

70366

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

ANTAKYA, KAYSERİ ve İZMİR
ÖRNEKLERİNDE β TALASEMİ
MUTASYON TIPLERİNİN SAPTANMASI

Dr. KENAN TOPAL

DOKTORA TEZİ

DANIŞMANI

Doç.Dr. ABDULLAH ARPACI

Bu tez Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
SBE 96.D.11 no'lu proje olarak desteklenmiştir.


ADANA 1998

Kabul ve onay sayfası


Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya Anabilim Dalı Doktora/ Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan Antakya, Kayseri ve İznir Örneklerinde β Talasemi Mutasyon Tiplerinin Saptanması adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora/ Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 26./02.../1998


Prof. Dr. Levent Kayrın
Ç.Ü. Tıp Fakültesi
Jüri Başkanı


Doç. Dr. Necip İlhan
F.Ü. Tıp Fakültesi


Doç. Dr. Abdullah Arpacı
Ç.Ü. Tıp Fakültesi

Yukarıdaki tez, Yönetim Kurulunun ...01-04-1998 tarih ve ...11/6-2. sayılı kararı ile kabul edilmiştir.


Enstitüsü Müdürü
Prof. Dr. Kadri ÖZCAN

ÖNSÖZ

Kalıtsal Kan Hastalıkları Dünya Talasemi Kuşağı üzerinde bulunan ülkemizin çeşitli bölgelerinde yaygın olarak bulunmaktadır. β talasemilerin yüksek bir sıklıkta görüldüğü Çukurova bölgesinde Ç.Ü. Tıp Fakültesi bünyesinde yapılan çalışmalarla hastalığın bir halk sağlığı sorunu olduğu ortaya konmuştur. Bu konudaki çalışmalara öncülük eden; hem Biyokimya eğitimime başlamamda hem de Talasemiler konusundaki çalışmalarımda beni yüreklendiren, destekleyen sayın hocam Prof. Güneş Yüregir'e sonsuz minnet ve şükranlarımı sunuyorum.

Biyokimya eğitimine başladığım 1994 yılından beri heran yanımda olan, çalışmalarımın başarıyla sonuçlanmasını sağlayan danışman hocam sayın Doç.Dr. Abdullah Arpacı'ya teşekkür ediyorum. Biyokimya Doktora eğitimim sürecinde her konuda en iyi şekilde yetişmemi sağlayan sayın hocalarım Prof.Dr. Kıymet Aksoy, Prof.Dr. Levent Kayrın ve Prof.Dr. Nurten Dikmen'e teşekkür ediyorum. Ayrıca çalışmalarım sırasında katkılarını esirgemeyen bütün öğretim üyelerine, çalışma arkadaşlarıma ve bölüm çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim. Tez çalışmamı SBE 96.D.11 no'lu proje ile destekleyen Ç.Ü. Araştırma Fonu'na teşekkür ederim.

Sevgili abeyimi, babamı ve annemi rahmetle anıyor bütün aileme teşekkür ediyorum. Sabır ve desteği için sevgili eşime şükranlarımı sunuyorum.

Dr. Kenan TOPAL

Adana 1998

İÇİNDEKİLER

KABUL ve ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL DİZİNİ.	vi
TABLO DİZİNİ.	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.	viii
ÖZET.	ix
ABSTRACT.	x

1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1.GİRİŞ	3
2.2.HEMOGLOBİN'İN YAPISAL ÖZELLİKLERİ.	3
2.3.TALASEMİLERİN MOLEKÜLER TEMELİ	5
2.3.1.GENLERİN EKSPRESYONU	5
2.3.1.1.Transkripsiyon	5
2.3.1.2.mRNA Processing	6
2.3.1.3.mRNA Dayanıklılığı	6
2.3.1.4.Translasyon	6
2.3.2.GLOBİN GEN KÜMELERİ.	6
2.3.3.ERİTROPOEZ	9
2.3.4.β GLOBİN GENİ.	10
2.4.β TALASEMİLERDE PATOFİZYOLOJİ.	12
2.5.β TALASEMİLERDE KLİNİK	12
2.5.1.HETEROZİGOT β TALASEMİ FENOTİPİ.	12
2.5.2.HOMOZİGOT β TALASEMİ FENOTİPİ.	13
2.5.2.1.β Talasemi Major fenotipi.	13
2.5.2.2.β Talasemi İntermediya fenotipi.	13
2.5.2.2.1.Orta Düzeyli β Talasemi Alelleri	14
2.5.2.2.2.Birlikte Bulunan α Talasemi.	15
2.5.2.2.3.Birlikte Bulunan δβ Talasemi ve HPFH Sendromu.	15
2.6.β TALASEMİYE NEDEN OLAN MUTASYONLAR.	15
2.6.1.TRANSKRİPSİYONEL MUTASYONLAR	15
2.6.2.RNA İŞLENMESİ İLE İLGİLİ MUTASYONLAR.	16

2.6.2.1.Splice Kavşağındaki Mutasyonlar.16
2.6.2.2.Consensus Dizi Değişikliklerine Neden Olan Mutasyonlar.16
2.6.2.3.İntronlardaki Değişiklikler.16
2.6.2.4.Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar17
2.6.3.RNA TRANSLASYON MUTASYONLARI18
2.6.3.1.Anlamsız Mutasyonlar18
2.6.3.2.Çerçeve Kayması Mutasyonları18
2.6.4.RNA AYRILMASI VE POLİADENİLASYON'LA İLGİLİ MUTASYONLAR.18
2.6.5.BAŞLIK BÖLGESİ MUTASYONU19
2.6.6. 3'TRANSLASYONU YAPILMAYAN BÖLGEDEKİ MUTASYON.19
2.6.7.BAŞLANGIÇ KODONU MUTASYONLARI.19
2.6.8.DELESYONEL MUTASYONLAR19
3.GEREÇ ve YÖNTEMLER24
3.1.GEREÇLER24
3.1.1.KULLANILAN ALETLER24
3.1.2.KULLANILAN KİMYASAL MADDELER25
3.2.ÖRNEKLER.25
3.2.1.ANTAKYA DEVLET HASTANESİ ÖRNEKLERİ25
3.2.2.ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ÖRNEKLERİ.26
3.2.3.EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ÖRNEKLERİ.26
3.3.YÖNTEMLER26
3.3.1.HEMATOLOJİK TETKİKLER26
3.3.2.TAM KANDAN DNA İZOLASYONU27
3.3.2.1.Prensip27
3.3.2.2.Çözeltiler.27
3.3.2.3.Yöntem.28
3.3.3.POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE BELİRLİ GEN BÖLGELERİNİN ÇOĞALTILMASI29
3.3.4.ARMS YÖNTEMIYLE β GLOBİN GEN BOZUKLUKLARININ SAPTANMASI.31
3.3.4.1.Prensip31
3.3.4.2.Çözeltiler.31
3.3.4.3.Yöntem.32
3.3.4.3.1.Amplifikasyon Protokolü32
3.3.4.3.2.ARMS Yönteminde Kullanılan Primerler.32

3.3.4.3.3.Termal Döngü Protokolü.34
3.3.5.AGAROS JEL ELEKTROFOREZİ.	34
3.3.5.1.Prensip	34
3.3.5.2.Çözeltiler.	34
3.3.5.3.Yöntem.	35
3.3.6. DNA DİZİ ANALİZİ37
3.3.7. DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİYLE β GLOBİN GENİNİN BAZ DİZİLİMİNİN BELİRLENMESİ37
3.3.7.1.Prensip.	37
3.3.7.2.Tek zincir DNA (ssDNA) amplifikasyonu	38
3.3.7.2.1.ssDNA Amplifikasyon Protokolü.40
3.3.7.2.2.Termal Döngü Protokolü40
3.3.7.4.Dideoksi Terminasyon Reaksiyonuyla Baz diziliminin belirlenmesi, Sekans reaksiyonu	41
3.3.7.4.1.Primer bağlanma basamağı.	41
3.3.7.4.2.İşaretleme Reaksiyonu	42
3.3.7.4.3.Sonlandırma Reaksiyonu42
3.3.7.5. Poliakrilamid-üre Jel Elektroforezi (PAGE).44
3.3.7.5.1.Jel hazırlanması44
3.3.7.5.2.Jel Elektroforezi.45
3.3.7.5.3.Tespit (Fixing).46
3.3.7.5.4.Kurutma ve Otoradyogram.46
3.3.7.5.5.Değerlendirme.47
4.BULGULAR48
4.1.ANTAKYA ÖRNEKLERİ.48
4.2.KAYSERİ ÖRNEKLERİ.51
4.3.İZMİR ÖRNEKLERİ.53
5.TARTIŞMA ve SONUÇ.63
KAYNAKLAR.75

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Talasemilerin ve Malaryanın coğrafik dağılım haritası.2
Şekil 2: Hemoglobin A (HbA) molekülü.4
Şekil 3: Ökaryotik mRNA işlemlenmesinin şematik görünümü7
Şekil 4. Globin gen kümeleri.8
Şekil 5: Yaşamın farklı evrelerinde üretilen globin zincirleri.9
Şekil 6. Yaşamın farklı evrelerinde oluşan hemoglobin çeşitleri.10
Şekil 7. β globin geni. Promotor bölge, splice kavşakları ve 3' UTR'deki poliadenilasyon dizilerinin yerleri işaretlenmiştir.11
Şekil 8. β globin gen kümesinin Locus Kontrol Bölgesi11
Şekil 9: RNA Translasyon mutasyonlarından ikisinin şematik özeti. β^0 talasemiyle sonuçlanan Nonsense mutasyon Cd 39 (C→T) ve Frameshift mutasyon Cd 44 (-C).18
Şekil 10: PCR yöntemiyle gen amplifikasyonunun şematik özeti.30
Şekil 11: β IVS1-110 Mutant ve Normal bantlarının elektroforez sonrası jel üzerindeki görüntüsü. 3,4 ve 6 no'lu örnekler (-), 1,2 ve 5 no'lu örnekler IVS1-110 Mutant (+), 7 (-) Kontrol (A/A), 8 (+) Kontrol (IVS1-110/IVS1-110). 9,10,11,12 ve 14 IVS1-110 Normal (+); 13 no'lu örneğin IVS1-110 Normal bandı yok (-). 15 (-) Kontrol (IVS1-110/IVS1-110), 16 (+) Kontrol (A/A)35
Şekil 12: İnsan β globin geni baz dizileri36
Şekil 13: β IVS1-110 Mutant ve Normal ARMS primerleriyle genel primer 1'in (30) β geni üzerinde gösterilmesi.37
Şekil 14: DNA dizi analizindeki basamakların şematik görünümü.43
Şekil 15: Poliakrilamid jel elektroforezinin şematik görünümü.46
Şekil 16: Otoradyografi ve baz dizisinin değerlendirilmesi.47
Şekil 17: IVS1-110 mutant primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. 1. kuyu negatif (-), 2, 3, 4, 5, 6. kuyular pozitif (+) örnekler; 8. kuyu (-) Kontrol, 9. kuyu (+) Kontrol.59
Şekil 18: IVS1-6 mutant primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. 1. ve 13. kuyu (+), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14. kuyular (-) örnekler; 15. kuyu (-) Kontrol, 16. Kuyu (+) Kontrol60
Şekil 19: Cd 8 mutant primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. 2, 3, 4, ve 5. kuyu (+), 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13. kuyular (-) örnekler; 14. kuyuda amplifikasyon yok, 15. kuyu (-) Kontrol, 16. kuyu (+) Kontrol.60
Şekil 20: IVS2-1 mutant primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. 5. kuyu (+), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9. kuyular (-) örnekler; 10. kuyu (-) Kontrol, 11. kuyu (+) Kontrol.61
Şekil 21: IVS2-745 mutant primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. 4 ve 5. kuyu (+), 1, 2, 3, 5, 7, 8. kuyular (-) örnekler; 9. kuyu (-) Kontrol, 10. kuyu (+) Kontrol.61
Şekil 22: İzmir'den gelen B. ailesinde prenatal tanı: IVS1-110 mutant ve normal primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. Üst bölüm, IVS1-110 (m) 1 (H.B.), 2 (E.B.), 3 (Ş.B.), 4 (CVS ₁ B.), ve 5. (CVS ₂ B.) kuyu (+), 6. kuyu (-) Kontrol, 7. kuyu (+) Kontrol. Alt bölüm, IVS1-110 (n) 1 (H.B.), 2 (E.B.), 3 (Ş.B.) kuyu (+), 4 (CVS ₁ B.), ve 5. (CVS ₂ B.) (-); 6. kuyu (-) Kontrol, 7. kuyu (+) Kontrol.62
Şekil 23: β geni 1. bölgenin sekans resmi. 108 ve 109 no'lu primerlerle ssDNA halinde PCR'la amplifiye edilen örneklerin 410 no'lu sekans primeri ile baz dizisi belirlenmiştir. 1. örnek -28 (A→G) mutasyonunu bir kromozomunda taşımakta, 3. örnek -30 (T→A) mutasyonunu her iki kromozomunda taşımakta (okla işaretli), 2. örnek ise normal kromozoma sahiptir.62

TABLO DİZİNİ

Tablo I. Transkripsiyonel Mutasyonlar.	20
Tablo II. RNA İşlemlenmesi ile ilgili Mutasyonlar.	20
Tablo III. RNA Translasyon Mutasyonları.	21
Tablo IV. RNA Ayrılması ve Poliadenilasyon ile ilgili mutasyonlar.	23
Tablo V. Başlık Bölgesi (Cap site) Mutasyonu	23
Tablo VI. 3' Translasyonu Yapılmayan Bölgedeki Mutasyon.	23
Tablo VII. Başlangıç Kodonu mutasyonları	23
Tablo VIII: ARMS yönteminde kullanılan genel ve sabit primerler	32
Tablo IX: β talasemi mutasyonlarına özgün ARMS primerleri	33
Tablo X: Genel ve sabit primerlerle birlikte kullanılan ARMS primerleri.	33
Tablo XI: β globin geninin birinci kısmının amplifikasyon ve dizi analizi (sequencing) reaksiyonları için kullanılan primerleri.	38
Tablo XII: β globin geninin ikinci kısmının amplifikasyon ve dizi analizi (sequencing) reaksiyonları için kullanılan primerleri.	39
Tablo XIII: ssDNA amplifikasyonu için termal döngü protokolü	40
Tablo XIV: Antakya örneklerinin hematolojik verileri.	48
Tablo XV: Antakya örneklerinde Hemogloblin Elektroforezi sonuçları	48
Tablo XVI: β -talasemi şüphesi olan örneklerin hematolojik verileri	49
Tablo XVII: Antakya örneklerinden elde edilen DNA'ların konsantrasyon ve verimleri	49
Tablo XVIII: Antakya örneklerinde saptanan mutasyon tipleri.	50
Tablo XIX: Kayseriden gönderilen β -talasemili hasta ve yakınlarına ait örneklerin hematolojik verileri.	51
Tablo XX: Kayseri örneklerinde Hb Elektroforezi sonuçları.	51
Tablo XXI: Kayseri örneklerinde DNA konsantrasyon ve verimleri.	52
Tablo XXII: Kayseri örneklerinde saptanan mutasyon tipleri.	53
Tablo XXIII: İzmir örneklerinden elde edilen DNA'ların konsantrasyon ve verimleri.	54
Tablo XXIV: İzmir örneklerinde ARMS ve DNA Dizi Analizi yöntemleriyle saptanan mutasyon tipleri.	55
Tablo XXV: Prenatal tanı uygulanan ailelerde mutasyon tipleri.	56
Tablo XXVI: Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde çalışılan kromozomlarda saptanan β talasemi mutasyonları ve sıklıkları.	56
Tablo XXVII: Bütün olgularda heterozigot, homozigot ve çifte heterozigot olgu sayısı ve sıklıkları.	57
Tablo XXVIII: Heterozigot olgularla homozigot olguların hematolojik verilerinin karşılaştırılması.	57
Tablo XXIX: Heterozigot örneklerde mutasyon tiplerine göre hematolojik verilerin ORT \pm SD'si.	58
Tablo XXX: Heterozigot, homozigot ve çifte heterozigot olguların mutasyon tipleri ve görülme sıklıkları.	58
Tablo XXXI: Normal populasyonda hematolojik veriler.	65
Tablo XXXII: Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak görülen β talasemi mutasyon tiplerinin görülme sıklıkları.	68
Tablo XXXIII: Türkiye'de yapılan çeşitli çalışmalarda saptanan β talasemik kromozomların sayısı ve mutasyon tiplerinin görülme sıklıkları.	72

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

- α : Alfa
 β : Beta
 δ : Delta
 ϵ : Eta
 γ : Gama
 θ : Teta
 ψ : Pseudo
 ζ : Zeta
 $\delta\beta$ **Talasemi**: Delta-Beta talasemi
 $\gamma\delta\beta$ **Talasemi**: Gama- Delta-Beta talasemi
 β^0 : Beta zero, Beta sıfır
 β^+ : Beta plus, Beta artı
 $^G\gamma$: G gama
 $^A\gamma$: A gama
bç: Baz çifti
nt: Nükleotid
kb: Kilo baz, 1000 bç
DNA: Deoksiribo Nükleik Asit
gDNA: Genomik DNA
ssDNA: Single strand DNA, tek zincir DNA
RNA: Ribo Nükleik Asit
mRNA: Messenger RNA, elçi RNA
dNTP: Deoksi nükleotit trifosfat
ddNTP: Dideoksi nükleotit trifosfat
5' Cap site: 5 üssü başlık bölgesi
Ekson: Kodlanan gen bölgeleri
Cd: Codon, kodon, bir aminoasiti şifreleyen üçlü baz dizisi
İntron: Kodlanmayan gen bölgeleri
IVS: Intervening sequence, intron dizileri
3' UTR: 3' untranslated region, 3' translasyonu yapılmayan bölge
poly(A) signal: Polyadenilation signal, poliadenilasyon sinyali
HS: Hipersensyitive Site, Hipersensitif bölge
LCR: Locus Control Region, Lokus kontrol bölgesi
PCR: Polymerase Chain Reaction, polimeraz zincir reaksiyonu
ARMS: Amplificatory Refractory Mutation System
Sequencing: Sekans analizi, dizi analizi
PAGE: Poly acrylamide gel electrophoresis, poliakrilamid jel elektroforezi
CVS: Chorionic Villus Sampling, Koryonik villus örnekleme

ÖZET

ANTAKYA, KAYSERİ ve İZMİR ÖRNEKLERİNDE β TALASEMİ MUTASYON TİPLERİNİN SAPTANMASI

β Talasemiler Dünyada en yaygın görülen kalıtsal hastalıktır. Dünyada yaklaşık 150 milyon insanın β talasemik fenotipe sahip olduğu bilinmektedir. Çukurova bölgesi, Dünya Talasemi Kuşağı üzerinde bulunan Türkiye'nin güneyinde, Doğu Akdeniz kıyılarında yer almakta olup yapılan çalışmalarda bölgemizde β talasemi sıklığı %3.7 gibi yüksek oranda bulunmuştur.

Daha çok β geni üzerinde oluşan nokta mutasyonlarla ortaya çıkan bu hastalık için 140'ın üzerinde mutasyon tipi belirlenmiştir. Günümüzde halen kesin tedavisi bulunmayan bu hastalığın toplum sağlığını tehdit ettiği açıktır. Bu nedenle mutasyon tiplerinin belirlenerek bölgesel görülme sıklıklarının hesaplanması; β talasemili olguların tedavilerinin daha doğru düzenlenebilmesi, moleküler yöntemler kullanılarak Prenatal Tanı'nın konulduğu laboratuvarların hızlı ve düşük maliyetlerle çalışması ve ailelere verilen genetik danışmanlık hizmetlerinin daha etkili yürütülmesi açısından önemlidir.

Bu çalışmamızda Ç.Ü.Tıp Fakültesi ve Antakya Devlet Hastanesi tarafından ortaklaşa yürütülen evlilik öncesi talasemilerin taranmasına yönelik protokol kapsamında 33 heterozigot olgunun moleküler mutasyonları belirlenerek görülme sıklıkları saptandı. Çalışmamız sürerken Kayseri ve İzmir yöresinde bulunan Üniversite kliniklerinde fenotipleri belirlenerek gönderilen 50 β talasemi olgusunun genotipik tanıları saptandı. Ayrıca İzmir'den gelen iki ailede Prenatal Tanı uygulayarak bir sağlam ve bir de hasta fetus belirlendi. Moleküler mutasyonları saptamak için ağırlıklı olarak ARMS yöntemi kullanıldı. Üç olguda ise DNA Dizi Analizi yöntemi kullanılarak sonuca ulaşıldı.

Anahtar Sözcükler: β talasemi, mutasyon tipleri, ARMS, DNA Dizi Analizi, Prenatal Tanı.

ABSTRACT

DETERMINING β THALASSEMIA MUTATION TYPES OF SAMPLES FROM ANTAKYA, KAYSERİ and İZMİR

β Thalassemias are the most commonly inherited disorder in the World. It is known that about 150 million people have β thalassemia phenotype. Çukurova region is in south Turkey where is on World Thalassemia Belt at the coasts of east Mediterranean. Studies which have been done in this region showed that the incidence of β thalassemia is very high as 3.7%.

More than 140 mutation type defined for this disorder; mostly arise from point mutations on the human β globin gene. There is still no cure for this public health threatening problem. By the way characterization of mutation types and determining regional frequencies are important for clinicians to design treatment regimens, rapid and low costs in laboratories using molecular methods for prenatal diagnosis and effective genetic counseling of the families.

In this study we characterize mutation types of 33 heterozygote cases in the content of the project for premarital carrier screening of the thalassemias in collaboration with Çukurova University Medical Faculty and Antakya Public Hospital. We detected the genotypes of 50 β thalassemic cases whose phenotypes determined in the University clinics from Kayseri and İzmir region while our study was going on. We assessed a healthy and an affected fetus with Prenatal Diagnosis in two families came from İzmir. ARMS method was used for characterization of molecular mutation types, in three cases we obtained the results with DNA sequencing.

Key Words: β thalassemia, mutation types, ARMS, DNA Sequencing, Prenatal Diagnosis.

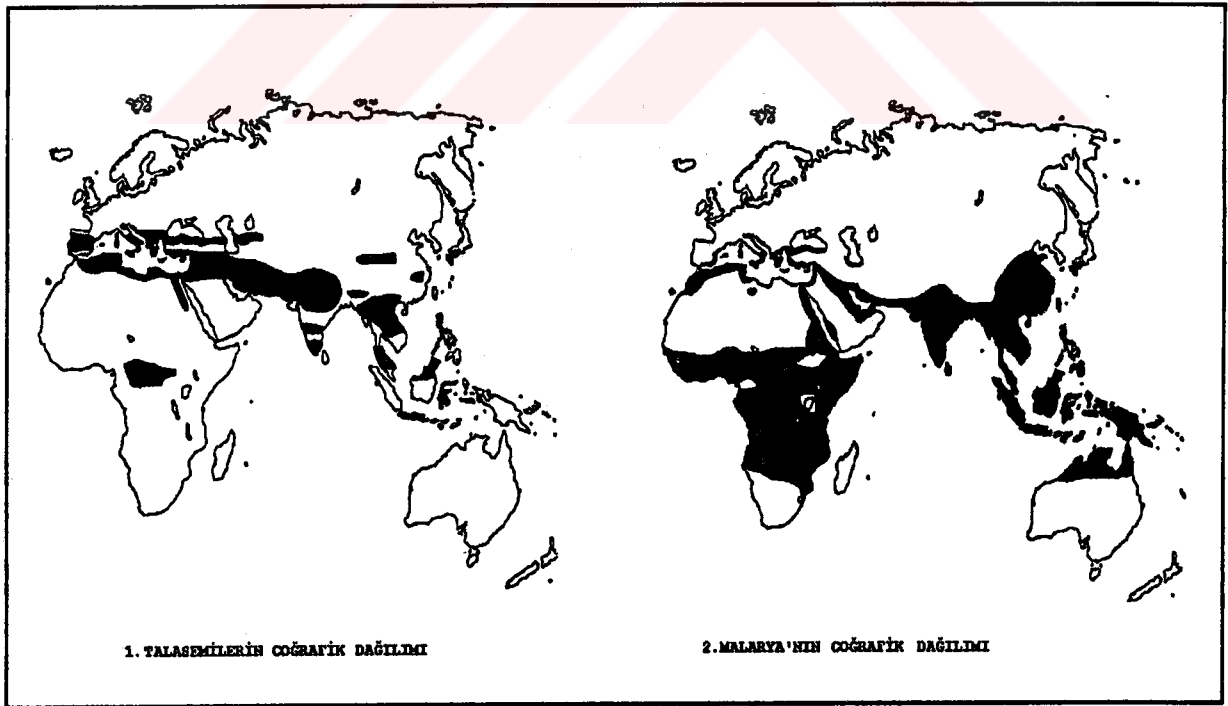
1.GİRİŞ ve AMAÇ

Talasemiler eritrositler içindeki hemoglobin molekülünün globin subünitelerinden birinin sentezinin yapılamaması ile karakterize kalıtsal kan hastalıklarıdır. İlk kez 1925 yılında şiddetli anemi, dalak büyüklüğü ve kemik deformiteleri ile seyreden bir sendrom olarak *Thomas COOLEY* tarafından İtalyan kökenli Amerikalı çocuklarda saptanmıştır. Ardından yapılan çalışmalarla klinik olarak yüksek çeşitlilik gösteren geniş bir anemi ailesinin karakterizasyonu yapılmıştır. ^(44,56)

Talasemi Dünya üzerindeki en yaygın genetik hastalık olarak kabul edilir. Akdeniz havzasından Ortadoğu, Hindistan, Burma ve Güneydoğu Asya'ya kadar uzanan ve Dünya Talasemi Kuşağı olarak adlandırılan geniş bir bölgede belirgin olarak yaygın bir sıklığa sahiptir. Talasemilerin görülme sıklığı açısından normal insan hemoglobini HbA'nın ($\alpha_2\beta_2$) tutulumuna göre α ve β talasemiler olarak iki büyük grubu vardır. α talasemik genler en yüksek yoğunlukta Güneydoğu Asya ve Afrikanın batı sahillerinden köken alan popülasyonlarda bulunur. Dünya popülasyonunun %3'ü, yaklaşık olarak 150 milyon insan ise β talasemi geni taşır. β talasemiler Akdeniz popülasyonlarında, Ortadoğu, Pakistan ve Hindistan'ın birçok bölümlerinde, Güneydoğu Asya'da, Rusya'nın güney bölgelerinde ve Çin'de geniş bir yayılıma sahiptir. Bu yüksek gen sıklığı heterozigot talasemi fenotipine sahip insanların Malarya'nın endemik olduğu bölgelerde diğerlerine göre şiddetli enfeksiyonundan korunma yönünde seçici bir avantaja sahip olmalarıyla açıklanır. β talasemilerin Afrika kıtasındaki yayılımı göreceli olarak daha azdır (Şekil 1). ^(37,47,61)

Türkiye de β talasemilerin yaygın olarak görüldüğü Dünya Talasemi Kuşağı üzerinde yer almaktadır. Doğu Akdeniz kıyılarında yer alan Çukurova Bölgesinde yapılan çalışmalarda β talasemi sıklığı %3.7 gibi yüksek oranda bulunmuştur. Yine son yıllarda yapılan çalışmalarda Ege bölgesinde, Bursa, Kayseri ve Trakya'da da Talasemi olgularının bulunduğu anlaşılmıştır. ^(5,19,20,59,88)

Bu çalışmada amacımız Ç.Ü.Tıp Fakültesi ve Antakya Devlet Hastanesi tarafından ortaklaşa yürütülen ve a. Taşıyıcıların saptanması b. Moleküler mutasyonların bulunması c. Genetik danışmanlık ve bilinçlendirme d. Prenatal tanı uygulanması kriterlerinin baz alındığı protokol kapsamında Antakya yöresinde evlilik öncesi yapılan testlerle β talasemi taşıyıcılık oranlarının tam olarak saptanması ve moleküler düzeyde yapılacak çalışmalarla da hastalığa neden olan β talasemi mutasyonlarının belirlenerek sıklıklarının saptanmasıdır. Aynı çalışma kapsamı içerisinde Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi kliniklerinden gelen işbirliği teklifi değerlendirilerek Kayseri ve İzmir yöresinde fenotipleri belirlenen β talasemi olgularının genotipik tanıları belirlenmiş ve sonuçlar karşılaştırılmıştır. (89)



