8	66,7	19,7	29,6	AA	2,8	0,9	13,1
25149	6,32	11,7	40,1	63,5	18,5	29,2	AA	5,1	0,9	13,1
25121	5,32	12,1	39,9	75,1	22,8	30,4	AA	3,1	1,3	13,3
25691	3,99	12,2	35,5	88,8	30,5	34,2	AA	3,6	2,0	13,4
25154	5,25	11,3	37,9	72,2	21,5	29,8	AA	5,3	2,0	13,5
25142	5,87	12,4	41,2	70,2	21,1	30,0	AA	5,1	1,5	14,0
25674	4,23	9,6	36,1	85,3	22,8	26,8	AA	2,5	1,3	14,1
25347	6,59	12,8	43,2	65,5	19,5	29,8	AA	5,0	1,8	14,1
25122	5,39	11,3	35,9	66,7	21,0	31,5	AA	3,7	1,2	14,2
25104	5,48	11,4	37,3	68,1	20,9	30,6	AA	5,0	0,9	14,3
25669	4,03	10,5	30,9	76,8	26,0	33,9	AA	2,1	1,4	14,5
25115	4,03	9,2	31,1	77,2	22,9	29,7	AA	2,0	1,7	15,0
25677	5,68	15,8	47,1	83,0	27,9	33,6	AA	2,7	2,0	15,0
25685	4,32	13,0	38,2	88,5	30,2	34,1	AA	2,6	0,4	15,2
25690	4,00	11,6	34,3	85,9	29,0	33,8	AA	4,4	1,1	15,2
25161	5,99	14,0	45,9	76,6	23,3	30,5	AA	5,6	1,7	15,4
25109	5,25	10,8	35,2	67,2	20,7	30,7	AA	3,5	1,0	15,8
25678	5,54	12,0	38,4	69,2	21,7	31,3	AA	5,0	0,6	16,0
25106	5,80	12,0	39,9	68,8	20,6	30,0	AA	3,7	1,2	16,3
25156	3,94	7,5	27,9	70,9	19,0	26,9	AA	2,2	0,4	16,7
25110	6,14	12,7	41,8	68,0	20,7	30,5	AA	5,0	1,4	17,0
25105	4,92	11,1	37,3	75,8	22,6	29,8	AA	4,1	1,5	17,2
25684	4,72	12,0	36,0	76,3	25,3	33,2	AA	3,0	1,9	17,3
25689	4,58	12,2	37,1	81,1	26,6	32,7	AA	2,3	1,9	17,5
25113	6,47	13,4	45,4	70,2	20,7	29,5	AA	4,2	1,8	17,5
25107	6,06	10,6	36,0	59,3	17,4	29,4	AA	4,4	1,0	18,1
25682	5,49	11,4	36,1	65,8	20,8	31,7	AA	3,8	1,5	20,0
25136	3,72	8,3	28,1	75,5	22,4	29,7	AA	5,3	0,7	21,3

No	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elek	Hb A ₂ %	Hb F %	G6PD (U/gHb)
25179	3,39	5,0	20,9	61,9	14,7	23,8	AA	1,8	1,0	23,8
25345	3,74	6,9	22,5	58,1	17,8	30,6	EF	49,1	7,6	49,1
25680	4,33	7,5	24,4	56,5	17,4	30,7	AE	42,0	2,9	77,5



Çizelge 4.2. MCV düzeyi 79fl'nin altında ve Hb A₂ düzeyinin de 3,7'den yüksek olan olguların hematolojik verileri

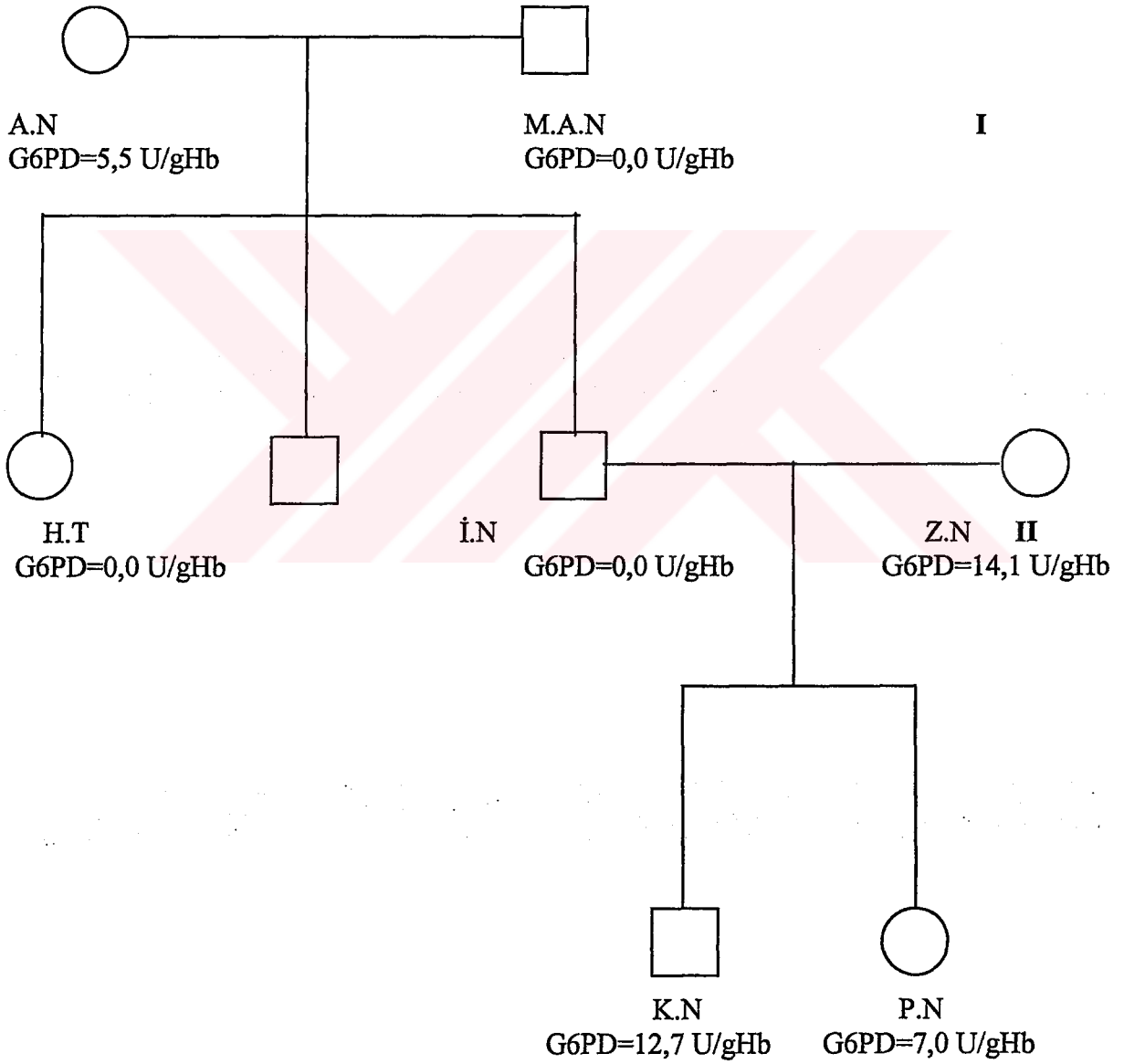
No	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elek	Hb A ₂ %	Hb F %	G6PD (U/gHb)
25345	3,74	6,9	22,5	58,1	17,8	30,6	EF	49,1	7,6	49,1
25680	4,33	7,5	24,4	56,5	17,4	30,7	AE	42,0	2,9	77,5
25140	6,13	12,7	41,6	67,7	20,7	30,5	AA	5,9	0,6	11,3
25150	4,89	10,7	37,2	76,0	22,0	29,0	AA	5,8	1,0	10,3
25148	5,37	11,1	37,0	68,9	20,8	30,2	AA	5,6	1,3	0,0
25161	5,99	14,0	45,9	76,6	23,3	30,5	AA	5,6	1,7	15,4
25159	5,79	11,0	36,7	63,4	19,0	30,0	AA	5,5	0,3	12,8
25157	6,33	12,9	42,4	67,0	20,4	30,5	AA	5,5	0,9	11,2
25160	6,42	13,9	45,9	71,5	21,7	30,4	AA	5,5	0,4	10,4
25133	5,40	10,8	36,8	68,1	20,1	29,4	AA	5,4	0,5	11,5
25124	5,71	12,0	39,3	68,9	20,9	30,4	AA	5,4	0,7	0,0
25139	4,32	9,9	32,5	75,2	22,8	30,3	AA	5,4	0,8	10,7
25154	5,25	11,3	37,9	72,2	21,5	29,8	AA	5,3	2,0	13,5
25136	3,72	8,3	28,1	75,5	22,4	29,7	AA	5,3	0,7	21,3
25137	5,66	11,3	37,8	66,8	20,0	29,9	AA	5,2	0,9	10,0
25149	6,32	11,7	40,1	63,5	18,5	29,2	AA	5,1	0,9	13,1
25155	6,45	12,6	41,6	64,5	19,5	30,3	AA	5,1	0,7	12,9
25138	5,37	11,1	37,2	69,3	20,6	29,7	AA	5,1	0,6	9,5
25142	5,87	12,4	41,2	70,2	21,1	30,0	AA	5,1	1,5	14,0
25130	5,78	12,1	41,6	72,1	21,0	29,1	AA	5,1	1,1	7,3
25145	5,00	10,9	36,6	73,2	21,9	29,9	AA	5,1	1,3	10,6
25347	6,59	12,8	43,2	65,5	19,5	29,8	AA	5,0	1,8	14,1
25679	5,40	11,3	35,8	66,3	20,9	31,5	AA	5,0	1,8	8,4
25110	6,14	12,7	41,8	68,0	20,7	30,5	AA	5,0	1,4	17,0
25104	5,48	11,4	37,3	68,1	20,9	30,6	AA	5,0	0,9	14,3
25678	5,54	12,0	38,4	69,2	21,7	31,3	AA	5,0	0,6	16,0
25144	4,73	10,4	34,5	73,0	21,9	30,1	AA	5,0	0,5	6,3
25719	6,32	12,8	41,8	66,1	20,3	30,7	AA	4,9	1,7	12,2
25131	6,73	13,5	45,7	68,0	20,0	29,4	AA	4,9	1,1	8,7
25158	5,30	10,8	36,3	68,4	20,4	29,8	AA	4,9	0,6	11,7
25132	5,54	11,3	37,8	68,2	20,3	29,8	AA	4,8	1,9	6,5
25147	6,38	12,7	43,1	67,5	20,0	29,6	AA	4,7	0,8	12,0
25126	5,26	11,4	36,0	68,5	21,7	31,7	AA	4,7	0,4	8,9
25129	4,76	10,0	33,2	69,7	21,0	30,1	AA	4,7	0,8	10,9
25127	5,26	11,3	37,1	70,6	21,5	30,5	AA	4,7	2,7	12,9
25134	4,84	10,1	33,9	70,0	20,9	29,8	AA	4,6	0,5	9,7
25141	6,23	13,7	44,8	71,9	22,0	30,5	AA	4,5	0,8	8,3
25107	6,06	10,6	36,0	59,3	17,4	29,4	AA	4,4	1,0	18,1
25120	6,81	13,0	43,3	63,5	19,0	30,0	AA	4,2	1,4	6,3
25114	6,03	12,4	40,5	67,2	20,5	30,5	AA	4,2	0,8	8,3
25113	6,47	13,4	45,4	70,2	20,7	29,5	AA	4,2	1,8	17,5
25105	4,92	11,1	37,3	75,8	22,6	29,8	AA	4,1	1,5	17,2

No	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elek	Hb A ₂ %	Hb F %	G6PD (U/gHb)
25119	5,63	10,0	34,3	61,0	17,7	29,0	AA	4,0	0,8	10,8
25186	4,50	9,7	33,9	75,3	21,6	28,6	AA	4,0	0,9	11,0
25682	5,49	11,4	36,1	65,8	20,8	31,7	AA	3,8	1,5	20,0
25108	5,28	10,8	35,9	68,0	20,4	30,0	AA	3,8	1,3	6,9
25125	4,41	9,1	30,7	69,5	20,7	29,7	AA	3,8	0,6	8,2
25118	5,25	11,1	36,5	69,7	21,2	30,4	AA	3,8	0,9	8,6



N. AİLESİ

G6PD aktivite düzeyi 0,0 U/gHb olan N ailesinin 3 kuşağından toplam 7 olgudan kan örneği alınarak enzim düzeyleri ölçülmüş ve ailenin soy ağacı çizilmiştir (Şekil 4.1.). Ailenin ikinci kuşağında bir kadın ve bir erkek bireyde enzim aktivitesi 0,0 U/gHb olarak bulunmuş diğer 4 olgunun aktiviteleri ise 5,5 – 14,1 U/gHb arasında saptanmıştır.



Şekil 4.1. N Ailesinin Soyağacı

N ailesinden H.T ve İ.N'nin G6PD enzimi DE-52 reçinesiyle kısmi olarak saflaştırılmış ancak H.T'nin saflaştırıldıktan sonra aktivitesi elde edilemediği için kinetik çalışması yapılamamıştır. M.A.N'ye tekrar ulaşılamadığı için çalışmaya alınmamıştır. İ.N'nin kısmi saflaştırma aktivitesi olduğu için kinetik çalışması yapılmış veriler çizelgede 4.3'de verilmiştir. (Şekil 4.2-4.6) İ.N'nin kinetik bulgularının Gd B⁺ ve Gd Akdenizden farklı olduğu gözlenmiştir. Her iki olgunun da membran proteinleri çalışılmış ve bulgular çizelge 4.4'de sunulmuştur. Her iki olgunun da bariz olarak ankrin eksikliği içerdiği saptanmıştır.

Çizelge 4.5'de gözlemlendiği gibi enzim aktivitesi 0,0 U/ gHb olan 3 olgunun da Gd Akdeniz mutasyonu içerdiği, A.N'nin enzim aktivitesinin 5,5 U/gHb ve P.N'nin enzim aktivitesinin de 7.0 U/gHb olmasına rağmen bu olguların da Gd Akdeniz mutasyonu içerdiği saptanmıştır. Z.N'nin G6PD enzim aktivitesi normal olmasına rağmen MDA düzeyinin yüksek olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.3. İ.N'nin kinetik verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Km (µM)		Analog kullanımı				Optimum pH	İlk 20' ak.değ (%)
		G6P	NADP ⁺	dNADP	NAD	Gal6P	2dG6P		
İ.N	0,0	113	100	339	104	0	0	7	50
Gd B ⁺	8,3±3,3	50-70	2-4	55-60	<1	7-15	<4		
Gd Akdeniz	0-7	19-26	1,2-1,6	350		20	23-37		

Çizelge 4.4. İ.N ve H.T'nin membran proteinleri verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Spektrin	Ankrin	Bant 3	Bant 4.1	Bant 4.2
İ.N	0,0	24	2	24	4	4
H.T	0,0	26	2	25	2	7
Referans aralık	8,3±3,3	21±2	5±1	21±2	5±1	5±1

Çizelge 4.5. N ailesinin Gd Akdeniz mutasyon verileri

	G6PD (U/gHb)	G6PD mutasyonu	MDA nmol/mL
İ.N	0,0	Med	1,0
M.A.N	0,0	Med	--
H.T	0,0	Med	2,3
A.N	5,5	Med	--
P.N	7,0	Med	2,0
K.N	12,7	N	1,3
Z.N	14,1	N	6,0

N: Gd Akdeniz mutasyonu taşıyor

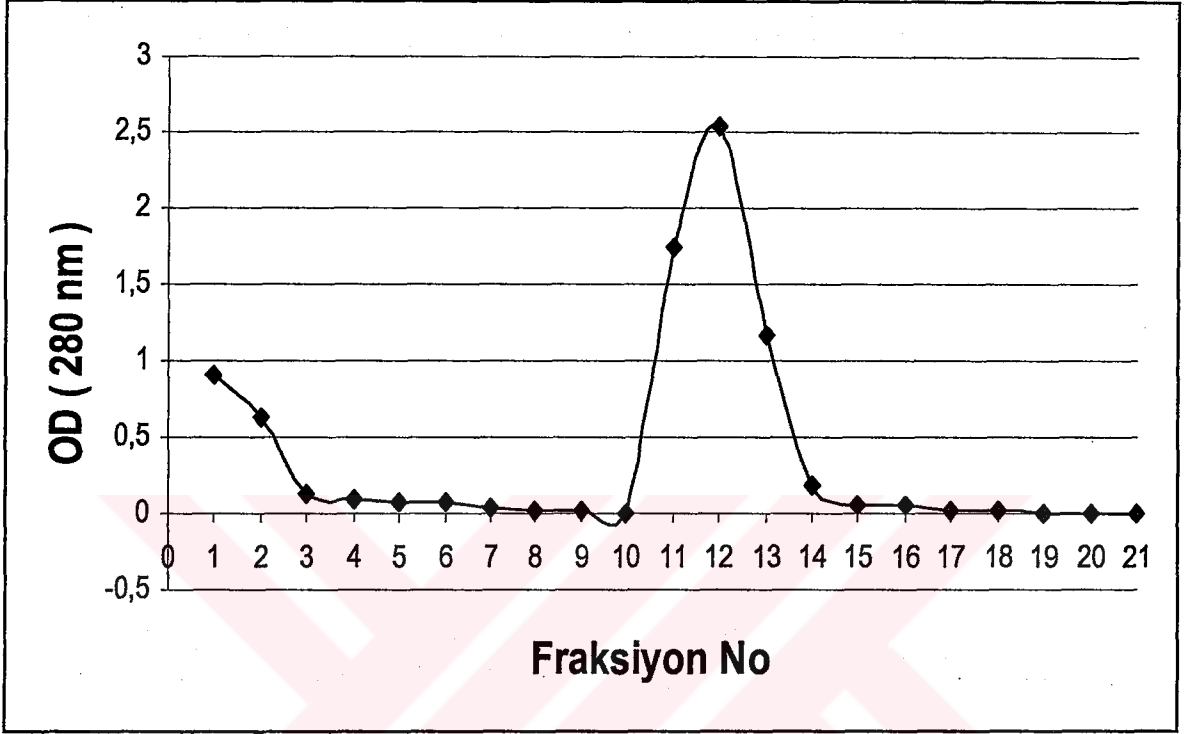
Hematolojik bulgular incelendiğinde bütün olguların Hb AA tipinde olduğu ve Hb A₂ düzeylerinin normal olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6.N. Ailesinin hematolojik bulguları

	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elektrofor ez	Hb A2 %	Hb F %
K.N	4,55	12,9	37,2	81,7	28,4	34,7	AA	3,2	1,8
H.T	4,10	12,1	37,3	90,8	29,5	32,4	AA	3,1	0,6
M.A.N	4,48	12,4	45,1	100,6	27,6	27,4	AA	3,0	2,0
A.N	4,57	11,5	41,9	91,6	25,2	27,5	AA	2,8	2,0
P.N	4,47	11,6	35,7	79,8	25,9	32,5	AA	2,7	2,0
İ.N	5,31	15,5	45,3	85,2	29,2	34,2	AA	2,5	1,0
Z.N	4,23	9,6	36,1	85,3	22,8	26,8	AA	2,5	1,3

İ.N'nin Kinetik Bulguları

Hemolizat aktivitesi : 0,0 Ü/ mL



Şekil 4.2. İ.N'nin G6PD enzimin saflaştırılması grafiği

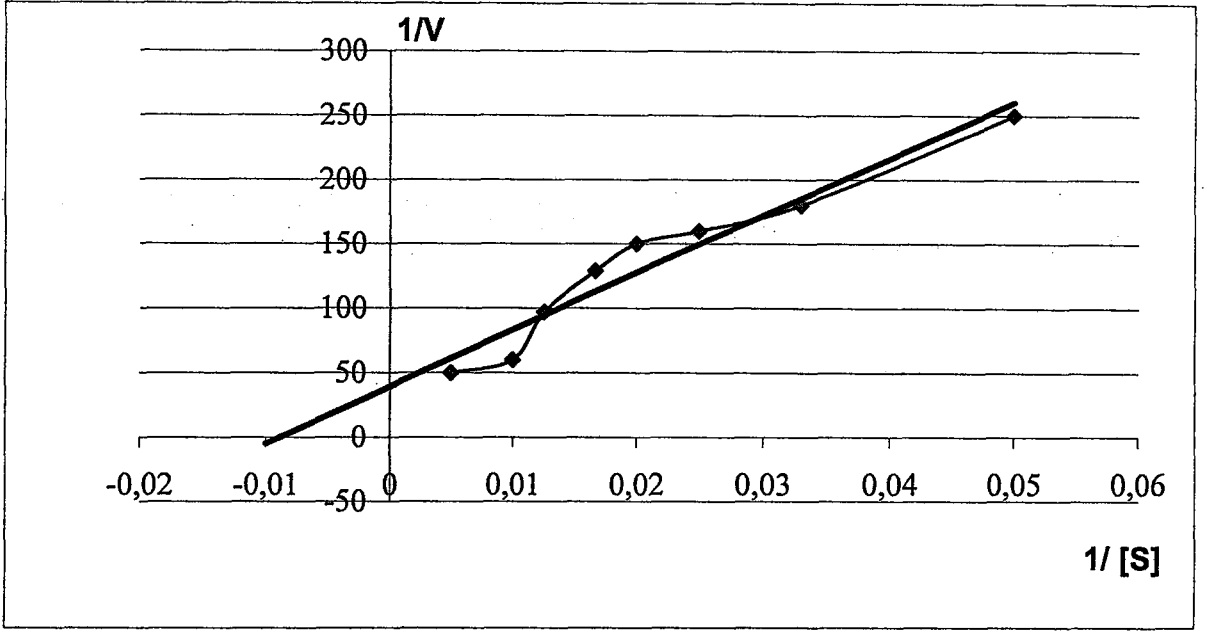
Yüksek OD'li fraksiyon G6PD enzim aktivitesi:

11. fraksiyon: 0,0079 U/ mL

12. fraksiyon: 0,0115 U/ mL

13. fraksiyon: 0,0052 U/ mL

G6PD enzim kinetiği çalışmalarında 12. fraksiyon kullanılmıştır.

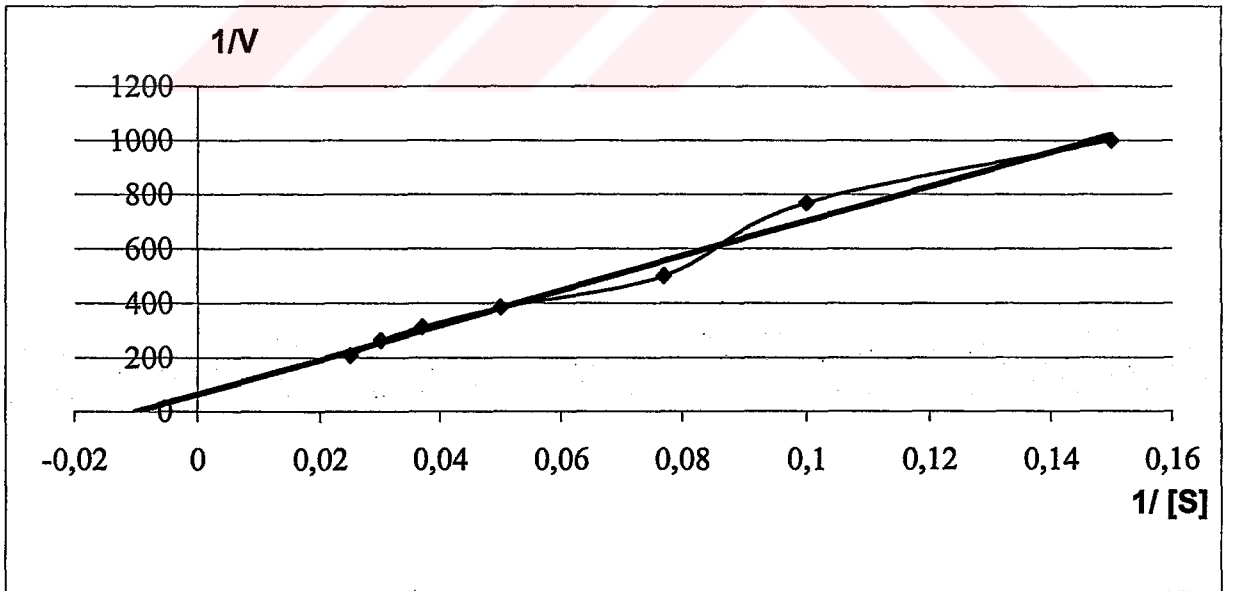


Şekil 4.3. İ.N'nin G6P kinetik çalışması

$$Y=4426,4x+39,222$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

$$K_m^{G6P} = 113 \mu M$$



Şekil 4.4. İ.N' nin NADP+ kinetik çalışması

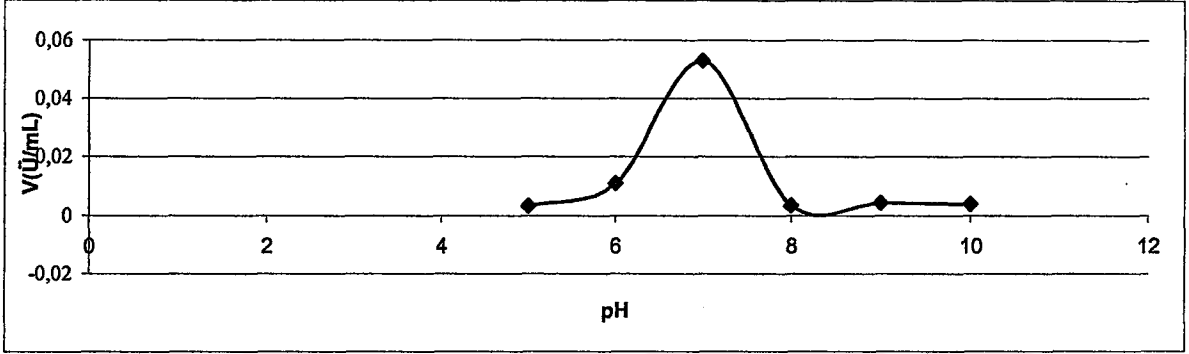
$$Y=6372,7x+63,883$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

