



T.C.

KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KAHRAMANMARAŞ İLİ BETA TALASEMİ MUTASYONLARININ  
GENETİK HETEROJENİTESİ

Mehmet Emrah AKSAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KAHRAMANMARAŞ 2017

**T.C.**  
**KAHRAMANMARAŞ SÜTÇÜ İMAM ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**KAHRAMANMARAŞ İLİ BETA TALASEMİ MUTASYONLARININ**  
**GENETİK HETEROJENİTESİ**

**Mehmet Emrah AKSAN**

**YÜKSEK LİSANS**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ergül Belge KURUTAŞ**

**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN**

**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. M. Akif ÇÜRÜK**

**KAHRAMANMARAŞ 2017**

Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü öğrencisi Mehmet Emrah AKSAN tarafından hazırlanan “Kahramanmaraş İli Beta Talasemi Mutasyonlarının Genetik Heterojenitesi” adlı bu tez, jürimiz tarafından 25.05.2017 tarihinde oy birliği ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ergül Belge KURUTAŞ .....

Tıbbi Biyokimya A.B.D., K.S.Ü Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Fatma İNANÇ TOLUN .....

Tıbbi Biyokimya A.B.D., K.S.Ü Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK .....

Tıbbi Biyokimya A.B.D., Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi

Yukarıdaki imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

Doç.Dr. Mehmet BOŞNAK .....

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdür

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Mehmet Emrah AKSAN



Bu çalışma Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (Bap) Koordinasyon Birimi Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.

Proje No:2015-1/31YLS

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

## ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Eğitimim süresi boyunca her türlü bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, tezimin her aşamasında ilgi ve desteğini aldığım ve fikirlerinden faydalandığım saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr.Ergül BELGE KURUTAŞ'a,

Tezimin sonuçlarının değerlendirilmesinde yardımcı olan Çukurova Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Mehmet Akif ÇÜRÜK'e eğitimim sırasında ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve Öğretim üyesi hocalarıma;

Tez yazımı esnasında değerli görüş ve önerilerini paylaşan arkadaşım Ferudun KOÇER'e, ÜSKİM yönetici ve personellerine,

Beni bu günlere getiren ve hayatımın her alanında maddi ve manevi yardımlarını benden esirgemeyen değerli aileme; Sevincimi, heyecanlarımı ve üzüntülerimi paylaşan bir ömürlük eşime,

En içten teşekkürü bir borç bilirim.

Mayıs-2017

Mehmet Emrah AKSAN

# KAHRAMANMARAŞ İLİNDE BETA TALASEMİ MUTASYONLARININ GENETİK HETEROJENİTESİ YÜKSEK LİSANS TEZİ

## ÖZET

Beta talasemi, otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalıktır. Çeşitli ülkelerde ve aynı ülkenin farklı bölgelerinde dağılım bakımından heterojenite göstermektedir. Beta talasemide,  $\beta$ -globin geni üstünde veya etrafında meydana gelen mutasyonlar, beta globin zincir yapımının azalmasına ya da hiç sentez edilmemesine neden olur. Beta talasemi taşıyıcılığı ülkemizde %2 olarak verilmekte ancak bu oran bazı yörelerimizde %10'a kadar çıkmaktadır. IVS-I-110 Türkiye'de en sıklıkla rastlanan  $\beta$ -talasemi mutasyonudur; bunu IVS-I-6, FSC-8, IVS-I-1, IVS-II-745, IVS-II-1, Cd39, -30 ve FSC-5 mutasyonları takip etmektedir.

Kahramanmaraş ilinde daha önce beta talasemi taşıyıcılığı %2,35 olarak bulunmuştu. Bu çalışmada 14 talasemili hasta ve onların ailelerinden toplam 29 kan örneği alındı. Bu hastalar KSÜ hastanesinde tedavi edilmekte idi. Hematolojik veriler kan sayımı cihazı ile elde edildi. HbA<sub>2</sub> miktarı HPLC yöntemi ile belirlendi. On farklı beta talasemi mutasyonu ARMS yöntemi tarandı. Çukurova bölgesinde sık görülen bu beta talasemi mutasyonları -30 (T>A), Cd 8 (-AA), Cd 8/9 (+G), IVS 1-1 (G>A), IVS 1-5 (G>C), IVS 1-6 (T>C), IVS 1-110 (G>A), Cd 39 (C>T), IVS 2-1 (G>A), IVS 2-745 (C>G) dir. Ondört hastadan 7 tanesi IVS1-110 mutasyonu için homozigot olarak belirlendi. Hastalardan biri taranan 10 mutasyondan hiçbirine sahip değildi. Kalan 6 hasta Fsc 8, Fsc 8/9, IVS1-5, IVS1-110 ve IVS2-1 mutasyonu için heterozigot idi. Bu altı hastanın ikinci kromozomları ARMS yöntemi ile belirlenemedi. Bir hastanın iki kromozomu ve altı hastanın da ikinci kromozomları DNA dizi analizi ile belirlenmelidir.

Sonuç olarak 28 kromozomun 16 tanesi IVS1-110 olarak belirlendi (%57.14). Kahramanmaraş ilinde IVS1-110 (G>A) nın en yaygın mutasyon olduğu görüldü. Toplam 12 aileden onu birer talasemik çocuğa sahip iken iki aile de çift talasemili çocuğa sahipti. Bu yüzden son yıllarda Kahramanmaraş ilinde Sağlık Bakanlığı tarafından evlilik öncesi tarama ve genetik danışma hizmeti verilmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Beta talasemi, Genetik heterojenite, Mutasyon

**Sayfa Sayısı:** 86

**Danışman:** Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ

**GENETIC HETEROGENEITY OF BETA THALASSEMIA  
MUTATIONS IN KAHRAMANMARAŞ MASTER THESIS**

**ABSTRACT**

Beta thalassaemia is a autosomal recessively transmitted disease. It presents heterogeneity in terms of distribution at different countries and at different regions of these countries. Mutations consist over and around  $\beta$ -globin gene cause a decrease of beta globin production or beta globin completely isn't synthesized at beta thalassaemia. Beta thalassaemia trait in our country is given as 2% but at some regions this ratio increase as to 10%. IVSI-110 is the most common beta thalassaemia mutation in Turkey, and IVSI-6, Fsc 8, IVSI-1, IVSII-745, IVSII-1, Cd39,-30 and Fsc5 mutations follow this.

Beta thalassaemia trait was found as 2.35% in Kahramanmaraş, previously. At this study; 5 ml blood samples was taken from 14 thalassemic patients and their relatives. The patients were taking care of K.S.Ü. Hospital at Kahramanmaraş. Haematological datas were obtained by cell blood counter. HbA<sub>2</sub> was determined by HPLC. Ten different mutations were screened by ARMS method. These common beta thalassemia mutations are -30 (T>A), Cd 8 (-AA), Cd 8/9 (+G), IVS 1-1 (G>A), IVS 1-5 (G>C), IVS 1-6 (T>C), IVS 1-110 (G>A), Cd 39 (C>T), IVS 2-1 (G>A), IVS 2-745 (C>G) in Çukurova region. Seven of the 14 patients were detected IVS1-110 homozygous. One of the patient doesn't have any of ten mutations. Six patients were detected as heterozygotes for Fsc 8, Fsc 8/9, IVS1-5, IVS1-110 and IVS2-1. Second chromosome of the six patients were not detected by ARMS method. Two chromosome of one patient and second chromosome of the six patientes have to be analyzed by DNA sequencing.

As a result; 16 chromosomes were detected as IVS1-110 in 28 (57.14%). IVS 1-110 (G>A) was seen the most common mutation in Kahramanmaraş. While 10 families have only one thalassemic patient, two families have double thalassemic patient in total 12 family. Therefore, premarital screening and genetic counselig service has been given by Ministry of Health in Kahramanmaraş recently.

**Keywords:** Beta thalassaemia, Genetic heterogeneity, Mutation,

**Page Number:** 86

**Supervisor:** Prof. Dr. Ergül BELGE KURUTAŞ

# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR .....	I
ÖZET .....	II
ABSTRACT .....	III
İÇİNDEKİLER .....	IV
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	VIII
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Hemoglobin Yapı ve İşlevi .....	4
2.2. İnsan Globin Gen Aileleri .....	6
2.3. Beta Globin Gen Ailesi .....	8
2.4. Talasemi Genel Özellikleri .....	8
2.4.1. Beta Talasemi .....	9
2.4.2. Beta Talaseminin Patofizyolojisi .....	9
2.4.3. Beta Talaseminin Moleküler Patolojisi .....	10
2.4.4. Beta Talasemi Mutasyonları .....	11
2.4.5. Promotor ve 5' UTR bölgelerindeki mutasyonlar .....	12
2.4.6. RNA işlenmesi (processing) ile ilgili mutasyonlar .....	12
2.4.7. Splice bölgesi ve consensus dizi mutasyonları .....	12
2.4.8. Dünyada $\beta$ talasemi .....	14
2.4.9. Türkiye'de $\beta$ -talasemi .....	16
2.5. Tanı ve Teşhiste Moleküler Yöntemler .....	17
2.5.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi(HPLC) .....	17
2.5.2. Hematolojik Endeks .....	17
2.5.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) .....	19



3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	20
3.1. Kullanılan Araçlar ve Kimyasalların Temini .....	20
3.2. Hematolojik Yöntemler .....	20
3.3. Moleküler Tanı Yöntemleri.....	21
3.3.1. Genomik DNA izolasyonu .....	22
3.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile beta gen amplifikasyonu .....	25
3.3.3. Amplification refractory mutation system (ARMS).....	25
3.3.4. $\beta$ -globin Gen Mutasyonlarının “AccuPower Multipleks PCR Premiks” kiti kullanılarak Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (ARMS) ile Saptanması .....	27
4. BULGULAR .....	30
5. TARTIŞMA .....	55
6. SONUÇ VE ÖNERİLER .....	60
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	71

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
<b>µL</b>	: Mikrolitre
<b>µg</b>	: Mikrogram
<b>A</b>	: Adenin
<b>AÇSAP</b>	: Ana Çocuk Sağlığı-Aile Planlaması Merkezi
<b>ARMS</b>	: Amplification Refractory Mutation System
<b>Aγ</b>	: γ Alanin
<b>bp</b>	: Base pair
<b>C</b>	: Sitozin
<b>CO</b>	: Karbon monoksit
<b>CO<sub>2</sub></b>	: Karbon dioksit
<b>Da</b>	: Dalton
<b>DEAE</b>	: Dietil Aminoetil
<b>dk</b>	: Dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribo Nükleik asit
<b>DNase</b>	: Deoxyribonuclease
<b>dNTP</b>	: Deoksi Nükleotit Tri Fosfat
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>EtBr</b>	: Etidyum Bromür
<b>FSC</b>	: Frame Shif Mutasyonu
<b>Fe</b>	: Demir
<b>fl</b>	: Femtolitre
<b>g</b>	: Gram
<b>G</b>	: Guanin
<b>Gγ</b>	: γ Glisin
<b>Hb A<sub>2</sub></b>	: Hemoglobin A <sub>2</sub>
<b>Hb C</b>	: Hemoglobin C
<b>Hb D</b>	: Hemoglobin D
<b>Hb E</b>	: Hemoglobin E
<b>Hb F</b>	: Fetal Hemoglobin
<b>Hb S</b>	: Hemoglobin S
<b>Hb</b>	: Hemoglobin
<b>HbA</b>	: Hemoglobin A
<b>Hct</b>	: Hematokrit
<b>HS</b>	: Hipersensitif
<b>IVS</b>	: Intron dizileri
<b>kb</b>	: Kilo baz
<b>LCR</b>	: Locus Control Region
<b>M</b>	: Molar
<b>mA</b>	: Mili Amper
<b>MCH</b>	: Hücre içindeki ortalama hemoglobin miktarı
<b>MCHC</b>	: Ortalama hemoglobin konsantrasyonu
<b>MCV</b>	: Ortalama eritrosit hacmi
<b>MCV/RBC</b>	: Mentzer indeksi
<b>mg</b>	: Mili gram
<b>mL</b>	: Mili litre

<b>mM</b>	: Mili Molar
<b>mRNA</b>	: Messenger RNA
<b>NaCl</b>	: Sodyum Klorür
<b>NO</b>	: Nitrik oksit
<b>O<sub>2</sub></b>	: Oksijen
<b>°C</b>	: Santigrat Derece
<b>OD</b>	: Optik Dansite
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>pg</b>	: Pikogram
<b>pH</b>	: potential of hydrogen
<b>RBC</b>	: Kırmızı kan hücresi (Eritrosit)
<b>RFLP</b>	: Restriction fragment length polymorphism
<b>RNA</b>	: Ribo Nükleik Asit
<b>rpm</b>	: Revolutions per minute
<b>SDS</b>	: Sodyum Dodesil Sülfat
<b>SNP</b>	: Tek Nükleotit Polifomorfizmi
<b>SSCP</b>	: Single Strand conformation polymorphism
<b>T</b>	: Timin
<b>TBE</b>	: Tris Borat EDTA
<b>TI</b>	: Talasemi İntermedia
<b>TM</b>	: Talasemi Major
<b>UTR</b>	: Untranslation Region
<b>UV</b>	: Ultra Viyole
<b>V</b>	: Volt
<b>VNTR</b>	: Variable number of tandem repeat
<b>WBC</b>	: Beyaz kan hücresi (Lökosit)
<b>WHO</b>	: Dünya Sağlık Örgütü
<b>α</b>	: Alfa
<b>β</b>	: Beta
<b>β<sup>+</sup></b>	: Beta zinciri kısmen veya tamamen üretilen
<b>β<sup>0</sup></b>	: Beta zinciri üretilmeyen
<b>γ</b>	: Gama
<b>δ</b>	: Delta
<b>ε</b>	: Epsilon
<b>ζ</b>	: Zeta
<b>θ</b>	: Teta
<b>σ</b>	: Sigma
<b>Ψ</b>	: Püsedo

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2. 1 Hemoglobinin genel yapısı .....	4
Şekil 2. 2 Hem molekül yapısı .....	5
Şekil 2. 3 Alfa ve beta globin gen aile yapıları ve globin genlerinin zamansal gelişim süreci..	7
Şekil 2. 4 İnsan beta globin gen ailesi yapısı .....	8
Şekil 3. 1 Genomik DNA izolasyonu şematik gösterimi .....	23
Şekil 4. 1 HPLC ile HbA <sub>2</sub> değeri belirlenen bir örneğin kromatogram bulguları.....	32
Şekil 4. 2 ARMS yöntemi ile elde edilen PCR ürünleri ve jel görüntüsü.....	33
Şekil 4. 3 IVS I-110 normal ve mutant agaroz jel bulguları .....	34
Şekil 4. 4 IVS I-110 mutant agaroz jel bulguları .....	36
Şekil 4. 5 IVS I-110 mutant agaroz jel bulguları .....	36
Şekil 4. 6 IVS I-110 mutant agaroz jel bulguları .....	37
Şekil 4. 7 IVS I-110 normal agaroz jel bulguları .....	38
Şekil 4. 8 Olgu (26-29) IVS I-110 normal ve mutant bulguları.....	39
Şekil 4. 9 FSC 8 mutant agaroz jel bulguları .....	40
Şekil 4. 10 IVS II-I mutant agaroz jel bulguları.....	41
Şekil 4. 11 IVS II-I normal ve mutant (Olgu1-4) ailesi için agaroz jel bulguları .....	42
Şekil 4. 12 FSC8 normal ve mutant agaroz jel bulguları .....	43
Şekil 4. 13 IVS I-6 mutant agaroz jel bulguları .....	44
Şekil 4. 14 Codon 39 mutant agaroz jel bulguları.....	45
Şekil 4. 15 -30 mutant agaroz jel bulguları .....	46
Şekil 4. 16 IVS I-1 mutant agaroz jel analiz bulguları.....	47
Şekil 4. 17 IVS II-745 mutant agaroz jel bulguları .....	48
Şekil 4. 18 IVS I-5 mutant agaroz jel bulguları .....	49
Şekil 4. 19 Fsc 8/9 mutant agaroz jel bulguları.....	50
Şekil 4. 20 FSC 8/9 normal ve mutant agaroz jel bulguları .....	51
Şekil 4. 21 IVS I-5 normal ve mutant agaroz jel bulguları .....	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2. 1 Talasemi için moleküler tanı akış şeması .....	11
Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve marka/modelleri .....	20
Çizelge 3. 2 Kit içeriğinde bulunan malzemeler .....	22
Çizelge 3. 3 ARMS için kullanılan PCR karışımları .....	26
Çizelge 3. 4 ARMS ile çoğaltılan örnekler için PCR programı .....	26
Çizelge 3. 5 ARMS ile çoğaltılan örnekler için kullanılan ortak primerler .....	26
Çizelge 3. 6 Normal ve mutata allelerin taramasında kullanılan primerler .....	27
Çizelge 3. 7 ARMS uygulaması için PCR bileşenleri.....	28
Çizelge 3. 8 Uygulama bileşenleri ve miktarları.....	28
Çizelge 3. 9 Reaksiyon adımları, sıcaklık, süre ve döngü sayıları.....	28
Çizelge 3. 10 Reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları .....	29
Çizelge 4. 1 Beta talasemi hasta ve ailelerine ait hematolojik ve HbA <sub>2</sub> değerlerinin bulguları .....	31
Çizelge 4. 2 IVS I-110 normal ve mutant analiz bulguları .....	34
Çizelge 4. 3 IVS I-110 mutant analiz bulguları .....	35
Çizelge 4. 4 IVS I-110 mutant analiz bulguları .....	37
Çizelge 4. 5 IVS I-110 normal analiz bulguları .....	38
Çizelge 4. 6 Olgu 26-29 için IVS I-110 normal ve mutant bulguları.....	39
Çizelge 4. 7 FSC 8 mutant analiz bulguları .....	40
Çizelge 4. 8 IVS II-I mutant analiz bulguları.....	41
Çizelge 4. 9 IVS II-I normal ve mutant olgu 1-4 ailesi.....	42
Çizelge 4. 10 FSC8 normal ve mutant analiz bulguları .....	43
Çizelge 4. 11 IVS I-6 mutant analiz bulguları .....	44
Çizelge 4. 12 Codon 39 mutant analiz bulguları .....	45
Çizelge 4. 13 -30 mutant analiz bulguları .....	46
Çizelge 4. 14 IVS I-1 mutant analiz bulguları .....	47
Çizelge 4. 15 II-745 mutant analiz bulguları.....	48
Çizelge 4. 16 I-5 mutant analiz bulguları .....	49
Çizelge 4. 17 8/9 mutant analiz bulguları .....	50
Çizelge 4. 18 FSC 8/9 normal ve mutant analiz bulguları .....	51

Çizelge 4. 19 IVS I-5 normal ve mutant analiz bulguları .....	52
Çizelge 4. 20 Tüm olguların analiz edilmesi ile elde edilen mutasyon bulguları .....	53
Çizelge 4. 21 Sadece hasta olguların analiz edilmesi ile elde edilen mutasyon bulguları .....	54



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Talasemi ilk defa 1925'te Thomas Cooley ve Pearl Lee tarafından, splenomegali ve karakteristik kemik değişiklikleri olan çocuklarda meydana gelen ciddi bir anemi formu olarak tanımlandı. İlk tanımlanan vakaların tümünün Akdeniz bölgesindeki çocuklarda yayınlanmış olması nedeni ile hastalık Yunanca da deniz anlamına gelen “*thalassa*” sözcüğünden “*thalassemia*” olarak adlandırıldı. Daha sonra bu bozuklukların Akdeniz çevresi ülkeleri ile sınırlı olmadığı, tropikal ülkeleri içine alan geniş bir bölgede “dünya talasemi kuşığı” görüldüğü ortaya çıkmıştır (1-2).

Tüm dünyada sıklıkla görülmekte olan talasemi, Akdeniz Ülkeleri başta olmak üzere, Orta Doğu, Orta Asya, Hindistan, Güney Çin ve Uzak Doğu, Kuzey Afrika kıyıları ve Güney Amerika'da yaygın olarak görülmektedir. En yüksek insidans olarak Kıbrıs (% 14), Sardunya (% 10.3) ve Güneydoğu Asya'da bulunduğu bildirilmiştir (3).

Ülkemiz açısından da büyük bir sağlık sorunu olan talasemi hastalığı, Çavdar ve Arcasoy tarafından talasemi sıklığını gösteren çalışmalarına göre ortalama insidansı % 2.1 ve bazı bölgelerde ise insidansın % 0.6-11.7 arasında olduğu belirtilmiştir (4).

Talasemi hastalığı  $\alpha$ -talasemi ve  $\beta$ -talasemi olarak iki forma ayrılmaktadır.  $\alpha$  talasemi daha çok Uzak Doğu'da görülürken,  $\beta$  talasemi Akdeniz ülkeleri ve Türkiye'de yaygındır.  $\beta$ -talasemi dünya genelindeki en yaygın kalıtsal hastalıklar arasında yer alır. Günümüzde  $\beta$  talasemiye neden olan moleküler bozukluklar oldukça iyi bir şekilde incelenmiştir. Moleküler çalışmalar ile 200'den fazla  $\beta$  talasemiye neden olan mutasyon belirlenmiştir. Bunların çoğunu nokta mutasyonları daha az bir kısmını delesyonel mutasyonlar oluşturmaktadır. Nokta mutasyonları RNA transkripsiyonunun başlamasını, RNA işlenmesini ve stabilitesini önleyerek normal globin sentezini önler. Buna karşın çerçeve kayması ve zincir mutasyonları translasyonu bloke ederler (5-6).

Bu geniş moleküler çeşitliliğin tümünün her toplumda görülmemesi, mutasyonların etnik gruplara özgün olmasından kaynaklanmaktadır. Genelde bir toplumda görülen  $\beta$ -talasemi mutasyonların % 90-95'ini az sayıda mutasyon çeşidi oluşturmaktadır. Alel çeşitliliği Sardunya adası, Kıbrıs gibi küçük ve izole etnik gruplarda daha da azalmaktadır. Türkiye toplumunda 40 dan fazla mutasyon çeşidi tanımlanmış olup bölgesel farklılık göstermektedir (7,8,9,10).

Bir genin farklı alellerde bulunma durumu ve bu alellerin toplum içerisinde farklı oranlarda dağılımı nedeniyle, türe ait grup içinde morfolojik, fizyolojik ve davranış gibi özellikleri bakımından farklı bireyler oluşturmaktadır. Her bireye özgü olan genselfarklılıklar, insan genomunu meydana getiren yaklaşık 3.2x10<sup>9</sup> bp'lik DNA diziliminde görülen farklılıklardan kaynaklanmaktadır (11). DNA dizisinde gözlenen bu farklılıkların, % 90.0' ını tek nükleotid polimorfizmleri (*SNP*'ler) oluşturmaktadır. *SNP*'lerin çoğu günümüzde bilinen işlevsel etkilere neden olmamakla birlikte, bazı *SNP*'ler gen ekspresyonunu, kromozom düzeyindeki yapılanmayı veya protein işlevlerini etkilemektedir (12,13). Çalışmalarda belirlenen *SNP*'ler ve alleller, insan genomu boyunca belli bir düzen içerisinde. Araştırmacılar insan genomunda rastgele dağılıma sahip olmayan ve genetik hastalıklara sebep olan, polimorfizm olarak ifade edilen DNA dizi değişikliklerini araştırarak, insan sağlığında önemli bir yer tutacak olan özgün yaklaşım, yöntem ve uygulamaları geliştirmektedir (11,14,15,16).

İnsan genomundaki bu genetik değişiklikleri oluşturan bölgeler; restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri (*RFLP*'ler), değişen çok sayıda tekrar bölgeleri (*VNTR*' lar), kısa tekrar bölgeleri (*STR*'ler) gibi insan genomundaki çeşitli tekrar bölgelerinden oluşmaktadır (17). İnsan genomu boyunca belirlenen polimorfizmlerin bir kısmı gen ürünlerinde yapısal ve işlevsel bozukluklara neden olarak fenotipi etkilemekte, diğer bir kısım polimorfizmler ise, sessiz kalarak gen düzeyinde çeşitliliğe neden olup, fenotip üzerinde herhangi bir belirgin sonuç ortaya koymamaktadır. Genom boyunca gözlenen polimorfik bölgeler arasındaki ilişkiler, çeşitli genetik ve evrimsel etkenler (*crossing-over*; karşılıklı parça değişimi, *mutation*; mutasyon, *gene conversion*; karşılıklı olmayan parça değişimi) arasındaki tarihsel ilişkiler ve toplumdaki biyolojik süreçlerden (*genetic drift*; genetik sürüklenme, *gene flow*; gen akışı ve *natural selection*; doğal seçim v.b.) etkilenmektedir. Nüfus hareketleri ve toplumsal biyolojik süreçleri etkileyen faktörler incelendiğinde, bu verilerden elde edilen bilgiler ışığında, çalışılan genom bölgesine özgü istatistiksel ve moleküler sonuçlar elde edilmektedir (18). Farklı toplumlarda gözlenen beta talasemi mutasyonlarına sahip olgularda, istatistiksel testlerle değerlendirilen çeşitli moleküler yöntemler (*RFLP*, *SNP*, DNA dizi analizi vb.) kullanılarak, beta globin gen mutasyonlarının ilişkili olduğu haplotip (*haplotype*) odakları ve bu mutasyonların yayılımı ile ilgili farklı hipotezlere dayalı görüşler ortaya konulmuştur. Bu çalışmalardan elde edilen verilere göre, beta globin gen ailesi içinde ayrılan 5' bölgesinin *SNP*'ler açısından daha kararlı bir yapıda olduğu gösterilmiştir. Diğer taraftan 3' bölgesinin ise, daha fazla rekombinasyona açık olduğu ortaya konulmuştur (19). Beta globin gen ailesi



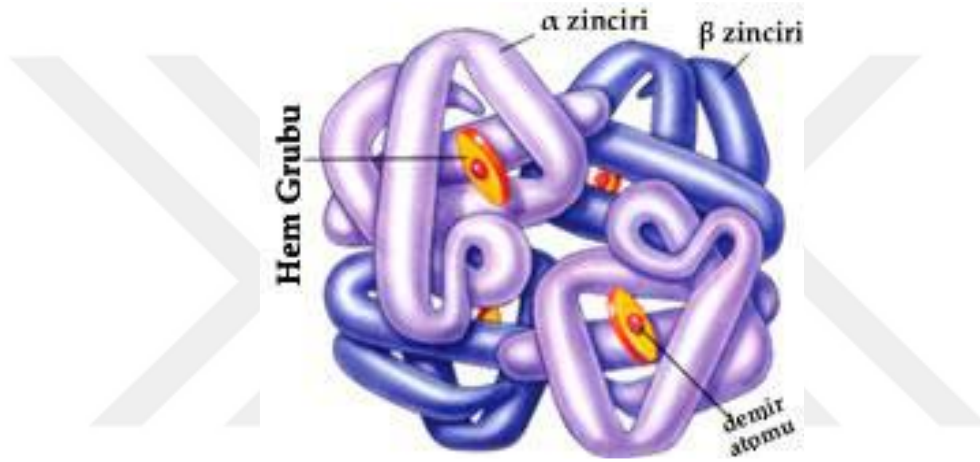
içerisinde yer alan 5' ve 3' haplotipleri arasında ise, yaklaşık 9.1 kb uzunluğundaki bölge rekombinasyon açısından sıcak bölge (*recombination hot-spot region*) olarak tanımlanmıştır. Bu bölgenin, beta globin geni içerisinde yeniden düzenlenerek, yapılanmanın en yoğun olarak gözlemlendiği ve genom boyunca rastgele olmayan ilişkilere (*non-random associations*) sahip olduğu belirlenmiştir (20). Sıcak bölgede gözlenen yüksek derecedeki yeniden yapılanma, 5' ve 3' haplotipleri arasındaki ilişkiyi bozmaktadır (20-22).

