



**Hb D-LOS ANGELES ÖRNEĞİNDE
BETA GLOBİN GEN YAPISI VE POLİMORFİZMLER**

Onur ÖZTÜRK

**Haziran 2012
DENİZLİ**

**Hb D-LOS ANGELES ÖRNEĞİNDE
BETA GLOBİN GEN YAPISI VE POLİMORFİZMLER**

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Doktora Tezi
Biyofizik Anabilim Dalı**

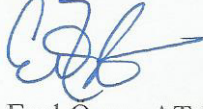
Onur ÖZTÜRK

Danışman: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

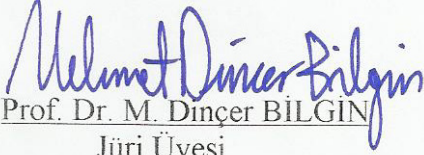
**Haziran 2012
DENİZLİ**

DOKTORA TEZİ ONAY FORMU

Onur ÖZTÜRK tarafından, Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY yönetiminde hazırlanan “Hb D-Los Angeles Örneğinde Beta Globin Gen Yapısı ve Polimorfizmler” başlıklı doktora tezi tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.



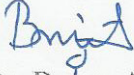
Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY
Jüri Başkanı



Prof. Dr. M. Dinçer BİLGİN
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Ayfer ATALAY
Jüri Üyesi



Doç. Dr. Beyza AKDAĞ KARGI
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 21.6.12 tarih ve 12.11.-2 sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Z. Melek BOR KÜÇÜKATAY
Müdür



TEŐEKKÖR

Tez çalıőmam ve doktora öğrenciliğim süresince, öğrenimim ve eğitimim için, desteklerini esirgemeyen değerli tez danışmanım Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY ve anabilim dalımız öğretim üyesi sayın hocam Doç. Dr. Ayfer ATALAY' a teşekkürlerimi sunarım. Katkılarından dolayı çalışma arkadaşlarıma, ilgileri ile her an yanımda hissettiğim aileme, sevgili ablama, Doğu Berke' ye ve kız arkadaşıma teşekkür ederim.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmasının yapılması ve bulguların analizinde bilimsel etiğe ve akademik kurallara özenle riayet edildiğini; bu çalışmanın doğrudan birincil ürünü olmayan bulguların, verilerin ve materyallerin bilimsel etiğe uygun olarak kaynak gösterildiğini ve alıntı yapılan çalışmalara atfedildiğini beyan ederim.

İmza :
Öğrenci Adı Soyadı : Onur ÖZTÜRK

ÖZET

Hb D-LOS ANGELES ÖRNEĞİNDE BETA GLOBİN GEN YAPISI VE POLİMORFİZMLER

Öztürk, Onur

Doktora Tezi, Biyofizik ABD

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

Haziran 2012, sayfa 74

D-Punjab, D-Nort Carolina, D-Portugal, D-Chicago, D-Neath ve Oak Ridge isimleri ile de bilinen Hb D-Los Angeles mutasyonu, beta zinciri kodon 121'de G>C baz yer değiştirmesi ile glutamik asit yerine glutamin gelmesi sonucu oluşan amino asit farklılığından kaynaklanmaktadır. Hb D Los Angeles klinik olarak belirti vermeyen bir anormal hemoglobin türüdür ve Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobin türleri içinde % 57.8 sıklık ile ilk sırada yer almaktadır. Denizli yöresinde anormal hemoglobinler ve beta talasemiler, T.C. Sağlık Bakanlığı Denizli Hemoglobinopati Merkezi verilerine göre % 3.5 oranındadır. Denizli ili, ülkemizde Hemoglobinopati Kontrol Programı uygulanan 33 il merkezinden bir tanesidir. Anormal hemoglobinler yöremizde toplum sağlığı açısından önemli kalıtsal hastalıklar arasında yer almaktadır.

Beta globin gen ailesi gibi tüm gen aileleri, ürünleri aynı genel işlevi gören bölgesel gen gruplarıdır. Gen ailesi içinde yer alan genler arasındaki DNA dizi benzerliği, bunların ortak atasal genden geldikleri hipotezinin doğmasına sebep olmuştur. Bu işlergelerin keşfedilmesine yönelik, beta globin gen ailesinin içindeki polimorfizm odakları son 30 yıl içerisinde araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

Tez çalışmasında; tüm beta geninin dizi analizi yapılarak, model olarak seçtiğimiz Hb D-Los Angeles mutasyonu ile ilişkili olabilecek beta geni 1. ekzonda 2. kodon nt.3 ile 2. intronda nt.16, nt.74, nt.81, nt.666 olmak üzere 5 adet framework polimorfik odağının baz türü belirlenmiştir. Beta globin gen ailesi içerisinde yer alan beta geni üzerindeki framework polimorfik odaklarının belirlenmesi ile bu odakların Hb D-Los Angeles mutasyonu ile olan olası ilişkileri istatistiksel yazılım programı (Arlequin 3.5) ile değerlendirilmiştir. Çalışmada ayrıca, Denizli yöresindeki normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylere ait beta globin gen ailesi haplotipleri ile beta geni framework analizi verilerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması yapılmıştır. Bu verilerin elde edilerek değerlendirilmesi, ilgili mutasyonların izlenmesinde antropolojik, paleoklimatolojik, arkeolojik ve filocoğrafik yaklaşımlara katkıda bulunmakta olup, ayrıca mutasyonların oluşum işlergelerinin tartışılması, bu işlergelerin modellenmesi ve bu noktadan hareketle olası gen tedavisi yaklaşımlarına da değerli katkılar sağlayabileceği öngörülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hb D-Los Angeles, Hb D-Punjab, Beta geni, Framework

ABSTRACT**BETA GLOBIN GENE STRUCTURE AND POLYMORPHISMS
IN MODEL OF Hb D-LOS ANGELES****Öztürk, Onur****PhD. Thesis in Biophysics****Supervisor: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY****june 2012, 74 pages**

Hb D-Los Angeles (also known as D-Punjab, D-North Carolina, D-Portugal, D-Chicago, D-Neath and Oak Ridge) is an abnormal hemoglobin (Hb) with an amino acid substitution of glutamine for glutamic acid at codon 121 of the beta-globin. Hb D-Los Angeles an asymptomatic abnormal type of hemoglobin in clinically. In Denizli province, the most common abnormal hemoglobin variant is Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] with a frequency of 57% of the total abnormal hemoglobins observed. In Denizli province of Turkey, carrier rate for abnormal hemoglobins and beta-thalassemias is 3.5 % according to the data obtained from Turkish Ministry of Health, Denizli Hemoglobinopathy Center. The city of Denizli is one of the 33 target cities of which Hemoglobinopathy Control Program is applied as premarital screening in Turkey. In terms of public health, abnormal hemoglobins are one of the major inherited diseases in our region.

All genes families such as beta-globin gene families, as a general regional groups of the gene that same functions. DNA sequence similarity between genes within the this gene family, leads to a discussion of their come from a common ancestral gene hypothesis. Loci of polymorphism in the beta globin gene family has drawn the attention of researchers in the last 30 years.

In this thesis study, to determine the framework, the β -globin gene region containing the five SNPs were sequenced. Micro-haplotype polymorphism of the β -globin gene designated as ‘framework’ (FW) is defined by five single nucleotide polymorphisms (SNPs) (nt.3, nt.16, nt.74, nt.81, nt.666). To examine the possible relationships between Hb D-Los Angeles mutation with these loci was used the statistical software program (Arlequin 3.5). In addition, normal and carriers of Hb D-Los Angeles mutation in Denizli province were compared statistically owned by individuals beta-globin gene cluster haplotypes with the data analysis framework. With evaluation of these data contribute to approaches anthropological, paleoclimatic, archaeological and phylogeographical. In addition, expected to provide valuable contributions discuss the mechanisms of mutations and mechanisms of modeling to the potential of gene therapy approaches.

Keywords: Hb D-Los Angeles, Hb D-Punjab, Beta gene, Framework

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İçindekiler.....	v
Şekiller Dizini.....	vii
Tablolar Dizini.....	viii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini.....	x
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI.....	3
2.1 Hemoglobinin Yapısı ve İşlevi.....	3
2.2 Hemoglobin Türleri.....	6
2.3 Anormal Hemoglobinler.....	8
2.3.1 Beta Globin Gen Ailesi; Yapı ve İşlevi.....	11
2.3.2 Haplotip Analizi ve Polimorfizm Kavramı.....	13
2.3.3 Beta Geni ve Framework Kavramı.....	15
2.3.4 Hb D-Los Angeles.....	17
2.4 Arlequin; İstatistik Tabanlı Yazılım ve İstatistiksel Kavramlar.....	19
2.4.1 Hardy-Weinberg Eşitliği.....	21
2.4.2 AMOVA; Molekülse Çeşitlilik Analizi.....	22
2.4.3 Bağlantı Dengesizliği; Linkage Disequilibrium (LD).....	25
2.4.4 Mismatch Dağılım Analizi.....	26
2.4.5 Molekülse Çeşitlilik Analizi İndeksleri.....	28
2.4.6 Tarafsızlık (Neutrality) Testleri.....	29
2.5 Modern İnsanın Tarihsel Göç Yolları ve Göç Zamanları.....	31
3. MATERYAL ve METOD.....	33
3.1 Framework Analizi.....	35
3.1.1 İlgili Odakların PCR Yöntemi ile Çoğaltılması.....	35
3.1.2 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	37
3.1.2.1 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması Yöntemi.....	37
3.1.3 DNA Dizi Analizi.....	37
3.1.4 İstatistiksel Analiz Yöntemi.....	39
4. BULGULAR.....	40
4.1 Haplotip Analizi Verilerinin İstatistiksel Olarak İncelenmesi ve Bulgular... 42	42
4.1.1 Haplotip analizi verilerinden elde edilen AMOVA bulguları.....	43
4.1.2 Haplotip analizi verilerinden elde edilen gen akışı parametresi bulguları.....	43
4.1.3 Haplotip analizi verilerinden elde edilen mismatch dağılımı bulguları.....	44
4.1.4 Haplotip analizi verilerinden elde edilen neutrality test analizi bulguları.....	44
4.1.5 Haplotip analizi verilerinden elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği bulguları.....	45
4.1.6 Haplotip analizi verilerinden elde edilen molekülse çeşitlilik analizi bulguları.....	46
4.2 Framework Analizi Verilerinin İstatistiksel Olarak İncelenmesi ve Bulgular.....	46

4.2.1 Framework analizi verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon içi framework çeşitleri bulgusu.....	46
4.2.2 Framework analizi verilerinin AMOVA bulguları.....	47
4.2.3 Framework analizi verilerinden elde edilen gen akışı parametresi bulguları.....	47
4.2.4 Framework analizi verilerinden elde edilen mismatch dağılımı bulguları.....	48
4.2.5 Framework analizi verilerinden elde edilen neutrality test analizi bulguları.....	48
4.2.6 Framework analizi verilerinden elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği bulguları.....	48
4.2.7 Framework analizi verilerinden elde edilen molekül sel çeşitlilik analizi bulguları.....	49
4.2.8 Framework analizi verilerinden elde edilen lokus çiftleri arasındaki LD bulguları.....	50
5. TARTIŞMA	52
6. SONUÇ	66
7. KAYNAKÇA.....	67
8. ÖZGEÇMİŞ.....	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1 Hemoglobin molekülü tetramerik yapısı.....	3
Şekil 2.2 Hemoglobin molekülünün T ve R formu.....	4
Şekil 2.3 İnsan globin genleri ve üretim dönemleri şeması.....	6
Şekil 2.4 Santral dogma (a.Replikasyon, b.Transkripsiyon, c.Translasyon, d.Ters Transkripsiyon).....	7
Şekil 2.5 İnsan beta globin gen ailesi, Beta geni ve Sıcak nokta.....	12
Şekil 2.6 Beta globin gen ailesi ve haplotiplemede kullanılan 7 odak, Enzim kesim bölgesi (↑).....	14
Şekil 2.7 Beta geni üzerinde framework polimorfik odaklarının ve Hb D-Los Angeles mutasyonunun yerleşimi.....	16
Şekil 2.8 Hb D-Los Angeles EcoRI enzim kesimi.....	19
Şekil 2.9 Arlequin istatistiksel yazılım programı AMOVA kontrol paneli.....	23
Şekil 2.10 Gen akışı parametresi, Nm; Jenerasyon başına göç sayısı, n; popülasyon sayısı.....	24
Şekil 2.11 Arlequin istatistiksel yazılım programı LD kontrol paneli.....	26
Şekil 2.12 Arlequin istatistiksel yazılım programı Mismatch Dağılımı kontrol paneli.....	28
Şekil 2.13 Arlequin istatistiksel yazılım programı Molekülse Çeşitlilik İndeksleri kontrol paneli.....	29
Şekil 2.14 Arlequin istatistiksel yazılım programı Tarafsızlık Testleri kontrol paneli.....	30
Şekil 2.15 Modern insanın tarihsel göç yolları ve göç zamanları haritası.....	32
Şekil 3.1 EcoRI enzim kesimi ile beta globin geni kodon 121' deki Hb D-Los Angeles (GAA→CAA) mutasyonunun saptanması.....	34
Şekil 3.2 Heterozigot Hb D-Los Angeles mutasyonunun, geri primer kullanılarak dizi analizi ile tanımlanması.....	34
Şekil 3.3 Beta geni üzerinde framework polimorfik odaklarının ve Hb D-Los Angeles mutasyonunun yerleşimi.....	35
Şekil 3.4 Beta geni üzerindeki framework polimorfik odaklarının çoğaltılması için kullanılan primer çiftleri.....	36
Şekil 3.5 Beta gen dizisinin, PAM 613 ileri primeri kullanılarak dizi analizi ile tanımlanması.....	38
Şekil 4.1 DNA dizi analizi yöntemi ile framework odaklarının belirlenmesi.....	40
Şekil 5.1 İnsan beta globin gen ailesi, beta geni, LCR bölgesi ve sıcak nokta.....	58
Şekil 5.2 Beta globin gen ailesi üzerinde haplotip analizi polimorfik odakları.....	60
Şekil 5.3 Beta geni üzerinde framework analizi polimorfik odakları ve Hb D-Los Angeles mutasyonunun yerleşimi.....	60

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 2.1 Türkiye’de saptanan anormal hemoglobin türleri.....	9
Tablo 2.2 Türkiye’de 2002’den sonra saptanan anormal hemoglobin türleri.....	10
Tablo 2.3 Denizli yöresinde saptanan anormal hemoglobinler.....	10
Tablo 2.4 Hb D-Los Angeles ve normal olgulara ait haplotip analizi sonuçları ile literatür haplotip çeşitleri.....	14
Tablo 2.5 Beta geni framework sınıflandırması.....	16
Tablo 2.6 Hb D Ailesi Çeşitliliği.....	17
Tablo 2.7 Arlequin yazılımı ile gerçekleştirilebilen popülasyon içi istatistiksel analiz yöntemleri.....	20
Tablo 2.8 Arlequin yazılımı ile gerçekleştirilebilen popülasyonlar arası istatistiksel analiz yöntemleri.....	21
Tablo 3.1 PCR karışımı.....	36
Tablo 3.2 PCR yönteminde kullanılan primerler çiftleri.....	36
Tablo 3.3 DNA dizi analizi yönteminde kullanılan primerler ve dizileri.....	38
Tablo 3.4 DNA dizi analizi reaksiyon karşımı ve uygulama biçimi.....	38
Tablo 4.1 Normal olgulara ait DNA dizi analizi ikili framework sonuçları.....	41
Tablo 4.2 Hb D-Los Angeles heterozigot olgulara ait DNA dizi analizi ikili framework sonuçları.....	42
Tablo 4.3 Haplotip sonuçları için, normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarının molekül sel varyans analizi.....	43
Tablo 4.4 Haplotip sonuçları için, normal ve Hb S Angeles popülasyonlarının molekül sel varyans analizi.....	43
Tablo 4.5 Haplotip sonuçlarından elde edilen gen akışı parametresi değerleri.....	43
Tablo 4.6 Haplotip sonuçlarından elde edilen mismatch analizi parametreleri.....	44
Tablo 4.7 Haplotip sonuçlarından elde edilen neutrality test istatistikleri parametreleri.....	44
Tablo 4.8 Normal popülasyon haplotip sonuçlarından elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği p-değeri bulguları.....	45
Tablo 4.9 Hb D-Los Angeles popülasyonu haplotip sonuçlarından elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği p-değeri bulguları.....	45
Tablo 4.10 Hb S popülasyonu haplotip sonuçlarından elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği p-değeri bulguları.....	45
Tablo 4.11 Haplotip sonuçlarından elde edilen, popülasyonlara ait molekül sel çeşitlilik parametreleri bulgusu.....	46
Tablo 4.12 İkili Framework sonuçlarından elde edilen framework çeşitleri ve sıklıkları bulgusu.....	47
Tablo 4.13 Framework sonuçları için, normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarının molekül sel varyans analizi.....	47
Tablo 4.14 Framework sonuçlarından elde edilen gen akışı parametresi değerleri..	47
Tablo 4.15 Framework sonuçlarından elde edilen mismatch analizi parametreleri..	48
Tablo 4.16 Framework sonuçlarından elde edilen neutrality test istatistikleri parametreleri.....	48
Tablo 4.17 Normal popülasyon framework sonuçlarından elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği p-değeri bulguları.....	48
Tablo 4.18 Hb D-Los Angeles popülasyonu framework sonuçlarından elde edilen	

Hardy-Weinberg eşitliği p-değeri bulguları.....	49
Tablo 4.19 Framework sonuçlarından elde edilen, popülasyonlara ait molekülse çeşitlilik parametreleri bulgusu.....	49
Tablo 4.20 Normal popülasyon framework sonuçlarından elde edilen, bağlantı dengesizliğinin ki-kare istatistiği ile belirlenmesi.....	50
Tablo 4.21 Hb D-Los Angeles popülasyonu framework sonuçlarından elde edilen bağlantı dengesizliğinin ki-kare istatistiği ile belirlenmesi.....	51
Tablo 5.1 Popülasyonlara ait framework analizi sonuçları ve literatür framework çeşitleri.....	59

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA:	Deoksiribonükleik asit
DPG:	2,3-Difosfogliserat
DTCS:	Dye Terminator Cycle Sequencing
EDTA:	Etilendiamin tetraasetikasit
FW:	Framework
Hb:	Hemoglobin
IVS:	Intervening Sequence
mt DNA:	Mitokondriyal DNA
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RFLP:	Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
SNP:	Tek nükleotid polimorfizmi

1.GİRİŞ

Anormal hemoglobin kavramı, 1959 yılında M.F. Perutz ve arkadaşlarının (Perutz vd 1968) hemoglobin yapısını tarif etmesinden sonra birçok araştırmacının çalışma konusu olmuştur. Globin genlerinin okunan bölgelerindeki (ekson dizileri) mutasyonlar nedeni ile ortaya çıkan aminoasit değişiklikleri anormal hemoglobinleri oluşturmaktadır. Anormal hemoglobine yol açan globin gen yapısındaki değişiklikler proteinin yapı ve işlevine yansımaktadır (Schrier 1994). Bunun sonucu olarak, kalıtsal klinik sorunlara sebep olan anormal hemoglobinler olduğu gibi, herhangi bir klinik belirti göstermeyen ve kalıtım yolu ile aktarılabilen anormal hemoglobinler de ortaya çıkmaktadır (Weatherall 2001, Ho 1999). Hemoglobin molekülü ile yapılan çalışmalarla birlikte, farklı coğrafyalarda, farklı mutasyonlara sahip çok sayıda anormal hemoglobinin varlığı bilinmektedir (Globin Gene Server 2012). Alfa ve beta globin gen odaklarındaki bölgeye özgü mutasyonların tek odaklı filojenez analizleri göç yollarını aydınlatmada oldukça kullanışlı olmuştur (Oppenheimer 2012). Bu anormal hemoglobinlerden Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln], klinik olarak belirti vermeyen ve yöremizde gözlenen hemoglobin mutasyonları içerisinde, en yüksek bulunma yüzdesine sahiptir (Atalay 2005). Bu ve benzeri anormal hemoglobinlerin oluşum işlemlerinin anlaşılmasına yönelik, beta globin gen ailesinin içindeki polimorfik odaklar son 20 yıl içerisinde araştırmacıların ilgisini çekmektedir (Curat vd 2002). Beta globin gen ailesi içindeki genler yapı, işlev ve organizasyonları ile gen duplikasyonu ve molekülse evrim araştırmalarına büyük destek sağlayabilmektedir (Borg 2009). “Denizli yöresinde gözlenen Hb D-Los Angeles mutasyonunun haplotip analizi” yüksek lisans tez çalışmasında bu anormal hemoglobinin beta globin gen ailesi üzerindeki polimorfik odaklar sınanarak, gensel kökeni ile ilişkili haplotip türü Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - + +] olarak belirlenmiştir. Her ne kadar haplotip I ağırlıklı bir gensel yapı gözlenmiş olsa da, Denizli yöresinde Tayland Tipi (- + + - + +) haplotip de gözlenmektedir. Bunların yanı sıra Denizli yöresinde gözlenen ve literatürde ilk kez bildirilen üç farklı (- + - - + + +, - + + - + + +, - - + - + + +) haplotip de bulunmaktadır (YL Tezi Öztürk 2007, Öztürk vd 2007, Atalay vd 2007). Denizli yöresinde gözlenen bu haplotip türleri ile mutasyonların çok odaklı kökene sahip olduğu ve yerel popülasyon üzerinde çeşitliliğe neden olabileceği sonucuna varılabilmektedir. Hb D-Los Angeles mutasyonunun beta globin geni 121. kodonda yer alması, 3' haplotiplerin değişimine

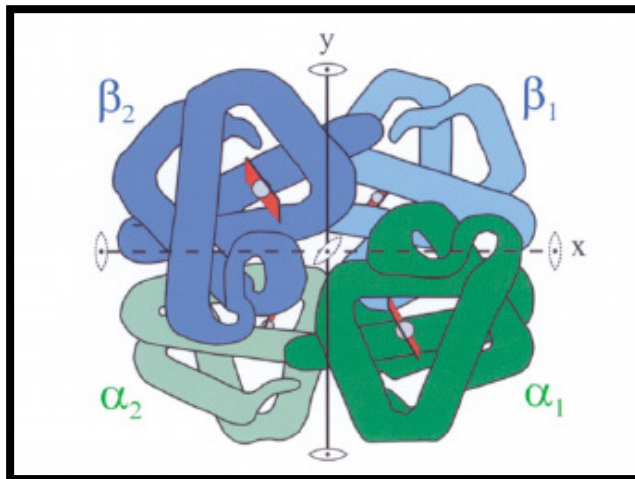
neden olan nokta mutasyonlar veya gen dönüşüm işlemleri ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir (Atalay vd 2007, Öztürk vd 2007). Literatürde, klinik olarak belirti vermeyen mutasyonlarla ilgili olarak polimorfizmlerin tanımlanması ve veri bankalarının kurulmasına yönelik çalışmaların önemi vurgulanmaktadır (Giardine vd 2011). Mutasyon ve ilgili polimorfik odaklar arasındaki ilişki, mutasyonun oluşum sürecine ışık tutması açısından önem taşımaktadır.