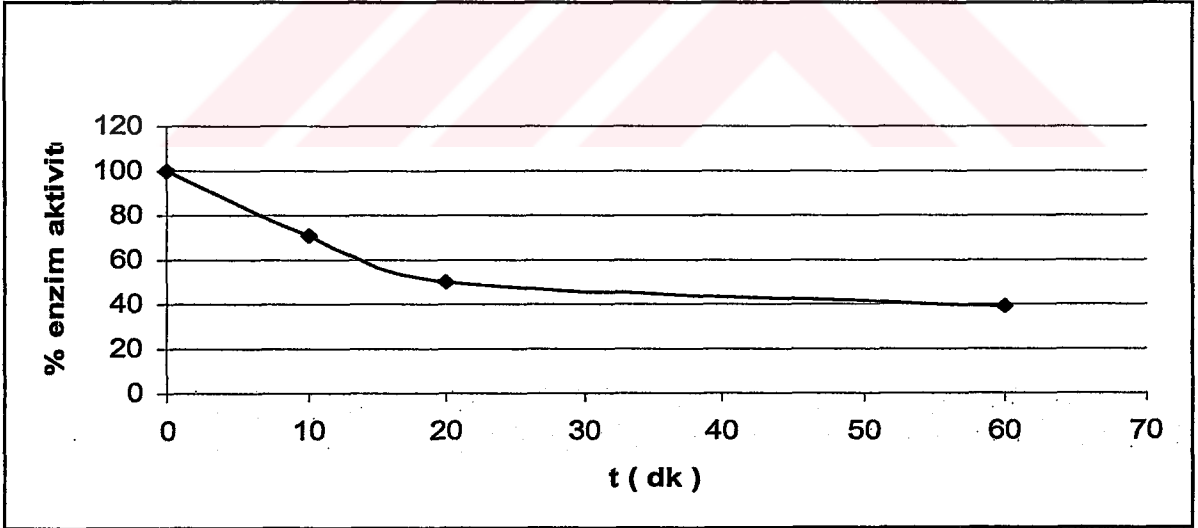
$$K_m^{NADP} = 100 \mu M$$

Çizelge 4.7. İ.N'nin analog kullanımı

	V (U/mL)	%
12. Fraksiyon	0,0115	100
dNADP	0,039	339
NAD	0,012	104
2dG6P	0,0	0
Gal6P	0,0	0



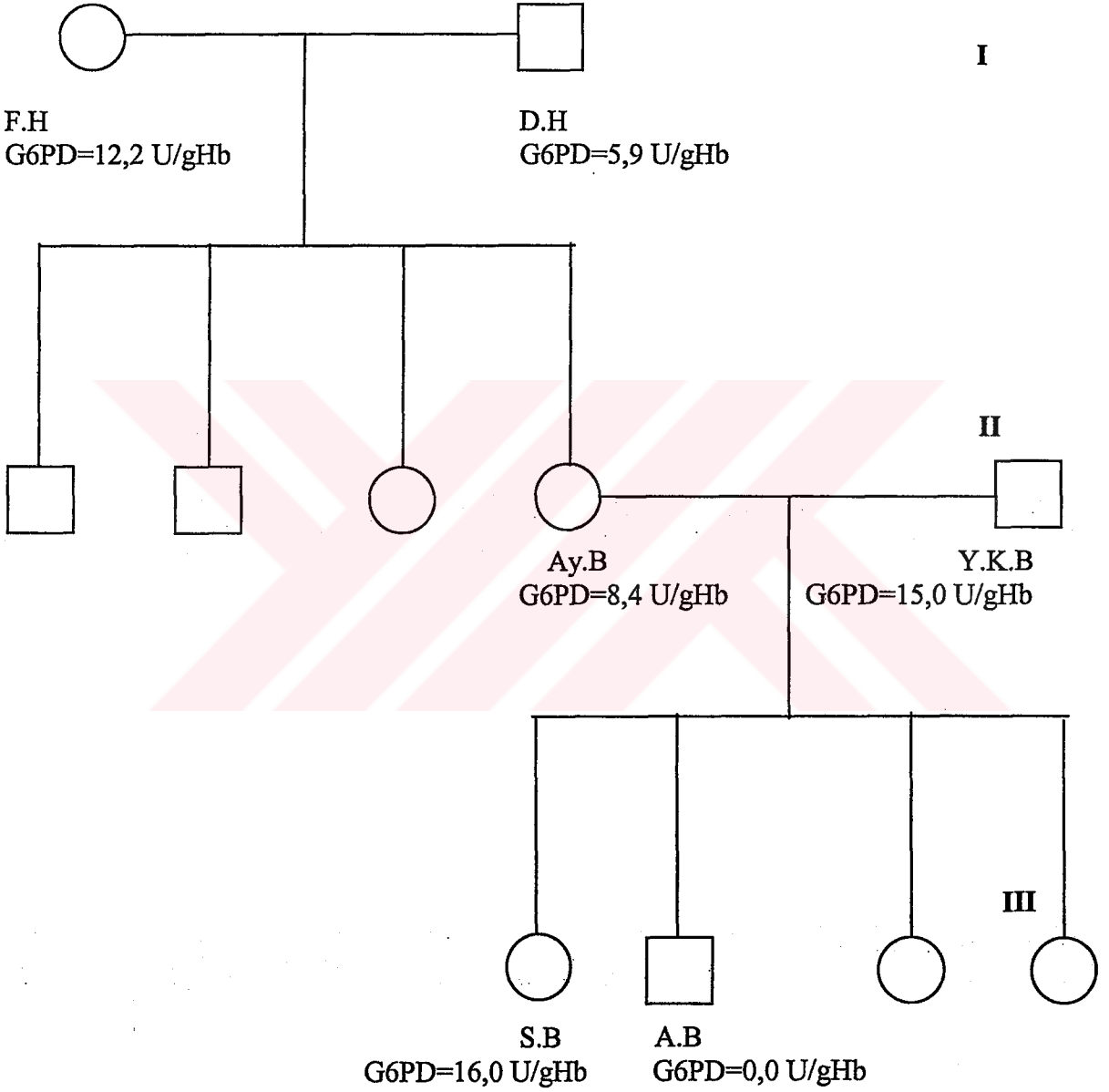
Şekil 4.5. İ.N'nin G-6-PD enziminin pH stabilitesi



Şekil 4.6. İ.N'nin G-6-PD enziminin ısı stabilitesi

B. AİLESİ

B ailesinin 3 kuşağından toplam 6 olgudan kan örneği alınarak enzim düzeyleri ölçülmüş ve ailenin soy ağacı çizilmiştir (Şekil 4.7.). Ailenin üçüncü kuşağında bir erkek bireyde enzim aktivitesi 0,0 U/gHb olarak bulunmuş diğer 5 olgunun aktiviteleri ise 5,9-16,0 U/gHb arasında saptanmıştır.



Şekil 4.7.B. Ailesinin soyağacı

B ailesinden A.B'nin G6PD enzimi DE-52 reçinesiyle kısmi olarak saflaştırılmış ve kinetik çalışması yapılmıştır. A.B'nin DE-52 saflaştırma grafisi, K_m G6P ve $NADP^+$ grafiği, analog kullanımı, pH ve ısı stabilite grafiği şekil 4.8-4.12 arasında ve kinetik bulgular da toplu olarak çizelge 4.8'de verilmiştir. Kinetik bulguların Gd B⁺ ve Gd Akdeniz bulgularından farklı olduğu gözlenmiştir. A.B'nin membran proteinleri çalışılmış ve en belirgin eksiklik Band 4.1'de saptanmıştır (Çizelge 4.9.). Gd Akdeniz mutasyonu hiçbir olguda gözlenmemiş ve MDA düzeylerinin de normal olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.10.).

Çizelge 4.8. A.B'nin kinetik verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Km (μ M)		Analog kullanımı				Optimum pH	İlk 20' ak.değ (%)
		G6P	$NADP^+$	dNADP	NAD	Gal6P	2dG6P		
A.B	0,0	116	476	223	0	0	0	7	0
Gd B ⁺	8,3±3,3	50-70	2-4	55-60	<1	7-15	<4		
Gd Akdeniz	0-7	19-26	1,2-1,6	350		20	23-37		

Çizelge 4.9. A.B'nin membran proteinleri verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Spektrin	Ankrin	Bant 3	Bant 4.1	Bant 4.2
A.B	0,0	23	7	24	3	4
Referans aralık	8,3±3,3	21±2	5±1	21±2	5±1	5±1

Çizelge 4.10. B ailesinin Gd Akdeniz mutasyon verileri

	G6PD (U/gHb)	Gd Akdeniz mutasyonu	MDA nmol/mL
A.B	0,0	N	0,6
D.H	5,9	N	--
Ay.B	8,4	N	--
F.H	12,2	N	2,6
Y.K.B	15,0	N	0,0
S.B	16,0	N	--

N: Gd Akdeniz mutasyonu taşıyor

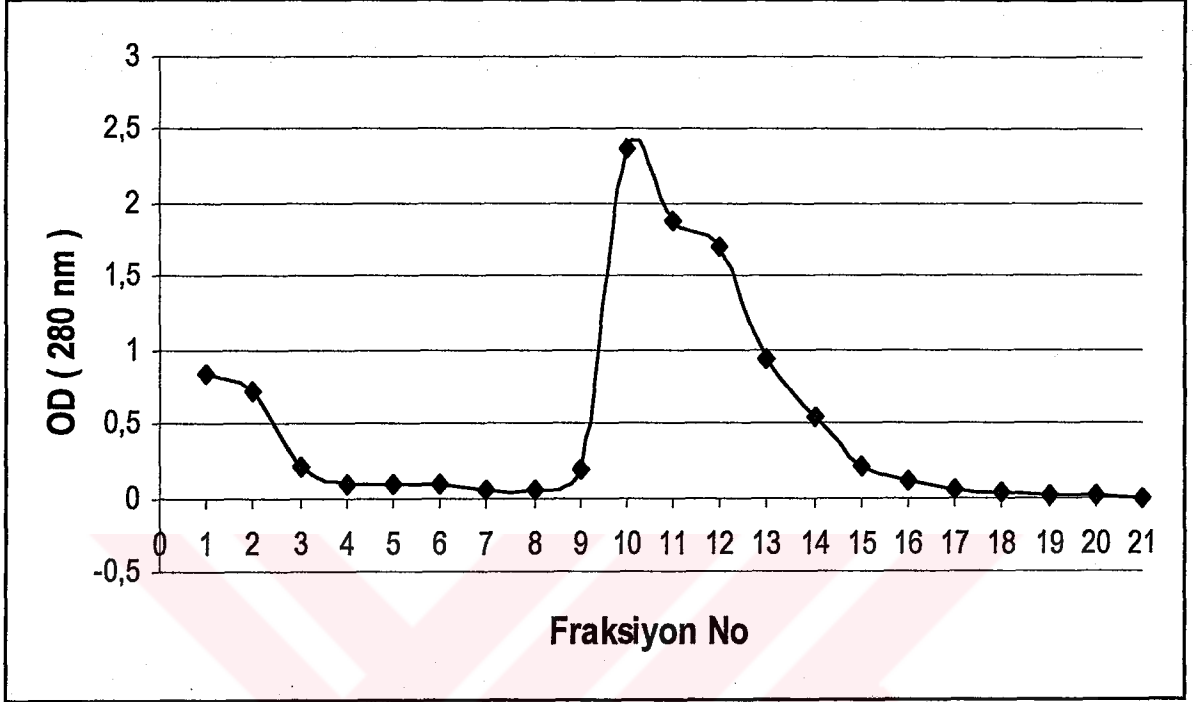
Ailenin hematolojik verileri incelendiğinde bütün olguların Hb AA olduğu, A.B, Ay.B, S.B ve F.H'nin Hb A₂ düzeylerinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.11.).

Çizelge 4.11. B. Ailesinin hematolojik bulguları

	RBC (10 ¹² / L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elektro	Hb A ₂ %	Hb F %
A.B	5,71	12,0	39,3	68,9	20,9	30,4	AA	5,4	0,7
Ay.B	5,40	11,3	35,8	66,3	20,9	31,5	AA	5,0	1,8
S.B	5,54	12,0	38,4	69,2	21,7	31,3	AA	5,0	0,6
F.H	6,32	12,8	41,8	66,1	20,3	30,7	AA	4,9	1,7
D.H	4,83	15,0	44,3	91,6	31,2	34,0	AA	3,1	1,8
Y.K.B	5,68	15,8	47,1	83,0	27,9	33,6	AA	2,7	2,0

A.B'nin Kinetik Bulguları

Hemolizat aktivitesi : 0,0 Ü/ mL



Şekil 4.8. A.B'nin G6PD enzimin saflaştırılması grafiği

Yüksek OD'li fraksiyon G6PD enzim aktivitesi:

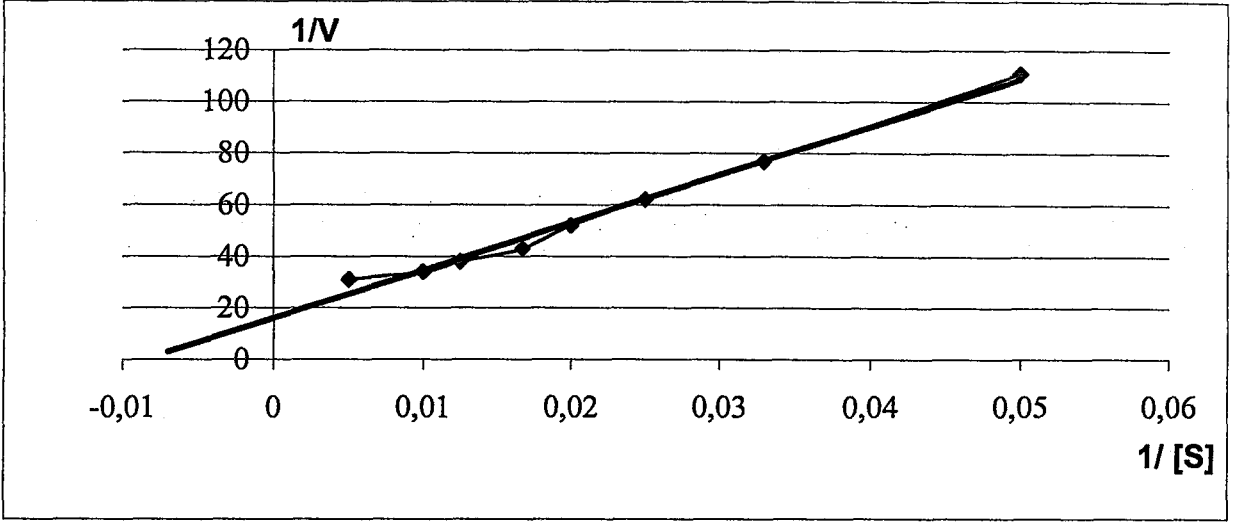
10. fraksiyon: 0,013 U / mL

11. fraksiyon: 0,010 U / mL

12. fraksiyon: 0,009 U / mL

13. fraksiyon: 0,005 U / mL

G6PD enzim kinetiği çalışmalarında 10. fraksiyon kullanılmıştır.

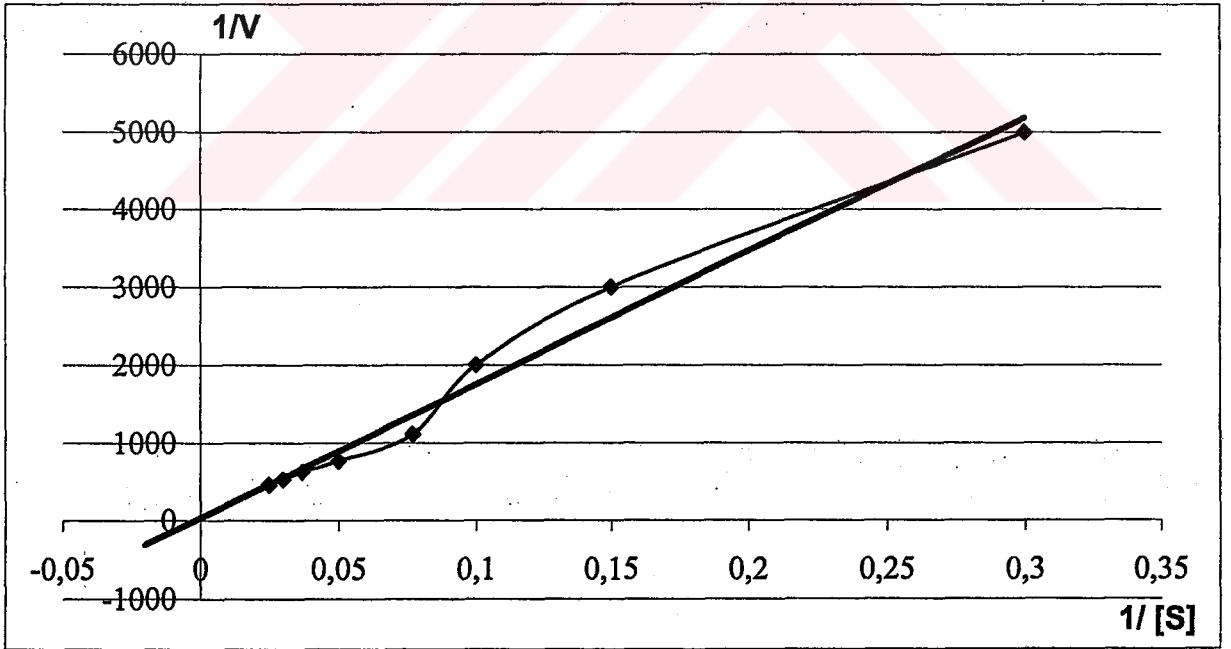


Şekil 4.9.A.B'nin G6P kinetik çalışması

$$Y=1857,5+16,018x$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

$$K_m^{G6P} = 116 \mu M$$



Şekil 4.10.A.B'nin NADP+ kinetik çalışması

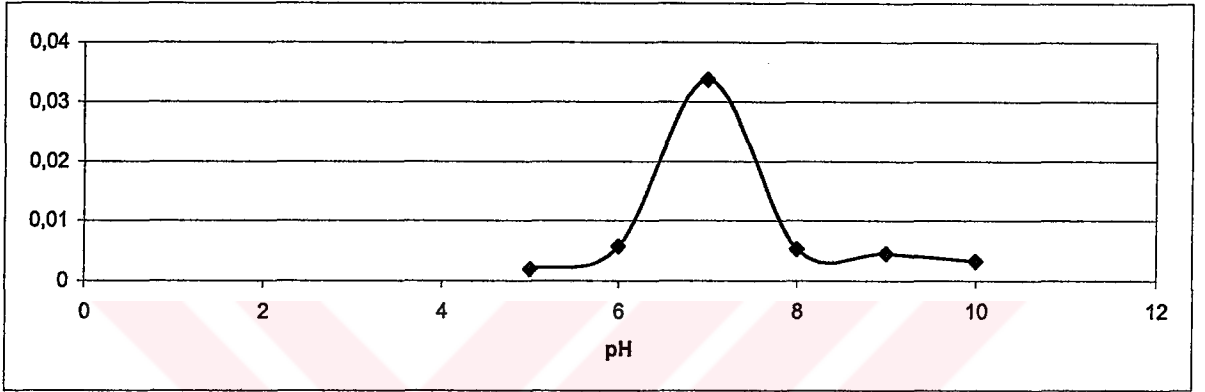
$$Y= 17161x + 36,003$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

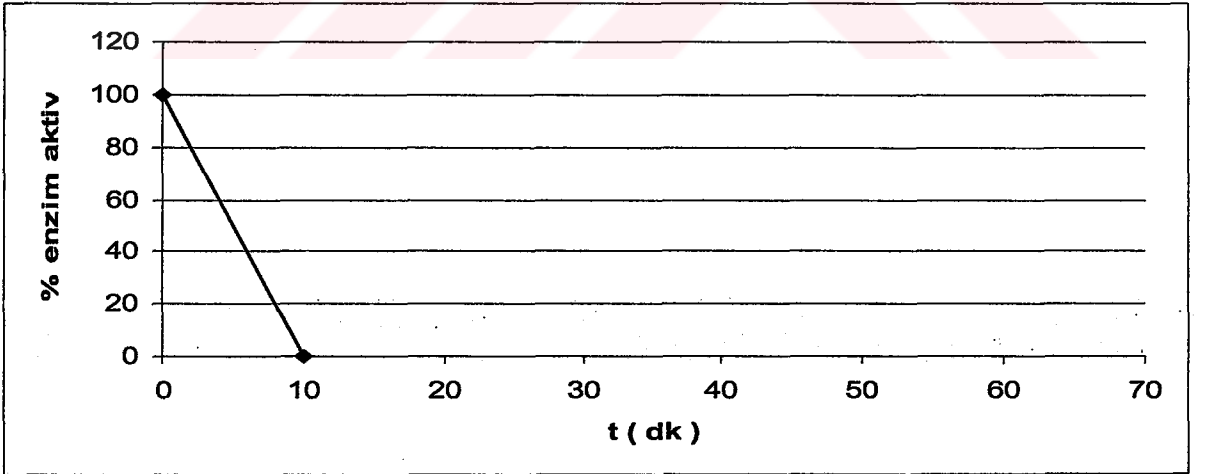
$$K_m^{NADP} = 476 \mu M$$

Çizelge 4.12. A.B'nin analog kullanımı

	V (Ü / mL)	%
10. Fraksiyon	0,0013	100
dNADP	0,029	223
NAD	0,0	0
2dG6P	0,0	0
Gal6P	0,0	0



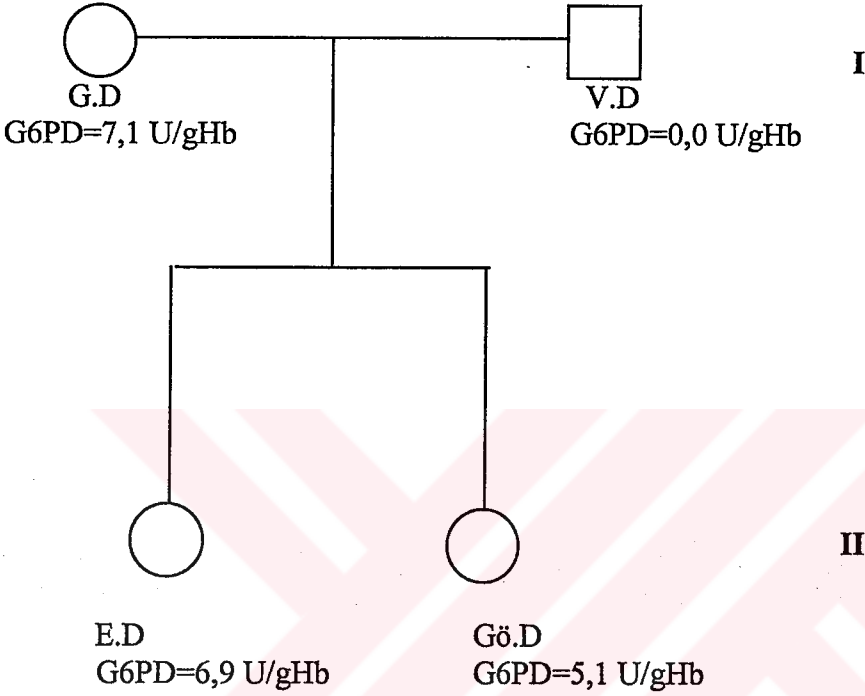
Şekil 4.11.A.B'nin G-6-PD enziminin pH stabilitesi



Şekil 4.12. A.B'nin G-6-PD enziminin ısı stabilitesi

D. AİLESİ

G6PD aktivite düzeyi 0,0 U/gHb olan V.D'nin ailesinin 2 kuşağından toplam 4 olgudan kan örneği alınarak enzim düzeyleri ölçülmüş ve ailenin soy ağacı çizilmiştir (Şekil 4.13). Ailenin ilk kuşağında bir erkek bireyde enzim aktivitesi 0,0 U/gHb olarak bulunmuş diğer 3 olgunun aktiviteleri ise 5,1-7,1 U/gHb arasında saptanmıştır.



Şekil 4.13 . D Ailesinin soyağacı

D ailesinden V.D'nin G6PD enzimi DE-52 reçinesiyle kısmi olarak saflaştırılarak kinetik çalışması yapılmıştır. V.D'nin DE-52 saflaştırma grafisi, K_m G6P ve $NADP^+$ grafiği, analog kullanımı, pH ve ısı stabilite grafiği şekil 4.14-4.18 arasında ve kinetik bulgular da toplu olarak çizelge 4.13'de verilmiştir. Kinetik bulgularının Gd B⁺ ve Gd Akdenizden farklı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca V.D'nin membran proteinleri çalışılmış ve en belirgin eksiklik Band 4.1'de bulunmuştur (Çizelge 4.14.).

Gd Akdeniz mutasyonu moleküler düzeyde çalışıldığında G.D hariç ailenin tüm bireylerinin Gd Akdeniz mutasyonu içerdiği bulunmuştur. V.D'nin MDA düzeyi de normal bulunmuştur (Çizelge 4.15.).

Çizelge 4.13. V.D'nin kinetik verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Km (μ M)			Analog kullanımı			Optimum pH	İlk 20' ak.değ (%)
		G6P	NADP ⁺	dNADP	NAD	Gal6P	2dG6P		
V.D	0,0	434	5	28	41	28	41	7	41
Gd B ⁺	8,3±3,3	50-70	2-4	55-60	<1	7-15	<4		
Gd Akdeniz	0-7	19-26	1,2-1,6	350		20	23-37		

Çizelge 4.14. V.D'nin membran proteinleri verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Spektrin	Ankrin	Bant 3	Bant 4.1	Bant 4.2
V.D	0,0	23	7	24	3	5
Referans aralık	8,3±3,3	21±2	5±1	21±2	5±1	5±1

Çizelge 4.15. D ailesinin Gd Akdeniz mutasyon verileri

	G6PD (U/gHb)	Gd Akdeniz mutasyonu	MDA nmol/mL
V.D	0,0	Med	1,0
Gö.D	5,1	Med	--
E.D	6,9	Med	--
G.D	7,1	N	--

N: Gd Akdeniz mutasyonu taşıyor

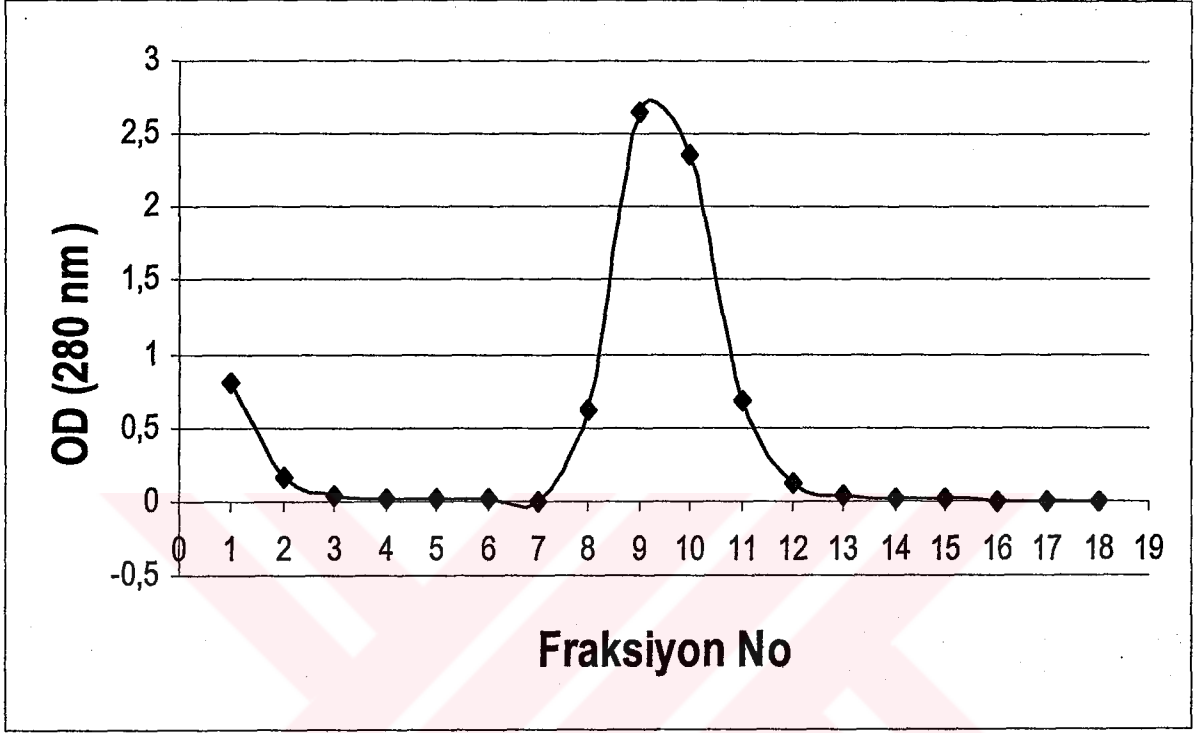
Ailenin hematolojik verileri incelendiğinde bütün bireylerin Hb AA olduğu ve V.D. ile E.D'nin Hb A₂ düzeylerinin yüksek olduğu bulunmuştur (Çizelge 4.16.).