Türkiye'de ve tüm dünyada ciddi bir sağlık sorunu olan talaseminin ailelere ve topluma maddi ve manevi zararının çok büyük olması, hastalığın anlaşılması ve tedavi yöntemlerinin bulunmasını zorunlu kılmıştır. Bizim bu çalışmamızın amacı Kahramanmaraş ilinde bulunan  $\beta$  talasemi hastalarının genetik heterojenitelerini araştırarak prenatal tanı için riskli çiftlere faydalı olmak ve bu alanda yapılacak ikincil çalışmalar için temel teşkil etmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Hemoglobin Yapı ve İşlevi

Hemoglobin (Hb), eritrositler içinde oksijen bağlayıcı bir grup olarak bulunan hem molekülüne, 64.400 Da (dalton) ağırlığında dört globin zincirleri kovalent olarak bağlı olan tetramerik yapıya sahip, hücre ve dokulara oksijen taşımada işlev gören bir metaloproteindir. Her bir eritrosit hücresinde 300 milyon kadar hemoglobin molekülü bulunduğu bildirilmiştir (Şekil 2. 1) (23-26).

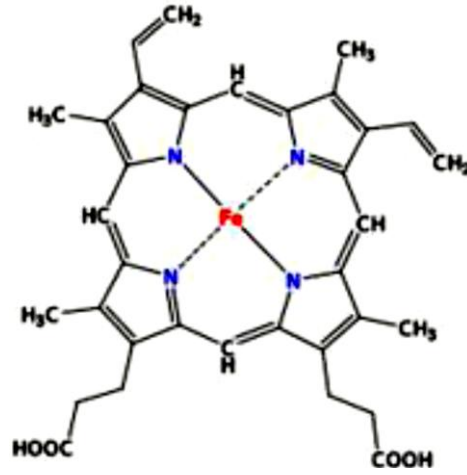


Şekil 2. 1 Hemoglobinin genel yapısı

Hemoglobinin yukarıda sayılan önemli biyolojik rolleri ile birlikte farklı 3 gazla [karbon dioksit (CO<sub>2</sub>), karbon monoksit (CO) ve nitrik oksit (NO)] özel etkileşimleri bulunmaktadır (Schechter 2008). Globin zincirlerindeki polipeptitlerinin tetramerindeki bu 4 ferröz demir atomuna gazların geri dönüşümlü olarak bağlanması hemoglobinin O<sub>2</sub>, CO ve NO taşımaya izin verir. CO<sub>2</sub> kanda demir atomuna bağlı olarak değil, hemoglobinin amino terminal rezidüleri ile zayıf karbomino kompleksi olarak etkileşim yoluyla çözülmüş olarak taşınır (25).

Hemoglobin molekülünün yapısında yer alan her globin zincirlerine bir tane de hem plağı bağlanmıştır. Bu yapı, hemoglobin molekülüne oksijen bağlanmasını sağlar ve kanın kırmızı renkli görünmesine olanak verir. Hem grubu, ferröz (Fe<sup>+2</sup>) şeklinde demir atomu ve protoporfirin halka sisteminden oluşmaktadır (27).

Hem, bir protoporfirin IX ve iki değerlikli demir (Fe<sup>+2</sup>) kompleksidir. Merkezinde Fe<sup>+2</sup> atomu olan Meten köprüleri ile birbirine bağlanan dört pirol halkasından meydana gelir (Şekil 2. 2). Hem içindeki demir atomları O<sub>2</sub>'i bağlayarak taşınmasını sağlar (26,28,29).



Şekil 2. 2 Hem molekül yapısı

Değişik hemoglobinler için globin zincirleri farklıdır. Bu farklılıklar;  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$  ve  $\zeta$  olarak ifade edilir. Hb'lerin tümü, her bir globin zincirine bir hemin bağlandığı farklı ikişer çift globin zincirinden oluşan, bir tetramerik yapıya sahiptir (30-31). Sağlıklı normal erişkinlerde; HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ) ve HbF (fetal Hb,  $\alpha_2\gamma_2$ ) yapısında görülür. Embriyonik dönemde; Hb portland ( $\zeta_2\gamma_2$ ), Hb Gower 1 ( $\zeta_2\epsilon_2$ ), Hb Gower 2 ( $\alpha_2\epsilon_2$ ) yapısından oluşur (30,32).  $\gamma$  zincirinin 136. aminoasit pozisyonunda glisin ve alanin bulunmasına göre iki farklı fetal Hb mevcuttur.  $\gamma$  glisin (G $\gamma$ ) ve  $\gamma$  alanin (A $\gamma$ ) zincirlerinin gen lokusları da ayrıdır (31). Gelişimin farklı evrelerinde, farklı tipte hemoglobinler yapılmaktadır (1).

Hemoglobin molekülü, tetramerik ve allosterik özellik taşıyan yapısı, fizyolojik işlevin gerçekleştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Hemoglobin molekülünün % 96'sını oluşturan globinlerin üç boyutlu yapılarında, Van der Waals bağları olmakla birlikte, yapıdaki polar özellikte bulunan amino asit grupları dış yüzeyde, non-polar yan gruplar ise iç yüzeyde bulunmaktadır. Hemoglobin molekülü oksijen ile allosterik etkileşimini sağlamaktadır. Hemoglobin molekülünün üç boyutlu yapısının aydınlatılması 1960 yılların başlarında Perutz ve arkadaşları tarafından X ışını kristallografisi yöntemi ile belirlenmiştir (23-25). Hemoglobinin, oksihemoglobin ve deoksihemoglobin durumu için birer tane olmak üzere iki farklı dördüncül (*quaterner*) yapısı bulunmaktadır. Hemoglobin molekülü bir yapıdan diğer yapıya, çoğunlukla farklı hemoglobin altbirimleri arasındaki etkileşimlerin katıldığı bazı amino asit rezidülerinin hareketleri ile geçmektedir. Dolayısıyla, globin zincirleri arasındaki bağlantılarda, 1-2 ya da 1-2 arasında olanlar sayıca az olup önemsiz iken, en önemli bağ 1-2 arasında olan bağıdır. Ayrıca farklı globin zincirleri arasındaki bağlantı uzaklığı, benzer globin zincirlerinden daha büyük olduğu için farklı globin zincirleri arasındaki bağlar daha güçlüdür (33-34).

Hemoglobin molekülünün üç boyutlu yapısı, “oksijenizasyon” ve “deoksijenizasyon” durumu tarafından etkilenmektedir. Hemoglobin molekülü oksijen bağladığı zaman üç boyutlu yapısında gevşeme (*relaxed*) oluşmakta ve alt birimler birbirleri üzerinden hareket ederek dönme hareketleri meydana gelmektedir. Oksihemoglobin durumunda, demir atomunun pozisyonu dolayısıyla, 1-2’de 1 A° yaklaşma, 7 A° dönme hareketi oluşmaktadır. Oksijenizasyon durumunda, iki globin zincirinin hem gruplarının demir atomları arasındaki mesafe önemli derecede değişmez iken, globin zincirleri arasındaki mesafe azalır (33). Globin zincirleri arasındaki bu tür etkileşimler ve bu etkileşimler sonucu gerçekleşen konformasyonel değişim, hemoglobin molekülünün oksijene olan ilgisi değişime neden olmaktadır (34-37).

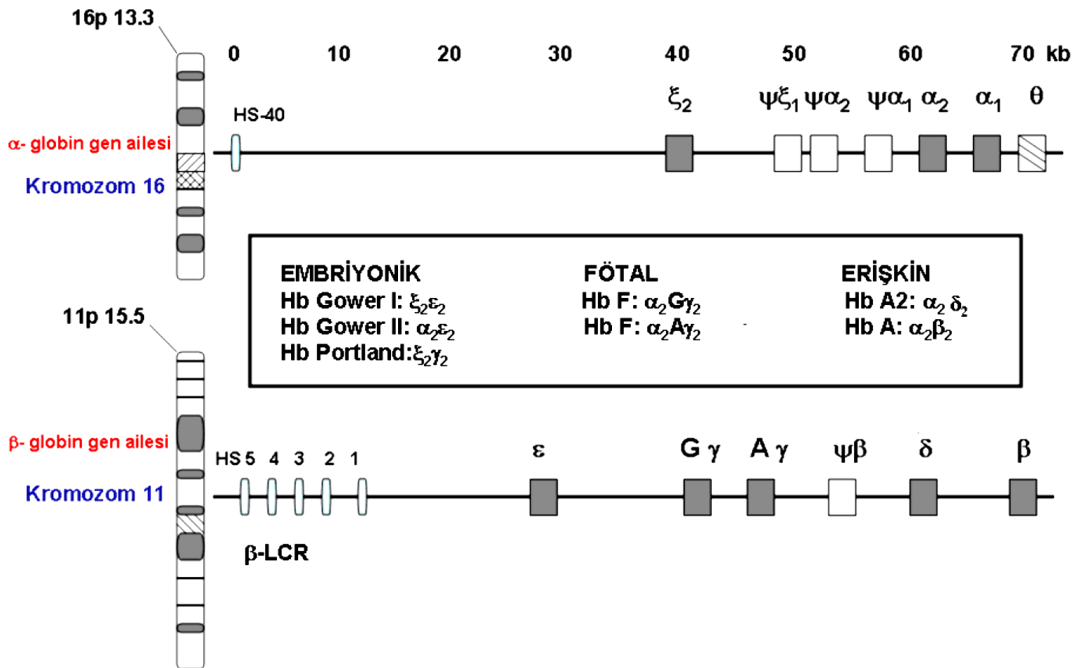
## 2.2. İnsan Globin Gen Aileleri

Organizmada, embriyonik, fetal ve yetişkin yaşam boyunca her bir gelişimsel adımda, değişen oksijen ihtiyacına göre ve benzeri globin genlerinin eş güdümlü biçimde ekspresyonu ile sonuçlanan, yaşam evrelerine özgün farklı hemoglobin tipleri sentez edilmektedir (38). Hemoglobin yapımı ile ilgili genler, yaşamın farklı evrelerinde etkinleşmekte ya da baskılanarak etkinliklerini kaybetmektedirler. Bu bağlamda, yetişkin ve fetal yaşamda globin zincirleri; (HbA,  $\alpha_2\beta_2$ ), (HbA<sub>2</sub>,  $\alpha_2\delta_2$ ), (HbF,  $\alpha_2\gamma_2$ ) globin zincirleri ile bütünleşik biçimde bulunmaktadır. Embriyonik yaşamda ise,  $\alpha$ -globin benzeri genlerin zincirler olan globin zincirleri ile Hb Portland, ( $\zeta_2\gamma_2$ ) ve Hb Gower I, ( $\zeta_2\varepsilon_2$ ) globin zincirleri, ayrıca globin zincirleri ile globin zincirleri (Hb Gower II,  $\alpha_2\varepsilon_2$ ) bir arada bulunmaktadır. Bu genler, bireylerin gelişimsel aşamalarına bağımlı olarak farklı şekilde ifade edilmektedir (Şekil 2.1) (39-40).

Alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) globin gen aileleri, iki farklı kromozomda yer almaktadır. İnsan  $\alpha$ -gen ailesi, yaklaşık 30 kb uzunluğunda olup, 16. kromozomun kısa kolunda (16p 13.3) bulunmakta ve 141 amino asit kodlamaktadır. İnsan  $\alpha$ -gen ailesi üç işlevsel gen ( $\zeta$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ ,  $\theta$ ), üç etkin olmaya gen (*pseudogene*,  $\Psi\zeta$ ,  $\Psi\alpha_1$ ,  $\Psi\alpha_2$ ) içermektedir. İnsan  $\beta$ -gen ailesi ise, yaklaşık 70 kb uzunluğunda 11. kromozomun kısa kolunda (11p 15.5) yer almakta, 146 amino asit kodlamaktadır.

Bu gen ailesi ise, beş etkin gen ( $\varepsilon$ ,  $G\gamma$ ,  $A\gamma$ ,  $\delta$  ve  $\beta$ ) ve bir etkin olmayan genden (*pseudogene*,  $\Psi\beta$ ) oluşmaktadır. Fetal hemoglobin, heterojen bir yapıya sahip olup iki farklı globin zincirinden meydana gelmektedir. Gama ( $\gamma$ ) globin zincirinin 136. pozisyonunda, glisin amino asit bileşimi yer alıyorsa G, alanin amino asit bileşimi yer alıyorsa A globin zinciri oluşmaktadır (Şekil 2.1).

Gelişimsel süreç boyunca, zamana bağlı olarak farklı hemoglobin türlerinin ifade edilmesi, “*hemoglobin swicthing*” olarak ifade edilen olayla gerçekleşmektedir. (41-42). Alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ )globin gen ailesi, eritroid dokuya özgü gen ekspresyonunun başlaması için özgün promotor bölgeler ile etkileşebilen ve her bir genin gelişimsel düzenlenmesini kontrol eden düzenleyici (*regulators*) elementler içermektedir. Bu elementler, globin genlerinin transkripsiyonunun gelişimsel süreçlerine bağlı olarak düzenlenmesinde, dokuya özgün kararlı bir yapıya sahip olan, DNase-HS (*hypersensitive*) bölgelerinde yer almaktadır. Bu bölgeler  $\alpha$ -globin gen ailesi için, bir -HS 40 (veya -MRE) dizisi,  $\beta$ -globin gen ailesi için ise beta geni kontrol bölgesi (LCR; *locus control region*) içinde yer alan beş HS (HS1, HS2, HS3, HS4, HS5) diziden oluşmaktadır (43). Bu dizilerin her biri, transkripsiyonu etkinleştirici (*activators*) veya engelleyici (*repressors*) moleküller için bağlanma bölgesi olarak yer alan kısa motifler olarak düzenlenmişlerdir. Farklı hemoglobin türlerinin zamana bağlı ekspresyonunun molekül mekanizması, her bir globin gen ailesi içinde yer alan globin genlerinin birbirinden bağımsız olarak düzenlenmesini sağlayan, globin genlerinin düzenleyici bölgelerde bulunan elementlerle farklı derecelerde etkileşimleri ile gerçekleşmektedir (Şekil 2. 3) (39,44-48). Yapılan çeşitli araştırmalar ile fetal ve erişkin beta benzeri globin genlerinin gelişimsel aşamalara özgün farklı ekspresyonunun, LCR bölgesinin üst kısmında yer alan dizilerde, ilgili genlerin proksimal promotorları arasındaki yarışmalı etkileşim ürünleri ile oluşabileceği düşünülmektedir (43,49-51).

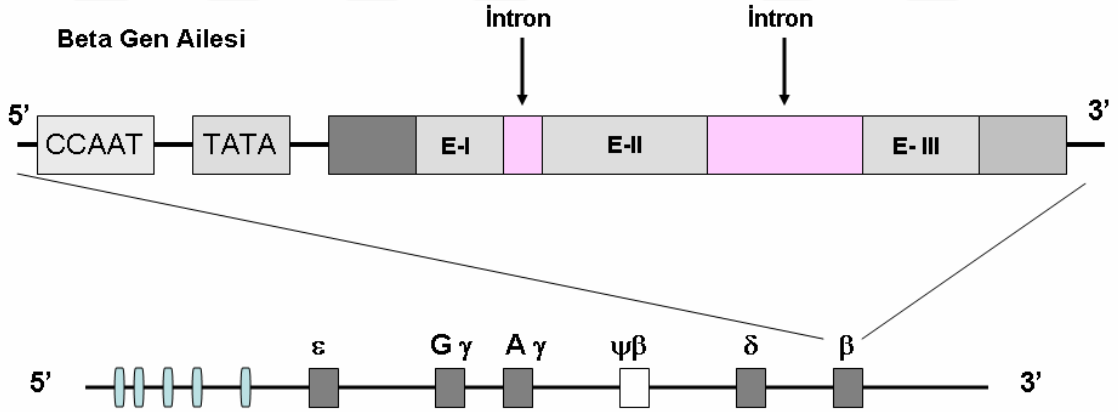


Şekil 2. 3 Alfa ve beta globin gen aile yapıları ve globin genlerinin zamansal gelişim süreci

### 2.3. Beta Globin Gen Ailesi

İnsan globin gen ailesi yaklaşık 70 kb uzunluğunda bulunan ve 11. kromozomda yer alan (11p 15.5), bütün insan lokusları arasında en yoğun olarak çalışılan gen grubudur. Beta globin gen ailesi, embriyonik yaşamda eksprese edilen  $\epsilon$  globin geni, fetal yaşamda eksprese edilen G ve A globin genleri, erişkin yaşamda eksprese edilen ve globin genleri olmak üzere beş aktif gen ve olarak ifade edilen bir etkin olmayan genden oluşmaktadır. Beta globin gen ailesinin bir ürünü olan  $\beta$ -globin, erişkin hemoglobin yapısında ( $HbA, \alpha_2\beta_2$ ) bulunur iken, diğer beta globin gen ailesi ürünleri  $\epsilon$  ve  $\gamma$ - globin olarak embriyonik ve fetal hemoglobin türlerinin bir üyesi olarak gelişim boyunca eksprese edilmektedir (52-53).

Beta globin gen ailesi yapısı içerisinde yer alan her bir beta-benzeri gen; üç ekzon ve iki intron bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 2. 4). Beta globin gen ailesi içerisinde yer alan  $\beta$ -benzeri globin genlerinin gelişimini ve yetişkin yaşam boyunca dokuya özgün ekspresyonunu kontrol eden beta geni kontrol bölgesi (LCR), yaklaşık 20 kb uzunluğunda olup, geninin 6-18 kb önünde yer almaktadır (48).



Şekil 2. 4 İnsan beta globin gen ailesi yapısı

### 2.4. Talasemi Genel Özellikleri

Talasemi bir yaşından küçük çocuklarda solukluk, dalak büyümesi, gelişme bozukluğu ile kendini gösteren daha sonraları yüz kemiklerinde değişimler, demir birikimine bağlı olarak

multi organ (kalp, karaciğer, pankreas gibi) bozukluklarıyla karakterize edilen kalıtsal bir hastalıktır (54).

Dünya nüfusunun yaklaşık %7'sinin Hb hastalıkları açısından taşıyıcı olduğu ve her yıl 300.000-500.000 yeni doğanda bu hastalıkların çeşitli formlarının görüldüğü tespit edilmektedir. Sosyo-ekonomik düzeyi düşük veya orta olan ülkelerde her yıl orak hücre anemili çocukların %50-80'inin öldüğü bildirilirken, Beta talasemi hastalığı sebebiyle ise dünyada her yıl 50.000- 100.000 çocuğun öldüğü bildirilmektedir (55).

#### **2.4.1. Beta Talasemi**

$\beta$ -talasemi, hipokrom-mikrositer, hemolitik anemi ile karakterize ve yaşamın sürdürülebilirliğinin kan transfüzyonuna bağımlı olduğu otozomal resesif geçişli kalıtsal bir hastalıktır. 11. kromozomun kısa kolu üzerinde (11p 15.5) yer alan,  $\beta$ -globin geninde meydana gelen mutasyon sonucunda  $\beta$ -globin zincir yapımının azalması veya yokluğu ile karakterizedir (1-3).

Beta talasemi, beta globin zincir sentezinin azalmasına ( $\beta^+$ ) veya yokluğuna ( $\beta^0$ ) neden olan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (54,56).

Beta talasemi de hastalığın ağır klinik formlarıyla ilişkili olan mutasyonların büyük delesyonlardan ziyade nokta mutasyonlarının sorumlu olduğu bilinmektedir. Özellikle PCR ve moleküler tabanlı yöntemlerin kullanıma girmesinden sonra hastalıkla ilgili çok sayıda mutasyon tanımlanmaya başlanılmıştır. Dünya genelinde 200'ün üzerinde mutasyon tanımlanmış olup her geçen gün bu mutasyonların sayısının değiştiği de bilinmektedir (2).

Beta talasemi olgularının hem klinik hem de molekül sel düzeyde yüksek oranda çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle gerek mutasyonlar ve gerekse de beta globin gen ailesi içerisinde yer alan gen bölgeleri ve etkileşen protein faktörleri birçok çalışmanın temel amacı olmuştur. Bu bağlamda her bir mutasyonun etkisi, etki işlergesi ve fenotip-genotip ilişkileri, bilimsel çevrelerde özel önem kazanmıştır (57-60).

#### **2.4.2. Beta Talaseminin Patofizyolojisi**

Kalıtsal hemoglobin bozukluklarının bir grubu olan  $\beta$  talasemiler,  $\beta$  globin zincir üretiminin azalmış sentezi veya tamamen yokluğuyla karakterizedir.  $\alpha$ /non $\alpha$  globin sentez oranının dengesizliği  $\beta$  talasemi sendromundaki hastalığın şiddetini saptamada önemli faktördür. (1).

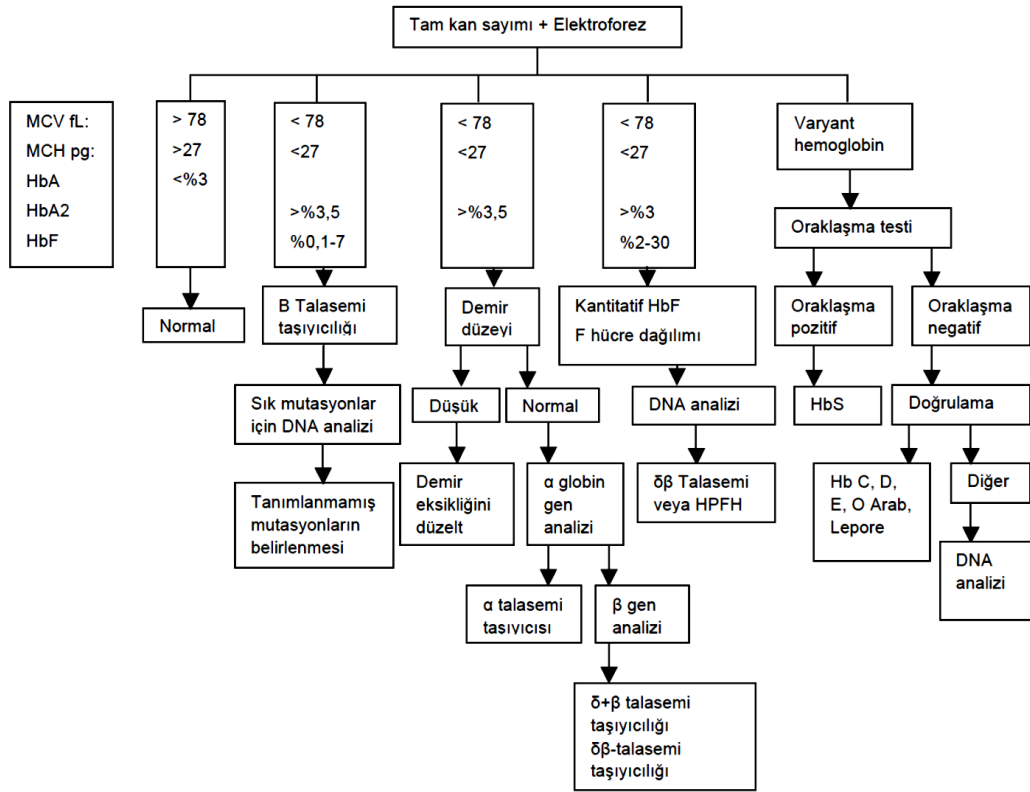
Beta talasemide normal alfa globin zincir üretimi normal şekilde devam ederek eritroid prekürsörlerde aşırı alfa globin birikimi oluşmaktadır. Normal bireylerde  $\beta:\alpha$  oranı 0,9:1,1 olarak bulunurken beta talaseminin ağır formlarında 0-0,35 oranlarında bulunmaktadır. Üretilmeyen beta zinciri yerine gama zincir sentezi ve HbF üretilmeye çalışılır ancak gama zincirleri ortamdaki tüm alfa zincirlerini bağlamada yetersiz kalır ve alfa zincirleri hücrede çöker. Eritrositlerde hemoglobin alt üniteleri miktarı artarak oksidasyon ile süperoksit ve hidrojen radikalleri gibi serbest oksijen radikalleri, methemoglobinler ve hemikromlar oluşur. Serbest alfa globin zincirleri tetramer yapısı oluşturamadığından kemik iliğinde kırmızı hücre prekürsörlerinde Heinz body olarak adlandırılan inklüzyon cisimleri şeklinde çökerler. Eritroit prekürsörlerin intramedüller yıkımından ve böylece beta talasemilerde gelişen yetersiz eritropoezden sorumludurlar. Tüm bu olaylar sonucunda gelişen inefektif eritropoez anemiye, eritropoetin aşırı üretimine ve kemik iliğinin aşırı genişlemesine yol açar. Eritropoetik kemik iliği aktivitesinin artması sonucu osteopeni, osteoporoz, kemik hipertrofisi, yüz ve kafatası kemiklerinde deformiteler gibi iskelet anomalileri gözlenir (61).

#### **2.4.3. Beta Talaseminin Moleküler Patolojisi**

Bugüne kadar  $\beta$  globin genini etkileyen ve  $\beta$  talasemi fenotipine neden olan yaklaşık 200 farklı moleküler defekt yayınlanmıştır (62). Beta talasemiye neden olan mutasyonların büyük bir çoğunluğu primer olarak nokta mutasyonudur, diğerleri nükleotit eklenmesi veya delesyonları içerir (63) Talasemide moleküler tanı için akış şeması Çizelge 2. 1'de verilmiştir (64). PCR temelli teknolojilerin gelişimi ile hızlı, kesin ve güvenli sonuçlar elde edilebilmektedir (61).



Çizelge 2. 1 Talasemi için moleküler tanı akış şeması



#### 2.4.4. Beta Talasemi Mutasyonları

Beta talasemiye neden olan çoğu mutasyonun beta globin geninin fonksiyonel olarak önemli bölgelerindeki nokta mutasyonlarla ilgili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar Beta talasemili hastalarda beta globin geninde 200'den fazla farklı nokta mutasyonu olduğunu göstermektedir (65).