Bu bakış açısı altında çalışmamızda; tüm beta geninin dizi analizi yapılarak, model olarak seçtiğimiz Hb D-Los Angeles mutasyonu ile ilişkili olabilecek framework polimorfik odakları belirlenmiştir. Beta globin gen ailesi içerisinde yer alan beta geni üzerindeki framework polimorfik odaklarının belirlenmesi ile, bu odakların Hb D-Los Angeles mutasyonu ile olan olası ilişkilerinin istatistiksel yazılım programı (Excoffier vd 2006, Arlequin 3.5) ile değerlendirilmesi amaçlanmaktadır (Excoffier vd 1,2 2006). Bu verilerin elde edilerek değerlendirilmesi, ilgili mutasyonların izlenmesinde antropolojik, paleoklimatolojik, arkeolojik ve filocoğrafik yaklaşımlara katkıda bulunmakta olup, ayrıca mutasyonların oluşum mekanizmalarının tartışılması, bu mekanizmaların modellenmesi ve bu noktadan hareketle olası gen tedavisi yaklaşımlarına da değerli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir (Oppenheimer 2012).

2. KURAMSAL BİLGİLER ve LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Hemoglobin Yapısı ve İşlevi

Hemoglobin, hem grupları içeren, zayıf kovalent olmayan bağlar ile birbirine bağlı dört globin zincirinden oluşmuş dördüncül (tetramerik) yapıya sahip bir moleküldür (Şekil 2.1). Globin zincirleri türlerine göre, iki özdeş alfa (α veya ζ) ve beta (ϵ , γ , δ veya β) globinler olarak adlandırılır. Bu alt ünitelerin üç boyutlu yapılanması non-kovalent bağlar, hidrojen bağları, tuz köprüleri ve non-polar etkiler ile sağlanmaktadır. Polipeptit yapıyı oluşturan polar aminoasit yan grupları dış yüzeyde, non-polar yan gruplar ise iç yüzeyde yer almaktadır. Bu oluşum üçüncül yapıyı belirlemektedir (Perutz 1970, Antonini 1970).

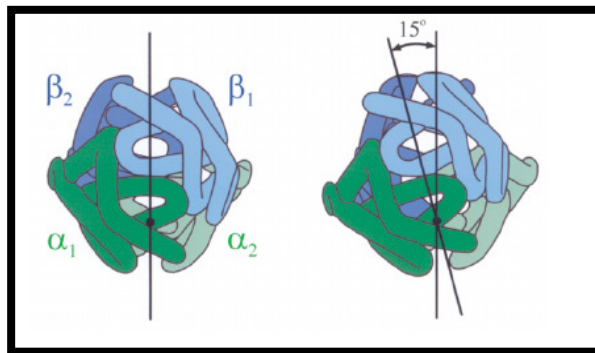


Şekil 2.1 Hemoglobin molekülü tetramerik yapısı (Henry 2002)

Hb molekülünün globin kısmındaki polipeptit zincirlerinin sentezi için önce, hücre çekirdeğinde globin genlerinin transkripsiyonu sonucu öncü m-RNA (pre-mRNA) sentezlenmektedir. Pre-mRNA'daki intron bölgeleri kesilerek çıkarılmakta ve geri kalan ekzonlar sıralı olarak birleştirilmektedir. Bu şekilde oluşan mRNA poliribozomlara giderek taşıdığı genetik bilgiye göre globin zincirlerinin sentezlenmesini sağlamaktadır. Sentezlenen 4 hem grubu ile 4 polipeptid zinciri birleşerek hemoglobin molekülünü oluşturmaktadır (Huisman 1993, Huisman 1995). Temel olarak hemoglobinin, oksijenin akciğerden dokulara, karbondioksit ve protonların dokulardan akciğere taşınması olmak üzere iki işlevi bulunmaktadır. Bunun yanında hemoglobinin, kanın ve dolaylı olarak diğer vücut sıvılarının pH değerini sabit tutma özelliği de vardır.

Hemoglobinin bu özelliği deoksihemoglobinin protonlara olan ilgisinden kaynaklanmaktadır. Bu bakımdan, hemoglobin molekülü hem kandaki yüksek derişimleri hem de içeriğinde yer alan aminoasitlerin fizyolojik pH' ye yakın olan pK' ları sayesinde güçlü bir tampon sistemi oluşturmaktadır. Bu özellikleri ile hemoglobin molekülü, eritrositler içerisinde işlev görmektedir (Perutz 1978, Bermek 1997, Wada 2002, Çelebi 2005). Hb molekülünün ortalama ömrü 120 gündür. Bu süre sonunda, molekülün yıkımı karaciğer, kemik iliği ve dalakta eritrositlerin parçalanmasıyla başlamaktadır. Açığa çıkan Hb molekülünde önce hem ve globin kısmı birbirinden ayrılır. Hem grubu, demir ve porfirin kısmına ayrılır. Demir tekrar kullanılmak üzere depolanırken porfirin, oksidasyona uğrayarak biliverdine, biliverdin ise bilirubine dönüşür. Polipeptit zincirleri ise parçalanarak amino asitlerine ayrılır ve bu amino asitler depolanır (Lukens vd 1993, Dönbak 2005).

İnsan saf oksijen soluduğunda dahi, kanda oksijenin kısmi basıncı 101,3 kPa (760 mmHg) olacağından, 100 cm³ kan içinde, fiziksel olarak 2,3 cm³ oksijen çözünebilir. Oysaki insanın dinlenme halinde bile oksijen gereksinimi bu değerden çok daha yüksektir (5 cm³ oksijen/100 cm³ kan). Kandaki ortalama derişimi 15 gr/100 ml olan hemoglobin moleülleri, fiziksel olarak kanda çözünebilir oksijen miktarının 65 kat fazlasını kimyasal yoldan bağlayabilmekte ve oksijen taşınımında temel bir rol oynamaktadır. Bu yol ile kandaki oksijenin % 97' si hemoglobine bağlı olarak taşınır (Hardison 1998, Pehlivan 2011). Hemoglobin, içinde bulunduğu ortamdaki derişim değişimlerine göre, yapısal olarak, oksijene ilgisi düşük olan T (*tense-gergin*) veya yüksek olan R (*relaxed-gevşek*) formlarını alabilir. T formundan farklı olarak R formunda tuz köprüleri bulunmamaktadır (Şekil 2.2). Ayrıca oksijen bağlama eğilimleri arasında 3,5 kcal/mol enerji farkı vardır (Bettati vd 1998).

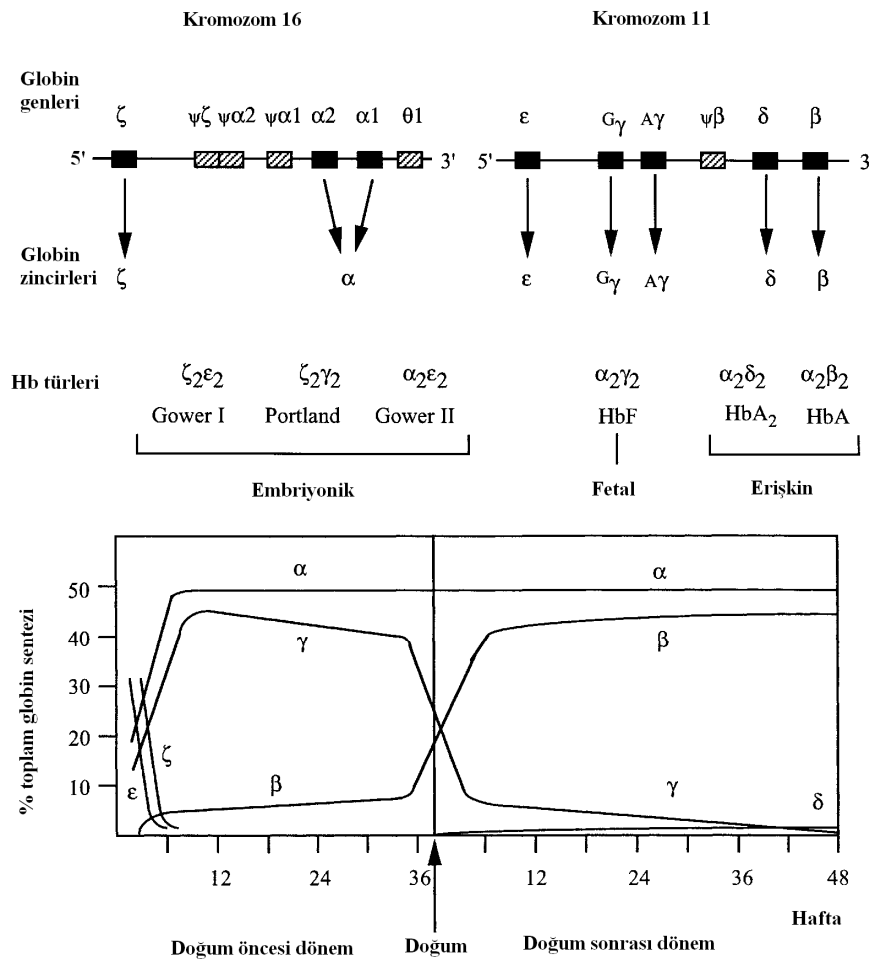


Şekil 2.2 Hemoglobin molekülünün T ve R formu (Henry 2002)

Hemoglobin yapısı ve işlevi termodinamik açıdan ele alındığında, yapısal modeli ve işlevi ile termodinamik kanunları arasında tamamen bir bütünlük olduğu görülmüştür. Hemoglobinin farklı fizyolojik koşullarda gösterdiği değişik yapısal ve işlevsel özellikler, allosterik etkileşimlerin termodinamik açıdan incelenbilmesini sağlamıştır. Hemoglobinin oksijen ile ilişkisi sıcaklık, 2,3- difosfogliserat (DPG) ve İnositol heksakis fosfat (IHP) değişkenlerine bağlı olarak Gibbs serbest enerjisi (ΔG), entalpi (ΔH) ve entropi (ΔS) gibi termodinamik nicelikler açısından incelenmiştir. DPG hemoglobinin oksijene olan ilgisini azaltır. Hemoglobine oksijen ve DPG bağlanması arasında ters bir ilişki vardır. DPG, hemoglobinin α ve β zincirleri arasındaki bir boşluğa bağlanır. Hemoglobin T durumunda iken, zincirler arasında bir DPG molekülünün girebileceği kadar boşluk oluşur ve DPG bu bölgeye bağlanarak T formunu kararlı hale getirip, hemoglobinin oksijene ilgisini azaltmaktadır. R durumuna geçiş ise DPG' nin bağlandığı cebi daraltır ve bu nedenle DPG yapıdan ayrılır. DPG ve IHP derişiminin artması hemoglobinin T yapıya geçmesi ve oksijene eğiliminin azalması anlamına gelmektedir. Yapılan bir çalışmada deneysel olarak sıcaklık arttığında Gibbs serbest enerjisinin daha negatif değerlere değiştiği gözlenmiştir. Bu değişim, hemoglobin molekülüne DPG veya IHP bağlandığı ve bunun sonucunda da Gibbs serbest enerjisinin azalarak sistem tarafından iş yapıldığını göstermektedir. Kuramsal olarak da biyolojik bir sistemin yapabileceği iş miktarı, en fazla serbest enerjisindeki azalma kadardır. Yapılan bu çalışmada, hemoglobin ile oksijen arasındaki ilişkiden yararlanılarak, hemoglobinin yapı ve işlevi termodinamik yasaları ile tanımlanmaktadır (Bordbar vd 2006, Pehlivan 2011, Çelebi 2011).

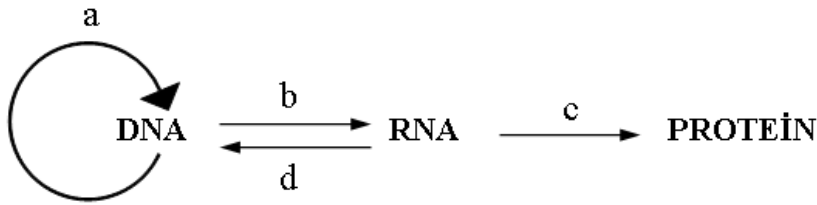
2.2 Hemoglobin Türleri

Hemoglobin, yaşamın embriyonik, fetal ve erişkin dönemlerinde yapısal farklılıklar göstermektedir. Tüm normal hemoglobinler, iki alfa (α) ve iki beta (β) globin zincirlerinin katkılarıyla dördüncül yapıdan işlev yapmaktadırlar. Erişkin ve fetal hemoglobinler alfa globin zincirine ek olarak, beta (Hb A , $\alpha_2\beta_2$), delta (Hb A_2 , $\alpha_2\delta_2$) veya gama globin zinciri (Hb F , $\alpha_2\gamma_2$) ile yapılanmaktadır. Embriyonik hemoglobinler ise, alfa globin benzeri zincirler (ζ , zeta zincirleri) ile gama (Hb Portland , $\zeta_2\gamma_2$) veya epsilon globin zincirlerinin (Hb Gower 1 , $\zeta_2\varepsilon_2$), (Hb Gower 2 , $\alpha_2\varepsilon_2$) dördüncül yapıyı oluşturması sonucu meydana gelmektedir (Ho 2000). Alfa globin gen ailesi kromozom 16, beta globin gen ailesi ise kromozom 11'de yer almaktadır (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 İnsan globin genleri ve üretim dönemleri şeması (Ho 1999)

Hemoglobin sentezinde, ilgili genlerin kontrolü moleksel açıdan bu gen ailelerinin yapısında bulunan düzenleyici bölgeler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte DNA'daki kodlar, RNA aracılığı ile bir protein olan hemoglobine dönüşmektedir. Alfa ve beta globinleri kodlayan gen bölgelerinin nükleotid dizisi temel alınarak, hemoglobinin dördüncül yapısını oluşturan bileşenler olan globinler üretilmektedir. Gen düzeyindeki bilginin akışı; replikasyon, transkripsiyon, translasyon evreleri ile açıklanmaktadır (şekil 2.4). DNA bilgisinde yer alan farklılıklarda, DNA'daki bilginin RNA'ya aktarılması (transkripsiyon) ve RNA'daki bilginin proteine dönüştürülmesi (translasyon) aşamalarında oluşan hatalarda, protein anormallikleri gözlenmektedir.



şekil 2.4 Santral dogma (a.Replikasyon, b.Transkripsiyon, c.Translasyon, d.Ters Transkripsiyon)

2.3 Anormal Hemoglobinler

Yapısal hemoglobin bozuklukları çoğunlukla, alfa veya beta globin zincirlerindeki tek amino asit değişimlerinden kaynaklanmaktadır. Bazı mutasyonlar ise tek ya da daha fazla nükleotid eklenmesi (*insertion*), çıkması (*deletion*) veya globin genlerinin yeniden düzenlenmesi ile olmaktadır. Alfa globin zinciri 141, beta globin zinciri 146 amino asit içermektedir. Globin genlerinin yapısında bulunan ekzonlardaki DNA dizilerinde oluşan mutasyonlar, amino asit kodlarını değiştirmektedir. Bunun sonucu olarak, kalıtsal klinik sorunlara sebep olan anormal hemoglobinler olduğu gibi, herhangi bir klinik belirti göstermeyen ve kalıtım yolu ile aktarılabilen anormal hemoglobinler de ortaya çıkmaktadır (Ho 1999, Weatherall vd 2001).

Hemoglobin çeşitleri veri tabanı olan ‘‘Globin Gene Server’’ 2012 yılı nisan ayı verilerine göre dünya çapında 1149 farklı anormal hemoglobin bildirilmiştir. Anormal hemoglobinler, mutasyonların $\alpha 2$, $\alpha 1$, β , G_γ , A_γ gibi farklı globin genlerinde olmalarına bağlı olarak çeşitli gruplarda sınıflandırılmaktadır. Buna göre bildirilen anormal hemoglobin çeşitliliğinin yaklaşık % 82’ si tek baz değişimlerinden, % 18’ i ise aynı globin zincirindeki iki farklı bazın değişiminden, bir veya daha fazla nükleotid eklenmesi (*insertion*) veya çıkmasından (*deletion*), N- veya C- terminal uzamasından ve hibrid globin zincirlerinden kaynaklanmaktadır (Globin Gene Server 2012). Amino asit değişiminden kaynaklanan bu anormal hemoglobin çeşitliliğinin büyük kısmı, hemoglobin molekülünde yapısal ve fonksiyonel olarak çok az değişime sebep olan yada hiçbir değişime sebep olmayan heterozigot formda ve klinik olarak belirti vermeyen yapıdadır. Bu çeşitliliğin büyük bölümü popülasyon genetiği çalışmalarında ve hemoglobinopati tarama programlarında tespit edilmektedir. Türkiye geneli göz önüne alınarak yapılan çalışmada ise, 42 adet anormal hemoglobin türünün varlığı gösterilmiştir (Altay 2002). Bu anormal hemoglobinlerden 13 tanesi α globin zincirinde, 24 tanesi β globin zincirinde, biri de δ globin zincirinde yer almaktadır (bkz. Tablo 2.1). 2007 yılında yapılan çalışmada ise Türkiye genelinde anormal hemoglobin türünün 88 olduğu bildirilmiştir (bkz. Tablo 2.2) (Akar 2007). Evlilik öncesi tarama programının uygulandığı Denizli yöresinde, T.C Sağlık Bakanlığı Denizli Hemoglobinopati Merkezi verilerine göre, anormal hemoglobinler ve β -talasemi taşıyıcılığı oranı % 3.5 olarak saptanmıştır. Ayrıca, Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobinlerin çeşitliliği ve bulunma oranları ile ilgili çalışma yapılmış olup, sonuçları yayınlanmıştır (bkz. Tablo 2.3). Bu sonuçlara göre, Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobin dağılımına

bakıldığında % 57.8 ile Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] birinci sırada yer almaktadır (Atalay 2005). Denizli yöresinde bildirilen anormal hemoglobin türleri; Hb-D Los Angeles, Hb-C, Hb-E Saskatoon, Hb-G Coughatta, Hb-Beograd, Hb-Yaizu, Hb-J-İran, Hb-D-Ouled Rabah ve Hb-Tunis olarak sıralanmaktadır (Köseler vd 2006, Atalay vd 2008, Köseler vd 2008, Köseler vd 2010). Bunlardan Hb-D-Ouled Rabah, Hb-Yaizu ve Hb-Tunis dünyada ikinci kez ülkemizde de ilk kez bildirilen anormal hemoglobin özelliği taşımaktadır (Köseler vd 2010).

Tablo 2.1 Türkiye’de saptanan anormal hemoglobin türleri (Altay 2002)

Anormal Hemoglobin	Mutasyon
α - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb O-Padova	α 30(B11) Glu ---> Lys (GAA--->AAG)
Hb Hasharon	α 47(CE5) Asp---> His (GAC--->CAC)
Hb Montgomery	α 48(CE6) Leu ---> Arg (CTG--->CGG)
Hb Adana	α 59(E8) Gly ---> Asp (GGC--->GAC)
Hb J-Anatolia	α 61(E10) Lys--->Thr (AAG--->ACG)
Hb Ube- 2	α 68(E17) Asn--->Asp (AAC--->GAC)
Hb Q-İran	α 75 (EF4)Asp--->His (GAC--->CAC)
Hb Moabit	α 86(F7) Leu--->Arg (CTG--->CGG)
Hb M-Iwate	α 87(F8) His--->Tyr (CAC--->TAC)
Hb Çapa	α 94(G1) Asp--->Gly (GAC--->GGC)
Hb G-Georgia	α 95(G2) Pro--->Leu (CCG--->CTG)
Hb Strumica	α 112(G19) His--->Arg (CAC--->CGC)
Hb J-Meerut	α 120(H3) Ala--->Glu (GCG--->GAG)
β - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb S	β 6 (A3) Glu --->Val (GAG--->GTG)
Hb C	β 6 (A3) Glu --->Lys (GAG--->AAG)
Hb Ankara	β 10 (A7) Ala --->Asp (GCC--->GAC)
Hb E- Saskatoon	B22 (B4) Glu --->Lys (GAA--->AAA)
Hb G- Coughatta	B22(B4) Glu --->Ala (GAA--->GCA)
Hb D-İran	B22 (B4) Glu --->Gln (GAA--->CAA)
Hb E	B26 (B8) Glu --->Lys(GAG--->AAG)
Hb Knossos	B27 (B9) Ala--->Ser (GCC--->TCC)
Hb Hakkâri	B31 (B13) Leu--->Arg (CTG--->CGG)
Hb G-Copenhagen	B47 (CD6) Asp--->Asn (GAT--->AAT)
Hb Summer Hill	B52 (D3) Asp--->His (GAT--->CAT)
Hb Hamadan	B56 (D7) Gly--->Arg (GGC--->CGC)
Hb J-Antakya	B65 (E9) Lys--->Met (AAG--->ATG)
Hb City of Hope	B69 (E13) Gly--->Ser (GGT--->AGT)
Hb J-İran	B77 (EF1) His--->Asp (CAC--->GAC)
Hb G-Szuhu	B80(EF4)Asn--->Lys (AAC--->AAAveya AAG)
Hb İstanbul Saint Etienne	B92 (F8) His--->Gln (CAC--->CAA veya CAG)
Hb N-Baltimore	B95 (FG2) Lys--->Glu (AAG--->GAG)
Hb Köln	B98 (FG5) Val--->Met (GTG--->ATG)
Hb D-Los Angeles	B121 (GH4) Glu--->Gln (GAA--->CAA)
Hb O-Arab	B121 (GH4) Glu--->Lys (GAA--->AAA)
HbBeograd	B121 (GH4) Glu--->Val (GAA--->GTA)
Hb Sarrebourg	B131 (H9) Gln--->Arg (CAG--->CGG)
Hb Brockton	B138 (H16) Ala--->Pro (GCT--->CCT)
γ - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb F-Başkent	γ 128 (H6) Ala--->Thr (GCT--->ACT)

Tablo 2.2 Türkiye’de 2002’den sonra saptanan anormal hemoglobin türleri (Akar 2007)