Şekil 1. Talasemilerin ve Malaryanın coğrafik dağılım haritası.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. GİRİŞ

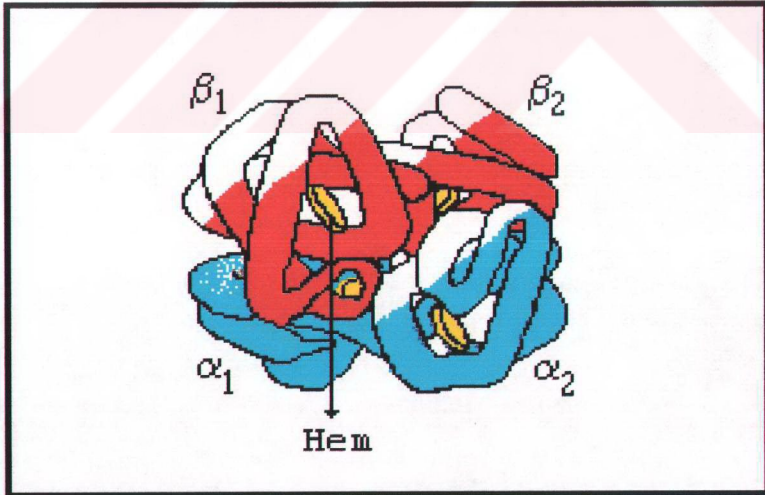
Talasemiler günümüzde halen kesin tedavisi bulunmayan normal insan hemoglobininin polipeptid zincirlerinden birinde veya daha fazlasında sentez bozukluğu ile ortaya çıkan otozomal resesif geçişli mikrositik hemolitik anemilerdir. Hastalığın moleküler düzeydeki temel mekanizmalarının belirlenemediği ilk dönemlerde sınıflandırma klinik şiddete göre yapılmıştır. Buna göre major klinik görünümüne sahip ve şiddetli anemisi olan ilk grup Talasemi Major ya da Cooley Anemisi; orta düzeyde bir anemisi olan, düzenli kan transfüzyonuna gereksinim duymayan ve transfüzyon yapılmadığı halde çoğu zaman hemoglobin düzeyleri 5 mg/dl'nin altına düşmeyen ikinci grup Talasemi İntermediya olarak adlandırılmıştır. Talaseminin kalıtsal karakterinin tanımlanmasının ardından Talasemi Major'lu çocukların anne-babasinda morfolojik olarak anormal eritrositlere rağmen çok küçük oranda bir aneminin olması veya hiç olmaması haline Talasemi Minör tanımlaması getirilmiştir. (20,24,25)

Moleküler düzeyde yapılan çalışmaların sonunda artık talasemik fenotiplere neden olan genotipik özelliklere göre yapılan sınıflandırmalar daha öne çıkmış ve yapım bozukluğu olan globin zincir çeşidine göre tanımlanmaya başlanmıştır. Buna göre moleküler düzeyde en iyi tanımlanan hastalıklar: α , β , $\delta\beta$, δ ve $\gamma\delta\beta$ Talasemilerdir. Bunlara yakın bir grup hastalık ise β globin eksikliğinin yükselmiş γ globin üretimiyle tamamen karşılandığı HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin) sendromudur. (29,62,81,82)

2.2. HEMOGLOBİN'İN YAPISAL ÖZELLİKLERİ

İnsan hemoglobini globin ve demir protoporfirin kompleksinden oluşan hem'in oluşturduğu konjuge bir proteindir. Tetramer yapısındadır, molekül ağırlığı 64500 dalton'dur. İki çift özdeş olmayan polipeptid zinciri ve dört molekül hem'den oluşur. Hemoglobin tetramerini oluşturan globin polipeptid zincirleri özgül aminoasitlerden oluşur. Bu aminoasitlerin

doğru dizilim ve kompozisyonları birincil yapıya karşılık gelir. İkincil yapı ise aralarında oluşan hidrojen bağlarıyla aminoasitlerin heliksler şeklinde organize olmasıyla tanımlanır. Üçüncül ya da tersiyer yapı polipeptid zincirlerin katlanarak üç boyutlu hücrenel bir forma ulaşmasıyla ortaya çıkar. En sonunda dört polipeptid zincirinin birleşerek oluşturduğu tek bir moleküle dördüncül ya da kuarterner yapı denir. Kısaca hemoglobin molekülü dört adet polipeptid zinciri içine dört adet hem molekülü oturtulmuş globüler yapıda bir proteindir. Dizilim ve konum yönünden birbirlerine benzeyen α ve β globin zincirleri kompakt biçimde katlanmış ve birbirine sıkıca uyan iki çift halinde iyonik ve hidrojen bağlarıyla hidrofobik etkileşim yoluyla birbirlerine tutturulmuşlardır. Bu kompleks yapıda hem grubu bütün insan hemoglobin fenotiplerinde özdeştir ve yoğun bir hidrofobik ortam sağlayan hem cepleri içine yerleştirilmişlerdir. Bu şekilde Oksijenin (O_2) kanda taşınması O_2 'nin hemoglobinle reversible kombinasyonlar yapması ile başlarılır (Şekil 2).^(48,84,85,91)



Şekil 2: Hemoglobin A (HbA) molekülü.

2.3. TALASEMİLERİN MOLEKÜLER TEMELİ

Talasemilerin moleküler düzeyde patolojilerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan restriksiyon enzim çalışmaları, genetik klonlama ve DNA dizi analizi yöntemleri aynı zamanda ökaryot hücrelerde gen işlevinin aydınlatılması yolunda da büyük katkılar sağlamıştır. Özellikle 1988'de Saiki ve Mullis tarafından tanımlanan Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR=Polimerase Chain Reaction) β genindeki bozuklukların moleküler düzeyde belirlenmesinde tam bir sıçramaya neden olmuştur. (21,26,27,51,58,70,73)

2.3.1.GENLERİN EKSPRESYONU

Bir gen işlevsel bir ürünün yapımından sorumlu DNA parçası olarak tanımlanır. Bu ürün işlevsel bir polipeptid veya işlevsel bir RNA olabilir. Ökaryot hücre genlerinde aminoasitleri kodlayan nükleotid dizileri (ekson) yanında kodlanmayan bölgeler (intron) de bulunur. Genlerin 5' ön kısmında kodlanmayan ancak transkripsiyonun regulasyonunu kontrol eden nükleotid (nt) dizilerinin bulunduğu bir promotor yöre ve 3' son kısmında poliadenilasyon sinyalini veren dizilerin bulunduğu 3'UTR (3' untranslated region, 3' translasyonu yapılmayan bölge) bölgesi bulunur. Bir gen'den işlevsel bir ürün olan polipeptid zincirinin oluşmasını sağlayan süreç Gen Ekspresyonu olarak tanımlanır ve dört aşaması vardır. (48,84,87,91)

2.3.1.1.Transkripsiyon: DNA'daki nt dizileri şablon olarak kullanılarak birebir mRNA'ya kopyalanmasına transkripsiyon denilir. mRNA sentezi 5'→3' yönünde gerçekleşir. mRNA'da Timin nt'i yerine Urasil nt'i bulunur. Transkripsiyonun regulasyonu genlerin 5' başlık bölgesinin (5' Cap site) önünde bulunan 'promotor' bölge tarafından kontrol edilir. Bu bölge RNA polimeraz'ın bağlanarak, mRNA sentezinin başlangıç sinyalini verildiği özel sıralı diziler (consensus sequence) içerir. Bu diziler mRNA transkripsiyonunun hangi sıklık ve miktarda gerçekleşeceğini belirler. Transkripsiyonu yapılan başlangıç ve sonlanma sinyallerini içeren bölgeye 'transkripsiyon ünitesi'

veya operon adı verilir. Gen transkripsiyonu 5' Cap bölgesinden (+1) başlar, aminoasitleri kodlayan ekson bölgeleri, kodlanmayan intron bölgeleri üzerinden poly(A) sinyalini içeren 3'UTR bölgesiyle sonlanır. 5' Cap bölgesi 7-Metilganozin içerir ve protein sentezinin başlatılmasında görev alır. mRNA'nın 3' ucu bir endonükleaz tarafından koparılır ve bir poly(A) polimeraz tarafından poliadenilasyon gerçekleştirilir. (49,84,92)

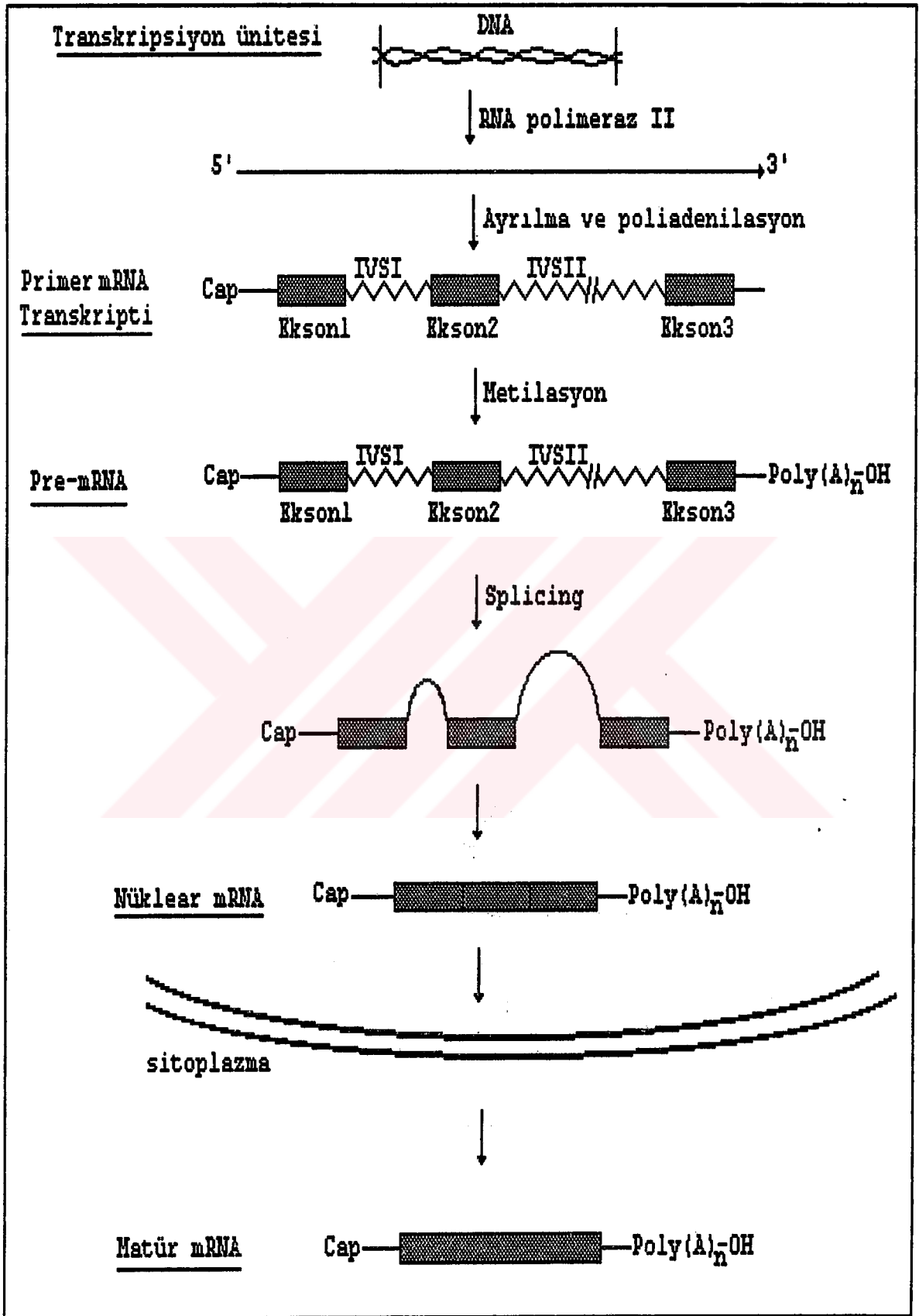
2.3.1.2.mRNA processing: Transkripsiyon sonrası oluşturulan bu prekürsör mRNA intronlardan 'splicing' denilen bir işlemle arıtılır. İtronların 5' başlangıcında ve 3' son kısmında bulunan korunmuş diziler GT ve AG dinükleotidleri (donör ve akseptör bölgeler) bulunur. (44,92)

2.3.1.3.mRNA dayanıklılığı: 5' ön kısmında 7-Metil guanilat'la başlıklanmış, splicing ile intronlarından arıtılmış ve 3' son kısmına Poly(A) kuyruğu takılmış RNA'ya olgun (matür) mRNA denilir ve hücre çekirdeği içinden sitoplazmaya salındığında kararlı yapısı bozulmaz (Şekil 3). (21)

2.3.1.4.Translasyon: mRNA'daki şifreye göre aminoasit dizilimlerinin belirlenerek protein sentezinin yapılmasına translasyon denilir. Protein sentezi aktive edici enzimler, aminoasitler ve tRNA'ların varlığında sitoplazmada poliribozomlar üzerinde yapılır. (84)

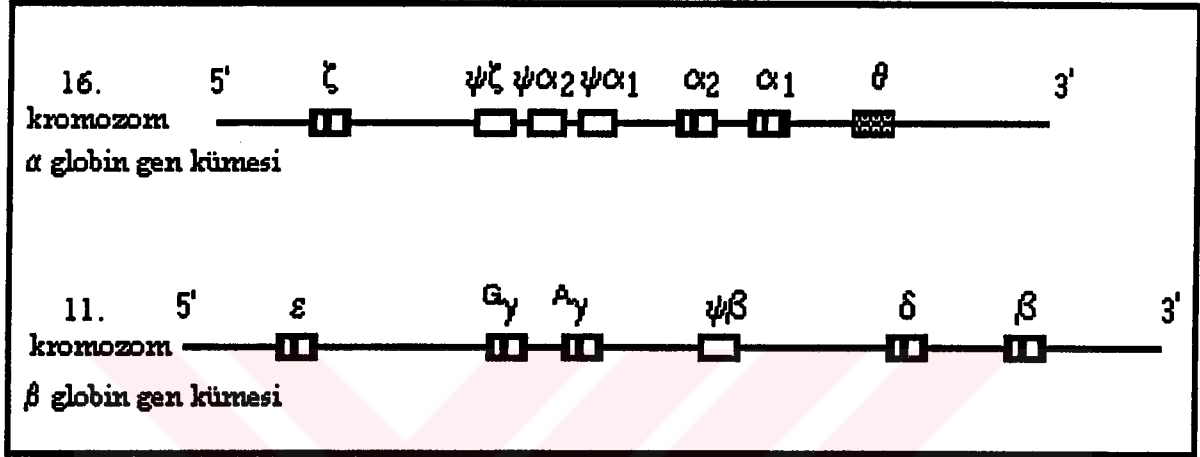
2.3.2. GLOBİN GEN KÜMELERİ

Globin genleri otozomal kromozomlarda gen kümeleri halinde bulunurlar. α globin benzeri gen kümesi 16. kromozom'un kısa kolunda 5'- ζ , $\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$, α_2 , α_1 , θ -3' şeklinde sıralanır. β globin benzeri gen kümesi 11. kromozom'un kısa kolunda 5'→3' yönünde yerleşmiş embriyonik ϵ globin geni, fetal $\zeta\gamma$ ve $\lambda\gamma$ genleri, işlevsiz bir gen olan $\psi\beta$ geni ve yetişkin δ ve β globin genlerinden oluşur. Pseudo (ψ) genler ekspresyonu yapılmayan işlevsiz genlerdir, bu genlerin promotor yörelerinde ekspresyonun kontrolünü sağlayan consensus dizilimleri anlaşılammıştır (Şekil 4). (15, 29, 37)



Şekil 3: Ökaryotik mRNA işlemlenmesinin şematik görünümü.

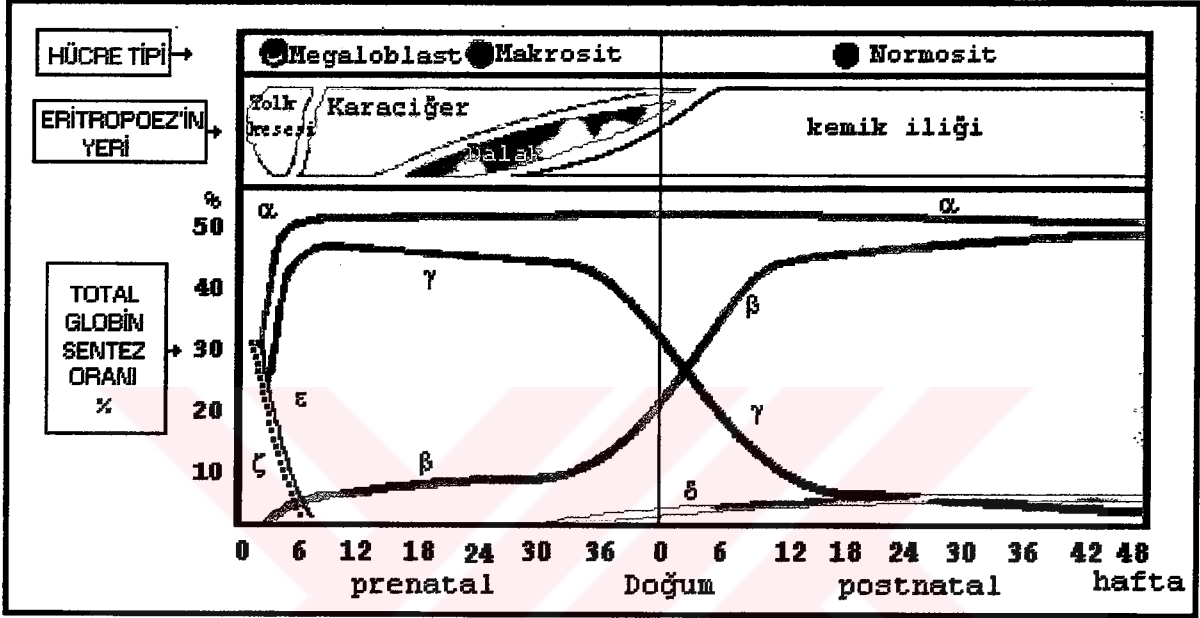
İnsan gelişiminin her bir aşamasında bu kümelerde bulunan farklı genler aktive olur veya baskılanırlar. Belli genler tarafından yönlendirilen globin zincirleri birbirlerinden bağımsız olarak sentezlenirler ve birbirleriyle kombinasyonlar oluştururlar. Normalde bu kombinasyonlar α benzeri gen kümesinin üyeleriyle β benzeri gen kümesinin üyeleri arasındadır. (15, 35, 37)



Şekil 4. Globin gen kümeleri.

Embriyonel dönemdeki en erken globin zincirleri ζ ve ϵ 'dir. Hb Gower 1 ($\zeta_2 \epsilon_2$) kombinasyonundan oluşur ve 5 haftadan küçük embriyolarda major hemoglobindir. Hb Gower 2 ise ($\alpha_2 \epsilon_2$) zincirlerinden oluşur ve en erken 4. haftadan itibaren görülür, 13. haftada tamamen kaybolur. Hb Portland 10 haftanın altında görülür ve $\zeta_2\gamma_2$ kombinasyonundan oluşur. ζ ve ϵ zincirlerinin sentezi α ve γ zincir sentezinin artmasıyla düşmeye başlar. HbF genç embriyolarda görülür, fötal yaşamda ana hemoglobindir. HbF'in iki farklı formu γ zincirlerinin 136. pozisyonunda Guanin içerenler HbF₁ ($\alpha_2 \gamma_2$) ve aynı pozisyonda Adenin içerenler HbF₂ ($\alpha_2 \gamma_2$) olarak tanımlanırlar. Fötal gelişim süresince ζ 'dan α 'ya ve ϵ 'dan γ 'ya dönüşüm olur. Sentez δ ve β ile devam eder. Erişkin yaşamdaki ana hemoglobin olan HbA ($\alpha_2 \beta_2$)'nin sentezi anne karnında en erken 9. haftadan itibaren görülmeye başlar, 34. haftadan itibaren HbF'in düşmeye başlamasıyla kandaki konsantrasyonu artar. Doğumdan sonraki 6.

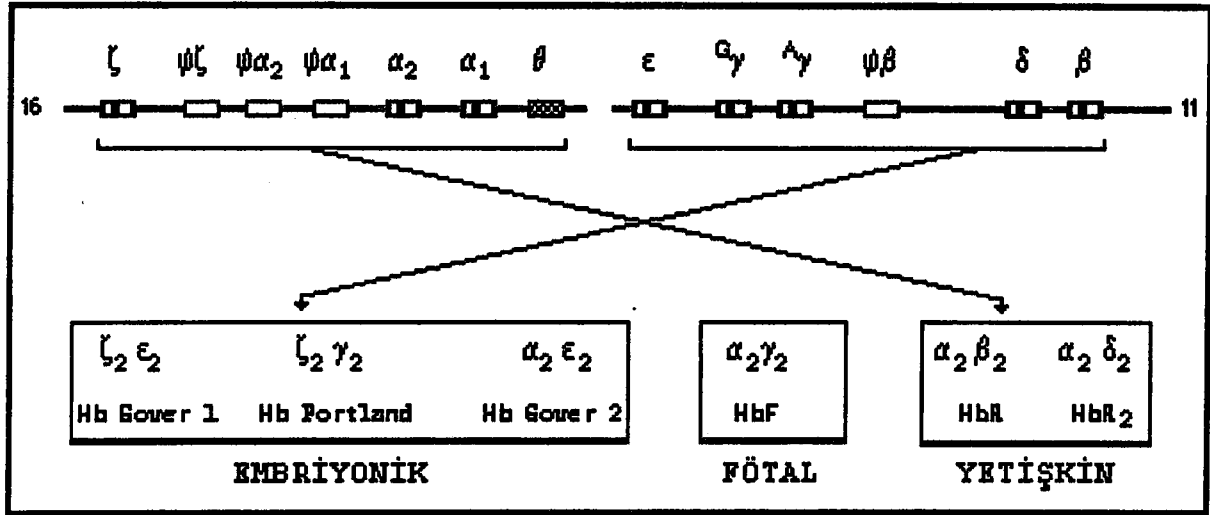
ayda HbF oranı %2-3'lere düşer. Bu aşamadan itibaren ana hemoglobin HbA'dır ve kandaki konsantrasyonu %97'dir. Minör hemoglobin olarak da bilinen HbA₂ ($\alpha_2 \delta_2$) ise 3. trimestırda yapılmaya başlar, doğumdan sonra artmaya devam ederek yaşamın 4. ve 5. aylarında erişkin düzeye (%2-3.6) çıkar (Şekil 5 ve Şekil 6)). (37,48,82,85)



Şekil 5: Yaşamın farklı evrelerinde üretilen globin zincirleri.

2.3.3. ERİTROPOEZ

Yetişkin bir kişide normal koşullarda globin zincir sentezi geç bazofilik eritroblast'ta başlar. Hücre çekirdeğinin atılmasının ardından olgun eritrosit'in kemik iliğinden periferal dolaşıma salınmasının öncesinde sentez yaklaşık olarak %95 oranında tamamlanır. Sentezlenen globin zincirleri bütünüyle stabil değildir. Fakat hızla hem molekülleri etrafında katlanarak dayanıklı hemoglobin tetramerlerini oluştururlar. Normal koşullarda bütün bu işlem her bir eritroid hücre için her bir globin zincirinin yaklaşık olarak 600 milyon kopyasının üretilmesiyle sonuçlanır ki buda 30 pikogramlık (pg) Mean Corpuscular Hemoglobin (MCH) değerine karşılık gelir. (44,91)

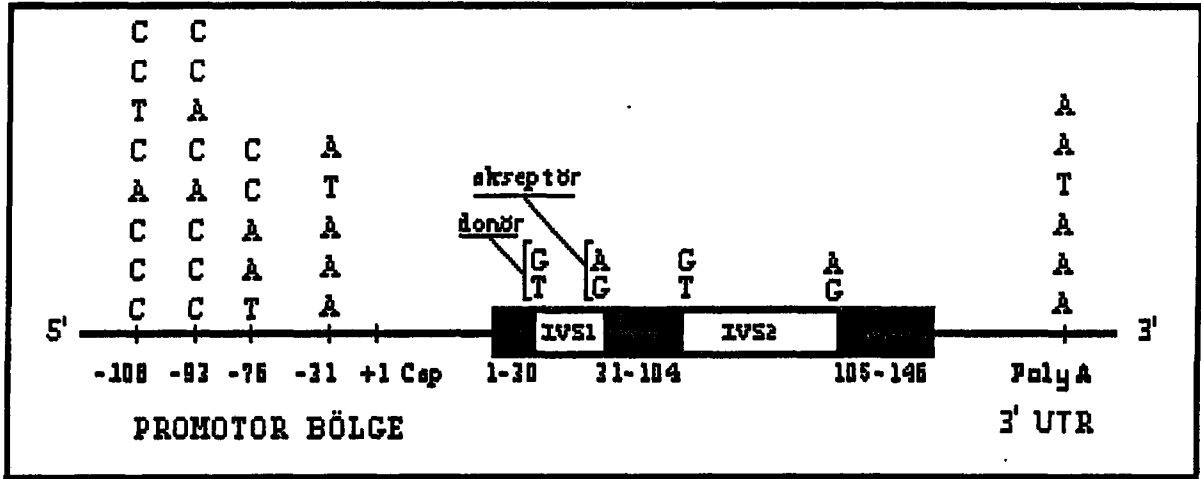


Şekil 6. Yaşamın farklı evrelerinde oluşan hemoglobin çeşitleri.

2.3.4. β GLOBİN GENİ

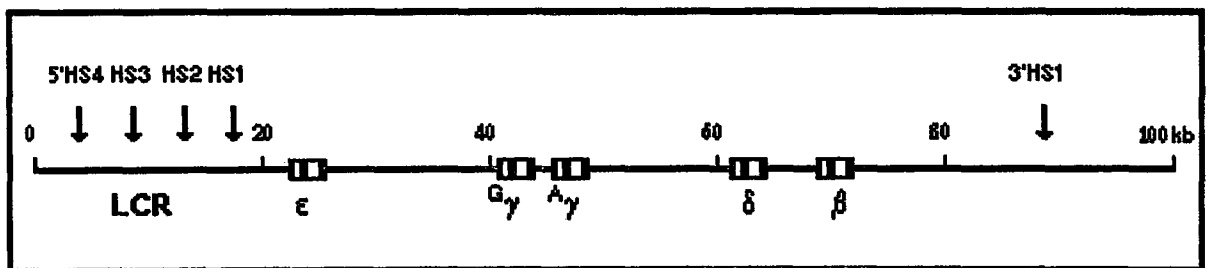
Her bir haploid genom için iki tane α globin geni bulunurken, sadece bir tane β globin geni bulunur. Yaklaşık olarak 2 kilo baz (kb) uzunluğunda bulunan β globin geninin ekspresyonunda rol oynayan promotor bölgeler 5' Cap bölgesine göre -108'de bulunan CCTCACCC, -93'te bulunan CCACACCC, -76'da CCAAT ve -31'de ATAAA konsensus dizilerini içerir. Bu diziler β globin geninin hangi sıklıkta ve ne kadar miktarda üretileceğini belirler. İçlerinde en önemlisi TATA kutusu olarak da bilinen -31'deki RNA polimeraz II'nin bağlandığı bölgedir. Bunun ardından +1'le başlayan 51 baz çift'lik (bç) transkribe olan ancak translasyonu yapılamayan 5' Cap bölgesi gelir. Ekson 1, üçlü nt dizilerinden oluşan 30 adet kodon içerir ve 1-30 no'lu aminoasitleri şifreler. İntron I, (IVS I = Intervening sequence I) 128 bç uzunluğundadır, 5' başlangıcında donör bölge olarak adlandırılan GT ve 3' son kısmında akseptör bölge olarak adlandırılan AG dinükleotidleri bulunur. Ekson 2, 31-104 no'lu aminoasitlerin kodonlarını içerir. Ardından 850 bç'lik aynı intron I'de olduğu gibi donör bölge ile başlayıp akseptör bölge ile biten intron II gelir. Ekson 3, 105-146 no'lu aminoasitlerin kodonlarını içerir. Zincir sonlandırma kodonundan sonra ise yaklaşık 200 bç

uzunluğunda, AATAAAA'den oluşan Poly A sinyali dizisini içeren 3' translasyonu yapılmayan bölge (3'UTR=3'Untranslated Region) bölge bulunur (Şekil 7). (47,48,50)



Şekil 7. β globin geni. Promotor bölge, splice kavşakları ve 3' UTR'deki poliadenilasyon dizilerinin yerleri işaretlenmiştir.