Nokta mutasyonları beta globin ekspresyonunu 3 farklı kategoride etkilemektedir. Bunlar:

- Hatalı beta globin gen transkripsiyonuna yol açan promotor ve 5' UTR mutasyonları
- mRNA işlenmesini etkileyen bağlantı bölgesi ve konsensus dizi mutasyonları ile poliadenilasyon ve diğer 3' UTR mutasyonları
- Anormal mRNA translasyonuna neden olan anlamsız mutasyonlar, çerçeve kayması (frameshift) ve başlangıç kodonu mutasyonları beta talasemiye neden olan nokta mutasyonlarına ek olarak daha nadir görülen büyük gen delesyonları da bildirilmiştir. Talasemilerin en ağır formu olan  $\beta^0$  talasemilerin delesyon, başlangıç kodonu mutasyonları,

anlamsız, çerçeve kayması ve özellikle de birleştirme bölgesi bağlantısındaki mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Daha hafif bir talasemi formu olan Beta<sup>+</sup> talasemilerin ise promotor bölgesi (ya CACCC ya da TATA kutusu), poliadenilasyon sinyali ve 5'-3' UTR bölgelerindeki mutasyonlardan veya splicing anomalilerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (56).

#### **2.4.5. Promotor ve 5' UTR bölgelerindeki mutasyonlar**

$\beta$  geninin promotor bölgesinde bulunan konsensus dizilerde oluşan mutasyonlar RNA polimerazın  $\beta$  genine bağlanma ve transkripsiyonu başlatma yeteneklerini azaltır,  $\beta$  mRNA transkripsiyonu % 20–30 arasında düşer. Bunların birçoğunda  $\beta^+$  talasemiler görülür,  $\beta$  globin zincir sentezi homozigotlarda veya çifte heterozigotlarda talasemi majörü önlemeye yeterlidir, klinik seyirin hafif olduğu talasemi intermedia fenotipini oluştururlar (66).

$\beta$ -globin geninin 5' yan tarafında, dizisi korunmuş motifler içinde (TATA kutusu, proksimal ve distal CACCC kutusu) veya çevresinde tanımlanmış olan mutasyonlardır (1).

Bu bölgede tek baz değişimi ve minör delesyonlar gibi çeşitli mutasyonlar bildirilmiştir. Heterozigot durumunda normal veya sınırda eritrosit indeksleri ve HbA<sub>2</sub> görülür iken; ağır BT allelli birleşik heterozigotta genellikle hafif fenotipte  $\beta^+$ -talasemi görülür. mRNA başlık bölgesinde (Cap+1 A>C) meydana gelen mutasyonda; transkripsiyonda azalma, başlıklanmada yavaşlama ve mRNA kararlılığında bozulma meydana gelir. Sadece homozigot durumda talasemi taşıyıcılığı hematolojik değerlerini gösterir (1,67).

#### **2.4.6. RNA işlenmesi (processing) ile ilgili mutasyonlar**

Esas olarak RNA işlenmesi; fonksiyonel mRNA üretmek için intronların çıkarılması ve kodlama bölgelerinin birleştirilmesinden oluşmaktadır. Bu sürecin hassaslığı, mevcut intron/ekson sınırlarının hassas dizilerine dayanır. Bu diziler birleşme bölgelerindeki oldukça iyi korunmuş değişmez dinükleotidler olan 5' bölgesindeki GT ve 3' bölgesindeki AG ve konsensus dizileridir (1).

#### **2.4.7. Splice bölgesi ve consensus dizi mutasyonları**

Değişmez dinükleotid (5'-GT ve 3'-AG) mutasyonları normal splicing ortadan kaldırır ve  $\beta^0$ -talasemiye neden olur. Şimdiye kadar değişmeyen dinükleotidleri içeren 24 mutasyon tespit edilmiştir. mRNA'daki diğer gizli splice bölgeler, alternatif splice için kullanılır ancak mis-spliced (hatalı yerleşimli) mRNA ile fonksiyonel  $\beta$ -globini üretilemez. Normal splicing etkinliği, splice bölgesinin hemen bitişiğindeki konsensus dizilerinde meydana gelecek

mutasyonlarla azaltılabilir.  $\beta$ -globin üretiminde azalma oldukça değişkendir ve hafif / şiddetli fenotiple sonuçlanır. Örneğin; IVS-1-5 (G→C, G→T, G→A) mutasyonunda  $\beta$ -globin sentezinde belirgin bir azalma oluşturduğundan ağır  $\beta^+$ -talasemi fenotipine neden olur. Halbuki Akdeniz bölgesinde oldukça yaygın olan IVS-1-6 (T→C) mutasyonu, splicing etkinliği hafif etkiler ve hafif  $\beta^+$ -talasemi klinik tablosu görülür (68).

İntron I ve intron II'nin başlangıç ve bitiş yerlerindeki donör ve akseptör dinükleotidleri GT ve AG'yi kapsayan mutasyonlar RNA processing'i şaşırtıcı biçimde bozabilir. Bu nükleotidlerdeki değişimler RNA splicing'i bütünüyle bozar ve oluşan mRNA  $\beta$ -globin sentezi için kullanışsızdır; sonuçta  $\beta^0$  talasemi fenotipi oluşur (68).

Bu grup, intronların 5' donör ya da 3' akseptör splice birleşmelerindeki ya da birleşme çerçevelerindeki konsensus dizilerinde oluşan mutasyonlarını içerir. 5' intron donör bölgesinde korunmuş GT ve 3' intron akseptör bölgesinde AG dinükleotidlerinin kritik olan yapısı nedeniyle, bu dinükleotidlerdeki mutasyonlar normal splicing oluşumunu engeller. Normal akseptör yerinin inaktivasyonu, RNA prekürsöründe başka bir yerde, diğer akseptör benzeri dizilerin kullanımına yardımcı olur. Bu alternatif yerler, doğru yer olduğunda splicing tarafından normal olarak kullanılmaz ve “*cryptic splice sites*” olarak adlandırılır. Kriptik veya akseptör bölgeler ekzonlar veya intronlar içinde bulunabilir ve tek başlarına kullanılabilceği gibi diğer kriptik bölgelerle veya normal splice bölgeleriyle yarışa girebilir. IVS 1'in 5. pozisyonunda G yerine C, T veya A'nın geçmesiyle oluşan mutant donör alan normalle karşılaştırıldığında splicingi büyük oranda azaltır. Ciddi  $\beta^+$ - talasemiye neden olur. IVS 1'in 6. pozisyonunda T yerine C'in girmesi normal RNA splicingini hafif olarak etkiler ve hafif  $\beta^+$ -talasemi fenotipine neden olur. IVS 1'in 110. pozisyonundaki G>A değişimi normal  $\beta^+$ -mRNA'nın küçük bir miktarının üretilebilmesine olanak verir ve ciddi  $\beta^+$ - talasemiye neden olur. IVS 1'in 116. pozisyonundaki T>G değişiminde  $\beta$ -mRNA'nın üretimi çok az veya hiç yoktur ve  $\beta^0$ -talasemi fenotipiyle sonuçlanır. IVS 2'nin 745. pozisyonunda C>G baz değişimi sonucunda bozuk splicing gerçekleşir. Normal donör bölgeden normal akseptör bölgeye kadar splicing değişen miktarlarda meydana gelir ve  $\beta^+$ -talasemiden  $\beta^0$ - talasemiye kadar değişebilen fenotipik yapı ortaya çıkar (69).

*İntron ve ekzonlardaki gizli bölge mutasyonları;* İntronlar ve ekzonlar boyunca, intron-ekson sınırlarında benzer diziler vardır. Normalde “gizli splice bölgeler” splicing için kullanılmazlar. Bu dizileri içeren nükleotid değişimlerinin bir kısmı normal alanda gizli bir bölgeye dönüşür. Bu yeni splice sinyali, splice için normal konsensus sekansı ile yarışır ve bazı

durumlarda, şiddetli  $\beta^+$  veya  $\beta^0$  talasemi fenotipi ile sonuçlanır. IVS-1' de iki ve IVS-2' de dört gizli splice bölge mutasyonları tanımlanmıştır. Ekzonlarda bulunan üç gizli splice bölgeler nükleotid değişimiyle aktive olabilir: Birincisi, kodon 10 (C→A), ikincisi, kodon 19 (A→G) ve üçüncüsü, kodon 24 (T→A), 26 (G→A) veya 27 (G→T)' deki mutasyonlar tarafından oluşur. Nükleotid değişimleri, kısmen gizli splice bölgeleri aktive ederek, hem normal hem de anormal spliced  $\beta$ -mRNA ile sonuçlanırlar. Kodon 24 (T→A) mutasyonu dönüşümü sessizdir ve şiddetli  $\beta^+$  talasemi ile ilişkilidir. Kodon 19 (Hb Malay), 26 (HbE), ve 27 (Hb Knossos) mutasyonları anormal hemoglobin üretimine neden olur ve normal splice bölgelerinin kullanımından dolayı hafif veya sessiz bir talasemi fenotipi ile ilişkilidir (68).

Kalıtsal kan hastalıkları grubu içerisinde yer alan talasemiler, hemoglobin molekülünün üretimi süresince, alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) globin zincir sentezlerinde meydana gelen düzenlenme dengesizliklerine dayalı, globin zincir sentez bozukluğu olarak ifade edilmektedir (43). İlk talasemi olgusu, majör formda 1925 yılında Dr. Thomas B. Cooley ve Dr. Pearl Lee tarafından, İtalyan orjinli çocuklarda splenomegali, belirgin kemik değişiklikleri ile ilişkili olarak gözlenmiştir (70). Daha sonra ilk talasemi olgularının Yunanistan, İtalya ve Suriye gibi Akdeniz ülkelerinde bildirilmesi nedeni ile bu vakalara “Akdeniz Anemisi” tanımı verilmiştir (71). Ancak ilerleyen zamanlarda bu tanım bırakılarak bu olgular, Yunanca deniz anlamına gelen “*thalassa*” ve anemi (kansızlık) anlamına gelen “*emia*” kelimesinden kaynak alan “*thalassemia*” olarak ifade edilmiştir (60-61). Fakat sonraki yıllarda, Cooley ve Lee tarafından tanımlanmış olan bu tür olguların Akdeniz ülkeleri ile sınırlandırılmaması gerektiği, diğer çeşitli toplumlarda da oldukça yaygın ve geniş ölçüde gözlemlenebilen genetik hastalıklardan biri olduğu bildirilmiştir. Talasemiler, etkilenen globin zincir veya zincirlerine göre ifade edilmektedir. Başlıca gözlenen formları  $\alpha$  ve  $\beta$ -talasemi olmakla birlikte ve talasemiler olarak ifade edilen farklı türleri de belirlenmiştir (73).

#### 2.4.8. Dünyada $\beta$ talasemi

Talasemiler içinde beta talasemi, dünyada en yaygın olarak görülen otozomal resesif geçişli kalıtsal kan hastalıklardan biridir. Beta talasemilerde  $\beta$ -globin zincir sentezindeki azalma,  $\alpha/\beta$  türü globin sentezinde dengesizliğe neden olmakta ve böylece bu oran,  $\beta$  talasemi'nin ciddiyetini belirleyen önemli faktörlerden birini oluşturmaktadır (73-74). Beta globin üretimindeki yetersizlik ile sonuçlanarak  $\beta$  talasemi'ye neden olan mutasyonlar, normalden az  $\beta$  globin zinciri sentezlenmesi ile oluşan “ $\beta^+$  talasemi” mutasyonlarından, hiç  $\beta$  globin zinciri sentezlenmemesi ile oluşan “ $\beta^0$  talasemi” mutasyonları arasında değişmektedir. Nadir de olsa bazı farklılıklar görülmekle birlikte,  $\beta$  talasemi heterozigotlar hafif hemotolojik

anormalliklere sahip olup, klinik olarak herhangi bir belirti göstermemekte ve “talasemi minör” olarak tanımlanmaktadır. Beta talasemi homozigot veya çift heterozigotlar ise, transfüzyon bağımlı, klinik ve hematolojik olarak ciddi hastalık tablosuna sahip olmakta, “*talasemi major (TM)*” ve “*talasemi intermedia (TI)*” olarak ifade edilmektedirler. TI hastaları hafif ve değişken bir tablo sergilemekle birlikte, düzenli kan transfüzyonu gerektirmemekte, fakat hepatosplenomegali ve hücre iskeleti anormalliklerine sahip olabilmektedirler (75-78).

Ayrıca yapılan araştırmalar sonucunda, heterozigot  $\beta$  talasemili olgular sıtmaya karşı direnç sağladığı için bu mutasyonların, sıtmanın yaygın olarak görüldüğü Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu, Afrika ve Güney Doğu Asya gibi toplumlarda, doğal seçilim (*natural selection*) ile görülme olasılığının daha yüksek olması beklenmiştir. Böylece heterozigot beta talaseminin, bireyleri sıtmaya karşı gensel olarak koruduğu düşünülmektedir. Dolayısıyla bir sağlık problemi olan  $\beta$  talasemilere neden olan gelişim süreçlerinin sıtma evrimi ile yakından ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Fakat daha sonraları yapılan incelemeler sonucunda beta talasemi mutasyonunun, aynı zamanda sıtma salgını olmayan bölgelerde de görülmesi, bu öngörüye kuşku ile yaklaşılması sonucunu doğurmuştur (73,79-83).

Beta talasemi olgularının hem klinik hem de molekül düzeyde yüksek oranda çeşitlilik gösterdiği bilinmektedir. Bu nedenle gerek mutasyonlar ve gerekse de beta globin gen ailesi içerisinde yer alan gen bölgeleri ve etkileşen protein faktörleri birçok çalışmanın temel amacı olmuştur. Bu bağlamda her bir mutasyonun etkisi, etki işlergesi ve fenotip-genotip ilişkileri, bilimsel çevrelerde özel önem kazanmıştır (57-60). Günümüzde, beta globin genlerinde beta talasemiye neden olan dünyada yaklaşık 300 ve üzeri farklı mutasyon saptanmıştır (84,1,62). Bu mutasyonların yaklaşık 50 tanesi, Akdeniz ülkelerinde belirlenmiştir (85). Akdeniz ülkelerinde, doğu ve batı kısımlarda, talasemi mutasyonları farklı sıklıklara sahiptir. Akdeniz ülkelerinde batıya doğru gidildikçe talasemi sıklığı düşmektedir. Bu mutasyonların tanımlandığı toplumlardaki kesin mutasyon dağılımlarının belirlenmesi, genetik danışma, premarital tarama ve prenatal tanı için gerekli stratejilerin yorumlanmasında önem kazanmıştır. Farklı toplumlarda, beta talasemiye neden olan beta globin genleri arasındaki gensel ilişkilerin ortaya konulabilmesi, birçok çalışmanın ana konusu olmuştur. Bu çalışmalar arasında, mt-DNA (*maternal*, anneye ait), Y-kromozom (*paternal*, babaya ait) incelemeleri ve beta globin gen ailesi haplotiplerin tanımlanması gibi gensel yaklaşımlar önem taşımaktadır (87-93)

#### 2.4.9. Türkiye’de $\beta$ -talasemi

Türkiye’de beta talasemi ile ilgili ilk çalışmalar Prof. Dr. M. Aksoy tarafından 1941 yılında başlamış, 1950’li yılların sonunda ise bu rahatsızlık, tıp araştırmacılarının dikkatini çeken önemli bir konu olarak görölmüştür (94). Türkiye’de 40’dan fazla sayıda beta talasemi mutasyonları belirlenmiş olup, çeşitli molekölsele yöntemlerle bu mutasyonların, hem gösterdikleri klinik tablolar hem de mutasyon türleri olarak oldukça heterojen bir yapıya sahip oldukları belirlenmiştir (95,96,97). Diğer Akdeniz ölkelerinden farklı olarak, Türkiye’nin Asya ve Avrupa arasında köprü görevi gören coğrafik yerleşimi nedeni ile tarih boyunca birçok nüfus hareketleri ile karşı karşıya kalmasının gen havuzundaki çeşitliliği oluşturduğu düşünölmektedir (98). Farklı araştırmacılar tarafından Türkiye’nin farklı bölgelerindeki  $\beta$  talasemi mutasyon sıklıkları karşılaştırılmış, bölgesel farklılıklar gözlenmekle birlikte, genel olarak Türkiye’de tüm beta talasemi sıklığı % 2.0 olarak tanımlanmıştır (97). Türkiye’de  $\beta$  talasemi mutasyonlarının coğrafik dağılımını incelendiğinde, Doğu Anadolu’dan Batı Anadolu’ya doğru gidildikçe mutasyon sayısındaki değişimde azalma görölmüştür (9,95,99-101). Denizli yöresinde ise talasemi sıklığı, farklı araştırmacılar tarafından % 2.6 ile % 3.7 arasında belirlenmiştir (102,90).

Hemoglobinopatiler bir bölümü ölkemizde sıklıkla gözlenen kalıtsal hastalıklar arasında yer almaktadır. En yaygın görölen hemoglobin varyantı HbS dir. Çeşitli araştırmalar bu hastalığın oranının ölkemizin farklı yörelerinde %0.5–44.2 arasında değiştiğini belirtmişlerdir. Bu varyant, yaygın olarak Akdeniz bölgesinde görölmüştür.

Ayrıca HbE %1.6–2.4 HbD %0.2 ve HbC de % 3.9 oranında rapor edilmiştir (104). Türkiye’de  $\beta$ -talasemi, diğer Akdeniz ölkelerine oranla daha karmaşıktır.  $\beta$ -talasemi riski taşıyan toplumlarda, aynı bölgede birçok mutasyonun birlikte bulunmasından dolayı  $\beta$ -talasemi hastalarının büyük kısmı iki değişik mutasyon taşırlar; bunlar iki es mutasyon taşıyan “gerçek homozigot”lardan farklı olarak “çift heterozigot” olarak adlandırılır. Bu tip mutasyonların genetiğinin aydınlatılması oldukça zordur.  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığı oranı Türkiye genelinde yaklaşık olarak %2 olmakla birlikte, busayı Türkiye’nin bazı yörelerinde %10’a kadar çıkmaktadır. Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye’de beklenenin de üzerinde  $\beta$ -talasemili çocuk doğmasının nedenidir. Hastalık, hafif klinikli  $\beta$ -talasemi intermedya ile tranfüzyona bağımlı  $\beta$ -talasemi majör arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görölmekle birlikte, Türkiye’de  $\beta$ -talasemi majör olguları ağır basmaktadır. Halen Türk toplumunda 30’u aşkın mutasyon tanımlanmıştır. Bu geniş molekölere çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde güçleştirmektedir (103).

## 2.5. Tanı ve Teşhisde Moleküler Yöntemler

Talasemi çalışmalarında sıklıkla kullanılan HPLC ve PCR gibi birçok yöntemler çalışmanın temelinin oluşturmaktadır.

### 2.5.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi(HPLC)

Hemoglobin ve globinlerin ayrıştırılması ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Zayıf iyon değiştirici kolonlar (anyon ve katyon değiştiriciler) Hb'lerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Hb molekülünün globin zincirleri de HPLC ile ayrıştırılarak mutasyonun (zincirdeki amino asit değişikliğinin) hangi zincirde olduğunu belirlemektedir. Bu işlem globinlerin hidrofobik özelliklerinden faydalanılarak yapılmaktadır.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi beş önemli parçadan meydana gelmiştir. Numuneyi sisteme alan enjektör, pompa, kolon, dedektör ve yazıcıdır. Ayrıca hemoglobin ayırımını sağlamak için sistemin bir de çözeltiye (tampon) gereksinimi vardır. Günümüzde bu parçalar bir cihaz içerisinde toplanarak sadece hemoglobin ve globin zincir analizleri yapacak şekilde değişik firmalar (Bio-Rad; Variant) tarafından pazarlanmaktadır. Hemoglobinopatiler için özel olarak hazırlanmış bu sistemlerin kullanımı çok kolaydır. Bir cihaz, kolon ve çözeltileri değiştirilerek Hb ve globin analizlerini kısa sürede yapmaktadır. Bir tarama merkezinde kan sayım ve HPLC cihazlarını birlikte bulundurularak sistematik bir tarama yapılabilir. Bu iki cihaza sahip olan bir merkez tek bir teknisyen ile günde pek çok örneği analiz edebilir. Bu olanaktan yoksun olan merkezlerde çalışanlar mikroskopla kırmızı hücre sayıp, Hb ve Hct ölçümlerini yaptıktan sonra MCV ve MCH değerleri hesaplamak zorundadır. Ayrıca yukarıda bahsettiğimiz şekilde Hb elektroforezi, HbA<sub>2</sub> ve HbF ölçümlerini de yapmak için daha fazla sayıda insan, kimyasal madde ve zamana gereksinim duyulmaktadır.

### 2.5.2. Hematolojik Endeks

Hastalara ait hematolojik parametreler kan sayım cihazı ile ölçülür. Bu ölçümlerde kırmızı kan hücrelerinin büyüklüğü, hacmi ve ihtiva ettikleri hemoglobin miktarını belirtilir. Kırmızı kan hücrelerinin büyüklüğü hacmi ve içlerindeki hemoglobin miktarı azalır veya düşerse bireyin talasemi taşıyıcısı olabileceği düşünülür. Normal bireylerde sıklıkla kaydedilen hematolojik göstergeler Çizelge 1. 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. 1. Hematolojik değerlendirmede kullanılan sınır değerler

Hematolojik Değerler		Sınır Değerler
<b>RBC</b>	10 <sup>12</sup> /L	4,1-5,1
<b>Hgb</b>	g/dL	12,3-15,3
<b>Hct</b>	%	36,0-50,0
<b>MCV</b>		80,0-96,1
<b>MCH</b>	pg	27,5-33,2
<b>MCHC</b>	g/dL	33,4-35,2
<b>Hgb Elektroforezi</b>		HbA
<b>HbA<sub>2</sub></b>	%	2,5-3,5
<b>HbF</b>	%	<1,0

Yöremizde yaygın olarak görülen demir eksikliği anemisi ve talaseminin karşılaştırılmasında Çizelge 1. 2’de tablodan yararlanılmıştır. Ayrıca demir eksikliği ve talaseminin ayırıcı tanısında Acarsoy ve arkadaşları (2003) tarafından Çizelge 1. 3’ de verilen kriterlerden yararlanılmıştır.

Çizelge 1. 2. Talasemi taşıyıcılığı ve demir eksikliği anemisinin karşılaştırılması

Türler	Demir Eksikliği Anemisi			Talasemi	
	Hafif	Orta	Ağır	Alfa	Beta
<b>Hct (%)</b>	35-40	30-35	<30	37-40	32-40
<b>MCV</b>	Normal	75-85	70-85	75-85	<75
<b>HbA<sub>2</sub></b>	Normal	Normal	Düşük	Normal	Genellikle artmış
<b>HbF</b>	Normal	Normal	Normal	Artabilir	Artabilir
<b>Ferritin</b>	Düşük	Düşük	Düşük	Normal	Normal

**Hb:** Hemoglobin, **Hct:** Hematokrit, **MCV:** Mean Corpuscular Volume

Çizelge 1. 3. Demir eksikliği ve talaseminin ayırıcı tanısı

Eritrosit Değerleri	Talasemi	Demir Eksikliği Anemisi
<b>MCV</b>	<80 fL	<80 fL
<b>MCH</b>	<27 pg	<27 pg
<b>RDW</b>	Normal	Artmış
<b>Mentzer İndeksi (MCV/RBC)</b>	<13	>13



### 2.5.3. PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)

PCR, hedef DNA fragmanlarının milyonlarca veya daha fazla kopyasını üreten, birkaç adım büyüklüğündeki hedef DNA'nın amplifikasyonu için kullanılan bir moleküler tekniktir. Bir PCR'de 25-45 devir boyunca tekrarlanan farklı sıcaklıklarda üç ana adım vardır. Çift sarmallı hedef DNA, ısıyla denatüre edilir (denatürasyon adımı), hedef segmenti tamamlayan iki primer düşük sıcaklıkta tavlanır (annealing basamağı) ve tavlanmış primerler daha sonra bir DNA Polimeraz ile bir ara sıcaklığa uzatılır. Teorik olarak, her bir döngüde hedef kopya sayısı ikiye katlanır.

**Primerler:** Primer kalitesi, başarılı multipleks PCR için kritik bir faktördür, bu nedenle Multipleks PCR PreMiksi standart kalite primer çiftleri ile başarılı çoklu PCR gerçekleştirmek üzere tasarlanmalıdır. Tüm primer çiftlerinin özgüllüğü, bir multipleks PCR testinde birleştirilmeden önce tek PCR reaksiyonlarında test edilmeli ve doğrulanmalıdır.

*Primer tasarımı:* Primer tasarım, başarılı multipleks PCR reaksiyonları için kritik öneme sahiptir. Tüm primerler genellikle 24-35 nükleotid uzunluğunda ve ideal olarak 5 ° C'de bir Tm değeri aralığına sahiptir.

*Anneal sıcaklığı:* Multipleks PCR için tavlama sıcaklığı, bileşen astar çiftlerinin en yüksek Tm değerini kullanarak seçilmelidir. Bu multipleks PCR reaksiyonunda spesifik olmayan bantları azaltır.

*Primer molar konsantrasyon:* PCR reaksiyonu sırasında mevcut olan DNA primerlerinin miktarı sonuçları etkiler. Çok yüksek primer konsantrasyonları çoklu tepkimeyi engelleyebilir, ancak çok düşük miktarlar yeterli olmayabilir. Reaksiyon başına nihai primer konsantrasyonunun 1- 5 pmol olmasını önerilir.

*Agaroz jel analizi:* Agaroz jel elektroforezi DNA'yı ayırmanın ve analiz etmenin en kolay ve en yaygın yoludur. Aşağıdaki grafik çeşitli ebattaki DNA parçalarını ayırmak için önerilen agaroz konsantrasyonlarını göstermektedir (Çizelge 1. 4).

Çizelge 1. 4. Verimli PCR ürün aralığı ve agaroz jel yüzdeleri

Verimli PCR ürünü aralığı	Agaroz (%)
200 bp- 2 kb	1.2- 1.5%
100 bp- 1 kb	1.5-%2
80 bp- 500 bp	%2,5- 3%

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Kullanılan Araçlar ve Kimyasalların Temini

Bu çalışmada, kullanılan cihaz ve ekipmanların özellikleri ile marka/model bilgileri Çizelge 3. 1’de verilmiştir. Ayrıca çalışma kapsamında kimyasal ve diğer sarflar kullanılmıştır.

Çizelge 3. 1. Çalışmada kullanılan cihazlar ve marka/modelleri

Cihaz adı	Marka/Model
Buz Dolabı	Arçelik
Çalkalayıcı	IKA-SCHÜTTLER MTS2
Etüv	Binder
Fotograf makinesi	Poloroid Gel Cam, Sony Digital
Güç Kaynağı	Edit on line
Jel elektroforez cihazı	Sigma-Aldrich
Manyetik Karıştırıcı	IKA Labortechnik
Mikro Santrifüj	Hettich Mikro 22R
Mikrodalga fırın	Arçelik
Otomatik pipet	Volac (50,100µL)
Otomatik pipet	(Eppendorf (1-20 iL)
pH metre	Lab Star
Santrifüj	MSE Mistral 1000
Spektrofotometre	Thermo Electron Coparation
Tarayıcı	Hp Scanjet 2400
Terazi	Scaltec
Thermal Cycler	Eppendorf Mastercycler Personal PCR
Transluminatör	Vilber Lourmat
Vortex	Heidolph Reax

#### 3.2. Hematolojik Yöntemler

##### 3.2.1. Kan örneklerinin alınması ve kan sayımı

Kan örnekleri Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Araştırma Hastanesi Çocuk Hematoloji Kliniğinde tedavi gören hasta ve ailelerinden alınmıştır. EDTA içeren toplama tüplerine alınan kanların sayımı yapıldıktan sonra Hb varyantları HPLC ile analiz edilmiştir. Mutasyon analizi için beyaz kan hücrelerinden DNA izole edilmiştir.