Anormal Hemoglobin	Mutasyon
α - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb Selif	α 94(G1) Asp ---> Tyr
Hb Q-İran	α 75(EF4) Asp ---> His
Hb Hasharon	α 47(CE5) Asp ---> His
Hb Bronovo	A103(E8) His ---> Leu
β - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb C	B6 (A3) Glu --->Lys
Hb E- Saskatoon	B22 (B4) Glu --->Lys
Hb G- Coughatta	B22(B4) Glu --->Ala
Hb D-İran	B22 (B4) Glu --->Gln
Hb Hamadan	B56 (D7) Gly--->Arg
Hb Volga	B27 (B9) Ala --->Asp
Hb Beograd	B121 (GH4) Glu--->Val
Hb Siirt	B27 (B9) Ala --->Gly
Hb D Punjab	B52 (D3) Asp--->His
Hb J-İran	B77 (EF1) His--->Asp
Hb Tyne	B65 (E9) Lys--->Met
Hb G-Copenhagen	B69 (E13) Gly--->Ser
Hb D-İran	B22(B4) Glu --->Gln
γ - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb A2 Yialousa	γ 82 C-T Ala 28 Ser

Tablo 2.3 Denizli yöresinde saptanan anormal hemoglobinler

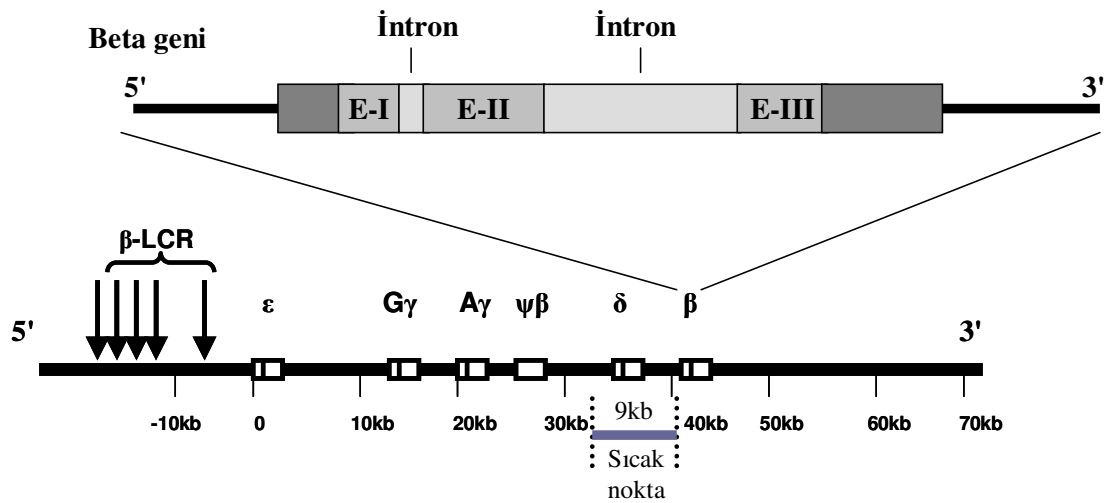
Anormal Hemoglobin	Mutasyon	Bulunma yüzdesi (%)	Kaynak
Hb D- Los Angeles	β 121(GH4)Glu \rightarrow Gln	57,8	Atalay 2005
Hb S	β 6(A3)Glu \rightarrow Val	21,9	Atalay 2005
Hb G-Coughatta	β 22(B4)Glu \rightarrow Ala	15,6	Atalay 2005
Hb E- Saskatoon	β 22(B4)Glu \rightarrow Lys	3,1	Atalay 2005
Hb C	β 6(A3)Glu \rightarrow Lys	1,6	Atalay 2005
Hb J-İran	β 77(EF1) His \rightarrow Asp	-	Köseler 2006
Hb Beograd	β 121(GH4) Glu \rightarrow Val	-	Atalay 2008
Hb Yaizu	β 79(EF3)Asp \rightarrow Asn	-	Atalay 2007
Hb D Ouled Rabah	β 19(B1)Asn \rightarrow Lys	-	Köseler 2008
Hb Tunis	β 124(H2)Pro \rightarrow Ser	-	Köseler 2010
Hb Hinsdale	β 139(H17)Asn \rightarrow Lys	-	Köseler 2010

2.3.1 Beta Globin Gen Ailesi; Yapı ve İşlevi

Alfa ve beta globin gen aileleri içinde bulunan genler hemoglobin sentezi için amino asitleri kodlamakla görevlidir. Alfa globin gen ailesi (5'- ζ - α 2- α 1-3') kromozom 16'nın kısa kolunda bulunurken, beta globin gen ailesi (5'- ϵ - G_γ - A_γ - $\psi\eta$ - δ - β -3') kromozom 11'in kısa kolunda yaklaşık 60 kb'lık bir alanda yer almaktadır. Daha önce belirtildiği gibi, her iki gen ailesinde yer alan genler, insanın gelişim evrelerine bağlı olarak ifade edilir. Her iki beta globin gen ailesinden zeta (ζ) ve epsilon (ϵ) embriyonik dönemde, gama (G_γ , A_γ) genleri fetal dönemde, delta (δ) ve beta (β) genleri ise erişkin dönemde ifade edilmektedir. Ayrıca beta globin gen ailesi içinde herhangi bir amino asit kodlamayan dolayısı ile protein ürünü oluşturamayan psödo ($\psi\eta$) geni yer almaktadır (Chen vd 1990, Ho 2000). Beta globin geninin 5' ucunda, yaklaşık olarak 16 kb uzunluğunda beta geni kontrol bölgesi (β LCR) yer almaktadır (Levings 2002) (bkz. Şekil 2.5). Beta geni kontrol bölgesi, protein sentezi aşamasında beta globin genlerinin ifade edilmesinde düzenleyici rol oynamaktadır (Hardison 1998, Ho 2000, Athanassiadou 2004). Tüm beta globin genlerinde ortak olarak 3 ekzon ve 2 intron bulunmaktadır (Şekil 2.5). Ekzonlarda yer alan DNA dizileri ilgili proteini kodlamaktadır. Yine, her genin 5' ucu tarafında yaklaşık 50 nükleotid uzunluğunda bir cap bölgesi ve protein sentezini başlatan kodon (AUG) yer almaktadır. Ekzon III'ün sonunda ise dur kodonunu takip eden ve Poli A kuyruğuna kadar uzanan DNA dizisi bulunmaktadır. Bu dizi transkripsiyonun bitiş sinyalini içermektedir. Poli A kuyruğu (AAT AAA) ise mRNA'nın kararlılığını ve ribozomlara bağlanmasını sağlamaktadır.

Beta globin gen ailesi gibi tüm gen aileleri, ürünleri aynı genel işlevi gören bölgesel gen gruplarıdır. Gen ailesi içinde yer alan genler arasındaki DNA dizi benzerliği, bunların ortak atasal genden geldikleri hipotezinin doğmasına sebep olmuştur. Bu işlevlerin keşfedilmesine yönelik, beta globin gen ailesinin içindeki polimorfizm odakları son 30 yıl içerisinde araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Curat vd 2002). Gen ve protein düzeyinde yapılan çalışmalar sonucu, gen çeşitlenmesi, mutasyon işlevleri ve molekül evrim süreci ile ilgili yeni yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. Gen çeşitliliğinin oluşmasında gen duplikasyonu en önemli işlevlerden biridir. Gen duplikasyonundan sonra oluşan gen kopyalarında, işlevini kaybettikleri, yeni işlevler kazandıkları ya da işlevlerini kısmen yerine getirebildikleri mutasyonlar gerçekleşebilir (Aguileta vd 2004). Gen duplikasyonları genellikle yeniden düzenlenmiş yapılanma (*recombination*) olayından sonra gerçekleşir (Papadakis 1999). DNA dizi homolojisi içeren iki

kromozom boyunca, eşdeğer pozisyonlardaki genetik bilgi değiş tokuşuna yeniden düzenlenmiş yapılanma adı verilmektedir. Gen dönüşümü (*gene conversion*), DNA'nın yeniden düzenlenmiş yapılanması sonucu ortaya çıkar. Gen dönüşümü iki yakın ve bağlantılı gen arasında, karşılıklı olmayan (*non-reciprocal*) gensel değiş tokuş olarak tanımlanmaktadır. Bu bakış açısı altında, beta globin gen ailesi üzerinde yeniden düzenlenmiş yapılanma ve gen dönüşümünü konu alan çalışmalarda, 3' ucuna yakın, delta (δ) ve beta (β) genlerini içinde bulunduran yaklaşık 9 kb uzunluğundaki bölgede önemli oranda yeniden yapılanma saptanmıştır (Currat vd 2002) (Şekil 2.5). Sıcak nokta (*hot spot*) olarak adlandırılan bu bölgede genler arası uzaklık az olduğu için yeniden yapılanma oranı yüksek olduğu gösterilmiştir (Schneider vd 2002, Currat vd 2002, Falchi vd 2005). Beta globin gen ailesi içindeki genler yapı, işlev ve organizasyonları ile gen duplikasyonu ve moleküler evrim araştırmalarına büyük destek sağlayabilmektedir. Beta globin gen ailesi, araştırmacılar tarafından gensel köken incelemelerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir (Oppenheimer 2012).



Şekil 2.5 İnsan beta globin gen ailesi, Beta geni ve Sıcak nokta (Ho 2000, Currat vd 2002).

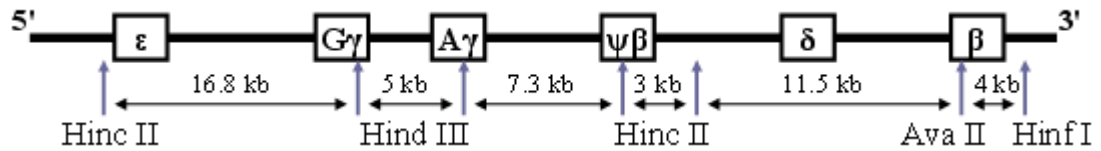
2.3.2 Haplotip Analizi ve Polimorfizm Kavramı

Haplotip analizi, polimorfizm gösterebilen odakların PCR yöntemi ile çoğaltılıp, RFLP yönteminin uygulanması ve elde edilen sonuçların mutasyon taşıyan allel ile olan olası ilişkilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi işlemi olarak ifade edilmektedir. Polimorfizm, normal bireylerde %2' den daha sık gözlenen ve genomik DNA' nın tek baz çiftlik pozisyonunda farklı dizi (allel) alternatiflerinin bulunması olarak ifade edilmektedir. DNA polimorfizmleri teriminden, toplumda yaygın olarak rastlanan ve genellikle hastalık etkeni olmayan nükleotid değişiklikleri anlaşılır. Bu polimorfik özellikler farklı görünümde karşımıza çıkabilmektedir. Kısa ve uzun nükleotid tekrarları (STRP ve VNTR polimorfizmleri) ya da tek baz değişimleri (SNP) bunlara örnek olarak verilebilir. Bu polimorfizmleri tespit etme yöntemleri birbirinden farklı olmakla birlikte gerek STRP gerekse SNP değişikliklerinin çalışılmasındaki ana amaç bireyin biri anneden diğeri ise babadan kalıtılmış olduğu alleller arasındaki farklılıkların belirlenebilmesidir. Bu durum *genotipleme* olarak adlandırılır ve genotipleme sonucunda hangi allelin hangi ebeveynden kalıtıldığı saptanabilir. Birbirine çok yakın yerleşimli birden fazla polimorfik bölgenin genotiplenmesi (*haplotip oluşturma*) ise tek bir allelin değil, ilgili kromozomun belli bir parçasının hangi ebeveynden geldiğini saptamamızı sağlamaktadır. Genotip ve haplotip düzeyinde oluşan farklılıklar kromozomların kuşaklar arası kalıtımının izlenmesi için kullanılır ve bu yöntem gensel köken araştırmaları için oldukça değerlidir. Mutasyon odağını içeren gen bölgesi yakınlarında bulunan polimorfik odaklar mutasyonun geçmişe dönük incelenmesinde oldukça yararlı veriler sunmaktadır (Akarsu 2006, Xing vd 2010).

Söz konusu polimorfizmleri belirleyebilmek için restriksiyon endonükleazlar ve DNA dizi analizi yöntemi kullanılmaktadır. Restriksiyon endonükleazlar, kendilerine özgü nükleotid dizilerini tanıyarak kesebilmektedir. RFLP, DNA dizisi üzerinde yer alan tanımlanmış enzim kesim bölgelerinin, bu bölgelere özgü restriksiyon enzimleri yardımı ile izlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemde göre, DNA dizisinde, restriksiyon enzimine özgü enzim kesim bölgelerinin bulunması artı (+), bulunmaması eksi (-) işaretleri ile temsil edilir. Bu polimorfik odaklar yeniden düzenlenmiş yapılanma (*recombination*), duplikasyon ve gen dönüşümü (*gene conversion*) işlemlerinin ürünü olduklarından, haplotip çalışmaları ile elde edilen sonuçlar, gensel köken araştırmalarında oldukça değerli veriler olarak kabul edilmektedir. Bu verilerin değerlendirilmesi ve anlamlı hale getirilmesi, aile çalışmaları ve istatistik tabanlı

yazılımlar ile mümkün olmaktadır. Arlequin (ver 3.5) yazılımı, bu amaca yönelik olarak geliştirilmiştir ve popülasyon genetiği verilerinin işlenmesinde kullanılmaktadır (Excoffier, Laval ve Schneider 2006).

2007 yılında gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasında Denizli yöresinde Hb D-Los Angeles mutasyonu ile ilişkili haplotipin belirlenmesi amacı ile bu yazılımdan yararlanılmıştır. Bu tez çalışmasında, Denizli yöresinde Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] mutasyonu taşıyan ve normal bireylere ait, beta-globin gen ailesi içerisindeki ϵ -globin, $G\gamma/A\gamma$ -globin, $\psi\beta$ -globin, δ -globin ve β -globin genleri üzerinde bulunan toplam yedi enzim kesim bölgesi için beş adet restriksiyon enzimi kullanılarak haplotip analizi sonuçları elde edilmiştir (Şekil 2.6, Tablo 2.4) (YL Tezi Öztürk vd 2007, Öztürk vd 2007, Atalay vd 2007).



Şekil 2.6 Beta globin gen ailesi ve haplotiplemede kullanılan 7 odak. Enzim kesim bölgesi (↑) (Chen 1990, Currat vd 2002).

Tablo 2.4 Hb D-Los Angeles ve normal olgulara ait haplotip analizi sonuçları ile literatür haplotip çeşitleri (Öztürk vd 2007, Atalay vd 2007)

Hb D-Los Angeles mutasyonlu olgular			Normal olgular		
No:	Hap lo tip	%	No:	Hap lo tip	%
1	+ - - - - + +	34.6	1	+ - - - - + +	26.6
2	- + + - + + +	29.8	2	- + - + + + +	14.6
3	+ - - - - - +	12.5	3	+ - - - - + -	12.5
4	+ - - - - + -	6.5	4	- + + - + + +	6.2

Hap lo tip Çeşitleri							
Hap lo tip	5'- ϵ Hinc II	$G\gamma$ Hind III	$A\gamma$ Hind III	5'- $\psi\beta$ Hinc II	3'- $\psi\beta$ Hinc II	5'- β Ava II	3'- β Hinf I
I	+	-	-	-	-	+	+
II	-	+	+	-	+	+	+
III	-	+	-	+	+	+	-
V	+	-	-	-	-	+	-
VII	+	-	-	-	-	-	+
VIII	-	+	-	+	-	+	-
IX	-	+	-	+	+	+	+

Bu sonuçlara göre Denizli yöresindeki Hb D-Los Angeles olguları ve normal bireylere ait haplotip sıklıklarının sırası ile % 34,6 ve % 26,6 oranlarına sahip biçimde Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - - + +] ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bununla beraber, Tablo 2.4’ de ikinci sırada % 29,8 sıklıkla yer alan [- + + - + + +] Tayland tipi haplotip ve üçüncü sırada % 12,5 sıklıkla [+ - - - - +] Haplotip VII olmak üzere Denizli yöresinin Hb D-Los Angeles mutasyonu ile ilişkili haplotip türleri tanımlanmıştır. Dünyada anormal hemoglobinlerin kökeni ve haplotip çeşitliliği ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu anormal hemoglobinlerin Asya ve Afrika gibi bir merkezden, göç yolları ile ilişkilendirilerek yayıldığı varsayımı üzerinde durulmaktadır. Ancak yöremizdeki Hb D-Los Angeles ve haplotip çeşitliliğini konu alan yüksek lisans tez çalışmasında elde edilen veriler doğrultusunda, normal popülasyonda ilk sırada yer alan Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - - + +]’ in aynı zamanda Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan popülasyonda da ilk sırada yer alması, bu mutasyonun yerel haplotip olan Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - - + +] üzerinde işlergesi henüz bilinmeyen bir şekilde geliştiğini düşünmemize sebep olmaktadır Buna ek olarak aynı Hb D-Los Angeles mutasyonunun dünyada bildirilen Tayland [- + + - + + +] ve Türk [- + - - + + +] tipi gibi iki farklı gensel kökeni gösteren haplotipler ile ilişkili olması, bu mutasyonun göçler ile yayıldığı varsayımının tartışmalı olarak kaldığını göstermektedir (Öztürk vd 2007, Atalay vd 2007). Doktora tez çalışmamızda Denizli yöresindeki normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylere ait beta globin gen ailesi haplotipleri ile beta geni framework analizi verilerinin istatistiksel olarak karşılaştırılmasının yapılması amaçlanmaktadır.

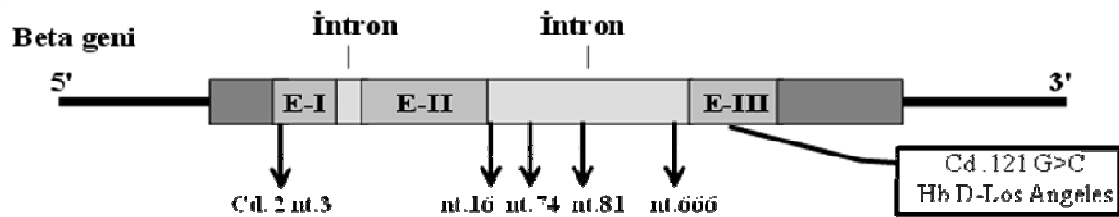
2.3.3 Beta Geni ve Framework Kavramı

1982 yılında Orkin ve Antonarakis tarafından yayınlanan çalışmalarda beta geni içerisindeki 5 adet tek nükleotid polimorfizm (*SNP; Single Nucleotid Polymorphism*) odağı referans alınarak “Framework” adı ile ifade edilen bir “beta geni polimorfizm mikro-haplotip dizisi” tanımlanmıştır. Yayınlanan bu çalışmalarda bildirilen framework çeşitleri 4 ana grup içerisinde sunulmaktadır (bkz. Tablo 2.5). Bu gruplara göre, FW1 (framework 1) ve FW2 dünya çapında yaygın olarak bulunmaktadır, FW3 Afrika, Avrupa ve Batı Asya popülasyonlarında yaygın olarak görülmektedir, FW3A ise Doğu Asya popülasyonlarında yaygındır. Framework dizisini belirlemek için 5 SNP odağını

içeren beta geninin dizi analizi yapılmaktadır. Uygun primerler kullanılarak ilk SNP odağı, beta geni 1. ekzonda yer alan 2. kodonun 3. nükleotidi DNA dizi analizi yöntemi ile incelenerek belirlenmektedir (Şekil 2.7). Diğer 4 SNP odağı (nt.16, nt.74, nt.81, nt.666) beta geninin 2. intronunda yer almaktadır (Orkin vd 1982, Antonarakis vd 1982). Aynı kromozom üzerinde birbirine çok yakın yerleşimli genlerin ya da polimorfik odakların mayoz sırasında parça değişimine uğraması (*crossing over*) ve birbirinden bağımsız olarak bir sonraki kuşağa kalıtılması düşük olasılık olarak ifade edilmektedir. Böylelikle birbirine yakın yerleşimli genler ve ilişkili polimorfizmler ile mutasyonlar kuşaklar boyunca bir arada kalıtılmaktadırlar. Bu özellik yeni yapılanmalar (rekombinant ürünler) ortaya çıkmasını engellemektedir. Bu olaya bağlantı (*linkage*) adı verilir (Akarsu 2006). Tez çalışmamızda da beta geni içerisinde yer alan Hb D-Los mutasyonu ile framework odakları arasındaki olası ilişkilerin istatistiksel yazılım programı kullanılarak araştırılması amaçlanmaktadır.

Tablo 2.5 Beta geni framework sınıflandırması (Orkin, Antonarakis vd 1982).

	Codon 2		IVS II			
	nt. 3	nt. 16	nt. 74	nt. 81	nt. 666	
FW 1	C	C	G	C	T	
FW 2	C	C	T	C	T	
FW 3A	T	G	T	C	C	
FW 3	T	G	T	T	C	



Şekil 2.7 Beta geni üzerinde framework polimorfik odaklarının ve Hb D-Los Angeles mutasyonunun yerleşimi.

2.3.4 Hb D-Los Angeles

D-Punjab, D-Nort Carolina, D-Portugal, D-Chicago, D-Neath ve Oak Ridge isimleri ile de bilinen Hb D-Los Angeles mutasyonu, beta zinciri kodon 121'de G>C baz yer değiştirmesi ile glutamik asit yerine glutamin gelmesi sonucu oluşan amino asit faklılığından kaynaklanmaktadır. Hb D-Los Angeles ilk olarak Itano tarafından 1951 yılında beyaz Amerikan ailesinde tespit edilmiş ve bu adı almıştır (Itano 1956). 1964 yılında moleksel yapısı tanımlanmış ve günümüze kadar Hb D ailesinin 21 farklı yesi bildirilmiştir (Tablo 2.6). Hb D ailesi üyelerinin bazıları aynı amino asit değişikliğinin farklı bölgesel isimlerle tanımlanmasını ifade etse de temelde 9 farklı yesi bulunmaktadır (Welch ve Bateman 1993).