Bunlardan başka β globin geninin ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynayan uzak regülatuar elemanlar da tanımlanmıştır. Bunlar Lokus Kontrol Bölgesi (LCR=Locus Control Region) olarak adlandırılan ve ϵ geninin promotor bölgesine 6-18 kb uzaklıkta bulunan dört adet DNase I'e hassas 5' Hipersensitiv bölge (5'HS1, HS2, HS3, HS4) ile β geninin 3' sonlanma bölgesine 20 kb uzaklıktaki 3'HS1'den oluşur. Bu bölgelerin β globin gen kümesinin sıralı bir şekilde aktivasyonunda rol aldığı ve yine gen ekspresyonunu artırıcı özellikler taşıyan elemanlar (Enhancer elements) içerdiği düşünülmektedir. Bunlardan 5'HS2'nin eritroid ve transkripsiyonel faktörleri bağlayan çok sayıda korunmuş dizilere sahip olduğu gösterilmiştir (Şekil 8). (1,40,60,64,78)



Şekil 8. β globin gen kümesinin Lokus Kontrol Bölgesi.

2.4. β TALASEMİLERDE PATOFİZYOLOJİ

β -talasemiler β geninde oluşan mutasyonlar sonucunda mRNA miktarının azalması ve buna bağlı olarak normal yapısal globin sentezinin düşmesi veya hiç olmaması sonucu oluşur. β talasemilerin büyük çoğunluğu α talasemilerin tersine olarak daha çok gen delesyonlarıyla değil de gen regulasyonunu ve ekspresyonunu etkileyen nokta mutasyonlar nedeniyle oluşur.⁽¹⁵⁾

Homozigot durumda globin zincir sentezi çalışmalarlarıyla iki ana tipte β talasemi tanımlanmıştır. Birinci grubu hasarlı ya da miktarı az da olsa β zincirlerinin bulunduğu β^+ talasemiler; ikinci grubu ise β zincirinin hiç bulunmadığı β^0 talasemiler oluşturur. β^+ talasemili bireylerde retikülositlerdeki ve kemik iliği normoblastlarındaki β globin zincir miktarı 3 kattan 10 kata kadar azalmıştır. Homozigot β^0 talasemili hastalarda β globin zincir sentezi yoktur. Hastaların hemen hemen yarısında eritrosit prekürsörleri ve retikülositlerdeki β globin mRNA ya yoktur ya da çok azalmıştır. Diğer yarısında ise β globin mRNA miktarı azalmış fakat ölçülebilir düzeydedir. Hastalıkta anemiye neden olan üç farklı bileşen vardır. Bunlar ineffektif eritropoez, hemoliz ve eritrositlerin azalmış hemoglobinizasyonudur. İneffektif eritropoez ve hemoliz'in nedeni normal olarak sentezi devam eden α zincirlerin birleşebileceği yeterli β zinciri olmaması nedeniyle serbest α zincir miktarında artış ve buna bağlı olarak serbest α zincirlerinin hücre içinde çökmesiyle oluşan presipitatların eritrosit hücre zarına zarar vermesidir.^(19,53,56)

2.5. β TALASEMİLERDE KLİNİK

2.5.1. HETEROZİGOT β TALASEMİ FENOTİPİ

Sadece bir tane β talasemi geni taşıyan heterozigot bireyler klinik olarak iyidir, nadiren orta düzeyde anemileri vardır. β talasemi taşıyıcısı olarak tanımlanan bu kişilerdeki hematolojik parametreler ise şöyledir: Eritrosit sayısı (RBC) artmıştır, Ortalama Eritrosit Volumü (OEV=MCV) 60 ile 75

femtolitre (fl) arasında düşmüştür. Ortalama Eritrosit Hemoglobini (OEH=MCH) 20-25 pikogram (pg) arasında azalmıştır. HbA₂ konsantrasyonu %3.5-%7 arasında artmıştır. HbF düzeylerinde sınırlı bir artış (%1.5-8.0) söz konusudur. Periferik kan yaymasında orta düzeyde mikrositik ve hipokromik eritrositler görülür. β talasemi taşıyıcısı bireyler normal yaşam sürelerine sahiptirler.⁽⁶²⁾

2.5.2.HOMOZİGOT β TALASEMİLERİN FENOTİPİ

İki β talasemi kromozomu taşıyan bireyler sıklıkla homozigot olarak adlandırılırlar. Ancak β talasemilerin yüksek heterojenetisinden dolayı homozigot olarak adlandırılan olguların çoğu farklı β talasemi genleri için çifte heterozigottur. Homozigot olgulara akraba evliliğinin çok olduğu izole coğrafik bölgelerde sık rastlanır.^(44,53,59)

2.5.2.1. β talasemi major fenotipi

İki tane hasarlı β talasemi geni taşıyan kişiler genellikle şiddetli anemisi olan, transfüzyona bağımlı β talasemi major fenotipine sahiptirler. Bu olgularda klinik tanı yaşamın ilk yılında konulur, 3-4 haftada bir düzenli kan transfüzyonuna gereksinimleri vardır, vücuttaki demir fazlalığına bağlı olarak maksiller hiperplazi ve hepatosplenomegali gelişir. Genellikle 20-25 yaşında ağır anemiye bağlı gelişen komplikasyonlar sonucu ölürlür.^(20,30)

2.5.2.2. β talasemi intermediya fenotipi

Olguların bir kısmında iki tane hasarlı β talasemi geni bulunmasına rağmen orta düzeyde bir klinik seyir vardır ve klinikte Talasemi İntermedia tanısı alırlar. Bu türden intermediyer fenotiplerde sessiz taşıyıcılıktan transfüzyona bağımlı fenotiplere kadar değişebilen bir klinik heterojinite bulunur. Bu hastalarda tanı genellikle 2-5 yaşlar arasında veya daha geç dönemlerde konulur, göreceli olarak daha yüksek hemoglobin değerlerine sahiptirler, orta düzeyde kemik değişiklikleri oluşur, büyümeleri normaldir. Talasemi intermedia'da aneminin daha az şiddetli olması ortamda bulunan

serbest α zincirlerinin bazı genetik faktörler tarafından azaltılması ve α /non α globin zincir imbalansının daha az olmasıdır. Globin zincir imbalansını düşüren genetik faktörler orta düzeyde β talasemi alelleri, birlikte bulunan α talasemi ve birlikte bulunan $\delta\beta$ ve HPFH sendromu'dur. (24,25)

2.5.2.2.1. Orta düzeyli β talasemi alelleri

Bu gruptaki β talasemi mutasyonları sonucunda; hasarlı ya da miktarı az da olsa β globin zincir üretimi bulunur. Bu mutasyonlar için homozigot olan kişiler düzenli kan transfüzyonuna gereksinim göstermeyen orta düzeyli bir β talasemi fenotipine sahiptirler. Bu mutasyonlar için birleşik heterozigot olanlar ise talasemi intermedia'dan talasemi major'a kadar değişebilen şiddette farklı klinik tablolara sahip olabilirler. Bu mutasyonların ilk grubunu promotor bölgedeki nt değişiklikleriyle ortaya çıkan Transkripsiyonel Mutasyonlar oluşturur. Transkripsiyonu azaltarak β globin mRNA miktarında azalmaya neden olan bu mutasyonlardan -31 pozisyonunda A→G yer değiştirmesi Japonlarda, -30 T→A yer değiştirmesi Türkler ve Bulgarlarda, -29 A→G yer değiştirmesi Amerikalı zencilerde ve -28 A→G yer değiştirmesi Çinlilerde görülür. Promotor bölgede TATA kutusunda bulunan bu mutasyonların dışında proksimal ve distal consensus dizilerde oluşan mutasyonlarda homozigot durumda orta düzeyde seyirli bir klinik fenotiple sonuçlanırlar. İkinci grupta ise alternatif splice bölgelerini aktive eden mutasyonlar bulunur. Eksonlar içinde bulunan consensus dizilerin oluşturduğu kriptik bölgelerde denilen bu alternatif splice bölgelerini aktive eden mutasyonlar Kodon (Cd) 19 A→G (Hb_{MALAY};Asn→Ser) Cd 24 T→A, Cd 26 G→A (Hb_E;Glu→Lys) ve Cd 27 G→T (Hb_{KNOSSOS};Ala→Ser) olarak sayılabilir. Üçüncü grupta intronlar içinde bulunan kriptik bölgelerde oluşan mutasyonlar vardır. Bunlardan Intron I'in 6. pozisyonunda T→C yer değiştirmesi (IVSI-6 T→C) ile aktive olan kriptik splice bölgesi mRNA miktarında azalmaya

neden olur. Akdeniz popülasyonunda yaygın olan bu mutasyon homozigot durumda Talasemi Intermediya fenotipiyle sonuçlanır. Dördüncü ve son olarak 3' UTR bölgesinde bulunan poliadenilasyon sinyalinin verildiği AATAAA consensus dizisindeki mutasyonlar da homozigot durumda orta düzeyde klinik seyirli talasemi intermedia fenotipi oluştururlar. ^(15,47)

2.5.2.2.2. Birlikte bulunan α talasemi

İki tane hasarlı β globin geni yanında hasta kişinin birde α talasemi geni taşıması serbest kalan α globin zincir miktarının düşmesine neden olur. Bu da α /non α dengesini olumlu yönde etkileyerek Talasemi intermedia fenotipi oluşumu ile sonuçlanır. ⁽¹⁵⁾

2.5.2.2.3. Birlikte bulunan $\delta\beta$ talasemi ve HPFH sendromu

$\delta\beta$ talasemi ve HPFH sendromunda artmış olan γ zincirleri ortamda bulunan serbest α zincirleriyle birleşerek HbF molekülünü oluştururlar. Sonuçta globin zincir imbalansı azalır ve Talasemi intermedia fenotipi ortaya çıkar. ⁽¹⁵⁾

2.6. β TALASEMİYE NEDEN OLAN MUTASYONLAR

β globin genindeki mutasyonlar gen ekspresyonunun herhangi bir kademesini etkileyerek β globin zincir sentezinde bozukluklara neden olur. Bu nedenle β globin genindeki mutasyonların sınıflandırılması gen ekspresyonu kademelerindeki etkilerine göre yapılabilir. ^(13,15,29,37,44,47,56)

2.6.1. TRANSKRİPSİYONEL MUTASYONLAR

β geninin promotor bölgesinde bulunan consensus dizilerde oluşan mutasyonlar RNA polimeraz'ın β genine bağlanma ve transkripsiyonu başlatma yeteneklerini azaltır, β mRNA transkripsiyonu %20-30 arasında düşer. Bunların birçoğunda β^+ talasemiler görülür, β globin zincir sentezi homozigotlarda veya çifte heterozigotlarda Talasemi Major'u önlemeye yeterlidir, klinik seyirin hafif olduğu talasemi intermedia fenotipini oluştururlar. ^(11,50)

2.6.2.RNA İŞLEMLENMESİ (PROCESSING) İLE İLGİLİ MUTASYONLAR

2.6.2.1. Splice Kavşağındaki mutasyonlar

İntron I ve İntron II'nin başlangıç ve bitiş yerlerindeki donör ve akseptör dinükleotitleri GT ve AG'yi kapsayan mutasyonlar RNA processing'i şaşkırtıcı biçimde bozabilir. Bu nükleotidlerdeki değişimler RNA splicing'i bütünüyle bozar ve oluşan mRNA β globin sentezi için kullanışsızdır; sonuçta β^0 talasemi fenotipi oluşur.⁽⁴⁴⁾

2.6.2.2.Consensus dizi değişikliklerine neden olan mutasyonlar

β mRNA'dan intronların etkili bir şekilde arıtılması için Splice kavşaklarda bulunan diğer anahtar baz dizilimleri de önemlidir. Ökaryotik hücre genlerinde çok sayıda yapılan dizi analizi çalışmaları birçok intron-ekson bağlanma bölgelerinde benzer dizilimler olduğunu ortaya koymuştur ve bunlar Consensus Diziler olarak adlandırılmıştır. Bu diziler donör bölgelerdeki eksonların son üç nükleotidi ile intron'un ilk altı nükleotidini, akseptör bölgede ise intron son on nükleotidi ile ekson'un ilk nükleotidinden oluşur. İşte bu dizilerdeki mutasyonlar sonucunda β^+ talasemiler oluşur.^(15,37)

2.6.2.3.İntronlardaki değişiklikleri

β geninin içinde GT ve AG dinükleotidleri splice kavşakları haricinde birçok yerde bulunabilir. Ancak bunlar normal splicing işleminde donör ve akseptör olarak kullanılmazlar. Ancak kriptik bölgeler (cryptic sites) olarak adlandırılan bu yerler oluşan bazı mutasyonlarla aktive olurlar ve yeni splice bölgeleri oluştururlar. Örneğin Doğu Akdeniz bölgesindeki ülkelerde ve ülkemizde en yaygın sıklıkta görülen I. İntron'un 110. pozisyonundaki G→A değişimi yeni bir akseptör bölgenin oluşumuna neden olur. Bu olay kriptik bölgenin aktivasyonu olarak adlandırılır. Bu yeni bölge normalde bulunan akseptör bölge ile yarışma içine girer. Bu durumda yeni akseptör bölge donör bölge tarafından daha çok tercih edilir ve normalde splicing sonucu atılması gereken 18 nükleotidlik bir parça β mRNA içinde kalarak kararsız bir β globin zinciri oluşumuna yol açar. İntron içindeki bu türden

değişimler sonucunda genel olarak β^+ talasemi fenotipi ortaya çıkar. ^(15,37)

2.6.2.4.Kodlanan bölgelerdeki mutasyonlar

Eksonların içinde de kriptik splice bölgeleri vardır. Oluşan mutasyonlar sonucu bu yerler de aktive olarak mRNA processing'i bozarlar. Bunlardan ekson 1'in 24-27 kodonları arasındaki diziler normal splice bölgesindeki dizilere benzerlik gösterir. Ekson 1 içindeki bu kriptik donör bölge oluşan üç mutasyonla aktive olur. Bu mutasyonlar HbE (Cd26 G→A), Hb_{Knossos} (Cd27 G→T) ve Cd24 (T→A)'dır. Kodon 26'da oluşan GAG→AAG mutasyonu ile iki tür mRNA ortaya çıkacaktır. Birincisi azalmış olmasına rağmen normal splicing mekanizmasının işlediği glutamik asit'le lysin'in yer değiştirdiği (glu→lys) β^E mRNA'dır, ikincisi ise aktive olan yeni donör bölge nedeniyle bozulan splicing işleminin sonucu oluşan işlevsel olmayan bir mRNA'dır. HbE'ye en yaygın sıklıkta Uzakdoğu Asya ülkelerinde rastlanır. Kodon 24'deki (T→A) mutasyonu ile aminoasit diziliminde bir değişiklik olmaz ancak intronlardan arıtılma işlemi oluşan yeni kavşak nedeniyle bozular. Bu mutasyonlar sonucu orta düzeyde klinik seyir gösteren bir β^+ talasemi fenotipi görülür. ⁽³⁷⁾

2.6.3.RNA TRANSLASYON MUTASYONLARI

2.6.3.1.Anlamsız (nonsense) mutasyonlar

Tek bir nt'in yer değiştirmesi sonucu normalde bir aminoasidi kodlayan kodon translasyonun durdurulması sinyalini veren durdurucu kodon (stop codon: UAA,UAG veya UGA) haline gelir. Mutasyonun olduğu kodondan itibaren globin zincir üretimi normalden önce durur. Bunlardan en yaygın görüleni kodon 39 C→T (CAG→TAG) mutasyonudur. Akdeniz Bölgesinde yüksek sıklıkta görülen bu mutasyon sonucu β^0 talasemi fenotipi ortaya çıkar. ^(8,31,65)

2.6.3.2.Çerçeve kayması (frameshift) mutasyonları

Bir veya birden fazla nt'in delesyonu veya insersiyonu sonucu öne veya arkaya doğru (5'→3' veya 3'→5' yönde) oluşan

nükleotid kayması ile mutasyon bölgesinden sonraki kodonların şifreleri değişerek farklı aminoasitlerin şifreleri ortaya çıkar. Bu şekilde oluşan bir çerçeve kayması kaçınılmaz olarak normalden önce bir durdurucu kodon oluşumuna da neden olur. Farklı amino asit dizilimli ve normalden kısa olan bu mRNA normal bir globin zinciri oluşturamaz ve β^0 talasemi fenotipine neden olur (Şekil 9).⁽⁵⁶⁾

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		
CTG	CTG	GTG	GTC	TAC	CCT	TGG	ACC	CAG	AGG		
Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg		
								TAG			
								STOP			
Cd 39 C→T Mutasyonu											
Delesyon											
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50		
TTC	TTT	GAG	TCC	TTT	GGG	GAT	CTG	TCC	ACT		
Phe	Phe	Glu	Ser	Phe	Gly	Asp	Leu	Ser	Thr		
			↓								
Cd 44 (-C) Mutasyonu			44	45	46	47	48	49	50	61
			TCT	TTG	GGG	ATC	TGT	CCA	CTC	TGA
			Ser	Leu	Gly	İle	Cys	Pro	Leu	STOP

Şekil 9: RNA Translasyon mutasyonlarından ikisinin şematik özeti. β^0 talasemiyle sonuçlanan Nonsense mutasyon Cd 39 (C→T) ve Frameshift mutasyon Cd 44 (-C).

2.6.4. RNA AYRILMASI VE POLİADENİLASYON'LA İLGİLİ MUTASYONLAR

Üçüncü eksondan sonra gelen 3' translasyonu yapılmayan bölgede bulunan consensus dizi -AATAAAA- enzimatik bir işlemi tetikleyerek büyüyen mRNA'nın uygun noktadan kesilerek genden ayrılmasını sağlayan bir sinyal görevi görür. Bu yörede oluşan nt yer değiştirmeleri poliadenilasyon sinyalinin yapısını bozar ve mRNA'nın ayrılması 900 nt sonra gelen başka bir sinyal bölgesine kadar ertelenir. Dolayısıyla eklenen materyal oluşan pre-mRNA'nın yaklaşık iki kat uzun olmasına ve kararlı yapısının bozulmasına neden olarak β^+ talasemi fenotipi oluşturur.^(37,44)

2.6.5. BAŞLIK BÖLGESİ (CAP SITE) MUTASYONU

β^+ talasemi fenotipiyle sonuçlanan +1 A→C yer değiştirmesi sonucu transkripsiyon azalır, başlıklanma (capping) yavaşlar ve mRNA kararlılığı bozulur. Homozigot olarak bulunması halinde bile kişide heterozigot gibi bulgu veren bir fenotip oluşturur. ^(66,84)

2.6.6. 3' TRANSLASYONU YAPILMAYAN BÖLGEDEKİ MUTASYON

3' UTR bölgesinde +1565'den +1577 nt'e kadar olan kısmın delesyonu sonucu β^+ talasemi fenotipi ortaya çıkar. ⁽³⁷⁾

2.6.7. BAŞLANGIÇ KODONU MUTASYONLARI

Başlangıç kodonu ATG'deki nt değişiklikleri sonucu transkripsiyon başlatılamaz, β^0 talasemi fenotipi oluşur (Tablo I). ⁽³⁷⁾

2.6.8. DELESYONEL MUTASYONLAR

β^0 talasemi fenotipine sahip birçok delesyonel mutasyon tarif edilmiştir. Diğerlerine göre göreceli daha az sıklıkta rastlanılan bu mutasyonların en sık görüleni İntron II'den başlayıp β geninin 3' sonuna kadar giden -619 bç'lik delesyondur. Hindistan'da yaşayan β talasemili olguların yaklaşık %30'u bu mutasyonu taşır. ⁽¹⁵⁾

β talasemilerde görülen bu birbirinden oldukça farklı mutasyon tipleri homozigot veya birleşik heterozigot olarak bulunması çok farklı fenotiplerin oluşumuna neden olur. Mutasyon tiplerinin Dünyanın değişik bölgelerinde populasyon içinde görülme sıklıkları da oldukça değişkendir. Bu aşamada β talasemili olgularda mutasyon tiplerinin belirlenerek; bu mutasyonların yöresel görülme sıklıklarının hesaplanması büyük bir önem taşımaktadır. Bu sayede klinikte β talasemili olguların tedavileri daha doğru düzenlenebilecek, moleküler tanının konulduğu ve prenatal tanının konulduğu laboratuvarlar daha uygun seçilen yöntemlerle hızlı ve düşük maliyetle çalışabilecek, ailelere verilen genetik danışmanlık hizmetleri daha etkili olacaktır. ^(30,89)

β talasemilere neden olan mutasyonlar genotip, fenotip ve etnik kökene göre özellikleriyle aşağıda verilmiştir. (Tablo I, II, III, IV, V, VI, VII.)⁽¹³⁾

Tablo I. Transkripsiyonel Mutasyonlar.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
-101 (C→T)	β^+	Türk, Bulgar, İtalyan
-92 (C→T)	β^+	Akdeniz
-90 (C→T)	β^+	Portekiz
-88 (C→T)	β^+	Amerikalı zenci
-88 (C→A)	β^+	Kürt
-87 (C→G)	β^+	Akdeniz
-87 (C→T)	β^+	Alman, İtalyan
-87 (C→A)	β^+	Yugoslav, Amerikalı zenci
-86 (C→G)	β^+	Lübnanlı
-86 (C→A)	β^+	İtalyan
-32 (C→A)	β^+	Tayvanlı
-31 (A→G)	β^+	Japon
-31 (A→C)	β^+	İtalyan
-30 (T→A)	β^+	Türk, Bulgar
-30 (T→C)	β^+	Çinli
-29 (A→G)	β^+	Amerikalı zenci, Çinli
-28 (A→C)	β^+	Kürt
-28 (A→G)	β^+	Çinli
+10 (-T)	β^+	Yunan
+22 (G→A)	β^+	Türk, Bulgar, İtalyan
+43'ten +44'e (-AAAC)	β^+	Çinli

Tablo II. RNA İşlemlenmesi ile ilgili Mutasyonlar.

1. Splice kavşağındaki mutasyonlar.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
IVSI-1 (G→A)	β^0	Akdeniz
IVSI-1 (G→T)	β^0	Hintli, Çinli
IVSII-1 (G→A)	β^0	Akdeniz, Tunuslu, Amerikalı zenci
IVSI-2 (T→G)	β^0	Amerikalı zenci
IVSI-2 (T→C)	β^0	Kürt
IVSI-2 (T→A)	β^0	Akdeniz
IVSI 17 nt del 3'son	β^0	Alman, İtalyan
IVSI 25 nt del 3'son	β^0	Hintli
IVSI-130 (G→C)	β^0	Lübnanlı
IVSI-130 (G→A)	β^0	İtalyan
IVSII-849 (A→G)	β^0	Tayvanlı
IVSII-849 (A→C)	β^0	Japon
IVSII-850 (G→C)	β^0	İtalyan
IVSII-850 (-G)	β^0	Türk, Bulgar
IVSII-850 (G→A)	β^0	Çinli

2.Consensus dizi değişikliklerine neden olan mutasyonlar.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
IVSI-5 (G→C)	β ⁺	Hintli, Çinli, Malezyalı
IVSI-5 (G→T)	β ⁺	Akdeniz, Amerikalı zenci
IVSI-5 (G→A)	β ⁺	Cezayirli, Akdeniz
IVSI-6 (T→C)	β ⁺	Akdeniz
IVSI, -1 (Cd30) (G→C)	β ⁺	Tunuslu, Amerikalı zenci
IVSI, -1 (Cd30) (G→A)	?	Bulgar
IVSI, -3 (Cd29) (C→T)	?	Lübnanlı
IVSI-128 (T→G)	β ⁺	Suudi Arabistan
IVSII-837 (T→G)	?	Hintli
IVSII-843 (T→G)	β ⁺	Cezayirli
IVSII-844 (C→G)	β ⁺	İtalyan
IVSII-848 (C→A)	β ⁺	Amerikalı zenci, Mısır, İran
IVSII-848 (C→G)	β ⁺	Japon

3.İntronlarda değişikliklere neden olan mutasyonlar.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
IVSI-110 (G→A)	β ⁺	Akdeniz
IVSI-116 (T→G)	β ^o	Akdeniz
IVSII-4, 5 (-AG)	β ⁺	Portekiz
IVSII-654 (C→T)	β ⁺	Çinli
IVSII-705 (T→C)	β ⁺	Akdeniz
IVSII-745 (C→G)	β ⁺	Akdeniz

4.Kodlanan bölgedeki mutasyonlar.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
Cd 19 (A→G) Asn→Ser	β ⁺	Malay-Hb _{Malay}
Cd 24 (T→A)	β ⁺	Amerikalı zenci, Japon
Cd 26 (G→A) Glu→Lys	β ⁺	Uzakdoğu Asya-HbE
Cd 27 (G→T) Ala→Ser	β ⁺	Akdeniz-Hb _{KNOSSOS}

Tablo III. RNA Translasyon Mutasyonları.

1.Anlamsız (nonsense) mutasyonlar.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
Cd 15 (TGG→TAG)	β ^o	Hintli
Cd 15 (TGG→TGA)	β ^o	Portekiz
Cd 17 (A→T)	β ^o	Çinli
Cd 22 (G→T)	β ^o	Reunion Adaları
Cd 26 (G→T)	β ^o	Tayland
Cd 35 (C→A)	β ^o	Tayland
Cd 37 (G→A)	β ^o	Suudi Arabistan
Cd 39 (C→T)	β ^o	Akdeniz
Cd 43 (G→T)	β ^o	Çinli
Cd 61 (A→T)	β ^o	Zenci
Cd 90 (G→T)	β ^o	Japon
Cd 112 (T→A)	β ^o	Slovak
Cd 121 (G→T)	β ^o	Polonya, Fransız/İsveç, Japon, İngiliz
Cd 127 (C→T)	β ^o	İngiliz

2.Çerçeve kayması (Frameshit) mutasyonlar.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
Cd 1 (-G)	β°	Akdeniz
Cd 5 (-CT)	β°	Akdeniz
Cd 6 (-A)	β°	Akdeniz,Amerikalı zenci
Cd 8 (-AA)	β°	Akdeniz
Cd 8/9 (+G)	β°	Hintli
Cd 9/10 (+C)	β°	Türk
Cd 11 (-T)	β°	Meksikalı
Cd 14/15 (+G)	β°	Çinli
Cd 15 (-T)	β°	Hintli
Cd 16 (-C)	β°	Hintli
Cd 22 (-AAGTTGG)	β°	Türk
Cd 24 (-G+CAC)	β°	Mısırlı
Cd 25/26 (+T)	β°	Tunuslu
Cd 27/28 (+C)	β°	Çinli
Cd 29 (-G)	β°	Japon
Cd 35 (-C)	β°	Malay
Cd 36/37 (-T)	β°	İranlı,Kürt
Cd 37/38/39 (-GACCCAG)	β°	Türk
Cd 38/39 (-C)	β°	Çek
Cd 40 (-G)	β°	Japon
Cd 41 (-C)	β°	Taylandlı
Cd 41/42 (-TTCT)	β°	Çinli
Cd 43 (+G)	β°	Japon
Cd 44 (-C)	β°	Kürt
Cd 47 (+A)	β°	Surinamlı
Cd 47/48 (+ATCT)	β°	Pencabi
Cd 51 (-C)	β°	Macar
Cd 54 (+G)	β°	Japon
Cd 54 (-T)	β°	Cezayirli
Cd 55 (+A)	β°	Hintli
Cd 57/58 (+C)	β°	Pencabi
Cd 59 (-A)	β°	İtalyan
Cd 64 (-G)	β°	İsveç
Cd 67 (-TG)	β°	Filipinli
Cd 71 (+T)	β°	Çinli
Cd 71/72 (+A)	β°	Çinli
Cd 74/75 (-C)	β°	Türk
Cd 76 (-C)	β°	İtalyan
Cd 82/83 (-G)	β°	Azerbaycan,Çek
Cd 84/85 (+C)	β°	Japon
Cd 85/86 (+T)	β°	Japon
Cd 88 (+T)	β°	Hintli
Cd 95 (+A)	β°	Taylandlı
Cd 106/107 (+G)	β°	Amerikalı zenci

Tablo IV. RNA Ayrılması ve Poliadenilasyon ile ilgili mutasyonlar.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
AATAAA→AACAAA	β^+	Amerikalı zenci
AACAAA→AATAAG	β^+	Kürt
AATAAA→AATGAA	β^+	Akdeniz
AATAAA→AATAGA	β^+	Malezyalı
AATAAA→A (-AATAAA)	β^+	Arab
AATAAA→AAAA (-AT)	β^+	Fransız

Tablo V. Başlık Bölgesi (Cap site) Mutasyonu.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
+1 A→C	β^+	Hintli

Tablo VI. 3' Translasyonu Yapılmayan Bölgedeki Mutasyon.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
3'UTR (+1565'ten +1577 bç'e kadar -GCATCTGGATTCT)	β^+	Türk

Tablo VII. Başlangıç Kodonu mutasyonları.