### 3.2.2. Hemolizat hazırlanması

Kanlar üç kez serum fizyolojik ile yıkanarak 2400 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Çökelen hücre hacmi kadar su ilave edilerek 5 dakika iyice çalkalandıktan sonra 3000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmistir. Hemolizat olarak bilinen üst faz HPLC analizlerinde kullanılmıştır.

### 3.2.3. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi(HPLC)

Hemoglobin ve globinlerin ayrıştırılması ve miktarlarının belirlenmesinde kullanılan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi beş önemli parçadan meydana gelmiştir. Numuneyi sisteme alan enjektör, pompa, kolon, dedektör ve yazıcıdır.

HPLC cihazı Agilent 1100

HPLC Kolonu: Poly CAT katyon değiştirici (3.54CT 0315, 3uL 100)

HPLC de kullanılan çözeltiler

Mobil Faz A: 20 mM Bis Tris, 100 mg KCN pH 6.2

Maobil Faz B 20 mM Bis Tris, 200 mM NaCl pH 6.5

### 3.3. Moleküler Tanı Yöntemleri

Talaseminin moleküler tanısında ARMS, RFLP ve DNA dizi analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Bu analizler için öncelikle genomik DNA'nın izolasyonu gereklidir.

**%2 lik Jelin Hazırlanması:** Agaroz (1g) ve NuSieve (1g) 100 mL 1x TBE Tamponu içinde mikrodalga fırında eritilerek hazırlanmıştır.

**Yükleme Tamponunun Hazırlanması:** %0.25 Brom Fenol Mavisi ve %40 Sukrozolacak şekilde 1x TBE tamponunda hazırlanmıştır.

**pH:8, Tris Borat EDTA (TBE) Tamponunun Hazırlanması:** Tris Baz (54g) Borikası (27.5 g) ve 2.5 gr EDTA 900 mL saf suda çözülmüştür. pH 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1000 mL saf su ile tamamlanmıştır.

**Etidyum Bromür Çözeltisinin Hazırlanması:** EtBr 5µg/mL olacak şekilde saf suda eritilmiştir.

### 3.3.1. Genomik DNA izolasyonu

Bu çalışmada genomik DNA izolasyonu için Bioneer markası *AccuPrep®* Genomic DNA Extraction Kiti kullanılmıştır. Prosedür firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki gibi uygulanmıştır. Kit içeriğinde bulunan malzemeler Çizelge 3. 2' de verilmiştir.

Çizelge 3. 2 Kit içeriğinde bulunan malzemeler

Kit Solüsyonları	Miktar
Proteinaz K, liyofilize	25 mg X 2 şişe
Doku Liziz Tamponu (TL)	25 mL
Bağlama Tamponu (GC)	25 mL
Yıkama Tamponu 1 (W1)	40 mL
Yıkama Tamponu 2 (w2)	20 mL
Elüsyon Tamponu (EL)	30 mL
Kolonlar ve tüpler	
Bağlayıcı kolon tüpleri	100
2 mL tüpler (filtreleme için)	100
1.5 mL tüpler (elüsyon için)	100

#### Gerekli ek malzemeler;

- Masa üstü santrifüjü, 10000 xg (13,000 rpm)
- İnkübatör, termal blok veya su banyosu
- Sterilize pipet ucu
- Vorteks
- Saf etanol
- Saf isopropil alkol
- 1.5 mL tüp (lizat hazırlanması için)
- Fosfat tamponu tuzu

#### Başlamadan önce yapılanlar;

1. Proteinaz K 1.25 mL nükleazsız ultra saf suda çözüldü.
2. Yıkama Tamponu 1 (W1) 30 mL saf etanol ile seyreltildi.
3. Yıkama Tamponu 2 (W2) 80 mL saf etanol ile seyreltildi.
4. Elüsyon Tamponu (EL) 60 °C sıcaklığa getirildi.

Deney protokolü olarak kullanılan metot Şekil 3. 1'de iş akışı şematik gösterimi (tam kan için) verilmiştir.



Şekil 3. 1 Genomik DNA izolasyonu şematik gösterimi

### 3.3.1.1. Tam kandan DNA izolasyon uygulaması

1. Temiz bir 1.5 ml tüpe 20 µl Proteinaz K eklendi.
2. 200 µl tam kanı Proteinaz K içeren tüp üzerine uygulayın. Numune hacmi 200 µl'den düşürse toplam hacmi 200 µl yapmak için PBS eklendi.
3. Örneğe 200 µl Bağlama tamponu (GC) ekleyin ve hemen Vorteks karıştırıcıyla karıştırın. Azami lizöz verimliliğini elde etmek için numuneyi tamamen tekrar süspanse etmeye özen gösterildi.
4. 60 ° C'de 10 dakika inkübe edildi.
5. 100 µl izopropanol ilave edin ve pipetle iyice karıştırıldı. Bu adımdan sonra, damlaların kapağın altına yapışmasını sağlamak için kısaca aşağı doğru döndürüldü. DNA verimini azaltabileceği için vorteks yapılmadı.
6. Parçacıkları, kapak ıslanmadan bağlayıcı sütun tüpünün üst haznesine dikkatlice aktarıldı (2 ml tüp içine oturtun).
7. Tüp kapatılarak ve 1 dakika 8,000 devirde (6,000 g) santrifüjlendi.

Santrifüj işlemi sırasında aerosol oluşumunu önlemek için her bağlayıcı sütun tüpünü kapatmamız gerekir. Lizat, santrifüjden sonra sütundan tamamen geçmezse, cilt sütunu tüpü boşalana kadar tekrar yüksek bir hızda ( $> 10,000$  rpm) santrifüjlendi.

8. Tüp açılarak ve bağlayıcı sütun tüpünü, filtreleme için yeni bir 2 ml'lik tüpe (verilen) aktarıldı.
9. Kapak ıslanmadan 500  $\mu$ l yıkama tamponu 1 (W1) ilave edildi, tüpü kapatılarak ve 1 dakika süreyle 8.000 devirde (6.000 g) santrifüjlendi.
10. Tüp açılarak ve çözeltiyi 2 ml tüpten bir boşaltma şişesine boşaltıldı.
11. Kapak ıslanmadan dikkatlice 500  $\mu$ l yıkama tamponu 2 (W2) ilave edilerek, tüp kapatıldı ve 1 dakika süreyle 8.000 devirde (6.000g) santrifüjlendi.
12. Etanolü tamamen çıkarmak için 1 dakika boyunca 13000 devirde (10,000g) bir kez daha santrifüjlendi ve bağlayıcı kolon tüpünün tabanına yapışan bir damlacık olmadığını kontrol edildi.

Bağlayıcı kolon tüpünde artık W2, sonraki uygulamalarda sorunlara neden olabileceği unutulmamalıdır.

13. Bağlayıcı kolon tüpünü, elüsyon için yeni bir 1.5 ml tüpe aktarıldı, Bağlayıcı kolon tüpüne 200  $\mu$ l elüsyon tamponu (EL veya nükleaz içermeyen su) ilave edildi ve oda sıcaklığında en az 1 dakika bekletildi (15 ~25 °C), EL, bağlayıcı kolon tüpünün cam elyafına tamamen emilmesi beklendi.

DNA verimini artırmak için elüsyon tamponu (EL) ekledikten sonra 5 dakika beklemelidir.

14. Elüe edilmesi için 1 dakika boyunca 8.000 devirde santrifüjlendi.

200  $\mu$ l Elüsyon Tamponu (veya nükleaz içermeyen su) kullanıldığında yaklaşık 180  $\mu$ l ~ 200  $\mu$ l eluent elde edilebilmektedir.

Çıkarılan genomik DNA kararlıdır ve doğrudan kullanılabilir veya daha sonra analiz için +4 °C'de saklanabilir. Uzun süreli DNA depolaması için, elüsyon tamponu (EL) ile elüe edilmelidir ve -20 °C'de saklanmalıdır, çünkü suda depolanan DNA asit hidrolizine tabi olmaktadır.

### **3.3.2. Polimeraz zincir reaksiyonu ile beta gen amplifikasyonu**

Talasemi hastası veya taşıyıcısı olabilecek bireylerden saflaştırılan DNA'lar ARMS kullanılmak üzere PCR ile şu şekilde çoğaltılmıştır.

Polimer zincir reaksiyonu ile genomik DNA'nın istenen bölgesi, mutasyona spesifik bir çift primer yardımıyla çoğaltılmıştır. Amplifikasyon olarak isimlendirilen bu işlemde DNA 95°C'ye kadar ısıtılmıştır. Böylece çift iplikli DNA'nın ayrılarak tek iplikli DNA haline gelmesi sağlanmıştır. İkinci asamada ısı (55°C-65°C) düşürülerek spesifik primerlerin komplementer dizilerine yapışması (annealing) sağlanmıştır. Üçüncü aşamada taq DNA polimeraz enzimi ile deoksिनुकлеозид trifosfatlar (dNTP) primerlerin 3' ucuna eklenerek yeni zincir 5'den 3' doğru sentezlenmiştir.

Bu üç basamakta meydana gelen ısı değişiminin her tekrarında (döngü) sentezlenen zincir sayısı iki katına çıkartılmıştır. Thermal Cycler ile sağlanan bu ısı döngüsü 25-30 kez tekrarlanarak gen amplifikasyonu sağlanmıştır. Thermal Cycler cihazı PCR tüplerinin yerleştirildiği bir ısıtıcı blok ve ısı değişimlerini ayarlayan ısıtıcı ve soğutucu sistemler ile bunların sürelerini ayarlayan bir mikro işlemciden oluşmuştur.

### **3.3.3. Amplification refractory mutation system (ARMS)**

Önceden karakterize edilen nokta mutasyonları veya küçük delesyonlar ARMS yöntemiyle belirlenmiştir. ARMS yönteminde iki ayrı PCR tüpü kullanılmıştır. Normal DNA dizisine özgü ARMS primeri, sadece normal alleli belirlerken mutant alleli amplifiye edememiştir. Benzer şekilde, ikinci tüpte mutant allele spesifik primerler mutasyonu belirlerken, normal diziyi amplifiye edememiştir. Klasik PCR'dan farklı olarak hermutasyon için ayrı bir amplifikasyon yapılarak beta globin geni taranmıştır. Mutant beta globin alleline özgü primer sadece mutasyon olan bölgeyi tanıırken, tek bir nükleotid farklı bile olsa amplifikasyon gerçekleşmemiştir. Birinci PCR tüpüne mutasyona spesifik primer ile ona zıt yönde çalışan diğer primer PCR koşullarını sağlamak için eklenmiştir. Normal allele özgü primer ile buna zıt yönde çalışan diğer primer ikinci PCR tüpüne konularak thermal cycler da amplifiye edilmiştir. Böylece her iki tüpte amplifikasyon gözlenirse taşıyıcı, sadece mutant primerin bulunduğu birinci tüpte amplifikasyon varsa hasta, birinci tüpte yok sadece ikinci tüpte varsa, spesifik mutasyon mevcut değildir. Ayrıca beta globin geni primerler ile amplifiye edilerek PCR koşulları kontrol edilmiştir. Kısacası her tüpte iki farklı fragment çoğaltılmıştır. Çizelge 3. 3-6' de sırasıyla ARMS için kullanılan karışımları, PCR programını, ortak ve mutant primerleri göstermektedir.

Çizelge 3. 3 ARMS için kullanılan PCR karışımları

Yöntem	Normal PCR tüpü	Mutant PCR tüpü
PCR karışımı	20 µL	20 µL
Normal ARMS Primeri	1 µL	-
Mutant ARMS Primeri	-	1 µL
Ortak Primer	1 µL	1 µL
Kontrol A	1 µL	1 µL
Kontrol B	1 µL	1 µL
DNA (0.5-1 µg/mL)		1 µL
Tag Polimeraz (5 EU/mL)	0.1 µL	0.1 µL
Toplam Hacim	25,1 µL	25,1 µL

Çizelge 3. 4 ARMS ile çoğaltılan örnekler için PCR programı

Sıcaklık	Zaman (saniye)	Döngü Sayısı
94 °C	60	25
65 °C	60	25
72 °C	90	25
72 °C	100	1

Çizelge 3. 5 ARMS ile çoğaltılan örnekler için kullanılan ortak primerler

- 1 5'-AGT GCT GCA AGA AGA ACA ACT ACC -3'
- 2 5'-CTC TGC ATC ATG GGC AGT GAG CTC -3'
- 15 5'-CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC -3'
- 16 5'-GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA -3'
- 30 5'-ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC -3'
- 31 5'-CCC CTT CCT ATG ACA TGA ACT TAA -3'



Çizelge 3. 6 Normal ve mutatalelerin taramasında kullanılan primerler

<b>IVS1-110 (G&gt;A)40M</b>	5'-CTG ATA GGC ACT GAC TCT CTC TGC CTG TTA -3'
<b>IVS1-110 (G&gt;A)41N</b>	5'-ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACC -3'
<b>IVS1-1 (G&gt;A)42M</b>	5'-TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAT -3'
<b>IVS1-1 (G&gt;A)43N</b>	5'-TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAC -3'
<b>CD 39 (C&gt;T)47M</b>	5'-CAG ATC CCC AAA GGA CTC AAA GAA CCT GTA -3'
<b>CD 39 (C&gt;T)52N</b>	5'-TTA GGC TGC TGG TGG TCT ACC CTT GGT CCC -3'
<b>IVS1-6 (C&gt;T)</b>	5'-TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATG -3'
<b>IVS1-6 (C&gt;T)</b>	5'- TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATA -3'
<b>FSC8 (-AA)54M</b>	5'-ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGG -3'
<b>FSC8 (-AA)70N</b>	5'-ACA CCA TGG TGC ACC TGA CTC CTG AGC AGA -3'
<b>-30 (T&gt;A)57M</b>	5'-GCA GGG AGG GCA GGA GCC AGG GCT GGG CAA-3'
<b>-30 (T&gt;A)58N</b>	5'-GCA GGG AGG GCA GGA GCC AGG GCT GGG CAT -3'
<b>IVS2-1 (G&gt;A)49M</b>	5'-AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAT -3'
<b>IVS2-1 (G&gt;A)77N</b>	5'-AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAC -3'
<b>IVS2-745 (C&gt;G) 50M</b>	5'-TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGG -3'
<b>IVS2-745 (C&gt;G) 56N</b>	5'-TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGC -3'
<b>IVS1-5(G&gt;C)88M</b>	5'-CTC CTT AAA CCT GTC TTG TAA CCT TGT TAG -3'
<b>IVS1-5(G&gt;C) 89N</b>	5'-CTC CTT AAA CCT GTC TTG TAA CCT TGT TAC -3'
<b>FSC8/9 (+G)90M</b>	5'-CCT TGC CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAC ACC -3'
<b>FSC8/9 (+G)91N</b>	5'-CCT TGC CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAC ACT -3'

### 3.3.4. $\beta$ -globin Gen Mutasyonlarının “AccuPower Multipleks PCR Premiks” kiti kullanılarak Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (ARMS) ile Saptanması

ARMS uygulaması ile PCR protokolü uygulanırken Bioneer markasının AccuPower® Multiplex PCR PreMix kiti kullanılmıştır (Çizelge 3. 7).

AccuPower® Multiplex PCR PreMix, iki veya daha fazla ürünün tek bir tüpte DNA amplifikasyonuna izin veren güçlü ve basit bir teknolojidir. AccuPower Multiplex PCR PreMix,

Hotstart Top DNA polimeraz, dNTP'ler ve reaksiyon tamponu ihtiva eder; bu ön-karıştırılmış formatta liyofilize halde bulunur.

Çizelge 3. 7 ARMS uygulaması için PCR bileşenleri

Bileşen	Konsantrasyonu
DNA polimeraz	1 U
DNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Her birinden 250 µM
Reaksiyon Tamponu, 2 mM MgCl <sub>2</sub>	1 X
Sabitleyici ve izleme boyası	

*Uygulama protokolü:* Template DNA, damıtılmış su ve primerler kullanmadan önce çözülmüştür. Template DNA ve primerleri AccuPower multipleks PCR Premiks'e eklenmiştir (Çizelge 3. 8).

Çizelge 3. 8 Uygulama bileşenleri ve miktarları

Bileşenler	Miktar
Template DNA	1 ng – 100 ng
Primer seti	Her biri 1- 5 pmol

Her AccuPower Multiplex PCR Premiks tüplerine 15 µL damıtılmış su eklenmiştir. Liyofilize edilmiş yeşil pelleti tamamen çözündürülmüştür. Birkaç kez pipetlendikten sonra kısaca yukarı ve aşağı döndürülmüştür. Reaksiyon aşağıdaki koşullar altında uygulanmıştır (Çizelge 3. 9 ve Çizelge 3. 10).

Çizelge 3. 9 Reaksiyon adımları, sıcaklık, süre ve döngü sayıları

Adım	Sıcaklık	Süre	Döngü Sayısı
Pre-denaturasyon	95 ° C	1 dak	1
Denatürasyon	95 ° C	30 sn	26
Tavlama	65 ° C	30 sn	
Uzatma	72 ° C	1,5 dak/ kb	
Son Uzantı	72 ° C	5 dak	1

Çizelge 3. 10 Reaksiyon bileşenleri ve konsantrasyonları

<b>Bileşen</b>	<b>Hacim</b>	<b>Konsantrasyonu</b>
Template DNA	2 µl	100 ng / µl
Primerler	4 µl	1 pmol / µl
Distile Su	14 µl	
Toplam	20 l	



#### 4. BULGULAR

$\beta$  talasemi tanısı konulan ve metabolik rahatsızlığı bulunan, doğum yerleri Kahramanmaraş ve yöresi olan 14 talasemili hasta ve onların ailelerinden toplam 29 kan örneği alındı. Toplanan kan örnekleri soğuk zincir kurallarına uygun şekilde laboratuara getirildi. 10 ml olacak şekilde EDTA'lı tüpe alınan tüm örneklerin kan sayımı, hemoglobin tiplendirmesi, Hb A<sub>2</sub> ve Hb F düzeyleri ölçülmüş ve tüm kan örneklerinin DNA'sı izole edilerek polimeraz zincir reaksiyonu ile  $\beta$  globin gen delesyonları incelendi.

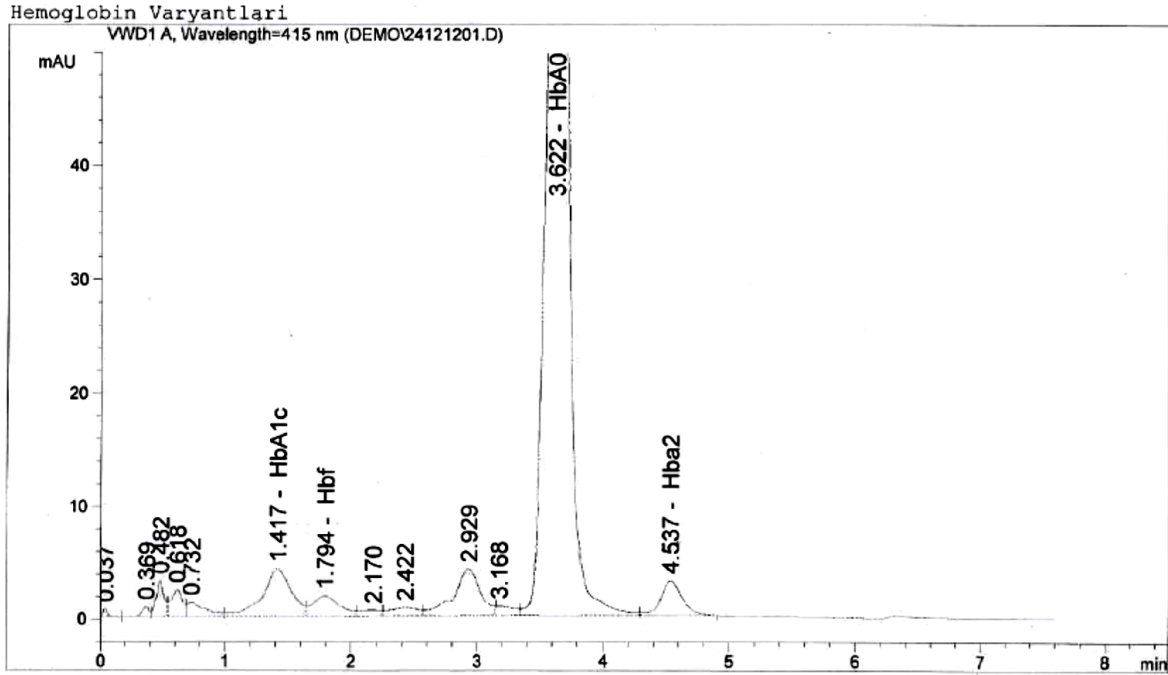
Hematolojik bulgular değerlendirildiğinde, tüm örneklerin hemoglobin miktarı 7-13,5 g/dl, Hct oranı %20,4-50,3, MCV değerleri 61- 90,4 fl, MCH 15,7- 28 pg, MCHC oranı % 24,1- 35,1, HbA<sub>2</sub> % 1,7-4,59 olarak bulunmuştur (Çizelge 4. 1).

29 olgunun 8'inde Hb A<sub>2</sub> değeri %3.7'nin üzerinde ve 16'sında %3.0'ün altında bulunmuştur. Hemoglobin tiplendirmesinde 7 olgu Hb AF diğer olgular ise Hb AA olarak belirlenmiştir (Çizelge 4. 1)

Çizelge 4. 1 Beta talasemi hasta ve ailelerine ait hematolojik ve HbA<sub>2</sub> değerlerinin bulguları

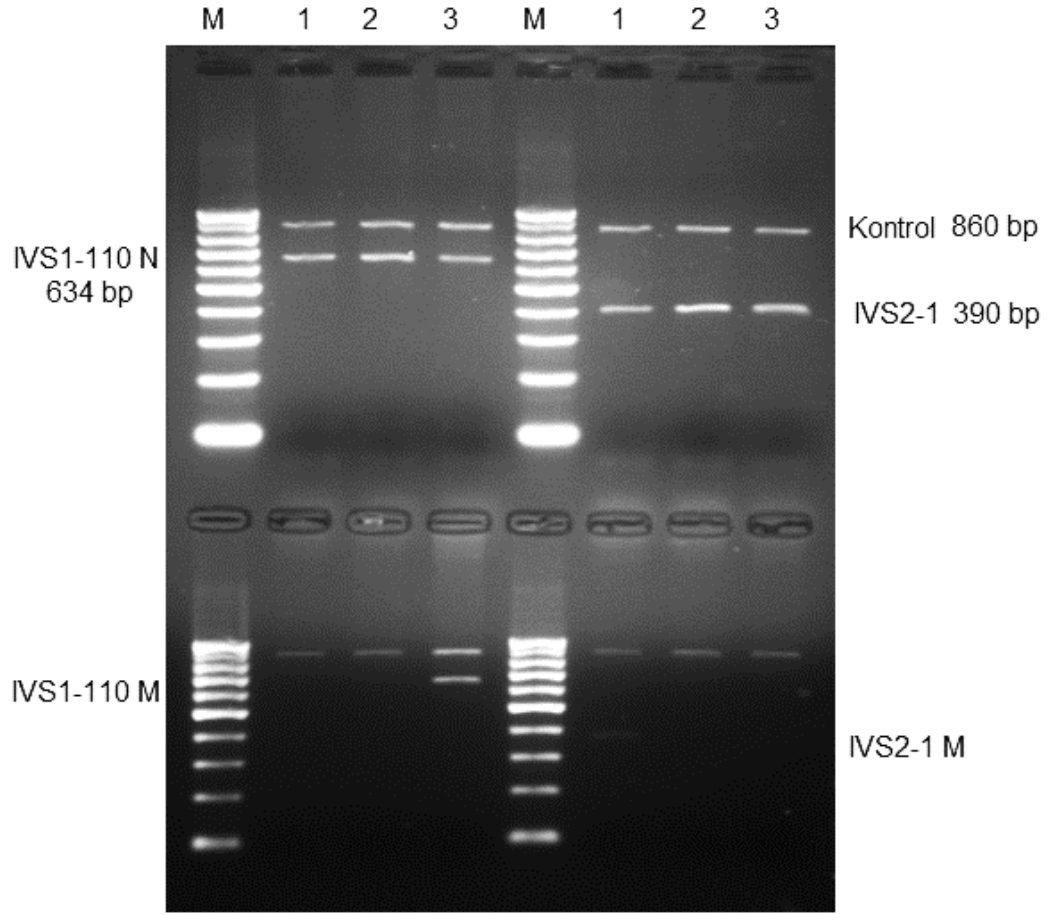
Olgu No	Cins/Yaş	Wbc 10 <sup>9</sup> /L	Rbc 10 <sup>12</sup> /L	Hb g/dl	Hct %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dl	Hb Tipi	HbA <sub>2</sub> %	HbF %	RDW fl	RDM %
1	E-13	8,1	3,24	8,8	25,6	79,1	27,1	34,2	AA	2,2	21,2	-	21,7
2	K	5,2	3,24	8,6	29,3	90,4	26,5	29,4	AA	4,5	21,2	77,3	24,9
3	E	6,3	2,94	7,8	25,8	87,8	26,5	30,2	AA	2,2	5,0	49,7	16,2
4	K	4,8	5,65	11,0	40,4	71,9	19,6	27,1	AA	4,6	2,6	40,7	14,8
5	K	4,8	2,71	7,1	21,6	79,8	26,1	32,7	AF	2,2	2,8	-	17,8
6	E	8,8	6,23	13,0	50,3	80,7	20,9	25,8	AA	4,5	0,7	43,7	13,8
7	E	16,7	2,76	7,5	21,5	77,9	27,2	34,9	AF	2,3	1,9	-	14,2
8	K	5,6	5,80	11,0	45,7	78,8	19,0	24,1	AA	3,0	-	42,2	13,8
9	E	8,6	3,23	8,3	24,0	74,3	25,5	34,4	AF	2,4	15,3	-	21,1
10	E	4,9	6,71	12,8	49,4	73,6	19,1	25,9	AF	2,1	1,0	37,3	12,6
11	E	6,2	2,47	6,9	20,4	82,5	28,0	33,9	AA	2,2	3,0	-	15,5
12	K	5,5	6,05	9,5	40,3	66,6	15,7	23,6	AA	4,4	-	45,2	19,7
13	E	4,8	2,9	8,0	23,1	80,5	28,0	34,8	AA	4,3	2,6	-	15,2
14	K	4,5	5,36	11,2	40,4	75,4	20,9	27,7	AF	1,8	1,7	37,0	11,9
15	K	7,8	3,0	7,7	23,4	77,5	25,6	33,1	AF	1,9	4,1	-	16,6
16	K	5,9	5,92	11,0	40,2	67,9	18,6	27,4	AA	2,0	-	33,6	11,9
17	E	10,1	2,69	7,5	22,5	83,8	28,0	33,5	AA	4,1	4,95	-	14,5
18	K	6,7	6,00	10,8	36,6	61,0	18,0	29,5	AA	2,1	-	35,1	16,0
19	E	18,7	2,87	7,8	24,9	86,9	27,2	31,3	AA	3,2	5,24	-	16,2
20	K	7,3	5,19	10,0	33,9	65,3	19,3	29,5	AA	1,7	1,73	40,0	16,1
21	E	5,81	2,69	7,0	21,5	79,7	25,9	32,5	AA	3,1	14,49	-	22,0
22	E	4,2	6,30	13,5	42,1	66,8	21,4	32,1	AF	2,0	0,84	40,2	17,4
23	E	4,85	3,6	9,3	26,5	73,5	25,7	35,0	AA	3,5	14,57	-	23,1
24	K	6,9	5,14	11,3	37,6	73,2	22,0	30,1	AA	2,0	-	41,9	15,0
25	K	13,5	3,34	9,2	26,8	80,3	27,4	34,2	AA	4,0	8,65	-	21,5
26	K	12,9	3,25	9,2	26,6	82,0	28,4	34,7	AA	2,3	6,85	-	18,0
27	K	7,68	3,37	9,6	27,5	81,5	28,6	35,1	AA	3,8	3,62	-	15,6
28	E	5,6	6,15	12,8	43,0	69,9	20,8	29,8	AA	2,3	-	37,9	13,7
29	K	4,1	5,06	10,2	32,2	63,6	20,2	31,7	AA	3,4	0,61	36,6	15,3

HPLC ile HbA<sub>2</sub> değeri belirlenen bir olguların kromatoğramı Şekil 4. 1’de verilmiştir. HPLC ile HbA<sub>2</sub> değerlerinin yaklaşık olarak beşinci dakikada (4,537) pik verdiği belirlenmiştir.