Tablo 2.6 Hb D Ailesi eşitliliği (Welch 1993)

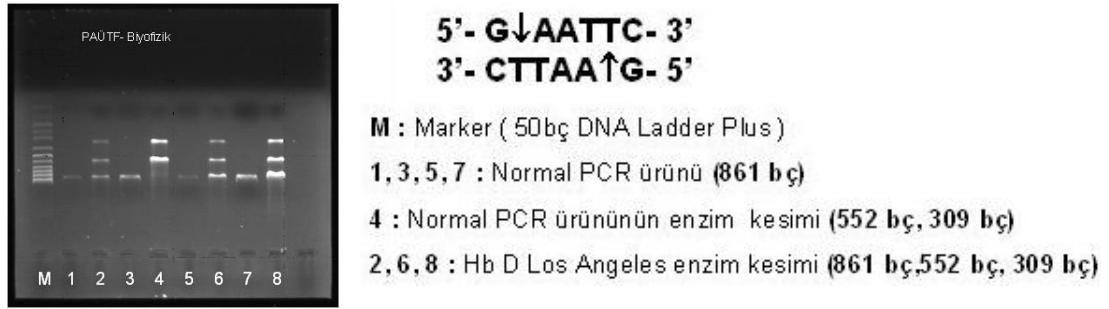
Amino asit eşitliliği	Hb Adı
β 16(A13)	Gly→Arg D-Bushman
β 19(B1)	Asn→Lys D-Ouled Rabah
β 22(B4)	Glu→Gln D-Iran
	Glu→Val D-Granada
β 87(F3)	Thr→Lys D-Ibadan
β 121(GH4)	Glu→Val D-Camperdown D-Beograd
β 121(GH4)	Glu→Ala D-Neath
	Glu→Gln D-Los Angeles D-Punjab D-Chicago D-Nort Carolina D-Portugal D-Oak Ridge
α 68 (E17)	Asn→Lys D-Baltimore D-St. Louis D-Washington G-Philadelphia Stanleyville-T G-Bristol G-Knoxville-T G-Azakuoli

Literatürde Hb D-Los Angeles mutasyonunun gensel kökeni için iki farklı varsayım tartışılmaktadır. Bunlardan biri mutasyonun Akdeniz kuşağında bağımsız olarak oluştuğu diğeri ise Hindistan ve kuzeybatı in' de yaygın olduğu öngörülerek Asya gibi bir merkezde oluşup gler ile dünyaya yayıldığı varsayımıdır (Fioretti vd 1993). Vella ve Lehmann (1974) bu mutasyonun Pers yada Moğol istilasında askerler tarafından

Hindistan' dan İnan ve Türkiye' ye gelmiş olabileceğini öne sürmektedirler. Benzer Şekilde Hb D-Los Angeles mutasyonunun Fransız, Portekiz ve İngiliz sömürgeciliği dönemlerinde evlilikler aracılığı bu ülkelere gelmiş olabileceği ve gçler yolu ile Amerika ile Kanada' ya ulaşmış olabileceği ifade edilmektedir (Lischka 1984). Lehman ve Huntsman Hb D-Los Angeles mutasyonunun Moğolistan kökenli bir anormal hemoglobinin olabileceğini ileri sürmektedirler. Bu varsayımı test etmek için yapılan 7 ayrı çalışmada Uygur ve Kazak popülasyonlarında bu mutasyonun görülme sıklılığı çok düşük olduğu bildirilmektedir. Bu durum Hb D-Los Angeles mutasyonunun Moğol popülasyonlarından köken almadığını açık bir Şekilde desteklemektedir (Li vd 1986). Dünya çapında yapılan çalışmalarda Hb D-Los Angeles Brezilya (Zago 1988), Rusya (Tokarev 1982), İnan (Rahimi 2006), Amerika (Rahbar 1983), Sardunya (Masala 1992), İtalya (Marinucci 1982), Macaristan (Szelenyi 1983), Avusturya (Lischka 1984), in (Li 1986), Belçika (Husquinet 1986), Japonya (Harano 1987), Tayland (Fuchaoren 2002), Bosnahersek (Efremov 1982) ve Birleşik Arap Emirlikleri (El-kalla 1997) gibi ülkelerde tespit edilmiştir.

Hb D Los Angeles klinik olarak belirti vermeyen bir anormal hemoglobinin türüdür. Daha önce belirtildiği üzere, Hb D-Los Angeles Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobinin türleri içinde % 57,8 sıklık ile ilk sırada yer almaktadır. Aynı zamanda, Denizli yöresinde yapılan çalışmada Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] olgularına özgü beta globin haplotiplerine ait, yeni bir haplotip çeşidi bildirilmiştir (Atalay vd 2007).

Hb D-Los Angeles'ın ayırıcı tanısı ilk olarak kromotografik ve elektroforetik özelliklerinden yararlanarak iyon değiştirici kolon kromatografisi ve hemoglobinin elektroforezi teknikleri kullanılarak yapılmıştır. Protein düzeyinde yapılan bu tetkiklerden sonra gen düzeyinde, PCR ürününün restriksiyon enzim analizi tekniği kullanılmıştır. Normal beta globin geninin 121. kodonu GAA, 122. kodonu ise TTC baz dizisine sahiptir. Hb D-Los Angeles mutasyonunda 121. kodon CAA, 122. kodon ise TTC nükleotid dizilimi göstermektedir. Gen düzeyinde yapılan bu analiz için, çift iplikli DNA (*dsDNA-double stranded*) zerinde yer alan 5'-GAATTC-3' dizisini tanıyarak kesen, EcoRI restriksiyon endonükleaz kullanılmaktadır. Şekil 2.8' de gösterildiği gibi mutasyon taşıyıcısı bireylerde, PCR yöntemi ile çoğaltılan ilgili allele özgü PCR rn EcoRI enzimi tarafından kesilememektedir.



Şekil 2.8 Hb D-Los Angeles EcoRI enzim kesimi (Üstel 2006)

2.4 Arlequin; İstatistik Tabanlı Yazılım ve İstatistiksel Kavramlar

Arlequin yazılımı haplotip veya genotip verilerini, bünyesinde bulunan temel istatistik yöntemleri kullanarak analiz edebilmektedir. Söz konusu yazılım ile DNA dizi, RFLP, DNA mikrodizininler, standart ve allel sıklığı gibi verilerin analizi gerçekleştirilmektedir (Excoffier and Heckel 2006, Manual Arlequin ver 3.5 2011). Çalışmamızda beta geni dizi analizinden elde edilen veriler ile beta globin gen ailesi haplotip verilerinin istatistiksel analizleri Arlequin (ver 3.5) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Arlequin yazılımı popülasyon genetiği verilerinin işlenmesinde araştırmacılar tarafından oldukça sık kullanılmaktadır (Weir 2006). Arlequin yazılımında yer alan istatistiksel analiz yöntemleri popülasyon içi ve popülasyonlar arası olmak üzere iki ana kategoride toplanmaktadır. Popülasyon içi yöntemler ile elde edilen istatistiksel bilgi diğer popülasyonlardan bağımsız hesaplanmaktadır (bkz. Tablo 2.7). Popülasyonlar arası yöntemler ile elde edilen istatistiksel bilgi ise popülasyonlar karşılaştırılarak belirlenmektedir (bkz. Tablo 2.8). Arlequin yazılımı, beklenen maksimumlama (*ML*, *Maximum-Likelihood*) yöntemi ile maksimum olabilirlik (*EM*, *Expectation Maximization*) algoritmasını kullanarak framework ve haplotip sıklıklarını hesaplayabilmektedir. *ML* (*Maximum-Likelihood*) yöntemi gensel köken araştırmaları için oldukça iyi bir değerlendirme olanağı sağlar (Weir vd 2006). Arlequin (ver 3.5) yazılımında *EM* algoritmasının çalışma ilkesi başlıca dört adımda incelenebilmektedir. İlk adımda, program framework ve haplotip frekanslarını rasgele değerlendirmekte, ikinci adımda ise bu verileri kullanıp Hardy-Weinberg eşitliğine dayalı olarak her fenotip için beklenen genotip sıklıklarını hesaplamaktadır. Üçüncü adımda, yeni oluşan framework ve haplotip ile genotip sıklıkları karşılaştırır, son adım olan dördüncü adımda ise epsilon değerini, önceden tanımlanmış değerle karşılaştırarak sıklıklar dengeye ulaşmaya kadar ikinci ve üçüncü adımları tekrarlar.

Bu uygulama ile elde edilen framework ve haplotipleme sonuçları ile Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan allel arasındaki ilişki belirlenebilmektedir. Arlequin yazılımı gensel çeşitlilik incelemeleri, F-istatistiği ve popülasyonlar arası gensel ilişkiler, bağlantı dengesizliği (*LD, Linkage Disequilibrium*) ve popülasyon içi çeşitlilik, çoklu genotiplere ait gametik faz değerlendirmeleri, nüfus dağılımları ve yaygınlık testleri, Hardy-Weinberg kesin testi, molekülse çeşitlilik analizi (*AMOVA*) gibi popülasyon genetiğini ilgilendiren birçok konuda veri değerlendirme olanağı sağlamaktadır (Excoffier ve Heckel 2006).

Tablo 2.7 Arlequin yazılımı ile gerçekleştirilebilen popülasyon içi istatistiksel analiz yöntemleri (Manual Arlequin ver 3.5, 2011).

Popülasyon içi yöntem	Kısa Tanım
Standart endeksler	Polimorfik site sayısı ve gen çeşitliliği gibi bazı çeşitlilik ölçümleri.
Molekülse çeşitlilik	Nükleotid çeşitliliği ve popülasyon parametresi olan Teta (θ) değerinin farklı formlarını hesaplar.
Uyumsuzluk (<i>Mismatch</i>) dağılımı	Haplotipler arasındaki ikili (<i>pairwise</i>) farklılıkların dağılımından, popülasyonun nüfussal ve mekansal genişleme parametrelerini belirler.
Haplotip frekansı tahmini	Maximum Likelihood (ML) yöntemi ile popülasyon içinde bulunan haplotip sıklıklarını belirler.
Gametik faz tahmini	Pseudo-Bayesian yaklaşımını kullanarak, çoklu-lokus genotiplerinin en olası gametik fazını belirler (ELB algoritması).
Bağlantı dengesizliği (LD)	Farklı lokuslardaki allellerin rastgele-olmayan bağlantılarını test eder.
Hardy-Weinberg dengesi	Diploid bireylerde allellerin rastgele olmayan bağlantılarını test eder.
Tajima' nın tarafsızlık testi (sonsuz site modeli)	Sonsuz site modeli altında DNA dizileri ve RFLP haplotiplerinin rastgele örneklem seçici tarafsızlık testidir.
Fu' nun <i>FS</i> tarafsızlık testi (sonsuz site modeli)	Sonsuz site modeli altında DNA dizileri ve RFLP haplotiplerinin rastgele örneklem seçici tarafsızlık testidir.
Ewens-Watterson tarafsızlık testi (sonsuz allel modeli)	Sonsuz site modeli altında Ewens örnekleme teorisi tabanlı seçici tarafsızlık testidir.
Chakraborty' nin birleştirme testi (sonsuz allel modeli)	Seçici tarafsızlık ve popülasyon homojenliği testidir. Bu test homojenliğin şüpheli olduğu durumlarda uygulanır.
Minimum yayılım ağı (<i>Minimum Spanning Network; MSN</i>)	Haplotipler arasında Minimum yayılım ağacı (<i>Minimum Spanning Tree; MST</i>) ve MSN hesaplar. Bu test AMOVA ile birlikte farklı popülasyonlardaki haplotiplerin bağlantılarını belirlemek için de kullanılabilir.

Tablo 2.8 Arlequin yazılımı ile gerçekleştirilebilen popülasyonlar arası istatistiksel analiz yöntemleri (Manual Arlequin ver 3.5, 2011).

Popülasyonlar arası yöntem	Kısa Tanım
Popülasyonlar arasında ortak olan haplotiplerin belirleme	Haplotip içeriklerine göre örneklerin popülasyonlar arası karşılaştırmasını yapar.
AMOVA	Popülasyonların gensel yapıları üzerinde molekülse çeşitlilik analizi yapar.
İkili gensel uzaklıklar (<i>Pairwise genetic distances</i>)	Kısa süre içerisinde gerçekleşmiş gensel çeşitlenmeler için F_{ST} tabanlı gensel mesafe analizi testidir.
Popülasyon farklılaşma kesin testi (<i>Exact test of population differentiation</i>)	Panmixia hipotezi altında popülasyonlar içindeki haplotiplerin rastgele olmayan dağılımlarını test eder.
Genotip belirleme testi	Olası allel sıklıkları ile popülasyonlardaki bireylerin genotiplerini belirler.
F-istatistiği ile seçilime uğrayan lokusları belirleme	F_{ST} dağılımı incelenmesi ile seçilime uğrayan lokusları ve "hierarchical island model" altında heterozigotluğu belirler.

2.4.1 Hardy-Weinberg Eşitliği

1910 yılında İngiliz matematikçi George Hardy ve Alman fizikçi Wilhelm Weinberg bir popülasyonda bir genotip frekans oranının jenerasyondan jenerasyona değişmeden kaldığını saptayarak popülasyon genetiğinin temel kuralını tespit etmişlerdir. Hardy-Weinberg prensibi bazı basit varsayımlar altında bir popülasyondaki genotip ve allel sıklıklarının ne olacağını gösterir. Bu varsayımlar gerçek popülasyonların karşılaştığı birçok karmaşık durumun bulunmadığı ideal bir popülasyonu belirlemektedir;

- Bütün genotipler eşit hayatta kalma oranına ve üreme başarısına sahiptir. Yani hiç bir seçim yoktur.
- Yeni allel oluşturacak ya da mevcut bir alleli diğerine dönüştürecek mutasyonlar bulunmaz.
- Popülasyonun içine veya içinden dışına hiçbir göç yoktur.
- Popülasyon sınırsız bir genişliğe sahiptir. Bir başka ifade ile, bu popülasyon örnekleme hatalarının ve diğer rastgele etkilerin göz ardı edilebileceği kadar büyük bir popülasyondur.

Hardy-Weinberg kanununa göre yukarıdaki varsayımlara uygun popülasyon aşağıdaki özelliklere sahiptir;

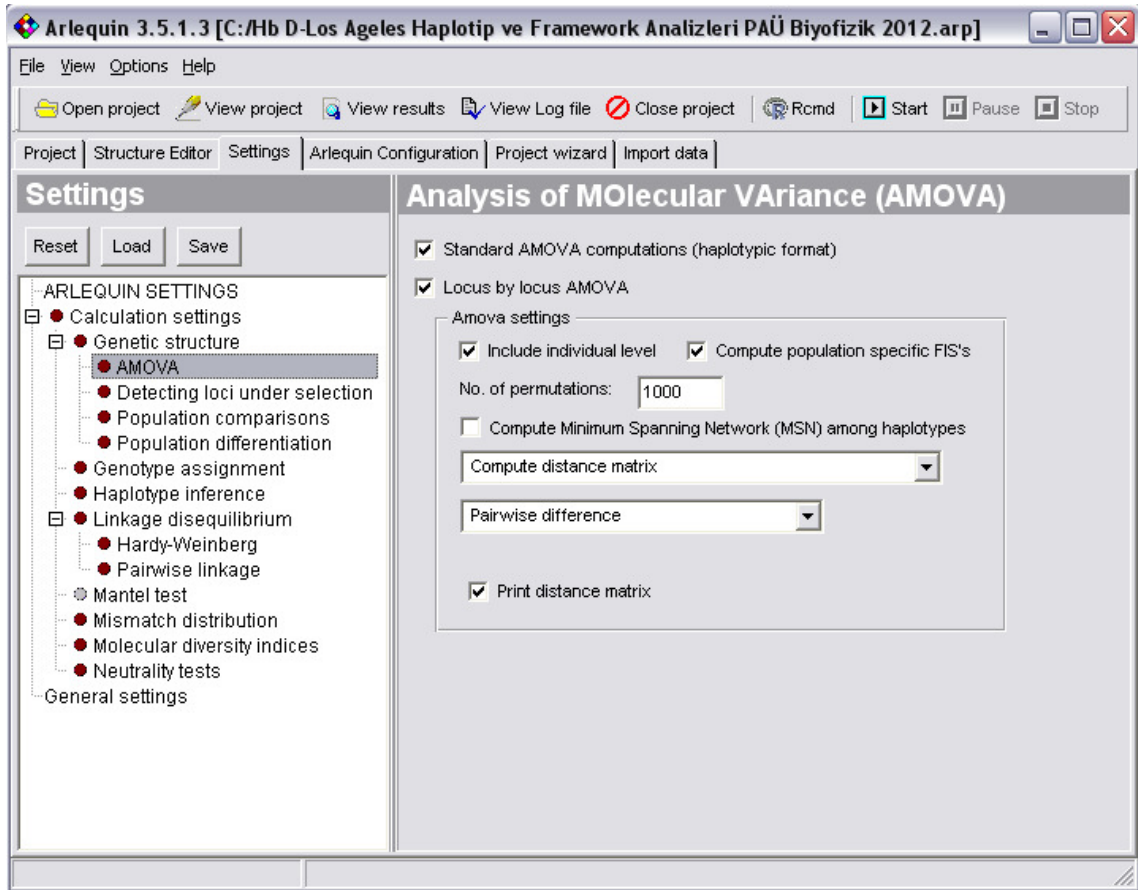
- Bir popülasyondaki allel frekansları nesilden nesile değişmemektedir.
- Bir nesil süren rastgele eşleşmenin ardından genotip frekansları allel frekanslarından tahmin edilebilmektedir

Denge test edilirken öncelikle genotip frekansları hesaplanmalıdır. Daha sonra genotip frekanslarından allel frekansları hesaplanır. Son olarak hesaplanan allel frekansları kullanılarak genotip frekansları tahmin edilir. Hardy-Weinberg kanununa göre genotip frekanslarının $p^2+2pq+q^2=1$ denkleminde uyması beklenir. Aksi takdirde varsayımlardan biri veya bir kaç bu popülasyon için geçersizdir (Klug ve Cummings, 2002).

Ölçülen değerler ile beklenen değerler arasında gerçek bir fark olmadığı kabul edilerek “sıfır hipotezi” (H_0) kurulur. Arlequin yazılımında sıfır hipotezi, genotipik sıklıklar beklenen değerde olduğunu ve nesilden nesile değişmeyeceğini ifade etmektedir. Alternatif hipotez (H_1) ise, beklenen değer ile gözlenen değer arasında fark olduğunu ifade etmektedir. Bu hipotezi test etmek için istatistiksel analizler kullanılır. Buna dayanarak sıfır hipotezi ya reddedilir ya da reddedilemez. Eğer reddedilmişse beklenen orandan sapma sadece şansa bağlanmaz. Bu sapmanın sebebi gen akışı, doğal seçim, gensel sürüklenme veya rastgele olmayan çiftleşme olabilmektedir (Slatkin 1995). Dolayısıyla istatistiksel analizler, gözlenen verilerin tahmin edilen ya da beklenene ne kadar iyi uyduğunu, ondan ne kadar farklılık gösterdiğini incelememiz için matematiksel bir temel oluşturur. Bu teste uyumun mükemmelliği (*Goodness of fit*) adı verilir. Sıfır hipotezinin mükemmellik uyumuna karar vermek için geliştirilen en basit istatistiksel testlerden biri Ki-kare (χ^2) analizidir. Bu sebeple Arlequin istatistiksel yazılım programında gözlenen ve beklenen değerler arasındaki farkın önemli olup olmadığını test etmek için Ki-kare istatistik analiz yöntemi kullanılmaktadır (Manual Arlequin ver 3.5, 2011).

2.4.2 AMOVA; Moleküler Çeşitlilik Analizi

Arlequin yazılımı ile moleküler çeşitlilik analizi yöntemi kullanılarak haplotipler arasında bağlantı ve MSN hesaplanmaktadır (bkz. Şekil 2.9). Haplotiplerin allel içerikleri ile birlikte sıklık bilgisi kullanılarak gensel yapı indislerinin tahmini yapılmaktadır (Excoffier vd 1992). Gensel yapının olası farklı grupları (bireyler içinde, popülasyonlar içinde, popülasyon grupları içinde ve gruplar arasında) ile ilişkili kovaryans bileşenlerinin anlamlılığı parametrik olmayan permutasyon yöntemleri kullanılarak test edilmektedir (Excoffier vd 1992).



Şekil 2.9 Arlequin istatistiksel yazılım programı AMOVA kontrol paneli

Çalışmamızda Arlequin (ver 3.5) ile amova yöntemi içerisinde yer alan F-istatistiği testleri gerçekleştirilmiştir. Popülasyon ya da popülasyonlar arası genetik çeşitliliğin seviyesini belirlemek için kullanılan F-istatistiği fiksasyon indeksleri (F_{IS} , F_{ST} , F_{IT}) 1951 yılında Weir tarafından yayınlanmıştır (Weir vd 1984).

F_{IS} (Alt popülasyon bireyleri arası çiftleşme); Analiz sonuçlarına göre F_{IS} değerinin alt ve üst sınırları 0-1 aralığında değişmektedir. F_{IS} değerinin sıfıra yaklaşması p-değerine bağlı olarak heterozigotluğun arttığını yani rastgele çiftleşme (*random mating*) olayının varlığını, bire yaklaşması ise heterozigotluğun azaldığını yani popülasyon içi seçilmiş çiftleşme (*inbreeding*) olayının varlığını ifade etmektedir. (0; *random mating* – 1; *inbreeding*). Analiz sonucuna göre $p < 0,05$ ise popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinden (HWE) saptığı yorumu yapılmaktadır. Eğer $p > 0,05$ ise popülasyon Hardy Weinberg dengesindedir. F_{IS} değerine göre popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olması popülasyon için genotipik sıklıkların ortaya çıkışında, haplotip çeşitlerinin ve frekanslarının nesilden nesile değişmeyeceği sonucunu doğurmaktadır.

F_{IT} (Tüm popülasyon bireyleri arası çiftleşme); Analiz sonuçlarına göre F_{IT} değerinin alt ve üst sınırları 0–1 aralığında değişmektedir. F_{IT} değerinin sıfıra yaklaşması p-

değerine bağlı olarak popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu yani rastgele çiftleşme olayının varlığını, bire yaklaşması ise gensel sürüklenme ve seçilmişli çiftleşme olayının varlığını ifade etmektedir ($0; HWE - 1; genetic\ drift\ and\ inbreeding$). Analiz sonucuna göre $p < 0,05$ ise popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinden (HWE) saptığı yorumu yapılmaktadır. Eğer $p > 0,05$ ise popülasyon Hardy Weinberg dengesindedir.

F_{ST} (Alt popülasyonlar arası toplam gensel çeşitlilik ölçütü); Analiz sonuçlarına göre F_{ST} değeri 0–1 aralığında değişmektedir. F_{ST} popülasyonlar arasındaki gen akışını (gene flow) ve gensel benzerliği ölçmektedir. Popülasyonlar gensel olarak birbirinden farklılaşmış ve aralarında gen akışı yok ise F_{ST} değeri bire yakın olarak hesaplanmaktadır. Popülasyonlar arasında gen akışı var ise allel sıklıkları ve kompozisyonları birbirine çok benzerdir ve F_{ST} değeri sıfıra yakın olarak hesaplanır (Silva vd 2008).