MUTASYON	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
ATG→ACG	β^0	Yugoslav
ATG→AGG	β^0	Çinli, Koreli
ATG→GTG	β^0	Japon
ATG→ATC	β^0	Japon
ATG→ATA	β^0	İtalyan

3.GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1.GEREÇLER

3.1.1.KULLANILAN ALETLER

- 1.Coulter Counter. T 890
- 2.Mikrosantrifüj.Fischer 235 B
- 3.Soğutmalı santrifüj. Eppendorf Centrifuge 5403
- 4.UV spektrofotometre. Schimadzu UV 120-02
- 5.UV spektrofotometre. Schimadzu UV 260
- 6.Spektrofotometre.Bausch and Lamb, Spectronic 20
- 7.pH metre.Beckman , Century SS-1
- 8.Manyetik karıştırıcı.Ka Cambimag RCD
- 9.Buz makinası.Scotsman AF-10
- 10.Konsantratör. Speed Vac SVC, 100 H
- 11.Elektroforez tankı. Gelman, Pharmacia LKB, Bio-Lab
- 12.PAG Elektroforez tankı Bethesda Research Lab., Life
Technologies Inc. Model S2
- 13.Elektroforez güç kaynağı. . . .LKB Browma; 2297-Macrodrives
- 14.Jel kurutucusu Bio-RAD, Slab Dryer Model 483
- 15.Otomatik banyo cihazı. Kodak X-omat M20 processor
- 16.Mikro dalga fırın. Vestel Goldstar
- 17.Kamera.Poloroid MP4 Land Camera
- 18.UV lamba.Cole Parmer 9814
- 19.Su banyosu.Nüve
- 20.Derin dondurucu. Bosch -20°C
- 21.Termal döngü aleti (1).DNA Thermal Cycler,
Perkin Elmer Cetus
- 21.Termal döngü aleti (2).GeneAmp PCR System 9600,
Perkin Elmer Cetus
- 22.Elektrikli terazi. Mettler AJ-100
- 23.Otomatik pipet.Gilson 10, 20, 100, 1000 µL

3.1.2.KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

- 1.Fenol Merck, 100200.
- 2.Kloroform. Merck, 2431.
- 3.HbA₂ Kiti. İsolab QS 7100, QS 7020
- 4.Proteinaz K. Sigma P6556
- 5.Agaroz. Promega V312A
- 6.NuSieve agaroz. FMC Bioproducts
- 7.Etidiyum Bromür. Sigma E8751
- 8.ARMS ve Dizi Analizi primerleri . Boehringer, P.E.Cetus
- 9.Taq polimeraz. Boehringer, P.E.Cetus
- 10.dATP, dCTP, dGTP, dTTP. P.E.Cetus
- 11.Dizi Analizi Kiti USB, Sequenase Version 2.0
DNA Sequencing Kit, US70770
- 12.³⁵S-dATP α Dupont
- 13.Amonyum persulfat. Electrophoresis grade, BRL
- 14.TEMED Electrophoresis grade, BRL

3.2.ÖRNEKLER

3.2.1.ANTAKYA DEVLET HASTANESİ ÖRNEKLERİ

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D. ve Antakya Devlet Hastanesi tarafından birlikte yürütülen Talasemilerin teşhisine yönelik proje kapsamında Antakya Devlet Hastanesinde EDTA'lı tüpler içine alınan kanların hematolojik parametreleri otomatik kan sayım aleti ile çalışıldı. MCV'si düşük olan şüpheli örnekler (MCV≤79 fL.), soğuk zincir kurallarına uyularak Adana'ya transfer edildi. Gönderilen örnek sayısı 213'tü. Biyokimya A.B.D.'da bu örneklerin kan sayımları otomatik kan sayım aleti ile tekrar yapıldı. MCV≤79 fL. ve MCH≤25 pg olan örneklerde alkali denaturasyon yöntemiyle HbF ve mikrokolon yöntemiyle HbA₂ değerleri saptandı. HbA₂≥%3.7 olan örneklerin DNA'ları Poncz yöntemine göre izole edildi. Bölgemizde yaygın sıklıkta rastlanan dokuz tane β talasemi mutasyonu ARMS yöntemiyle tarandı. Toplam 33 örneğin β talasemi mutasyon tipi saptandı. (28, 63, 74)

3.2.2. ERCİYES ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ÖRNEKLERİ

E.Ü.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı A.B.D.'dan β talasemi fenotipi taşıyan hasta veya yakınlarından EDTA'lı tüpler içine alınan kan örnekleri soğuk zincir kurallarına uyularak Kayseri'den Adana'ya gönderildi. Örneklerin kan sayımları otomatik kan sayım aleti ile yapıldıktan sonra HbA₂ ve HbF değerleri mikrokolon ve alkali denaturasyon yöntemiyle belirlendi. Toplam 34 örneğin DNA'ları Poncz yöntemiyle izole edildikten sonra ARMS yöntemiyle β talasemi mutasyon tipleri belirlendi. (28, 55, 63, 74)

3.2.3. EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ÖRNEKLERİ

Ege Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji B.D.'dan β talasemi fenotipleri belirlenmiş kişilere ve yakınlarına ait EDTA'lı tüpler içindeki kan örnekleri soğuk zincir kurallarına uyularak Adana'ya gönderildi. Bu örneklerin DNA'ları Poncz yöntemiyle izole edilerek β talasemi mutasyon tipleri dokuz mutasyon için ARMS yöntemiyle tarandı. ARMS yöntemiyle mutasyon tipleri belirlenemeyen dört örneğin mutasyonları DNA Dizi Analizi ile saptandı. Bundan başka gönderilen örneklerle bağlantılı olarak üç aile İzmir'den gelerek bölümümüze Prenatal tanı için başvurdu. Bu ailelerin kan örnekleri alındı, alınan Koryonik villus'ların (CVS) DNA'ları izole edildikten sonra β talasemi mutasyon tipleri belirlendi. (28, 58, 63, 72, 74)

3.3. YÖNTEMLER

3.3.1. HEMATOLOJİK TETKİKLER

Coulter Counter otomatik kan sayım aleti ile Hemoglobin (Hb, g/dL), hematokrit (Htc, %), Eritrosit sayısı (Rbc, $10^{12}/L$), ortalama eritrosit hacmi (MCV=OEH, femtolitre=fL), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH=OEhb, pikogram=pg) ve ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC=OEhbK, %) değerleri çalışıldı. Mikrokolon yöntemiyle HbA₂, Alkali denatürasyon yöntemiyle de HbF değerleri saptandı. Hemoglobin tiplerinin belirlenmesinde Selüloz asetat elektroforezi kullanıldı. (28, 38, 74)

3.3.2.TAM KANDAN DNA İZOLASYONU

3.3.2.1.Prensip:EDTA'lı tüplere alınmış tam kanın plazması santrifüj edilerek atılır. Tüp içeriği üzerine hipotonik bir çözelti ekleyerek eritrositler patlatılır, santrifüj edilerek lökositlerden ayrılır. Lökositlerin, proteinaz K ve Sodyum klorür-Tris-EDTA (STE) çözeltisi ile hücre zarları parçalanır, proteinleri hidroliz edilir. Fenol-kloroform karışımı ve kloroform ile hücre ve protein artıklarından arındırılan DNA saf etanolde çöktürülerek elde edilir.^(63,90)

3.3.2.2.Çözeltiler

1. 5X Retikülosit Salın Çözeltisi:

NaCl	40.1 g
KCl	1.85 g
MgCl ₂ 6H ₂ O	7.10 g

Distile suyla 1 L'ye tamamlanır. 1X hazırlanarak kullanılır.

2. Parçalayıcı (Lysing) Çözelti:

NH ₄ Cl 131 mM	7.14 g
NH ₄ HCO ₃ 9 mM	35.0 mg

Distile suyla 1 L'ye tamamlanır.

3. Sodyum Tris EDTA (STE) Çözeltisi:

NaCl 0.1 M	5.84 g
Tris HCl 0.05 M	6.05 g
EDTA 1 mM	0.37 g

Distile suyla 1 L'ye tamamlanır. Konsantre HCl veya doymuş NaOH'le pH 7.4'e ayarlanır.

4. Tris EDTA (TE) Çözeltisi:

Tris 1 mM	0.122 g
EDTA 1 mM	0.372 g

Distile suyla 1 L'ye tamamlanır. Konsantre HCl veya doymuş NaOH'le pH 7.4'e ayarlanır.

5. Doymuş Fenol Çözeltisi:

Fenol	250g
Distile su	50 mL
Tris 1 M	50 mL

Kristal halde fenol 250 g tartılır, 50 mL distile suda eritilir. Üzerine pH'sı 8'e ayarlanmış 50 mL Tris eklenir, karıştırılır. Fenol ve su fazı ayrıldıktan sonra üstte kalan su fazının pH'sı 8.0'ın altındaysa su fazı atılır yeniden Tris eklemeleri yapılarak pH8.0 ayarlanır. Ardından konsantrasyonu %1 olacak şekilde Hidroksikinolin eklenir. Üstte bir miktar su fazı bırakılarak renkli şişede +4°C'da saklanır.

3.3.2.3.Yöntem:

1.EDTA'lı tüpler içindeki 5 mL taze kan 15 mL'lik plastik santrifüj tüplerine aktarılıp ağız kapatılır. +4°C'da, 2500 rpm'de, 10 dakika döndürülerek plazma atılır.

2.Tüp üzerine 5 mL 1X Retikülosit salin çözeltisi eklenir, altüst edilir, +4°C'da, 2500 rpm'de, 10 dakika döndürüldükten sonra üst faz atılır; işlem iki kez daha tekrarlanır.

3.Tüp üzerine 5 mL Lysing çözeltisi eklenir; altüst edilerek buz içerisinde 15 dakika bekletilir. Ardından +4°C'da, 2500 rpm'de, 10 dakika döndürülür. Tüp dikkatlice yan çevrilerek dibe yapışmış olan lökosit topağı koparılmadan boşaltılır; işlem iki kez daha tekrarlanır.

4.Tüpün dibindeki lökosit topağı üzerine:

STE	5 mL
Proteinaz K (10mg/mL)	50 µL
SDS %20	125 µL

eklenir. Altüst edilip vortekslenir. Bir gece 37°C su banyosunda inkübe edilir.

5.Tüp üzerine 2.5 mL doymuş Fenol ve 2.5 mL Kloroform karışımı eklenir. Dikkatli bir şekilde 15 dakika altüst edilir. +4°C'da, 2500 rpm'de, 10 dakika döndürülür. Alt faz pastör pipetiyle 'buffy coat' denilen orta tabakayı almadan çekilerek atılır. İşlem bir kez daha tekrarlanır. Üçüncü kez aynı işlem sadece 2.5 mL kloroform ile tekrarlanır.

6.Üst faz tek kullanımlık plastik pastör pipetiyle -20°C'dan hemen çıkarılıp 15 mL'lik cam şişelere konulan soğuk saf alkol üzerine aktarılır. 30 dakika bekletilerek hava kabarcıklarına tutunan DNA iplikçiklerinin şişenin üst kısmında birikerek çökmesi sağlanır.

7.DNA topağı 1000 µL'lik bir mikropipetle dikkatlice alınır ve 1.5 mL'lik eppendorf tüpler içine aktarılır. 3 dakika, 2500 rpm'de döndürüldükten sonra dibe yapışan DNA topağı kurutulur. Üzerine 1 mL %70 alkol eklenir, altüst edilip 2500 rpm'de 3 dakika döndürülür. Son işlem iki kez daha tekrarlanır.

8. Kurutulmuş DNA topağı üzerine 250 µL apirojen bidistile su eklenir; çözünmesi için 37°C'lik etüvde en az iki saat bekletilir.

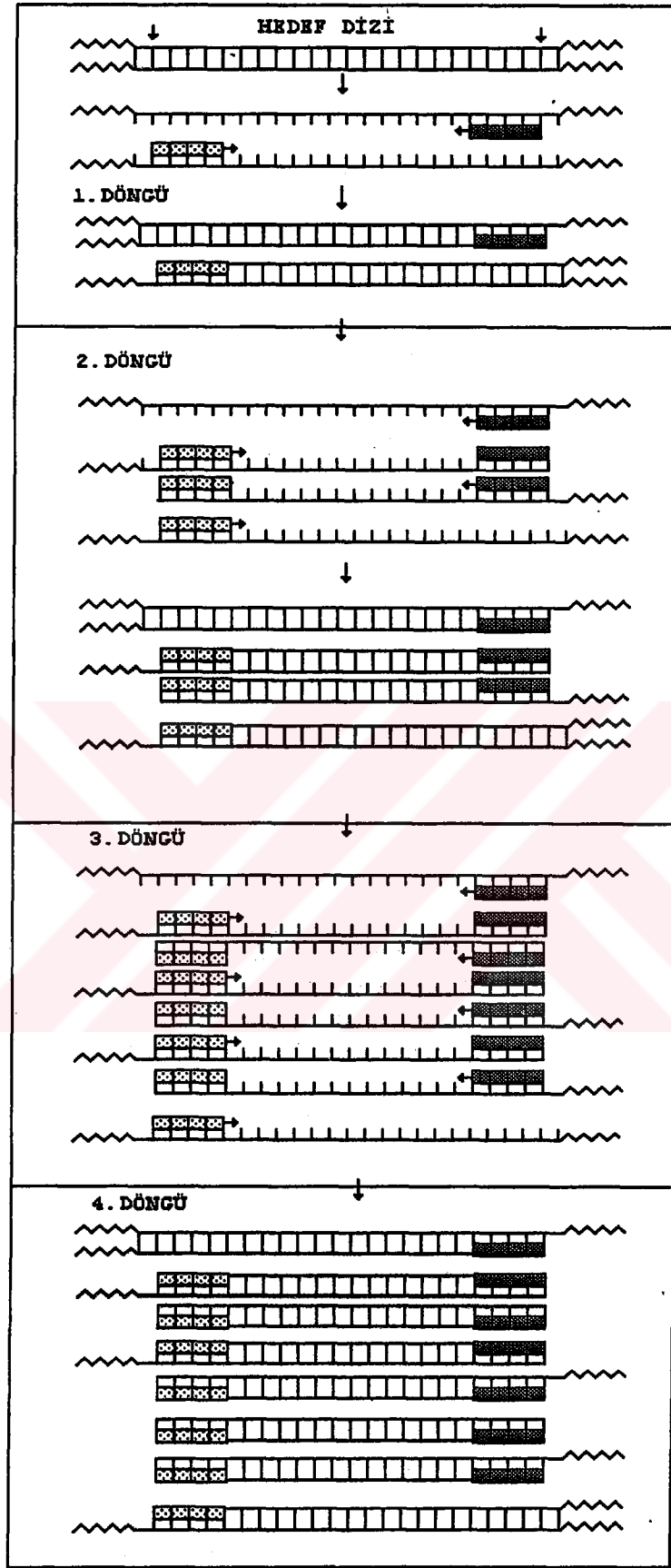
9. DNA Konsantrasyonu ve veriminin hesaplanması: Örnekten 20 µL alınır üzerine 580 µl saf su eklenir. Ölçüm UV spektrofotometrede 260 ve 280 nanometre dalga boylarında yapılarak Optik Dansite 260 (OD₂₆₀) ve Optik Dansite 280 (OD₂₈₀) kaydedilir. ^(8,90)

$$\text{Konsantrasyon } (\mu\text{g/mL}) = \text{OD}_{260} \times \text{Seyreltme Faktörü} \times 50$$

$$\text{Verim} = \text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$$

3.3.3. POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (PCR) İLE BELİRLİ GEN BÖLGELERİNİN ÇOĞALTILMASI

Polimeraz zincir reaksiyonu DNA üzerinde belirlenen; en az 50-100 en çok 2500 nt uzunluğundaki bir bölgenin milyon kez çoğaltılmasıdır (amplifikasyon). Hedeflenen bölgenin iki ucuna aynı yönden ve ters yönden karşılık gelen ve DNA sentezleyici aletle önceden sentezlenmiş primer amplifikasyonun özgünlüğünü sağlar. Amplifikasyonun yapılacağı DNA'nın ısı 95°C'ye kadar yükseltilerek çift iplikçikli DNA'nın ayrılarak tek iplikçik haline geldiği denaturasyon sağlanır. İkinci aşamada ısı 55°C-65°C arasına düşürülerek özgün primerlerin tamamlayıcı dizilerine yapışması (annealing) sağlanır. Son aşama ise DNA polimeraz'ın yerini tutan ve yüksek ısıdan etkilenmeyen bir enzim olan Taq polimeraz'la ortamda bulunan deoksिनükleotit trifosfatların (dNTP'ler) 5'→3' yönünde zincire eklenerek zincir uzamasının (ekstensiyon) sağlandığı ısının 72°C'da tutulduğu fazdır. Böyle bir ısı değişimi döngüsü sonrasında iki katına çıkan hedef dizilerin kendisi de tekrarlanan sonraki döngüde şablon olarak kullanılacak ve her döngünün (n) ardından (2ⁿ) sayıda eksponensiyel bir artış gerçekleşecektir (Şekil 10). ^(7,16,33,34,39,41,42,43,51,52,83)



Şekil 10: PCR yöntemiyle gen amplifikasyonunun şematik özeti.

3.3.4.ARMS YÖNTEMİYLE β GLOBİN GEN BOZUKLUKLARININ SAPTANMASI

3.3.4.1.Prensip: Klasik PCR'dan farklı olarak mutasyona özgün amplifikasyon yapılarak mutant β globin alelleri saptanmaya çalışılır. Mutant β globin alelline özgü primer sadece mutasyonun olduğu bölgeyi tanırken, tek bir nt değişikliğinde bile mutasyonun olmadığı bölgeye yapışmayacak ve amplifikasyon sonuçsuz kalacaktır. Böylece bir tane mutant alelle özgü, bir tane bunun zıt bölgesini karşılayan (özgün amplifikasyon), iki tane de genin herhangi bir bölgesini çoğaltarak koşulların doğruluğunu kontrol etmeye yarayacak (kontrol amplifikasyon) toplam dört primerin tek bir tüpte kullanılmasıyla β geninin bilinen mutasyonları saptanabilecektir. (8, 45, 46, 55, 67, 68, 69, 70, 71, 76, 79, 80)

3.3.4.2.Çözeltiler

1. PCR karışımı (4 mL)	
10X Tampon	500 μ L
Steril saf su	2700 μ L
1,25 mM dNTP _{karışımı}	800 μ L
1 M Spermidine	4 μ L
2. 10X Tampon	
2 M KCl	1,2 mL
1 M Tris (pH:8,3)	0,5 mL
1 M MgCl ₂	75,0 μ L
Gelatin	5,0 mg
Steril Saf su	3,2 mL
3. 2 M KCl	
4. 1 M Tris (pH:8,3)	
5. 1 M MgCl₂	
6. dNTP_{karışımı} (1,25 mM)	
dATP 100 mM	60 μ L
dGTP 100 mM	60 μ L
dCTP 100 mM	60 μ L
dTTP 100 mM	60 μ L
Steril saf su	4740 μ L
7. 50X AGB Tamponu (pH:8,3)	
Tris 2M	242,28 g
Sodyum Asetat 3H ₂ O 1M	136,08 g
EDTA Na ₂ 10 mM	3,72 g
Distile su ile 1 L'ye tamamlanır. pH, glasiyel asetik asit ile 8,3'e ayarlanır.	
8. 1 M Spermidin (Serbest Baz)	

3.3.4.3.Yöntem

Amplifikasyon ısıya dayanıklı mikrotüpler içinde Termal Döngü Düzenleyici Alet'le (Thermal Cycler) yapılır. Amplifikasyon tüplerinin yerleştirildiği bir ısı bloku ve ısı değişimlerinin kısa sürede gerçekleştiren bir mikroişlemci'den oluşan bu alette termal döngü protokolleri önceden belirlenerek uygulanabilir.

3.3.4.3.1. Amplifikasyon Protokolü

PCR karışımı, mutasyonu içeren bölgeye özgü ARMS primeri, genel primer 1 veya 2, 5' sabit primer, 3' sabit primer, örnekten izole edilen şablon genomik DNA (gdDNA) ve Taq polimeraz'dan oluşan karışım amplifikasyon için üzerine 1 damla mineral oil damlatılarak termal döngü aletine yerleştirilir.

PCR karışımı	20 µL
ARMS primeri	1 µL
Genel Primer 1 veya 2	1 µL
5' Sabit primer	1 µL
3' Sabit primer	1 µL
gdDNA (0.5-1 µg/mL)	1 µL
Taq polimeraz (5 U/µL)	0.1 µL
Toplam	25.1 µL

3.3.4.3.2. ARMS yönteminde kullanılan primerler

ARMS yönteminde kullanılan genel ve sabit primerler Tablo VIII'de gösterilmiştir. Tablo IX'da ise β talasemi mutasyonlarına özgün ARMS primerleri bulunmaktadır. Şekil 12'de β globin geni baz dizleri verilmiştir. Şekil 13'de ise β IVS 1-110 mutasyonu için kullanılan mutant ve normal primerlerle (40 M ve 41 N ile gösterilmiştir) her iki primere karşılık olan genel primer 1'in (30 ile gösterilmiştir) β geni üzerindeki yerleri gösterilmiştir.

Tablo VIII: ARMS yönteminde kullanılan genel ve sabit primerler.

Genel Primer 1	5' ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC 3'
Genel Primer 2	5' CCC CTT CCT ATG ACA TGA ACT TAA 3'
5'Sabit primer	5' CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC 3'
3'Sabit primer	5' GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA 3'

Tablo IX: β talasemi mutasyonlarına özgün ARMS primerleri.

IVS1-110 (G→A) (m)*	5' ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACT 3'
IVS1-110 (G→A) (n)*	5' ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACC 3'
IVS1-1 (G→A) (m)	5' TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAT 3'
IVS1-1 (G→A) (n)	5' TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAC 3'
Cd 39 (C→T) (m)	5' CAG ATC CCC AAA GGA CTC AAA GAA CCT GTA 3'
Cd 39 (C→T) (n)	5' TTA GGC TGC TGG TGG TCT ACC CTT GGT CCC 3'
IVS 1-6 (C→T) (m)	5' TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATG 3'
IVS 1-6 (C→T) (n)	5' TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATA 3'
IVS2-1 (G→A) (m)	5' AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAT 3'
IVS2-1 (G→A) (n)	5' AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAC 3'
Cd 8 (-AA) (m)	5' ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGG 3'
Cd 8 (-AA) (n)	5' ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGA 3'
-30 (T→A) (m)	5' GCA GGG AGG GCA GGA GCC AGG GCT GGC CAT 3'
-30 (T→A) (n)	5' GCA GGG AGG GCA GGA GCC AGG GCT GGC CAA 3'
IVS2-745 (C→G) (m)	5' TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGG 3'
IVS2-745 (C→G) (n)	5' TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGC 3'
Cd 5 (-CT) (m)	5' ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT CCG CGA 3'
Cd 5 (-CT) (n)	5' CAC AGG GCA GTA ACG GCA GAC TTC TCG TCG 3'

* (m:mutant, n:normal)

Tablo X: Genel ve sabit primerlerle birlikte kullanılan ARMS primerleri.

Genel veya sabit primer no:	Genel primer 1 (30)	Genel primer 2 (31)	3' sabit primer (16)
ARMS primeri:	IVS 1-110 m ve n IVS1-1 m ve n IVS1-6 m ve n IVS2-1 m ve n Cd 5 m ve n Cd 39 n	Cd 8 m ve n -30 m ve n Cd 39 m	IVS2-745 m ve n

3.3.4.3.3. Termal döngü Protokolü

Termal döngü aletinde programlanan döngülerin ısı ve süreleri aşağıda verilmiştir.

94°C	1 dakika	→ 25 döngü
65°C	1 dakika	
72°C	1 dakika	
72°C	3 dakika	→ polimerizasyon

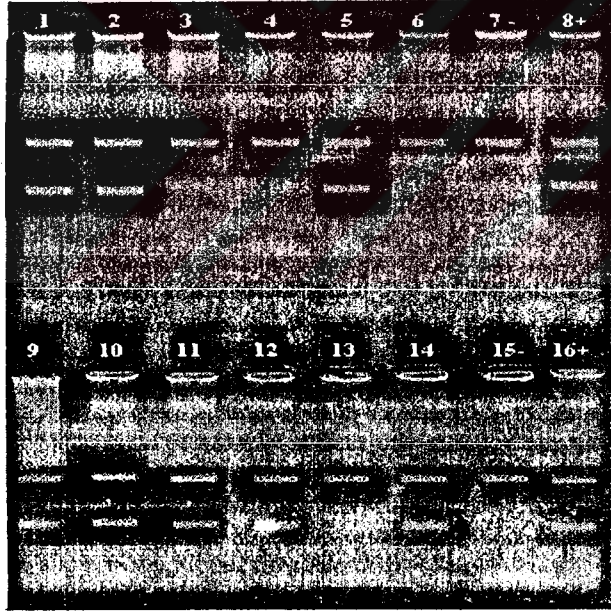
3.3.5. AGARUZ JEL ELEKTROFOREZİ

3.3.5.1. Prensi: Agaruz jel elektroforezi DNA molekülünün tanımlanması, ayrıştırılması ve saflaştırılması amacıyla kullanılır. Elektriksel bir ortamda agaruz jel içinde bulunan DNA molekülleri içerdikleri nt sayısının logaritması ile (Log10) ters orantılı olarak anoda doğru göç ederler.⁽⁹⁰⁾

3.3.5.2. Çözeltiler:

1. %3'lük NuSieve-Agaruz jel: NuSieve 1.5 g Agaruz 1.5 g 100 mL 1XAGB Tamponu içinde mikrodalga fırında eritilerek hazırlanır.
2. Yükleme Tamponu: Brom fenol Mavisi %0.25 Sukroz %40 olacak şekilde 1XTBE tamponunda hazırlanır.
3.5X Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu: Tris baz 54.0 g Borik asit 27.5 g EDTA (0.5 M, pH:8.0) 20 mL 1 L. saf suda çözülerek hazırlanır.
4. Etidiyum Bromür çözeltisi: EtBr 5 µg/µL olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanır.

3.3.5.3.Yöntem: 1X AGB tamponu içinde mikrodalga fırında çözülen %3'lük NuSieve-Agaroz jel elektroforez kapları içine döküldükten sonra soğumaya bırakılır. 1X AGB tamponuyla dolu elektroforez tankı içine yerleştirilerek jel içindeki tarak çıkarıldığında oluşan kuyulara, amplifiye örnekten 20 µL alınarak 2 µL yükleme tamponu ile parafilm üzerinde karıştırıldıktan sonra aplike edilir. 150 volt'ta 30 dakika yürütülür. Elektroforez sonrası jel etidyum bromür (EtBr) kabı içinde 3 dakika bekletilerek boyanır ve saf su dolu kap içinde 20 dakika bekletilerek fazla boyalardan arıtılır. Jel UV lamba altına alınarak DNA fragmanları görünür hale getirilir ve Polaroid kamera ile fotoğrafı çekilerek değerlendirilir (Şekil 11).