Şekil 4. 1 HPLC ile HbA<sub>2</sub> değeri belirlenen bir örneğin kromatoğram bulguları

ARMS yöntemi ile elde edilen PCR ürünleri ve jel görüntüsü Şekil 4. 2’de verilmiştir. IVS I-110 (Normal) 634 bp, kontrol 860 bp, IVS 2-1 390 bp, IVS 1-110 (Mutasyon), IVS 2-1 (Mutasyon) bulguları agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Her bandın belirlenmesi için marker kullanılmıştır.

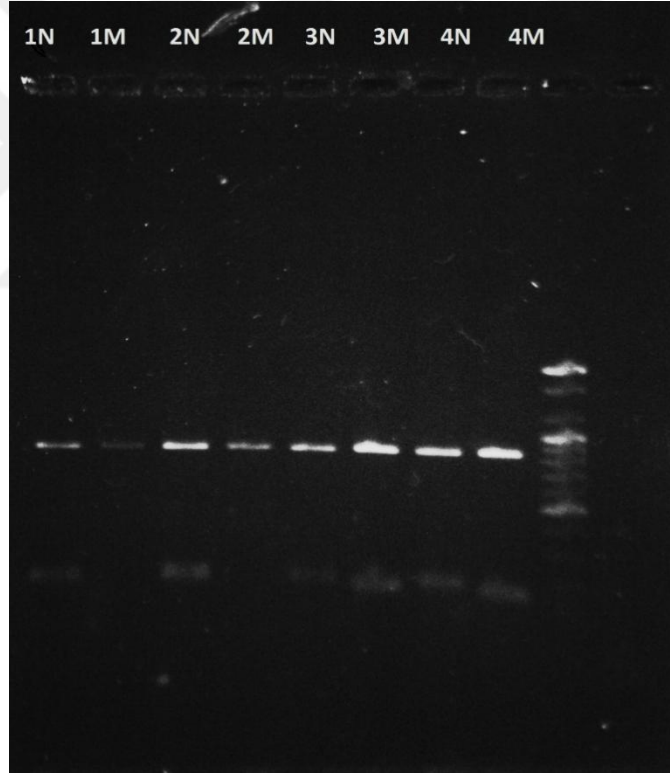


Şekil 4. 2 ARMS yöntemi ile elde edilen PCR ürünleri ve jel görüntüsü

IVS I-110 normal ve mutant analiz bulguları Çizelge 4. 2’te verilmiştir. Olgu 18, 20 ve 21 de IVS-I-110 (normal ve mutant) pozitiflik/neğatiflik durumları belirlenmiştir. Aynı olgulara ait IVS I-110 normal ve mutant analiz bulguları agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir. Her bandın belirlenmesi için marker kullanılmıştır.

Çizelge 4. 2 IVS I-110 normal ve mutant analiz bulguları

Sıra No	Olgu No	IVS I-110 Normal	IVS I-110 Mutant
1	<b>Olgu 18</b>	+	-
2	<b>Olgu 20</b>	+	-
3	<b>Olgu 21</b>	+	+
4	<b>Kontrol</b>	+	+



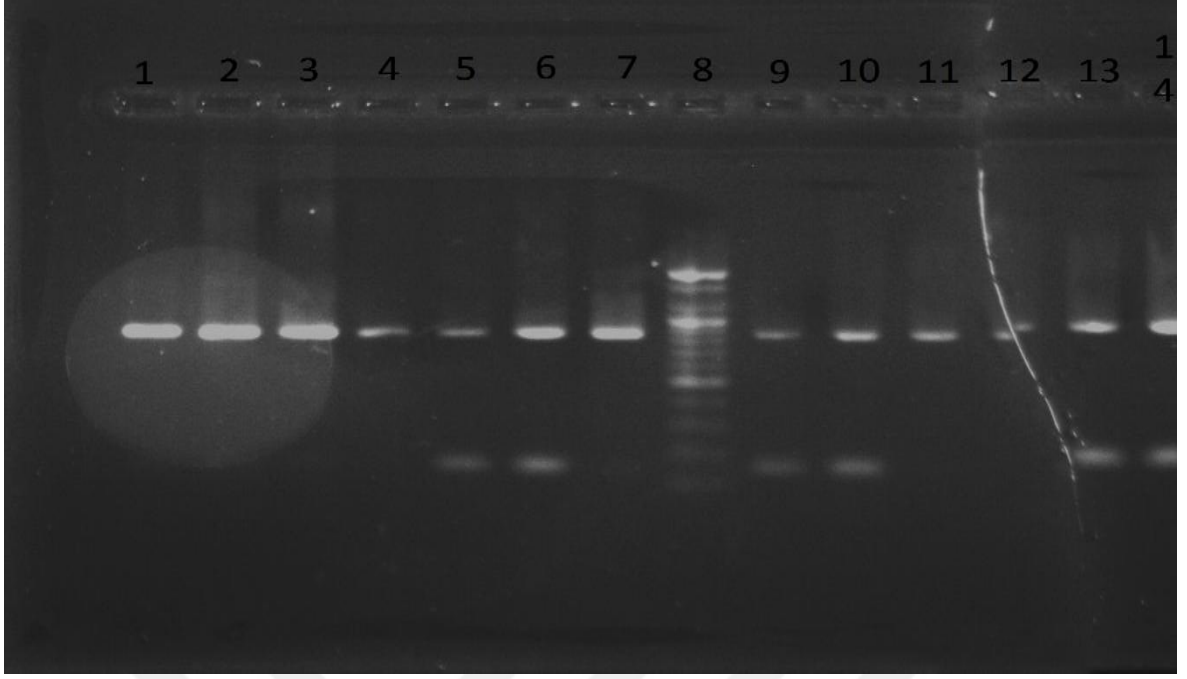
Şekil 4. 3 IVS I-110 normal ve mutant agaroz jel bulguları



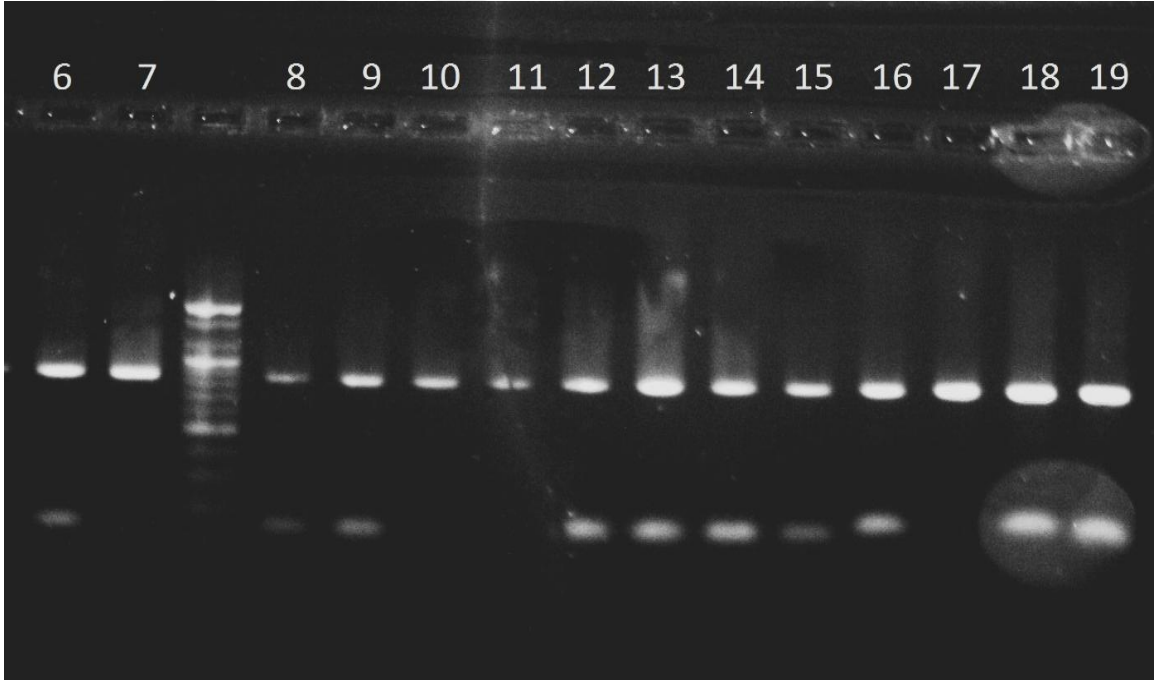
IVS I-110 mutant analiz bulguları incelendiğinde çalışılan toplam 15 olgudan 9 olgunun IVS I-110 mutant analizinde pozitif olduğu belirlenmiştir (Çizelge 4. 3). IVS I-110 mutant agaroz jelgörüntüleri ise Şekil 4. 4 ve Şekil 4. 5’de görüntülenmiştir. Çalışma bulgularına göre Olgu 5, 6, 8, 9, 12,13, 14, 15, 16’da pozitif görüntü elde edilmiştir.

Çizelge 4. 3 IVS I-110 mutant analiz bulguları

Sıra No	Olgu No	IVS I-110 (Mutant)
1	Olgu 3	-
2	Olgu 1	-
3	Olgu 2	-
4	Olgu 4	-
5	Olgu 5	+
6	Olgu 6	+
7	Olgu 7	-
8	Olgu 8	+
9	Olgu 9	+
10	Kontrol	
11	Olgu 11	
12	Olgu 12	+
13	Olgu 13	+
14	Olgu 14	+
15	Olgu 15	+
16	Olgu 16	+
17	Kontrol	+
18	Kontrol	+



Şekil 4. 4 IVS I-110 mutant agaroz jel bulguları

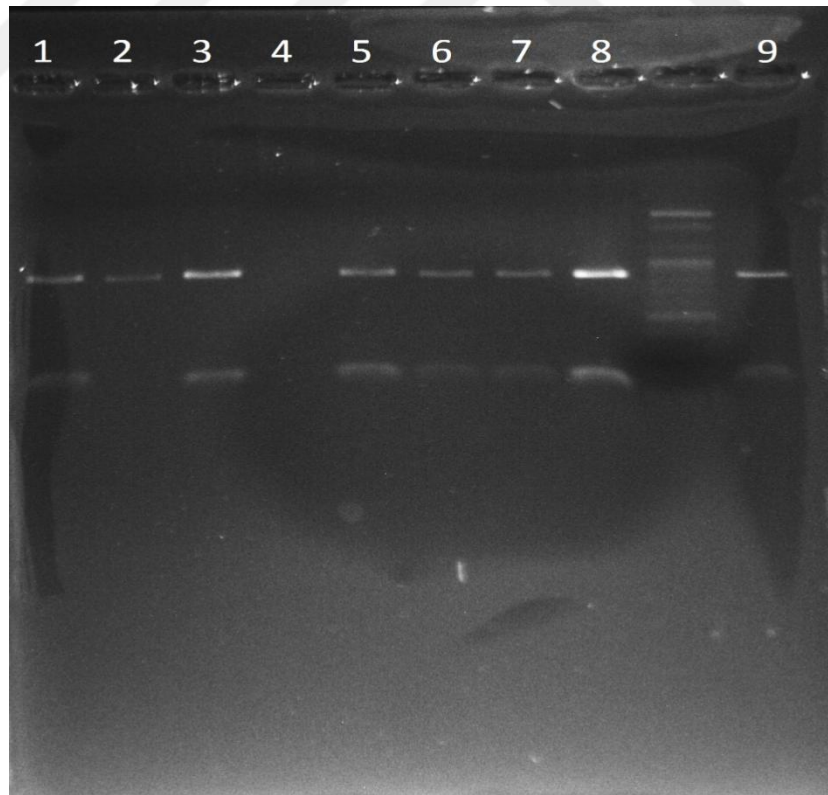


Şekil 4. 5 IVS I-110 mutant agaroz jel bulguları

IVS I-110 mutant analiz bulguları Çizelge 4. 4’de verilmiştir. Çalışmada toplam 7 olgunun 5 ‘inde pozitif olduğu belirlenmiştir. Bu bulgular agaroz jel elektroforezinde Şekil 4. 6’ da görüntülenmiştir. Olgu 23, 25, 27, 28 ve 29’da pozitif olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4. 4 IVS I-110 mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>IVS I-110 Mutant</b>
<b>1</b>	Olgu 23	+
<b>2</b>	Olgu 24	-
<b>3</b>	Olgu 25	+
<b>4</b>	Olgu 26	-
<b>5</b>	Olgu 27	+
<b>6</b>	Olgu 28	+
<b>7</b>	Olgu 29	+
<b>8</b>	Kontrol	+
<b>9</b>	IVS I-110 Kontrol	+

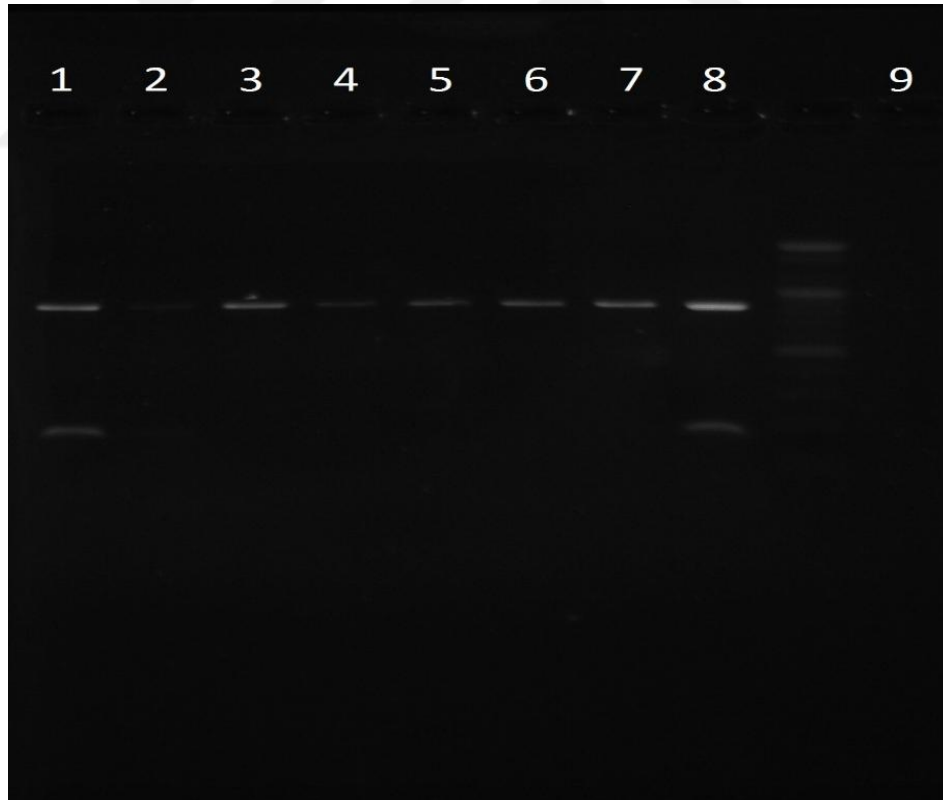


Şekil 4. 6 IVS I-110 mutant agaroz jel bulguları

IVS I-110 normal analiz bulguları Çizelge 4. 5’de verilmiştir. Ayrıca Şekil 4. 7’da agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir. Çalışmada sadece olgu 19’da pozitif olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4. 5 IVS I-110 normal analiz bulguları

	Adı Soyadı	IVS I-110 Normal
1	Olgu 19	+
2	Olgu 23	
3	Olgu 26	
4	Olgu 5	
5	Olgu 9	
6	Olgu 13	
7	Olgu 15	
8	Kontrol	+

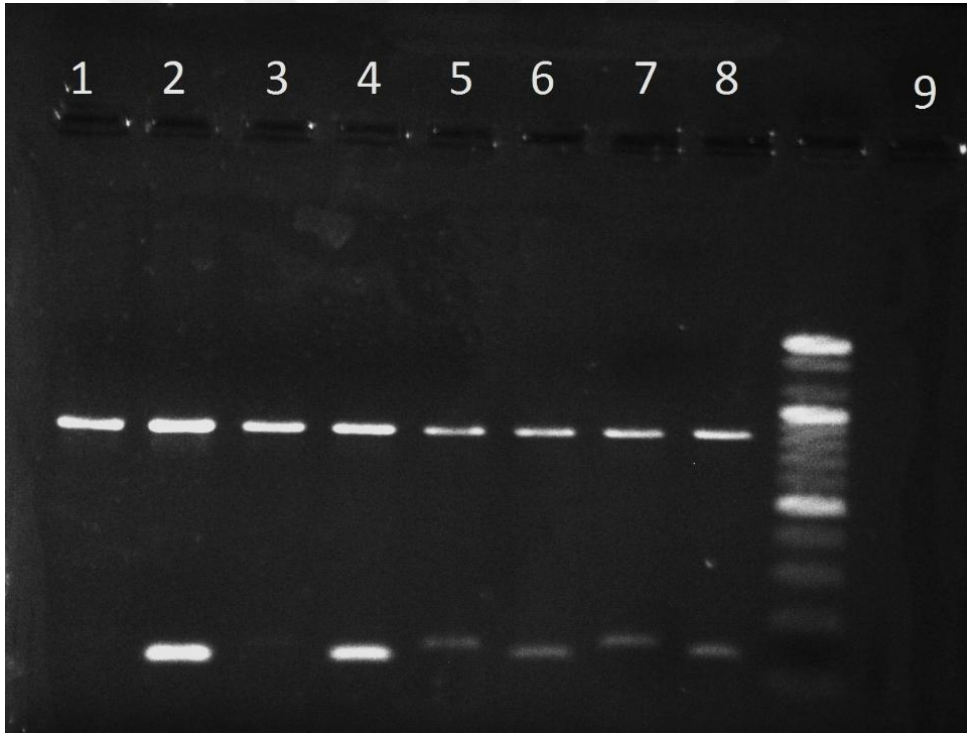


Şekil 4. 7 IVS I-110 normal agaroz jel bulguları

IVS I-110 normal ve mutant olgu 26-29 ailesi bulguları incelendiği zaman Çizelge 4. 6'de IVS I-110 normal 26 ve 27 de negatif olduğu, olgu 28 ve 29'da ise pozitif olduğu belirlenmiştir. Ayrıca IVS I-110 mutasyonunun bu aile için pozitif olduğu belirlenmiştir. Bulgular Şekil 4. 8'de ağaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir.

Çizelge 4. 6 Olgu 26-29 için IVS I-110 normal ve mutant bulguları

	Olgu No	IVSI-110 Normal	IVS I-110 Mutant
1	Olgu 26	-	+
2	Olgu 27	-	+
3	Olgu 28	+	+
4	Olgu 29	+	+

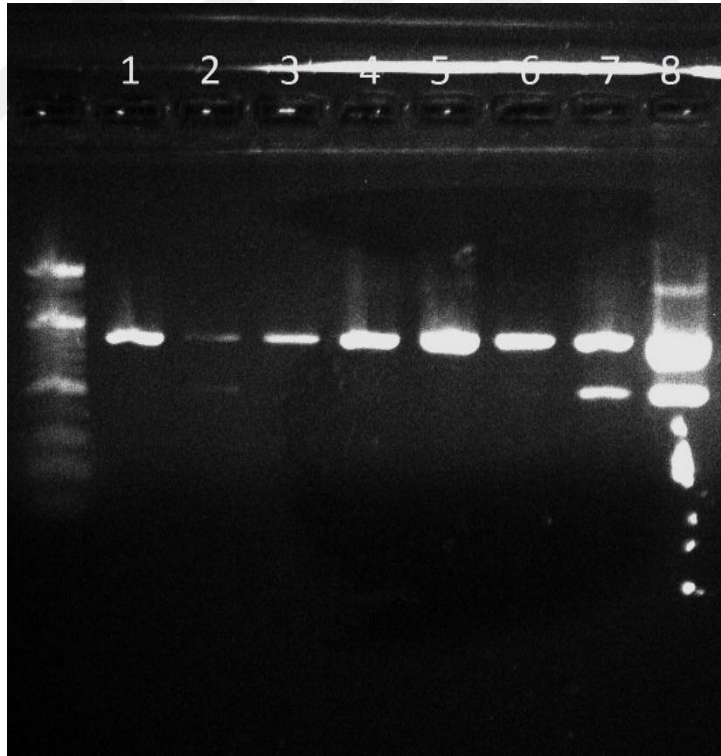


Şekil 4. 8 Olgu (26-29) IVS I-110 normal ve mutant bulguları

FSC8 mutant analiz bulguları Çizelge 4. 7’de verilmiştir. Bu olgulardan sadece olgu 21’in FSC 8 mutasyonu olduğu belirlenmiştir. Ayrıca Şekil 4. 9’de agaroz jel elektroforezi ile bu durum görüntülenmiştir.

Çizelge 4. 7 FSC 8 mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>FSC 8 Mutant</b>
<b>1</b>	Olgu 17	
<b>2</b>	Olgu 21	+
<b>3</b>	Olgu 23	
<b>4</b>	Olgu 3	
<b>5</b>	Olgu 7	
<b>6</b>	Olgu 11	
<b>7</b>	Kontrol	+
<b>8</b>	Heterozigot kontrol	+

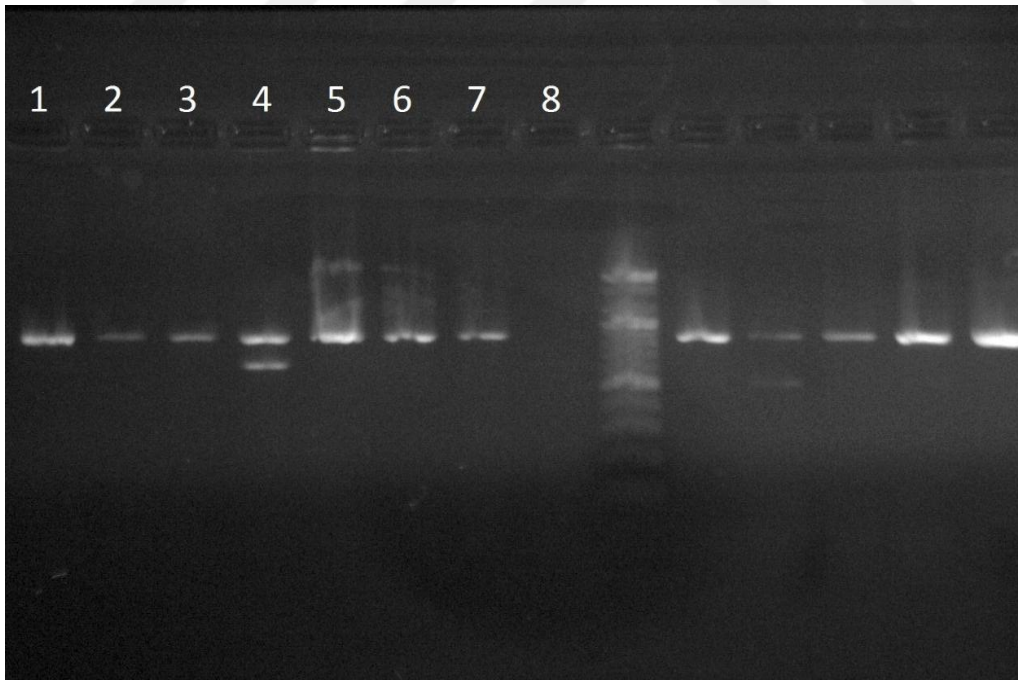


Şekil 4. 9 FSC 8 mutant agaroz jel bulguları

IVS II-I mutant analiz bulgular ıÇizelge 4. 8’da verilmiştir. Bu çalışmada kullanılan olgulardan sadece olgu 3’te IVS II-I (mutant) mutasyonu pozitif olduğu belirlenmiştir. Ağaroz jel elektroforezinde 4 nolu görüntü ile elde edilmiştir (Şekil 4. 10).