- $F_{ST} \leq 0.05$; F_{ST} değeri 0.05' e kadar ihmal edilebilir gensel farklılığı ifade etmektedir. Bu durum karşılaştırılan alt popülasyonların gensel olarak çok benzer ve aralarında yüksek gen akışının olduğunu göstermektedir.

- $F_{ST} \geq 0.25$; F_{ST} değeri 0.25' den büyük olması alt popülasyonlar arasındaki gensel farklılığın çok fazla olduğunu ve düşük gen akışını ifade etmektedir.

Hesaplanan F_{ST} değeri popülasyonlar arasındaki gensel farklılık oranının yüzdesini vermektedir. Hamrick and Loveless' e (1986) göre akrabalık dışı çiftleşen popülasyonların ortak özelliği popülasyon içi yüksek değerde gensel çeşitlilik ve popülasyonlar arası düşük değerde gensel farklılık (F_{ST}) olmasıdır. Gen akışı arttığında popülasyonlar arası farklılık azalır (Silva vd 2008).

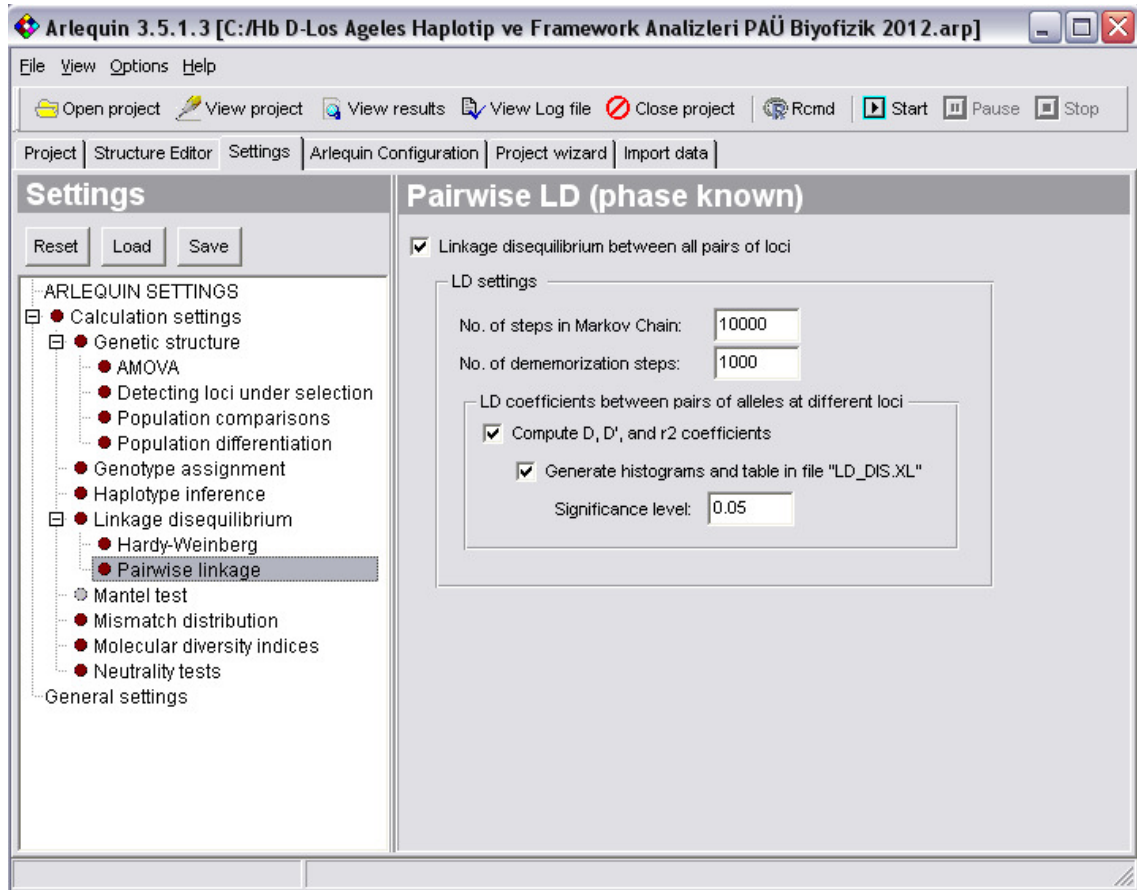
F_{ST} aynı zamanda gen akışı parametresinin (Nm) hesaplanmasında kullanılmaktadır (Şekil 2.10). Bu parametre gensel uzaklığın belirlenmesi açısından oldukça yararlı ve güvenilir bilgiler sağlamaktadır (Crow ve Aoki 1984). Eğer Nm değeri 1.0' dan büyük ise gensel sürüklenmeden (genetic drift) kaynaklanan popülasyonlar arası farklılaşmayı engelleyecek kadar yeterli gen akışı gerçekleşmektedir (Slatkin ve Barton 1989).

$$Nm = \left(\frac{1}{4\alpha} \right) \left[\left(\frac{1}{F_{ST}} \right) - 1 \right] \quad \alpha = \left[\frac{n}{(n-1)} \right]^2$$

Şekil 2.10 Gen akışı parametresi, Nm ; Jenerasyon başına göç sayısı, n ; popülasyon sayısı (Silva 2008).

2.4.3 Bağlantı Dengesizliği; Linkage Disequilibrium (LD)

Aynı kromozom üzerinde birbirine çok yakın yerleşimli genlerin ya da polimorfik odakların mayoz sırasında parça değişimine uğraması (*crossing over*) ve birbirinden bağımsız olarak bir sonraki kuşağa kalıtılması çok zordur. Böylelikle birbirine yakın yerleşimli genler ve polimorfik odaklar kuşaklar boyunca bir arada kalıtılırlar ve yeni haplotipler (rekombinant ürünler) ortaya çıkmamaktadır. Bu olaya bağlantı (*linkage*) adı verilir. Bağlantı dengesizliği (LD) aynı kromozom üzerinde ya da farklı iki kromozom üzerinde yer alan iki ya da daha fazla lokustaki allellerin rastlantısal olmayan bağlantılarıdır (Akarsu 2006). Belirli lokuslardaki polimorfizimlerin rastgele olmayan şekilde birliktelikleri onların bağlantı dengesizliği (LD) ile ölçülür. Bağlantı dengesizliği kavramında tüm bireylerde aynı allel ya da aynı haplotipin seçilmesi durumu aranmaktadır. Doğal seçim yoluyla sıklığı artan bir gen, barındırdığı ve bağlantı halinde bulunduğu polimorfik odakların da sıklığını artırır. Bu sayede genlerin evrimsel geçmişleri ve doğal seçimin tarih boyunca onlara nasıl davrandığı belirlenebilmektedir. Bu tip bir çalışmayı yapabilmek için aday olduğu düşünülen bir gene ve bu genin içindeki SNP dağılımının bilinmesine ihtiyaç vardır. Toplum tabanlı çalışmalarda polimorfik odaklar üzerinden LD testi gerçekleştirilmesine yönelik zorluk hangi allelin hangi ebeveyninden kalıtıldığının bilinmemesinden kaynaklanmaktadır. Aile çalışmalarında olduğu kadar rahatlıkla haplotip oluşturulamadığı için tahmini haplotipler üzerinden en olası haplotip bulunmaya çalışılır ve daha sonra bu haplotipin ilgili nitelik ile ilişkisinin anlamlı olup olmadığı istatistiksel olarak test edilir (Ardlie vd 2002, Bansal vd 2003). İstatistiksel hesaplamalarda Maksimum olabilirliğe dayalı algoritmalar (*Expectation Maximization (EM) algoritması*) ile ML (*Maximum-Likelihood*) yöntemini bünyesinde bulduran Arlequin yazılımı bu istatistiksel bağlantı analizini gerçekleştirebilmektedir (bkz. Şekil 2.11). Arlequin yazılımında LD sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlılığının belirlenmesi için Ki-Kare test istatistiği kullanılmaktadır. Ki-Kare testi “iki lokus arasında LD vardır” şeklinde kurulan H_0 hipotezinin reddedilip edilemeyeceğine karar verilmektedir. İstatistiksel olarak $P < 0.05$ şartı sağlandığında H_0 hipotezi kabul edilir. Sıfır (H_0) hipotezinin kabul edilmesi, değişkenlerin birbirinden bağımsız olmadığı, diğer bir ifadeyle, değişkenler arasında bağlantı bulunduğu anlamını taşımaktadır.



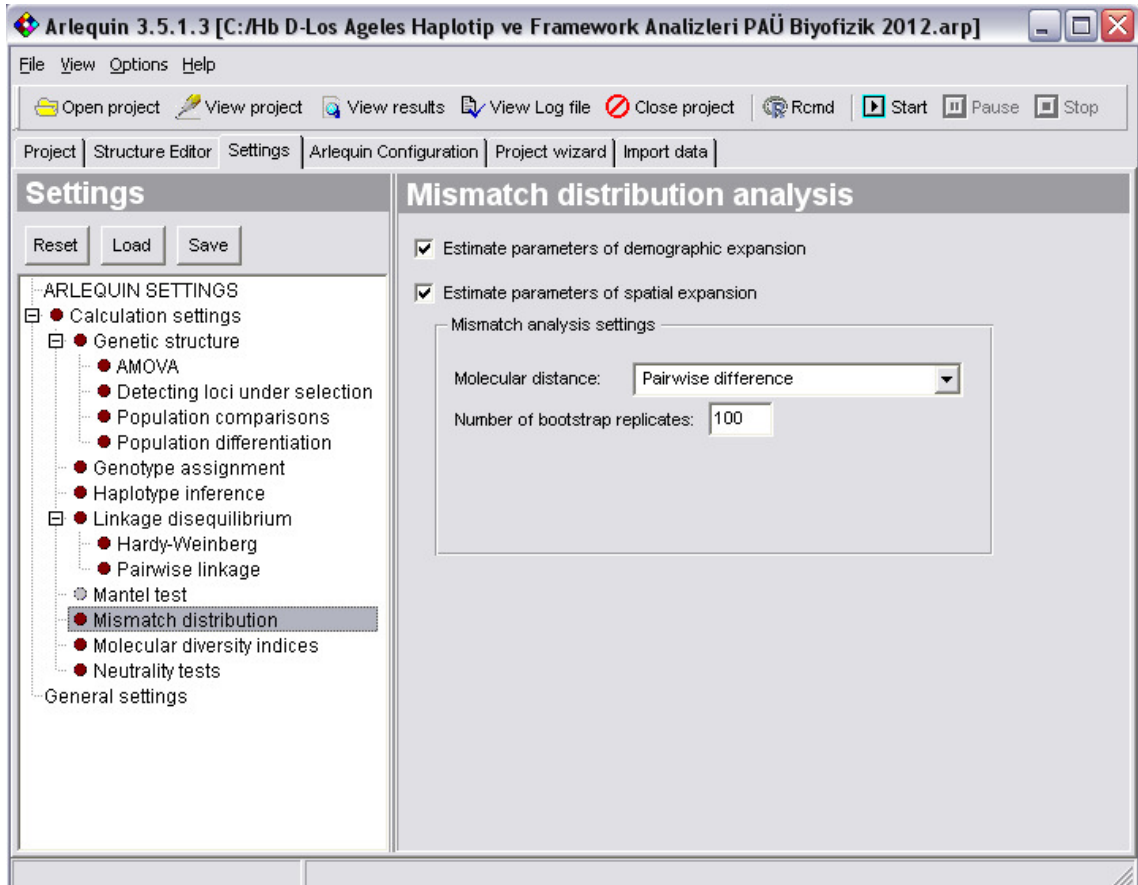
Şekil 2.11 Arlequin istatistiksel yazılım programı LD kontrol paneli

2.4.4 Uyumsuzluk (*Mismatch*) Dağılım Analizi

Mismatch analizi popülasyon içi haplotip çiftleri arasındaki gözlenen farklılıkların dağılımını hesaplamaktadır (bkz. Şekil 2.12). Popülasyon nüfussal dengede olduğunda bu dağılım çok modlu (*multimodal*) bir grafik olarak ortaya çıkmaktadır. Nüfusu üstel olarak artan popülasyonlar için ise mismatch analizi sonucunda düzgün ve tek modlu (*unimodal*) grafik ortaya çıkmaktadır. Mismatch dağılımı popülasyonların tarihsel nüfus değişimleri ile ilgili olarak önemli bilgiler sağlamaktadır (Slatkin ve Hudson 1991, Rogers ve Harpending 1992). Mismatch analizi çerçevesinde nüfussal genişleme parametreleri olarak τ , θ_0 , θ_1 , SSD, RI değerleri hesaplanmaktadır. θ_0 ve θ_1 popülasyonun nüfus artışından önceki ve sonraki büyüklük değerlerini ifade etmektedir. Raggedness indeks (RI), p değeri ile birlikte mismatch dağılımının uygunluğunu test etmektedir. Sum of square deviations (SSD) ani popülasyon yayılma modeli ile mismatch dağılımını beklenen ve gözlenen değerler açısından karşılaştıran bir test istatistiği olarak ifade edilmektedir (Schneider ve Excoffier 1999). Popülasyonlar için rg

indekslerinin düşük değerlerde ve SSD P-değerlerinin > 0.05 olması bu popülasyonların nüfussal olarak ortak geçmişe sahip olduğunu göstermektedir (Xiao vd 2011). SSD ve rg indekslerinin p değerleri, H_0 hipotezinin kabul edilip edilemeyeceğini göstermektedir. Dolayısıyla bu istatistiksel analiz, gözlenen verilerin tahmin edilen ya da beklenene ne kadar iyi uyduğunu, ondan ne kadar farklılık gösterdiğini incelememiz için matematiksel bir temel oluşturur. Bu teste uyumun mükemmelliği (*Goodness of fit*) adı verilmektedir. Sıfır hipotezinin mükemmellik uyumuna karar vermek için geliştirilen istatistiksel testlerden biri Ki-kare (χ^2) analizidir. Bu sebeple Arlequin yazılımında, gözlenen ve beklenen değerler arasındaki farkın önemli olup olmadığını test etmek için Ki-kare istatistik analiz yöntemi kullanılmaktadır. H_0 hipotezi dağılımın tek modlu olduğunu ifade etmektedir. Buna göre $P > 0,05$ olduğunda H_0 hipotezi kabul edilir ve dağılım tek modludur denir. Bu sonuç popülasyonlar arasındaki gözlenen ikili çeşitlilik dağılımının, ani popülasyon yayılması modeli altındaki beklenen çeşitlilikten istatistiksel olarak önemli derecede farklı olmadığını göstermektedir. Ayrıca tek modlu dağılım, popülasyon nüfusunun herhangi bir kısıtlama veya göç olayı etkisi altında kalmadan üstel olarak düzgün bir şekilde arttığını ifade etmektedir (Schneider ve Excoffier 1999, Rogers 1995, Slatkin ve Hudson 1991, Rogers ve Harpending 1992).

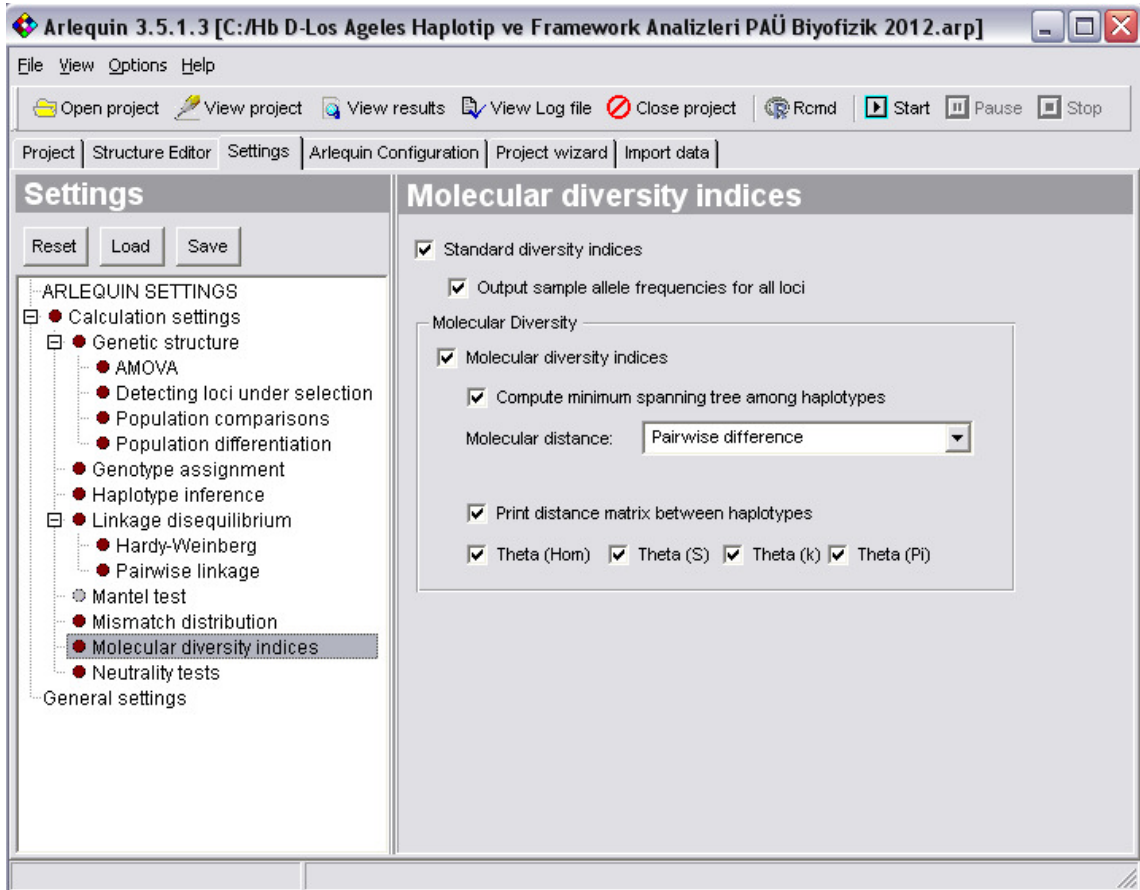
Rogers tarafından 1995 yılında yayınlanan istatistiksel yöntemlere göre $\theta_1 = 2uN_0$, $\theta_2 = 2uN_1$ ve $\tau = 2ut$ (u ; mutasyon oranı) parametreleri modellenerek bu parametrelerin güven aralıkları bildirilmiştir. Bu modelde haplotipik veriler ile hesaplanan τ (Tau; mutasyonel zaman birimi) değerinden yola çıkılarak popülasyonun olası yaşı belirlenebilmektedir. Çalışmada insan mitokondriyel nükleotid diverjans oranı güven aralığı milyon yılda %2 - %4 olarak ifade edilmektedir. %4 diverjans oranına karşılık mutasyon oranı $u = 15 \times 10^{-4}$, %2 diverjans oranına karşılık mutasyon oranı $u = 7.5 \times 10^{-4}$, jenerasyon sayısı $1/2u$ ve jenerasyon yaşı da her jenerasyon başına 25 yıl olarak bildirilmektedir. Bu veriler ile zaman parametresi için güven aralığı 8333 – 16666 yıl olarak hesaplanmaktadır. Bu zaman parametresinin istatistiksel olarak hesaplanan tau değeri ile çarpımı incelenen gen bölgesi üzerinden, popülasyonun ilk nüfus büyüklüğünden son nüfus büyüklüğüne ulaşmaya kadar geçen zamanı yaklaşık olarak ifade etmektedir (Rogers 1995).



Şekil 2.12 Arlequin istatistiksel yazılım programı Mismatch Dağılımı kontrol paneli

2.4.5 Moleküler Çeşitlilik Analizi İndeksleri

Moleküler çeşitlilik analizi indeksleri θ , $\theta_{(H)}$, $\theta_{(S)}$, $\theta_{(k)}$, $\theta_{(\pi)}$, π , k gibi simgeler ile ifade edilmektedir (bkz. Şekil 2.13). Bu indekslerden θ ; popülasyon mutasyon parametresi, iki lokus arasındaki olası rekombinasyon olaylarını uzaklığın fonksiyonu olarak tanımlamaktadır. $\theta_{(H)}$; gözlenen homozigotluktan (H) elde edilen teta tahmin parametresidir ve gensel sürüklenme ile mutasyon olaylarının dengede bulunduğu popülasyonlarda beklenen homozigotluğu tanımlamaktadır. $\theta_{(S)}$; gözlenen ayırık site (S) sayısından elde edilen teta tahmin parametresidir ve bir rekombinant olmayan DNA örneği için ayırık site (S) sayısı, örnek büyüklüğü (n) ve teta (θ) ile sonsuz-site eşitliği arasındaki ilişkiyi hesaplanmaktadır (Watterson 1975). $\theta_{(k)}$; gözlenen allel sayısından (k) elde edilen teta tahmin parametresidir ve beklenen allel sayısı (k), örnek büyüklüğü (n) ve teta (θ) ile sonsuz-allel eşitliği arasındaki ilişkiyi hesaplanmaktadır (Ewens 1972). $\theta_{(\pi)}$; ortalama çift farklılığı sayısından (ya da her gen için nükleotid çeşitliliği) (π) elde edilen bir teta parametresidir ve ortalama çift farklılığı (π), teta (θ) ile sonsuz-site eşitliği arasındaki ilişkiyi hesaplanmaktadır (Schneider and Excoffier, 1999).