Çizelge 4.16. D. Ailesinin hematolojik bulguları

	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elektro	Hb A ₂ %	Hb F %
V.D	5,37	11,1	37,0	68,9	20,8	30,2	AA	5,6	1,3
E.D	5,28	10,8	35,9	68,0	20,4	30,0	AA	3,8	1,3
Gö.D	4,34	12,3	38,2	88,0	28,3	32,2	AA	2,8	0,4
G.D	4,10	11,5	37,3	90,9	28,0	30,8	AA	2,2	2,1

V.D'nin Kinetik Bulguları

Hemolizat aktivitesi : 0,0 Ü/ mL



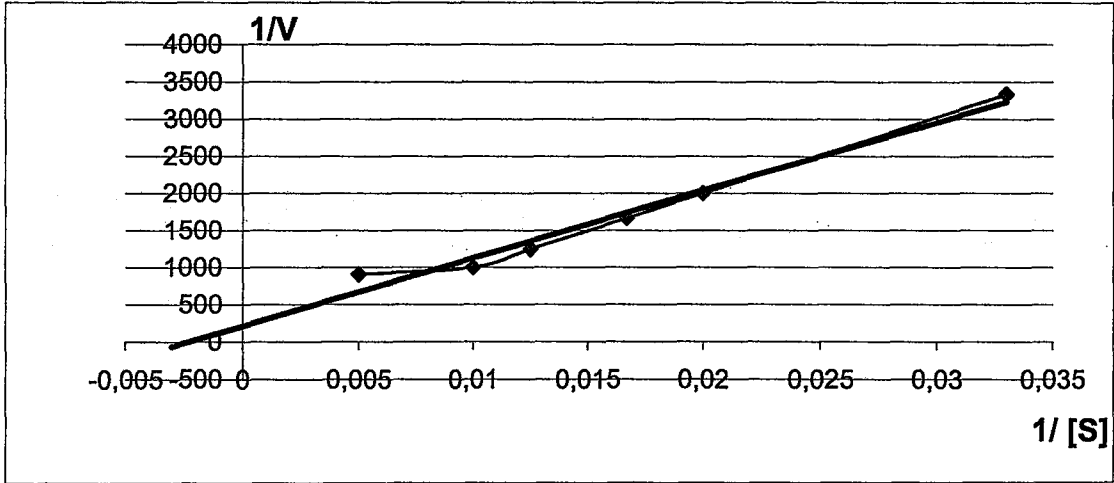
Şekil 4.14. V.D'nin G6PD enzimin saflaştırılması grafiği

Yüksek OD'li fraksiyon G6PD enzim aktivitesi:

9. fraksiyon: 0,0032 U/ mL

10. fraksiyon: 0,0028 U / mL

G6PD enzim kinetiği çalışmalarında 9. fraksiyon kullanılmıştır.

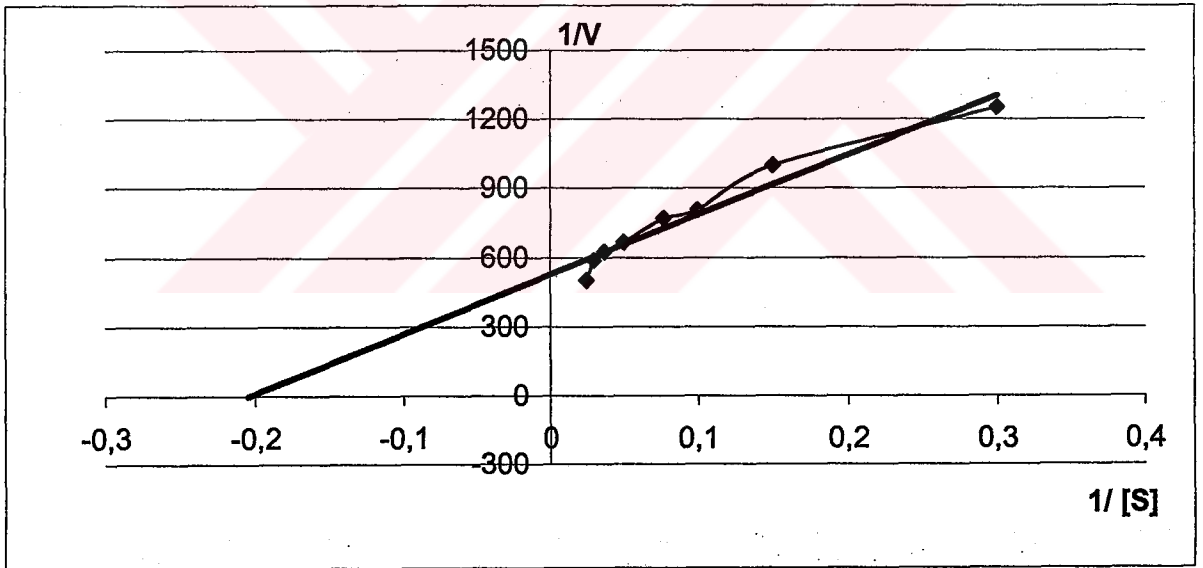


Şekil 4.15.V.D'nin G6P⁺ kinetik çalışması

$$Y=91511x+210,68$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

$$K_m^{G6P} = 434 \mu M$$



Şekil 4.16.V.D'nin NADP⁺ kinetik çalışması

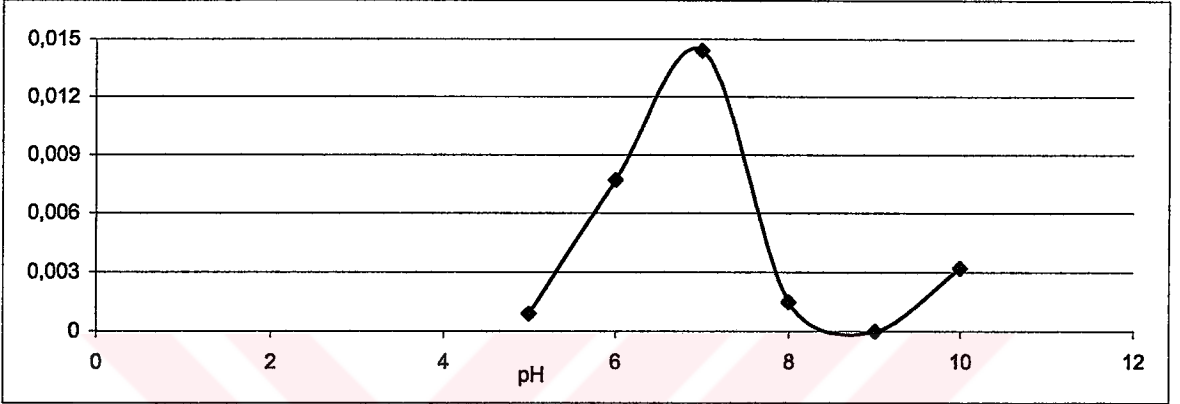
$$Y=2582,7x+526,99$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

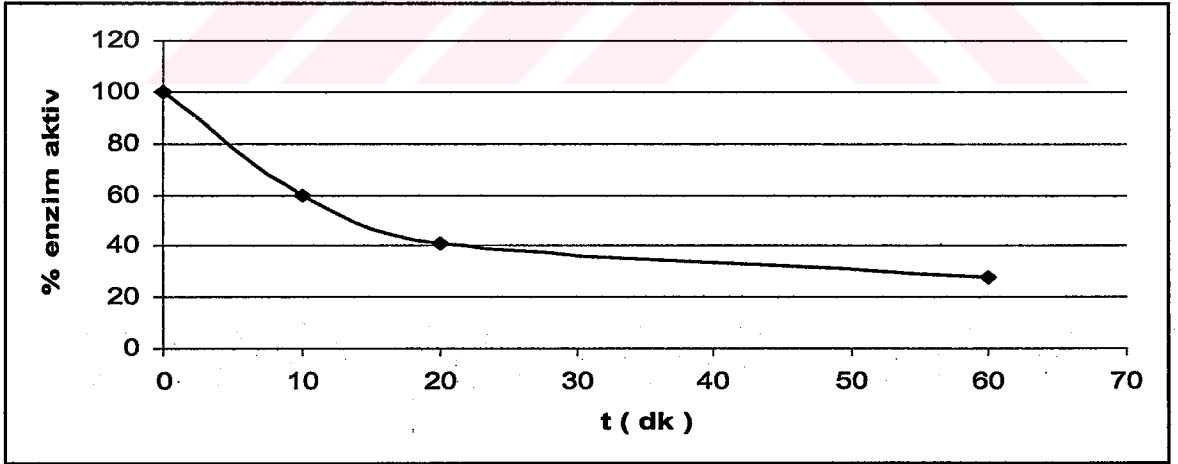
$$K_m^{NADP} = 5 \mu M$$

Çizelge 4.17. V.D'nin analog kullanımı

	V (Ü / mL)	%
9. Fraksiyon	0,0032	100
dNADP	0,0009	28
NAD	0,0013	41
Gal6P	0,0009	28
2dG6P	0,0013	41



Şekil 4.17.V.D'nin G-6-PD enziminin pH stabilitesi



Şekil 4.18.V.D'nin G-6-PD enziminin ısı stabilitesi

T. AİLESİ

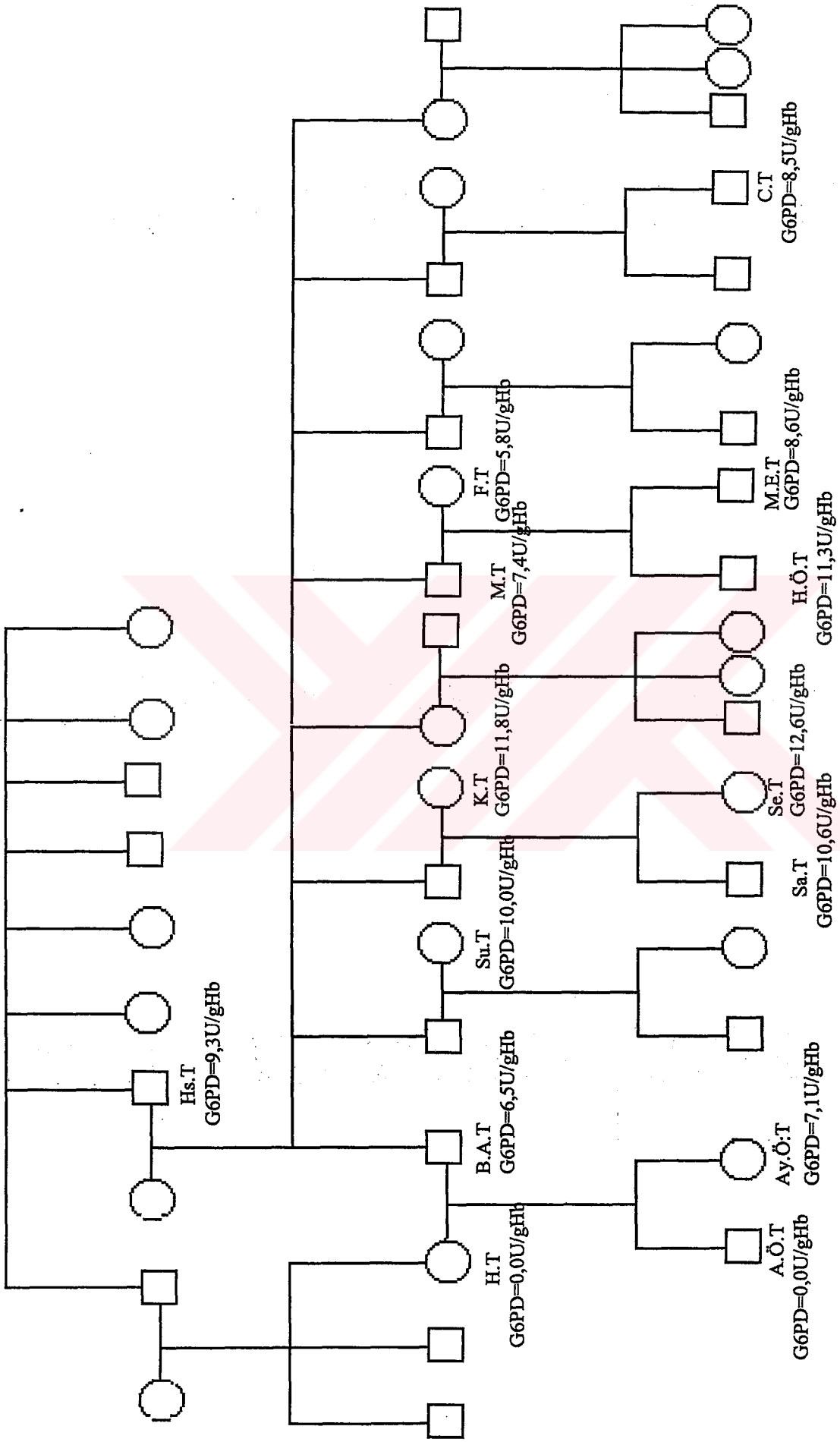
G6PD aktivite düzeyi 0,0 U/gHb olan T ailesinin 3 kuşağından toplam 14 olgudan kan örneği alınarak enzim düzeyleri ölçülmüş ve ailenin soy ağacı çizilmiştir (Şekil 4.19.). Ailenin ikinci kuşağında bir kadın ve üçüncü kuşağında da bir erkek bireyde enzim aktivitesi 0,0 U/gHb olarak bulunmuş diğer 12 olgunun aktiviteleri ise 5,8 – 12,6 U/gHb arasında saptanmıştır.

T ailesinden H.T ve A.Ö.T' nin G6PD enzimi DE-52 reçinesiyle kısmi olarak saflaştırılmış ancak H.T'nin saflaştırıldıktan sonra aktivitesi elde edilemediği halde A.Ö.T'nin aktivitesi elde edilebilmiş ve kinetik çalışması yapılabilmektedir. A.Ö.T' nin DE-52 saflaştırma grafisi, K_m G6P ve $NADP^+$ grafiği, analog kullanımı, pH ve ısı stabilite grafiği şekil 4.20-4.24 arasında ve kinetik bulgular da toplu olarak çizelge 4.18'de verilmiştir. Kinetik bulgular Gd B⁺ ve Gd Akdenizden farklı bulunmuştur. Ayrıca A.Ö.T' nin membran proteinleri çalışıldığında Band 4.1 ve 4.2'de bariz yükseklik saptanmıştır (Çizelge 4.19).

Çizelge 4.20'de gözlemlendiği gibi H.T ve A.Ö.T' nin enzim aktivitesi 0,0 U/gHb olup Gd Akdeniz mutasyonu içerdikleri ve Ay.Ö.T'nin de enzim aktivitesinin normal olmasına rağmen Gd Akdeniz mutasyonu içerdiği gözlemlenmiştir. MDA düzeyleri ise normal saptanmamıştır.

Çizelge 4.18. A.Ö.T.nin kinetik verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Km (μ M)		Analog kullanımı				Optimum pH	İlk 20' ak.değ (%)
		G6P	$NADP^+$	dNADP	NAD	Gal6P	2dG6P		
A.Ö.T	0,0	140	24	256	121	40	34	7	93
Gd B ⁺	8,3±3,3	50-70	2-4	55-60	<1	7-15	<4		
Gd Akdeniz	0-7	19-26	1,2-1,6	350		20	23-37		



Şekil 4.19. T Ailesinin soyacağı

Çizelge 4.19. A.Ö.T.'nin membran proteinleri verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Spektrin	Ankrin	Bant 3	Bant 4.1	Bant 4.2
A.Ö.T	0,0	22	5	22	8	9
Referans aralık	8,3±3,3	21±2	5±1	21±2	5±1	5±1

Çizelge 4.20. T ailesinin Gd Akdeniz mutasyon verileri

	G6PD (U/gHb)	Gd Akdeniz mutasyonu	MDA nmol/mL
A.Ö.T	0,0	Med	1,6
H.T	0,0	Med	2,3
F.T	5,8	N	0,0
B.A.T	6,5	N	--
Ay.Ö.T	7,1	Med	--
M.T	7,4	N	2,3
C.T	8,5	N	--
M.E.T	8,6	N	--
Hs.T	9,3	N	--
Su.T	10,0	N	0,3
Sa.T	10,6	N	2,0
H.Ö.T	11,3	N	--
K.T	11,8	N	--
Se.T	12,6	N	2,0

N: Gd Akdeniz mutasyonu taşıyor

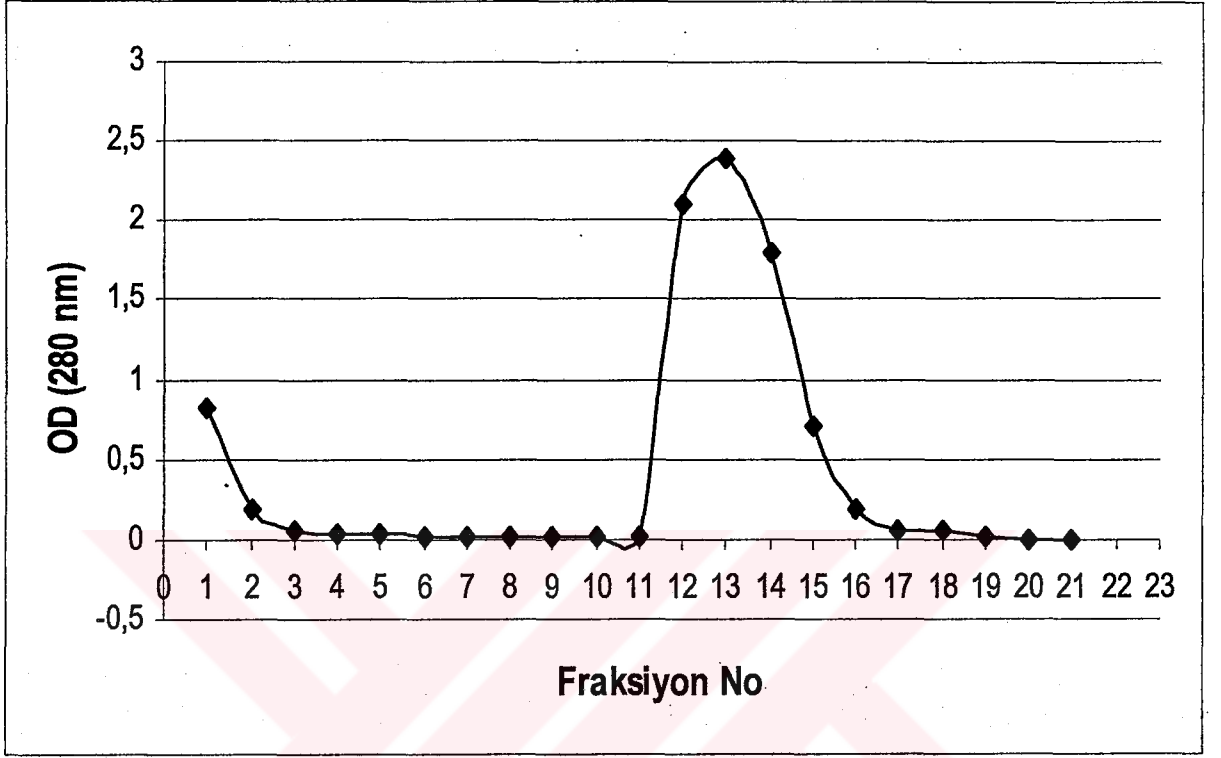
Ailenin hematolojik verileri incelendiğinde bütün olguların Hb AA olduğu ve Sa.T.'nin Hb A₂'sinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21. T. Ailesinin hematolojik bulguları

	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elektro	Hb A ₂ %	Hb F %
Sa.T	5,00	10,9	36,6	73,2	21,9	29,9	AA	5,1	1,3
H.T	4,10	12,1	37,3	90,8	29,5	32,4	AA	3,1	0,6
Hs.T	4,31	12,6	38,8	90,1	29,2	32,4	AA	3,0	0,6
H.Ö.T	4,42	12,1	37,2	84,2	27,5	32,6	AA	3,0	1,3
Su.T	4,72	14,2	40,6	86,0	30,1	35,0	AA	2,9	0,9
C.T	4,63	12,1	38,3	82,8	26,1	31,5	AA	2,8	0,9
A.Ö.T	4,87	14,9	45,9	94,3	30,6	32,5	AA	2,7	1,2
K.T	4,47	12,9	38,2	85,6	28,9	33,8	AA	2,7	1,8
Ay.Ö. T	4,07	12,3	38,2	93,9	30,2	32,1	AA	2,6	0,5
F.T	4,19	11,0	35,1	83,7	26,2	31,3	AA	2,5	0,5
Se.T	4,83	13,8	40,0	82,9	28,5	34,4	AA	2,5	0,7
B.A.T	4,99	15,1	47,2	94,6	30,3	32,0	AA	2,3	1,2
M.E.T	4,20	11,6	35,6	84,8	27,6	32,6	AA	2,3	0,8
M.T	4,47	12,6	39,3	87,9	28,3	22,2	AA	1,8	1,3

A.Ö.T'nin Kinetik Bulguları

Hemolizat aktivitesi : 0,0 Ü/ mL



Şekil 4.20. A.Ö.T'nin G6PD enzimin saflaştırılması grafiği

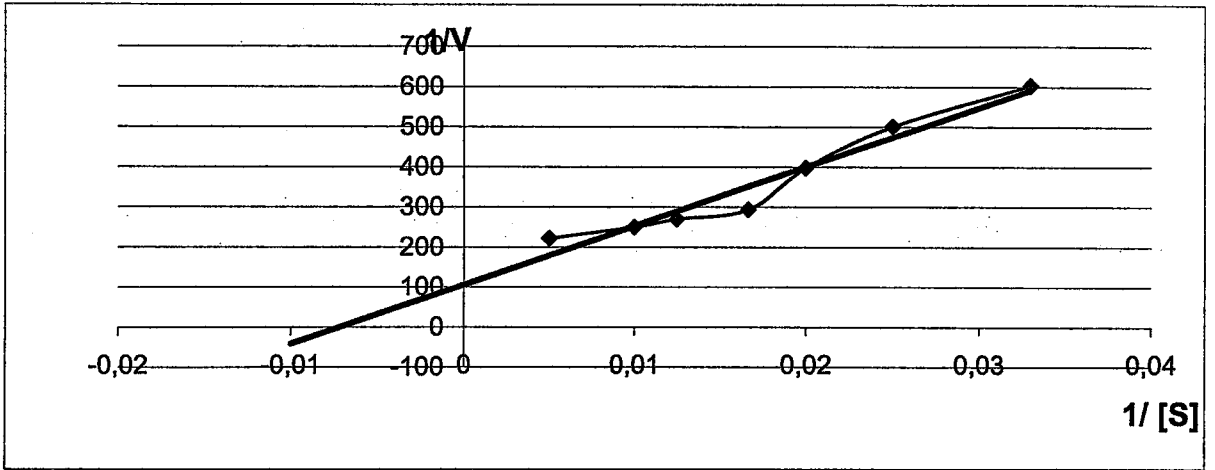
Yüksek OD'li fraksiyon G6PD enzim aktivitesi:

12. fraksiyon: 0,048 U/ mL

13. fraksiyon: 0,055 U/ mL

14. fraksiyon: 0,041 U/ mL

G6PD enzim kinetiği çalışmalarında 13. fraksiyon kullanılmıştır.