→Kontrol Amplifikasyon
→Özgün (mutant) Amplifikasyon

→Kontrol Amplifikasyon
→Özgün (normal) Amplifikasyon

Şekil 11: β IVS1-110 Mutant ve Normal bantlarının elektroforez sonrası jel üzerindeki görüntüsü. 3,4 ve 6 no'lu örnekler (-), 1,2 ve 5 no'lu örnekler IVS1-110 Mutant (+), 7 (-)Kontrol (A/A), 8 (+) Kontrol (IVS1-110/IVS1-110). 9,10,11,12 ve 14 IVS1-110 Normal (+); 13 no'lu örneğin IVS1-110 Normal bandı yok (-). 15 (-) Kontrol (IVS1-110/IVS1-110), 16 (+) Kontrol (A/A).

-148 ccagaagagc caaggacagg tacggctgtc atcaactaga cctcacctg tggagccaca
 -88 ccctaggggtt ggccaatcta ctcccaggag cagggagggc aggagccagg gctgggcata
 -28 aaagtcaggg cagagccatc tattgcttAc atttgcttct gacacaactg tggtcactag
 +33 caacctcaaa cagacacc +1
 Ekson 1 **ATG** GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG
 Cd 16 GGC AAG CTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG GCC CTG GGC AG
 IVSI-1 gttggtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg catgtggaga
 61 cagagaagac tcttgggttt ctgataggca ctgactctct ctgcctattg gtctattttc
 121 ccacccttag
 EksonII G CTG CTG GTG GTC TAC CCT TGG ACC CAG AGG TTC TTT GAG TCC TTT GGG
 Cd 47 GAT CTG TCC ACT CCT GAT GCT GTT ATG GGC AAC CCT AAG GTG AAG GCT
 Cd 63 CAT GGC AAG AAA GTG CTC GGT GCC TTT AGT GAT GGC CTG GCT CAC CTG
 Cd 79 GAC AAC CTC AAG GGC ACC TTT GCC ACA CTG AGT GAG CTG CAC TGT GAC
 Cd 95 AAG CTG CAC GTG GAT CCT GAG AAC TTC AGG
 IVSII-1 gtagtctat gggacccttg atgttttctt tccccttctt ttctatgggtt aagttcatgt
 61 cataggaagg ggagaagtaa cagggtagag ttagaatgg gaaacagacg aatgattgca
 121 tcagtgtgga agtctcagga tcgttttagt ttcttttatt tgctgttcat aacaattggt
 181 ttcttttggt taattcttgc tttctttttt tttcttctcc gcaattttta ctattatact
 241 taatgcctta acattgtgta taacaaaagg aaatatctct gagatacatt aagtaactta
 301 aaaaaaaaaact ttacacagtc tgcctagtag attactattt ggaatatatg tgtgcttatt
 361 tgcattattca taatctcctt actttatttt cttttatttt taattgatac ataactatta
 421 tacatattta tgggttaaag tgtaatggtt taatatgtgt acacatattg accaaatcag
 481 ggtaattttg catttgtaat tttaaaaaat gctttcttct tttaatatac ttttttggtt
 541 atcttatttc taatactttc cctaactctt ttctttcagg gcaataatga tacaatgtat
 601 catgcctctt tgcaccattc taaagaataa cagtataat ttctgggtta aggcaatagc
 661 aatatttctg catataaata tttctgcata taaattgtaa ctgatgtaag aggtttcata
 721 ttgctaatag cagctacaat ccagctacca ttctgctttt attttatggt tgggataagg
 781 ctggattatt ctgagtccaa gctagccct tttgctaate atgttcatac ctcttatctt
 841 cctcccacag
 Ekson 3 CTC CTG GGC AAC GTG CTG GTC TGT GTG CTG GCC CAT CAC TTT GGC AAA
 Cd 121 GAA TTC ACC CCA CCA GTG CAG GCT GCC TAT CAG AAA GTG GTG GCT GGT
 Cd 137 GTG GCT AAT GCC CTG GCC CAC AAG TAT CAC **TAA**
 3' UTR1 gctcgctttc ttgctgtcca atttctatta aaggttcctt tgttcctaa gtccaactac
 3' UTR61 taaactgggg gatattatga agggccttga gcatctggat tctgcct**AAT** **AAAA**aacatt
 3' UTR121 tattttcatt gcaatgatgt atttaaatta tttctgaata ttttactaaa aagggatgt
 3' UTR181 gggaggtcag tgcatttaaa acataaagaa atgaagagct agttcaaacc ttgggaaat

Şekil 12: İnsan β globin geni baz dizileri.

		————— 30 —————→
-148	ccagaagagc caaggacagg tacggctgtc atcacttaga cctcaccctg tggagccaca	
-88	ccctaggggtt ggccaatcta ctcccaggag cagggagggc aggagccagg gctgggcata	
-28	aaagtcaggg cagagccatc tattgctt Ac atttgcttct gacacaactg tgttcactag	
+33	caacctcaaa cagacacc +1	
Ekson 1	ATG GTG CAC CTG ACT CCT GAG GAG AAG TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG	
Cd 16	GGC AAG CTG AAC GTG GAT GAA GTT GGT GGT GAG GCC CTG GGC AG	
IVSI-1	gttggtatca aggttacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaactggg catgtggaga	
61	cagagaagac tcttggggtt ctgataggca ctgactctct ctgcctattg gtctatttcc	← 41 N —
121	ccacccttag	← 40 M —
EksonII	G CTG CTG GTG GTC TAC CCT TGG ACC CAG AGG TTC TTT GAG TCC TTT GGG	

Şekil 13: β IVS1-110 Mutant ve Normal ARMS primerleriyle genel primer 1'in (30) β geni üzerinde gösterilmesi.

3.3.6. DNA DİZİ ANALİZİ

DNA Dizi Analizi yönteminin temel prensipleri şu şekilde sıralanır; 1. Baz dizisi belirlenecek olan gen bölgesi PCR ile tek zincir halinde amplifiye edilir. 2. Amplifiye edilen bu diziye komplementer zincir oluşumunu başlatmak için uygun bir primerin yapışması sağlanır. 3. Primer DNA polimeraz'la dört ayrı reaksiyon karışımı içinde uzatılır. Her bir reaksiyon karışımı α işaretli dNTP (deoksi nükleotid trifosfat) ve işaretlenmemiş dNTP karışımı ile zincir sonlandırıcı ddNTP (dideoksi nükleotid trifosfat) içerir. 4. Dört ayrı setten oluşan reaksiyon ürünlerinin elektroforezi yüksek çözünürlüklü poliakrilamid-üre jelinde yapılır. 5. Jel'den otoradyografik bir film oluşturularak çoğaltılan gen bölgesinin baz dizilimi belirlenir. (17,18,27,33,54,73)

3.3.7. DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİYLE β GLOBİN GENİNİN BAZ DİZİLİMİNİN BELİRLENMESİ

3.3.7.1. Prensip: β globin geni dört tane özgün primer ile iki büyük parçaya bölünerek tek zincir halinde (ssDNA) PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılan bu iki ssDNA'nın komplementer zincirleri iki farklı primer'in yapışmasının ardından ³⁵S-dATPα ile işaretlenerek dideoksi terminasyon yöntemiyle sentezlenir.

Poliakrilamid-üre jelinde yürütülen örneklerin otoradyografi sonrasında baz sıraları belirlenir. Böylelikle ARMS yöntemiyle rutin olarak taradığımız β talaseminin dokuz mutasyonun dışında kalan, bölgemizde nadir görülen mutasyonlar veya daha önce hiç saptanmamış bir mutasyon belirlenebilir. Aynı zamanda ARMS yöntemiyle elde edilen sonuçlar gerek duyulursa β gen dizi analizi ile kontrol edilebilir. (18,72,84)

3.3.7.2. Tek zincir DNA (ssDNA) amplifikasyonu

β globin geni iki parça halinde dört tane özgün primer kullanılarak asimetrik olarak amplifiye edilir. Birinci parça, β geninin 5' tarafından -140 no'lu nt ile başlar promotor bölge, Exon I, IVSI ve Exon II'yi içine alır. IVS II'nin 71. nt'i ile sonlanan birinci parça 704 bp uzunluğundadır. Kullanılan amplifikasyon ve sekans primerleri Tablo XI'de verilmiştir. (23)

Tablo XI: β globin geninin birinci kısmının amplifikasyon ve dizi analizi (sequencing) reaksiyonları için kullanılan primerleri.

Primer	Primer no	Baz dizilimi
Forward Primer	108	5'-GCCAAGGACAGGTACGGCTGTCATC-3'
Reverse Primer	109	5'-CCCTTCCTATGACATGAACTTAACCAT-3'
Sequencing Primer	410	5'-TGTGGAGCCACACCCTAGGGTTGG-3'
Sequencing Primer	16	5'-GCAGGPTGGTATCAAGGTT-3'

β geninin, IVS II'nin 122. nükleotidinden başlayarak, Exon 3 ve Poli A'yı da içine alarak 3' UTR bölgesinde sonlanan, 1098 nt uzunluğundaki ikinci parçasının amplifikasyon ve sequencing primerleri Tablo XII'de gösterilmiştir.

Tablo XII: β globin geninin ikinci kısmının amplifikasyon ve dizi analizi (sequencing) reaksiyonları için kullanılan primerleri.

Primer	Primer no	Baz dizilimi
Forward Primer	143	5'-CAGTGTGGAAGTCTCAGG-3'
Reverse Primer	230	5'-GTATTTTCCCAAGGTTTGAAGTAGCTC-3'
Sequencing Primer	229	5'-ATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACC-3'
Sequencing Primer	169	5'-GTCTGTGTGCTGGCCCATC-3'

3.3.7.2.1. ssDNA Amplifikasyon Protokolü

Amplifikasyon 1 μ g genomik DNA, 20 mM MOPS (pH 7.8), 300 mM dNTP, 50 mM NaCl, 3 mM MgCl₂ ve 1 pmol forward primer ile 100 pmol reverse primer ve Taq polimeraz'dan oluşan karışım içinde yapılır. Tek zincir DNA amplifikasyonunda çift zincir (dsDNA) amplifikasyondan farklı olarak primer konsantrasyonları eşit değildir.⁽⁷⁷⁾

Her örnek için üç tane eppendorf tüpü alınır. Her tüpe aynı DNA örneğinden 1 μ g konulur. Daha sonra üç tüpe yetecek kadar reaksiyon karışımı hazırlanır.

Reaksiyon karışımı (3 tüp için):		
MOPS Tamponu 20 mM	3x93	279 μ L
dNTP _{karışımı} 300 mM	3x5	15 μ L
Forward (Limiting primer, 1 pmol/ μ l)	3x1	3 μ L
Reverse (Excess primer, 100 pmol/ μ l)	3x1	3 μ L
Toplam		300 μL

Başlangıçta her tüpe bu karışımdan 50 μ l aktarılarak tüpler Termal döngü aletine yerleştirilir ve DNA 95°C'de 6 dakika denatüre edilir. Karışımın geri kalan kısmına (150 μ L) 1.5 μ L Taq polimeraz (5 U/ μ L) eklenir. Denatürasyonun bitiminde her

tüpe 50 µL, içerisinde enzim bulunan reaksiyon karışımının ikinci kısmı eklenir ardından her tüpe 2 damla mineral oil damlatılarak termal döngü aletine yerleştirilir.

3.3.7.2.2. Termal Döngü Protokolü:

DNA'nın enzim içermeyen reaksiyon karışımı içinde 95°C'da 6 dakika denatüre edilmesinden sonra üç farklı aşamadan oluşan termal döngü protokolü Tablo XIII'da verildiği şekilde uygulanır.⁽²³⁾

Tablo XIII: ssDNA amplifikasyonu için termal döngü protokolü.

İşlem	Isı	1.döngü	2.döngü	3.döngü
Denatürasyon	94°C	4.30 dakika	1.30 dakika	1.15 dakika
Annealing	55°C	1.30 dakika	1.30 dakika	1.30 dakika
Ekstensiyon	72°C	6.00 dakika	5.30 dakika	10.00 dakika
Döngü tekrar sayısı:		1	32	1

Toplam 34 döngünün tamamlanmasının ardından her bir tüpten 5 µl alınır, 1 µL metilen blue ile karıştırılıp %1.5'lük agaroz jel'e aplike edilir. 100 V'ta 20 dakika elektroforez uygulanır ve UV lamba altında amplifikasyon kontrol edilir.⁽¹⁸⁾

3.3.7.3. Amplifiye DNA'nın pürifikasyonu

Amplifikasyon ürünlerini içeren tüpler parafilm üzerine boşaltılarak mineral oil'den arındırılır. Tek bir eppendorf tüpü içerisinde birleştirilen amplifiye ürüne (~280 µL) kendi hacmi kadar 2.5 M Amonyum Asetat eklenir. Üzerine 700 µL saf soğuk (-20°C) etanol eklenip yavaşça alt üst edilerek karıştırılan tüp 20 dakika +4°C'de bekletilir. Aynı sıcaklıkta 15 dakika, 10.000 rpm'de döndürülür. Işığa karşı tutularak bakıldığında toplu iğne başı kadar küçük miktarda bir DNA çökeltisi tüpün dibine yapışmış olarak görülür. Tüp whatman kağıdı üzerine dipteki DNA topağı kopmadan dikkatlice ters çevrilerek içerisindeki sıvı atılır. Üzerine 1 mL %70'lik etil alkol ilave edilir ve 2-3 kez alt üst edilerek 10.000 rpm'de 5 dakika döndürülür. Çok küçük miktardaki DNA genellikle tüpün dibine yapışır. Aynı işlem üç kez tekrarlandıktan sonra dipte kalan DNA topağı (ssDNA) Speed

Vac'da 20-25 dakika kurutulur. Üzerine 15 µL saf su eklenerek (37°C'de 2 saat) çözülmesi beklenir. Bundan 1 µL alınarak %1.5'lik agaroz jel'e, konsantrasyonu bilinen başka bir ssDNA örneği ile birlikte aplike edilir. Elektroforezden sonra band şiddetleri karşılaştırılarak amplifiye ürünün konsantrasyonu yaklaşık olarak saptanır. Amplifikasyonu ve purifikasyonu tamamlanan örnek dizi analizindeki ikinci kısım reaksiyonlar için kullanılır.⁽⁹⁰⁾

3.3.7.4.Dideoksi Terminasyon Reaksiyonuyla Baz diziliminin belirlenmesi, Sekans reaksiyonu:

Sekans reaksiyonunda bir DNA polimeraz enzimi olan, 3'→5' ekzonükleaz aktivitesi yok edilmiş Sequence Version 2.0 enzimi kullanılır. Reaksiyon, işaretleme ve zincir sonlandırma olmak üzere iki basamaktan (Labeling and Chain termination) oluşur. Birinci basamakta deoksinekleotid trifosfatlar dCTP, dGTP, TTP ve ³⁵S-dATP α'nın (deoksiadenosine 5' [α-thio] triphosphate, spesifik aktivite 1325 Ci/mmol, konsantrasyonu 12.5 mCi/mL) sınırlı miktardaki konsantrasyonları primerleri uzatır. İkinci basamakta dNTP'lerin konsantrasyonu artırılırken ddNTP'ler de ortama eklenir. Uzayan zincirler ddNTP'ler tarafından sonlandırılır. Bu basamak 5 dakika sonra stop solüsyonu ile (EDTA ve formamid varlığında) durdurulur.⁽⁷²⁾

3.3.7.4.1. Primer bağlanma basamağı (Annealing)

Bir eppendorf tüpü işaretlenerek, içine yaklaşık 250-300 ng ssDNA konulur. DNA'nın hacmi 7 µL'den fazla ise DNA konsantörde 7 µL'ye indirilir. Daha az ise 7 µL'ye H₂O ile tamamlanır.

Annealing karışımı:

ssDNA	7 µL
5X Reaksiyon tamponu	2 µL
Primer (20-30 pmol)	1 µL
Toplam	10 µL

Toplam hacim 10 μL olmalıdır. ssDNA konsantrasyonu ile primer yaklaşık olarak eşit olmalıdır. Tüpler önceden 68°C'ye ayarlanmış ısı bloku içerisine konular, 3 dakika inkübe edilir; sürenin bitiminde oda sıcaklığına alınır, ısının 30°C'a kadar düşmesi beklenir. Bu esnada işaretleme ve sonlandırma basamağındaki çözeltiler hazırlanarak buz içerisinde korunur. (72)

3.3.7.4.2.İşaretleme Reaksiyonu

Bir eppendorf tüpüne 1 μL işaretleme karışımı ve 8 μL saf su konularak karıştırılır. Diğer bir tüpe 7 μL enzim seyreltme tamponu alınıp üzerine 1 μL enzim (Sequence versiyon 2.0) eklenir. Enzim seyreltmesi tam kullanılacağı anda yapılır. Enzim kesinlikle oda ısısında bekletilmez. Seyreltilen enzim buz içerisine alınarak hemen kullanılır. İşaretleme reaksiyonu karışımındaki maddeler ve miktarları aşağıda verilmiştir. Hafifçe karıştırılan tüp 5 saniye kadar santrifüj edilerek oda ısısında 3 dakika bekletilir. (72)

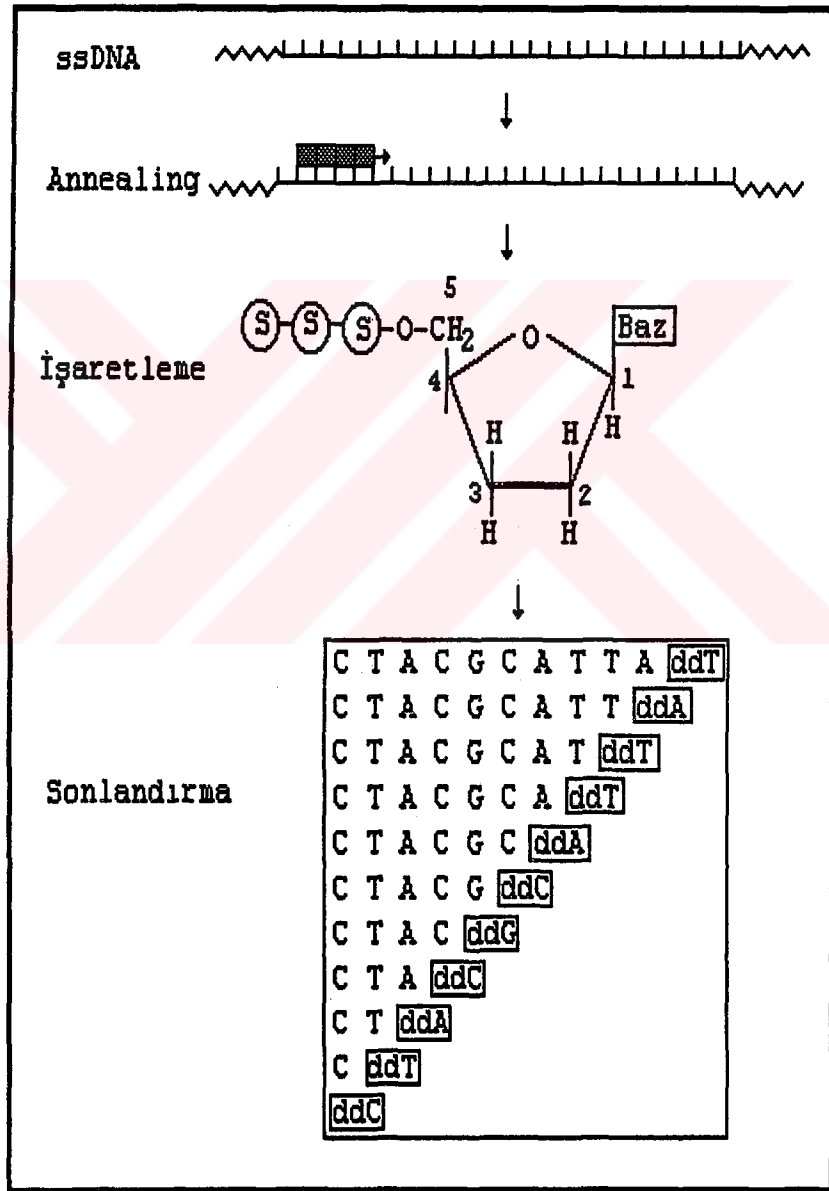
İşaretleme reaksiyonu karışımı:	
Template-primer	10.0 μL
DDT (Dithiothreitol)0.1 M	1.0 μL
Seyrelmiş işaretleme karışımı	2.0 μL
³⁵ S dATP α	0.5 μL
Seyreltilmiş enzim	2.0 μL
Toplam	15.5 μL

3.3.7.4.3.Sonlandırma Reaksiyonu

Dört tane eppendorf tüpünün kapağına A, C, G ve T harfleri yazılır. A ile işaretlenmiş tüpe 2.5 μL ddATP eklenir. Aynı şekilde C, G ve T tüplerine de aynı miktarda ddCTP, ddGTP ve ddTTP eklenir. Bu işlem tek zincir DNA'ya bağlanmış primer karışımının oda ısısına kadar soğuması ve işaretleme için geçen zamanda hazırlanır.

İşaretleme süresince ddNTP konulan tüpler 37°C'deki ısıtıcı blokta preinkübasyona tabi tutulur. İşaretleme süresi biter

bitmez içeriği 15.5 µL olan işaretleme karışımından 3.6 µL alınıp A tüpüne konarak karıştırılır. Aynı şekilde C, G ve T ile işaretli tüplere de aynı hacimde eklenerek karıştırılır. Bu dört tüp santrifüje konularak 5-10 saniye döndürülür ve tekrar 37°C'ye alınarak 5 dakika bekletilir. Son iki işlem mümkün olduğu kadar kısa süre içerisinde yapılır. Sonlandırma süresinin bitiminde her tüpe 4 µl stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durdurulur. Kısa süreli hızlı döndürmeden sonra, 95°C'de 5 dakika denatüre edilen örnekler önceden hazırlanmış poliakrilamid-üre jeline applike edilir. ^(61,72)



Şekil 14: DNA dizi analizindeki basamakların şematik görünümü.

3.3.7.5. Poliakrilamid-üre Jel Elektroforezi (PAGE)

Jel hazırlanmasında bir çift cam kullanılır. Kalınlığı 3 mm olan camların boyutları 33x38 ve 33x40 cm'dir. Deterjanla çok iyi yıkanmış ve etil alkol ile silinmiş bu camların arasına 0.4 mm kalınlığında ve 1 cm eninde polikarbonat "şeritler" yerleştirilir. Bunlar camın alt, sağ ve sol tarafına gelecek şekilde ayarlanarak plastik yapıştırıcı ile etrafı sarılır, ya da %1'lik agaroz ile yapıştırılıp kenarlardan kısıkaç ile sıkıştırılır. Camların üst kısmı farklı uzunluklarda olup jel dökerken uzun olan alt tarafa yatay düzlemle 45° açı oluşturacak şekilde ayarlanır. Hazırlanan jel buradan iki cam arasına dökülerek doldurulur. (18,90)

3.3.7.5.1. Jel hazırlanması:

Akrilamide/Bisakrilamide: 19:1 oranında karıştırılır. İki yüz gram karışım üzerine 352 mL saf steril su ilave edilerek manyetik karıştırıcı ile tamamen çözünmesi sağlanır. Bu %40'luk stok çözelti +4°C'de uzun süre saklanabilir. Bu çözeltiden 10.5 mL alınıp üzerine 10 mL 10xTBE tamponu (1 M Tris, 1 M Borik asit, 20 mM EDTA Na₂; pH:8.3), 25 mL saf su ve 29.4 gr üre konarak manyetik karıştırıcıda çözününceye kadar karıştırılır veya jel hazırlanırken tartılarak aşağıdaki gibi hazırlanır.

Poliakrilamid jel'in içeriği:

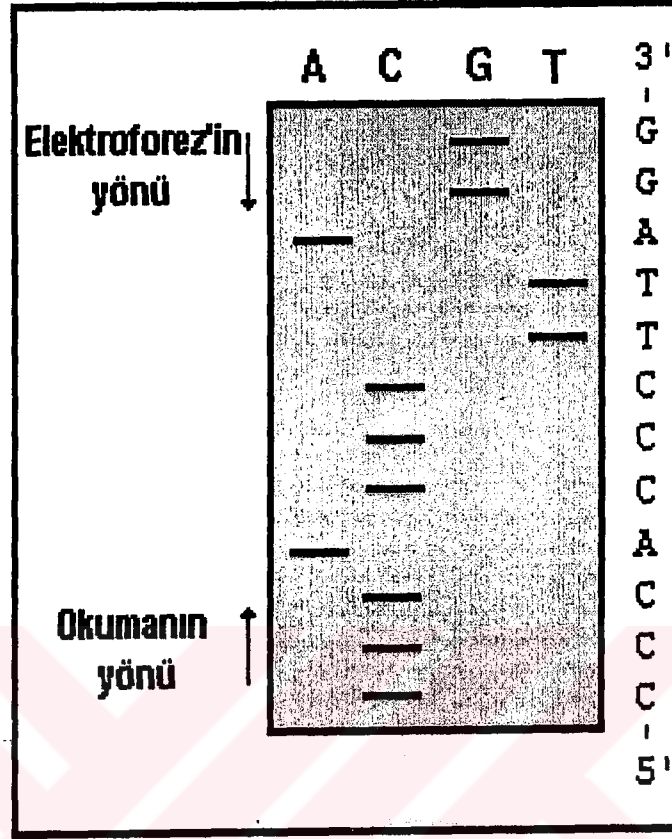
Akrilamide	6.33 g
Bisakrilamide	0.33 g
Üre	29.40 g
10xTBE Tamponu	10.50 mL
Distile su	36.50 mL

Yukardaki maddeler manyetik karıştırıcı yardımıyla tamamen çözülür ve whatman kağıt ile süzülerek plastik bir şişeye transfer edilir. Bu şişeye 330 µL taze hazırlanmış %10'luk Amonyum persulfat ve 33 µL TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyl ethylene diamine) eklenir. Amonyum persulfat saf suda çözülür, en fazla bir hafta kullanılır. Bu jel iki cam arasına hava kabarcığı

girmemesine dikkat edilerek dökülür. Eğer kabarcık girmişse cam yere dikey olarak tutulur ve kabarcıkların çıkması beklenir, ve tekrar 45°C açı yapacak şekilde konularak tarak bu iki cam arasına ters olarak yerleştirilir. Camların üst kısmı kışkaçlarla sıkıştırılarak jelin polimerleşmesi beklenir. Bir eppendorf tüpüne yaklaşık 1 mL jel çözeltisinden alınarak 15-20 dakika sonra polimerleşme kontrol edilir. Polimerleşme gerçekleştikten sonra jel kullanıma hazırdır. Eğer jel hazırlama aşamasında erken polimerize oluyor ise (5-6 dakika içerisinde) amonyum persulfat konsantrasyonu azaltılır, polimerleşme zamanı 15 dakikadan fazla ise artırılır. (18,90)

3.3.7.5.2. Jel Elektrofrez:

Önceden hazırlanan jelin üst kısmına koyduğumuz kışkaçlar ve tarak çıkarılır, alt kısımdaki bant sökülerek dikey elektrofrez tankına yerleştirilir. Boyu kısa olan cam cihazdan tarafa getirilerek yandaki vidalarla sabitleştirilir. Cihazın alt ve üst rezervuarına 1X TBE tampon konulur. Jelin tampon ile temas ettiği yerde oluşan hava kabarcıkları, kristalleşen üre ve akrilamid jel artıkları plastik bir pastör pipeti kullanılarak temizlenir. Jelin üst kısmından ayrılan tarak bu sefer dişleri jele hafifçe bastırılarak küçük kışkaçlarla sabitleştirilir. Stop solüsyonundan jelin üst kısmında oluşan kuyucuklara otomatik pipetle biri dolu diğeri boş olmak üzere ardışık olarak birer μL uygulanır. Yüksek voltaj güç kaynağına bağlanan jel elektrofrez cihazına 75 W (~1500 Volt, 50 mA) akım yüklenir. Örnekleri applike etmeden 1-1.5 saat camların ısınması sağlanır. Stop solüsyonu içindeki bromfenol mavisinin jeldeki hareketi gözlenir. Her örnek için hazırlanan A, C, G ve T tüpleri 95°C'de 5 dakika denatüre edilir. Bu sürede güç kaynağı kapatılarak tarak dişleri arasında oluşan hava kabarcıkları temizlenir. Denatürasyonun ardından 95°C'den alınan bu 4 tüp buz içerisine daldırılır. A tüpünden alınan 2.5-3.0 μL 'lik örnek jele applike edilir. Sırasıyla aynı miktarda C, G ve T tüplerinden alınarak applike edilir. Tekrar güç kaynağı açılarak aynı miktarda akım üç saat uygulanır (Şekil 15). (61,90)



Şekil 15. Poliakrilamid jel elektroforezinin şematik görünümü.