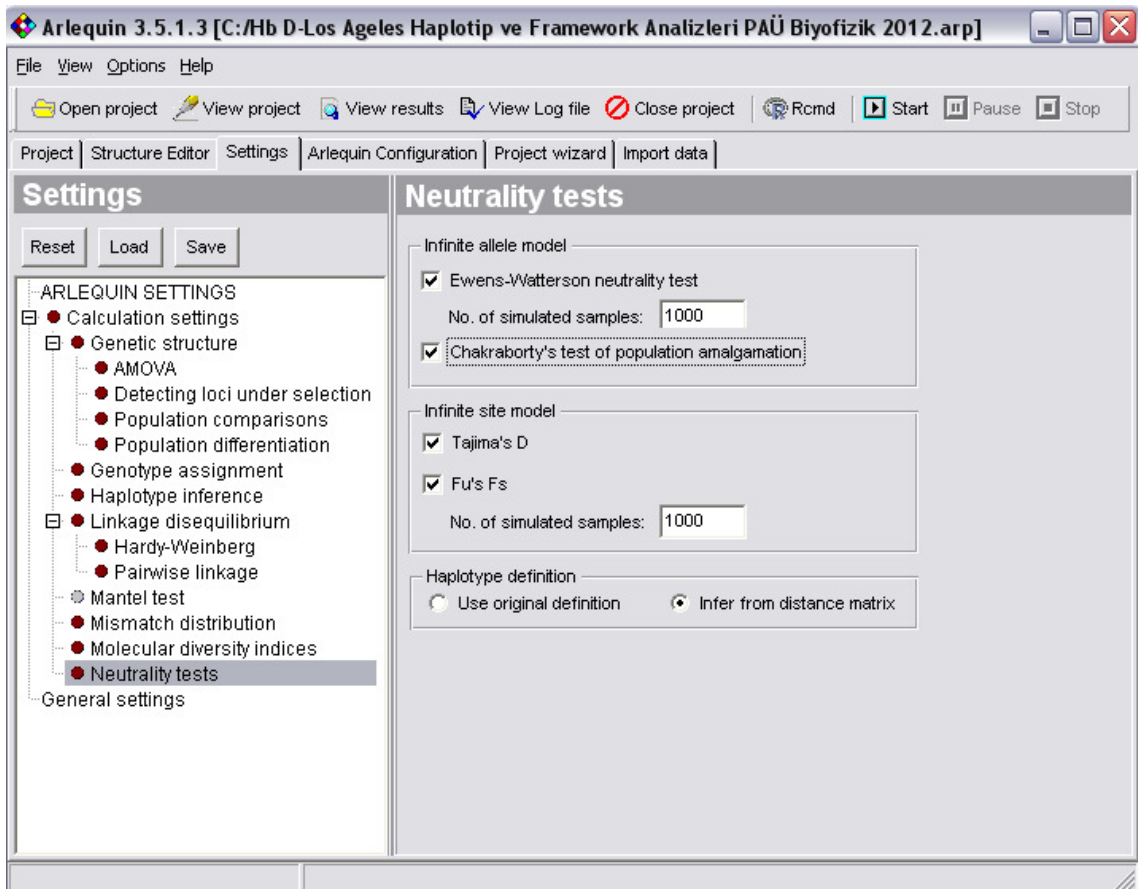


Şekil 2.13 Arlequin istatistiksel yazılım programı Molekülse Çeşitlilik İndeksleri kontrol paneli

2.4.6 Tarafsızlık (Neutrality) Testleri

Çalışmamızda elde edilen verilere Tajima' nın D ve F_u ' nun F_S tarafsızlık testleri uygulanmıştır (bkz. Şekil 2.14). Tajima D testi popülasyon içindeki ayırık site sayısı (S) ve haplotipler arasında ortalama çift farklılıkları (π) tabanlı iki teta (θ) popülasyon parametresini karşılaştırmaktadır (Tajima 1989a, 1989b, 1993). Tajima D testi popülasyonların standart nötral modelden sapmasını test etmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) kabul edilen Tajima D değeri nötral modelde doğal seçim, nüfussal dalgalanmalar ve diğer popülasyon dengesi bozucu nedenler ile beklenen S ve π parametrelerinin değişmesinden kaynaklanmaktadır. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan ($P > 0.05$) Tajima D değeri ise, popülasyonların nötral dengede olduğunu ifade etmektedir. Böyle popülasyonlarda nadir varyasyonların sayısı her zaman düşük olmaktadır (Hasan vd 2008). Pozitif Tajima D değeri heterozigotluğun seçilimli bir avantaja sahip olduğunu, negatif Tajima D değeri ise belirli bir allelin diğer allel

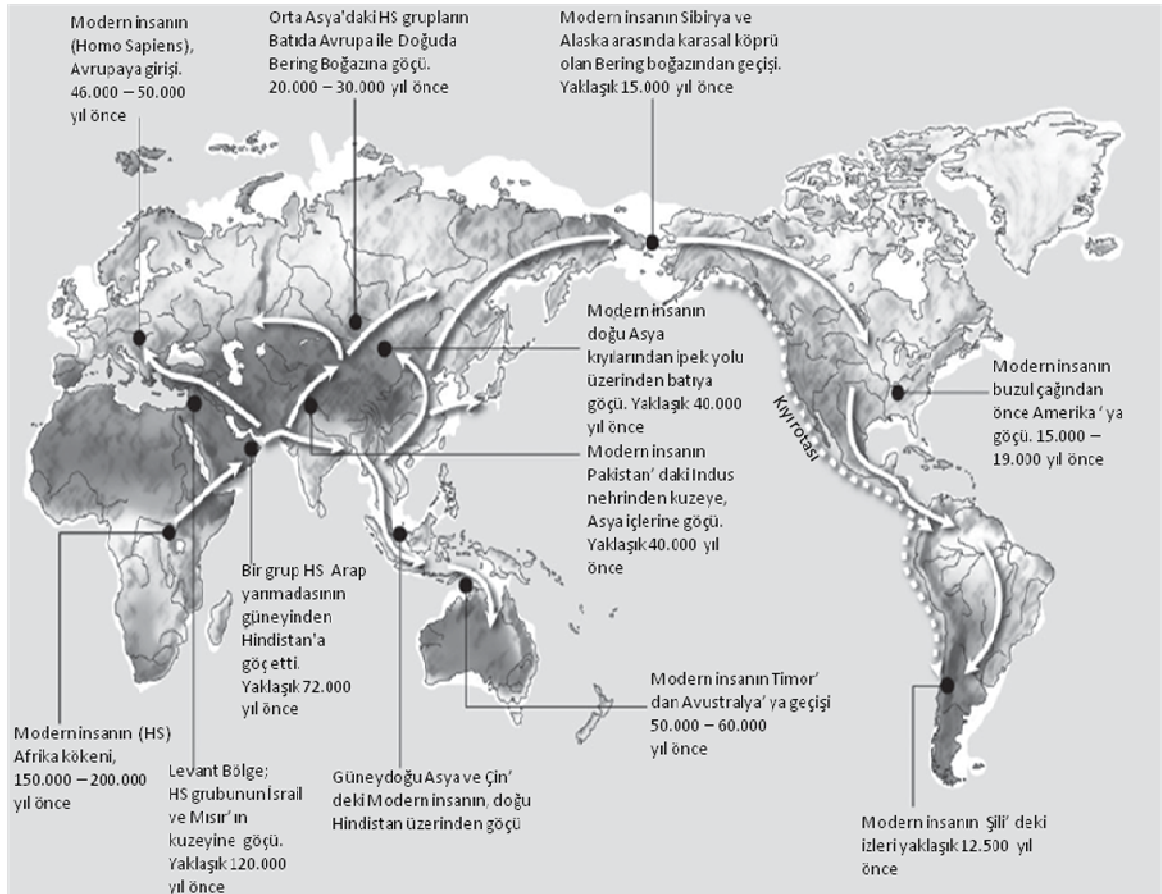
arasında seçilimli bir avantaja sahip olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca negatif değerler bir dış etki ile popülasyonda hızlı nüfus artışı olduğunu ifade etmektedir (Stephens 2001). F_u ' nun F_S testi nüfussal genişleme hareketlerine oldukça duyarlı bir test olarak ifade edilmektedir (Fu 1997). F_u F_S testi popülasyon içi seçici tarafsızlık tabanlı allel sayısı (k) olasılıklarını kullanarak popülasyon genişlemesi süreçlerine ve popülasyon dengesi değişimlerine duyarlılık göstermektedir. İstatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) kabul edilen negatif F_u test sonuçları incelenen popülasyonların ortak nüfussal büyümeye sahip ve aynı gen havuzuna ait olduklarını ifade etmektedir (Li 2009).



Şekil 2.14 Arlequin istatistiksel yazılım programı Tarafsızlık Testleri kontrol paneli

2.5 Modern İnsanın Tarihsel Göç Yolları ve Göç Zamanları

Coğrafik açıdan, ortak görüş; Modern insan Afrika' nın güneyinden tek bir rotadan Kızıldeniz boğazını geçerek ilk önce Hint okyanusu kıyılarında Bali' ye oradan da güneybatı pasifikte Malenesya ve Avustralya' ya geçtiği, diğer kolunun ise Amerika' ya ulaştığı yönündedir. Bu görüş Afrika' lı olmayan gruplar ile Afrika' lı gruplar arasında RFLP tabanlı popülasyonlar arası gensel uzaklık analizi çalışmaları ile de desteklenmektedir (bkz. Şekil 2.15). Afrika' da bulunan en erken fosil kaydı 160.000 – 195.000 yıl öncesine tarihlenmektedir. Modern insanın afrikadan çıkışı ile ilgili gensel, iklimik ve arkeolojik bulgular bu göçün yaklaşık 70.000 yıl önce güney rotası kullanılarak gerçekleştiğini göstermektedir. Paleoantropoloji ve paleoklimatoloji verileri 90.000 yıl önceki aşırı soğuk iklim koşulları nedeniyle avrupaya levant bölge (orta doğu) ve Türkiye üzerinden gecikmiş (yaklaşık 40.000 yıl önce) bir göç rotası olduğunu desteklemektedir. Ayrıca gensel çalışmalar Güney Asya modern insan popülasyonunun Avrupa popülasyonunun erken dönemini temsil ettiğini göstermektedir. Literatürde yer alan bu bilgiler coğrafik ve topoğrafik çalışmaların katkısını içeren yüksek doğruluk oranına sahip soy ağacı çalışmaları, rekombinant olmayan tekata (*uniparental*) (*mtDNA* ve *NR1; Y kromozom / rekombinant olmayan Y kromozom*) analizleri, popülasyon allellerinin yerine belirli allellerin izlenmesi yöntemi, popülasyonların teknolojik gelişim süreçlerinin izlenmesi, popülasyonların nüfus yoğunluk analizleri, globin genlerinde bulunan coğrafik olarak spesifik mutasyonların incelenmesi ve izlenmesi ile detaylandırılarak desteklenmektedir (Oppenheimer 2012, Currat ve Excoffier 2004, Petraglia 2010).

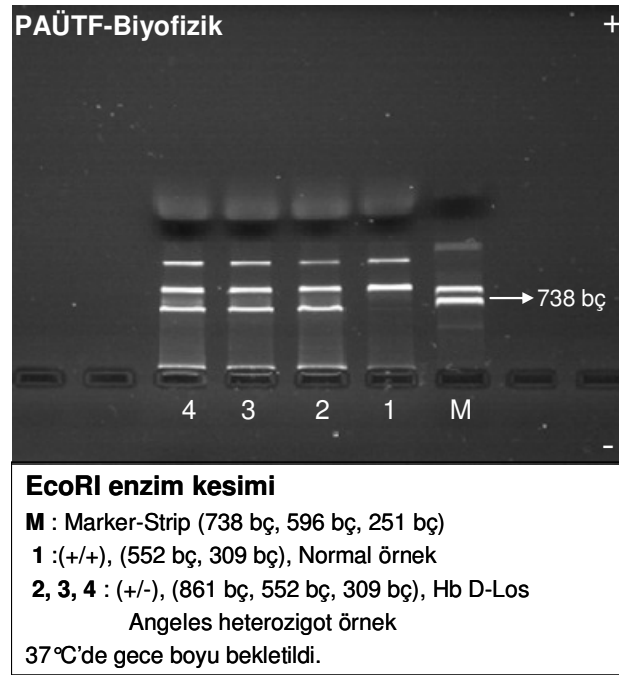


Şekil 2.15 Modern insanın tarihsel göç yolları ve göç zamanları haritası (Oppenheimer 2012)

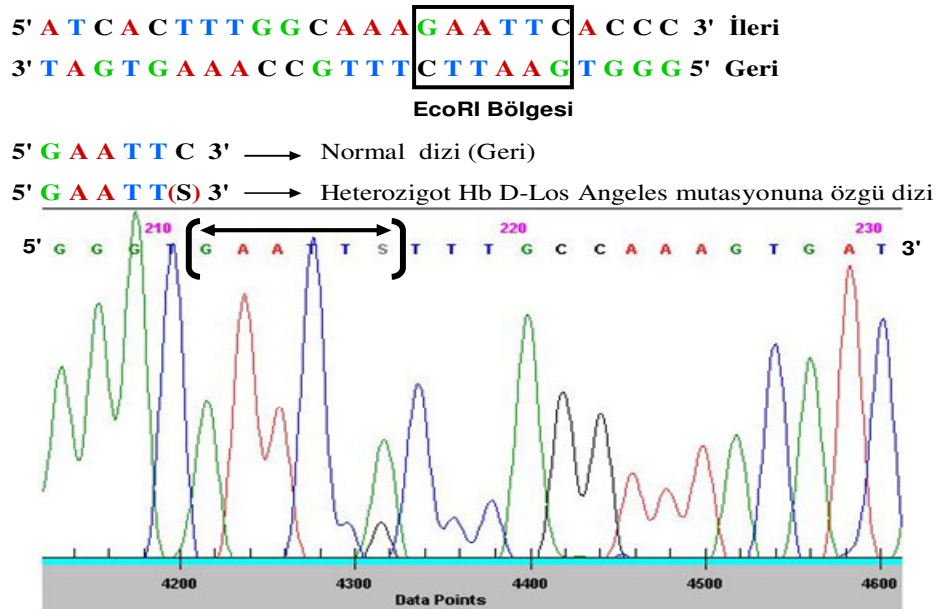
3. MATERYAL ve METOD

Tez çalışmamızda kullanılan, Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] mutasyonu taşıyan bireyler (40 adet) ile normal (59 adet) bireylere ait DNA örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı Hemoglobinopati DNA arşivinden alınmıştır. Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan bireylerden kan alınırken, kendilerine veya ebeveynlerine bilgilendirilmiş onay formu verilerek yazılı onayları alınmaktadır. Bilgilendirilmiş onay formu ile yazılı onayları alınmış kişilerden elde edilen DNA örnekleri, Biyofizik Anabilim Dalı DNA arşivine anonim olarak konulmaktadır. Çalışmamızda kullanılan normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylerin beta geni, uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Her bir örnek için beta geni nükleotid dizilerini temsil eden PCR ürünlerinin BECKMAN CEQ™8000 sisteminde DNA dizi analizi yapılarak sahip oldukları framework çeşitleri belirlenmiştir. Sonraki aşamada ise her bir örnek için belirlenen framework çeşitlerinin istatistiksel analizi yapılmıştır. 2007 yılında gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasında ise, normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylere ait beta globin gen ailesi içerisinde yer alan 7 adet polimorfik odağın bulunduğu gen bölgeleri, uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin, haplotip analizinin devam eden aşamalarında, sırası ile enzim kesimi ve haplotip çeşitlerinin istatistiksel değerlendirme çalışmaları yapılmıştır (YL tezi; Öztürk 2007).

Çalışmamızda kullanılan her bir örneğin genomik DNA izolasyonu, Hb D-Los Angeles mutasyonunu içeren beta genindeki 5'-GAATTC-3' dizisinin uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılması, bu mutasyonun EcoRI restriksiyon enzimi ve dizi analizi yöntemi ile gen düzeyinde tanısının yapılması işlemleri daha önce gerçekleştirilmiştir (YL tezi; Öztürk 2007).



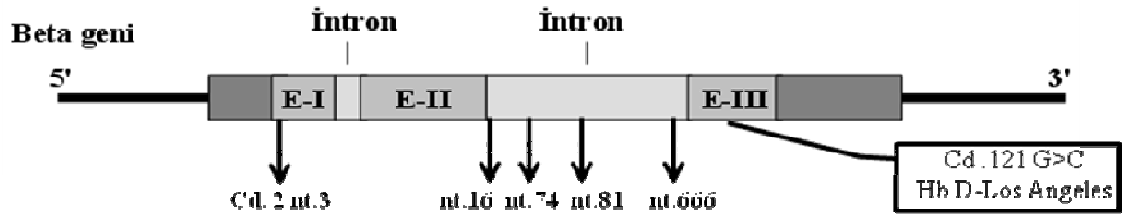
Şekil 3.1 EcoRI enzim kesimi ile beta globin geni kodon 121' deki Hb D-Los Angeles (GAA→CAA) mutasyonunun saptanması (YL tezi; Öztürk 2007).



Şekil 3.2 Heterozigot Hb D-Los Angeles mutasyonunun, geri primer kullanılarak dizi analizi ile tanımlanması.(S: G/C) (YL tezi; Öztürk 2007).

3.1 Framework Analizi

Beta genine özgü framework analizi için, şekil 3.3’ de verildiği gibi gen içerisindeki 5 adet tek nükleotid polimorfizm (SNP; Single Nucleotid Polymorphism) odağı referans alınarak “Framework” adı ile ifade edilen bir “beta geni polimorfizm mikro-haplotip dizisi” tanımlanmaktadır. Bu odaklar, beta geni 1. ekzonda yer alan 2. kodon 3. nükleotid ve beta geninin 2. intronunda yer alan 16., 74., 81. ve 666. nükleotid olarak sıralanmaktadır. Her bir örnek için, bu odakların yer aldığı beta geni nükleotid dizileri uygun primerler ile çoğaltılmaktadır. PCR yöntemi kullanılarak hazırlanan DNA parçalarının nükleotid dizilerindeki polimorfik odaklar DNA dizi analizi yapılarak araştırılmıştır.



Şekil 3.3 Beta geni üzerinde framework polimorfik odaklarının ve Hb D-Los Angeles mutasyonunun yerleşimi.

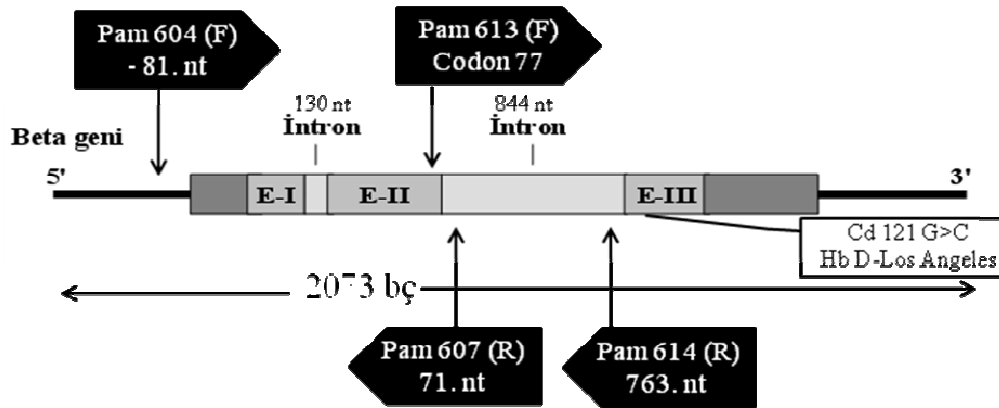
3.1.1 İlgili Odakların PCR Yöntemi ile Çoğaltılması

Beta geni içerisinde yer alan, 5 polimorfik odak incelenmek üzere, bölgelere özgü uygun primer çiftleri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. İlgili bölgelerin çoğaltılması için Tablo 3.1’ de verilen 50 µl’ lik PCR karışımı hazırlandı. Bu PCR karışımı içerisindeki, dizi analizi için DNA parçalarını çoğaltacak olan primer çiftleri Tablo 3.2’ de gösterilmiştir (bkz. Şekil 3.4).

PCR yöntemi ile çoğaltım işlemi, sıcaklık döngü cihazı (*Technogene Thermo Cycler*) kullanılarak yapıldı. Daha sonra, elde edilen PCR ürünü, % 1’ lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

Tablo 3.1 PCR karışımı.

PCR bileşenleri	Tek tüp için miktar	Derişimler
DNA (0,03 µg/µl)	2 µl	0,06 µg/ 50 µl
Tampon (Buffer BIORON 10X)	5 µl	1 X
dNTP _{Mix} (BIORON, 0,5 mM)	5 µl	0,05 mM
Mg ⁺⁺ (BIORON, 16 mM)	5 µl	1,6 mM
Primer I (10 pmol/µl)	2 µl	20 pmol
Primer II (10 pmol/µl)	2 µl	20 pmol
Taq DNA polimeraz (BIORON, 1 u/µl)	5 µl	0,2 u/ 50 µl
Steril dH ₂ O	24 µl	-
Toplam Hacim	50 µl	50 µl

**Şekil 3.4** Beta geni üzerindeki framework polimorfik odaklarının çoğaltılması için kullanılan primer çiftleri.**Tablo 3.2** PCR yönteminde kullanılan primerler çiftleri.

Primer Adı	Primer Dizisi
PAM 604 (İleri)	5' - GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG GAG -3'
PAM 607 (Geri)	5' - ATG GTT AAG TTC ATG TCA TAG GAA GGG -3'
PAM 613 (İleri)	5' - TCA CCT GGA CAA CCT CAA G -3'
PAM 614 (Geri)	5' - GTTGGGATAAGGCTGGATTA -3'

3.1.2 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Genomik DNA kullanılarak elde edilen PCR ürünleri GenElute™ PCR Clean-Up Kit (Sigma) kullanılarak saflaştırıldı. Bu safleştirmede 100 bp – 10 kb'lık dışında kalan DNA parçaları ortamdaki uzaklaştırıldı.

3.1.2.1 PCR Ürünlerinin Saflaştırılması Yöntemi

- Elde edilen PCR ürününün toplam hacminin 5 katı binding solüsyonu eklendi. Toplam hacim kolon içine transfer edildi. 12000 rpm'de 1dk santrifüj yapıldı.
- Kolona 500µL Wash solüsyon eklenip 12000 rpm'de 1dk santrifüj yapıldı. Bu kolon yıkama işlemi iki kez tekrar edildi.
- Kolon steril ependorf tüpüne yerleştirilerek üzerine 35µL steril H₂O eklendi. Oda sıcaklığında 2 dakika beklendikten sonra 12000 rpm'de 1dk santrifüj yapıldı.
- Elde edilen safleştirilmiş PCR ürünü -20 °C'de saklandı.

3.1.3 DNA Dizi Analizi

Her bir örnek için beta geni nükleotid dizilerini temsil eden PCR ürünlerinin BECKMAN CEQ™8000 sisteminde DNA dizi analizi yapılarak sahip oldukları framework çeşitleri belirlenmiştir.