Çizelge 4. 8 IVS II-I mutant analiz bulguları

	Olgu No	IVS II-I (Mutant)
1	Olgu 17	
2	Olgu 11	
3	Olgu 23	
4	Olgu 3	+
5	Olgu 7	
6	Olgu 11	
7	Kontrol	
8	Heterozigot kontrol	

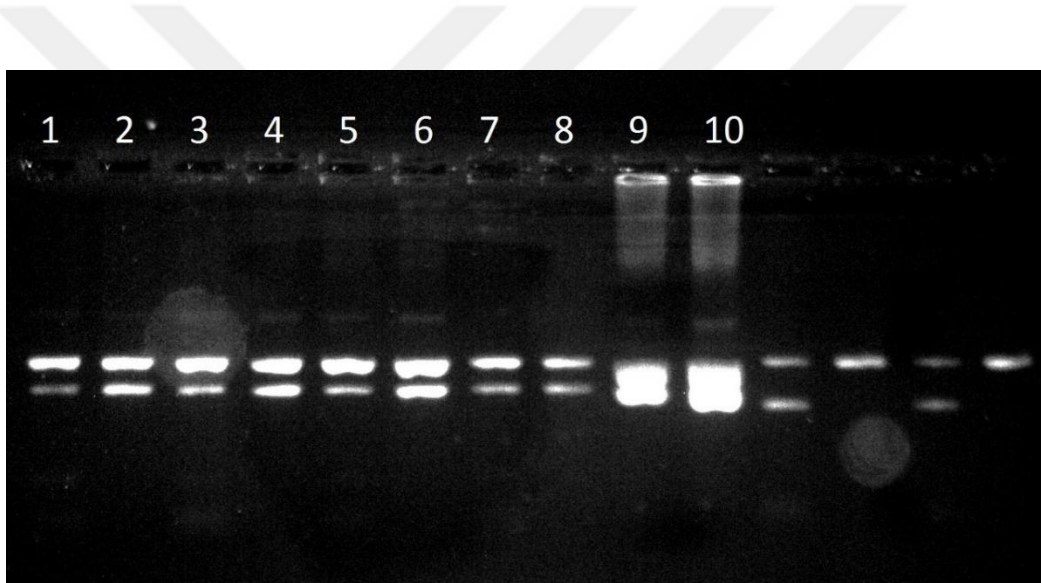


Şekil 4. 10 IVS II-I mutant agaroz jel bulguları

IVS II-I normal ve mutant olgu 1-4 ailesi bulguları Çizelge 4. 9'da verilmiştir. Çalışmada bu ailenin tüm üyelerinde IVS II-I normal ve mutant mutasyonları pozitif bulunmuştur. Ayrıca bu bulgular agaroz jel elektroforezinde görüntülenmiştir (Şekil 4. 11).

Çizelge 4. 9 IVS II-I normal ve mutant olgu 1-4 ailesi

	<b>Olgu No</b>	<b>IVS II-1 NORMAL</b>	<b>IVS II-1 MUTANT</b>
<b>1-2</b>	Olgu 1	+	+
<b>3-4</b>	Olgu 2	+	+
<b>5-6</b>	Olgu 3	+	+
<b>7-8</b>	Olgu 4	+	+
<b>9-10</b>	Kontrol	+	+



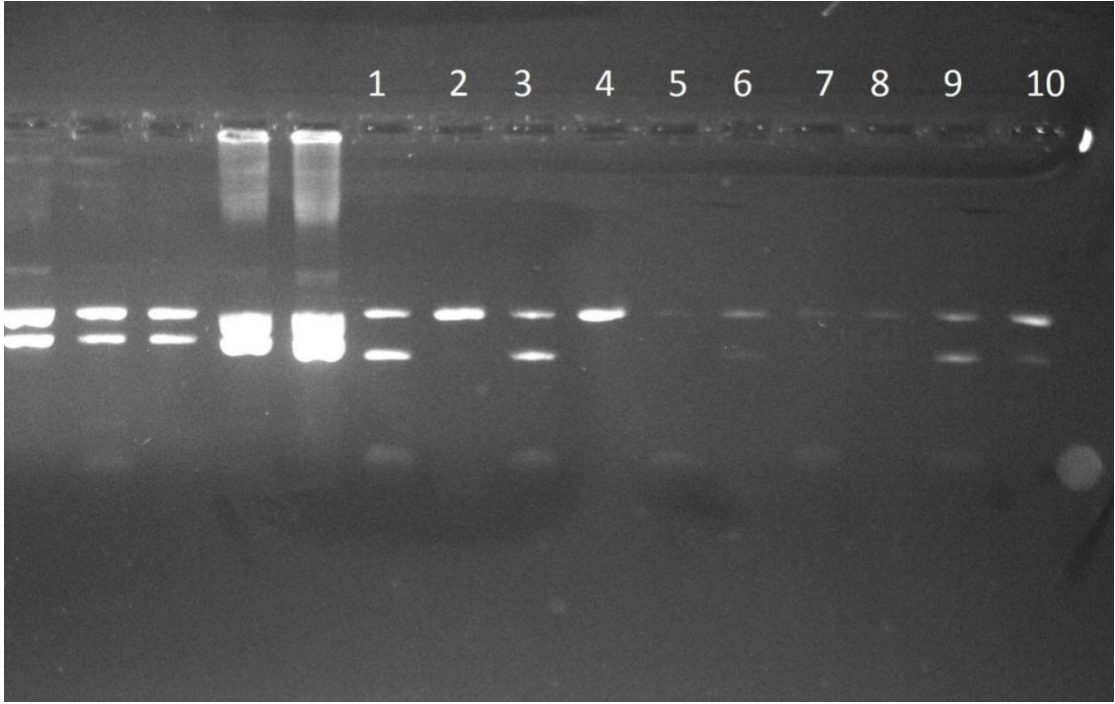
Şekil 4. 11 IVS II-I normal ve mutant (Olgu1-4) ailesi için agaroz jel bulguları



FSC8 normal ve mutant analiz bulguları Çizelge 4. 10'de verilmiştir. Olgu 17 ve 18'de FSC8 normal pozitif bulunurken, FSC8 mutant mutasyonu kullanılan tüm olgularda neğatif bulunmuştur. Bu bulgular agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4. 12).

Çizelge 4. 10 FSC8 normal ve mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>FSC 8 NORMAL</b>	<b>FSC 8 MUTANT</b>
<b>1-2</b>	Olgu 17	+	-
<b>3-4</b>	Olgu 18	+	-
<b>5-6</b>	Olgu 21	-	-
<b>7-8</b>	Olgu 22	-	-
<b>9-10</b>	Kontrol	+	+

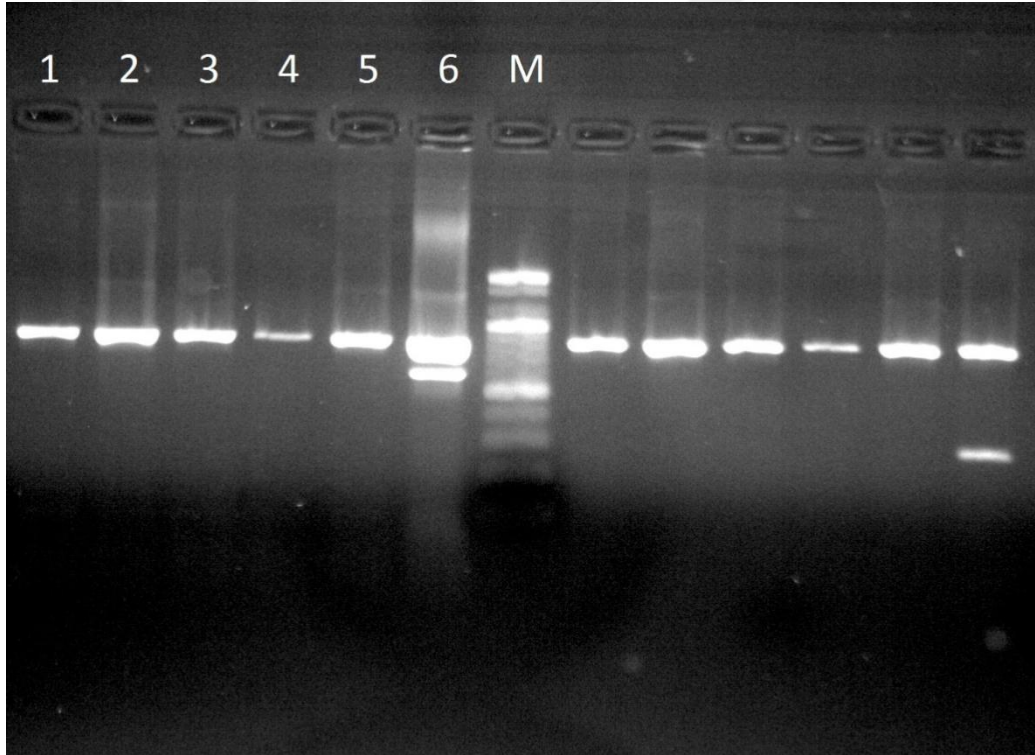


Şekil 4. 12 FSC8 normal ve mutant agaroz jel bulguları

IVS I-6 mutant analiz bulguları Çizelge 4. 11’de verilmiştir. Kullanılan tüm olgularda IVS I-6 mutant mutasyonu negatif bulunmuştur. Bu bulgular agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4. 13).

Çizelge 4. 11 IVS I-6 mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>IVS I-6 MUTANT</b>
<b>1</b>	Olgu 17	-
<b>2</b>	Olgu 7	-
<b>3</b>	Olgu 11	-
<b>4</b>	Olgu 21	-
<b>5</b>	Olgu 3	-
<b>6</b>	Kontrol	+

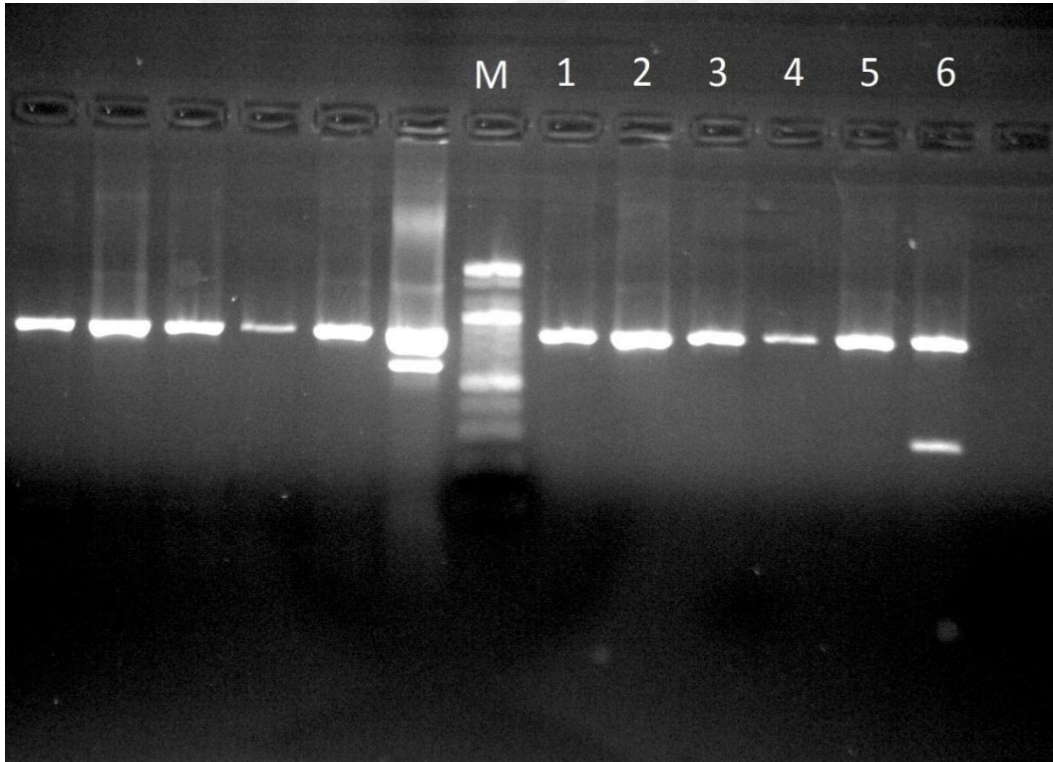


Şekil 4. 13 IVS I-6 mutant agaroz jel bulguları

Codon 39 mutant analiz bulguları Çizelge 4. 12'de verilmiştir. Kullanılan tüm olgularda Codon 39 mutasyonu neğatif bulunmuştur. Bu bulgular ağaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4. 14).

Çizelge 4. 12 Codon 39 mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>CODE 39 MUTANT</b>
<b>1</b>	Olgu 17	-
<b>2</b>	Olgu 7	-
<b>3</b>	Olgu 11	-
<b>4</b>	Olgu 21	-
<b>5</b>	Olgu 3	-
<b>6</b>	Kontrol	+

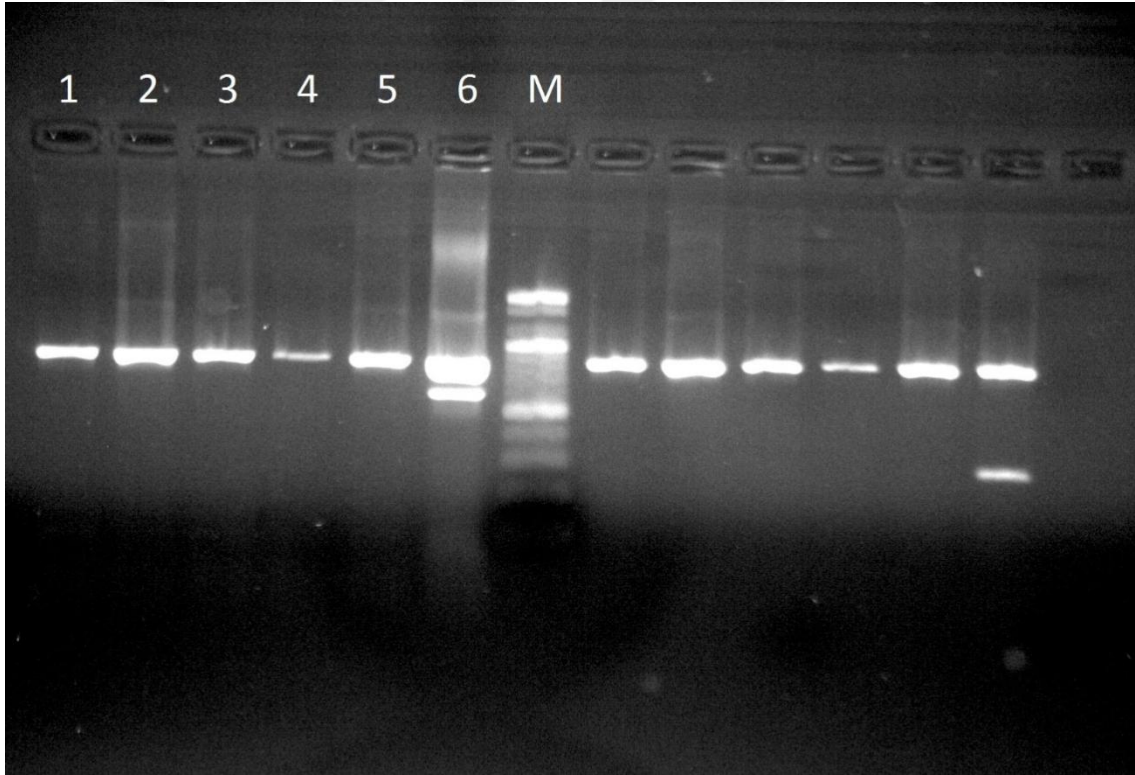


Şekil 4. 14 Codon 39 mutant ağaroz jel bulguları

-30 mutant analiz bulguları Çizelge 4. 13'de verilmiştir. Kullanılan tüm olgularda -30 mutant mutasyonu neğatif bulunmuştur. Bu bulgular ağaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4. 15).

Çizelge 4. 13 -30 mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>-30 MUTANT</b>
<b>1</b>	Olgu 17	-
<b>2</b>	Olgu 7	-
<b>3</b>	Olgu 11	-
<b>4</b>	Olgu 21	-
<b>5</b>	Olgu 3	-
<b>6</b>	Kontrol	+

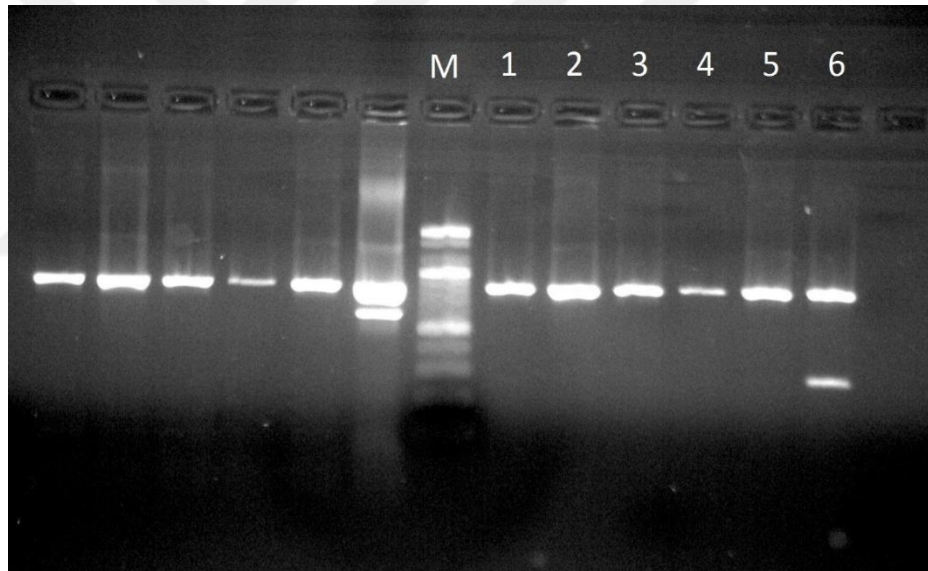


Şekil 4. 15 -30 mutant ağaroz jel bulguları

IVS I-1 mutant analiz bulguları Çizelge 4. 14'de verilmiştir. Kullanılan tüm olgularda IVS I-1 mutant mutasyonu belirlenmemiştir. Bu bulgular agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4. 16).

Çizelge 4. 14 IVS I-1 mutant analiz bulguları

	Olgu No	IVS I-1 MUTANT
1	Olgu 17	
2	Olgu 7	
3	Olgu 11	
4	Olgu 21	
5	Olgu 3	
6	Kontrol	+



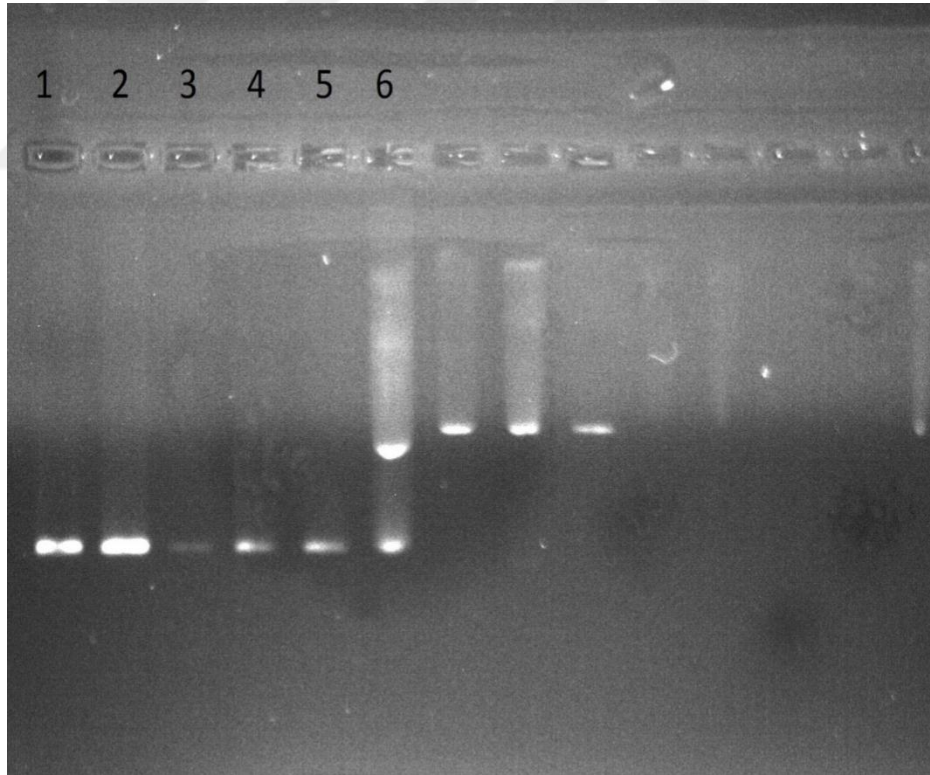
Şekil 4. 16 IVS I-1 mutant agaroz jel analiz bulguları



II-745 mutant analiz bulguları Çizelge 4. 15'da verilmiştir. Kullanılan tüm olgularda II-745 mutant mutasyonu neğatif bulunmuştur. Bu bulgular ağaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4. 17).

Çizelge 4. 15 II-745 mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>II-745 MUTANT</b>
<b>1</b>	Olgu 17	-
<b>2</b>	Olgu 7	-
<b>3</b>	Olgu 11	-
<b>4</b>	Olgu 21	-
<b>5</b>	Olgu 3	-
<b>6</b>	Kontrol	+

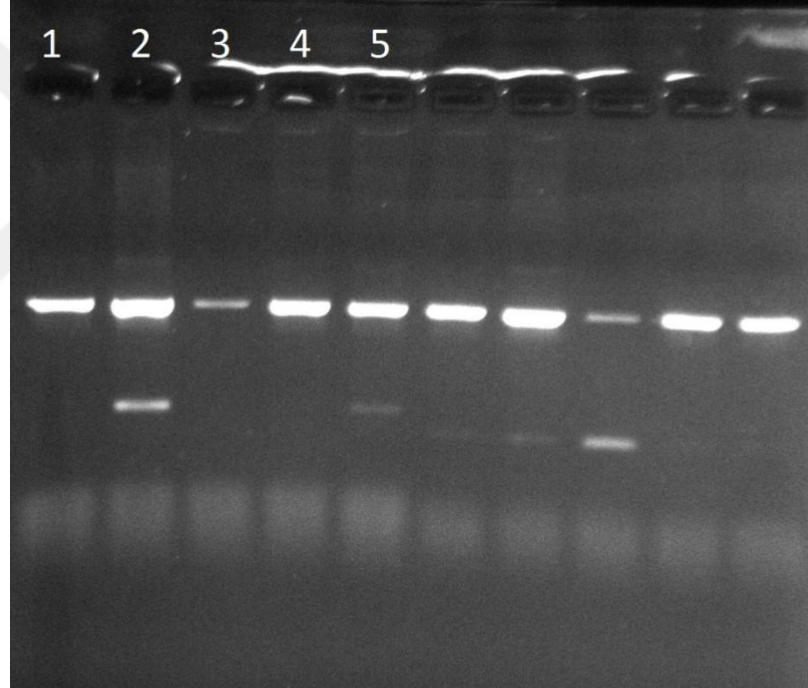


Şekil 4. 17 IVS II-745 mutant ağaroz jel bulguları

I-5 mutant analiz bulguları Çizelge 4. 16'de verilmiştir. Olgu 7 ve 3'te pozitif belirlenirken, diğer olgularda I-5 mutant mutasyonu belirlenmemiştir. Bu bulgular agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4. 18).

Çizelge 4. 16 I-5 mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>I-5 MUTANT</b>
<b>1</b>	Olgu 17	
<b>2</b>	Olgu 7	+
<b>3</b>	Olgu 11	
<b>4</b>	Olgu 21	
<b>5</b>	Olgu 3	+

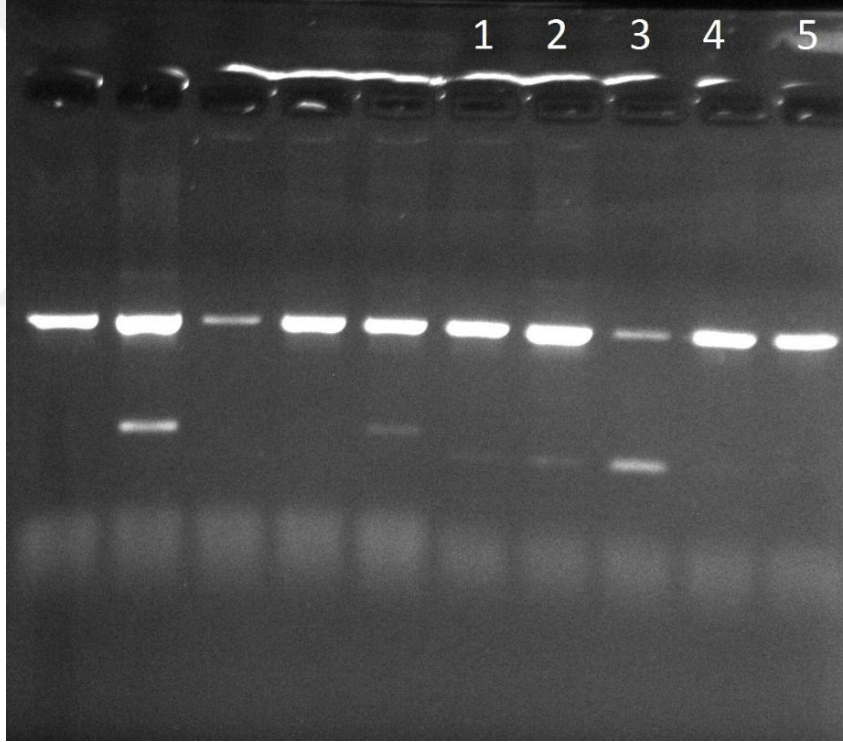


Şekil 4. 18 IVS I-5 mutant agaroz jel bulguları

Fsc 8/9 analiz bulguları Çizelge 4. 17’de verilmiştir. Olgulardan 17, 7 ve 11’de 8/9 mutasyonu pozitif bulunmuştur. Bu bulgular agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4. 19).

Çizelge 4. 17 8/9 mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>8/9 MUTANT</b>
<b>1</b>	Olgu 17	+
<b>2</b>	Olgu 7	+
<b>3</b>	Olgu 11	+
<b>4</b>	Olgu 21	
<b>5</b>	Olgu 3	



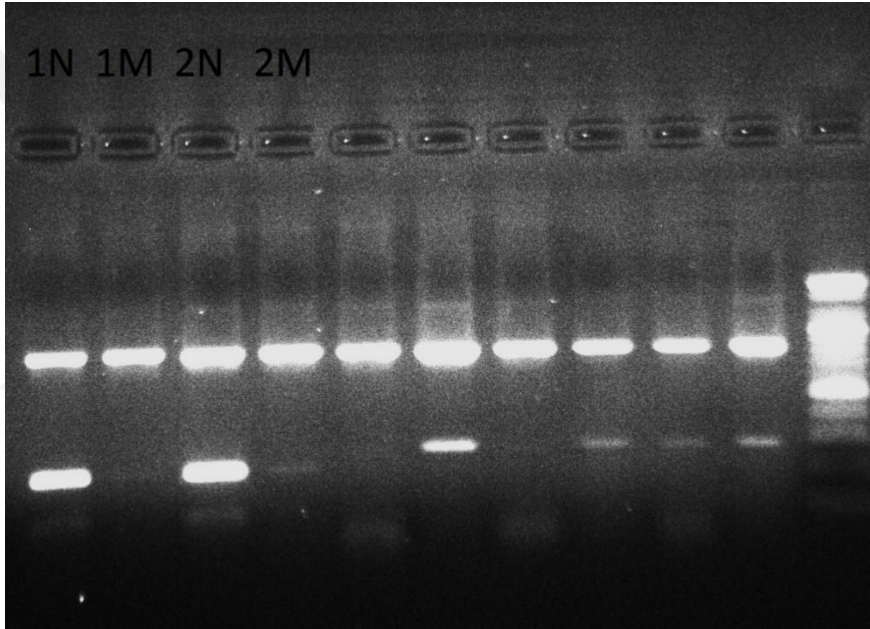
Şekil 4. 19 Fsc 8/9 mutant agaroz jel bulguları



FSC 8/9 normal ve mutant analiz bulguları Çizelge 4. 18 ve Çizelge 4. 15’da verilmiştir. Kullanılan tüm olgularda FSC 8/9 mutasyonu neğatif bulunmuştur. Bu bulgular ağaroz jel elektroforezi ile görüntenilmiştir (Şekil 4. 20).