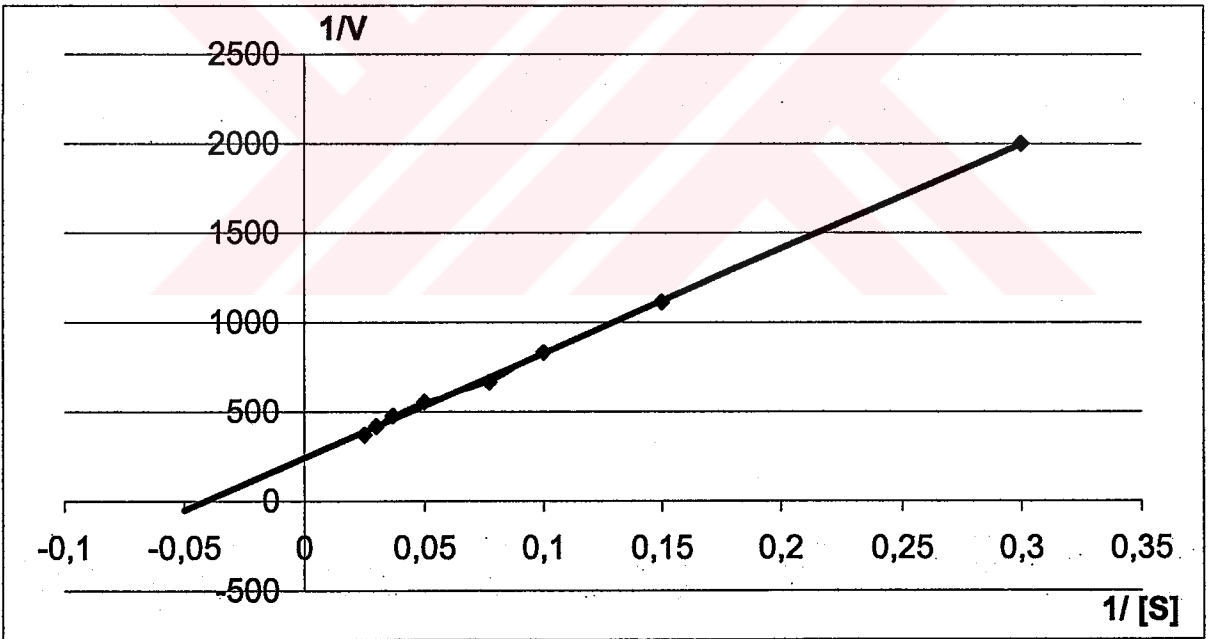


Şekil 4.21.A.Ö.T'nin G6P kinetik çalışması

$$Y=14735x+105,19$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

$$K_m^{G6P} = 140 \mu M$$



Şekil 4.22.A.Ö.T' nin NADP+ kinetik çalışması

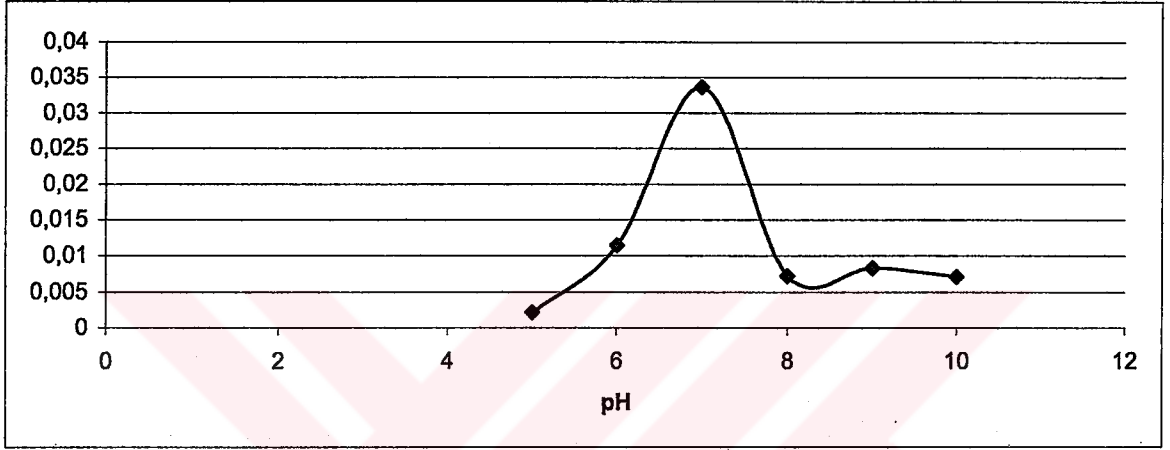
$$Y=5851,6x+240,89$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

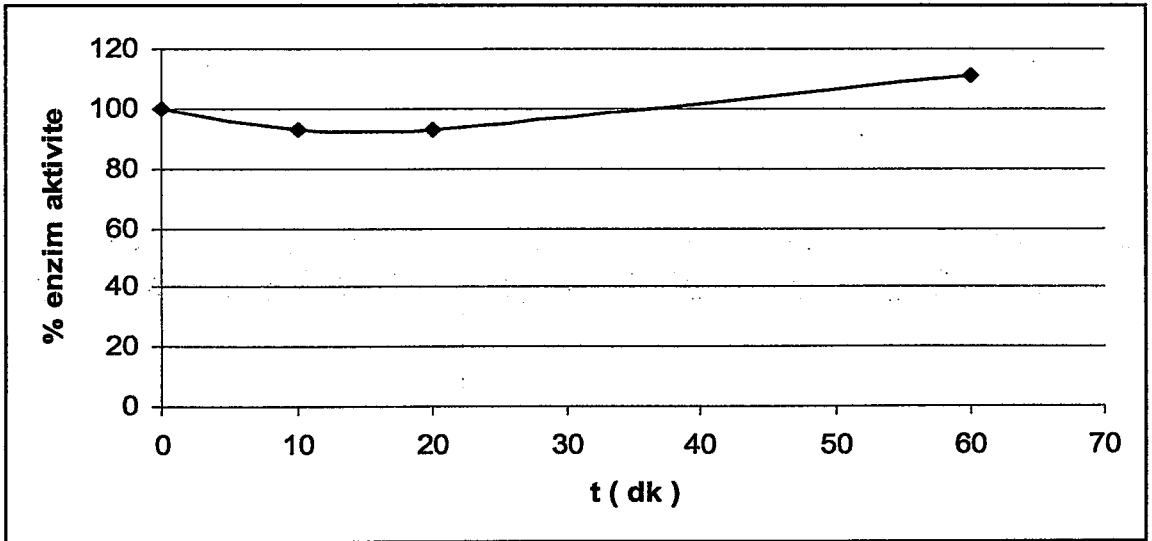
$$K_m^{NADP} = 24 \mu M$$

Çizelge 4.22. A.Ö.T' nin analog kullanımı

	V (Ü / mL)	%
13 . Fraksiyon	0,055	100
dNADP	0,0141	256
NAD	0,0067	121
Gal6P	0,0022	40
2dG6P	0,0019	34



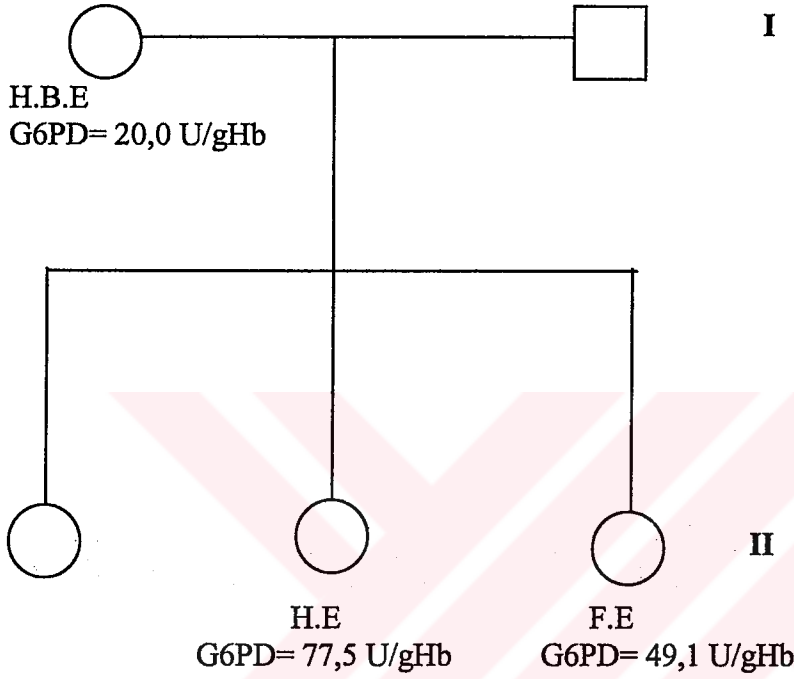
Şekil 4.23. A.Ö.T' nin G-6-PD enziminin pH stabilitesi



Şekil 4.24.A.Ö.T' nin G-6-PD enziminin ısı stabilitesi

E. AİLESİ

G6PD aktivite düzeyi 20,0 U/gHb'den yüksek olan E ailesinin 2 kuşağından toplam 3 olgudan kan örneği alınarak enzim düzeyleri ölçülmüş ve ailenin soy ağacı çizilmiştir (Şekil 4.25.). Ailenin 3 kadın bireyinin enzim aktivitesi 20,0-77,5 U/gHb arasında ölçülmüştür.



Şekil 4.25. E. Ailesinin soyağacı

E ailesinden H.B.E, H.E ve F.E'in G6PD enzimi DE-52 reçinesiyle kısmi olarak saflaştırılmış ve kinetik çalışmaları yapılmıştır. H.B.E, F.E ve H.E'in DE-52 saflaştırma grafisi, K_m G6P ve $NADP^+$ grafiği, analog kullanımı, pH ve ısı stabilite grafiği şekil 4.26 ile şekil 4.40 arasında ve kinetik bulgular da toplu olarak çizelge 4.23'de verilmiştir. Her 3 olgunun da kinetik bulgularının Gd B⁺ ve Gd Akdenizden farklı olduğu gözlenmiştir. Ayrıca H.B.E, F.E ve H.E'in membran proteinleri çalışılmış bulgular çizelge 4.24'de sunulmuştur. F.E. ve H.B.E'nin membran proteinlerindeki en büyük farklılık Ankrin yüksekliği olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.25'de gözleendiği gibi H.B.E, F.E ve H.E'in enzim aktivitesi 20,0-77,5 U/gHb arasında ölçülmüştür. Gd Akdeniz mutasyonu moleküler düzeyde

çalışıldığında ailenin hiçbir ferдинin GdAkdeniz mutasyonu içermediği ve MDA'nın sadece H.E'de yüksek olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4.23. E.ailesinin kinetik verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Km (μM)		Analog kullanımı				Optimum pH	İlk 20' ak.değ (%)
		G6P	NADP ⁺	dNADP	NAD	Gal6P	2dG6P		
H.B.E	20,0	446	9	85	73	0	0	7	90
F.E	49,1	196	6	27	28	5	5	6	93
H.E	77,5	731	3	133	117	0	0	8	60
Gd B ⁺	8,3±3,3	50-70	2-4	55-60	<1	7-15	<4		
Gd Akdeniz	0-7	19-26	1,2-1,6	350		20	23-37		

Çizelge 4.24. E.ailesinin membran proteinleri verileri

Olgu	Spektrin	Ankrin	Bant 3	Bant 4.1	Bant 4.2
H.E	20	6	22	4	5
F.E	22	14	27	2	3
H.B.E	23	12	27	5	3
Referans aralık	21±2	5±1	21±2	5±1	5±1

Çizelge 4.25. Çizelge. E ailesinin Gd Akdeniz mutasyon verileri

	G6PD (U/gHb)	G6PD mutasyonu	MDA nmol/mL
H.B.E	20,0	N	2,0
F.E	49,1	N	0,6
H.E	77,5	N	6,0

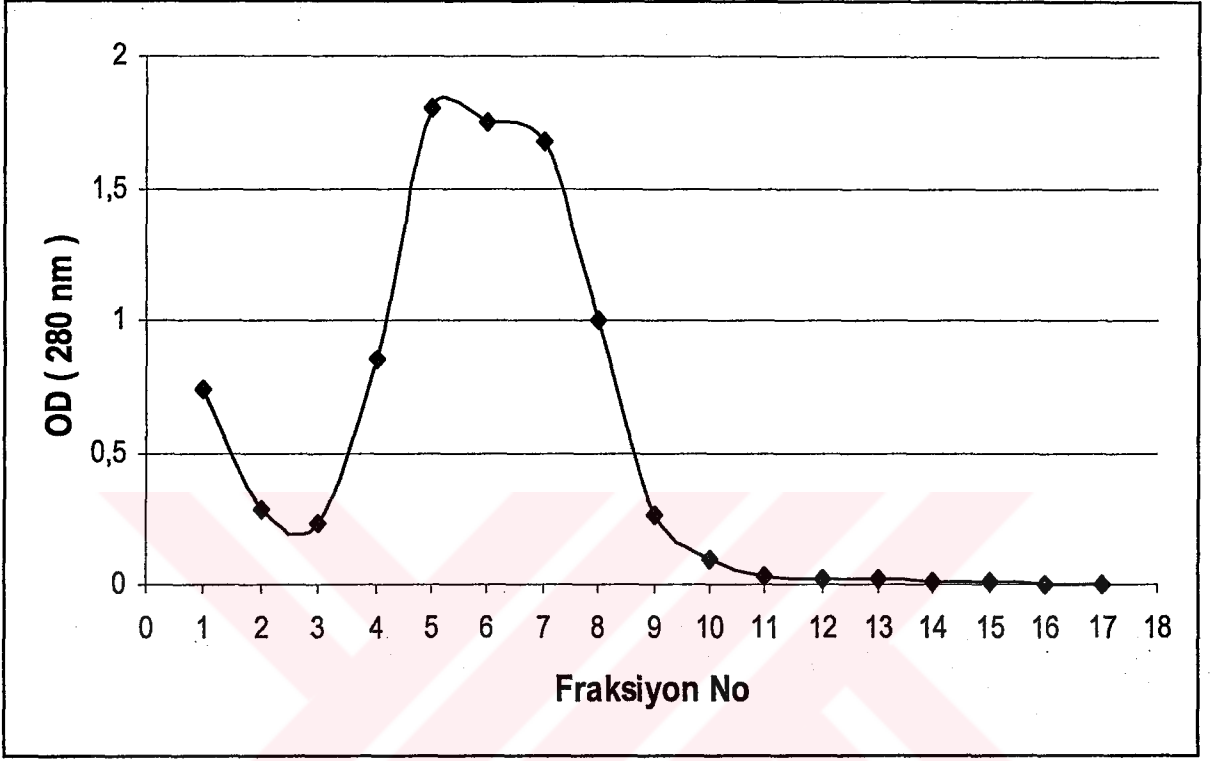
Ailenin elektroforez tipleri incelendiğinde F.E'nin Hb EF ve H.E'nin Hb AE olduğu bunun için de Hb A₂ değerlerinin çok yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.26.).

Çizelge 4.26. Çizelge E. Ailesinin hematolojik bulguları

	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Elektrofo	Hb A ₂ %	Hb F %
F.E	3,74	6,9	22,5	58,1	17,8	30,6	EF	49,1	7,6
H.E	4,33	7,5	24,4	56,5	17,4	30,7	AE	42,0	2,9
H.B.E	5,49	11,4	36,1	65,8	20,8	31,7	AA	3,8	1,5

H.B.E'nin Kinetik Bulguları

Hemolizat aktivitesi : 20,0 Ü/ mL



Şekil 4.26. H.B.E'nin G6PD enzimin saflaştırılması grafiği

Yüksek OD'li fraksiyon G6PD enzim aktivitesi:

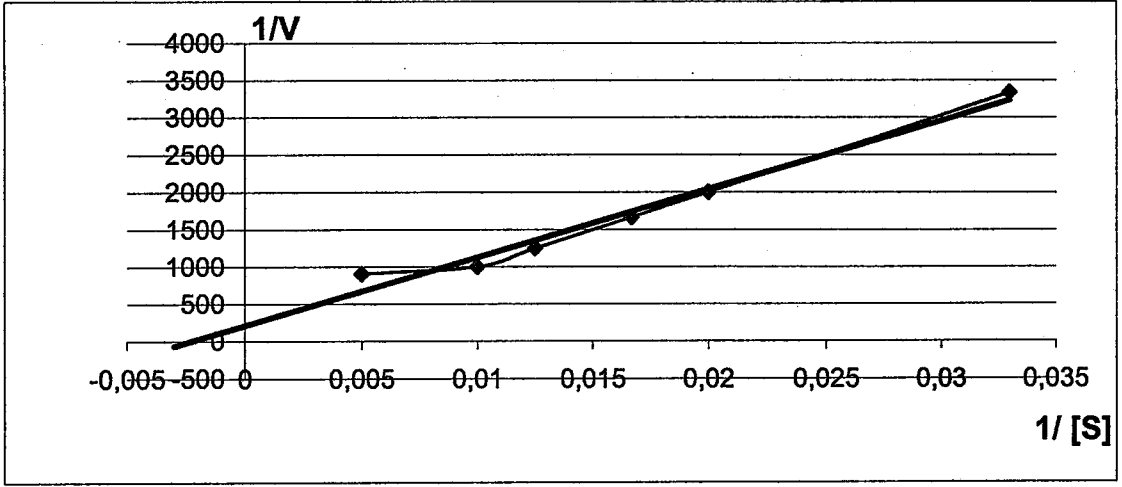
5. fraksiyon: 0,1196 U/ mL

6. fraksiyon: 0,1160 U / mL

7. fraksiyon: 0,1107 U / mL

8. fraksiyon: 0,0660 U / mL

G6PD enzim kinetiği çalışmalarında 5. fraksiyon kullanılmıştır.

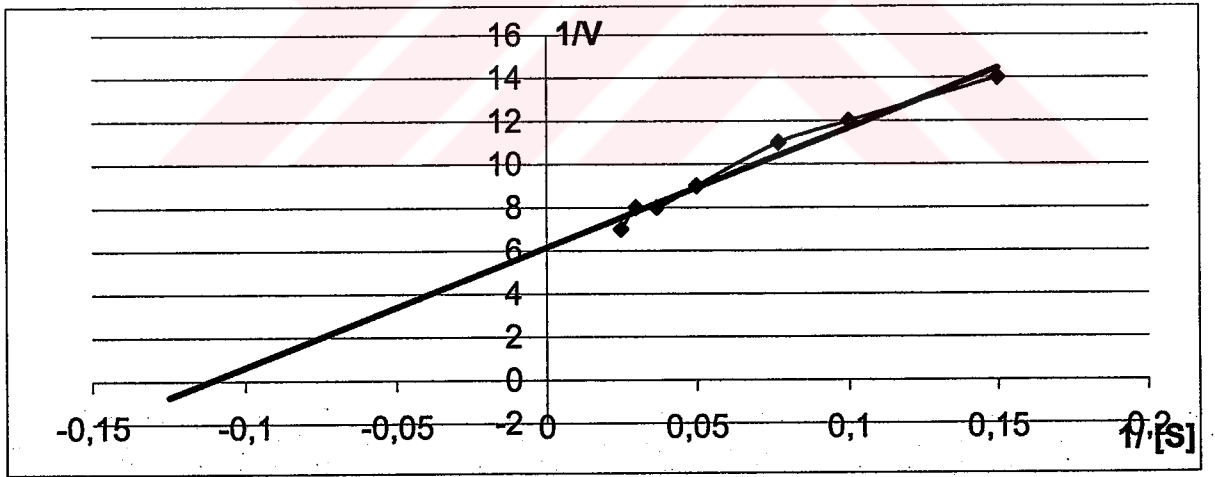


Şekil 4.27. H.B.E'nin G6P kinetik çalışması

$$Y=929,7x+2,0837$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

$$K_m^{G6P} = 446 \mu M$$



Şekil 4.28. H.B.E' nin NADP⁺ kinetik çalışması

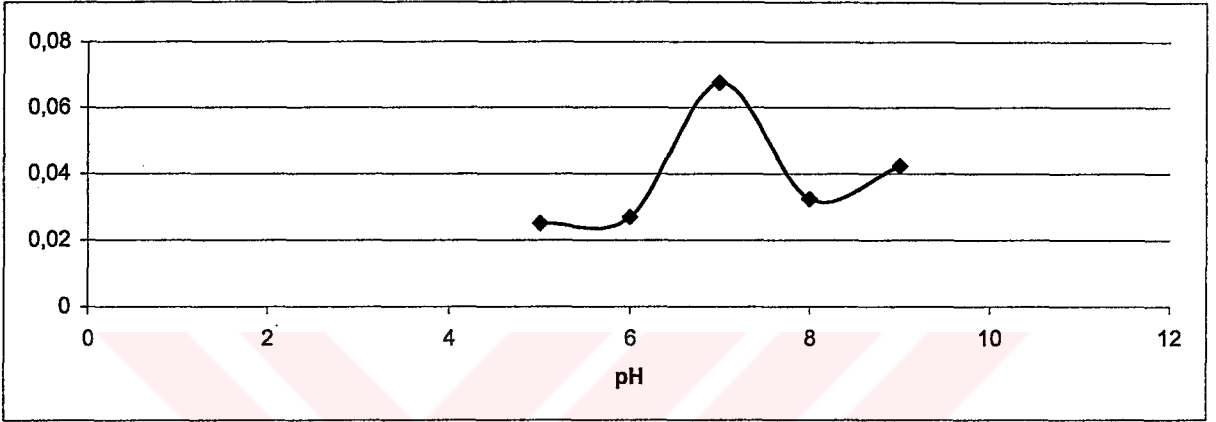
$$Y=55,242x+6,1559$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

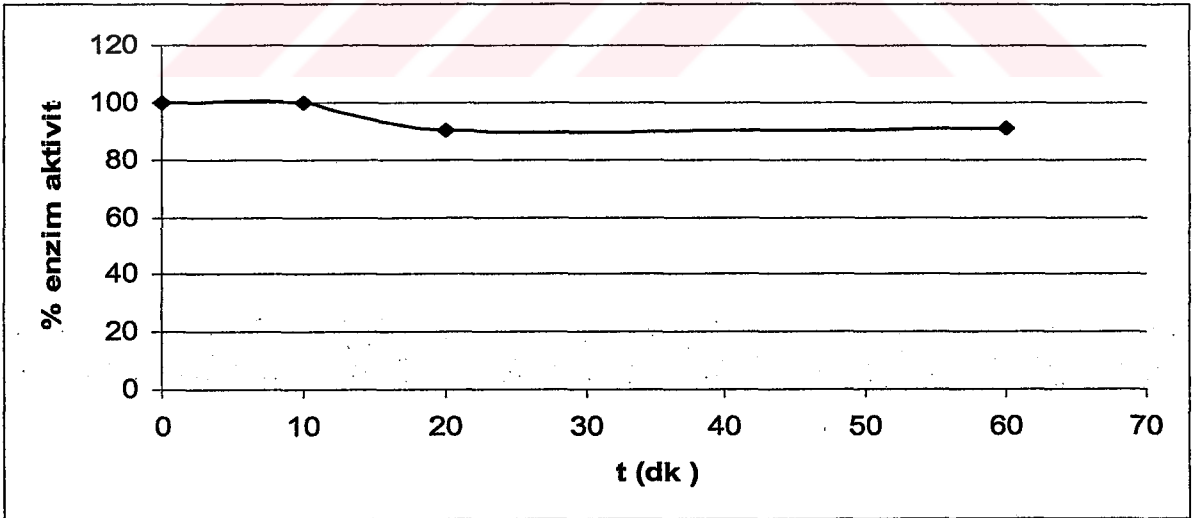
$$K_m^{NADP} = 9 \mu M$$

Çizelge 4.27. H.B.E'nin analog kullanımı

	V (Ü / mL)	%
5 . Fraksiyon	0,1196	100
dNADP	0,1013	85
NAD	0,0868	73
2dG6P	0,0	0
Gal6P	0,0	0



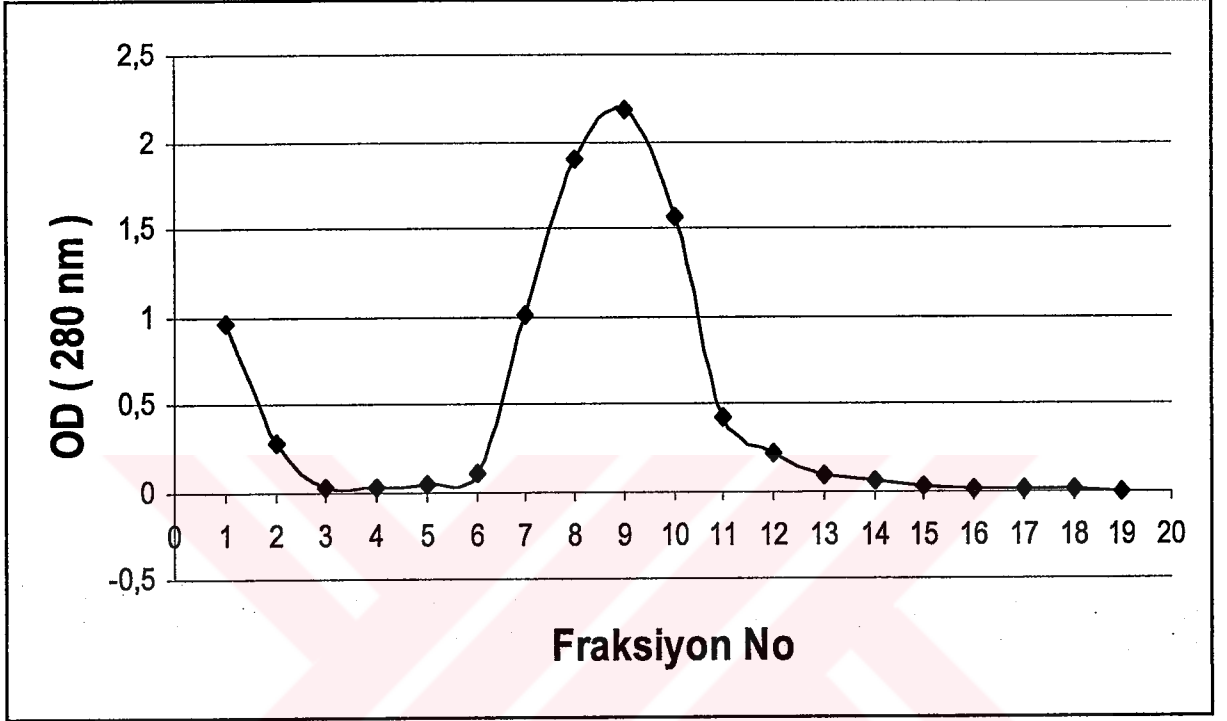
Şekil 4.29.H.B.E'nin G-6-PD enziminin pH stabilitesi



Şekil 4.30.H.B.E'nin G-6-PD enziminin ısı stabilitesi

F.E'nin Kinetik Bulgular

Hemolizat aktivitesi : 49,1 Ü/ mL



Şekil 4.31. F.E'nin G6PD enziminin saflaştırılması grafiği

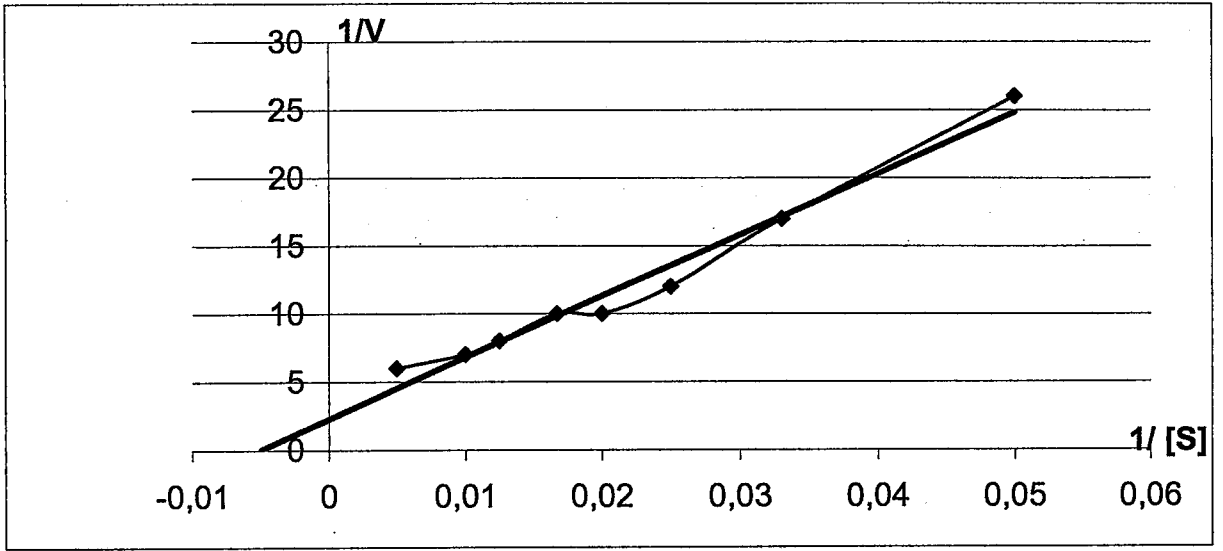
Yüksek OD'li fraksiyon G6PD enzim aktivitesi:

8. fraksiyon: 0,1683 U/ mL

9. fraksiyon: 0,1930 U / mL

10. fraksiyon:0,1377 U / mL

G6PD enzim kinetiği çalışmalarında 9. fraksiyon kullanılmıştır.