3.3.7.5.3. Tespit (Fixing)

Elektroforez bitiminde güç kaynağı kapatılarak cam aletten ayrılır. Çeşme suyu altında 5 dakika soğutulur. Birleşik olan camlar bir bıçak yardımıyla ayrılır. Jeli üzerinde taşıyan cam, bir kap içerisine alınarak üzerine tespit solüsyonu (%10 asetik asit, %12 Metanol) eklenir. Tespit sırasında jel büyüklüğünde bir tane Whatman 3 kağıdı kesilir. 15 dakika süren tespit işlemi tamamlanınca çözelti aspire edilerek alınır. Cam ve jel hafifçe eğilir, üzerindeki fazla solüsyon akıtılır. Kesilen Whatman kağıdı jel üzerine kapatılıp kağıt kaldırılarak ters çevrilip jelin üste gelmesi sağlanır.⁽⁹⁰⁾

3.3.7.5.4. Kurutma ve Otoradyogram

Whatman kağıdı üzerine alınan jel, ince naylon film ile kaplanarak vakuma bağlı jel kurutucusunda 80°C de 1 saat kurutulur. Naylon film ayrılarak, jel kaset içerisine

yerleştirilip üzerine uygun büyüklükte röntgen filmi konarak bir gece ekspozite edildi. Filmin banyosu otomatik banyo cihazı kullanılarak yapılır.⁽¹⁸⁾

3.3.7.5.5. Değerlendirme

Film üzerinde elde edilen görüntü β globin gen dizisi ile kontrol edilir. Bir nükleotidin diğerine değişimi, eksilmesi veya yeni bir nükleotidin araya girmesi gibi değişimlerin varlığı kontrol edilir (Şekil 16).⁽⁹⁰⁾



Şekil 16: Otoradyografi ve baz dizisinin değerlendirilmesi.

4. BULGULAR

4.1. ANTAKYA ÖRNEKLERİ

Ç.Ü.Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D ve Antakya Devlet Hastanesi tarafından ortaklaşa yürütülen Antakya yöresinde evlilik öncesi Talasemilerin taranması projesi kapsamında yapılan testlerle $MCV \leq 79$ olan ve β talasemi fenotipi şüpheli 213 örnek çalışmaya alındı. Hematolojik verileri Otomatik kan sayım cihazında çalışılan örneklerin ortalama \pm standart deviasyonları (ORT \pm SD) Tablo XIV'de, hemoglobin elektroforezi sonuçları ise Tablo XV'de verilmiştir.

Tablo XIV: Antakya örneklerinin hematolojik verileri.

	Hb g/dL	RBC $10^{12}/L$	Hct %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	HbA ₂ %	HbF %
ORT \pm SD n=213	11.7 \pm 6.5	5.32 \pm 1.04	38.5 \pm 13.8	71.3 \pm 8.7	20.4 \pm 3.5	28.5 \pm 4.0	2.6 \pm 1.1	2.3 \pm 3.8

Tablo XV: Antakya örneklerinde Hemoglobin Elektroforezi sonuçları.

Hemoglobin tipi	n	%
AA	191	89.7
AS	10	4.7
SS	5	2.3
AF	2	0.9
AE	2	0.9
SF	2	0.9
F	1	0.5
Toplam	213	100.0

Bu örneklerden $MCV \leq 79$, $HbA_2 \geq 3.7$ ve DNA izolasyonu için yeterli miktarda kanı olan 33 örneğin DNA'ları Fenol-kloroform ekstraksiyonu yöntemiyle izole edildi. Yaşları 1 ile 42 arasında (22.2 ± 7.6) değişen, 16'sı erkek (%48,5) 17'si kadın (%51.5) ve β -talasemi taşıma şüphesi bulunan bu örneklerin hematolojik verilerinin ortalama ve standart sapmaları Tablo XVI'da gösterilmiştir. Bu örneklerden elde edilen DNA'ların konsantrasyon ve verimleri Tablo XVII'de gösterilmiştir.

Tablo XVI:β-talasemi şüphesi olan örneklerin hematolojik verileri.

	Hb g/dL	RBC 10 ¹² /L	Hct %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	HbA ₂ %	HbF %
ORT±SD n=33	11.3±1.5	5.64±0.8	38.5±6.1	68.3±3.8	19.8±1.6	28.9±2.3	4.1±0.6	1.9±0.6

Tablo XVII: Antakya örneklerinden elde edilen DNA'ların konsantrasyon ve verimleri.

NO	DNA NO	Konsantrasyon µg/mL	Verim
1	1182	427	1.4
2	1187	285	1.4
3	1195	750	1.6
4	1255	560	1.7
5	1256	785	1.5
6	1259	285	1.6
7	1264	292	1.5
8	1272	625	1.5
9	1279	775	1.6
10	1309	1547	1.4
11	1324	275	1.5
12	1334	790	1.3
13	1337	912	1.6
14	1343	1130	1.5
15	1344	350	1.5
16	1346	720	1.3
17	1347	395	1.3
18	1348	520	1.5
19	1351	675	1.7
20	1353	645	1.4
21	1355	455	1.9
22	1357	936	1.8
23	1360	397	1.4
24	1364	287	1.4
25	1468	495	1.5
26	1479	586	1.6
27	1481	625	1.4
28	1484	486	1.5
29	1516	1092	1.4
30	1522	902	1.5
31	1574	335	1.5
32	1619	240	1.9
33	1720	617	2.1
	ORT±SD	611.3±294.2	1.52±0.17

DNA'ları izole edilen bu örneklerin mutasyon tipleri ise ARMS yöntemiyle yaptığımız çalışmalar sonucunda saptandı. Akdeniz bölgesinde sık görülen çeşitli mutasyonları heterozigot

olarak taşıyan bu kişilerin mutasyon tipleri Tablo XVIII'de gösterilmiştir. IVS 1-110 (G→A) mutasyonu 21 kişide (%63.6), IVS 1-1 (G→A) mutasyonu 6 kişide (%18.2), Cd 39 (C→T) mutasyonu 2 kişide (%6.1), IVS 1-6 (C→T) mutasyonu 2 kişide (%6.1), IVS 2-1 (G→A) mutasyonu 2 kişide (%6.1) saptandı.

Tablo XVIII: Antakya örneklerinde saptanan mutasyon tipleri.

NO	DNA NO	1. Kromozom	2. Kromozom
1	1182	IVS 1-110	N*
2	1187	IVS 1-110	N
3	1195	IVS 1-110	N
4	1255	IVS 1-110	N
5	1256	IVS 1-1	N
6	1259	IVS 1-110	N
7	1264	IVS 1-110	N
8	1272	IVS 2-1	N
9	1279	IVS 1-6	N
10	1309	IVS 1-1	N
11	1324	IVS 1-110	N
12	1334	IVS 1-110	N
13	1337	Cd 39	N
14	1343	IVS 1-110	N
15	1344	IVS 2-1	N
16	1346	IVS 1-110	N
17	1347	IVS 1-110	N
18	1348	IVS 1-110	N
19	1351	IVS 1-110	N
20	1353	IVS 1-110	N
21	1355	Cd 39	N
22	1357	IVS 1-110	N
23	1360	IVS 1-1	N
24	1364	IVS 1-1	N
25	1468	IVS 1-6	N
26	1479	IVS 1-110	N
27	1481	IVS 1-110	N
28	1484	IVS 1-110	N
29	1516	IVS 1-110	N
30	1522	IVS 1-1	N
31	1574	IVS 1-1	N
32	1619	IVS 1-110	N
33	1720	IVS 1-110	N

*Normal kromozomu göstermektedir

4.2.KAYSERİ ÖRNEKLERİ

Kayseri örnekleri E.Ü.Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı A.B.D.'da β talasemi fenotipleri belirlenen 31 kişiden oluşuyordu. Hasta çocuklar ile bunların anne-babalarından oluşan bu gruptaki kişilerin 14'ü erkek (%45.2), 17'si kadındı, yaşları 4-48 yıl (22.1 \pm 12.7) arasında değişiyordu. Örneklerin hematolojik verileri ORT \pm SD olarak Tablo XIX'da, hemoglobin elektroforezi sonuçları 27 kişide HbAA (%87.1), 3 kişide HbF (%9.7) ve 1 kişide HbAF (%3.2) olarak bulunmuş ve Tablo XX'de verilmiştir. DNA'ları izole edilen örneklerin konsantrasyon ve verimleri Tablo XXI'de verilmiştir.

Tablo XIX: Kayseriden gönderilen β -talasemili hasta ve yakınlarına ait örneklerin hematolojik verileri.

	Hb g/dL	RBC 10 ¹² /L	Hct %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	HbA ₂ %	HbF %
ORT \pm SD n=31	9.4 \pm 2.9	4.31 \pm 1.66	36.2 \pm 13.9	86.1 \pm 8.3	24.9 \pm 11.8	28.4 \pm 10.3	3.2 \pm 0.9	6.6 \pm 14.6

Tablo XX: Kayseri örneklerinde Hb Elektroforezi sonuçları.

Hemoglobin tipi	n	%
AA	27	87.1
F	3	9.7
AF	1	3.2
Toplam	31	100.0

Bu örneklerin β talasemi mutasyon tipleri ARMS yöntemiyle saptandı ve 31 örnekte toplam 41 β talasemik kromozomun mutasyonu belirlendi. Bu kromozomlardan 28 tanesi (%68.3) IVS 1-110 (G \rightarrow A), 8 tanesi Cd 8 (-AA) (%19.5), 2 tanesi IVS 1-6 (C \rightarrow T) (%4.9), 2 tanesi Cd 5 (-CT) (%4.9) ve 1 tanesi IVS 1-1 (G \rightarrow A) (%2.4) mutasyonunu taşıyordu.

Tablo XXI: Kayseri örneklerinde DNA konsantrasyon ve verimleri.

NO	Örnek	Konsantrasyon µg/mL	Verim
1	HS	620	1,5
2	ÜS	640	1,5
3	RS	500	1,5
4	FA	360	1,5
5	AA	360	1,7
6	MA	905	1,5
7	FA	680	1,7
8	FA	293	1,5
9	FB	500	1,6
10	AB	370	1,5
11	BB	245	1,9
12	CC	145	1,5
13	KC	637	1,4
14	BC	242	1,9
15	MC	105	1,3
16	AT	367	1,6
17	ZT	500	1,7
18	SÇ	478	1,8
19	NÇ	533	1,7
20	SÇ	214	1,7
21	EK	765	1,7
22	GK	103	2,2
23	ME	255	1,5
24	ME	277	1,6
25	CE	340	1,7
26	EÖ	440	1,7
27	RÖ	400	1,7
28	MÖ	135	2,7
29	SÖ	245	1,6
30	YE	607	1,6
31	GE	468	2,0
	ORT±SD	400.1±211.1	1.65±0.26

Buna göre IVS 1-110 (G→A) mutasyonu toplam 20 kişide (%64.5), Cd 8 (-AA) mutasyonu 4 kişide (%12.9), IVS 1-6 (C→T) mutasyonu 2 kişide (%6.4), Cd 5 (-CT) mutasyonu 2 kişide (%6.4), IVS 1-1 (G→A) mutasyonu 1 kişide (%3.2) saptanmıştır. Kayseri örneklerinde Antakya örneklerinden farklı olarak homozigot olgular da bulunmaktaydı. IVS 1-110 (G→A) mutasyonu için 8 kişi (%25.8), Cd 8 (-AA) mutasyonu için 2 kişi (%6.4) homozigot idi. Geriye kalan 21 kişi (%67.7) ise bu saptadığımız

mutasyonlardan biri için heterozigot idi. Kayseri örneklerinde saptanan bu mutasyonlar Tablo XXII'de gösterilmiştir.

Tablo XXII: Kayseri örneklerinde saptanan mutasyon tipleri.

NO	ÖRNEK	1. Kromozom	2. Kromozom
1	HS	IVS 1-110	N
2	ÜS	IVS 1-110	N
3	RS	IVS 1-110	IVS 1-110
4	FA	IVS 1-110	N
5	AA	IVS 1-110	IVS 1-110
6	MA	IVS 1-110	IVS 1-110
7	FA	IVS 1-110	N
8	FA	IVS 1-110	N
9	FB	IVS 1-110	N
10	AB	IVS 1-110	N
11	BB	IVS 1-110	IVS 1-110
12	CC	IVS 1-110	N
13	KC	IVS 1-110	N
14	BC	IVS 1-110	IVS 1-110
15	MC	IVS 1-110	IVS 1-110
16	AT	IVS 1-110	N
17	ZT	IVS 1-110	IVS 1-110
18	SÇ	IVS 1-6	N
19	NÇ	IVS 1-110	N
20	SÇ	IVS 1-6	N
21	EK	IVS 1-110	N
22	GK	IVS 1-110	IVS 1-110
23	ME	Cd 8	N
24	ME	Cd 8	N
25	CE	Cd 8	Cd 8
26	EÖ	Cd 8	N
27	RÖ	Cd 8	N
28	MÖ	Cd 8	Cd 8
29	SÖ	IVS 1-1	N
30	YE	Cd 5	N
31	GE	Cd 5	N

4.3.İZMİR ÖRNEKLERİ

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji B.D.'da β talasemi fenotipleri belirlenmiş kişilere ve yakınlarına ait örneklerin DNA'ları doğrudan fenol-kloroform ekstraksiyonu yöntemiyle izole edildi, örneklerden elde edilen DNA'ların konsantrasyon ve verimleri Tablo XXIII'de verilmiştir.

Tablo XXIII: İzmir örneklerinden elde edilen DNA'ların konsantrasyon ve verimleri.

NO	Örnek	Konsantrasyon $\mu\text{g/mL}$	Verim
1	GK	390	1,5
2	ÖÖ	658	1,6
3	NU	1142	1,7
4	MB	705	1,7
5	İC	308	1,6
6	ÜÖ	655	1,7
7	ÖÜ	1065	1,7
8	RY	385	1,6
9	CA	570	1,6
10	TE	510	1,6
11	ZB	608	1,6
12	DÇ	283	1,5
13	HÇ	375	1,7
14	HB	484	1,5
15	EB	536	1,7
16	ŞB	475	1,6
17	OK	635	1,7
18	HK	524	1,8
19	CK	230	1,7
ORT \pm SD		554.6 \pm 235.8	1.63 \pm 0.08

Örneklerin β talasemi mutasyon tipleri dokuz mutasyon için ARMS yöntemiyle tarandı. ARMS yöntemiyle mutasyon tipleri belirlenemeyen üç örneğin mutasyonu DNA Dizi Analizi yöntemi ile saptandı. DNA Dizi Analizi ile saptanan 2 örneğin mutasyonu promotor yörede bulunan -30 (T \rightarrow A) ve biri de yine aynı bölgede bulunan -28 (A \rightarrow G) mutasyonuydu. Ege bölgesinden gelen örneklerde hem homozigot hem de çifte heterozigot olgular saptandı, 2 kişi IVS 1-110 ve 2 kişi de -30 (T \rightarrow A) mutasyonunu için homozigottu. Kromozomlarında iki farklı mutasyon taşıyan

yani çifte heterozigot olan 7 kişi vardı, geriye kalan 8 kişi ise çeşitli mutasyonlar için heterozigot bireylerdi. (Tablo XXIV).

Tablo XXIV: İzmir örneklerinde ARMS ve DNA Dizi Analizi yöntemleriyle saptanan mutasyon tipleri.

NO	Örnek	1. Kromozom	2. Kromozom
1	GK	Cd 8	N
2	ÖÖ	Cd 8	Cd 5
3	NU	IVS 1-110	-28 †
4	MB	IVS 1-1	N
5	İC	IVS 1-110	Cd 39
6	ÜÖ	IVS 1-110	N
7	ÖÜ	IVS 1-110	IVS 1-1
8	RY	IVS 1-110	IVS 2-745
9	CA	IVS 1-6	IVS 2-745
10	TE	IVS 1-110	Cd 39
11	ZB	IVS 2-1	N
12	DÇ	-30 †	-30 †
13	HÇ	-30 †	-30 †
14	HB	IVS 1-110	N
15	EB	IVS 1-110	N
16	ŞB	IVS 1-110	IVS 1-110
17	OK	IVS 1-110	N
18	HK	IVS 1-110	N
19	CK	IVS 1-110	IVS 1-110

† DNA Dizi Analizi ile saptanan mutasyonlar.

İzmir'den gelerek bölümümüze başvuran iki aileye ise Prenatal Tanı uygulandı. Bu ailelerin her ikisi de IVS1-110 mutasyonu için homozigot olan β talasemi Major fenotipi almış hasta çocuklara sahipti. Ç.Ü.Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum A.B.D.'da annelerden alınan Koryonik villus'ların (CVS) DNA'ları izole edildikten sonra β talasemi mutasyon tipleri ARMS yöntemiyle belirlendi. Birinci aileye ait olan CVS-B IVS 1-110 mutasyonu için homozigot olarak belirlendi, ailenin isteğiyle tıbbi abortus uygulandı. İkinci aileye ait olan CVS-K ise anne babasından sağlam olan kromozomları almıştı, hasarlı kromozom taşıymıyordu (Tablo XXV).

Tablo XXV: Prenatal tanı uygulanan ailelerde mutasyon tipleri.

Aileler	1.Kromozom	2.Kromozom
EB (Anne)	IVS 1-110	N
HB (Baba)	IVS 1-110	N
ŞB (çocuk)	IVS 1-110	IVS 1-110
CVS B	IVS 1-110	IVS 1-110
HK (Anne)	IVS 1-110	N
OK (Baba)	IVS 1-110	N
CK (çocuk)	IVS 1-110	IVS 1-110
CVS K	N	N

Bu üç örnek grubunda toplam 83 kişinin mutasyonları belirlendi. Belirlenen β talasemik kromozom sayısı 104 idi. Her üç yörede de en sık karşılaşılan IVS 1-110 mutasyonu oldu. Her üç yöre için çalışılan kromozom sayıları ve sıklıkları Tablo XXVI'da verilmiştir.

Tablo XXVI: Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde çalışılan kromozomlarda saptanan β talasemi mutasyonları ve sıklıkları.

MUTASYON TİPİ	ANTAKYA ÖRNEKLERİ		KAYSERİ ÖRNEKLERİ		İZMİR ÖRNEKLERİ		BÜTÜN ÖRNEKLER	
	n	%	n	%	n	%	n	%
IVS1-110	21	63.7	28	68.3	14	46.7	63	60.6
IVS 1-1	6	18.2	1	2.4	2	6.7	9	8.6
Cd 39	2	6.0	-	-	2	6.7	4	3.8
IVS 1-6	2	6.0	2	4.9	1	3.3	5	4.8
IVS 2-1	2	6.0	-	-	1	3.3	3	2.9
Cd 8	-	-	8	19.5	2	6.7	10	9.6
Cd 5	-	-	2	4.9	1	3.3	3	2.9
IVS2-745	-	-	-	-	2	3.3	2	1.9
-30	-	-	-	-	4	13.3	4	3.8
-28	-	-	-	-	1	3.3	1	0.9
TOPLAM	33	100.0	41	100.0	38	100.0	104	100.0

Mutasyonları belirlenen 83 örnekten 62'si (%74.8) heterozigot olgulardı. Homozigot olgu sayısı 15 (%18.0) ve çifte heterozigot olgu sayısı 6 (%7.2) idi (Tablo XXVII).

Tablo XXVII: Bütün olgularda heterozigot, homozigot ve çifte heterozigot olgu sayısı ve sıklıkları.

ÖRNEKLER	HETEROZİGOT	%	HOMOZİGOT	%	ÇİFTE HETEROZİGOT	%
ANTAKYA n=33	33	39.7	-	-	-	-
KAYSERİ n=31	21	25.3	10	12.0	-	-
İZMİR n=19	8	9.6	5	6.0	6	7.2
TOPLAM n=83	62	74.8	15	18.0	6	7.2

Bu örneklere ait hematolojik veriler eşleştirilmiş örnekler için yapılan T-testiyle karşılaştırmalı olarak Tablo XXVIII'de verilmiştir. Bu veriler SPSS İstatistik Yazılım programı kullanılarak elde edildi (SPSS/PC, SPSS Inc, Chicago II). Mutasyon tiplerini belirlediğimiz heterozigot örneklerin mutasyon tiplerine göre hematolojik parametreleri Tablo XXIX'da verilmiştir. Heterozigot, homozigot ve çifte heterozigot olguların mutasyon tipleri ve görülme sıklıkları Tablo XXX'da verilmiştir.

Tablo XXVIII: Heterozigot olgularla homozigot olguların hematolojik verilerinin karşılaştırılması.

	Hb g/dL	RBC 10 ¹² /L	Hct %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL	HbA ₂ %	HbF %
HETEROZİGOT ÖRNEKLER ORT±SD n=62	11.0±1.9†	5.48±1.11†	40.4±8.5†	74.0±8.6†	20.4±2.4†	27.5±3.3††	3.9±0.7†	3.1±6.5††
HOMOZİGOT ÖRNEKLER ORT±SD n=15	7.4±2.7†	2.77±0.99†	24.1±10.0†	92.4±10.4†	32.5±18.8†	34.5±16.3††	2.5±0.9†	10.1±21.4††

Eşleştirilmiş örnekler için yapılan t-testiyle:† p<0.05 ve †† p<0.5

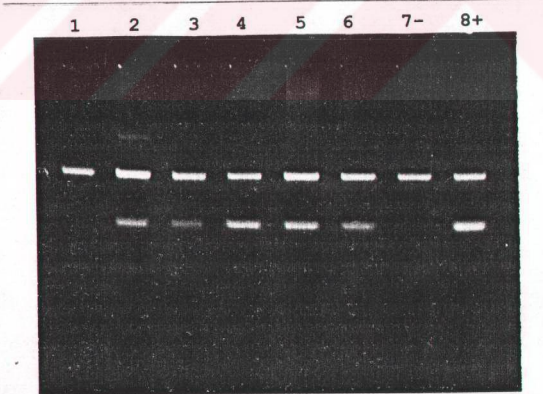
Tablo XXIX: Heterozigot örneklerde mutasyon tiplerine göre hematolojik verilerin ORT±SD'si.

MUTASYON TİPİ	Hb g/dL ORT±SD	RBC 10 ¹² /L ORT±SD	Hct % ORT±SD	MCV fL ORT±SD	MCH pg ORT±SD	MCHC g/dL ORT±SD	HbA ₂ % ORT±SD	HbF % ORT±SD
IVS1-110 n=33	10.7±1.9	5.38±1.07	39.6±7.8	74.1±8.8	20.3±2.3	27.3±2.7	3.9±0.7	2.7±4.5
IVS 1-1 n=7	12.1±1.1	6.01±0.74	41.5±7.2	68.7±4.7	20.4±2.8	29.9±5.2	4.1±0.3	1.8±0.2
Cd 8 n=4	10.3±2.4	5.26±1.7	42.2±14.2	79.9±1.5	20.3±2.8	25.5±4.1	3.8±0.6	1.7±0.2
IVS 1-6 n=4	11.7±3.2	5.38±1.91	41.6±14.9	77.9±10.1	22.6±2.9	29.2±3.7	3.0±0.8	12.2±20.3
IVS 2-1 n=2	9.4±0.7	5.15±0.19	33.9±4.0	65.7±5.3	18.3±0.7	27.9±1.0	4.8±0.5	1.5±0.0
Cd 39 n=2	12.1±2.1	6.37±1.13	43.8±9.3	68.5±2.5	19.0±0.0	27.8±0.9	5.1±0.3	1.5±0.0
Cd 5 n=2	10.7±0.4	5.41±0.43	47.0±1.9	86.9±3.4	19.9±0.7	22.8±0.0	4.2±0.0	1.7±0.3

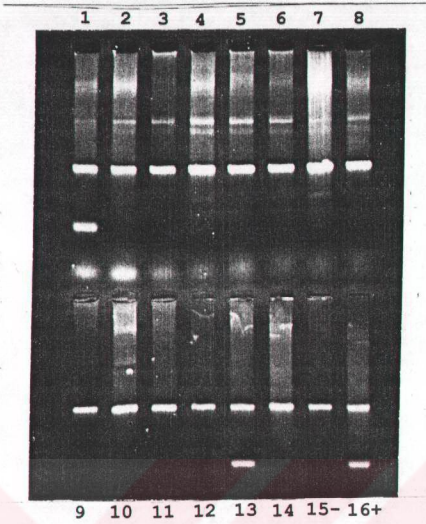
Tablo XXX: Heterozigot, homozigot ve çifte heterozigot olguların mutasyon tipleri ve görülme sıklıkları.

HETEROZİGOT ÖRNEKLER			HOMOZİGOT veya ÇİFTE HETEROZİGOT ÖRNEKLER		
MUTASYON TİPİ	n	%	MUTASYON TİPİ	n	%
IVS1-110	38	61.3	IVS1-110/IVS1-110	10	47.6
IVS 1-1	8	12.9	Cd 8/ Cd 8	2	9.5
Cd 8	5	8.1	-30/-30	2	9.5
IVS 1-6	4	6.5	IVS1-110/Cd 39	2	9.5
IVS 2-1	3	4.8	IVS1-110/-28	1	4.7
Cd 39	2	3.2	IVS1-110/IVS2-745	1	4.7
Cd 5	2	3.2	IVS1-110/IVS1-1	1	4.7
			Cd 8/Cd 5	1	4.7
			IVS1-6/IVS2-745	1	4.7
Toplam	62	100.0	Toplam	21	100.0

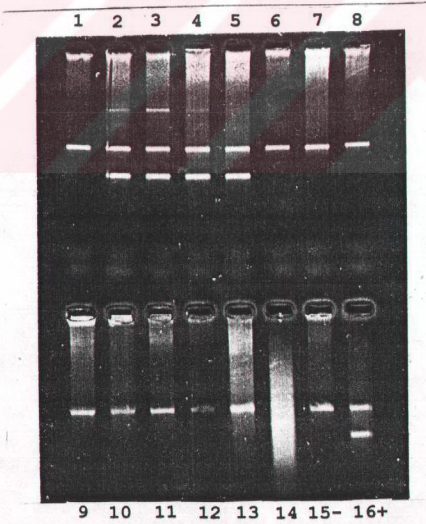
Bu mutasyon tiplerini belirlemek için ARMS yöntemi kullanıldı. Bu yöntemle belirlediğimiz örneklerle ait resimlerden bazıları aşağıda verilmiştir. Şekil 17'de IVS1-110 mutant primerle yapılan 6 örneğe ait ARMS amplifikasyonunun resmi görülmektedir. Şekil 18, 19, 20 ve 21'de sırasıyla IVS1-6 mutant, Cd 8 mutant, IVS2-1 mutant ve IVS2-745 mutant primerlerle yapılan çeşitli örneklerle ait ARMS amplifikasyon resimleri görülmektedir. Şekil 22'de İzmir'den gelerek bölümümüze başvuran ve prenatal tanı uygulanan ailede anne (EB), baba (HB), çocuk (ŞB) ve Koryonik Villus'a (CVS B) ait IVS1-110 mutant ve normal primerle yapılan ARMS amplifikasyonunun resmi izlenmektedir. Şekil 23 de ise 3 örnekte yapılan DNA Dizi Analizinde elde edilen otoradyografin resmi verilmiştir. İlk örnek -28 (A→G), 3. örnek -30 (T→A) mutasyonunu taşımaktadır; 2. örnek ise normal kromozoma sahiptir.