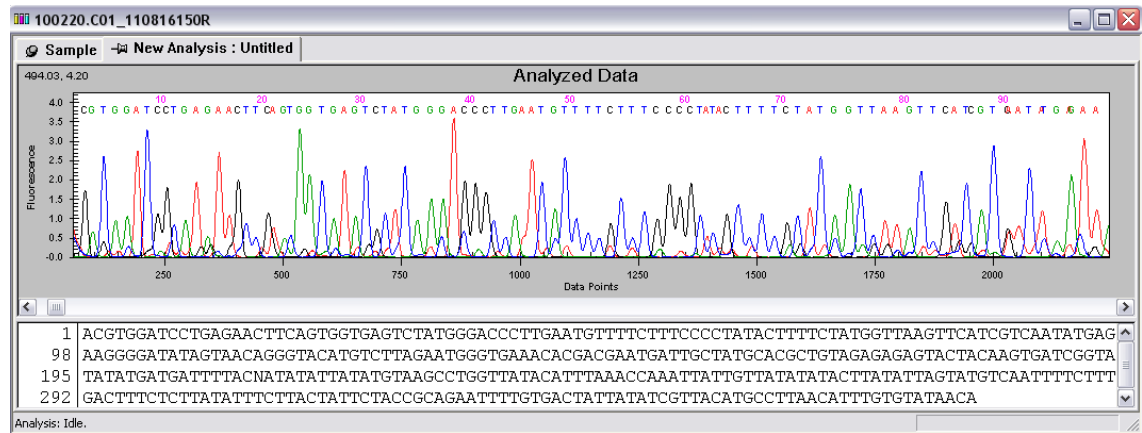
Dizi analizi yönteminde, Beckman Coulter Genome Lab™ Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Kiti ile beta geni içerisindeki polimorfik odaklar saptanmıştır. Reaksiyon uygulaması 94 °C'de 20 sn, 50 °C'de 20 sn ve 60 °C'de 4 dak. olmak üzere toplam 30 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. DNA dizi analizi reaksiyon karışımı ve uygulama biçimi Tablo 3.4' de, kullanılan geri primerlerin baz dizimleri Tablo 3.3' de verilmiştir. Şekil 3.5' de dizi analizi yöntemi ile polimorfik odakların tanımlanmasına yönelik bir örnek gösterilmiştir.

Tablo 3.3 DNA dizi analizi yönteminde kullanılan primerler ve dizileri.

Primer Adı	Primer Dizisi
PAM 604 (İleri)	5'- GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG GAG -3'
PAM 607 (Geri)	5'- ATG GTT AAG TTC ATG TCA TAG GAA GGG -3'
PAM 613 (İleri)	5'- TCA CCT GGA CAA CCT CAA G -3'
PAM 614 (Geri)	5'- GTTGGGATAAGGCTGGATTA -3'

Tablo 3.4 DNA dizi analizi reaksiyon karışımı ve uygulama biçimi.

DNA dizi analizi reaksiyon bileşenleri	Tek tüp için miktar
DNA	5 µl
DTCS mix	10 µl
Kullanılan Primer (1,6 pmol/µl)	2 µl
Steril dH ₂ O	3 µl
Toplam Hacim	20 µl

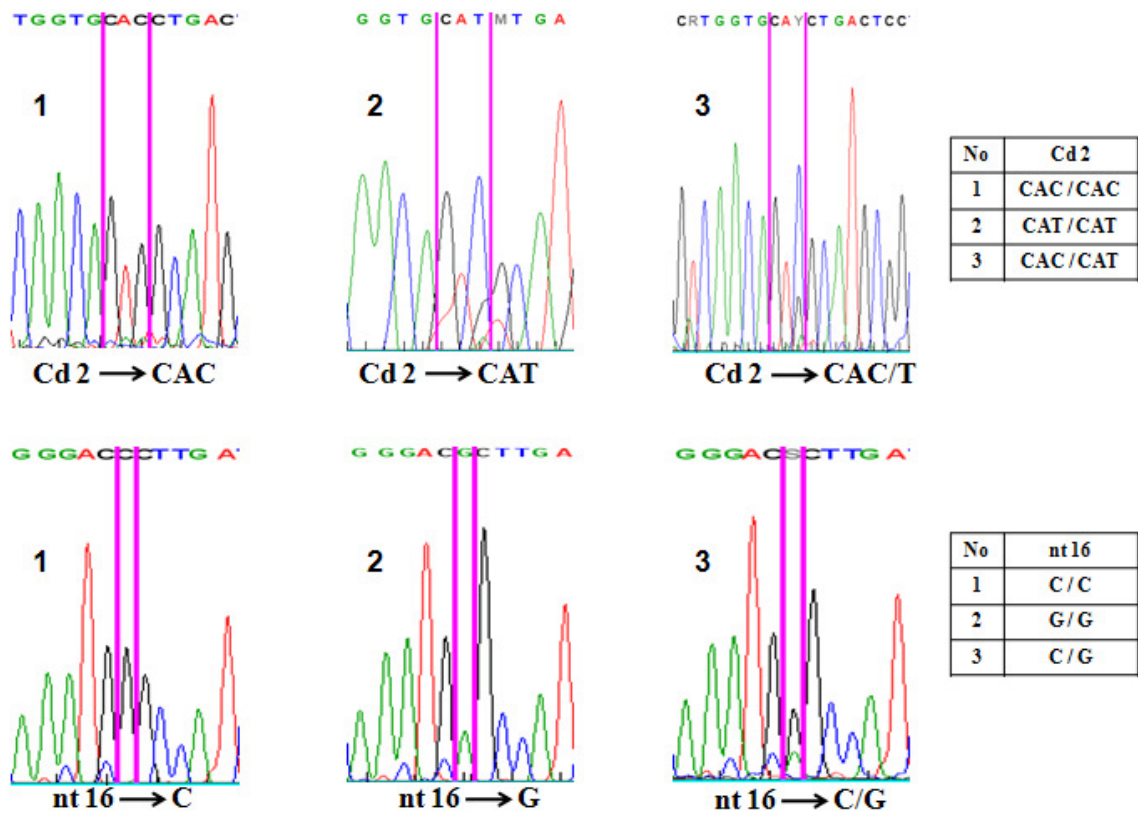
**Şekil 3.5** Beta gen dizisinin, PAM 613 ileri primeri kullanılarak dizi analizi ile tanımlanması.

3.1.4 İstatistiksel Analiz Yöntemi

Elde edilen framework sonuçları ile haplotip analizi verilerinin değerlendirilmesi amacı ile popülasyon içi ve popülasyonlar arası gensel ilişkilerin incelenmesine yönelik, temel yöntemler ve istatistiksel testleri içinde bulunduran Arlequin (ver 3.5) yazılımı kullanılmıştır. Normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylere ait söz konusu gensel veriler, Arlequin yazılımı ile işlenerek mutasyonun, framework çeşitlerinin oluşumu üzerindeki etkilerinin değerlendirilmesini sağlamıştır.

4.BULGULAR

Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan 40 ve normal bireylere ait 59 adet DNA örneği, Pamukkale Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Hemoglobinopati DNA arşivinden alınmış olup, anonim biçimde kullanılmıştır. Çalışmamızda normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylerin, dizi analizi sistemi ile belirlenen ikili allel framework analizi sonuçları Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’ de gösterilmektedir (Şekil 4.1). Öztürk tarafından 2007 yılında gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışması verileri olan normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylerde haplotip analizi sonuçları ve bu tez çalışmasında elde edilen framework analizi sonuçları Arlequin (ver 3.5) yazılımı ile değerlendirilmiştir. Hem haplotip analizinin hem de framework analizinin sonucunda elde edilen ikili allel çeşitlerinden hangisinin mutasyonla ilişkili olduğunu belirlemek için en olası alleli hesaplayabilen Arlequin yazılımı ile popülasyonlar arası gensel ilişki, nüfus, popülasyon yaşı, gensel sürüklenme, gen akışı ve gen-mutasyon ilişkisi gibi parametreler değerlendirilmektedir.



Şekil 4.1 DNA dizi analizi yöntemi ile framework odaklarının belirlenmesi.

Tablo 4.1 Normal olgulara ait DNA dizi analizi ikili framework sonuçları

No:	Normaller	Cd 2 (604 F)	nt 16 (613 F)	nt 74 (613 F)	nt 81 (613 F)	nt 666 (614 R)
1.	101311	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
2.	101319	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
3.	101323	CAT/CAT	C/G	T/T	C/C	T/C
4.	101324	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
5.	101322	CAT/CAC	C/G	T/T	C/C	T/T
6.	101330	CAT/CAT	C/G	T/T	C/C	T/C
7.	101343	CAT/CAT	C/G	T/T	C/C	T/C
8.	101345	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
9.	101349	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
10.	101355	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
11.	101147	CAT/CAT	C/G	T/T	T/C	T/C
12.	100029	CAT/CAT	C/G	T/T	T/C	T/C
13.	100030	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
14.	100031	CAT/CAT	C/G	T/T	T/C	T/C
15.	100034	CAT/CAT	C/G	T/T	T/C	T/C
16.	100036	CAT/CAT	C/C	G/G	C/C	T/T
17.	100040	CAT/CAC	C/C	T/G	C/C	T/T
18.	100048	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
19.	100050	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
20.	100051	CAT/CAT	C/C	T/G	C/C	T/T
21.	100054	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
22.	100058	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
23.	100064	CAT/CAT	C/G	T/T	T/C	T/C
24.	100066	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
25.	100070	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
26.	100071	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
27.	100076	CAT/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
28.	100078	CAT/CAT	C/G	T/G	T/C	T/C
29.	100079	CAT/CAC	C/G	T/T	T/C	T/C
30.	101126	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
31.	101130	CAT/CAT	C/G	T/G	C/C	C/C
32.	101148	CAT/CAT	C/G	T/G	C/C	C/C
33.	101170	CAT/CAT	C/G	T/T	C/C	C/C
34.	101176	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
35.	101265	CAT/CAC	C/G	T/T	T/C	T/C
36.	101375	CAT/CAT	G/G	T/T	T/C	C/C
37.	101377	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
38.	101407	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
39.	101420	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
40.	101066	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
41.	101124	CAT/CAT	C/G	T/T	C/C	T/C
42.	101367	CAT/CAT	C/G	T/T	T/C	T/C
43.	101365	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
44.	101366	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
45.	101051	CAT/CAT	G/G	T/T	T/C	C/C
46.	101006	CAT/CAT	C/G	T/T	C/C	T/C
47.	101000	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
48.	100985	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
49.	101372	CAT/CAT	C/G	T/G	T/C	C/C
50.	101282	CAT/CAT	C/G	T/T	C/C	C/C
51.	101283	CAT/CAT	C/G	T/T	C/C	T/C
52.	101285	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
53.	101297	CAT/CAT	C/G	T/G	T/C	C/C
54.	101301	CAT/CAT	C/G	T/T	C/C	C/C
55.	101305	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
56.	101306	CAT/CAT	C/G	T/T	T/C	C/C
57.	101310	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
58.	101276	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
59.	101277	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T

Tablo 4.2 Hb D-Los Angeles heterozigot olgulara ait DNA dizi analizi ikili framework sonuçları

No:	Hb-D Los	Cd 2 (604 F)	nt 16 (613 F)	nt 74 (613 F)	nt 81 (613 F)	nt 666 (614 R)
1.	100192	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
2.	100218	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
3.	100219	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
4.	100220	CAC/CAC	C/C	T/G	C/C	T/T
5.	100221	CAC/CAC	C/C	T/G	C/C	T/T
6.	100222	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
7.	100233	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
8.	100292	CAC/CAC	C/C	T/G	C/C	T/T
9.	100302	CAC/CAC	C/G	G/G	C/C	T/T
10.	100303	CAC/CAC	C/G	G/G	C/C	T/T
11.	100315	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
12.	100322	CAT/CAC	C/G	T/G	C/C	T/C
13.	100324	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
14.	100325	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
15.	100327	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
16.	100330	CAT/CAC	C/G	T/T	T/C	T/C
17.	100425	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
18.	100429	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
19.	100430	CAC/CAC	C/G	G/G	C/C	T/T
20.	100437	CAC/CAC	C/G	G/G	C/C	T/T
21.	100438	CAC/CAC	C/G	G/G	C/C	T/T
22.	100439	CAT/CAC	C/G	T/T	T/C	T/C
23.	100525	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
24.	100526	CAC/CAC	C/G	T/G	C/C	T/T
25.	100560	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
26.	100563	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
27.	100564	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
28.	100565	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
29.	100572	CAC/CAC	C/C	T/T	C/C	T/T
30.	100573	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
31.	100574	CAC/CAC	C/G	G/G	C/C	T/T
32.	100575	CAC/CAC	C/G	T/T	C/C	T/T
33.	100576	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T
34.	100621	CAT/CAC	C/G	T/T	C/C	T/C
35.	100665	CAT/CAC	C/G	T/T	T/C	T/C
36.	100666	CAT/CAC	C/G	T/T	T/C	T/C
37.	100668	CAT/CAC	C/G	T/T	T/C	T/C
38.	100672	CAT/CAC	C/G	T/T	C/C	T/C
39.	100705	CAC/CAC	C/G	G/G	C/C	T/T
40.	101284	CAC/CAC	C/C	G/G	C/C	T/T

4.1 Haplotip Analizi Verilerinin İstatistiksel Olarak İncelenmesi ve Bulgular

Tez çalışmamızda, beta geni framework sonuçları ile Öztürk (2007) tarafından yapılan yüksek lisans tez çalışmasından elde edilen haplotip sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması amacıyla, tüm beta globin gen ailesindeki 7 polimorfik odak test edilerek elde edilen haplotip analizi sonuçlarının Arlequin yazılımı ile istatistiksel analizi yapılmıştır.

4.1.1 Haplotip analizi verilerinden elde edilen AMOVA bulguları

Tablo 4.3 Haplotip sonuçları için, normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarının molekülse varyans analizi.

Farklılığın kaynağı (<i>Source of variation</i>)	Kareler toplamı (<i>Sum of squares</i>)	Varyans bileşenleri (<i>Variance components</i>)	Farklılığın (%) yüzdesi
Popülasyonlar arası	7.411	0.06333 Va	4.27
Bireyler arası	145.500	1.46970 Vc	99.0
Fiksasyon indeksleri (<i>Fixation Indices</i>)			
F_{IS} : -0.03415	p-value = 0.75464 ± 0.01456		
F_{ST} : 0.04266	p-value = 0.00391 ± 0.00185		
F_{IT} : 0.00996	p-value = 0.61975 ± 0.01361		

Tablo 4.4 Haplotip sonuçları için, normal ve Hb S Angeles popülasyonlarının molekülse varyans analizi.

Farklılığın kaynağı	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Farklılığın (%) yüzdesi
Popülasyonlar arası	6.587	0.12991 Va	8.32
Bireyler arası	103.500	1.45775 Vc	93.3
Fiksasyon indeksleri			
F_{IS} : -0.01841	p-value = 0.70772 ± 0.00548		
F_{ST} : 0.08321	p-value = 0.00001 ± 0.00001		
F_{IT} : 0.06633	p-value = 0.51026 ± 0.00501		

4.1.2 Haplotip analizi verilerinden elde edilen gen akışı parametresi bulguları

Tablo 4.5 Haplotip sonuçlarından elde edilen gen akışı parametresi değerleri.

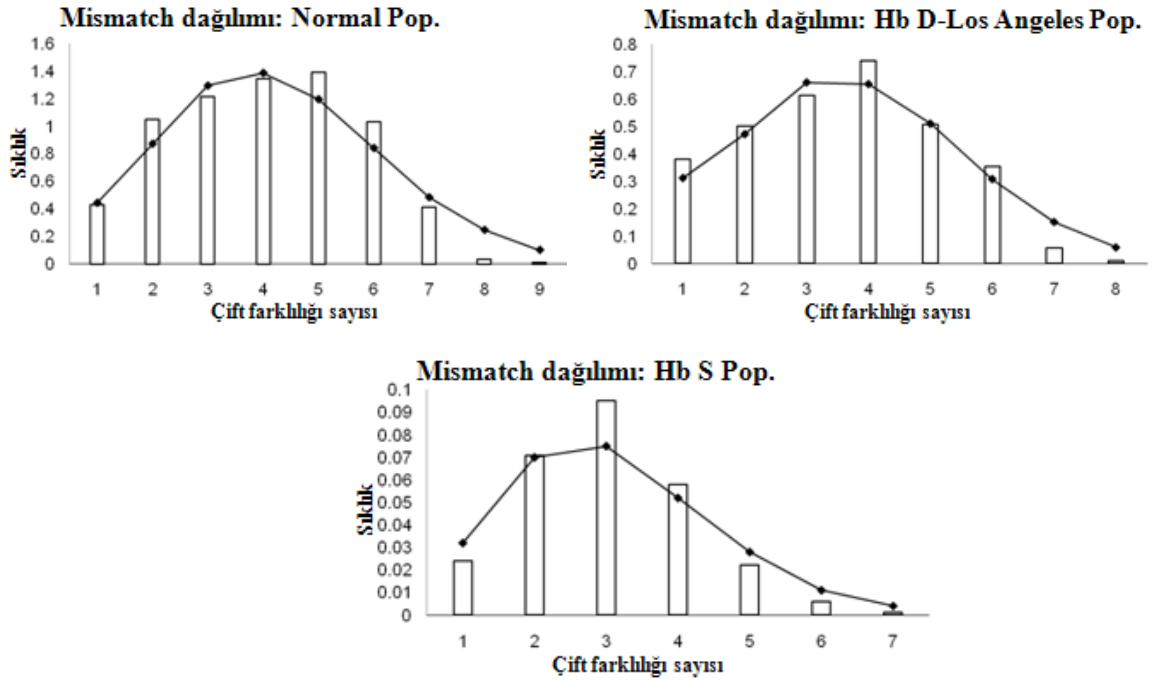
Popülasyon Karşılaştırması (Haplotip)	F_{ST} değeri	Nm değeri	
Normal x Hb D-Los.	0.0426	1.404	Nm > 1.0
Normal x Hb S	0.0832	0.688	Nm < 1.0
Gensel farklılık indeksi (F_{ST}), Gen akışı parametresi (Nm)			

$$Nm = \left(\frac{1}{4\alpha} \right) \left[\left(\frac{1}{F_{ST}} \right) - 1 \right] \quad \alpha = \left[\frac{n}{(n-1)} \right]^2$$

4.1.3 Haplotip analizi verilerinden elde edilen mismatch dağılımı bulguları

Tablo 4.6 Haplotip sonuçlarından elde edilen Mismatch analizi parametreleri.

Nüfussal genişleme	Normal Pop.	Hb D-Los Pop.	Hb S Pop.	Ortalama	Standart Sapma
Tau	3.4	3.1	2.1	2.91927	0.70225
Theta0	0.01758	0.00156	0.0000	0.00638	0.00973
Theta1	25.8203	12.6464	9999.0	33345.8	57723.3
Uyumun mükemmelliği testi	<i>(Test of Goodness of fit)</i>				
SSD	0.00352	0.00304	0.0079	0.00482	0.00269
Model (SSD) p-değeri	0.29000	0.57000	0.3400	0.40000	0.14933
Raggedness indeksi	0.02279	0.02137	0.0753	0.03985	0.03078
Raggedness p-değeri	0.54000	0.80000	0.2200	0.52000	0.29052



4.1.4 Haplotip analizi verilerinden elde edilen neutrality test analizi bulguları

Tablo 4.7 Haplotip sonuçlarından elde edilen neutrality test istatistikleri parametreleri.

İstatistik adı	Normal Pop.	Hb D-Los Pop.	Hb S Pop.	Ortalama	Standart Sapma
Tajima' nın D testi;					
Tajima D	3.00580	1.97688	0.21526	1.73265	1.41121
Tajima D p-değeri	0.99500	0.95300	0.54100	0.82967	0.25087
Fu' nun FS testi;					
FS	-16.88260	-6.37976	-3.86829	-9.04355	6.90398
FS p-değeri	0.00001	0.00500	0.01000	0.00500	0.00500

4.1.5 Haplotip analizi verilerinden elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği bulguları

Tablo 4.8 Normal popülasyon haplotip sonuçlarından elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği p-değeri bulguları.

Lokus	Genotip sayısı	Gözlenen Heterozigotluk	Beklenen Heterozigotluk	P- değeri	Standart Sapma	İşlem Sayısı
1	59	0.44068	0.49718	0.43522	0.00053	1001000
2	59	0.44068	0.50413	0.43454	0.00053	1001000
3	59	0.23729	0.26076	0.60500	0.00049	1001000
4	59	0.37288	0.44039	0.24873	0.00043	1001000
5	59	0.57627	0.50297	0.30386	0.00046	1001000
6	59	0.49153	0.40635	0.19169	0.00040	1001000
7	59	0.45763	0.42083	0.54780	0.00048	1001000

Tablo 4.9 Hb D-Los Angeles popülasyonu haplotip sonuçlarından elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği p-değeri bulguları.

Lokus	Genotip sayısı	Gözlenen Heterozigotluk	Beklenen Heterozigotluk	P- değeri	Standart Sapma	İşlem Sayısı
1	40	0.47500	0.49842	1.00000	0.00001	1001000
2	40	0.47500	0.49842	1.00000	0.00001	1001000
3	40	0.50000	0.44430	0.48953	0.00049	1001000
4	40	0.12500	0.11867	1.00000	0.00001	1001000
5	40	0.60000	0.47468	0.10553	0.00030	1001000
6	40	0.47500	0.36677	0.08208	0.00027	1001000
7	40	0.17500	0.16171	1.00000	0.00001	1001000

Tablo 4.10 Hb S popülasyonu haplotip sonuçlarından elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği p-değeri bulguları.

Lokus	Genotip sayısı	Gözlenen Heterozigotluk	Beklenen Heterozigotluk	P- değeri	Standart Sapma	İşlem Sayısı
1	12	0.58333	0.43116	0.48813	0.00048	1001000
2	12	0.33333	0.28986	1.00000	0.00001	1001000
3	12	0.83333	0.83333	1.00000	0.00001	1001000
4	12	0.33333	0.28986	1.00000	0.00001	1001000
5	12	0.50000	0.38130	0.52900	0.00049	1001000
6	12	0.25000	0.22826	1.00000	0.00001	1001000
7	12	0.33333	0.28986	1.00000	0.00001	1001000

4.1.6 Haplotip analizi verilerinden elde edilen moleksel çeşitlilik analizi bulguları

Tablo 4.11 Haplotip sonuçlarından elde edilen, popülasyonlara ait moleksel çeşitlilik parametreleri bulgusu.

İstatistik adı	Normal Pop.	Hb D-Los Pop.	Hb S Pop.
Çift farklılıkları sayısı (π)	3.0325	2.5629	2.0036
Gen eitliliği (h)	0.9379	0.8791	0.9130
Nükleotid eitliliği	0.4332	0.3661	0.2862
Teta k ($\theta_{(k)}$)	12.6541	6.9301	5.9124
$\theta_{(k)}$; alt sınıır	8.1373	3.9746	2.6522
$\theta_{(k)}$; üst sınıır	19.3448	11.7500	12.8901
Teta H ($\theta_{(H)}$)	13.5585	6.0973	9.1299
s.d. $\theta_{(H)}$	2.2739	1.3426	3.7403
Teta S ($\theta_{(S)}$)	1.3099	1.4132	1.8745
s.d. $\theta_{(S)}$	0.5699	0.6262	0.9013
Teta π ($\theta_{(\pi)}$)	3.0325	2.5629	2.0036
s.d. $\theta_{(\pi)}$	1.7627	1.5405	1.3040

4.2 Framework Analizi Verilerinin İstatistiksel Olarak İncelenmesi ve Bulgular

Çalışmamızda, haplotip analizi için de kullanılan normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı DNA rneklerinin, beta geni framework analizi yapılmıştır. Elde edilen framework analizi verileri Arlequin programı kullanılarak istatistiksel olarak incelenmiştir.