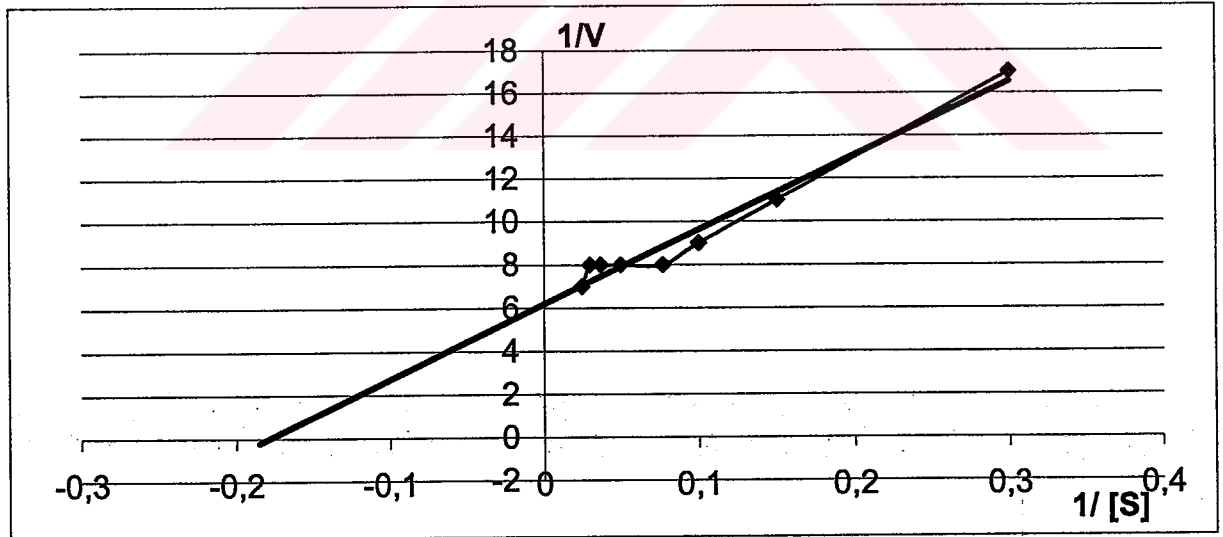


Şekil 4.32. F.E' nin G6P⁺ kinetik çalışması

$$Y=450,82x+2,296$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

$$K_m^{G6P} = 196 \mu M$$



Şekil 4.33. F.E' nin NADP⁺ kinetik çalışması

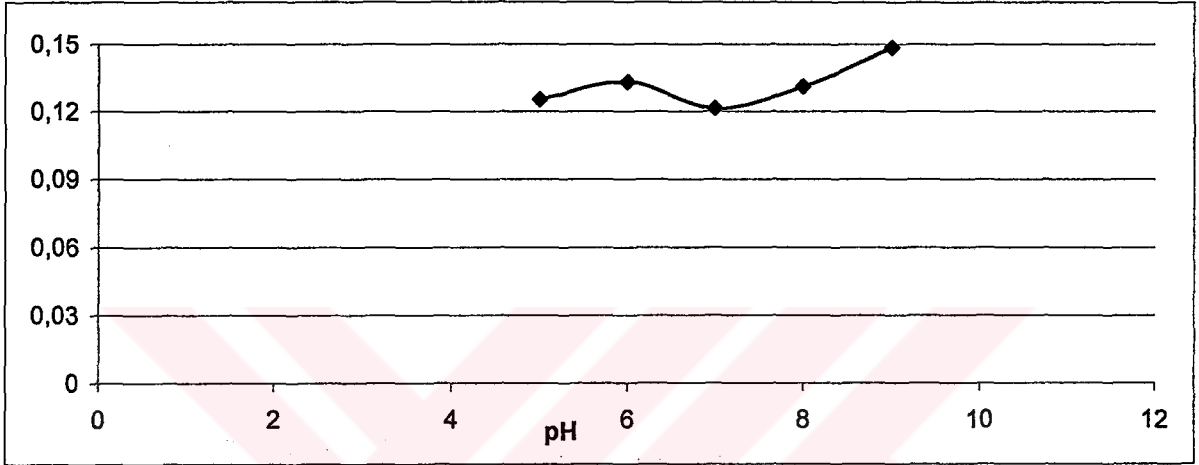
$$Y=34,581x+6,1759$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

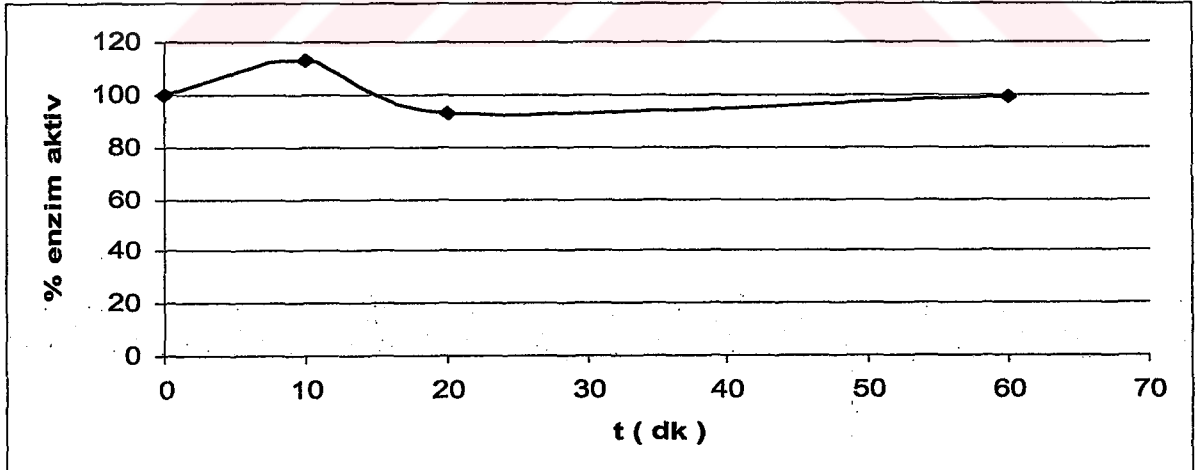
$$K_m^{NADP} = 6 \mu M$$

Çizelge 4.28. F.E'nin analog kullanımı

	V (Ü / mL)	%
9. Fraksiyon	0,1930	100
dNADP	0,0521	27
NAD	0,0540	28
Gal6P	0,097	5
2dG6P	0,0097	5



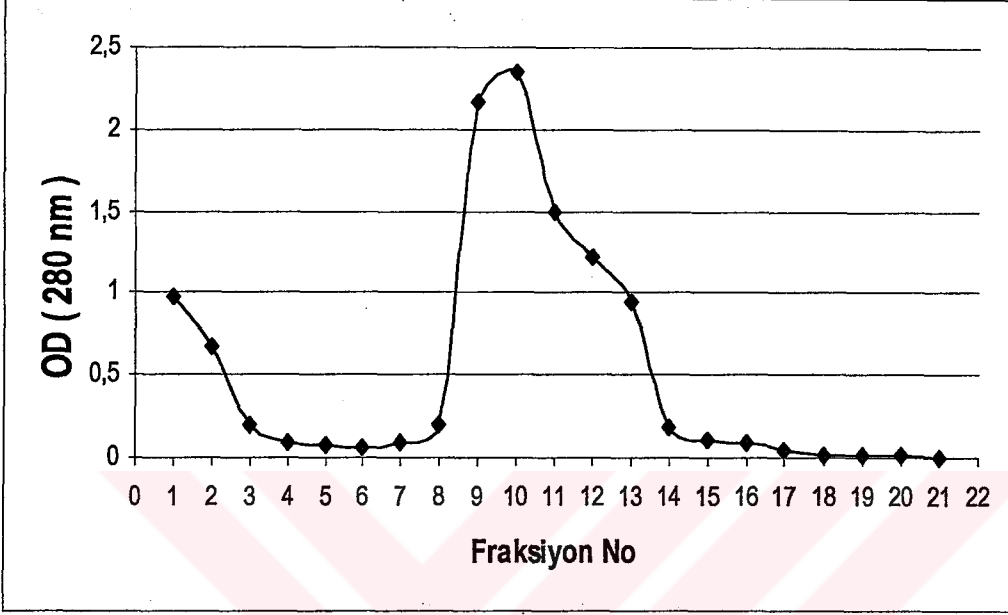
Şekil 4.34.F.E'nin G-6-PD enziminin pH stabilitesi



Şekil 4.35.F.E'nin G-6-PD enziminin ısı stabilitesi

H.E'nin Kinetik Bulguları

Hemolizat aktivitesi : 77,5 Ü/ mL



Şekil 4.36. H.E'nin G6PD enzimin saflaştırılması grafiği

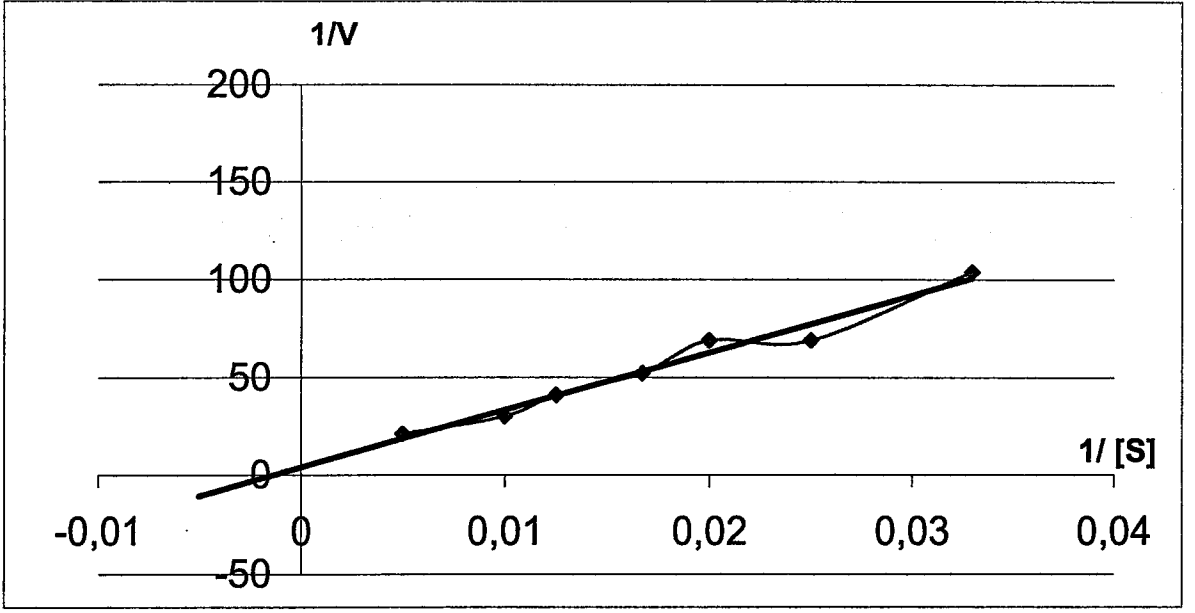
Yüksek OD'li fraksiyon G6PD enzim aktivitesi:

9. fraksiyon: 0,0267 U/ mL

10. fraksiyon: 0,0289 U / mL

11. fraksiyon: 0,0183U / mL

G6PD enzim kinetiği çalışmalarında 10. fraksiyon kullanılmıştır.

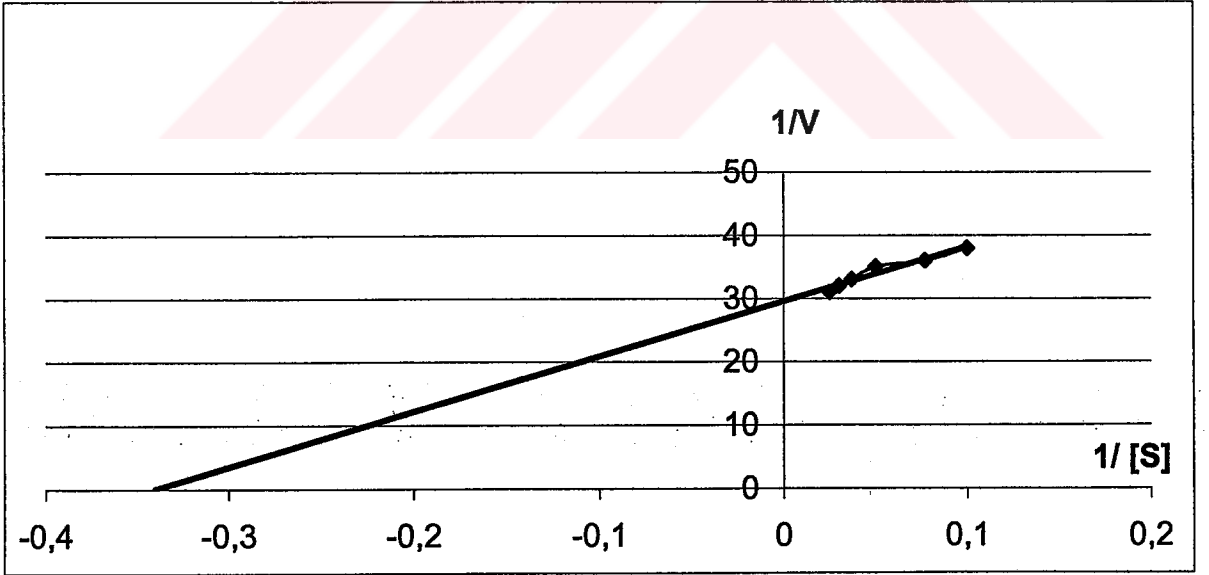


Şekil 4.37.H.E' nin G6P⁺ kinetik çalışması

$$Y=2929,4x+4,004$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

$$K_m^{G6P} = 731 \mu M$$



Şekil 4.38. H.E' nin NADP⁺ kinetik çalışması

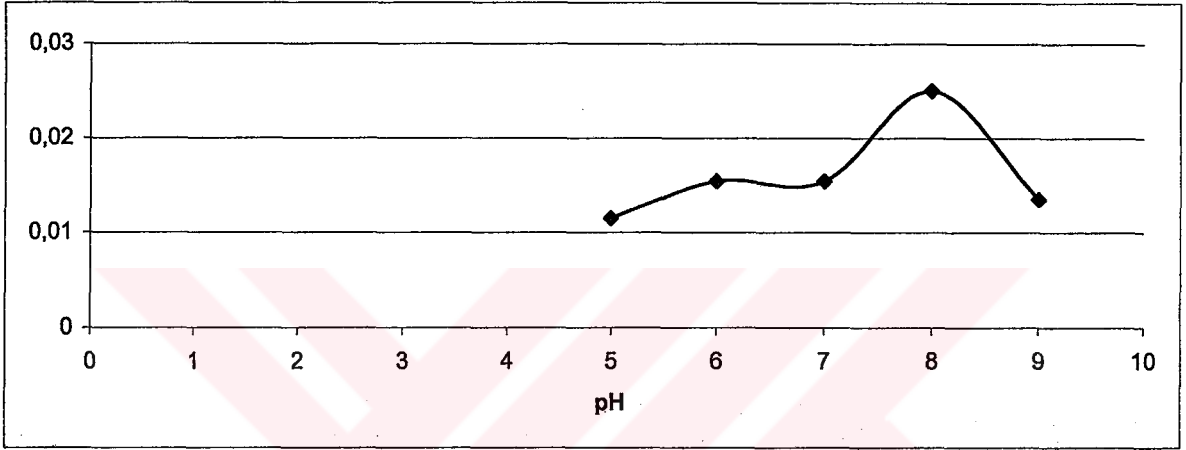
$$Y=86,832x+29,55$$

$$Y=0, \quad X=-1 / K_m$$

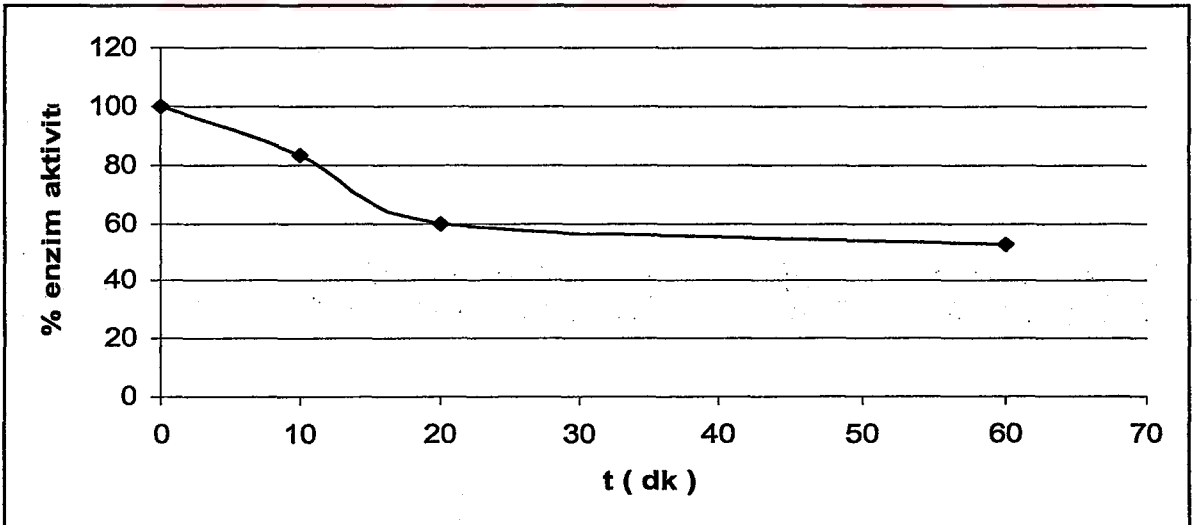
$$K_m^{NADP} = 3 \mu M$$

Çizelge 4.29. H.E'nin analog kullanımı

	V (Ü / mL)	%
10. Fraksiyon	0,0289	100
dNADP	0,0386	133
NAD	0,0338	117
2dG6P	0,0	0
Gal6P	0,0	0



Şekil 4.39. H.E'nin G-6-PD enziminin pH stabilitesi



Şekil 4.40. H.E'nin G-6-PD enziminin ısı stabilitesi

G6PD enzimi DE-52 kolonuyla saflaştırılan 7 olgunun kinetik verileri çizelge 4.30'da toplu olarak verilmiş ve hepsinin kinetik özellikleri Gd B⁺ ve Gd Akdeniz'den farklı olduğu gözlenmiştir.

Çizelge 4.30. G6PD enzim aktivitesi eksik ve yüksek olan olguların kinetik verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Km (μM)		Analog kullanımı				Optimum pH	İlk 20' ak.değ (%)
		G6P	NADP ⁺	dNADP	NAD	Gal6P	2dG6P		
V.D	0,0	434	5	28	41	28	41	7	41
A.Ö.T	0,0	140	24	256	121	40	34	7	93
İ.N	0,0	113	100	339	104	0	0	7	50
A.B	0,0	116	476	223	0	0	0	7	0
H.B.E	20,0	446	9	85	73	0	0	7	90
F.E	49,1	196	6	27	28	5	5	6	93
H.E	77,5	731	3	133	117	0	0	8	60
Gd B ⁺	8,3±3,3	50-70	2-4	55-60	<1	7-15	<4		
Gd Akdeniz	0-7	19-26	1,2-1,6	350		20	23-37		

Membran proteinleri incelenen olguların verileri toplu olarak incelendiğinde İ.N ve H.T'de ankrin eksikliği, A.B ve V.D'de bant 4.1 eksikliği, A.Ö.T'nin bant 4.1 ve 4.2 yüksekliği, H.B.E ve F.E'nin ankrin yüksekliği gösterdiği gözlenmiştir. H.E'de membran proteinlerinin normal olduğu fakat MDA düzeyinin oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.31).

Çizelge 4.31. G6PD enzim aktivitesi eksik ve yüksek olguların membran protein verileri

Olgu	G6PD aktivitesi (U/gHb)	Spektri n	Ankrin	Bant 3	Bant 4.1	Bant 4.2	MDA (nmol/mL)
İ.N	0,0	24	2*	24	4	4,	1,0
H.T	0,0	26	2*	25	2	7	2,3
A.Ö.T	0,0	22	5	22	8**	9**	1,6
A.B	0,0	23	7	24	3*	4	0,6
V.D	0,0	23	7	24	3*	5	1,0
H.B.E	20,0	23	12**	27	5	3	2,0
F.E	49,1	22	14**	27	2	3	0,6
H.E	77,5	20	6	22	4	5	6,0
Referans Aralık	8,3±3,3	21±2	5±1	21±2	5±1	5±1	2,2±0,7

* : Düşük düzey ** : Yüksek düzey

Olgular Gd Akdeniz mutasyonu bakımından incelendiğinde İ.N, M.A.N, H.T, V.D ve A.Ö.T G6PD aktivitelerinin 0,0 U/gHb ve bu mutasyonu içerdikleri fakat MDA düzeylerinin referans aralığı içinde bulunduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.32). Ancak Gö.D, A.N, E.D, P.N. ve Ay.Ö.T'nin G6PD enzim düzeyinin normal olmasına karşılık Gd Akdeniz mutasyonunu içerdiği saptanmıştır. G6PD enzim aktivitesi 0- 77,5 U/gHb arasında olan 23 olgunun ise Gd Akdeniz mutasyonunu içermediği fakat Z.N ile H.E'nin MDA aktivitelerinin yüksek olduğu saptanmıştır(Çizelge 4.33).

Çizelge 4.32. Gd Akdeniz mutasyonu içeren olguların verileri

	G6PD (U/gHb)	G6PD mutasyonu	MDA nmol/mL
İ.N	0,0	Med	1,0
M.A.N	0,0	Med	--
H.T	0,0	Med	2,3
V.D	0,0	Med	1,0
A.Ö.T	0,0	Med	1,6
Gö.D	5,1	Med	--
A.N	5,5	Med	--
E.D	6,9	Med	--
P.N	7,0	Med	2,0
Ay.Ö.T	7,1	Med	--

Çizelge 4.33. Gd Akdeniz mutasyonu içermeyen olguların verileri

	G6PD (U/gHb)	G6PD mutasyonu	MDA nmol/mL
A.B	0,0	N	0,6
F.T	5,8	N	0,0
D.H	5,9	N	--
B.A.T	6,5	N	--
G.D	7,1	N	--
M.T	7,4	N	2,3
Ay.B	8,4	N	--
C.T	8,5	N	--
M.E.T	8,6	N	--
H.T	9,3	N	--
Su.T	10,0	N	0,3
Sa.T	10,6	N	2,0
H.Ö.T	11,3	N	--
K.T	11,8	N	--
F.H	12,2	N	2,6
Se.T	12,6	N	2,0
K.N	12,7	N	1,3
Z.N	14,1	N	6,0
Y.K.B	15,0	N	0,0
S.B	16,0	N	--
H.B.E	20,0	N	2,0
F.E	49,1	N	0,6
H.E	77,5	N	6,0

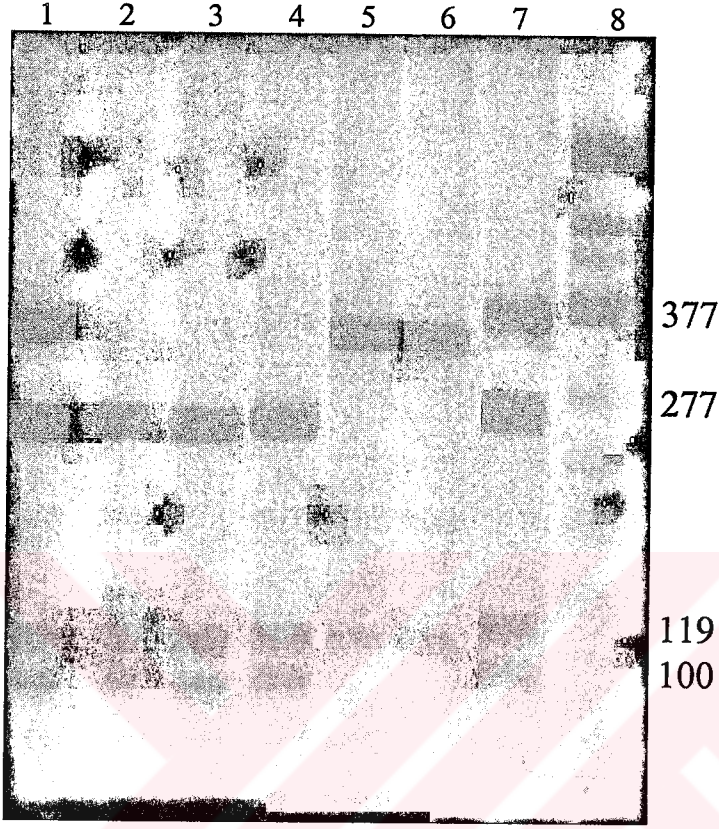
4.2 Moleküler Bulgular

N, B, D, T ve E ailelerinin Gd Akdeniz mutasyonları moleküler düzeyde çalışılmıştır. Bu amaçla tam kandan lökositler ayrıştırılarak DNA elde edilmiş Gd Akdeniz mutasyonu moleküler düzeyde araştırılmıştır. Ekson 6'daki 563. nt'deki C→T değişimi sonucu oluşan Gd Akdeniz mutasyonunu saptamak için ekson 6 yöresi amplifiye edilmiş, MboII enzimi ile amplifiye DNA kesilerek oluşan parçacıklar jel elektroforezinde incelenmiştir.

547 bç'lik amplifiye geni MboII enzimi üç farklı yerden keserek 377, 119, 26 ve 25 bç'lik dört parçaya bölmektedir. Mutasyonun varlığında ise dördüncü bir kesim yeri oluşmaktadır. Dördüncü kesim yeri 377 bç'lik parçanın içinde olduğundan 277 ve 100 bç'lik iki parça oluşmaktadır. Örnek hemizigot yada homozigot yapı içeriyorsa amplifiye gen toplam dört yerden kesilerek 277, 119, 100, 26 ve 25 bç'lik beş parça oluşmaktadır. Eğer olgu genetik olarak heterozigot ise amplifiye gen ürünü 377, 277, 119, 100, 26 ve 25 bç'lik altı parçaya ayrılmaktadır. %3'lük agaroz jelde 26 ve 25 bç'lik parçaların gösterimi jelin bu derişiminde olası olmadığından mutasyon içermeyenlerin 2 bant, homozigot yada hemizigot olanların 3 bant, heterozigotların ise 4 bant vermektedir.