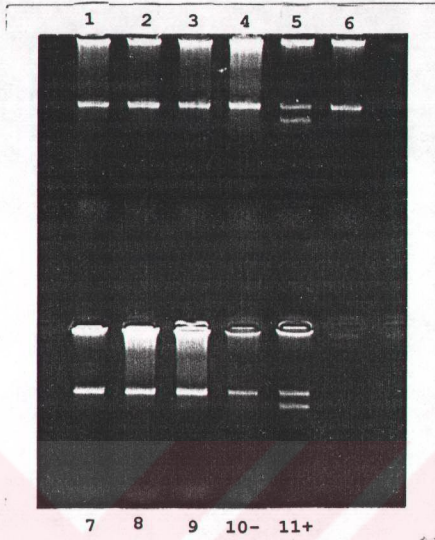
Şekil 17: IVS1-110 mutant primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. 1. kuyu negatif (-), 2, 3, 4, 5, 6. kuyular pozitif (+) örnekler; 8. kuyu (-) Kontrol, 9. kuyu (+) Kontrol.



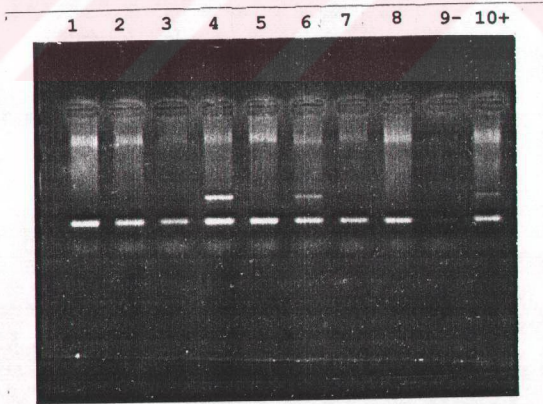
Şekil 18: IVS1-6 mutant primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. 1. ve 13. kuyu (+), 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14. kuyular (-) örnekler; 15. kuyu (-) Kontrol, 16. kuyu (+) Kontrol.



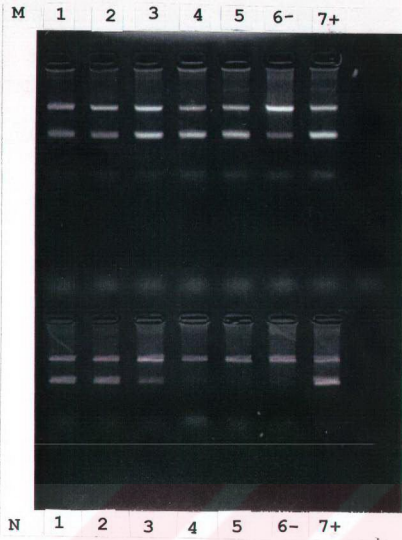
Şekil 19: Cd 8 mutant primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. 2, 3, 4, ve 5. kuyu (+), 1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13. kuyular (-) örnekler; 14. kuyuda amplifikasyon yok, 15. kuyu (-) Kontrol, 16. kuyu (+) Kontrol.



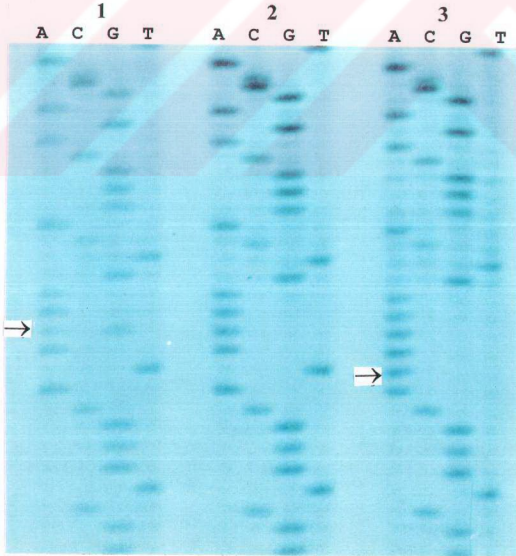
Şekil 20: IVS2-1 mutant primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. 5. kuyu (+), 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9. kuyular (-) örnekler; 10. kuyu (-) Kontrol, 11. kuyu (+) Kontrol.



Şekil 21: IVS2-745 mutant primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. 4 ve 5. kuyu (+), 1, 2, 3, 5, 7, 8. kuyular (-) örnekler; 9. kuyu (-) Kontrol, 10. kuyu (+) Kontrol.



Şekil 22: İzmir'den gelen B. ailesinde prenatal tanı: IVS1-110 mutant ve normal primer'le yapılan ARMS çalışmasının resmi. Üst bölüm, IVS1-110 (m) 1 (H.B.), 2 (E.B.), 3 (Ş.B.), 4 (CVS₁ B.), ve 5. (CVS₂ B.) kuyu (+), 6. kuyu (-) Kontrol, 7. kuyu (+) Kontrol. Alt bölüm, IVS1-110 (n) 1 (H.B.), 2 (E.B.), 3 (Ş.B.) kuyu (+), 4 (CVS₁ B.), ve 5. (CVS₂ B.) (-); 6. kuyu (-) Kontrol, 7. kuyu (+) Kontrol.



Şekil 23: β geni 1. bölgenin sekans resmi. 108 ve 109 no'lu primerlerle ssDNA halinde PCR'la amplifiye edilen örneklerin 410 no'lu sekans primeri ile baz dizisi belirlenmiştir. 1. örnek -28 (A→G) mutasyonunu bir kromozomunda taşımakta, 3. örnek -30 (T→A) mutasyonunu her iki kromozomunda taşımakta (okla işaretli), 2. örnek ise normal kromozoma sahiptir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

β Talasemiler Dünya'da olduğu gibi ülkemizde de yaygın sıklıkta görülen kalıtsal hastalıklardır. Homozigot ya da çifte heterozigot tutulmada klinik bulgu vermeyen hafif anemiden genç yaşta ölümle sonuçlanabilen transfüzyona bağımlı ağır anemiye kadar değişebilen klinik heterojineteğe sahiptir. Otozomal resesif geçişli olan bu hastalık grubunda asıl neden β globin geninde daha çok nokta mutasyonlar sonucunda oluşan hasarlardır. Şimdiye kadar 140'ın üzerinde nükleotid yer değişimi, delesyonu ve insersiyonu sonucu oluşan β gen mutasyon tipi tanımlanmıştır. Bu mutasyonlar β geni üzerindeki yerlerine göre gen ekspresyonunun çeşitli aşamalarını etkilemekte ve β globin zincirinin oluşumunu bozmaktadırlar. β globin zincir sentezinin hiç oluşmadığı mutasyonlar β^0 talasemi fenotipine neden olurken sentezin az ya da hasarlı olması β^+ talasemi fenotipine yol açar. (8,15,19)

β talasemik gen için heterozigot taşıyıcı bireyler morfolojik olarak anormal eritrositlere sahip olmalarına rağmen klinik yakınmaları yoktur ancak bazı istisnaların dışında iki tane hasarlı kromozoma sahip homozigot ya da çifte heterozigot bireyler için mikrositik hemolitik bir anemi söz konusudur. Aneminin şiddetini ise daha çok taşınan mutasyon tipi belirlemektedir. Etkilenmiş kişiler klinik olarak orta şiddette seyreden Talasemi İntermediya ya da şiddetli anemi ile karakterize, sık kan transfüzyonuna gereksinim duyan Talasemi Major fenotipine sahiptirler. Günümüzde halen kesin tedavisi mümkün olmayan bu hastalıkta hasta kişiler oldukça pahalı ve riskli olan düzenli kan transfüzyonu programına alınmakta, vücutta birikerek ciddi komplikasyonlara neden olan demir miktarını azaltmak amacıyla demir bağlayıcı ajanlar kullanılmakta ve erken yaşta aşırı büyüyen dalak nedeniyle oluşan komplikasyonları önlemek için splenektomi yapılmaktadır. Bazı merkezlerde kemik iliği transplantasyonu çok iyi seçilmiş

ve erken yakalanmış olgularda denenmektedir; ancak mortalitenin %30 civarında olduğu bildirilmektedir. Deneysel aşamada bulunan bir başka tedavi yöntemi ise Hidroksiüre, Azasitidin gibi sitotoksik ajanlarla γ gen aktivasyonunu sağlayarak HbF miktarını artırmak şeklindedir; ancak henüz istenilen sonuçlara ulaşılabilmiş değildir. Bu yüzden yapılan çalışmalarla taşıyıcıların belirlenmesi, hastalığa neden olan mutasyonların moleküler düzeyde saptanması, genetik danışmanlık ve bilinçlendirme çalışmaları yapılması ve riskli ailelerde Prenatal Tanı uygulanması toplum sağlığı açısından çok büyük önem taşımaktadır. Bu şekilde hastalıktan etkilenmiş bireylerin doğumları önlenilecek; riskli ailelerin kendi tercihlerine göre taşıyıcı ya da normal çocuk sahibi olabilmeleri sağlanacaktır. Aynı zamanda hasta çocukların tedavisi için harcanan giderlerden de büyük oranda tasarruf söz konusu olacaktır. (2, 3, 9, 16, 26, 37, 39, 47, 56)

Türkiye'de β talasemilerin yaygın olarak görüldüğü bilinmektedir. Çukurova Bölgesinde yapılan çalışmalarda β talasemi sıklığı %3.7 gibi yüksek oranda bulunmuştur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda Ege bölgesinde, Bursa, Kayseri ve Trakya'da Talasemi olgularının bulunduğu anlaşılmıştır. Biz bu çalışmamızda Ç.Ü.Tıp Fakültesi ve Antakya Devlet Hastanesi tarafından ortaklaşa yürütülen protokol kapsamında Antakya yöresinde evlilik öncesi yapılan testlerle β talasemi taşıyıcılık oranlarının tam olarak saptanması ve moleküler düzeyde yapılacak çalışmalarla da hastalığa neden olan β talasemi mutasyonlarının belirlenerek sıklıklarının hesaplanmasını amaçladık. Çalışmamız sürerken Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi kliniklerinden gelen işbirliği teklifi üzerine Kayseri ve İzmir yöresinde fenotipleri belirlenen β talasemi olgularının genotipik tanımlarını belirledik. (5, 6, 59, 86, 88, 89)

Tablo XXXI: Normal populasyonda hematolojik veriler.

	Hb g/dL	RBC 10 ¹² /L	Hct %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL
KADIN ORT±SD	13.7±1.0	4.51±0.36	40.9±3.0	90.4±4.8	30.2±1.9	33.6±1.1
ERKEK ORT±SD	15.5±1.1	5.11±0.36	46.0±3.1	90.1±4.8	30.2±1.8	33.9±1.2

Tablo XIV'de Antakya'dan gelen 213 örneğe ait hematolojik veriler görülmektedir. Bu örnekler normal populasyonda saptanan hematolojik verilere (Tablo XXXI) göre MCV'si ve MCH'si düşük (MCV 60-75 fl, MCH 20-25 pg arasında) kişilerden alınmış kanlardan oluşuyordu. Bu örneklerin Antakya'dan bize gönderilmelerinin sebebi sadece β talasemik kromozomların araştırılması değil aynı zamanda HbS/ β talasemili olguların da belirlenebilmesini içeriyordu. HbS ve β talaseminin çifte heterozigot olarak bulunması en yaygın olarak Akdeniz toplumlarında görülür ve Orak Hücreli aneminin klinik görünümüne yakın bir hastalık halini oluşturur. Afrika kökenlilerde ve Amerikalı zencilerde daha az şiddette seyreden bir durumdur. Eritrositler morfolojik olarak hem HbS hem de β talaseminin özelliklerini taşırlar. Bu olgularda MCV ortalama 68 fL. ve MCH ortalama 20 pg. olarak bildirilmiştir. (28,44)

Arpacı'nın Antakya yöresinde β talasemi insidansının belirlenerek mutasyonların saptanmasına yönelik yaptığı tez çalışmasında Orak Hücreli aneminin yoğun olarak görüldüğü Samandağı Meydan köyünde taramaya alınan 80 kişide HbAS sıklığı %22.1 olarak bulunmuştur. Bu çalışmada 5 olguda HbS/ β talasemi, 2 tane β talasemi taşıyıcısı belirlenmiştir. Dot-Blot yöntemi kullanılarak 5 olguda IVS1-110 ve 2 olguda da CD 39 mutasyonu tanımlanmıştır. Yüregir ve arkadaşlarının Antakya ve çevre ilçelerinde yaptığı bir tarama sonucunda HbAS sıklığı %10.1 olarak bulunmuştur. Biz örneklerimizde HbS/ β talasemi olgusu belirlenemedi ancak Tablo XV'de verilen hemoglobin elektroforezi sonuçlarına göre 10 kişide HbAS (%4.7), 5 kişide HbSS (%2.3) bulundu. Bizim olgularımızda Yüregir ve arkadaşlarının ve Arpacı'nın tez çalışmasına göre daha az

sıklıkta HbAS görülme nedeni örneklerimizin özellikle MCV'si düşük olgulardan oluşuyor olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz; oysa HbAS'li olgularda MCV genellikle yüksektir. (4,8,9,86)

Çukurova bölgesinde Yüregir ve arkadaşları tarafından yapılan bir başka çalışmada ise sistematik olasılıklı örnekleme yöntemiyle seçilen 306 kişide β talasemi taşıyıcılığı % 3.9 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada heterozigot β talasemili kişilerin hematolojik verileri şu şekildedir; Hb: 11.5±1.3 g/dL, Rbc: 5.64±0.52 $10^{12}/L$, Hct: %40.8±5.0, MCV: 72.0±4.0 fL, MCH: 20.0±0.8 pg., MCHC: 28.5±2.0 g/dL, HbA₂: %4.67±0.47, HbF: %0.74±0.56. Kazazian'a göre heterozigot β talasemili kişilerde MCV 60-75 fL ve MCH 20-25 pg. arasında düşük; HbA₂ ise %3.7-7.0 arasında yüksektir. Tablo XVI'da MCV'deki düşüklüğün yanı sıra HbA₂'si yüksek olan β talasemik kromozom taşıma şüphesi olan 33 kişiye ait hematolojik veriler görülmektedir. DNA'sı izole edilerek β talasemik mutasyonları belirlenen bu olguların tümü bir β talasemik kromozom için heterozigottu. Bu olgularda Hb: 11.3±1.5 g/dL, Rbc: 5.64±0.8 $10^{12}/L$, Hct: %38.5±6.1, MCV 68.3±3.8 fL, MCH 19.8±1.6 pg. MCHC: 28.9±2.3 g/dL, HbA₂ %4.1±0.6 ve HbF: %1.9±0.6 idi. Bu sonuçlar hem Kazazian'ın verdiği kriterlerle hem de Yüregir'in bulgularıyla uyumludur. (37,86,88)

Kayseri'den gönderilen hasta ve hasta yakınlarına ait 31 örneğin hematolojik verileri Tablo XIX'da görülmektedir. Bu gruptaki değerleri Tablo XVI'da verilen heterozigot örneklerin hematolojik verileri ile karşılaştırdığımızda Hb, Rbc, Hct ve HbA₂ değerlerinin düşük, MCV, MCH ve HbF değerlerinin yüksek olduğu görülmektedir. Kayseri örneklerinde hem heterozigot (21 kişi) hem de homozigot (IVS 1-110 G→A mutasyonu için 8 kişi, Cd 8 -AA mutasyonu için 2 kişi) olgular saptandı. Tablo XXVIII'de heterozigot örneklerle homozigot örneklerin hematolojik verilerini karşılaştırmış ve birbirlerinden anlamlı olarak farklı değerlere sahip olduğunu göstermiştik; verilerin bu iki grup arasındaki farkları da açıkladığını düşünmekteyiz.

Tablo XX'de verilen Kayseri örneklerinde Hb Elektroforezi sonuçlarına göre 27 kişide HbAA, 3 kişide HbF ve 1 kişide HbAF saptandı. HbF değerleri yüksek olan olguların ikisi IVS1-110 ve IVS1-6 mutasyonu için heterozigot iken diğer ikisi CD 8 için homozigottu.

Tablo XVII, XXI ve XXIII'de her üç grupta Poncz yöntemine göre elde ettiğimiz DNA'ların konsantrasyon ve verimleri ORT±SD ile birlikte verilmiştir. Farklı bölgelerden bölümümüze gönderilen bu örneklerde yeterli konsantrasyon ve verim elde edilmesinde bazı güçlükler olabileceği açıktır. Özellikle Antakya'dan gelen örneklerin kendi çalışmalarının ardından gönderilmesi nedeniyle kan miktarı 2-3 mL arasında düşmekte, bu da bizim kullandığımız DNA izolasyon yönteminde gerekli olan 5 mL'lik kan miktarından daha az olduğu için iyi bir konsantrasyon ve verim elde etmek için yetersiz olabilmektedir. Ancak yine de bütün örneklerdeki DNA konsantrasyonun ORT±SD'si 519.5±267.1 µg/mL ve DNA veriminin ORT±SD'si 1.60±0.20 olarak bulunmuştur. Bu değerler iyi bir amplifikasyon yapmak için yeterlidir.⁽⁹⁰⁾

β Talasemiler Dünya Talasemi Kuşağı olarak tariflenen ve Akdeniz havzasında bulunan ülkelere başlayarak Ortadoğu ülkeleri, Rusya'nın güney kesimleri, Hindistan, Çin, ve Uzakdoğu Asya'da bulunan ülkelerin yer aldığı bir kuşak üzerinde yaygın olarak görülür. Boletini ve Huisman Akdeniz havzasında yer alan ülkelere görülen β talasemi mutasyonlarının ülkelere göre görülme sıklıklarını bir tablo halinde yayınlamışlardır (Tablo XXXII). Bu ülkelere iki mutasyon tipi diğerlerine göre daha yaygın sıklıkta görülmektedir. Anlamsız kodon mutasyonu olan CD 39 (C→T) en yaygın olarak Batı Akdeniz'de bulunan Sardunya (%95.4), İspanya (%64.8), Tunus (%40.8), Portekiz (%40.1), İtalya (%40.1) ve Sicilya'da (%37.6) görülür. ^(14,30,32,36,57,65,75)

Tablo XXXII: Akdeniz ülkelerinde yaygın olarak görülen β talasemi mutasyon tiplerinin görülme sıklıkları.

MUTASYON ÜLKELER	-28 A→C	-28 A→G	-30 T→A	CD5 T→A	CD6 -A	CD8 -AA	CD15 G→A	CD39 C→T	CD44 -C	IVS1-1 G→A	IVS1-6 T→C	IVS1-110 G→A	IVS2-1 G→A	IVS2-745 C→G	DİĞERLERİ	KROMOZOM SAYISI
İSPANYA	-	-	-	-	5.0	1.7	-	64.8	-	3.5	15.5	8.5	-	-	1.8	58
PORTEKİZ	-	-	-	-	-	-	15.2	40.1	-	18.7	20.3	15.2	-	-	5.7	334
ÇEK/SLOVAKYA	0.4	-	-	-	-	-	-	2.1	-	45.2	-	5.9	14.1	4.3	28.4	93
MACARİSTAN	-	-	-	-	-	-	-	29.4	-	29.4	5.9	-	11.8	5.9	17.6	17
İTALYA	-	-	-	-	1.2	-	-	40.1	0.7	10.2	9.9	23.0	3.9	5.0	6.0	914
SARDUNYA	-	-	-	-	2.2	-	-	95.4	-	-	-	0.4	-	0.4	1.6	494
SİCİLİYA	-	-	-	-	2.2	-	-	37.6	-	5.5	23.9	24.1	-	3.5	3.2	399
BULGARİSTAN	-	-	-	4.7	6.1	5.5	-	21.9	-	5.3	9.2	27.4	1.76	6.6	11.6	483
ARNAVUTLUK	-	-	-	-	-	-	-	22.4	3.4	5.2	17.2	43.2	1.7	-	6.9	58
ESKİ YUGOSLAVYA	-	-	-	-	1.6	0.8	-	3.9	-	11.5	19.2	45.4	3.9	1.6	12.1	469
YUNANİSTAN	-	-	-	1.1	2.9	0.6	-	17.0	-	13.2	7.2	42.6	2.0	6.9	6.5	348
TURKIYE	0.4	0.6	3.6	1.2	0.4	5.8	-	3.2	-	3.7	17.2	41.2	8.0	1.9	12.8	859
AZERBAJCAN	-	-	-	-	-	21.2	-	2.0	3.1	2.0	7.1	20.2	21.2	3.1	20.1	99
KIBRIS	-	-	-	-	0.1	0.2	-	1.9	-	6.3	6.7	77.0	-	5.8	1.4	937
LÜBNAN	-	-	-	-	-	6.0	-	4.0	-	-	6.0	62.0	4.0	4.0	14.0	50
İSRAİL	15.0	-	-	-	-	-	-	12.0	19.5	4.0	2.5	18.0	13.5	0.8	14.7	46
MİSİR	-	-	-	-	4.2	21.2	-	2.1	3.1	10.4	18.8	27.1	-	8.3	4.8	50
TUNUS	-	-	-	-	2.3	2.3	-	40.8	9.1	-	-	20.5	-	-	25.0	48
CEZAYİR	-	-	-	-	17.9	-	-	26.0	-	14.5	3.5	25.4	-	-	12.7	129

Diğer taraftan intron 1'in 110. pozisyonunda G→A değişimi ile alternatif bir splice bölgesi oluşturarak β⁺ fenotipe yol açan IVS1-110 mutasyonu en yüksek yoğunlukta Doğu Akdeniz'de bulunan ülkelerde görülür. IVS1-110 (G→A) mutasyonu Güney Kıbrıs'ta %79.8, Kuzey Kıbrıs'ta %74.1, Lübnan'da %62.0, eski Yugoslavya'da %45.4, Arnavutluk'ta %43.2, Yunanistan'da %42.6, ve Türkiye'de %41.2 sıklıkta görülür. Yüregir ve arkadaşlarının Çukurova bölgesini kapsayan çalışmalarında IVS1-110 mutasyonun sıklığı %54.6 olarak bulunmuştur. Biz çalışmamızda IVS1-110'u Antakya'da %63.7, Kayseri'de %68.3 ve İzmir'de %46.7 oranında bulduk. Antakya ve Kayseri bölgesi için bulduğumuz bu sonuçlar Türkiye genelinde bulunan sıklıkla farklı ancak Doğu Akdeniz sahillerinde bulunan Çukurova bölgesinin sonuçlarıyla uyumludur. Sonuçlar Türkiye'nin güney bölgesinde bulunan Antakya popülasyonunun coğrafik olarak daha güneyde bulunan ülkelerle benzer özellikler gösterdiğini düşündürmektedir. Aynı zamanda sonuçların Çukurova bölgesinde görülen mutasyon tiplerinin sıklıklarının Türkiye genelinden daha farklı özellikler taşıdığını göstermesi açısından kayda değer olduğunu düşünmekteyiz. ^(12,14,20,22,89)

Tablo XVIII'de Antakya'dan gelen 33 örneğin ARMS yöntemi kullanılarak belirlenen mutasyon tipleri görülmektedir. Bu olguların hepsi heterozigot bireylerden oluşuyordu. En yaygın saptanan mutasyon tipi IVS1-110 (G→A) mutasyonuydu (%63.6). İkinci sıklıkta ise IVS1-1 (G→A) mutasyonu bulundu (%18.2). Tablo XXII'de Kayseri'den gönderilen hasta ve yakınlarına ait kan örneklerinde saptanan mutasyon tipleri görülmektedir. Kayseri örneklerinden 21 kişi heterozigot, 10 kişi ise homozigottu. Bu olgulardan 20 tanesi IVS1-110 (G→A) mutasyonunu taşıyordu, bu kişilerden 10 tanesi bu mutasyon için homozigot kişilerdi. CD 8 mutasyonunu taşıyan 6 kişiden ikisi homozigottu. IVS1-6 için 2, CD 5 için 2, ve IVS1-1 için 1 kişi heterozigot olarak bulundu. Tablo XXIV'de ise İzmir örneklerinde saptanan mutasyon tipleri ve sıklıkları görülmektedir. Bu olgulardan 8 tanesi heterozigot, 5 tanesi

homozigot ve 6 tanesi de çeşitli mutasyonlar için çifte heterozigot bireylerden oluşuyordu. İzmir örneklerinden NU'da bir kromozom ARMS yöntemi kullanılarak IVS1-110 olarak belirlendi, ancak klinikte β Talasemi intermedia tanısı alan bu örneğin ikinci kromozomunun mutasyonu, elimizde bulunan Akdeniz bölgesinde yaygın olarak görülen 9 mutasyon için kullanılan ARMS primerleri ile taranmasına rağmen saptanamadı. Bu kromozomu saptamak için DNA Dizi Analizi yöntemi kullanıldı. β geninin 1. bölgesini 108 ve 109 no'lu primerlerle ssDNA halinde PCR'la amplifiye edip 410 no'lu sekans primeri ile baz dizisini belirlediğimizde promotor bölgede bulunan -28 pozisyonunda A→G yer değişimi olduğunu saptandı. Örneklerden DÇ ve HÇ adlı iki kardeşte ise β talasemi intermediya tanısı konmuştu. Bu örneklerden DÇ'nin β geninin 1. bölgesinin Dizi Analizini yaptık ve -30 pozisyonunda T→A yer değişimini homozigot olarak bulduk. Daha sonra her iki örnek için -30 mutant ve normal ARMS primerini kullanarak yaptığımız deneyde bu bulgumuz doğrulandı. ARMS ve DNA Dizi Analizi ile her üç örnek grubunda saptadığımız β talasemik kromozomlar ve görülme sıklıkları toplu olarak Tablo XXVI'da verilmiştir. Tablo XXIX'da ise heterozigot örneklerde mutasyon tiplerine göre hematolojik verilerin ORT±SD'si verilmiştir. Özellikle MCV değerleri β^0 mutasyonlar IVS2-1 (65.7±5.3 fl), CD 39 (68.5±2.5 fl) ve IVS1-1'de (68.7±4.7 fl) daha düşük, β^+ mutasyonlar IVS1-110 (74.1±8.8 fl) ve IVS1-6'da (77.9±10.1 fl) biraz daha yüksek; iki frameshift mutasyon CD 8 (79.9±1.5 fl) ve CD 5'te (86.9±3.4 fl) daha yüksek olarak bulundu.⁽²³⁾

Ülkemizde β -talasemi mutasyon tiplerini belirlemeye yönelik çalışmalar yapılmıştır. Öner ve arkadaşlarının yaptığı heterozigot hasta yakınlarından oluşan ve 182 β talasemik kromozomun saptandığı bir çalışmada yaygın olarak görülen mutasyon tipleri ve sıklıkları şu şekilde idi: IVS1-110 (G→A) %42.5, IVS1-6 (T→C) %18.1, IVS2-1 (G→A) %11.5, CD 8 (-AA) %7.1, CD 39 (C→T) %6.0, IVS2-745 (C→G) %4.4, IVS1-1 (G→A)

%2.5 ve -30 (T→A) %2.2. Atalay ve arkadaşlarının Türkiye'de β talasemi mutasyon tiplerinin bölgesel dağılımını belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmalarında 139 β talasemik kromozom saptamışlardır. Saptanan mutasyon tipleri ve sıklıkları: IVS1-110 (G→A) %35.9, IVS1-6 (T→C) %21.6, IVS1-1 (G→A) %13.0, CD 39 (C→T) %7.2, IVS2-745 (C→G) %3.6, CD 8 (-AA) %2.2, IVS2-1 (G→A) %1.4 şeklindedir.^(10,59)

Yüregir ve arkadaşlarının yaptığı bölge illeri Hatay, Adana ve İçel'i kapsayan, 7444 kişinin tarandığı bir çalışmada β talasemi taşıyıcılığının sıklıkları sırasıyla %5.7, %1.8 ve %3.3 olarak bulunmuş ve Çukurova Bölgesinde β talasemi sıklığı %3.7 olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada toplam 256 β talasemik kromozom belirlenmiştir. Saptanan mutasyon tipleri ve sıklıkları ise IVS1-110 (G→A) %54.6, IVS1-1 (G→A) %9.4, CD 39 (C→T) %8.7, IVS1-6 (T→C) %4.7, CD 8 (-AA) %3.5, IVS2-1 (G→A) %2.7, -30 (T→A) %2.4 ve IVS2-745 (C→G) %1.9 şeklindedir. Bu çalışmada ARMS veya Dot-blot teknikleri kullanılarak 40 tane prenatal tanı uygulanmış ve fetuslardan 4'ü homozigot (2 tane HbSS, 1 tane HbSE ve 1 tane de IVS1-110/IVS1-110), 16'sı HbAS, 8'i β talasemi taşıyıcısı, 8'i normal olarak belirlenmiş, 4'ünde ise mutasyon tipi saptanamamıştır. Her üç çalışmada saptanan β talasemik kromozomların mutasyon tipleri ve sıklıkları bizim çalışmamızda bulunan sonuçlarla birlikte Tablo XXXIII'de verilmiştir.⁽⁸⁹⁾

Tablo XXXIII: Türkiye’de yapılan çeşitli çalışmalarda saptanan β talasemik kromozomların sayısı ve mutasyon tiplerinin görülme sıklıkları.