Çizelge 4. 18 FSC 8/9 normal ve mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>8/9 NORMAL</b>	<b>8/9 MUTANT</b>
<b>1</b>	Olgu 11	+	-
<b>2</b>	Olgu 12	+	-

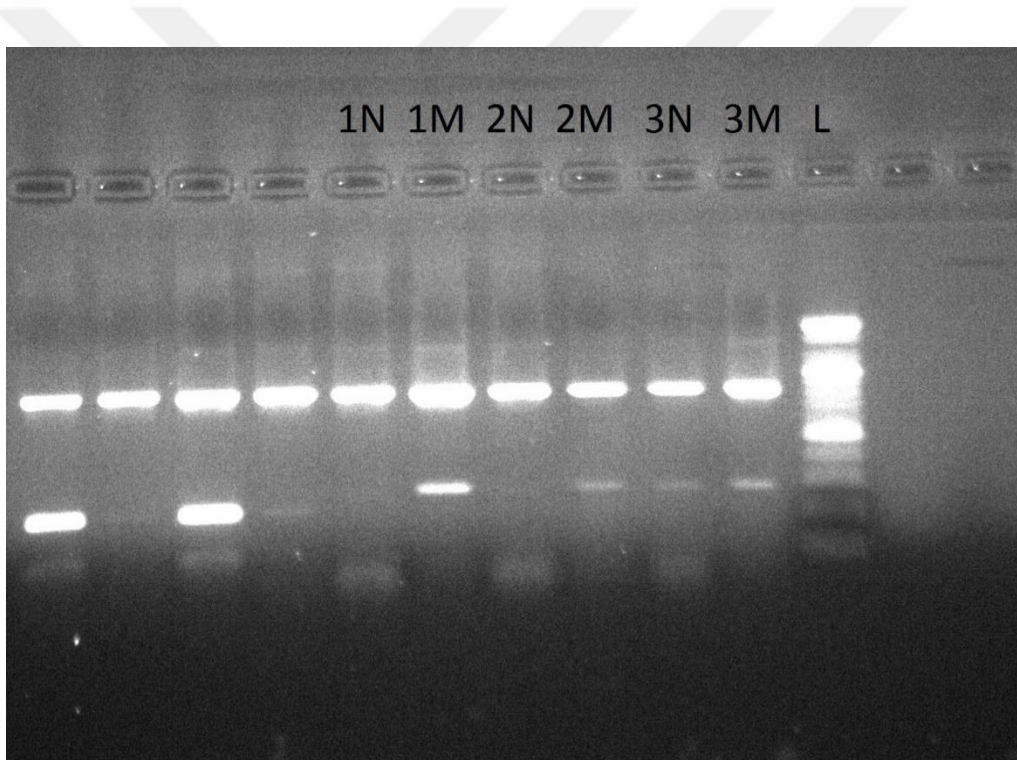


Şekil 4. 20 FSC 8/9 normal ve mutant ağaroz jel bulguları

IVS I-5 normal ve mutant analiz bulguları Çizelge 4. 19'da verilmiştir. Kullanılan tüm olgularda IVS I-5 mutant mutasyonu pozitif bulunmuştur. Bu bulgular agaroz jel elektroforezi ile görüntülenmiştir (Şekil 4. 21).

Çizelge 4. 19 IVS I-5 normal ve mutant analiz bulguları

	<b>Olgu No</b>	<b>IVS I- 5 NORMAL</b>	<b>IVS I -5 MUTANT</b>
<b>1</b>	Olgu 7	-	+
<b>2</b>	Olgu 8	-	+
<b>3</b>	Olgu 3	+	+



Şekil 4. 21 IVS I-5 normal ve mutant agaroz jel bulguları

Çizelge 4. 20 Tüm olguların analiz edilmesi ile elde edilen mutasyon bulguları

Sıra No	Cins-Yaş	Aile	Aile Kodu	Allel # 1	Allel # 2
1	E-15	1 Hasta	S.Ö.B.		
2	K-49	1 Anne	S.B.		
3	E-11	2 Hasta	F.K.	IVS 1-110	IVS 1-110
4	K-	2 Anne	T.K.	IVS 1-110	Normal
5	E-11	3 Hasta	O.Ç.	Fsc 8	?
6	E-41	3 Baba	İ.Ç.		
7	E-	4 Hasta	B.V.	IVS 1-110	Normal
8	K-	4 Anne	F.V.		
9	K-19	4 Kız Kardeş	G.V.	IVS 1-110	
10	K-	5 Hasta	M.S.A.	IVS 1-110	IVS 1-110
11	K-5	5 Kız Kardeş	S.A.	IVS 1-110	IVS 1-110
12	E-34	5 Baba	N.A.	IVS 1-110	Normal
13	K-	5 Anne	G.A.	IVS 1-110	Normal
14	E-10	6 Hasta	M.Ç.	IVS II-I	
15	E-	6 Baba	M.M.Ç.	IVS II-I	Normal
16	K-	6 Anne	S.Ç.	IVS II-I	Normal
17	K-	6 Kardeş	N.Ç.	IVS II-I	Normal
18	K-10	7 Hasta	İ.P.	IVS 1-110	IVS 1-110
19	E-45	7 Baba	E.P.	IVS 1-110	Normal
20	E-13	8 Hasta	İ.T.	IVS1-5	
21	K-	8 Anne	E.T.		
22	E-	9 Hasta	U.Ç.	IVS 1-110	IVS 1-110
23	E-	9 Baba	U.Ç.	IVS 1-110	Normal
24	E-	10 Hasta	H.U.	Fsc 8/9	
25	E-	10 Anne	H.U.		
26	E-11	11 Hasta	İ.S.K.	IVS 1-110	IVS 1-110
27	K-	11 Anne	İ.S.K.	IVS 1-110	Normal
28	K-	12 Hasta	A.A.	IVS 1-110	IVS 1-110
29	K-	12 Anne	A.A.	IVS 1-110	Normal

Hastaların analiz edilmesi ile elde edilen mutasyon bulguları Çizelge 4. 20 ve Çizelge 4. 21 incelendiğinde büyük çoğunluğunda IVS 1-110 mutasyonu olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4. 21 Sadece hasta olguların analiz edilmesi ile elde edilen mutasyon bulguları

No	Cinsiyet-Yaş	Hasta Adı	Allel # 1	Allel # 2
1	E-13	(S.Ö.)	?	?
2	E-11	(F.K.)	IVS 1-110	IVS 1-110
3	E-11	(O. Ç)	Fsc 8	?
4	E-12	(B. V.)	IVS 1-110	?
5	K-19	(G. V.)	IVS 1-110	?
6	K-3	(M. S. A.)	IVS 1-110	IVS 1-110
7	K-5	(S. A.)	IVS 1-110	IVS 1-110
8	E-10	(M. Ç.)	IVS II-I	?
9	E-	(İ. P.)	IVS 1-110	IVS 1-110
10	E-13	(İ. T.)	IVS1-5	?
11	E-	(U. Ç.)	IVS 1-110	IVS 1-110
12	E-9	(H. U.)	Fsc 8/9	?
13	E-11	(İ. S. K.)	IVS 1-110	IVS 1-110
14	K-	(A. A.)	IVS 1-110	IVS 1-110

Çizelge 4. 21 incelendiğinde ondört hastadan 7 tanesi IVS1-110 mutasyonu için homozigot olarak belirlendi. Hastalardan 1'i taranan 10 mutasyondan hiçbirine sahip değildi. Kalan 6 hasta Fsc 8, Fsc 8/9, IVS1-5, IVS1-110 ve IVS2-1 mutasyonu için heterozigot idi. Bu altı hastanın ikinci kromozomları ARMS yöntemi ile belirlenemedi.

## 5. TARTIŞMA

Globin zincirinin yapımının azalmasına ya da yapılamamasına bağılı olarak ortaya çıkan talesemiler oldukça geniş bir genetik yelpazeyi kapsar. En sık görülen tipleri alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) talasemilerdir. Beta talasemi, Türkiye ve diğerk birçok Akdeniz ülkesinde sıklıkla gözlenen tek gen hastalıklarından olup, hemolitik anemi ve mikrositoz ile karakterize otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalıktır (75,3).

Tetramerik bir protein olan insan erişkin hemoglobininin beta zincirine şifreleyen beta globin geni, 11. kromozomun kısa kolu üzerinde (11p 15.5), beta globin gen kümesi içinde yer almaktadır. Üç ekson, 2 intron ile 5' ve 3' düzenleyici bölgelerden oluşan bu gendeki mutasyonlar beta-talasemi veya başta orak hücreli anemisine neden olan HbS olmak üzere diğerk anormal hemoglobinlere neden olmaktadır (28).

Günümüzde beta globin geni üzerinde 200'den fazla mutasyonun bulunduğu belirtilmektedir. Beta talasemi mutasyonları oldukça çeşitlidir ve genin değışik bölgelerine yayılmıştır. Bu mutasyonlar promotor bölge mutasyonları, RNA işleme (splicing) mutasyonları, Poly A mutasyonları, nonsense mutasyonlar ya da çerçeve kayması mutasyonları olarak sınıflandırılabilir. Beta talasemide genin büyük bir kısmının kaybına neden olan mutasyonlar nadirdir. Beta talesemi major, mutant bir beta globin alleli için homozigot veya birleşik heterozigot olan bireylerde gözlenir. Hastalığın hafif bir formu olan beta talesemi minorlü bireyler ise mutant allel bakımından heterozigottur. Türk halkında tanımlanan 40'dan fazla mutasyon vardır. Bunlar arasında en yaygın 7 mutasyon (IVS 1-110, IVS 2-1, Fsc 8, IVS 1-1, IVS 2-745) tüm mutasyonların yaklaşık % 72'sini oluşturmaktadır (URL-1; Tadmouri ve ark. 2001). Beta talasemi taşıyıcılığı ülkemizde % 2 olarak verilmekte ancak bu oran bazı yörelerimizde % 10'a kadar çıkmaktadır (90,105).

Ülkemiz, çeşitli etnik grupları bir arada içermesinden dolayı  $\beta$  talasemi prevalansı ve  $\beta$  talasemi mutasyonlarının dağılımı farklı bölgelere göre çeşitlilik göstermektedir (64). Atalay ve arkadaşları (95) Türkiye'de  $\beta$  talasemi mutasyon tiplerini ve bölgesel dağılımlarını inceledikleri çalışmalarında % 36 IVS I-110, % 22 IVS I-6, % 13 IVS I-1, %7 Cd 39, %4 IVS II-745, %2 Fsc 8 ve %1 IVS II-1 olarak bildirmişlerdir. Tadmouri ve arkadaşları (10) yaptıkları çalışmada Türkiye'de en yaygın görülen  $\beta$  talasemi mutasyonunun IVS I-110 olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada, sırası ile bunu IVS I-6, Fsc 8, IVS I-1, IVS II-745, IVS II-1,

Cd 39, -30 ve Fsc 5 mutasyonlarının izlediğini bildirmişlerdir. IVS I-110 mutasyonunun bölgelere göre dağılımının Marmara Bölgesi için %34,1, Ege ve Akdeniz Bölgesi için %42,4, İç Anadolu için %52,3, Güneybatı Anadolu için %26,4, Karadeniz Bölgesi için %31,0 ve Batı Anadolu için %27,1 olarak değiştiğini rapor etmişlerdir. Farklı bir çalışmalarında ise yaygın olarak görülen mutasyonlardan 7 tanesinin Türk popülasyonunda görülen mutasyonların %72'sini oluşturduğunu ve bunların sırasıyla %41 IVS I-110, %13 IVS I-6, %8 IVS II-1, %6 Fsc 8, %5 IVS I-1 ve %5 IVS II-745 mutasyonları olduğunu bildirmişlerdir (82). Yüregir ve arkadaşları (107) yapmış oldukları çalışmada Çukurova bölgesi için  $\beta$  talasemi sıklığını %3,5 ve en yaygın mutasyon tipini IVS I-110 olarak bildirmişlerdir. Arpacı ve arkadaşları (108) Samandağ'da yaptıkları çalışmada  $\beta$  talasemi sıklığını ise %5,1 olarak bildirmiştir. Topal ve arkadaşları (66) IVS I-110 mutasyonu yüzdesini Antakya'da %64, Kayseri'de %68, İzmir'de %47 olduğunu Antakya bölgesinde %18, IVS I-1, %6 Cd39, %6 IVS I-6 ve %6 IVS II-1 olduğunu, Kayseri'de %20 Fsc8, %5 IVS I-6, %2 Fsc5 ve IVS I-1 olduğunu ve İzmir bölgesinde %7 IVS I-1, %7 Fsc5 ve Cd39 olduğunu bildirmişlerdir. Attila ve arkadaşları (109) çalışmalarında Çukurova'da HbS oranını %10,  $\beta$  talasemi oranını %3,7 ve  $\alpha$  talasemi oranını %3,3 olarak bildirmektedir. Doğum öncesi tanı yapılan 249 fetustan 49 tanesini homozigot ya da çifte heterozigot hasta olarak belirlemişlerdir. Bunların %13,7'sinde Hb S, %5,6'sında  $\beta$  talasemi, %0,4'ünde  $\alpha$  talasemi ve %0,4'ünde HbS- $\beta$ -talasemi mutasyonu tespit etmişlerdir. Altay çalışmasında (97) 9'u kararlı, 4'ü kararsız, 1'i uzamış toplam 14  $\alpha$ , 19'u kararlı, 2'si kararsız, 3'ü talasemik, 1'i delesyon/insersiyon toplam 25  $\beta$ , 1  $\gamma$  globin zinciri mutasyonu ile oluşan ve 2 de hibrit hemoglobin olmak üzere toplam 42 anormal hemoglobin rapor etmiştir. Akar ve arkadaşlarının (110) yaptığı çalışmada ise bunlara ek olarak 2002 yılından sonra Türkiye'de 2  $\alpha$ , 4  $\beta$  ve 1  $\delta$  globin zinciri mutasyonu sonucu oluşan anormal hemoglobin tiplerini bildirmişlerdir. Çürük ve arkadaşları (111) tarafından Çukurova bölgesinde  $\beta$ - talasemi heterojenitesini belirlenmesine yönelik çalışma yapmışlardır. Çalışmada rutin hematolojik analiz ve moleküler teknikler kullanılmıştır. Yaygın mutasyon sıklığı olarak en fazla IVS-I-110 (%57,3) olduğu belirtilmiştir. Çalışma sonuçlarına göre 15 (TGG  $\rightarrow$  TGA) ve Fsc 82/83 (-G) mutasyonları ülkemizde ilk defa kayıt olarak verilmiştir. Evrensel ve arkadaşları (112) Kayseri bölgesinde yaptıkları çalışmalarında en yüksek sıklıkla IVS I-110 mutasyonu olduğunu (%76), Fsc5 %8, IVS I-6 %8, Fsc8'in %6 ve Cd39'un ise %3 olduğunu bildirmişlerdir. İnce ve arkadaşları (113) Güneydoğu anadolu bölgesinde en yaygın  $\beta$  talasemi mutasyonunun IVS I-110 olduğunu (%27,8) ve bunu %11,1 oranlarında IVS I-6 ve Fsc 8, %8,3 oranında IVS II-1 ve %5,5 oranında IVS II-745 mutasyonlarının izlediğini bildirmişlerdir.

Çürük ve arkadaşları (114) Çukurova bölgesinde yapılan orak hücre ve  $\beta$  talaseminin prenatal tanı sonuçlarını yayınlamıştır. Çalışmada IVS-I-110 (G > A) mutasyon insidansının %57.14'ün  $\beta$ -thal özelliği taşıyan ebeveynlerin oluşturduğu bildirilmiştir. Arıyürek (6) tarafından yapılan çalışmada, Konya yöresinde 164 olgunun 84'ünde  $\beta$  talasemi mutasyonu taşıyıcılığı, birinde  $\alpha^{3,7}$  talasemi mutasyonu taşıyıcılığı ve birinde HbS-talasemi taşıyıcılığı belirlenmiştir. Mutasyon taraması yapılan olgulardan 3 tanesi IVS I-110/ IVS I-110 homozigot, 3 tanesi IVS II-745/IVS I-110 ve 1 tanesi HbD/IVS I-110 çifte heterozigot olarak belirlenmiştir. Beta talasemi taşıyıcılığı belirlenen olguların %74'ü IVS I-110, % 9'u Fsc 8, % 5'i Cd 39, % 4'ü Fsc 5, % 4'ü IVS I-1, % 2'si IVS II-745, % 1'i Fsc 44 ve -87 mutasyonu taşıyıcısı olduğu belirlenmiştir. Ulutaş ve arkadaşları (125) Kadirli bölgesinde evlilik öncesi tarama yaptıran 1994 kişiden 98'inde (%4,91) beta talasemi taşıyıcılığı tespit etmişlerdir. Ayrıca HbD için beş taşıyıcılık (%0.46) ve bir hasta oranı (%0.09) ile en fazla görülen anormal hemoglobin tipi olduğunu, iki kişide HbS ve bir kişide HbE taşıyıcılığı tespit ettiklerini bildirmişlerdir.

Çalışmalar incelendiğinde Türkiye'nin bölgeleri mutasyon sıklığı açısından her coğrafik bölgedeki mutant allellerin dağılımının farklı olduğu gözlenmektedir. Bunun içindir ki mutasyonların özellikle hasta çocuk doğumunu engellemek amacıyla halen 33 ilde kanun gereği uygulanan evlilik öncesi tarama çalışmalarına destek olmak amacıyla farklı bölgelerde benzer çalışmaların yapılarak ülkemizin tam bir talasemi mutasyon haritasının çıkarılması önem taşımaktadır.

Akdeniz bölgesinde sosyoekonomik, kültürel ve coğrafi yerleşim açısından farklı bir öneme sahip olan Kahramanmaraş'ta hemoglobinopati ile ilgili ilk çalışma Canatan ve ark. (115) tarafından yapılmıştır. Canatan ve arkadaşları (115) tarafından Kahramanmaraş'ın Elbistan ilçesinde yapılan tarama çalışması sonucu  $\beta$ -talasemi taşıyıcılığı sıklığını %1 (n = 995) olarak göstermişlerdir. 2001 yılında Yüreğir ve ark. (107) random olarak 1491 kişide tarama yapmışlar ve bu yörede orak hücre anemisinin olmadığı ve beta talasemi taşıyıcılığının % 0,93 olarak tespit etmişlerdir. Hemoglobin S tespit edilmemiş ve 3 HbD taşıyıcısı bildirmişlerdir. 2008 yılında Güler ve ark. (116) Tarafından bir yıllık sürede Kahramanmaraş ilinde evlilik öncesi 11040 kişi (5520 erkek, 5520 kadın) tarama yapılmıştır. Çalışmada olguların 261'inde (130 erkek, 131 kadın) beta talasemi taşıyıcılığı, 59'unda (31 erkek, 28 kadın) HbS saptanmış ve taşıyıcılık oranları talasemi için %2.35 ve HbS için %0.54 bulmuşlardır. Kurutaş ve ark. tarafından (2015) Kahramanmaraş ilinde evlilik öncesi tarama uygulanan 106889 kişiden 1670 kişinin beta talasemi taşıyıcısı (%1.56) ve 134 Orak hücre anemisi taşıyıcısı (%0.125) olduğu

ve HbS, Hb D-Los Angeles, HbC, HbE ve Hb-0-Arab olmak üzere beş farklı anormal hemoglobin bulunduğunu bildirmiştir.

Kahramanmaraş'ta hemoglobinopati ile ilgili moleküler düzeyde kapsamlı bir çalışma ilk defa 2015 yılında Sümer ve ark. (117-118) tarafından yapılmıştır. Sümer ve ark. (117) tarafından yapılan tarama çalışmasında da Kahramanmaraş yöresinde 100 olgunun birinde  $\alpha^{3,7}$ , diğer birinde  $\alpha^{20,5}$  olmak üzere iki alfa, 2 kişide ise beta talasemi taşıyıcılığı ve 9'unda demir eksikliği anemisi belirlenmiştir.

Bu tez çalışması, Kahramanmaraş yöresinde beta talasemi mutasyonlarının belirlenmesine yönelik olan ilk çalışma olup çeşitli araştırmacılar tarafından ülkemizde sıklıkla rastlandığı belirtilen 10 mutasyonu kapsamaktadır. Çalışma sonucunda 5 farklı beta globin geni mutasyonu (IVS 1-110 G>A, IVS II-I (G>A), IVS 1-5 (G>C), Fsc8 (-AA) ve Fsc 8/9 (+G) belirlenmiştir. Çalışmamızda en sık rastlanan mutasyon IVS 1-110 (G>A) olup, 28 kromozomun 16 tanesi IVS 1-110 olarak belirlendi (%57.14). Ayrıca çalışma grubu içerisinde 14 hastadan 7 tanesi IVS 1-110 mutasyonu için homozigot olarak belirlendi. Toplam 12 aileden 10'nu birer talasemik çocuğa sahip iken iki aile de çift talasemili çocuğa sahipti. Bu yüzden son yıllarda Kahramanmaraş ilinde Sağlık Bakanlığı tarafından evlilik öncesi tarama ve genetik danışma hizmeti verilmektedir.

Daha önce yapılan birçok çalışmada da ülkemizde en fazla gözlenen IVS 1-110 mutasyon olduğu rapor edilmiştir. Bu mutasyon farklı bölgelerimizi kapsayan çeşitli çalışmalarda %21.1-60 arasında değişen oranlarda rapor edilmektedir (90,96,101,105,119-123). Çalışmamızda görülen diğer mutasyonlar IVS 1-5, IVS 2-1, Fsc 8 ve Fsc 8/9'du. Çalışma kapsamında olan 14 hastanın 6'sı Fsc 8, Fsc 8/9, IVS1-5, IVS 1-110 ve IVS 2-1 mutasyonu için heterozigot idi. Ayrıca, çalışmamızda bir hastanın (Ö.B.) her iki kromozomunda mutasyonlar ARMS yöntemiyle belirlenemedi.

Çalışma kapsamımız içerisinde bulunmasına rağmen, IVS 1-6 (T>C), Cd 39 (C>T), -30 (T>A), IVS 1-1 (G>A) ve IVS 2-745 (C>G) mutasyonlarına olgularımızda rastlanmamıştır. Bu mutasyonlardan IVS 1-6 ülkemizde sıklıkla rastlanan mutasyonlardan biri olarak refere edilmektedir (82). Ayrıca Cüre, (123), Nisli ve ark. (124) tarafından değişen oranlarda rapor edilen -290 bp del, poly A (TAA>TGA), Cd -74/75 (-C), IVS 2.848 (C>A), -101,-28, Cd 15, Cd 27, 3'UTR (-13bp), Cd 22- 24 (-7bp), IVS 1-130 mutasyonları çalışma kapsamımızda bulunmamaktadır. Bu konu ile ilişkili olarak yukarıda bahsedilen 6 heterozigot olguda ve bir



hastada (Ö.B.) yukarıdaki olası mutasyonların biri ya da farklı bir mutasyonun varlığı söz konusu olabilir. Bu hastalarda  $\beta$ - globin geni için DNA dizi analizinin yapılması olası diğer mutasyonların taranması açısından yararlı olacaktır. Böylece akraba evliliklerinin yaygın olduğu bölgemizde olası riskler anlatılarak bu durumdaki ebeveynlerin prenatal tanıya yönlendirilmesi beta talaseminin önlenmesi bakımından önemlidir.

Sonuç olarak, Kahramanmaraş heterojen bir mutasyon dağılımı göstermekte ve IVS 1-110 mutasyonu %57.14'lük oran ile baskın bir mutasyon olduğu görülmektedir.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada 14 talasemili hasta ve onların ailelerinden toplam 29 kan örneği alındı. Bu hastalar KSÜ hastanesinde tedavi edilmekte idi. Kan sayımı cihazı ile hematolojik veriler elde edildi. HbA2 miktarı HPLC yöntemi ile belirlendi. On farklı beta talasemi mutasyonu ARMS yöntemi tarandı. Bunlar; -30 (T>A), Cd 8 (-AA), Cd 8/9 (+G), IVS 1-1 (G>A), IVS 1-5 (G>C), IVS 1-6 (T>C), IVS 1-110 (G>A), Cd 39 (C>T), IVS 2-1 (G>A), IVS 2-745 (C>G) alındı. Sonuçlar sırasıyla;

1. Çalışmamızda en sık rastlanan mutasyon IVS 1-110 (G>A) olup, 28 kromozomun 16 tanesi IVS 1-110 olarak belirlendi (%57.14).
2. Ayrıca çalışma grubu içerisinde 14 hastadan 7 tanesi IVS 1-110 mutasyonu için homozigot olarak belirlendi. Toplam 12 aileden 10'nu birer talasemik çocuğa sahip iken iki aile de çift talasemili çocuğa sahipti.
3. Çalışmamızda görülen diğer mutasyonlar IVS 1-5, IVS 2-1, Fsc 8 ve Fsc 8/9'du. Çalışma kapsamında olan 14 hastanın 6'sı Fsc 8, Fsc 8/9, IVS1-5, IVS 1-110 ve IVS 2-1 mutasyonu için heterozigot idi.
4. Çalışmamızda bir hastanın (Ö.B.) her iki kromozomunda mutasyonlar ARMS yöntemiyle belirlenemedi.
5. Çalışma kapsamımız içerisinde bulunmasına rağmen, IVS 1-6 (T>C), Cd 39 (C>T), -30 (T>A), IVS 1-1 (G>A) ve IVS 2-745 (C>G) mutasyonlarına olgularımızda rastlanmadı.