N, B, D, T ve E ailelerinin Gd Akdeniz Mutasyon çalışması şekil 4.41-4.45 arasında verilmiştir.

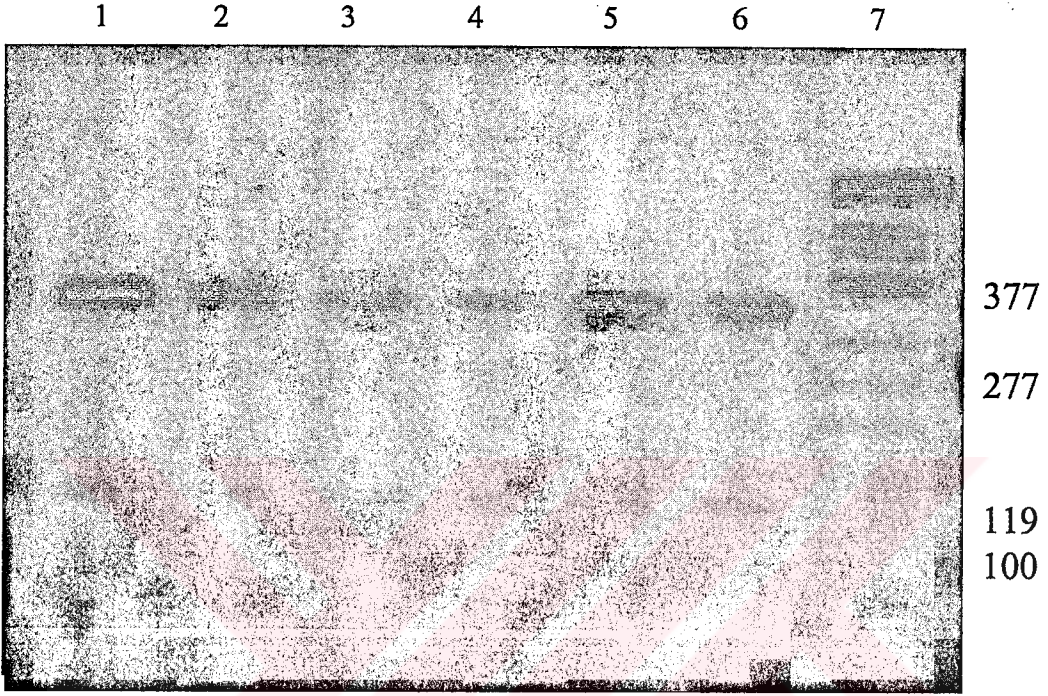
N AİLESİ



Şekil 4.41. N ailesinin Gd Akdeniz mutasyonunun agaroz jel elektroforez görünümü

- 1.A.N, (kadın) heterozigot
- 2.M.A.N, (erkek) hemizigot
- 3.H.T, (kadın) homozigot
- 4.İ.N, (erkek) hemizigot
- 5.Z.N, (kadın) normal
- 6.K.N, (erkek) normal
- 7.PN, (kadın) heterozigot
- 8.Marker

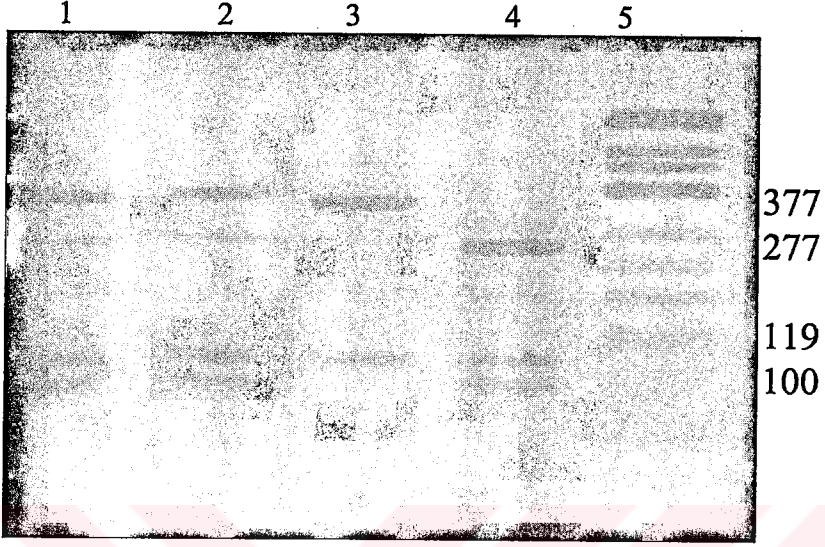
B Ailesi



ekil 4.42. B ailesinin Gd Akdeniz mutasyonunun agaroz jel elektroforez görüntüsü

F.H, (kadın) normal
D.H, (erkek) normal
Ay.B, (kadın) normal
Y.K.B, (erkek) normal
S.B, (kadın) normal
A.B, (erkek) normal
Marker

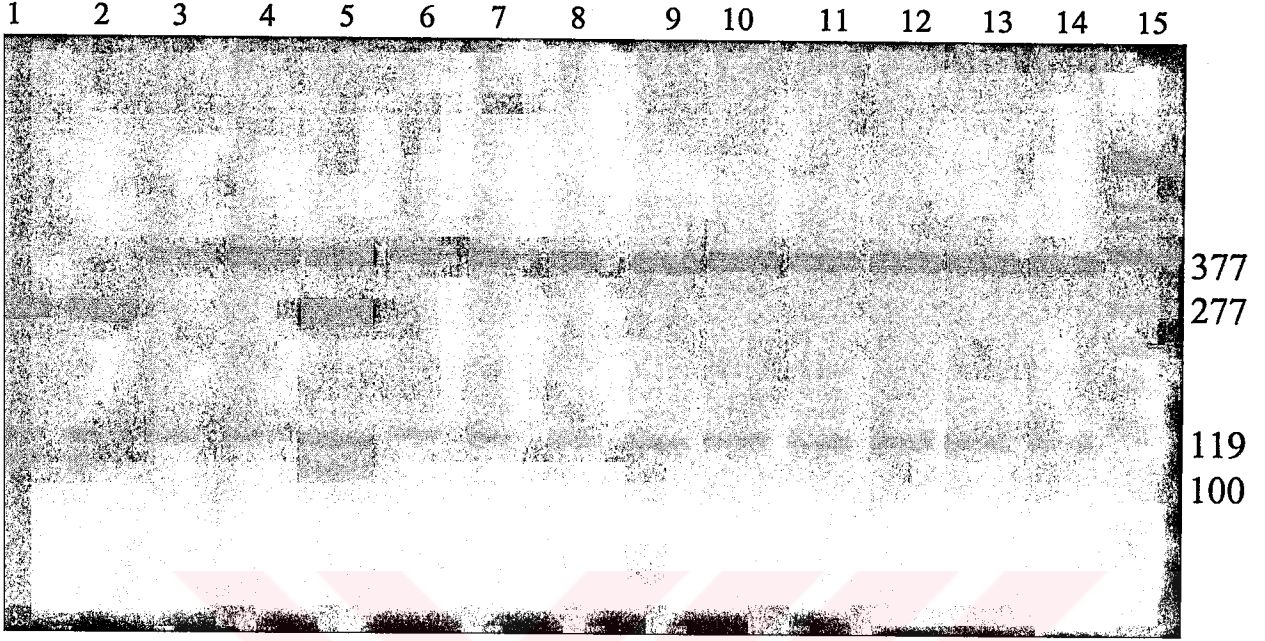
D AİLESİ



kil 4.43. D ailesinin Gd Akdeniz mutasyonunun agaroz jel elektroforez görünümü

3ö.D, (kadın) heterozigot
3.D, (kadın) heterozigot
3.D, (kadın) normal
√.D, (erkek) hemizigot
Marker

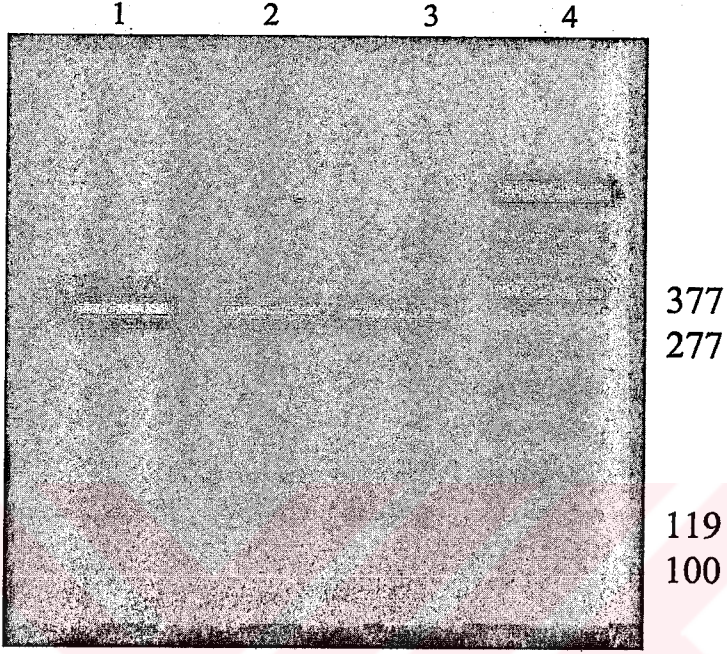
T Ailesi



Şekil 4.44. T ailesinin Gd Akdeniz mutasyonunun agaroz jel elektroforez görünümü

- A.Ö.T,(erkek) hemizigot
- H.T, (kadın) homozigot
- F.T, (kadın) normal
- B.A.T, (erkek) normal
- Ay.Ö.T, (kadın) heterozigot
- M.Ö.T, (erkek) normal
- C.T, (kadın) normal
- M.E.T, (erkek) normal
- Hs.T,(erkek) normal
- Su.T , (kadın) normal
- Sa.T , (kadın) normal
- H.Ö.T, (erkek) normal
- K.T, (erkek) normal
- Se.T, (kadın) normal
- Marker

E AİLESİ



Şekil 4.45. E ailesinin Gd Akdeniz mutasyonunun agaroz jel elektroforez görünümü

- 1.H.B.E, (kadın) normal
- 2.F.E, (kadın) normal
- 3.H.E, (kadın) normal
- 4.Marker

5.TARTIŞMA

G6PD, pentoz fosfat yolundaki ilk basamağı katalizleyen ve NADPH üretimini sağlayan bir enzimdir. Ayrıca bütün hücrelere dağılmış, sitoplazmik bir enzimdir. Pentoz fosfat yolunda üretilen NADPH'lar yağ asiti, kolesterol, steroid, amino asitlerin, nükleik asitlerin, nükleotit yapılı koenzimlerin ve de methemoglobin ile redükte glutasyon, redüksiyonunda görev yapmaktadır^{2,61}.

G6PD'nin aktif enzim formu 2 veya 4 subunit içermektedir. Yaklaşık moleküler ağırlığı 59kDa'dur.cDNA analizi ile primer dizisinin 515 amino asitten oluştuğu belirlenmiştir. Gen X kromozomunun uzun kolu üzerinde Xq28 bandında yer almaktadır.Burası konjenital diskeratozis lokusu ile GD1 mental retardasyon lokusu arasındadır. Kadınlarda G6PD'nin iki allelinden birisi inaktive durumdadır. G6PD geni 13 eksondan ve 12 introndan oluşmaktadır^{7,21,45}.

G6PD eksikliğinden dünyada yaklaşık 400 milyon insanın etkilendiği düşünülmektedir. Akdeniz'in bazı bölgeleri, Papua Yeni Gine, Tropikal ve subtropikal Asyada yüksek oranda G6PD eksikliği görülmektedir. G6PD eksikliği *plasmodium falciparum*'un neden olduğu sıtmanın coğrafik dağılımına benzerlik göstermektedir. G6PD eksik kişilerin eritrositlerinde sıtma paraziti yaşayamadığı ve bu tip eritrositlerin sıtmaya karşı daha dirençli olduğu varsayılmaktadır^{67,69,97}.

G6PD eksikliğinin en belirgin klinik belirtileri yenidoğan sarılığı ve hemolitik anemidir. Bazı yeni doğan sarılığında sürekli nörolojik hasar hatta ölüm bile gerçekleşebilmektedir. Bu yüzden G6PD eksikliğinin yeni doğanlarda tanımlanması ve yenidoğan sarılığında ortaya çıkan bilirubin ile ilişkileri büyük önem taşımaktadır. Akut hemolitik anemiye bazı ilaçlar, enfeksiyon ve bakla yenmesi neden olmaktadır. Bugün hala hemolizin mekanizması tam olarak açıklanamamıştır. G6PD eksik eritrositlerde direkt veya indirekt olarak oksidatif hasarın oluştuğu düşünülmektedir. Bu akut hemoliz olaylarında eritrositlerin yıkımı hemoglobiniye neden olmaktadır. G6PD enzimi eksik olan kişilerin büyük bir kısmı asemptomatiktir. Ancak bazı G6PD'si eksik kişilerin kronik hemolitik anemisi olduğu bilinmektedir^{21,23,33,36,39}.

Gelişen moleküler tanı yöntemleri sonucu DNA düzeyindeki çalışmalar çok hızlı kullanım alanı bulmuştur. G6PD eksikliği genetik olarak heterojeniteye sahiptir. Aynı mutasyon farklı kişilerde farklı klinik belirti gösterdiği için bazı mutasyonlar kronik hemolitik anemiye neden olurken bazılarında hemoliz gözlenmemektedir^{2,28,47}.

Ülkemizde G6PD enzim eksikliğine, sıtmanın yaygın olduğu Çukurova ve Antalya bölgelerinde sıkça rastlanmaktadır. Yapılan araştırmalar G6PD enzim eksikliğinin bölgemizde bir halk sağlığı sorunu olduğunu göstermiştir. Ayrıca enzimin kinetik özelliklerinin birbirinden farklı olduğu durumlarda moleküler yapının aynı olabileceği moleküler çalışmalarla gösterilmiştir^{5,7,54,98}.

Anamur bölgesi kapalı bir toplum özelliği göstermektedir ve bugüne kadar G6PD enzim düzeyi ile moleküler yapısı hiç incelenmemiştir.

Bu çalışmada Anamur bölgesinde farklı kinetik özellikler gösteren G6PD enzim aktivitesi eksik ve yüksek olan olguların moleküler yapıları incelenerek, G6PD eksikliğinde genotip ve fenotip ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla 83'ü kadın, 50'si erkek toplam 133 olgudan kan örneği alınmıştır. Bu kan örneklerinden hemolizat hazırlanarak G6PD enzim aktivitesi ölçülerek enzim aktivitesi eksik ve yüksek olgular saptanmıştır. Daha sonra G6PD aktivitesi eksik ve yüksek olguların kinetik çalışması yapılmıştır. Bu amaçla anyon değiştirici reçine kullanılarak G6PD enzimi kısmi olarak saflaştırılmış, saflaştırma sonunda G6PD enzimi 0,0 U/gHb olarak saptanan 6 olguda kinetik çalışma yapılırken bir olguda saflaştırma sonrası hiç aktivite elde edilemediği için kinetik çalışma yapılamamıştır (Çizelge 4.3, 4.8, 4.13, 4.18). Bu olgunun G6PD enziminin çevresel faktörlerden etkilendiği düşünülmüştür. NADPH molekülünün majör olarak pentoz fosfat yolunda üretildiği ve bu yoldaki hız kısıtlayıcı kilit enzimin G6PD enzimi olduğu düşünülürse, enzimin ölçülen bu değerinin gerçekten 0,0 U/gHb olup olmadığı sorusunu akla getirmektedir. Kısmi olarak saflaştırılan G6PD enziminin elde edilen kinetik bulguları WHO'nun Gd Akdeniz varyantı için bildirdiği verilerle karşılaştırıldığında farklı olduğu gözlenmiştir.

G6PD enziminin varyant analizlerinde birçok parametre kullanılmaktadır; bunlardan eritrosit G6PD aktivitesi, kısmi saflaştırılan enzimde kinetik çalışmalar, substrat analoglarının kullanımı ve ısı inaktivasyonu en çok kullanılan kriterlerdir⁷⁹.

G6PD enziminin substratlarına karşı ilgisini değerlendirmek için K_m değerleri ölçüldüğünde, olguların K_m^{G6P} değerleri 113-731 mM arasında K_m^{NADP} değerleri ise 3-

476 mM arasında bulunmuştur. K_m^{G6P} değeri tüm olgularda Gd B⁺ ve Gd Akdenizden yüksek olarak saptanmıştır. K_m^{NADP} değeri ise bir olguda (H.E) referans aralıkta olmasına rağmen diğer olgularda yüksek olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.30).

G6PD enziminin kinetik özelliklerinin belirlenmesinde ayrıca substrat analogları olarak dNADP, NAD, Gal6P ve 2dG6P kullanılmıştır.

WHO'ya göre GdB⁺'nin dNADP kullanım yüzdesinin %55-60 arasında olduğu belirtilmiştir. Ancak V.D ve F.E'nin dNADP kullanım yüzdesi bu sınırların altında, A.Ö.T, İ.N, A.B, H.B.E ve H.E'nin ise belirtilen aralığın üzerinde olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.30).

WHO'ya göre GdB⁺'nin NAD kullanım yüzdesinin %1'in altında olduğu belirtilmiştir. Olgularımızdan A.B'nin NAD'yi hiç kullanmadığı diğer olguların ise NAD'yi yüksek oranda kullandığı gözlenmiştir (Çizelge 4.30).

WHO tarafından Gal6P kullanım yüzdesi 7-15 olarak belirtilmiştir. İ.N, A.B, H.B.E ve H.E'nin Gal6P'yi hiç kullanmadığı ve V.D ile A.Ö.T'nin Gal6P kullanım değerlerinin belirlenen aralıktan oldukça yüksek olduğu saptanmıştır. Kinetik olarak incelenen bütün olgularımızın Gal6P kullanımını % 0-40 arasında olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4.30).

WHO tarafından 2dG6P kullanımının % 4'ün altında olduğu belirtilmiştir. V.D, A.Ö.T ve F.E'nin 2dG6P kullanımının yüksek olduğu, İ.N, A.B, H.B.E ve H.E'nin ise 2dG6P'yi hiç kullanmadığı saptanmıştır. Çalışmamızın bütününde 2dG6P kullanımının % 0-41 arasında olduğu gözlenmiştir (Çizelge 4.30).

Isı stabilitesi, eritrosit G6PD enziminin özelliklerinin araştırılmasında kullanılan diğer bir parametredir. A.B'nin ısıya dayanıksız olduğu bunun yanında A.Ö.T, H.B.E ve F.E'nin ısıya oldukça dayanıklı olduğu saptanmıştır (Çizelge 4.30).

Olguların optimum pH aralığının 6-8 arasında ve monofazik özellik gösterdiği bulunmuştur (Çizelge 4.30).

E ailesinde G6PD enzim aktivitesi ve HbA₂ düzeyi çok yüksek olarak gözlenmiştir. Ailede iki olgu Hb E içerdiği için kolon kromatografisi ile Hb A₂ ve Hb E ayrımı yapılamadığından dolayı yüksek bulunmuştur. Olguların kinetiğinin Gd B⁺ ve Gd Akdeniz varyantından oldukça farklı olduğu gözlenmiştir. Bu iki olgunun (H.B.E ve F.E) membran proteinlerinden Ankrin düzeyinin yüksek olduğu bulunmuştur. H.E'nin

membran proteinleri normal iken MDA düzeyinin yüksek olduğu gözlenmiştir (Çizelgen 4.31).

Membran proteinleri genel olarak integral ve periferel membran proteinleri olarak iki ana sınıfta incelenmektedir. İntegral proteinler lipit tabakasını boydan boya geçerken membran iskeletinin, membranla bağlantısını sağlar. Majör integral proteinler Glikoforin ve Bant 3'tür. Çalışmamızda hiçbir olguda Bant 3 eksikliği gözlenmemiştir (Çizelge 4.31).

Membran iskelet yapısını oluşturan periferel membran proteinleri, membranın sitoplazmik yüzeyinde yer alır ve integral proteinler ya da lipitlerle etkileşime girer. Başlıca periferel proteinler Spektrin, Ankrin, Bant 4.1 ve Bant 4.2'dir. Periferel membran proteinleri membran stabilitesinin ve eritrosit hücresinin şekil değiştirebilme özelliğinin düzenlenmesinde önemli görev alırlar. Membran iskeleti ile membran arasındaki bağlantılarda herhangi bir anormallik eritrosit membran yapısının bozulmasına neden olur. Eritrosit membranında gelişen oksidatif hasar membran proteinlerini de etkileyerek lipit peroksidasyonu sonucu MDA düzeyleri yükselmektedir^{2,14,21,43} (Çizelge 4.31).

Serbest radikal reaksiyonlarının öncelikli hedefi membran lipitleri içindeki doymamış bağlardır. Serbest radikal hasarı ile çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşan MDA gibi bazı aldehitler lipit, protein ve nükleik asitlerde çapraz bağlanmalara neden olabilir. Bu çalışmada G6PD enzim düzeyi eksik ve yüksek olguların MDA ve membran proteinleri bulguları karşılaştırılarak G6PD enziminin eksik olduğu olguların oksidatif hasarı değerlendirilmeye çalışılmıştır (Çizelge 4.31).

Kinetik olarak çalışma grubuna alınan olguların membran protein verileri toplu olarak incelendiğinde İ.N ve H.T'de belirgin Ankrin eksikliği, A.B ve V.D'de Bant 4.1 eksikliği gözlenmiştir. H.B.E ve F.E'nin Ankrin, A.Ö.T'nin ise Bant 4.1 ve 4.2 düzeyinin yüksek olduğu gözlenmiştir. Fakat bu olguların hiçbirisinde MDA düzeyi yüksek olmadığı bunun yanında H.E'nin membran protein verileri normal olmasına rağmen MDA'sının yüksek olduğu saptanmıştır. Bu verilerin ışığı altında membran proteinleri ile oksidatif hasar etkisiyle oluşan lipit peroksidasyonu sonucunda membranda meydana gelen bozukluklar arasında net bir ilişki kurulamamıştır^{14,43} (Çizelge 4.31).

Bugüne kadar biyokimyasal yöntemler kullanılarak 400'ün üzerinde varyant bildirilmiştir. Yapılan moleküler analizler sonucu yaklaşık olarak 140 tane G6PD varyantının moleküler mutasyonu rapor edilmiştir. Moleküler çalışma sonucunda bazı varyantların moleküler düzeyde aynı mutasyonu içerdiği gösterilmiştir. Örneğin Gd Akdeniz ile Gd Adana moleküler düzeyde aynı mutasyonu taşımaktadır. Ancak bazen de bunun tam tersi gözlenmiştir. Tek varyant olarak düşünülen Gd A⁻ genetik olarak heterojen bir yapı göstermektedir. Ayrıca enzim eksikliği olmaksızın birkaç tane de yapısal varyant gösterilmiştir²⁸.

G6PD eksikliği dünyada X'e bağlı geçiş gösteren en yaygın enzimopatidir. Moleküler düzeyde 140'ın üzerinde varyant bulunmuş ve bunların Hindistan'dan Sardinya'ya kadar uzanan geniş bir coğrafik dağılım gösterdiği gözlenmiştir. Bölgemizde en sık rastlanan Gd Akdeniz varyantı ileri derecede enzim eksikliğine neden olmasına rağmen bazen hemoliz görülmektedir. Bu nedenle bu çalışma sırasında G6PD enzim düzeyi düşük olan olgular moleküler düzeyde incelenerek özellikle ekson 6'daki 563. nükleotitdeki C→T mutasyonunu taşıyanların fenotip-genotip ilişkisi kurulmaya çalışılmıştır^{2,21,28}.

140'ın üzerindeki bu mutasyonlardan bugüne kadar en detaylı ve en fazla üzerinde çalışılan Gd Akdeniz'tir. İlk kez Vulliamy ve arkadaşları tarafından Gd Akdeniz varyantına 563. nükleotitteki C→T dönüşümünün neden olduğu bildirilmiştir. Gd Akdeniz varyantının hem NAPD'ye hem de G6P'ye karşı düşük K_m değerine sahip olduğu bilinmektedir. Ayrıca Gal6P ve dNADP gibi analogları yüksek oranda kullanmaktadır. Yeterince sentezlenebilen ancak in vivo şartlarda stabilitesini koruyamayan Gd Akdeniz varyantı elektroforetik olarak da Gd B⁺ gibi hareket etmektedir^{8,28,98}.

Gd Akdeniz mutasyonunun (563 C→T) ARMS yöntemi ile saptanması, bu genetik defektin moleküler taraması bakımından oldukça yaygın bir yöntemdir. ARMS yöntemi PCR'ya dayalı diğer yöntemlere göre birçok avantaja sahiptir. Yöntem hızlı ve güvenilir olup radyoaktif madde içermez. Sonuçlar bir gün içinde kolaylıkla elde edilebilir. İnternal kontrollü iki tepkimenin kullanımı yalancı pozitif sonuçların elde edilmesini önler. ARMS yöntemi genelde herhangi bir mutasyonun saptanması için geliştirilmiş olmasının yanında çeşitli genetik polimorfizmlerin saptanmasında da kullanılmaktadır^{111,112}.

Bu çalışmada G6PD aktivitesi 0,0 U/ gHb ve 77,5 U/gHb olan toplam 34 olgunun Gd Akdeniz mutasyonu moleküler düzeyde incelenmiştir. Lökosit DNA'ları Poncz yöntemiyle izole edilmiş ve 6. eksondaki 563. nükleotitteki C→T değişimini gösterebilmek için uygun primerler seçilerek örnekler ARMS yöntemiyle amplifiye edilmiştir. Elde edilen amplifiye DNA'lar Mbo II enzimi ile kesilerek jel elektroforeziyle oluşan ürün kontrol edilmiştir. Moleküler düzeydeki araştırma grubumuza toplam 5 aileden 34 olgu alınmıştır. İncelenen 34 olgudan 11'inde Gd Akdeniz varyantı belirlenmiştir (Çizelge 4.32, 4.33).

Bu çalışmada ilk defa kadın bir olguda (H.T) G6PD enzim düzeyi 0,0 U/gHb olarak bulunmuş ancak kolon kromatografisi ile enzim saflaştırıldığında hiç aktivite elde edilemediğinden dolayı kinetik çalışması yapılamamıştır. Moleküler incelemeler sonucunda bu olgunun Gd Akdeniz mutasyonu için homozigot bir örnek olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.41).