MUTASYON TİPİ	ÖNER ve Ark.		ATALAY ve Ark.		YÜREGİR ve Ark.		KENDİ ÇALIŞMAMIZ	
	n	%	n	%	n	%	n	%
IVS1-110	77	42.5	50	35.9	140	54.6	63	60.6
IVS 1-1	5	2.5	18	13.0	24	9.4	9	8.6
Cd 39	11	6.0	10	7.2	22	8.7	4	3.8
IVS 1-6	33	18.1	30	21.6	12	4.7	5	4.8
IVS 2-1	21	11.5	2	1.4	7	2.7	3	2.9
Cd 8	13	7.14	3	2.2	9	3.5	10	9.6
Cd 5	2	1.1	-	-	-	-	3	2.9
IVS2-745	8	4.4	5	3.6	5	1.9	2	1.9
-30	4	2.2	-	-	6	2.4	4	3.8
-28	-	-	-	-	-	-	1	0.9
Diğer	29	15.9	21	15.1	31	12.1	-	-
TOPLAM	182	100.0	139	100.0	256	100.0	104	100.0

Öner ve arkadaşlarının örnekleri ağırlıklı olarak Hacettepe Üniversitesi, ikinci olarak Çukurova Üniversitesi ve son olarak İstanbul Üniversitesi kliniklerine başvuran β talasemi için heterozigot hasta yakınlarından oluşuyordu. Atalay ve arkadaşlarının çalıştıkları kan örnekleri ise Türkiye’nin çeşitli yerlerinden gelen 86 heterozigot, 10 homozigot, 13 çifte heterozigot ve 7 tane de HbS/ β talasemili olgudan alınmıştı. Yüregir ve arkadaşlarının saptadığı 256 kromozom ise Hatay, Adana ve İçel’de yapılan tarama çalışmaları sırasında saptanmıştı. Bizim örneklerimiz ise Antakya Devlet Hastanesinde yapılan evlilik öncesi talasemilerin taranmasına yönelik testlerde saptanan 33 tane heterozigot, Kayseri ve İzmir’de Erciyes Üniversitesi ve Ege Üniversitesi kliniklerine başvuran hasta ve hasta yakınlarına ait 29 heterozigot, 15 homozigot ve 6 tane de çifte heterozigot kişiden alınmıştı (Tablo XXVII ve Tablo XXX). Diğer üç çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da en sık karşılaşılan mutasyon tipi IVS1-110’dur. Öner ve Atalay’ın çalışmasıyla bizim çalışmamız arasındaki farkların örneklerin değişik bölgelerden geliyor olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Her iki çalışmada da örnekler daha geniş bölgeleri kapsarken bizim çalışmamız da

örnekler daha çok bölgesel nitelikler içermektedir. Kayseri ve İzmir'de bu türden bir çalışma daha önce yapılmamıştır. Tablo XXVI'da verdiğimiz Kayseri ve İzmir örneklerinde çalışılan kromozom sayısının, bu bölgelerdeki mutasyon sıklıklarını yansıtmak için yeterli olmadığını düşünmekteyiz.

Old, Varawalla ve Weatheral birlikte yaptığı bir çalışmada ARMS yöntemini kullanarak, heterozigot anne-babaların β talasemik fenotipe sahip olma riski taşıyan fetuslarında mutasyon tiplerini saptamışlardır. İngiltere'de yaşayan Hindistan ve Kıbrıs kökenli kişilerin alındığı çalışmada birinci trimesterde Koryonik villus örnekleme yapılarak Hintlilerde 32, Kıbrıslılarda 73 olmak üzere 105 tane prenatal tanı gerçekleştirilmiştir. Bu fetuslar β talasemik mutasyonlar için ya homozigot ya da çifte heterozigot olarak belirlenmiştir. ARMS yönteminin hem tarama çalışmalarında hem de prenatal tanı için yeterince hızlı ve güvenilir bir yöntem olduğunu belirtmişlerdir. Çukurova Üniversitesi Biyokimya A.B.D.'da da 1992 yılından beri prenatal tanı uygulanmaktadır. Prenatal tanı için ARMS, Restriksiyon enzim çalışmaları, VNTR (Variable number of tandem repeats) ve Dizi Analizi yöntemleri kullanılmaktadır. Tablo XXV'de İzmir'den gelerek bölümümüze başvuran iki ailede ARMS yöntemiyle elde edilen prenatal tanı sonuçları verilmiştir. Birinci aileye ait olan fetus (CVS B) IVS1-110 için homozigot bulundu ve ailenin onayıyla tıbbi abortus uygulandı. İkinci aileye ait olan fetusun ise (CVS K) ise hasarlı kromozom taşımadığı anlaşıldı.⁽⁵⁸⁾

β talasemilerin yüksek sıklıkta görüldüğü bölgelerde toplum sağlığını tehdit ettiği açıktır. Çukurova bölgesinde %3.7 gibi yüksek oranda görülen bu kalıtsal hastalığın önlenmesine yönelik çalışmalar Antakya'da Üniversitemizin öncülüğünde başlatılmış İl Sağlık Müdürlüğü, Antakya Devlet Hastanesi ve Antakya Belediyesinin işbirliği ile başarılı bir şekilde sürdürülmektedir. Evlilik öncesinde yapılan testlerle taşıyıcıların belirlenerek genetik danışmanlık hizmetlerinin verilmesi; riskli ailelerde prenatal tanı uygulanmasıyla homozigot doğumların önüne geçilmesi, toplum sağlığının

korunması ve kaynakların daha rasyonel kullanılması açısından çok önemlidir.⁽⁸⁹⁾

Biz bu çalışmamızda 83 kişinin β talasemik genotiplerini belirleyerek ailelere bildirdik. Bize başvuran iki ailede ise prenatal tanı uygulayarak, ailelerden birinin hasta çocuk sahibi olmasını önledik. β talasemik kromozomlarını belirlediğimiz diğer kişilerin de ileride prenatal tanı için başvuracaklarını düşünüyoruz. Anne-babanın genotipik yapısının önceden biliniyor olması fetusla ilgili moleküler testlerin daha hızlı ve doğru yapılmasını sağlayacaktır. Aslında riskli aileler için moleküler düzeyde yapılan mutasyon belirleme çalışmaları rutin olarak uygulanmalı ve belirlenen mutasyon tipi kişilere, aynı kan grubu belirlenmesinde olduğu gibi özel bir kart üzerine kaydedilerek ulaştırılmalıdır. Böylelikle hasta çocuk doğma olasılığının azalacağını düşünüyoruz. Bu bölgede yapılan β talasemilerin önlenmesine yönelik bu çalışmalar insidansın yüksek olduğu diğer bölgelerde de biran önce başlatılmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Adekile AD, Dimovski JA, Öner Ç, Lanclos KD, Huisman THJ. Haplotype specific sequence variations in the locus control region (5' hypersensitive sites 2,3,4) of β^s Chromosomes. *Hemoglobin*, 1993, vol 17, no 5, p:475-478.
2. Ahmed S, Petrou M, Saleem M. Molecular genetics of β thalassemia in Pakistan: a basis for prenatal diagnosis. *Br J Haem*, 1996, vol 94, p:476-482.
3. Akar N, Çavdar AO, Arcasoy A, Pirasto M, Loi A, Cao A. Türk toplumunda beta talassemianın prenatal tanısında DNA polimorfizmlerinin ve sentetik oligonükleotidlerin kullanılma değeri. *Doğa TU Tıp ve Ecz D*, 12.1.1988, p:1-8.
4. Aksoy K, Arpacı A, Çürük MA, Yüregir GT. Çukurova bölgesinde saptanan β^s geninin 5' γ globin mutasyonları Haplotip tayini. *Ç.Ü.Tıp Fak. Der.* 1992, Cilt 17, sayı 2, p:111-115.
5. Aksoy M. Hemoglobinopathies in Turkey. *Hemoglobin*, 1985, vol 9, no 2, p:209-216.
6. Altay Ç, Gürgey A. Distribution of hemoglobinopathies in Turkey. *Turkish J Pediat*, 1986, no 28, p:219-229
7. Arakawa H, Uetanaka K, Maeda M, Tsuji A. Analysis of polymerase chain reaction product by capillary electrophoresis and its application to the detection of single base substitution in genes. *J Chromat A*, 1994, no 664, p:89-98.
8. Arpacı A. Antakya yöresinde β talasemik gen sıklığı ve mutasyonların gen amplifikasyon yöntemi ile saptanması. *Uzmanlık tezi*, Ç.Ü.Tıp Fak.Biyokimya A.B.D., Adana, 1991.

9. Arpacı A, Aksoy K, Yüregir GT. Preliminary studies for prenatal diagnosis: Incidence and mutation sites of β thalassemia in Antakya, Türkiye. *Ann Med Sci*, 1992, vol 1, p:103-110.
10. Atalay EÖ, Çırakoğlu B, Dinçol G, Atalay A, Kılınç Y, Aytekin H, Yüregir GT, Arpacı A, Bernek E, Aksoy M. Regional Distributions of β thalassemia mutations in Turkey. *Int J Hematol*, 1993, no 57, p:207-211.
11. Athanassiadou A, Adamandia P, Zoumbos N, Maniatis GM, Gibbs R. A novel β thalassemia mutation in the 5' untranslated region of the β globin gene. *Br J Haem*, 1994, vol 88, p:307-310.
12. Baysal E, Indrak K, Bozkurt G, Berkalp A, Arıtkan E, Old JM, Iannou P, Angastiniotis M, Droushiotou A, Yüregir GT, Kılınç Y, Huisman THJ. The β thalassemia mutations in the population of Cyprus. *Br J Haem*, 1992, vol 81, p:607-609.
13. Baysal E, Carver MFH. The β and δ thalassemia repository, 8th edition. *Hemoglobin*, 1995, vol 19, no 384, p:213-236.
14. Boletini E, Svobodova M, Divoky V, Baysal E, Çürük MA, Dimovski AJ, Liang R, Adekile AD, Huisman THJ. Sickle cell anemia, sickle β thalassemia, and thalassemia major in Albania: Characterization of mutations. *Hum Genet*, 1994, p:182-187.
15. Cao A, Galanello R, Rosatelli MC. Genotype-phenotype correlations in β thalassemias. *Blood Rev*, 1994, vol 8, no 1, p:1-12.
16. Cai SP, Chang CA, Zhang ZJ, Saiki RK, Erlich HA, Kan YW. Rapid Prenatal diagnosis of β thalassemia using DNA amplification and nonradioactive probes. *Blood*, 1989, vol 73, no 2, p:372-374.

17. Church GM, Gilbert W. Genomic sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, vol 81, p:1991-1995.

18.Çürük MA. Azerbaycan Türklerinde Beta Talasemi'nin DNA ve Globin Zincir Analizi ile Belirlenmesi. *Doktora Tezi*, Ç.Ü.T.F. Biyokimya A.B.D. Adana, 1994.

19.Davies SC, Wonke B. The management of hemoglobinopathies. *Bail Clin H*, 1991, vol 4, no 2, p:361-386.

20.Diaz-Chico JC, Yang KG, Stoming TA, Efremov DG, Kutlar F, Aksoy M, Altay Ç, Gürgey A, Kiling Y, Huisman THJ. Mild and severe β thalassemia among homozygotes from Turkey: Identification of the types by hybridization of amplified DNA with synthetic probes. *Blood*, 1988, vol 71, no 1, p: 248-251.

21.Elsas LJ, Priest JH. *Medical Genetics*, Chapter 3 in *Sodeman's Pathologic Physiology*, eds, Sodeman WA, Sodeman TM, 7th edition, W.B. Saunders Comp, Philadelphia, 1985, p:51-100.

22.Filon D, Oron V, Krichevski S, Shaag A, Shaag Y, Warren TC, Goldfarb A, Shneur Y, Koren A, Aker M, Abramov A, Racheilewitz EA, Rund D, Kazazian HHJ, Oppenheim A. Diversity of β globin mutations in Israeli ethnic groups reflects recent historic events. *Am J Hu Genet*, 1994, vol 54, p:836-843.

23.Gonzalaz -Redondo JM, Stoming TA, Lanclos KD, Gu YC, Kutlar A, Kutlar F, Nakatsuji T, Deng B, Han IS, McKie VC, Huisman THJ. Clinical and genetic heterogeneity in black patients with homozygous β thalassemia from the southeastern United States. *Blood*, 1988, vol 72, no 3, p:1007-1014.

24.Gürgey A, Kayın S, Kansu E, Altay C. Beta Thalassemia Intermedia. *North Cyprus Symposium on Abnormal Hemoglobins and Thalassemia*, Girne, 10-11 October 1983, eds. M.Aksoy and THJ. Huisman, TÜBİTAK TAG, Ankara, 1984, p:40-51.

25. Gürgey A, Altay Ç, Diaz-Chico JC, Kutlar F, Kutlar A, Huisman THJ. Molecular Heterogeneity of Beta-Thalassemia Intermedia in Turkey. *Act Haemat*, 1989, vol 81, p:22-27.

26. Gubler U, Hoffman BJ. A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene*, 1983, vol 25, p:263-269.

27. Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single strand DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of HLA-DQ α locus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, vol 85, p:7652-7656.

28. Huisman THJ, Jenkis JHP, *The hemoglobinopathies, techniques of identification*, Newyork, Marcel Dekker Inc, 1977.

29. Huisman THJ, A short review of the different forms of α , β , $\delta\beta$, and γ thalassemias. *North Cyprus Symposium on Abnormal Hemoglobins and Thalassemia*, Girne, 10-11 October 1983, eds. M.Aksoy and THJ. Huisman, TÜBİTAK TAG, Ankara, 1984, p:1-16.

30. Huisman THJ. Annotation: Frequencies of common β thalassemia alleles among different populations: variability in clinical severity. *Br J Haem*, 1990, vol 75, p: 454-457.

31. Humphries KR, Ley JT, Anagnou NP, Baur AW, Nienhuis AW. β° 39 Thalassemia gene: A premature termination codon causes β mRNA deficiency without affecting cytoplasmic mRNA stability. *Blood*, 1984, vol 64, no 1, p:23-32.

32. Indrak K, Brabec V, Indrakova J, Chrobak L, Sakalova A, Jarosova M, Cermak J, Fei YJ, Kutlar F, Gu YC, Baysal E, Huisman THJ. Molecular characterization of β thalassemia in Czechoslovakia. *Hum Genet*, 1992, no 88, p: 399-404.

33. Innis MA, Myambo KB, Gelfand DH, Brow MAD. DNA sequencing with *Thermus Aquaticus* DNA polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, vol 85, p:9436-9440.

34. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ. *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*, Academic Press Inc., USA, 1992.

35. Jones RW, Old JM, Trent RJ, Clegg JB, Weatherall DJ. Major rearrangement in the human β globin gene cluster. *Nature*, 1981, vol 291, p:39-44.

36. Kattamis C, Cheng HHG, Reese AL, Gonzalez-Redondo JM, Kutlar A, Kutlar F. Molecular characterization of β thalassemia in 174 Greek patients with thalassemia major. *Br J Haem*, 1990, vol 74, p:342-346.

37. Kazazian HH Jr. The Thalassemia syndromes: Molecular Basis and prenatal diagnosis in 1990. *Sem Hematol*, 1990, vol 27, no 3, p: 209-228.

38. Kohn J. Separation of hemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Path*, 1969, vol 22, p:109-110.

39. Kulozik AE, Lyons J, Kohne E, Bartram CR, Kleihaur E. Rapid and non-radioactive prenatal diagnosis of β thalassemia and sickle cell disease: application of the polymerase chain reaction (PCR). *Br J Haem*, 1988, vol 70, p:455-458.

40. Kulozik AE, Bail S, Koch AB, Bartram CR, Kohne E, Kleihaur E. The proximal element of the β globin locus control region is not functionally required in vivo. *J Clin Inv*, 1991, vol 87, p:2142-2146.

41. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989, vol 339, p:237-238.

42. Kwok S, Higuchi R. Procedures to minimize PCR product carry over. in *PCR Protocols A Guide to Methods and Applications*, eds, Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, Academic Press Inc., USA, 1990, p:142-145.

43. Lawyer FC, Stoffel S, Saiki RK, Myambo K, Drummond R, Gelfand DH. Isolation, Characterization, and expression in *Escherichia coli* of the DNA polymerase gene from *Thermus aquaticus*. *J Biol Chem*, 1989, vol 264, no 11, p:6427-6437.

44. Lukens JN. The thalassemia and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis. in *Wintrobe's Clinical Hematology*, Eds, Lee RG, Bithell TC, Foerster J, Athens JW and Lukens JN: vol 1, 9th edition, Lea&Febiger Philadelphia, London, 1993, p:1102-1145.

45. Lindeman R, Volpato SPHF, Trent RJ. Polymerase chain reaction (PCR) mutagenesis enabling rapid non-radioactive detection of common β thalassemia mutations in Mediterranean's. *Br J Haem*, 1991, vol 78, p:100-104.

46. Lo Y, Patel P, Newton CR, Markham AF, Fleming KA, Wainscoat JS. Direct haplotype determination by double ARMS: specificity sensitivity and genetic applications. *Nucl Acid R*, 1991, vol 19, no 13, p:3561-3567.

47. Loukopoulous D. Thalassemia: genotypes and phenotypes. *Ann Hematol*, 1991, vol 62, ps: 85-94 and 145-150.

48. Mathews CK, Van Holde KE. *Biochemistry*, chapter 7: Protein function and evolution. The Benjamin/Cummings Publishing Co.1990, p:216-259.

49. Mathews CK, Van Holde KE, *Biochemistry*, chapter 26: Information transfer: Transcription. The Benjamin/Cummings Publishing Co.1990, p:383-390.

50. Meloni A, Rosatelli MC, Faà V, Sardu R, Saba L, Murru S, Scirrata GV, Baldi M, Tannio N. Promoter mutations producing mild β thalassemia in the Italian population. *Br J Haem*, 1992, vol 80, p: 222-226.

51. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Meth Enzym*, 1987, vol 155, p:335-350.
52. Murray RK, Myes PA, Granner DK, Rodwell VW. *Harper's Biochemistry*, Prentice Hall International Inc., 22nd edition, 1994, chapter 42, p:432-439.
53. Nagel LR, Ranney HM. Genetic epidemiology of structural mutations of the β globin gene. *Sem Hematol*, 1990, vol 27, no 4, p:342-359.
54. Newton CR, Kalsheker N, Graham A, Powell S, Riley J, Markham AF. Diagnosis of α_1 antitrypsin deficiency by enzymatic amplification of human genomic DNA and direct sequencing of polymerase chain reaction products. *Nucl Acid R*, 1988, vol 16, no 17, p:8233-8243.
55. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. Analysis of any point mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS). *Nucl Acid R*, 1989, vol 17, no 7, p:2503-2516.
56. Nienhuis AW, Anagnou NP and Ley JT. Advances in Thalassemia Research. *Blood*, 1984, vol 63, no 4, p:738-758.
57. Novelletto A, Hafez M, Deidda G, Rienzo AD, Felicetti L, Tahan HL, Morsi ZE, Ziny ME, Tonbary YA, Sittien A, Terratano L. Molecular characterization of β thalassemia mutations in Egypt. *Hum Genet*, 1990, vol 85, p:272-274.
58. Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of β -thalassemia studies in Indian and Cypriot populations in the UK. *Lancet*, 1990, vol 6, p: 834-839
59. Öner R, Altay C, Gürgey A, Aksoy M, Kılınç Y, Stoming TA, Reese AL, Kutlar A, Kutlar F, Huisman THJ. β -thalassemia in Turkey. *Hemoglobin*, 1990, vol 14, p: 1-13.

60.Öner C, Dimovski AJ, Altay Ç, Gürgey YC, Gu YC, Huisman THJ, Lanclos KD. Sequence variations in the 5' hypersensitive site-2 of the locus control region of β^s chromosomes are associated with different levels of fetal globin in hemoglobin S homozygotes. *Blood*, 1992, vol 79, no 3, p:813-819.

61.Passarge E. *Color Atlas of Genetics*. Thieme Medical Publishers Inc., New York, 1995, p:286-289.

62.Pirastu M, Ristaldi MS, Loudianos G, Murru S, Sciarata GV, Parodi MI, Leone D, Agosti S, Cao A. Molecular Analysis of atypical β thalassemia heterozygotes. *Ann NY Acad*, 1990, vol 2, p:90-97.

63.Poncz M, Solowiejk D, Harpel B, Mary Y, Schwartz E, Surrey S. Construction of human gene library from small amounts of peripheral blood analysis of β like globin genes. *Hemoglobin*, 1982, vol 6, p:27-36.

64.Pruzina S, Hanscombe O, Whyatt D, Grosveld F, Philipsen S. Hypersensitive site 4 of the human β globin locus control region. *Nucl Acid R*, 1991, vol 19, no 7, p:1413-1418.

65.Rosatelli MC, Dozy A, Faà V, Meloni A, Sardu R, Saba L, Kan YW, Cao A. Molecular characterization of β thalassemia in the Sardinian population. *Am J Hu Gen*, 1992, vol 50, p: 422-426.

66.Rosatelli MC, Pisheddda A, Meloni A, Saba L, Pomo A, Travi M, Fattore S, Cao A. Homozygous β thalassemia resulting in the β thalassemia carrier state phenotype. *Br J Haem*, 1994, vol 88, p:562-565.

67.Rowley PT, Loader S, Sutura CJ, Walden M, Kozyra A. Prenatal screening for Hemoglobinopathies. I. a prospective regional trial. *Am J Hu Gen*, 1991, vol 48, p: 439-446.

68.Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplifications of β -globin genomic sequences and restriction site

analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 1985, vol 230, p: 1350-1354.

69. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β globin and *HLA-DQ α* DNA with allele specific oligonucleotide probes. *Nature*, 1986, vol 324, p:163-166.

70. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer directed amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 1988, vol 239, p: 487-491.

71. Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HHJ, Erlich HA. Diagnosis of sickle cell anemia and β thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele specific oligonucleotide probes. *N Eng J Med*, 1988, vol 319, no 9, p:537-541.

72. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977, vol 74, p: 5463-5467.

73. Scharf SJ, Horn GL, Erlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 1986, vol 233, p:1076-1078.

74. Singer K, Chernoff AA, Singer L. Studies on abnormal hemoglobins I. Alkali Denaturation. *Blood*, 1951, vol 6, p:413-424.

75. Selovyev GY, Gol'tsov AA, Surin VL, Lebedenko EN, Kaboev OK, Lukianenko AV, Alekseev AA, Plutalov OV, Dadasheva TS, Rustamov RS, Berlin YA, Schwartz EI. Molecular nature of mutations causing β^0 thalassemia in Azerbaijan. *Biomed Sci*, 1990, vol 1, p:300-304.

76. Sommer SS, Grozbach AR, Bottema CDK. PCR amplification of specific Alleles (PASA) is a general method for rapidly detecting known single-base changes. *BioTechniqu*, 1992, vol 12, no 1, p:82-87.

77. Spritz RA, Jagadeeswaran P, Choudary PV, Biro PA, Elder JT, Deriel JK, Manley JL, Getter ML, Forget BG, Weissman SM. Base substitution in an intervening sequence of a β^* thalassemic human globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1981, vol 78, p:2455-2459.

78. Stark J, Sarkar R, Romana M, Bhargava A, Scarpa AL, Minoru T, Chamberlain JW, Weissman SM, Forget BG. Developmental regulation of human γ and β globin genes in the absence of the locus control region. *Blood*, 1994, vol 84, no 5, p:1656-1665.

79. Tanrıverdi K. β talasemi mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi. *Bilim Uzmanlığı Tezi*, Ç.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1993.

80. Varawalla NY, Dokras A, Old JM, Sargent IL, Barlow DH. An approach to preimplantation diagnosis of β -thalassemia. *Prenat Diag*, 1991, vol 11, p:775-785.

81. Weatheral DJ. *The New Genetics and Clinical Practice*, 3rd edition, Oxford University Press, 1991.

82. Weatheral DJ. *The Thalassemias* in Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, *Hematology*, 4th edition, McGraw Hill Publishing Co., New York, 1990, p:510-539.

83. White TJ, Arnheim N, Erlich HA. The Polymerase Chain Reaction. *Trends Gen*, 1989, vol 5, no 6, p:185-189.

84. Wong C, Dowling CE, Saiki RK, Higuchi GR, Erlich HA, Kazazian HHJ. Characterization of β thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature*, 1987, vol 330, p:384-386.

85.Yüregir GT. *Temel Biyokimya II, Nükleik Asitler ve Protein Sentezi*. Kemal Matbaası, Adana, 1983, p: 47-74.

86.Yüregir GT, Kutlar F, Kutlar A, Aksoy M, Huisman THJ. Incidence and types of β thalassemia mutations in south Turkey. *Ç.Ü.Tıp Fak. Der.* 1989, Cilt 15, sayı 1, p:111-115.

87.Yüregir GT. *Klinik Biyokimya*, 1. baskı, Ç.Ü.Tıp Fak. Yayınları, no 12, Adana, 1990, p:137-144.

88.Yüregir GT, Aksungur P, Burgut R, Solakoğlu A, Atalay EÖ, Aksoy M. A survey of high A₂ β thalassemia, hemoglobin variants, G6PD deficiency and iron deficiency anemia in Karataş, Çukurova, Southern Turkey. *Doğa TU J Med Sci*, 1989, vol 13, no 3, p:203-210.

89.Yüregir GT, Arpacı A, Aksoy K, Tuli A, Dikmen N, Özgünen FT, Kılınç Y. Population at risk for hemoglobinopathies in Çukurova, Turkey. *Ann Med Sci*, 1995, vol 2, p:61-69.

90.Yüregir GT, Arpacı A, Tuli A. *Temel ve Klinik Biyokimyada İleri Teknoloji Yöntemleri*. Ç.Ü.Tıp Fak. Yayınları, 1995, p:56.

91.Zubay G, Geis I. Functional Diversity of proteins. in *Biochemistry*, Ed Zubay G, 3rd edition, Wm.C.Brown Publishers, Iowa USA, 1993, p: 109-118.

92.Zubay G. RNA Synthesis and processing. in *Biochemistry*, Ed Zubay G, 3rd edition, Wm.C.Brown Publishers, Iowa USA, 1993, p:791-829.

ÖZGEÇMİŞ

Adana'nın Kadirli ilçesinde 1.1.1965 tarihinde doğdum. İlköğretimimi Kadirli Rasim Ünal İlkokulunda tamamladıktan sonra Konya Anadolu Lisesinde parasız yatılı olarak okumaya hak kazandım. İlk bir yılı İngilizce yabancı dil eğitimi olmak üzere ortaokul ve lise eğitimimi aynı okulda 1983 yılında tamamladım. Aynı yıl Samsun Ondokuzmayıs Üniversitesi Tıp Fakültesini kazandım ve Nisan 1990'da Tıp Doktoru olarak mezun oldum.

Mecburi hizmetimde Bingöl İli 1. No'lu Sağlık Ocağında onyediy ay süreyle pratisyen hekim olarak çalıştım. Bu dönemde birinci basamak sağlık hizmetiyle ilgili İl Sağlık Müdürlüğü tarafından düzenlenen çeşitli kampanyaları da yürüttüm. Kasım 1991'de Adana Numune Hastanesi Acil Servisine atandım. İki yıl süreyle Acil Servis hekimliği yaptıktan sonra Edirne 2. Hudut Taburunda askerliğimi Revir komutanı olarak yaptım. Ardından Numune hastanesi Kardiyoloji Servisinde Koroner Yoğun Bakım Ünitesi doktoru olarak çalışmaya başladım ve halen bu görevimi sürdürmekteyim. Şubat 1994'te Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D.'da Doktora eğitimime başladım. Dört yıl süren eğitimim sonrasında Mart 1998'de tezimi tamamladım ve Biyokimya Doktoru ünvanını aldım.