Sonuç olarak, Kahramanmaraş iline özgü beta talasemi mutasyonlarının heterojenliğini gösteren bu çalışmanın prenatal tanı için riskli çiftlere faydalı olacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

1. Olivieri NF. (1999) The  $\beta$ -Thalasseмииs. Medical Progress. 341: 99-109.
2. Weatherall D. (2004) The Thalasseмииs: The Role of Molecular Genetics in an Evolving Global Health Problem. *Am J Hum Genet*, 74: 385–392.
3. Tüzmen Ş, Schechter AN. (2001) Genetic diseases of hemoglobin: Diagnostic methods for elucidating  $\beta$ - thalasseमीa mutations. *Blood Reviews* 15: 19-29.
4. Kayışlı ÖG, Keser İ, Canatan D, Sanlıoğlu A, Özes ON, Lüleci G. (2005) Identification of a Novel Frameshift Mutation [Codon 3 (+ T)] in a Turkish Patient with\ beta-Thalasseमीa Intermedia. *Turk J Med Sci*. 35(3) 175–177.
5. Rund D, Rachmilewitz E. (2001) Pathophysiology of  $\alpha$ - and  $\beta$ - thalasseमीa: Therapeutic implication. *Sem Hematol*. 38(4): 343-349.
6. Arıyürek SY. 2009. Konya bölgesinin anormal hemoglobin ve talasemi mutasyon tiplerinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Adana,
7. URL-1: <http://globin.bx.psu.edu/> erişim tarihi: 08.11.2016.
8. URL-2: [http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/ kitap/hemokitap4.asp/](http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp/) erişim tarihi: 08.11.2013.
9. Altay Ç. (2002) Abnormal Hemoglobins in Turkey. *Turk J Haematol*. 19:63-74.
10. Tadmouri GO, Tuzmen S, Ozçelik H et al. (1998) Molecular and Population Genetic Analyses of  $\beta$  -Thalasseमीa in Turkey. *Amu J. Hematol* 57: 215–20.
11. Kwok PY., Chen X. (2003). Detection of Single Nucleotide Polymorphisms. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 5(2): 43-60.
12. Collins FS., Brooks LD., Chakravarti A. (1998). A DNA Polymorphism Discovery Resource for Research on Human Genetic Variation. *Genom Res.*, 8(12): 1229- 1231.
13. Venter JC., Adams MD., Myers EW. Li PW., Mural RJ., Sutton GG., Smith HO., Yandell M., Evans CA., Holt RA., Gocayne JD., Amanatides P., Ballew RM., Huson DH., Wortman JR., Zhang Q., Kodira CD., Zheng XH., Chen L., Skupski M., Subramanian G., Thomas PD., Zhang J., Gabor Miklos GL., Nelson C., Broder S., Clark AG., Nadeau J., McKusick VA., Zinder N., Levine AJ., Roberst RJ., Simon M., et.al. (2001). The Sequence of The Human Genome. *Science. Review*, 291(5507): 1304- 1351.
14. Gusella JF. (1986). DNA Polymorphism and Human Disease. *Ann. Rev.*, 55: 831-854.

15. Botstein D., Risch N. (2003). Discovering Genotypes Underlying Human Phenotypes: Past Successes for Mendelian Disease, Future Approaches for Complex Disease. *Nat. Genet.*, 33. Suppl., 228-237.
16. Crawford DC., Akey DT., Nickerson DA. (2005a). The Patterns of Natural Variation in Human Genes. *Annu. Rev. Med.*, 6: 287-312.
17. Hoehe MR. (2003). Haplotypes and The Systematic Analysis of Genetic Variation in Genes and Genomes. *Pharmacogenetics.*, 4(5): 547-570.
18. Maxwell TJ. (2006). Applications of Evolutionary Theory To Genotype/Phenotype Association Studies. *Doctoral Thesis.*, Washington University., 107s-121s.
19. Smith RA., Ho PJ., Clegg JB., Kidd JR., Thein SL. (1998). Recombination Breakpoints in The Human  $\beta$  Globin Gene Cluster. *Blood.*, 92(11): 4415-4421.
20. Chakravarti A. Buetow KH., Antonarakis SE., Waber PG., Boehm CD., Kazazian HH. (1984). Nonuniform Recombination within The Human  $\beta$  Globin Gene Cluster. *Am. J. Hum. Genet.*, 36 (6): 1239-1258.
21. Antonarakis SE., Boehm CD., Giardina PJ., Kazazian HH. (1982). Non Random Association of Polymorphic Restriction Sites in The  $\beta$  Globin Gene Cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 79 (1): 137-141.
22. Treco D., Thomas B., Arnheim N. (1985). Recombination Hot Spot in The Human Globin Gene Cluster: Meiotic Recombination of Human DNA Fragments in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 5(8): 2029-2038.
23. Antonini E., Brunoria M. (1970). Hemoglobin. *Annu. Rev. Biochem.*, 39: 977-1042.
24. Marengo-Rowe AJ. (2006). Structure Function Relations of Human Hemoglobins. *Proc(Bay. Univ. Med. Cent.)*, 19(3): 239- 245.
25. Schechter AN. (2008). Hemoglobin Research and The Origins of Molecular Medicine. *Blood.*, 112(10): 3927- 3938.
26. Sümer P. Belge Kurutaş, E, Çürük M. A. (2016) *Kahramanmaraş İlinde Alfa Talasemi Genotipleri: Moleküler Çalışma*, Türk Biyokimya Dergisi, Kahramanmaraş Talasemi Sempozyumu I, 7-9 Nisan 2016 Cilt 4, Yayın 1. 74 sayfa.
27. Nagel R L. (2003) *Disorder of Hemoglobin Function and Stability*. Handin R I, Lux S E and Stossel T P. *Blood: Principles and Practice of Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 1597-1654. Şişli N. (2002) Vücut Proteinleri ve Fonksiyonları. Onat T, Emerk K, Sözmen e Y. İnsan biyokimyası. Ankara: *Palme yayıncılık*, 135-144.

28. Günçag D. (2003) *Hemolitik Anemiler. Klinik Hematoloji*. Dinçol G, Pekçelen Y, Atamer T, Sargin D, Nalçacı M, Aktan M, Besisik SK (editör) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, s: 87-152.
29. Weatherall DJ. (2006) Disorders of globin synthesis: The thalassemias. *Williams Hematology*, 7 nd Ed. In Lichtman MA, Beutler E, Kipps TJ, Seligsohn U, Kaushansky K, Prchal JT (eds). New York: McGraw-Hill, pp: 633–666.
30. Flint J, Harding SM, Boyce AJ, Clegg JB. (1993) The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol.* 6: 215-262.
31. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG. (2001) The Thalassemias. In: Scriver CR, Beutler E, Sly WS, Valle D, Eds. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed, New York: McGraw Hill Publishing Division, 4571-4636.
32. Fathallah H, Atweh FG. (2006) DNA hypomethylation therapy for hemoglobin disorders: Molecular mechanisms and clinical applications. *Blood Reviews.* 20: 227-234.
33. Schroeder WA. (1963). The Hemoglobins. *Ann. Rev.*, 32: 301-320.
34. Huehns ER. (1970). Diseases Due To Abnormalities of Hemoglobin Structure. *Annu. Rev. Med.*, 21: 157-178.
35. Stamatoyannopoulos G. (1972). The Molecular Basis of Hemoglobin Disease. *Annu. Rev.*, 6: 47- 70.
36. Bettati S., Mozzarelli A., Perutz MF. (1998). Allosteric Mechanism of Hemoglobin: Rupture of Salt- Bridges Raises The Oxygen Affinity of The T- Structure. *J. Mol. Biol.*, 281(4): 581- 585.
37. Xu J. (2006). Extracting Haplotypes From Diploid Organisms. *Curr. Issues Mol. Biol.*, 8(2): 113- 122.
38. Patrinos GP., Kollia P., Papadakis MN. (2005). Molecular Diagnosis of Inherited Disorders: Lessons From Hemoglobinopathies. *Hum. Mutat.*, 26(5): 399-412.
39. Orkin SH. (1995). Regulation of Globin Gene Expression in Erythroid Cells. *Eur. J. Biochem.*, 231(2): 271-281.
40. Levings PP., Bungert J. (2002). The Human Beta Globin Locus Control Region. *Eur. J. Biochem.*, 269(6): 1589-1599.
41. Wood WG., Weatherall DJ. (1983). Developmental Genetics of The Human Haemoglobins. *Biochem. J.*, 215 (1): 1-10.
42. Cao A., Moi P. (2002). Regulation of The Globin Genes. *Pediatr. Res.*, 51(4): 415-421.

43. Ho PJ., Thein SL. (2000). Gene Regulation and Deregulation: A Beta Globin Perspective. *Blood Rev.*, 14(2): 78-93.
44. Forrester WC., Takegawa S., Papanyanopoulou T., Stamatoyannopoulos G., Groudine M. (1987). Evidence for a Locus Activation Region: The Formation of Developmentally Stable Hypensensitive Sites in Globin Expressing Hybrids. *Nucleic Acids Res.*, 15(24): 10159- 10177.
45. Hanscombe O., Whyatt D., Fraser P., Yannoutsos N., Greaves D., Dillon N., Grosveld F. (1991). Importance of Globin Gene Order for Correct Developmental Expression. *Genes Dev.*, 5 (8): 1387-1394.
46. Grosveld F., Antoniou M., Berry M., De Boer E., Dillon N., Ellis J., Fraser P., Hnascombe O., Hurst J., Imam A., Lindenbaum M., Philipsen S., Pruzina S., Strouboulis J., Raguz-Bolognesi S., Talbot D. (1993). The Regulation of Human Globin Gene Switching. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. (Biol.)*, 339(1288): 183-191.
47. Ho PJ. (1999). The Regulation of  $\beta$  Globin Gene Expression and  $\beta$  Thalassemia. *Pathology.*, 31(4): 315- 324.
48. Stamatoyannopoulos G. (2005). Control of Globin Gene Expression During Development and Erythroid Differentiation. *Exp. Hematol.*, 33 (3): 259-271
49. Karlsson S., Nienhuis AW. (1985). Developmental Regulation of Human Globin Genes. *Ann. Rev Biochem.*, 54: 1071-1108.
50. Behringer RR., Ryan TM., Palmiter RD., Brinster RL., Townes TM. (1990). Human Gama to Beta Globin Gene Switching in Transgenic Mice. *Genes. Dev.*, 4 (3): 380- 389.
51. Stamatoyannopoulos JA. (1992). Future Prospects for Treatment of Hemoglobinopathies. *West. J. Med.*, 157(6): 631- 636.
52. Maniatis T., Fritsch EF., Lauer J., Lawn RM. (1980). The Molecular Genetics of Human Hemoglobins. *Annu. Rev. Genet.*, 14:145-178.
53. Orkin SH., Kazazian HH. (1984b). The Mutation and Polymorphism of The Human Globin Gene and It's Surrounding DNA. *Ann. Rev. Genet.*, 18: 131-171.
54. Galanello R, Origa R. (2010) Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis.* 5:11.
55. Modell, B., Darlison, M. (2008). Global Epidemiology of Haemoglobin Disorders and Derived Service Indicators. *Bulletin of the World Health Organization*, 86(6), 480-487.
56. Cao A, (2010) Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med.* 12(2):61–76.
57. Bank A. (1978). The Thalassemia Syndromes. *Blood.*, 51(3): 369-384.

58. Benz EJ., Forget BG. (1982). The Thalassemia Syndromes: Models for The Molecular Analysis of Human Disease. *Ann. Rev. Med.*, 33: 363-373.
59. Metherall JE. Collins FS., Pan J., Weissman SH., Forget BG. (1986). 0 Thalassemia Caused By A Base Substitution That Creates An Alternative Splice Acceptor Site in An Intron. *EMBO J.*, 5 (10): 2251-2257.
60. Weatherall DJ. (1997). The Thalassemias. *BMJ.*, 314 (7079): 492-496.
61. Eryılmaz N. Hatay İlinde Beta Talasemi Mutasyonları Dağılımının Dna Dizi Analizi Yöntemiyle Araştırılması, Mustafa Kemal Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, 2012.
62. Weatherall DJ. Phenotype–genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Genetics* 2001; 2: 245- 255.
63. May C, Sadelain MA. (2001) Promising genetic approach to the treatment of  $\beta$ -thalassemia. *Trends Cardiovasc Med.* 11:276-280.
64. Öner AF, Özer R, Üner A, Arslan G, Gümrük F. (2001) Beta-Thalassemia Mutations in the East of Turkey. *Turk J Haematol*, 18(4): 239-242.
65. Forget BG, Olivieri NF. (2003) Hemoglobin synthesis and the Thalassemias. Ed. Handin RI, Lux SE, Stossel TP, Blood: Principles and practice of hematology. pp. 1503-1596, Lippincott Williams & Wilkins, USA.
66. Topal K. Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde  $\beta$ -talasemi mutasyon tiplerinin saptanması. Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı, Doktora Tezi 1998.
67. Wood WG. (1993) Increased HbF in adult life. *Baillieres Clin Haematol.* 6: 177–213.
68. Borgna-Pignatti C, Galanello R. (2009) Thalassemias and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis. Ed: Wintrobe’s Clinical Hematology. pp. 1084-1131, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA.
69. Huisman TH. (1993) The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. *Baillieres Clin Haematol.* 6(1):1–30.
70. Pentberthy GC., Cooley TB. (1935). Results of Splenectomy in Childhood. *Ann. Surgery.*, 102(4): 645- 655.
71. Chernoff AI. (1959). The Distribution of The Thalassemia Gene: A Historical Review. *Blood.*, 14 (8): 899-912.
72. Marengo-Rowe AJ. (2007). The Thalassemias and Related Disorders. *Proc(Bay. Univ. Med. Cent.)*, 20(2): 27-31.

73. Weatherall DJ. (1998). Pathophysiology of Thalassemia. *Baillieres Clin. Haematol.*, 11(1): 127- 146.
74. Thein SL. (2004). Genetic Insights into The Clinical Diversity of  $\beta$  Thalassemia. *Br. J. Haematol.*, 124(3): 264-274.
75. Kazazian HH, Boehm C. (1988) Molecular basis and prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia. *Blood* 72:1107-1116.
76. Camaschella C., Cappellini MD. (1995). Thalassemia Intermedia. *Haematologica.*, 80(1): 58- 68.
77. Shah D., Choudhury P., Dubey A.P. (1999). Current Trends in Management of The Beta Thalassemias. *Indian Pediatrics.*, 36 (12): 1229- 1242.
78. Taher A., Isma'eel H., Cappellini MD. (2006). Thalassemia Intermedia: Revisited. *Blood Cells, Mol. Dis.*, 37(1): 12- 20.
79. Haldane JBS. (1949). The Rate of Mutations of Human Genes. *Proceedings of The 8th International congress on Genetics. Hereditas. Suppl.*, 35: 267-273.
80. Ramsay M., Jenkins T. (1987). Globin Gene Associated Restriction Fragment Length Polymorphisms in Southern African Peoples. *Am. J. Hum. Genet.*, 41 (6): 1132- 1144.
81. Nagel RL., Roth EF. (1989). Malaria and Red Cell Genetic Defects. *Blood.*, 74(4): 1213- 1221.
82. Tadmouri GO, Başak AN. (2001)  $\beta$ - Thalassemia in Turkey: A Review of the Clinical, Epidemiological, Molecular and Evolutionary Aspects. *Hemoglobin* 25(2):227-34.
83. Birgens H, Ljung R (2007). The thalassaemia syndromes. *Scand J Clin and Lab Invest* 67(1): 11- 25.
84. Huisman THJ., Carver MFH. (1998). The  $\beta$  and  $\delta$  Thalassemia Repository, Ninth Edition, Part I. *Hemoglobin.*, 22(2): 169-195.
85. Falchi A., Giovannoni L., Vacca L., Latini V., Vona G., Varesi L. (2005). B Globin Gene Cluster Haplotypes Associated with Thalassemia on Corsica Island. *Am. J. Hematol.*, 78(1): 27-32.
86. Clark BE., Thein SL. (2004a). Molecular Diagnosis of Haemoglobin Disorders. *Clin. Lab. Haem.*, 26 (3): 159-176.
87. Wilson IJ., Weale ME., Balding DJ. (2003). Inferences From DNA Data: Population Histories, Evolutionary Processes and Forensic Match Probabilities. *J. R. Statist. Soc. A.*, 166(2): 155-201.



88. Fattoum S., Messaoud T., Bibi A. (2004). Molecular Basis of  $\beta$  Thalassemia in The Population of Tunisia. *Hemoglobin.*, 28(3): 177-187.
89. Nagel RL. (2004). Beta Globin Gene Haplotypes, Mitochondrial DNA, TheY-Chromosomes: Their Impact on The Genetic Epidemiology of The Major Structural Hemoglobinopathies. *Cell. Mol. Biol.*, 50(1): 5- 21.
90. Yıldız S, Atalay A, Bağcı H, Atalay EÖ. (2005) Beta-thalassemia mutations in Denizli province of Turkey. *Turk J Hematol.*, 22: 19-23.
91. Makhoul NJ., Wells RS., Kaspar H., Shbaklo H., Taher A., Chakar N., Zalloua PA. (2005). Genetic Heterogeneity of Beta Thalassemia in Lebanon Reflects Historic and Recent Population Migration. *Ann. Hum. Genet.*, 69 (1): 55-66.
92. Hussein G., Fawzy M., El Serafi T., Ismail EF., Metwally DE., Saber MA., Giansily M., Schved JF., Pissard S., Martinez PA. (2007). Rapid Detection of  $\beta$  Thalassemia Alleles in Egypt Using Naturally or Amplified Created Restriction Sites and Direct Sequencing: A Step In Disease Control. *Hemoglobin.*, 31(1): 49-62.
93. Öztürk O. (2007b). Denizli Yöresinde Gözlenen Hb D Los Angeles Mutasyonunun Beta Globin Gen Ailesi Haplotip Analizi. Yüksek Lisans Tezi, *Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Denizli.
94. Aksoy M. (1970). Thalassemia Intermedia: A Genetic Study in 11 Patients. *J. Med. Genet.*, 7(1): 47-51.
95. Atalay EO., Çırakoğlu B., Dinçol G., Atalay A., Kılınç Y., Aytekin H., Yüregir GT., Arpacı A., Bermek E., Aksoy M. (1993). Regional Distributions of  $\beta$  Thalassemia Mutations in Turkey. *Int. J. Hematol.*, 57(3): 207-211.
96. Tadmouri GO. (1999).  $\beta$ -thalassemia in Turkey: Distribution, Diversity, Evolution and Phenotype-Genotype Correlations. Ph. D. Dissertation, *Bogaziçi University*, İstanbul., 69s - 70s.
97. Altay Ç. (2002). The Frequency and Distribution Pattern of  $\beta$  Thalassemia Mutations in Turkey. *Turk. J. Haematol.*, 19(2): 309-315.
98. Bilenoglu O. (2002). Beta Thalassemia In Turkey: Molecular Analysis of Beta Globin Gene and The Effect of The Beta 13 Mutation on Gene Expression. Doktora Tezi, *Boğaziçi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 31s.
99. Diaz-Chico JC., Yang KG., Stoming TA., Efremov DG., Kutlar A., Kutlar F., Aksoy M., Altay Ç., Gürgey A., Kılınç Y., Huisman THJ. (1988). Mild and Severe Beta Thalassemia

- among Homozygotes from Turkey: Identification of The Types by Hybridization of Amplified DNA with Synthetic Probes. *Blood.*, 71 (1): 248-251.
100. Başak AN., Özçelik H., Özer A., Tolun A., Aksoy M., Ağaoğlu L., Ridolfi F., Ulukutlu L., Akar N., Gurgey A., Kırdar B. (1992). The Molecular Basis of  $\beta$  Thalassemia in Turkey. *Hum. Genet.*, 89 (3):315-318.
101. Tadmoury GO, Bilenoğlu O, Kutlar F, et al. (1999) Identification of the Chinese IVS-II- $\&54$  (C>T) beta-thalassemia mutation in an immigrant Turkish family: recurrence or migration. *Hum Biol* 71(2): 295-302.
102. Keskin A., Turk T., Polat A., Koyuncu H., Saracoğlu B. (2000). Premarital Screening of Beta Thalassemia Trait in Denizli, Turkey. *Acta Hematol.*, 104(1): 31-33.
103. Tadmouri GO, Tüzmen S, Ozçelik H, Ozer A, Baig SM, Senga EB, et al. (1998) Molecular and Population Genetic Analyses of Beta-Thalassemia in Turkey. *Am J Hematol.* 57(3):215–20
104. Dönbak L. (2005) İnsan Hemoglobin Varyantları. *KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi.* 8: 13–22.
105. Keser İ, Manguoglu E, Kayışlı ÖG, et al. (2005) Prenatal diagnosis of  $\beta$ - talassemia in the Antalya Province. *Turk J Med Sci* 35: 251–253.
106. Tadmouri GO., Başak AN. (2001a).  $\beta$ -Thalassemia in Turkey: A Review of The Clinical, Epidemiological, Molecular and Evolutionary Aspects. *Hemoglobin.*, 25(2): 227- 239.
107. Yüregir GT, Arpacı A, Aksoy K, Tuli A, Dikmen N, Özgünen T, Kılınç Y. 1995, Population at risk for hemoglobinopathies in Çukurova. Türkiye: Need for prenatal diagnosis. *Ann Med Sci*, 4:61-60.
108. Arpacı A. 1991 Antakya yöresinde  $\beta$  talasemik gen sıklığı ve mutasyonların gen amplifikasyon yöntemi ile saptanması. Uzmanlık Tezi, ÇÜ Tıp Fakültesi. 89 s.
109. Atilla G, Çürük MA, Arpacı A, Özgünen FT, Kılınç Y, Aksoy K, ve ark. (1999) Prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in southern Turkey. *Ann Med Sci.* 8(2): 93-7.
110. Akar E, Akar N. (2007) A review of abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk J Hematol.* 24:143-145.
111. Çürük MA, Arpacı A, Atilla G, et al. (2001) Genetic Heterogeneity of  $\beta$ - talassemia at Çukurova in Southern Turkey. *Hemoglobin*, 25(2): 241-5.
112. Evrensel E, Yalın AE, Aksoy K. (2003) Kayseri Yöresinde  $\beta$ -Talasemi Mutasyon Dağılımı. Tanı da Moleküler Tıp Sempozyumu.

113. İnce HH, Ayyıldız O, Kalkanlı S, Batun S, Müftüoğlu E. (2003) Molecular basis of  $\beta$  thalassemia mutations in Diyarbakır in the southeastern region of Turkey. Hemoglobin. 27(4): 275-8
114. Çürük MA, Zeren F, Genc A, Aygun SO, Kılinc Y, Aksoy K. (2008) Prenatal diagnosis of sickle cell anemia and  $\beta$ -thalassemia in Southern Turkey. Hemoglobin. 32(6):525-530.
115. Canatan D, Bor S, Arcasoy A, Yeşil N. (1990) Elbistan yöresinde Anormal Hb ve HbA<sub>2</sub> yüksekliği ile karakterize  $\beta$  -thalassemia taşıyıcı taraması. Doğa Tr J Med Sci. 14:555-61.
116. Güler E, Davutoğlu M, Karabiber H, Çelik M, Ekerbiçer HÇ, Paksoy MF. (2008) Kahramanmaraş ilinde evlilik öncesi hemoglobinopati taraması sonuçlarının değerlendirilmesi. TAF Prev Med Bull. 7(3):243-244.
117. Sümer P. 2016, Kahramanmaraş İlinde Alfa Talasemi Genotipleri, Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 94 s.
118. Belge Kurutaş, E, Güngör M., Çitil M. (2016) Kahramanmaraş ilinde anormal Hemoglobinler Türk Biyokimya Dergisi, Kahramanmaraş Talasemi Sempozyumu I, 7-9 Nisan 2016 Cilt 4, Yayın 1. 74 sayfa.
119. URL-3: <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp>
120. Tadmouri GO., Başak AN. (2001a).  $\beta$ -Thalassemia in Turkey: A Review of The Clinical, Epidemiological, Molecular and Evolutionary Aspects. Hemoglobin., 25(2): 227- 239.
121. Keser I, Şanlıoğlu AD, Manguoğlu E, et al. (2004) Molecular Analysis of Beta Thalassemia and Sickle Cell Anemia in Antalya. Acta Haematologica 111: 2005-10.
122. Çürük MA, Arpacı A, Atilla G, Tuli A, Kılinc Y, Aksoy K, ve ark. (2001) Genetic heterogeneti of  $\beta$ -thalassemia at Çukurova in Southern Turkey. Hemoglobin. 25:241-245.
123. Cüre MC. (2008). Isparta ve Çevresindeki Beta-Talasemi Kalıtsal Mutasyonlarının Dağılımının Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi.
124. Nisli G. Kavaklı K, Aydınok Y, et.al. (1997) Beta-Thalassemia Allels in Region of Turkey: Effect on Clinical Severity of Disease. Pediatr Hematol Oncol 14:59-65.
125. Ulutaş KT, Şahpaz F, Sarıcı İŞ, Uluganyan M, Akçimen B, Çelik M, ve ark. (2014) Evlilik öncesi hemoglobinopati taraması: Kadirli, Türkiye beta-talasemi açısından riskli bir bölge mi?. Türk Biyokimya Dergisi. 39(3):357–61.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı : Mehmet Emrah AKSAN  
Uyruğu : T.C.  
Doğum tarihi ve yeri : 1986/Gaziantep  
Medeni hali : Evli  
Telefon : 0544 559 41 13  
Faks :  
e-posta : memrahaksan@gmail.com

### Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	KSÜ/Sağlık Bilimleri Tıbbi Biyokimya	2017
Lisans	YYÜ/Eğitim Fakültesi-Kimya Bölümü	2009
Lise	Kahramanmaraş Anadolu Tekstil Meslek Lisesi	2004

### İş Denevimi

Yıl	Yer	Mezuniyet Tarihi
2009	ETİ Maden İşletmeleri	
2009	KSU-ÜSKİM	

### Yabancı Diller

İngilizce

### İlgi Alanları

- Tıbbi Biyokimya
- Çevre Biyoteknolojisi
- Su Atık Su Arıtma
- Biyoenerji/ Biyokütle
- Atık Yönetimi
- Akreditasyon

### İdari Görevler

- T.C. Çevre Ve Şehircilik Bakanlığı Emisyon Numune Alma Yetkilisi
- K.S.Ü Ar-ge Merkezi Emisyon Laboratuvar Bölümü Sorumlusu 2015-D. Ediyor

## **Yayınlar**

### **1.1. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler (SCI & SSCI & Arts and Humanities)**

M. E. Aksan, M M & M M, Evaluation Of Reference Values And Biological Variation For Neuron-Specific Enolase In Sterile Human Urine Advance Laboratory Medicine International, 2014, 22288961, 4, 3, 64

### **1.2 Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler**

M. E. Aksan, Rat Böbreklerinde İskemi-Reperfüzyon Hasarına Karşı Kınanın (Lawsonia Inermis) Koruyucu Etkisi: Biyokimyasal Ve Histopatolojik Çalışma, Poster Sunumu, Laboratuvar Yönetimi: Kalite -Standardizasyon - Akreditasyon Sempozyumu? , 17 October 2014,

M. E. Aksan, 'Steril İnsan İdrarında Nörona-Spesifik Enolazın Biyolojik Varyasyonları', Poster Sunumu, Kahramanmaraş I. Biyokimya Günleri, 07-09 Kasım, 07 November 2013, 07 November 2013.

## **2. Katıldığı Kurslar Aldığı Eğitimler**

- Emisyon-İmisyon Ölçümlerinde Kullanılan Standartlar Ve Ölçüm Yöntemleri Eğitimi
- TS EN İSO/ IEC 17025 Deney Ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Teknik Şartlar
- Metod Validasyon Uygulamaları
- Kalite Kontrol Kartlarının Kullanımı
- Metod Validasyonu
- Ölçüm Belirsizliği Eğitimi
- Ölçüm Belirsizliği Hesaplamasına ait Uygulamalar
- Temel İlk Yardım -İş Sağlığı Ve Güvenliği
- Genel Metroloji Ve Kalibrasyon Eğitimi