Ayrıca Gö.D, A.N, E.D, P.N ve Ay.Ö.T'nin G6PD enzim düzeyleri 5,1-7,1 U/gHb arasında olmasına rağmen bu olguların da Gd Akdeniz mutasyonu taşıdığı gözlenmiştir (Şekil 4.41, 4.43, 4.44, çizelge 4.32).

Bu çalışmada gözleendiği gibi olguların kinetik özellikleri birbirinden farklı olmasına rağmen D, T ve N ailelerinin Gd Akdeniz mutasyonu taşıdığı, E ve B ailelerinin ise taşımadığı gözlenmiştir. (Çizelge 4.31, 4.32, 4.33).

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

SONUÇLAR

1. G6PD düzeyi 0,0 U/gHb ve Gd Akdeniz mutasyonu homozigot olan bir kadın olgu belirlenmiştir.
2. Bir olgunun G6PD düzeyi 0,0 U/gHb olmasına rağmen Gd Akdeniz mutasyonu içermediği belirlenmiştir.
3. G6PD düzeyi normal olmasına rağmen Gd Akdeniz mutasyonu içeren 5 olgu gözlenmiştir.
4. G6PD düzeyi çok yüksek (20,0-77,5 U/gHb) ve Hb E taşıyıcısı olan bir aile saptanmıştır.
5. G6PD enzim düzeyi ve membran protein eksikliği ile MDA düzeyi arasında kesin bir ilişki bulunamamıştır.

ÖNERİLER

1. G6PD'nin genotip ve fenotip ilişkisini aydınlatabilmek için kapalı toplum özelliği gösteren Çukurova'nın diğer yörelerinden de örnek toplanarak verilerin istatistiksel olarak karşılaştırılması
2. Gd Akdeniz mutasyonuna neden olan serin→fenilalanin amino asit değişiminin fonksiyonel yapı üzerindeki etkisinin bilgisayar ortamında sanal tasarımının yapılması düşünülmüştür.

7.KAYNAKLAR

1. **MacDonald D, Town M, Mason P, Vulliamy T, Luzzatto L, Goff DK.** Deficiency in red blood cells. *Nature*, 1991; 350:115.
2. **Beutler E.** Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency and other red cell abnormalities metabolism. Williams Hematology 6th. Ed., New York: Mc Graw-Hill Medical Publishing, 2001;527-545.
3. **Beutler E.** Study of glucose-6-phosphate dehydrogenase: History and molecular biology. *Am J Hematol*, 1993; 42: 53-58.
4. **Tuncel P.** Heksoz monofosfat yolu. Tokullugil A, Dirican M, Ulukaya E., Biyokimya. 2.baskı, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti., 1997: 111-117.
5. **Yalın S, Yalın E, Aksoy K.** Türkiye’de saptanan glukoz-6-fosfat dehidrogenaz varyantları. *Arşiv*,2002;11 :1-14.
6. **Cappellini MD, Di Montemuros FM, De Bellis G, Debernardi S, Dotti C, Fiorelli G.** Multiple G6PD mutations are associated with a clinical and biochemical phenotype similar to that of G6PD Mediterranean. *Blood*, 1996;87:3953–3958.
7. **Tuli A.** Çukurova’da saptanan G6PD varyantlarının mutasyon noktalarının moleküler düzeyde saptanması. Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD, Adana 1994
8. **Vives-Corrons JL, Kuhl W, Pujades MA, Beutler E.** Molecular genetics of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Mediterranean variant and description of a new G6PD mutant G6PD Andalus(1361A). *Am J Hum Genet*, 1990; 47: 575-579.
9. **Levy HR.** Glucose 6-phosphate dehydrogenase. Meister A. Adv Enzymol, New York: John Willey And Sons, Inc, 1979;48: 97-192.
10. **Beutler E.** Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *New Eng J Med*, 1991; 324: 169-174
11. **Beutler E, Mathai CK, Smith JE.** Biochemical variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase giving rise to congenital nonspherocytic hemolytic disease. *Blood*, 1968; 31: 131-150.
12. **Beutler E.** G6PD deficiency. *Blood*, 1994; 84: 3613-3636.
13. **Zubay G.**Biochemistry. 3rd Ed., Dubuque: Wm.C.Brown Publishers, 1993;321-353.
14. **Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** Harper’s Biochemistry. 25nd Ed, Connecticut: Appleton & Lange, 2000.
15. **Stryer L.**Biochemistry. 3rd Ed, New York: W. H. Freeman and Company, 1988: 427-431.
16. **Beutler E.** Red cell metabolism: A manuel of Biochemical Methods, 3rd Ed, Orlanda : Grune & Stratton Inc, 1984; : 68-71
17. **Burtis CA, Ashwood ER.** Tietz Textbook of Clinical Chemistry 3rd Ed, Philadelphia W.B. Saunders company, Fairbanks V, Klee GG 1999: 1643-1649.
18. **Gözükara EM.** Glukoz-6-Pentoz fosfat yolu dehidrogenaz enziminin özellikleri metabolik ve klinik açıdan önemi. *Biyokimya dergisi* , 1978; 2: 217-240
19. **Mason PJ.** New insights into G6PD deficiency. *Brit J Haemat*, 1996; 94: 585-591

20. Tishkoff SA, Varkonyi R, Cahinhinan N, Abbes S, Argyropoulos G, Destro-Bisol G, Drousiotou A, Dangerfield B, Lefranc G, Loiselet J, Piro A, Stoneking M, Tagarelli A, Tagarelli G, Touma EH, Williams SM, Clark AG. Haplotype diversity and linkage disequilibrium at human G6PD: recent origin of alleles that confer malarial resistance. *Science*, 2001; 293: 455-462
21. Glader B, Lukens JN. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and related disorders of hexose monophosphate shunt and glutathione metabolism. Wintrobe's Clinical Hematology. 10th, Egypt: Mass Publishing, 1999;1176-1190.
22. <http://www.rialto.com/g6pd/> (Erişim tarihi: 21.01 . 2003)
23. Beutler E, Luzzatto L. Hemolytic anemia. *Semin Hematol*, 1999; 36: 38- 42.
24. <http://www.rialto.com/favizm/> (Erişim tarihi: 21.01. 2003)
25. Cappadoro M, Giribaldi G, O'Brien E, Turrini F, Mannu F, Ulliers D, Simula G, Luzzatto L, Arese P. Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium falciparum may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood*, 1998; 92: 2527-2534.
26. Jablonska-Skwiecinska E, Lewandowska I, Plochocka D, Topczewski J, Zimowski JG, Klopocka J, Burzynska B. Several mutations including two novel mutations of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene in Polish G6PD deficient subjects with chronic nonspherocytic hemolytic anemia acute hemolytic anemia and favism. *Hum Mutat*, 1999; 14: 477-484.
27. Roth EF, Raventos-Suarez C, Rinaldi A, Nagel RL. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency inhibits in vitro growth of Plasmodium falciparum. *Proc Nat Acad Sci*, 1983; 80: 298-299.
28. Luzzatto L, Mehta A, Vulliamy TJ. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease 8th edition. Scriver C R Beaudet A L Sly W S and Valle D Eds McGraw-Hill New York, 2000; 4517-4553.
29. Senozan NM, Thielman AC. Glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Chem Edu*, 1991; 68: 7-10.
30. Vives-Corrns JL, Feliu E, Pujades M A, Cardellach F, Rozman C, Carreras A, Jou JM, Vallespi MT, Zuazu FJ. Severe glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency associated with chronic hemolytic anemia granulocyte dysfunction and increased susceptibility to infections: description of a new molecular variant (G6PD Barcelona). *Blood*, 1982; 59: 428-434.
31. Bruggen R, Bautista JM, Petropoulou T, Boer M, Zwieten R, Gomez-Gallego F, Belohradsky BH, Hartwig NG, Stevens D, Mason PJ, Roos D. Deletion of leucine 61 in glucose-6-phosphate dehydrogenase leads to chronic nonspherocytic anemia granulocyte dysfunction and increased susceptibility to infections. *Blood*, 2002; 100: 1026-1030.
32. Elizondo J, Saenz GF, Paez CA, Ramon M, Garcia M, Gutierrez A, Estrada M. G6PD Puerto Limon: a new deficient variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase associated with congenital nonspherocytic hemolytic anemia. *Hum Genet*, 1982; 62: 110-112.
33. Gaetani GF, Galiano S, Melani C, Miglino M, Forni G, L, Napoli G, Perrone L, Ferraris AM. A new glucose-6-phosphate dehydrogenase variant with congenital nonspherocytic hemolytic anemia (G6PD Genova): biochemical characterization and mosaicism expression in the heterozygote. *Hum Genet*, 1990; 84: 337-340.
34. Mamluk RJ, Mills GC, Goldblum RM, Daeschner CW. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Beaumont: a new variant with severe enzyme deficiency and chronic nonspherocytic hemolytic anemia. *Enzyme*, 1985; 34: 15-21.
35. <http://www.ncbi.nih.gov/Research Acembly> (Erişim tarihi: 07.06. 2003)

36. Vulliamy TJ, Kaeda JS, Ait-Chafa D, Mangerini R, Roper D, Barbot J, Mehta AB, Athanassiou-Metaxa M, Luzzatto L, Mason PJ. Clinical and haematological consequences of recurrent G6PD mutations and a single new mutation causing chronic nonspherocytic haemolytic anaemia. *Br J Haematol*, 1998; 101:670-675.
37. Satar M, Kılınc Y, Tanyeli A, Tok M, Etiz L. Yenidoğan bebeklerde hiperbilirubinemi ile glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği arasındaki ilişki. *Cerrahpaşa Tıp Fak Derg*, 1990; 21: 51-54.
38. Kaplan M, Hammerman C, Vreman HJ, Stevenson DK, Beutler E. Acute hemolysis and severe neonatal hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient heterozygotes. *J Pediat*, 2001; 139: 137-140.
39. Kılınc Y. The incidence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in cord blood in mid south part of Turkey. *Ç.Ü.Tıp Fak Der*, 1982; 3: 229-232.
40. <http://www.rubic.rdg.ac.uk/g6pd> (Erişim tarihi: 07.06 .2003)
41. Nsouly GM, Prchal JT. Characterization of a new G6PD variant and its associated oxidative damage. *Clin Res*, 1981; 29: 829-832.
42. Perroni L, Tassara P, Baldi M, Reali R, Scartezzini P. G6PD variants detected in Genoa area. Weatherall DJ, Fiorelli G, Gorini S. *Advances in Red Blood Cell Biology*, New York: Raven Press, 1982; 409-416.
43. Leninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principles of Biochemistry*. 3rd Ed., New York : Worth Publishers 2000.
44. <http://www.rialto.com/g6pd/index.htm> (Erişim tarihi: 21.01. 2003)
45. Pai GS, Sprenkle JA, Do TT, Mareni CE, Migeon BR. Localization of loci for hypoxanthine phosphoribosyltransferase and glucose-6-phosphate dehydrogenase and biochemical evidence of nonrandom X chromosome expression from studies of a human X-autosome translocation. *Proc Nat Acad Sci*, 1980; 77: 2810-2813.
46. Faust CJ, Levinson B, Gitschier J, Herman GE. Extension of the physical map in the region of the mouse X chromosome homologous to human Xq28 and identification of an exception to conserved linkage. *Genomics*, 1992; 13: 1289-1295.
47. Maffi D, Pasquino MT, Caforio MP, Sorrentino F, Cappabianca MP, Salvatti AM. Identification of G6PD Mediterranean mutation by amplification refractory mutation system. *Clinica Chimica Acta*, 2002; 321: 43-47.
48. Luzzatto L. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Genetic haematological aspects. *Cell Bio Fun*, 1987; 5: 101-107.
49. Beutler E, Westwood B, Melemed A, Dal Borgo P, Margolis D. Three new exon 10 glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations. *Blood Cells Mol Dis*, 1995; 21: 64-72.
50. Takizawa T, Huang IY, Ikuta T, Yoshida A. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: primary structure and cDNA cloning. *Proc Nat Acad Sci*, 1986; 83: 4157-4161.
51. Martini G, Toniolo D, Vulliamy T, Luzzatto L, Dono R, Viglietto G, Paonessa G, D'Urso M, Persico MG. Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *EMBO J*, 1986; 5: 1849-1855.
52. Beutler E, Kuhl W, Gelbart T, Forman L. DNA sequence abnormalities of human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *J Biol Chem*, 1991; 266:4145-4150.

53. Liu Y, Phelan J, Go RCP, Prchal JF, Prchal JT. Rapid determination of clonality by detection of two closely-linked X chromosome exonic polymorphisms using allele-specific PCR. *J Clin Invest*, 1997; 99: 1984-1990.
54. Bilget E. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği saptanan olguların kinetik ve moleküler özelliklerinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya ABD, Adana 1998
55. Cohen P, Rosemeyer MA. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *Eur J Biochem*, 1969;8: 8-15.
56. Levy HR, Vought VE, Xiaohong Y, Adams MJ. Identification of an arginine residue in the dual coenzyme-specific glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* that plays a key role in binding NADP⁺ but not NAD⁺. *Arc Biochem Biophys*, 1996;326: 145-151.
57. Au SW, Adams MJ. Solution of the structure tetrameric glucose-6-phosphate dehydrogenase by molecular replacement. *Acta Crystallogr D*, 1999; 55: 826-834.
58. Bhadbhade MM, Adams MJ, Flynn TG, Levy HR. Sequence identity between a lysine-containing peptide from *Leuconostoc mesenteroides* and an active site peptide from human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett*, 1987;211: 243-246.
59. Au SW, Gover S, Lam VMS, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP⁺ molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, 2000; 8: 293-303.
60. Toniolo D, Martini G, Migeon BR, Dono R. Expression of the G6PD locus on the human X chromosome is associated with demethylation of three CpG islands within 100 kb of DNA. *EMBO J*, 1988; 7: 401-406.
61. Hirono A, Kuhl W, Gelbart T, Forman L, Fairbanks VF, Beutler E. Identification of the binding domain for NADP(+) of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants. *Proc Nat Acad Sci*, 1989; 86: 10015-10017
62. Roos D, van Zwieten R, Wijnen JT, Gomez Gallego F, De Boer M, Stevens D, Pronk-Admiraal CJ, de Rijk T, van Noorden CJF, Weening RS, Vulliamy TJ, Ploem JE, Mason PJ, Bautista JM, Khan PM, Beutler E. Molecular basis and enzymatic properties of glucose 6-phosphate dehydrogenase Volendam leading to chronic nonspherocytic anemia granulocyte dysfunction and increased susceptibility to infections. *Blood*, 1999;94: 2955-2962 .
63. Tang TK, Chen HL, Tzou WS, Huang MJ . Structural and functional analysis of Chinese G6PD mutations on the basis of a three dimensional structural model of human enzyme. *Blood*, 1996;88:307-314.
64. Hirono A, Kuhl W, Gelbart T, Forman L, Fairbanks VF, Beutler E. Identification of the binding domain for NADP⁺ of human glucose-6-phosphate dehydrogenase by sequence analysis of mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989; 86: 10015-10017.
65. Vulliamy T, Mason P, Luzzatto L. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trends Genet*, 1992; 8: 138-143
66. Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: New perspectives. *Blood*, 1989; 73: 1397-1401
67. Ganczakowski M, Town M, Bowden DK, Vulliamy TJ, Kaneko A, Clegg JB, Weatherall DJ, Luzzatto L. Multiple glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with malaria endemicity in the Vanuatu archipelago (southwestern Pacific). *Am J Hum Genet*, 1995; 56: 294-301.

68. Luzzatto L, Usanga E, A, Reddy S. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient red cells: resistance to infection by malarial parasites. *Science*, 1969; 164: 839-842.
69. Beutler E, Westwood B, Prchal JT, Vaca G, Bartsocas CS, Baronciani L. New glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations from various ethnic groups. *Blood*, 1992; 80: 255-256.
70. Calabro V, Giacobbe A, Vallone D, Montanaro V, Cascone A, Filosa S, Battistuzzi G. Genetic heterogeneity at the glucose-6-phosphate dehydrogenase locus in southern Italy: a study on a population from the Matera district. *Hum Genet*, 1990; 86: 49-53.
71. Viglietto G, Montanaro V, Calabro V, Vallone D, D'Urso M, Persico MG, Battistuzzi G. Common glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants from the Italian population: Biochemical and molecular characterization. *Ann Hum Genet*, 1990; 54: 1-15.
72. Ruwando C, Khea SC, Snow RW, Yates SNR, Kwiatkoweld D, Gupta S, Warn P, Alisopp GEM, Gilbert SC, Peschu N, Newbold CI, Greenwood SM, Marsh K, Hill AVS, Natural selection of hemi- and heterozygotes for G6PD deficiency in Africa by resistance to severe malaria. *Nature*, 1995; 376: 246-249.
73. Friedman MJ, Trager W. The biochemistry of resistance to malaria. *Sci Am*, 1981; 244: 154-164.
74. Chang JG, Chiou SS, Perng LI, Chen TC, Liu TC, Lee LS, Chen PH, Tang TK. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency by natural and amplification created restriction sites: five mutations account for most G6PD deficiency cases in Taiwan, *Blood*, 1992;80: 1079-1082.
75. Vulliamy T, Beutler E, Luzzatto L. Variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase are due to missense mutations spread throughout the coding region of the gene. *Hum Mutat*, 1993; 2: 159-167.
76. Beutler E, Westwood B, Prchal J, Vaca G, Bartsocas CS, Baronciani L. Hematologically important mutation: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis*, 2002;28:93-103 .
77. D'Urso M, Luzzatto L, Perroni L, Ciccodicola A, Gentile G, Peluso I, Persico MG, Pizzella T, Toniolo D, Vulliamy TJ. An extensive search for RFLP in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase locus has revealed a silent mutation in the coding sequence. *Am J Hum Genet*, 1988;42: 735-741.
78. Tang TK, Yeh CH, Huang CS, Huang MJ. Expression and biochemical characterization of human glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*: A system to analyze normal and mutant enzymes. *Blood*, 1994;83:1436-1441.
79. World Healthy Organization. Scientific group on the standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. WHO Techn Rep Ser No 366, 1967; Geneva
80. Yoshida A, Takizawa T. The same extra FokI cleavage site exists in glucose-6-phosphate dehydrogenase variants A(+) and A(-). *Am J Hum Genet*, 1988; 43: 131-133.
81. Kirkman HN, Schettini E, Pickard BM. Mediterranean variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Lab Clin Med*, 1964; 63: 726-735.
82. Yoshida A. A single amino acid substitution (asparagine to aspartic acid) between normal (B plus) and the common Negro variant (A plus) of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Proc Nat Acad Sci*, 1967; 57: 835-840
83. Takizawa T, Yoshida A. Molecular abnormality of the common glucose-6-phosphate dehydrogenase variant G6PD A(+) and restriction-fragment-length polymorphism. *Am J Hum Genet*, 1987; 41: 241-246.
84. Gomez-Gallego F, Garrido-Pertierra A, Bautista JM. Structural defects underlying protein dysfunction in human glucose-6-phosphate dehydrogenase A- deficiency. *J Biol Chem*, 2000;275: 9256-9262

85. Takizawa T, Yoneyama Y, Miwa S, Yoshida A. A single nucleotide base transition is the basis of the common human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Genomics*, 1987; 1:228-231.
86. Babalola AOG, Beetlestone JG, Luzzatto L. Genetic variants of human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase: kinetic and thermodynamic parameters of variants A B and A- in relation to quaternary structure. *J Biol Chem*, 1976; 251: 2993-3002.
87. Yoshida A, Takizawa T, Prchal JT. RFLP of the X chromosome-linked glucose-6-phosphate dehydrogenase locus in blacks. *Am J Hum Genet*, 1988; 42: 872-876.
88. Vulliamy TJ, D'Urso M, Battistuzzi G, Estrada M, Foulkes NS, Martini G, Calabro V, Poggi V, Giordano R, Town M, Luzzatto L, Persico M, G. Diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Nat Acad Sci*, 1988; 85: 5171-5175.
89. Hirono A, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc Nat Acad Sci*, 1988; 85: 3951-3954.
90. Beutler E, Kuhl W, Vives-Corrans JL, Prchal JT. Molecular heterogeneity of G6PD A- . *Blood*, 1989;74:2550-2555.
91. Cappellini MD, Sampietro M, Toniolo D, Carandina G, Martinez di Montemuros F, Tavazzi D, Fiorelli G. G6PD Ferrara I has the same two mutations as G6PD A (-) but a distinct biochemical phenotype. *Hum Genet*, 1994; 93:139-142.
92. Vulliamy TJ, D'Urso M, Battistuzzi G, Estrada M, Foulkes NS, Martini G, Calabro V, Poggi V, Giordano R, Town M, Luzzatto L, Persico MG. Diverse point mutations in the human glucose 6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 5171-5175.
93. De Vita G, Alcalay M, Sampietro M, Cappellini MD, Fiorelli G, Toniolo D. Two point mutations are responsible for G6PD polymorphism in Sardinia. *Am J Hum Genet*, 1989; 44: 233-240.
94. Beutler E, Kuhl W. The NT 1311 polymorphism of G6PD: G6PD Mediterranean mutation may have originated independently in Europe and Asia. *Am J Hum Genet*, 1990; 47:1008-1012.
95. Kurdi-Haidar B, Mason PJ, Berrebi A, Ankra-Badu G, Al-Ali A, Oppenheim A, Luzzatto L. Origin and spread of the glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD-Mediterranean) in the Middle East. *Am J Hum Genet*, 1990; 47: 1013-1019.
96. Corcoran CM, Calabro V, Tamagnini G, Town M, Haidar B, Vulliamy TJ, Mason PJ, Luzzatto L. Molecular heterogeneity underlying the G6PD Mediterranean phenotype. *Hum Genet*, 1992; 88:688-690.
97. Vulliamy TJ, Othman A, Town M, Nathwani A, Falusi AG, Mason PJ, Luzzatto L. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A-. *Proc Nat Acad Sci*, 1991; 88: 8568-8571.
98. Aksoy K, Yuregir GT, Dikmen N, Unlukurt I. Three new G6PD variants G6PD Adana, G6PD Samandag, and G6PD Balcalı in Cukurova Turkey. *Hum Genet*, 1987; 76: 199-201.
99. Aksoy K, Yuregir GT, Dikmen N, Unlukurt I. Türkiye'de saptanan yeni bir G6PD B⁺ varyantı: G6PD Antakya. *Ç.Ü. Tıp Fak. Dergisi*, 1990; 15:186-191.
100. Zarza R, Pujades A, Rovira A, Saavedra R, Fernandez J, Aymerich M, Corrons JLV. Two new mutations of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene associated with haemolytic anaemia: Clinical biochemical and molecular relationships. *Br J Haematol*, 1997; 98:578-582.

101. Zimran A, Wasser G, Forman L, Gelbart T, Beutler E. Effect of ozone on red blood cell enzymes and intermediates. *Acta Haematol*, 2000; 102: 148-153.
102. Jablonska-Skwieciniska E, Lewandowska I, Plochocka D, Topczewski J, Zimowski JG, Klopocka J, Burzynska B. Several mutations including two novel mutations of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene in Polish G6PD deficient subjects with chronic nonspherocytic hemolytic anemia acute hemolytic anemia and favism. *Hum Mutat*, 1999;14 477-484.
103. Kohn J. Separation of hemoglobins on cellulose acetate. *J Clin Pathol*, 1969; 22:109-110.
104. Huisman THJ, Schroeder WA, Brodie AR, Mayson SM, Jakura J. Microchromatography of hemoglobins III. A simplified procedure for the determination of hemoglobin A₂. *J Lab Clin Med*, 1975;86:700.
105. Betke K, Marti HY, Schlicht L. Estimation of small percentage of fetal haemoglobin. *Nature*, 1959;184:1877.
106. Ohkawa H, Ohishi N, Tagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, 1979;95: 351-358.
107. Petrucci RH. General Chemistry 5th Ed., New York: Mc Millan Publishing Company, 1989.
108. Skoog DA, Leary JJ. Principles of instrumental analysis. 4th Ed., Fort Wort: Saunders College Publishing, 1992: 654-660.
109. Dodge JT, Mitchell C, Hanahan DJ. The preparation and chemical characteristics of hemoglobin-free ghosts of human erythrocytes. *Acta Biochem Biophys*, 1963;100:119-130.
110. 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 β -like globin genes. *Hemoglobin*, 1982; 6:27-36.
111. Saiki RK. The design and optimization of the PCR. New York : Stocton, 1989.
112. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manuel. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.
113. Weatherall DJ. New genetics and clinical practise. Oxford University, Oxford, 1991
114. Vulliamy T, Luzzatto L, Hirono A, Beutler E. Hematologically important mutations: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis*, 1997; 23: 302-313
115. Galanello R, Loi D, Sollaino C, Dessi S, Cao A, Melis MA. A new glucose phosphate dehydrogenase variant G6PD Sinnai .34G3T Mutations. *Hum Mutat*, 1998; 12: 72-73
116. Weimer TA, Salzano FM, Westwood B, Beutler E. G6PD variants in three South American ethnic groups: Population distribution and description of two new mutations. *Hum Hered*, 1998; 48: 92-96
117. Chao L, Du CS, Louie E, Zuo L, Chen E, Lubin B, Chiu DTY. A to G substitution identified in exon 2 of the G6PD gene among G6PD deficient Chinese. *Nucleic Acids Res*, 1991; 19: 6056
118. Hirono A, Ishii A, Kere N, Fujii H, Hirono K, Miwa S. Molecular analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in the Solomon Islands. *Am J Hum Genet*, 1995; 56: 1243-1245
119. Kaeda JS, Chhotray GP, Ranjit MR, Bautista JM, Reddy PH, Stevens D, Naidu JM, Britt RP, Vulliamy TJ, Luzzatto L, Mason PJ. A new glucose-6-phosphate dehydrogenase variant G6PD

- Orissa (44 Ala→Gly) is the major polymorphic variant in tribal populations in India. *Am J Hum Genet*, 1995; 57:1335–1341
120. Nafa K, Reghis A, Osmani N, Baghli L, Benabadji M, Kaplan JC, Vulliamy TJ, Luzzatto L. G6PD Aures: A new mutation (48Ile→Thr) causing mild G6PD deficiency is associated with favism. *Hum Mol Genet*, 1993; 2:81–82
121. Hirono A, Fujii H, Takano T, Chiba Y, Azuno Y, Miwa S. Molecular analysis of eight biochemically unique glucose-6-phosphate dehydrogenase variants found in Japan. *Blood*, 1997; 89:4624–4627
122. Hirono A, Kawate K, Honda A, Fujii H, Miwa S. A single mutation 202G→A in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene (G6PD) can cause acute hemolysis by itself. *Blood*, 2002; 99:1498
123. Hirono A, Beutler E. Molecular cloning and nucleotide sequence of cDNA for human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant A(-). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 3951–3954
124. Beutler E, Kuhl W, Ramirez E, Lisker R. Some Mexican glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants revisited. *Hum Genet*, 1991; 86: 371–374
125. Nafa K, Reghis A, Osmani N, Baghli L, Ait-Abbes H, Benabadji M, Kaplan JC, Vulliamy T, Luzzatto L. At least five polymorphic mutants account for the prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Algeria. *Hum Genet*, 1994; 94: 513–517
126. Ganczakowski M, Town M, Bowden DK, Vulliamy TJ, Kaneko A, Clegg JB, Weatherall DJ, Luzzatto L. Multiple glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient variants correlate with malaria endemicity in the Vanuatu archipelago (southwestern Pacific). *Am J Hum Genet*, 1995; 56: 294–301
127. Rovira A, Vulliamy T, Pujades MA, Luzzatto L, Corrons JLV. Molecular genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in Spain: Identification of two new point mutations in the G6PD gene. *Br J Haematol*, 1995; 91: 66–71
128. Mason PJ, Sonati MF, MacDonald D, Lanza C, Busutil D, Town M, Corcoran CM, Kaeda JS, Stevens DJ, Al-Ismail S, Altay C, Hatton C, Lewis DS, McMullin MF, Meloni T, Paul B, Pippard M, Prentice AG, Vulliamy TJ, Luzzatto L. New glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations associated with chronic anemia. *Blood*, 1995; 85: 1377–1380
129. Hirono A, Fujii H, Miwa S. Molecular abnormality of G6PD Konan and G6PD Ube the most common glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Japan. *Hum Genet*, 1993; 91: 507–508
130. Ninfali P, Baronciani L, Ruzzo A, Fortini C, Amadori E, Dall'ara G, Magnani M, Beutler E. Molecular analysis of G6PD variants in northern Italy: A study on the population from the Ferrara district. *Hum Genet*, 1993; 92: 139–142
131. Hirono A, Fujii H, Miwa S. Identification of two novel deletion mutations in glucose-6-phosphate dehydrogenase gene causing hemolytic anemia. *Blood*, 1995; 85: 1118–1121
132. Maeda M, Constantoulakis P, Chen CS, Stamatoyannopoulos G, Yoshida A. Molecular abnormalities of a human glucose-6-phosphate dehydrogenase variant associated with undetectable enzyme activity and immunologically cross-reacting material. *Am J Hum Genet*, 1992; 51: 386–395
133. Weimer TA, Salzano FM, Westwood B, Beutler E. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants from Brazil. *Hum Biol*, 1993; 65: 41–47
134. Chiu DTY, Zuo L, Chao L, Chen E, Louie E, Lubin B, Liu TZ, Du CS. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in patients of Chinese descent and identification of new base substitutions in the human G6PD gene. *Blood*, 1993; 81:2150–2154

135. Menounos P, Zervas C, Garinis G, Doukas C, Kolokithopoulos D, Tegos C, Patrinos GP. Molecular heterogeneity of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Hellenic population. *Hum Hered*, 2000; 50: 237–241
136. Vulliamy TJ, Wanachiwanawin W, Mason PJ, Luzzatto L. G6PD Mahidol a common deficient variant in South East Asia is caused by a (163) glycine → serine mutation. *Nucleic Acids Res*, 1989; 17:5868.
137. Tang TK, Yeh CH, Huang CS, Huang MJ. Expression and biochemical characterization of human glucose-6-phosphate dehydrogenase in *Escherichia coli*: A system to analyze normal and mutant enzymes. *Blood*, 1994; 83:1436–1441
138. Chen HL, Huang MJ, Huang CS, Tang TK. G6PD NanKang (517 T→C; 173Phe→Leu): A new Chinese G6PD variant associated with neonatal jaundice. *Hum Hered*, 1996; 46 : 201–204
139. Hirono A, Miwa S, Fujii H, Ishida F, Yamada K, Kubota K. Molecular study of eight Japanese cases of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency by nonradioisotopic single-strand conformation polymorphism analysis. *Blood*, 1994; 83: 3363–3368
140. Beutler E, Kuhl W, Saenz GF, Rodriguez W. Mutation analysis of G6PD variants in Costa Rica. *Hum Genet*, 1991; 87: 462–464
141. Vulliamy T, Rovira A, Yusoff N, Colomer D, Luzzatto L, Vives-Corrons JL. Independent origin of single and double mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene. *Hum Mutat*, 1996; 8: 311–318
142. De Vita G, Alcalay M, Sampietro M, Cappellini MD, Fiorelli G, Toniolo D. Two point mutations are responsible for G6PD polymorphism in Sardinia. *Am J Hum Genet*, 1989; 44: 233–240
143. Du CS, Chao LT, Louie E, Liu TZ, Chiu DTY. Molecular characterization of G6PD deficiency in patients of Chinese descent and identification of a new base substitution in the human G6PD gene. *Blood*, 1992; 80:284
144. Beutler E, Westwood B, Prchal J, Vaca G, Bartsocas CS, Baronciani L. New glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations from various ethnic groups. *Blood*, 1992; 80:255–256
145. Calabro V, Mason PJ, Filosa S, Civitelli D, Cittadella R, Tagarelli A, Martini G, Brancati C, Luzzatto L. Genetic heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency revealed by single-strand conformation and sequence analysis. *Am J Hum Genet*, 1993; 52: 527–536
146. Beutler E, Prchal JT, Westwood B, Kuhl W. Definition of the mutations of G6PD Wayne G6PD Viangchan G6PD Jammu and G6PD “LeJeune”. *Acta Haematol*, 1991; 86: 179–182
147. Poggi V, Town M, Foulkes NS, Luzzatto L. Identification of a single base change in a new human mutant glucose-6-phosphate dehydrogenase gene by polymerase-chain-reaction amplification of the entire coding region from genomic DNA. *Biochem J*, 1990; 271: 157–160
148. Zimmerman S, Ware RE, Forman L, Westwood B, Beutler E. G6PD Durham: A de novo mutation associated with chronic hemolytic anemia. *Blood*, 1996; 88: 307
149. Xu W, Westwood B, Bartsocas CS, Malcorra-Azpiazu JJ, Indra'k K, Beutler E. Glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood*, 1995; 85:257–263
150. Costa E, Cabeda JM, Vieira E, Pinto R, Pereira SA, Ferraz L, Santos R, Barbot J. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Aveiro: A de novo mutation associated with chronic nonspherocytic hemolytic anemia. *Blood*, 2000; 95: 1499–1501

151. Taki M, Hirono A, Kawata M, Den M, Kurihara Y, Shimizu H, Yamada K, Fujii H, Miwa S. A new glucose-6-phosphate dehydrogenase variant G6PD Sugao (826C→T) exhibiting chronic hemolytic anemia with episodes of hemolytic crisis immediately after birth. *Int J Hematol*, 2001; 74 :153–156
152. Beutler E. A new G-6-PD mutation G-6-PD La Jolla (c. 832 T → C) inherited together with Gilbert's disease. 2001 Manuscript in preparation
153. Beutler E, Westwood B, Kuhl W, Hsia YE . Glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Hawaii. *Hum Hered*, 1992; 42: 327–329
154. Cai W, Filosa S, Martini G, Zhou Y, Zhou D, Cai L, Kuang Y. Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Han and Li nationalities in Hainan China and identification of a new mutation in human G6PD gene. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2001; 18: 105–109
155. Ninfali P, Bresolin N, Baronciani L, Fortunato F, Comi G, Magnani M, Scarlato G. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Lodi844C: A study on its expression in blood cells and muscle. *Enzyme*, 1991; 45:180–187
156. Fiorelli G, Anghinelli L, Carandina G, Toniolo D, Sempietro M, Cappellini MD, Pareti FI. Point mutations in two G6PD variants previously described in Italy. *Blood*, 1990; 76:7
157. Cappellini MD, Martinez di Montemuros F, Dotti C, Tavazzi D, Fiorelli G. Molecular characterisation of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Ferrara II variant. *Hum Genet*, 1995; 95: 440–442
158. Frigerio R, Sole G, Lovicu M, Passiu G. Molecular and biochemical data on some glucose-6-phosphate dehydrogenase variants from Southern Sardinia. *Haematologica*, 1994; 79:319–321
159. Lisker R, Linares C, Motulsky AG. Glucose-6-phosphate dehydrogenase Mexico A new variant with enzyme deficiency abnormal mobility and absence of hemolysis. *J Lab Clin Med*, 1972; 79:788–793
160. Okano Y, Fujimoto A, Miyagi T, Hirono A, Miwa S, Niihira S, Hirokawa H, Yamano T. Two novel glucose-6-phosphate dehydrogenase variants found in newborn mass-screening for galactosaemia. *Eur J Pediatr*, 2001; 160:105–108
161. Ahluwalia A, Corcoran CM, Vulliamy TJ, Ishwad CS, Naidu JM, Argusti A, Stevens DJ, Mason PJ, Luzzatto L. G6PD Kalyan and G6PD Kerala: Two deficient variants in India caused by the same 317 Glu→Lys mutation. *Hum Mol Genet*, 1992; 1:209–210
162. Hirono A, Fujii H, Shima M, Miwa S. G6PD Nara: A new class 1 glucose-6-phosphate dehydrogenase variant with an eight amino acid deletion. *Blood*, 1993; 82: 3250–3252
163. Iancovici-Kidon M, Sthoger D, Abrahamov A, Volach B, Beutler E, Gelbart T, Barak Y. A new exon 10 glucose-6-phosphate dehydrogenase mutation (G6PD "Rehovot") in a Jewish Ethiopian family with variable phenotypes. *Blood Cells Mol Dis*, 2000; 26: 567–571
164. Efferth T, Osieka R, Beutler E . Molecular characterization of a German variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD Aachen). *Blood Cells Mol Dis*, 2000; 26:101–104
165. Vives Corrons JL, Zarza R, Aymerich JM, Boixadera J, Carrera A, Colomer D, Corbella M, Castro M, Crespo JM, Del Arco A, Erkiaga S, Font L, Gonzalez I, Junca J, Lausin A, Manrubia E, Martin NG, Murga MJ, Oliva E, Perez dM, Pujades MA, Remacha A, Rovira A, Villegas A. Molecular analysis of glucose-6-dehydrogenase deficiency in Spain. *Sangre (Barcelona)*, 1997; 42: 391–398

166. Vlachos A, Westwood B, Lipton JM, Beutler E. G6PD Mt Sinai: A new severe hemolytic variant characterized by dual mutations at nucleotides 376G and 1159T (N126D). *Hum Mutat*, 1998; 1:154–155
167. Filosa S, Calabro V, Vallone D, Poggi V, Mason P, Pagnini D, Alfinito F, Rotoli B, Martini G, Luzzatto L, Battistuzzi G. Molecular basis of chronic non-spherocytic haemolytic anaemia: A new G6PD variant (393 Arg→His) with abnormal K_m^{G6PD} and marked instability. *Br J Haematol*, 1992; 80:111–116
168. Filosa S, Cai W, Galanello R, Cao A, De Mattia D, Schettini F, Martini G. A novel single-base mutation in the glucose 6-phosphate dehydrogenase gene is associated with chronic nonspherocytic haemolytic anaemia. *Hum Genet*, 1994; 94: 560–562
169. Hirono A, Fujii H, Hirono K, Kanno H, Miwa S. Molecular abnormality of a Japanese glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD Tokyo) associated with hereditary nonspherocytic hemolytic anemia. *Hum Genet*, 1992; 88: 347–348
170. Iwai K, Hirono A, Matsuoka H, Kawamoto F, Horie T, Lin K, Tantular IS, Dachlan YP, Notopuro H, Hidayah NI, Salim AM, Fujii H, Miwa S, Ishii A. Distribution of glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations in Southeast Asia. *Hum Genet*, 2001; 108: 445–449
171. Saad STO, Salles TS, Arruda VR, Sonati MF, Costa FF. G6PD Sumare: A novel mutation in the G6PD gene (1292 T→G) associated with chronic nonspherocytic anemia. *Hum Mutat*, 1997; 10: 245–247
172. Hirono A, Nakayama S, Fujii H, Miwa S. Molecular abnormality of a unique Japanese glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD Kobe) with a greatly increased affinity for galactose-6-phosphate. *Am J Hematol*, 1994; 45: 185–186
173. Hsia YE, Miyakawa F, Baltazar J, Ching NSP, Yuen J, Westwood B, Beutler E. Frequency of glucose-6-phosphate dehydrogenase G6PD mutations in Chinese Filipinos and Laotians from Hawaii. *Hum Genet*, 1993; 92: 470–476
174. Vives Corrons JL, Rovira A, Pujades MA, Estrada M, Vulliamy TJ. Diverse point mutations of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene in Spanish and Cuban patients with hemolytic anaemia. *Revista Invest Clin*, 1994; 46:234
175. Perng LI, Chiou SS, Liu TC, Chang JG. A novel C to T substitution at nucleotide 1360 of cDNA which abolishes a natural Hha I site accounts for a new G6PD deficiency gene in Chinese. *Hum Mol Genet*, 1992; 1: 205
176. Wagner G, Bhatia K, Board P. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency mutations in Papua New Guinea. *Hum Biol*, 1996; 68: 383–394
177. Stevens DJ, Wanachiwanawin W, Mason PJ, Vulliamy TJ, Luzzatto L. G6PD Canton a common deficient variant in South East Asia caused by a 459 Arg→Leu mutation. *Nucleic Acids Res*, 1990; 18: 7190
178. Chiu DTY, Zuo L, Chen E, Chao L, Louie E, Lubin B, Liu TZ, Du CS . Two commonly occurring nucleotide base substitutions in Chinese G6PD variants. *Biochem Biophys Res Commun*, 1991; 180: 988–993
179. Ren X, He Y, Du C, Jiang W, Chen L, Lin Q. A novel missense mutation (G1381A) in the G6PD gene identified in a Chinese man. *Chin Med J*, 2001; 114: 399–401
180. Alfinito F, Cimmino A, Ferraro F, Cubellis MV, Vitagliano L, Francese M, Zagari A, Rotoli B, Filosa S, Martini G. Molecular characterisation of G6PD deficiency in Southern Italy: Heterogeneity correlation genotype–phenotype and description of a new variant (G6PD Neopolis). *Br J Haematol*, 1997; 98: 41–46

181. **Baronciani L, Tricta F, Beutler E** . G6PD "Campinas:" A deficient enzyme with a mutation at the far 3' end of the gene. *Hum Mutat*, 1993; 2:77-78
182. **Gonigle DPM, Lalloz MRA, Wild BJ**. G6PD Brighton: A new class I variant due to a deletion in exon 13. *Br J Haematol*, 1998; 101:51
183. **Vives Corrons JL, Aymerich M, Carrera A, Colomer D, Murga Fernandez MJ, Perez de Mendigueren B, Pujades A, Remacha A, Rovira A, Saavedra R, Zarza R**. Molecular genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in Spain. *Blood*, 1996; 88:7



EK 1: DNA Düzeyinde Karakterize Edilen G6PD Varyantları

Bugüne kadar moleküler düzeyinde belirlenen yaklaşık 140 G6PD varyantı çizelge 1'de gösterilmiştir¹¹⁴⁻¹⁸³.

Çizelge 1. DNA düzeyinde karakterize edilen G6PD varyantları

Varyant Adı	cDNA Nükleotit Substitüsüyonu	Genomik Nükleotit Substitüsüyonu	Amino Asit Substitüsüyonu	Sınıf
Sinnai	34G→T	34T	12 Val→Leu	3
Lages	40G→A	40A	14Gly→Arg	1 veya 3
Gaohe	95A→G	95G	32His→Arg	3
Gaozhou				3
Sapporo-like				
Ube				
Bodia-like				
Honiara	99A→G 1360C→T	99G 13763T	33Ile→Met 454Arg→Cys	1
Sunland	105-107 del	105-107 del	35 veya 36Ile del	1
Gidra	110T→C	110C	37Met→Thr	NA
Orissa	131C→G	9988G	44Ala→Gly	3
Aures	143T→C	10000C	148Ile→Thr	2
Kozukata	159G→C	10111C	53Trp→Cys	1
Kamogawa	169C→T	10121T	57Arg→Trp	2
Metaponto	172G→A	10124A	58Asp→Asn	3
Musashino	185C→T	10137T	62Pro→Phe	3
Asahi	202G→A	10154A	68Val→Met	
A-	202G→A	10154A	68Val→Met	3
DistritoFederal	376A→G	10877G	126Asn→Asp	3
Matera				3
Castilla				3
Alabama				3
Betica				2
Γepic				3
Terara				2
Maghouat				3
Kabyle				3
Namouru	208T→C	10160C	70Try→His	2
Murcia	209A→G	10161G	70Try→Cys	1
Swansea	224T→C	10176C	75Leu→Pro	1
Jbe	241C→T	10193T	81Arg→Cys	3
Conan				
Magosanto	242G→A	10194A	81Arg→His	3
Jrayasu	281-283 del	10782-10784	95Lys del	2
Vancouver	317C→G 544C→T 592C→T	10818G	106Ser→Cys 182Arg→Trp 198Arg→Cys	1
Hammersmith	323T→A	10824A	108Val→Glu	3
Jiao Borja	337G→A	10838A	113Asp→Asn	4
Al	376A→G	10877G	126Asn→Asp	4
Manua Lava	383T→C	10884C	128Leu→Pro	2
Quing Yan	392G→T	10893T	131Gly→Val	3
Jairo	404A→C	10905C	135Asn→Thr	2
Jalladolid	406C→T	10907T	136Arg→Cys	2
Jcrokorinthos	436C→A 376A→G	10964T 10887G	155His→Asp 155Asn→Asp	2

Varyant Adı	cDNA Nükleotit Substitüsyonu	Genomik Nükleotit Substitüsyonu	Amino Asit Substitüsyonu	Smf
esha	466G→A	10967A	156Glu→Lys	3
Mahidol	487G→A	11658A	163Gly→Ser	3
Plymouth	488G→A	11659A	163Gly→Asp	1
Gaipei	493A→G	11664G	165Asn→Asp	2
Naone	497G→A	11668A	166Arg→His	2
Volendam	514C→T	11684T	172Pro→Ser	1
Nankang	517T→C	11687C	173Phe→Leu	2
Miaoli	519C→G	11689G	173Phe→Leu	NA
Shinsbu	527A→G	11698G	176Asp→Gly	1
Chikugo	535A→T	11706T	179Ser→Cys	1
Malaga	542A→T	11713T	181Asp→Val	3
Santamaria	542A→T 376A→G	11713T 10877G	181Asp→Val 126Asn→Asp	2
Malaga	542 A→T	11713T	181 Asp→Val	
Fsukui	561-563del	11732-11734	188veya189Ser del	1
Mediterranean	563C→T	11734T	188Ser→Phe	2
Dallas				2
Birmingham				1
Sassari				2
Agliari				2
Panama				1
Coimbra	592C→T	11763T	198Arg→Cys	2
Shunde				
Santiago	593G→C	11764C	198Arg→Pro	1
Sibari	634A→G	11805G	212Met→Val	3
Minnesota	637G→T	11808T	213Val→Leu	1
Marion				1
Tastonia				1
Le Jeune				1
Harilaou	648T→G	11996G	216Phe→Leu	1
Radlowo	679C→T	12027T	227Arg→Try	NA
Mexico City	680G→A	12028A	227Arg→Glu	3
A-	680G→T 376A→G	12028T 10877G	227Arg→Leu 126Asn→Asp	3
North Dallas	683-685 del	12031-12033del	229Asn del	1
Asahikawa	695G→A	12043A	232Cys→Try	2
Durham	713A→G	12061	238Lys→Arg	1
Stonybrook	724-729 GGCACT del	12072-12077	242-243 Gly ve Thr del	1
Wayne	769C→G	12117G	257Arg→Gly	1
Aveiro	806G→A	12519A	269Cys→Try	1
Cleveland	820G→A	12533A	274Glu→Lys	1
Çorum				1
Suago	826 C→T	12539C	276Pro→Ser	
La Jolla	832 T→C	12545C	278Ser→Pro	1
Wexham	833C→T	12546T	278Ser→Phe	1
Chinese 1	835A→T	12548T	279Thr→Ser	2
Haikou	835A→G	12548G	279Thr→Ala	

Varyant Adı	cDNA Nükleotit Substitüsyonu	Genomik Nükleotit Substitüsyonu	Amino Asit Substitüsyonu	Sınıf
Seattle Lodi Modena Ferrara II Athens-like Mexico	844G→C	12557C	282Asp→His	3 3 3 3 2 veya 3 3
Papua	849C→A	12562A	283Asp→Glu	NA
Osaka	853C→T	12566T	285Arg→Cys	2
Montalbano	854G→A	12567A	285Arg→His	3
Viangchan Jammu	871G→A	13031A	291Val→Met	3 2
West Virginia	910G→T	13070T	303Val→Phe	1
Seoul	916G→A	13076A	306Gly→Ser	2
Orniya	921G→C	13081C	307Gln→His	1
Ludhiana	929G→A	13089A	310 Gly →Glu	2
Kalyan Kerala	949G→A	13109A	317Glu→Lys	3 3
Nara	953-976 del	13113-13136 del	319-326 del	1
Manhattan	962G→A	13142A	321Gly→Glu	1
Rehovot	964T→C	13124C	322Try→His	
A- Betica Selma Guantanamo	968T→C 376A→G	13128C 10877G	323Leu→Pro 126Asn→Asp	3 2 3 3
Farnoupilha	977C→A	13137A	326Pro→His	2 veya 3
Chatham	1003G→A	13163A	335Ala→Thr	3
Pushan	1004C→A	13164A	335Ala→Asp	2
Forun	1006 A→G	13166G	336Thr→Ala	1
Chinese-5	1024C→T	13184T	342Leu→Phe	3
Vira d'Aire	1048G→C	13208C	350Asp→His	4
Partenope	1052G→T	13351T	351Gly→Val	2
erapetra	1057C→T	13356T	353Pro→Ser	2
watsuki	1081G→A	13380A	361Ala→Thr	1
erres	1082C→T	13381T	361Ala→Val	1
Aachen	1089C→G	13388G	363Asn→Lys	1
Loma Linda	1089C→A	13388A	363Asn→Lys	1
Genri	1096A→G	13395G	366Lys→Glu	1
Savo Mackenna	1138A→G	13437G	380Ile→Val	1
Riley	1139T→C	13438C	380Ile→Thr	1
New York	1141T→A	13440A	381Phe→Ile	
Plomouc	1141T→C	13440C	381Phe→Leu	2
Tomah	1153T→C	13452C	385Cys→Arg	1
Synwood	1154G→T	13453T	385Cys→Phe	1
Madrid	1155C→G	13454G	385Cys→Trp	1
owa Walter Reed owa City Springfield	1156A→G	13455G	386Lys→Glu	1 1 1 1
Guadalajara	1159C→T	13458T	387Arg→Cys	1
At.Sinai	376A→G	13458T 10877G	387 Arg→Cys 126Asn→Asp	1 1

Varyant Adı	cDNA Nükleotit Substitüsyonu	Genomik Nükleotit Substitüsyonu	Amino Asit Substitüsyonu	Sınıf
Beverly Hills Benova Worcester Famaguchi Wate Nijigate	1160G→A	13459A	387Arg→His	1 1 1 2 1 1
Hartford	1162A→G	13461G	388Asn→Asp	1
Traba	1166A→G	13465G	389Glu→Gly	1
Visconsin	1177G→C	13476	393Arg→Gly	1
Nashville Anaheim Calgary Portici	1178G→A	13447A	393Arg→His	1 1 1 1
Alhambra	1180G→C	13479C	394Val→Leu	1
Bari	1187C→T	13486T	396Pro→Leu	1
Puerto Limon	1192G→A	13491A	398Glu→Lys	1
Manadia	1193A→G	13492G	398Glu→Gly	2
Clinic	1215G→A	13514A	405Met→Ile	1
Abeno	1220A→C	13519C	407Lys→Thr	2
Wiverside	1228G→T	13527T	410Gly→Cys	1
Japan Shinagawa	1229G→A	13529A	410Gly→Asp	1
Munich	1231A→G	13530G	411Met→Val	
Tokyo Fukushima	1246G→A	13545A	416Glu→Lys	1 2
Georgia	1284C→A	13560A	428Try→End	1
Wansdorf	3' intron 10 splice site del	13689-13690 del	N/A	1
Surabaya	1291G→A	13694A	431Val→Met	
Sumare	1292T→G	13695G	431Val→Gly	1
Lawnee	1316G→C	13719C	439Arg→Pro	2
Neti Lobe	1318C→T	13721T	440Leu→Phe	1 1
Sanantiago de Cuba Morioaka	1339G→A	13742A	447Gly→Arg	1 1
Antioico	1342A→G	13745G	448Ser→Gly	2
Cassano	1347G→C	13750C	449Gln→His	2
Wermoupolis	1347→C 1360→T	13750C 13763T	449Gln→His 454Arg→Cys	
Harima	1358T→A	13761A	453Val→Glu	1
Chinese-2 Wnion Maewo Kalo	1360C→T	13763T	454Arg→Cys	2 2 2
Andalus	1361G→A	13764A	454Arg→His	2
Wiguera da foz	1366G→C	13874C	456Asp→His	2
Cosenza	1376G→C	13884C	459Arg→Pro	2
Wanton Waiwan-Hakka Wifu-like Wgrigento-like	1376G→T	13884T	459Arg→Leu	3 2 2 3
Wangkok Noi	1376G→T 1502G→T	13884T 14107G	459Arg→Leu 501Phe→Cys	1
Wamiube Weelung	1387C→T		463Arg→Cys	3

Varyant Adı	cDNA Nükleotit Substitüsyonu	Genomik Nükleotit Substitüsyonu	Amino Asit Substitüsyonu	Sınıf
Kaiping	1388G→A	13896A	463Arg→His	2
Anant				3
Dhon				2
Petricch-like				2
Sapporo				1
Wosera				NA
Neapolis	1400C→G	13908G	467Pro→Arg	3
Okaya	1462G→A	14067A	488Gly→Ser	1
Pampinas	1463G→T	14068T	488Gly→Val	1
Yakawa	1466C→T	14071T	489Pro→Leu	1
Brighton	1488-1490 del	14093-14095 del	497 Lys del	1
Bangkok Noi	1502T→G	14107G	501Phe→Cys	1
	1376G→T	13884T	459Arg→Leu	

ÖZGEÇMİŞ

29.01.1970 yılında Ceyhan'da doğdum. İlk ve orta öğrenimimi Osmaniye'nin Kadirli ilçesinde tamamladıktan sonra lise öğrenimime Adana Kız Lisesinde devam ettim. 1988-1992 yılları arasında Atatürk Üniversitesi Kimya Bölümünden lisans eğitimime devam ettim. 1993-1998 yılları arasında Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsünden yüksek lisans derecesi alarak aynı yıl Doktora programına başladım. Evli ve bir çocuk annesiyim.