4.2.1 Framework analizi verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ile elde edilen popülasyon içi framework eitleri bulgusu

Çalışmamızda, ilişkili framewok çeşitlerinin ve sıklıklarının belirlenmesi amacıyla ikili framework sonuçlarının istatistiksel analizi yapılmıştır. Alleller üzerinde, nesilden nesile kalıtılma özelliğine sahip olan polimorfik odakların test edildiği framework analizinden elde edilen bulgular ile normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylerin geçmişe dönük gensel izleri istatistiksel olarak araştırılabilmektedir. Literatürde yer alan ve tanımlanmış framework eitleri Tablo 2.5 ve Tablo 4.12' de sunulmaktadır.

Tablo 4.12 İkili Framework analizi sonuçlarından elde edilen framework çeşitleri ve sıklıkları bulgusu.

Normal Olgular				Hb D-Los Angeles Mutasyonlu Olgular			
No:	Framework	%	s.s.	No:	Framework	%	s.s.
1.	CCTCT	27.9	0.041	1.	CCGCT	52.5	0.056
2.	CCGCT	22.9	0.038	2.	CCTCT	16.2	0.041
3.	TGTCC	15.2	0.033	3.	CGGCT	10.0	0.033
4.	TCTCT	8.5	0.025	4.	CGTCC	8.7	0.031
5.	TCTTT	7.6	0.024	5.	TCTTT	6.2	0.027
6.	TGGCC	4.2	0.018	6.	TCTCT	3.7	0.021
7.	TCTCC	4.2	0.018	7.	CGGCC	1.2	0.012
8.	TCGCT	2.5	0.014	8.	CGTCT	1.2	0.012

Beta Geni Framework Çeşitleri Sınıflandırması					
	Codon 2		IVS II		
	nt. 3	nt. 16	nt. 74	nt. 81	nt. 666
FW 1	C	C	G	C	T
FW 2	C	C	T	C	T
FW 3A	T	G	T	C	C
FW 3	T	G	T	T	C

4.2.2 Framework analizi verilerinin AMOVA bulguları

Tablo 4.13 Framework sonuçları için, Normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarının molekül sel varyans analizi.

Farklılığın kaynağı	Kareler toplamı	Varyans bileşenleri	Farklılığın (%) yüzdesi
Popülasyonlar arası	13.953	0.13452 Va	13.86
Bireyler arası	54.000	0.54545 Vc	56.21
Fiksasyon indeksleri			
F_{IS} : 0.34748	p-value = 0.00001 ± 0.00001		
F_{ST} : 0.13861	p-value = 0.00001 ± 0.00001		
F_{IT} : 0.43793	p-value = 0.00001 ± 0.00001		

4.2.3 Framework analizi verilerinden elde edilen gen akışı parametresi bulguları

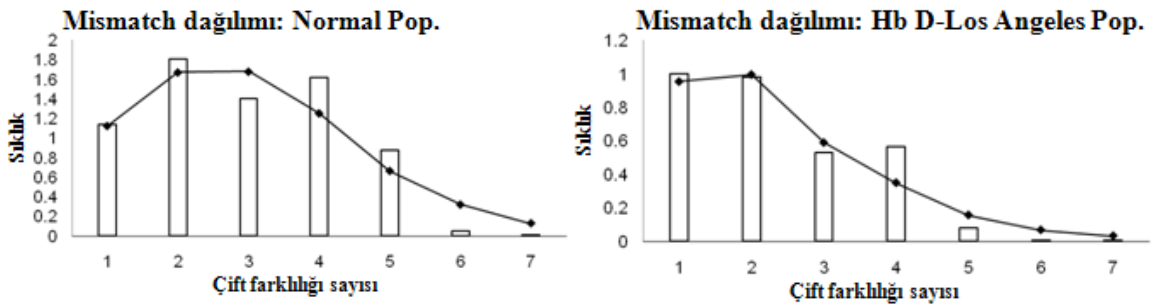
Tablo 4.14 Framework sonuçlarından elde edilen gen akışı parametresi değerleri.

Popülasyon Karşılaştırması (Framework)	F_{ST} değeri	Nm değeri	
Normal x Hb D-Los.	0.1386	0.418	Nm < 1.0
Gensel farklılık indeksi (F_{ST}), Gen akışı parametresi (Nm)			

4.2.4 Framework analizi verilerinden elde edilen mismatch dağılımı bulguları

Tablo 4.15 Framework sonuçlarından elde edilen Mismatch analizi parametreleri.

Nüfussal genişleme	Normal Pop.	Hb D-Los Pop.	Ortalama	Standart Sapma
Tau	2.4	1.8	2.08105	0.41846
Theta0	0.00001	0.05449	0.02725	0.03853
Theta1	9.50684	2.99590	6.25137	4.60393
Uyumun mükemmelliği testi	<i>(Test of Goodness of fit)</i>			
SSD	0.00730	0.00718	0.00724	0.00009
Model (SSD) p-değeri	0.27000	0.52000	0.39500	0.17678
Raggedness indeksi	0.03953	0.04486	0.04219	0.00377
Raggedness p-değeri	0.55000	0.79000	0.67000	0.16971



4.2.5 Framework analizi verilerinden elde edilen neutrality test analizi bulguları

Tablo 4.16 Framework sonuçlarından elde edilen neutrality test istatistikleri parametreleri

İstatistik adı	Normal Pop.	Hb D-Los Pop.	Ortalama	Standart Sapma (s.s.)
Tajima' nın D testi:				
Tajima D	2.17960	0.61529	1.39745	1.10614
Tajima D p-değeri	0.92100	0.67000	0.82967	0.25087
Fu' nun FS testi:				
FS	-2.07967	-1.35697	-1.71832	0.51103
FS p-değeri	0.26000	0.29100	0.27550	0.02192

4.2.6 Framework analizi verilerinden elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği bulguları

Tablo 4.17 Normal popülasyon framework sonuçlarından elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği p-değeri bulguları.

Lokus	Genotip sayısı	Gözlenen Heterozigotluk	Beklenen Heterozigotluk	P- değeri	Standart Sapma	İşlem Sayısı
1	59	0.08475	0.50196	0.00001	0.00001	1001000
2	59	0.40678	0.36506	0.48467	0.00050	1001000
3	59	0.11864	0.42083	0.00001	0.00001	1001000
4	59	0.23729	0.21092	1.00000	0.00001	1001000
5	59	0.25424	0.42083	0.00385	0.00006	1001000

Tablo 4.18 Hb D-Los Angeles popülasyonu framework sonuçlarından elde edilen Hardy-Weinberg eşitliği p-değeri bulguları.

Lokus	Genotip sayısı	Gözlenen Heterozigotluk	Beklenen Heterozigotluk	P- değeri	Standart Sapma	İşlem Sayısı
1	40	0.20000	0.18228	1.00000	0.00001	1001000
2	40	0.42500	0.33892	0.16349	0.00035	1001000
3	40	0.12500	0.46804	0.00001	0.00001	1001000
4	40	0.12500	0.11867	1.00000	0.00001	1001000
5	40	0.20000	0.18228	1.00000	0.00001	1001000

4.2.7 Framework analizi verilerinden elde edilen molekül çeşitlilik analizi bulguları

Tablo 4.19 Framework sonuçlarından elde edilen, popülasyonlara ait molekül çeşitlilik parametreleri bulgusu.

İstatistik adı	Normal Pop.	Hb D-Los Pop.
Çift farklılıkları sayısı (π)	1.920	1.290
Gen çeşitliliği (h)	0.8347	0.6832
Nükleotid çeşitliliği	0.3839	0.2580
Teta k ($\theta_{(k)}$)	3.1464	2.0163
$\theta_{(k)}$; alt sınır	1.6615	0.9290
$\theta_{(k)}$; üst sınır	5.6817	4.1003
Teta H ($\theta_{(H)}$)	4.0861	1.6433
s.d. $\theta_{(H)}$	0.5799	0.3805
Teta S ($\theta_{(S)}$)	0.9356	1.0094
s.d. $\theta_{(S)}$	0.4615	0.5046
Teta π ($\theta_{(\pi)}$)	1.9196	1.2901
s.d. $\theta_{(\pi)}$	1.2181	0.9057

4.2.8 Framework analizi verilerinden elde edilen lokus çiftleri arasındaki LD bulguları

Tablo 4.20 Normal popülasyon framework sonuçlarından elde edilen, bağlantı dengesizliğinin ki-kare istatistiği ile belirlenmesi.

Lokus (1, 2)	LnLHood LD: -101.61215 LnLHood LE: -126.07489 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 48.92549 (P = 0.00001)
Lokus (1, 3)	LnLHood LD: -139.52117 LnLHood LE: -144.94204 Kesin P= 0.00079 ±0.00027 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 10.84173 (P = 0.00099)
Lokus (2, 3)	LnLHood LD: -106.77673 LnLHood LE: -114.90846 Kesin P= 0.00020 ±0.00014 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 16.26347 (P = 0.00006)
Lokus (1, 4)	LnLHood LD: -100.93654 LnLHood LE: -111.32751 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 20.78193 (P = 0.00001)
Lokus (2, 4)	LnLHood LD: -66.04248 LnLHood LE: -81.29393 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 30.50288 (P = 0.00001)
Lokus (3, 4)	LnLHood LD: -96.92680 LnLHood LE: -100.16107 Kesin P= 0.01218 ±0.00109 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 6.46854 (P = 0.01098)
Lokus (1, 5)	LnLHood LD: -105.09482 LnLHood LE: -139.39686 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 68.60408 (P = 0.00001)
Lokus (2, 5)	LnLHood LD: -79.27525 LnLHood LE: -109.36328 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 60.17607 (P = 0.00001)
Lokus (3, 5)	LnLHood LD: -124.26621 LnLHood LE: -128.23043 Kesin P= 0.00634 ±0.00078 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 7.92843 (P = 0.00487)
Lokus (4, 5)	LnLHood LD: -81.43230 LnLHood LE: -94.61589 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 26.36719 (P = 0.00001)

Normal popülasyonda, lokuslar arasındaki anlamlı bağlantı dengesizliği sonuçları histogram gösterimi (anlamlılık seviyesi = 0.0500, $P < 0.05$; (+), $P > 0.05$; (-)).

Lokus	1	2	3	4	5
1	•	+	+	+	+
2	+	•	+	+	+
3	+	+	•	+	+
4	+	+	+	•	+
5	+	+	+	+	•

Tablo 4.21 Hb D-Los Angeles popülasyonu framework sonuçlarından elde edilen, bağlantı dengesizliğinin ki-kare istatistiği ile belirlenmesi.

Lokus (1, 2)	LnLHood LD: -41.35059 LnLHood LE: -50.05797 Kesin P= 0.00010 ±0.00010 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 17.41477 (P = 0.00003)
Lokus (1, 3)	LnLHood LD: -61.15075 LnLHood LE: -69.38317 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 16.46483 (P = 0.00005)
Lokus (2, 3)	LnLHood LD: -77.03652 LnLHood LE: -78.51822 Kesin P= 0.09564 ±0.00282 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 2.96341 (P = 0.08517)
Lokus (1, 4)	LnLHood LD: -25.75397 LnLHood LE: -35.69906 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 19.89018 (P = 0.00001)
Lokus (2, 4)	LnLHood LD: -39.89507 LnLHood LE: -44.83411 Kesin P= 0.00129 ±0.00041 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 9.87808 (P = 0.00167)
Lokus (3, 4)	LnLHood LD: -58.78707 LnLHood LE: -64.15931 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 10.74447 (P = 0.00105)
Lokus (1, 5)	LnLHood LD: -20.46146 LnLHood LE: -40.92292 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 40.92292 (P = 0.00001)
Lokus (2, 5)	LnLHood LD: -41.35059 LnLHood LE: -50.05797 Kesin P= 0.00020 ±0.00014 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 17.41477 (P = 0.00003)
Lokus (3, 5)	LnLHood LD: -61.15075 LnLHood LE: -69.38317 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 16.46483 (P = 0.00005)
Lokus (4, 5)	LnLHood LD: -25.75397 LnLHood LE: -35.69906 Kesin P= 0.00001 ±0.00001 (10100 uygulanan permütasyon sayısı) Ki-kare test değeri = 19.89018 (P = 0.00001)

Hb D-Los Angeles popülasyonunda, lokuslar arasındaki anlamlı bağlantı dengesizliği sonuçları histogram gösterimi (anlamlılık seviyesi = 0.0500, P < 0.05; (+), P > 0.05; (-)).

Lokus	1	2*	3*	4	5
1	•	+	+	+	+
2*	+	•	-	+	+
3*	+	-	•	+	+
4	+	+	+	•	+
5	+	+	+	+	•

5. TARTIŞMA

Normal olarak, bir türe ait popülasyon içinde birbirinden farklı bireyler yer almaktadır. Popülasyon içindeki her birey, türün başka bireyleriyle ortak genleri paylaşmasına rağmen, taşıdığı pek çok gen bakımından diğer bireylerden farklı bir gensel yapıya (genotip) sahiptir. Bir genin farklı allellerinden ve allellerin, popülasyon içerisindeki farklı sıklıklarda dağılımından kaynaklanan bu değişimler, popülasyonun bireyleri arasında, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve davranış özellikleri bakımından çeşitliliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Gen ve gen ürünleri olan proteinler arasındaki bu ve benzeri gensel ilişkiler konusunda hemoglobin molekülü en çok çalışılan model sistemidir. 1980' lerin başından itibaren beta globin gen aileleri filojenez verileri elde edilerek, popülasyonlar arası gensel uzaklık analizleri yapılabilmektedir (Oppenheimer 2012).

Hemoglobin sentezinden sorumlu olan genler, çalışılan popülasyonun tüm bireylerinde ortak olarak yer aldığı halde, içerdikleri mutasyonlar nedeni ile anormal hemoglobinler ve talasemiler gibi toplumlarda gözlenen çeşitliliğe sebep olmaktadır. Bu farklılıklar Hb S gibi orak hücre anemisine yol açan ve dolayısı ile sağlık sorunu oluşturan nitelikte olabileceği gibi, sağlık sorunu oluşturmeyen nitelikler de taşıyabilmektedir. Hb D-Los Angeles, sağlık sorunu oluşturmeyen bu tür bir çeşitlilik örneğidir. Bu gensel çeşitliliklere neden olan işlemlerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar, gen teknolojisinin hızla geliştiği son 60 yılda birçok araştırmanın konusu olmuştur. Gensel çeşitliliğe neden olan mutasyonların geçmişe dönük izlenmesi (*pedigree*), bu mutasyonları taşıyan bireylerin önceki nesiller boyu takibini gerektirmektedir. İlgilenilen DNA bölgesinde yer alan polimorfizm odakları kullanılarak allel sıklıkları hesaplanması ve bu yolla elde edilen verilerin değerlendirilmesi araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir. İngiliz matematikçi Godfrey H. Hardy ve Alman fizikçi Wilhelm Weinberg tarafından geliştirilen matematiksel bir model olan Hardy-Weinberg (HW) kanunu kullanılarak, popülasyonların allel sıklıkları ile ilgili oldukça verimli sonuçlar elde edilmektedir (Klug ve Cummings 2002). HW kanunu gensel çeşitliliğin bir popülasyona ait bireyler arasında nesilden nesile kalıtılabileceğini göstermektedir. İkinci olarak HW kanunu, bir genotipin sıklığının bilinmesi ile diğer genotip sıklıklarının hesaplanabilmesini

sağlamaktadır. Bununla birlikte HW kanunu, bir popülasyondaki heterozigotluk sıklığının hesaplanması için uygun bir yöntem sunmaktadır. Popülasyon düzeyinde yapılan gensel çalışmalarda allel sıklıklarının hesaplanması ve temel olarak HW kanununun kullanılıp homozigot ve heterozigot sıklıklarının, doğal seçim, mutasyon, göç ve gensel sürüklenme olguları altında incelenmesi, ilişki (*association*), bağlantı (*linkage*), ayırım (*segregation*), haplotip analizi, framework analizi gibi konular olasılık ve istatistik modellerinin yardımı ile gerçekleştirilmektedir (YL Tezi; Öztürk 2007).

Bu bakış açısı altında, Denizli yöresinde normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylerin framework ve haplotip analizi ile elde edilen verilerinin istatistiksel olarak karşılaştırmalı analizinin yapılması bu tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır. Bu amaç doğrultusunda, Arlequin (ver. 3.5) yazılımı çerçevesinde çeşitli istatistiksel testler uygulanarak, Hb D-Los Angeles mutasyonunun geçmişe dönük incelenmesi gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, Denizli yöresindeki normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı popülasyonların gensel uzaklık dereceleri, gensel çeşitlilikleri ve nüfussal oluşum süreçleri istatistiksel modeller üzerinden karşılaştırmalı olarak belirlenmiştir.

Talasemiler ve anormal hemoglobinler, dünyada ve özellikle ülkemizin de yer aldığı Akdeniz kuşağında karşılaşılan en yaygın kalıtsal hastalıklar arasında yer almaktadır (Weatherall 2001). Çalışmamıza model olarak seçtiğimiz anormal hemoglobin olan Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln], Türkiye genelinde görülme sıklığı açısından ikinci sırada yer alan bir anormal hemoglobin türüdür. Bu hemoglobin türünün görülme sıklığı % 0,2 olarak verilmektedir (Altay 2002). Bu durum yöremiz için farklılık göstermektedir. Yöremizde evlilik öncesi tarama çalışmalarında karşılaşılan anormal hemoglobinler arasında, Hb D-Los Angeles % 57,8 ile ilk sırada yer almaktadır (Atalay 2005).

Beta globin gen ailesi, ürünleri hemoglobin molekülünün yapısında yer alan alt birimleri kodlayan bölgesel gen grubudur ve 11. kromozomda yer almaktadır. Beta globin gen ailesi içerisinde saptanan polimorfik odaklar özellikle, Hb S ve beta talasemi mutasyonlarına ilişkin biçimde çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Birçok molekül sorunu ile ilişkisi nedeni ile beta globin gen ailesine özgü polimorfizm

odakları son 30 yıl içerisinde araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Chen vd 1990, Currat vd 2002, Falchi vd 2005, Oppenheimer 2012).

Tez çalışmamıza konu olan Hb D-Los Angeles mutasyonu temel bir sağlık sorunu oluşturmamasına karşın, hemoglobinopatilere yönelik premarital tarama çalışmalarında özellikle Hb S ile karıştırılabildiği için özel önem taşımaktadır. Hb D-Los Angeles dünyada birçok ülkede sıklıkla gözlenen anormal hemoglobin türlerinden bir tanesidir. Bunun yanı sıra Hindistan' da ve kuzeybatı Çin' de yaygın biçimde gözlenmesinden dolayı, mutasyonun Orta Asya kökenli olduğu ve göçler yolu ile yayıldığı hipotezi bulunmaktadır (Fioretti vd 1993). Bu hipotezin tartışılabilmesi için, dünyanın farklı bölgelerinde yapılan Hb D-Los Angeles haplotip analizi çalışmalarında, ilgili mutasyonun çoğunlukla Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - + +] ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (Fioretti vd 1993, Perea vd 1999, Rahimi vd 2006). Bunun yanında bu anormal hemoglobine ilişkin farklı gense kökenleri tanımlayan iki adet yeni haplotip türü de bildirilmiştir. Tayland' da beş aileyi kapsayan haplotip analizi çalışmasının verileri doğrultusunda, Hb D-Los Angeles'e ait yeni bir odak olan [- + + - + +] haplotipi tanımlanmıştır (Fucharoen vd 2002). Bir diğeri ise, Denizli yöresinde PAÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı tarafından yapılan çalışmada rapor edilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre, Hb D-Los Angeles'a ait [- + - - + +] haplotipi, dünyada Akdeniz ve Tayland tipinden sonra bildirilen üçüncü farklı odak olma özelliğini taşımaktadır (Atalay vd 2007). Öztürk tarafından, 2007 yılında gerçekleştirilen yüksek lisans tez çalışmasında, Denizli yöresindeki Hb D-Los Angeles olguları ve normal bireylere ait haplotip sıklıklarının sırası ile % 34,6 ve % 26,6 oranlarına sahip biçimde Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - + +] ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bununla beraber, ikinci sırada % 29,8 sıklıkla yer alan [- + + - + +] Tayland tipi haplotip ve üçüncü sırada % 12,5 sıklıkla [+ - - - - +] Haplotip VII olmak üzere Denizli yöresinin Hb D-Los Angeles mutasyonu ile ilişkili haplotip türleri de tanımlanmıştır. Çalışmada haplotip analizinden elde edilen bu sonuçların, dünyada anormal hemoglobinlerin kökeni ve haplotip çeşitliliği ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu anormal hemoglobinlerin Asya ve Afrika gibi bir merkezden, göç yolları ile ilişkilendirilerek yayıldığı varsayımını desteklemediği belirtilmektedir. Bununla beraber, çalışmada, Denizli yöresinde normal popülasyonda ilk sırada yer alan Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - + +]' in aynı zamanda Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan popülasyonda da ilk sırada yer alması, bu mutasyonun yerel haplotip olan Akdeniz

kuşağı haplotip I [+ - - - +] üzerinde işlergesi henüz bilinmeyen bir şekilde gelişmiş olabileceği varsayımı vurgulanmaktadır.

Tez çalışmamızda normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylerin oluşturduğu popülasyonlara ait beta globin gen ailesi içindeki 7 polimorfik odağın test edildiği haplotip analizi verileri istatistiksel olarak incelenmiştir (bkz. Tablo 4.3). Elde edilen molekülse çeşitlilik analizi (AMOVA) sonuçlarına göre iki popülasyon arasında % 4.27 ($F_{ST} = 0.04$, $P < 0.05$) gibi düşük bir gensel farklılık oranı ile popülasyonlar içinde % 99 gibi yüksek bir gensel çeşitlilik oranı saptanmıştır. $F_{ST} \leq 0.05$ olarak belirlenmesi, popülasyonlar arasındaki gensel farklılığın ihmal edilebilir düzeyde, karşılaştırılan popülasyonların gensel olarak çok benzer ve aralarında yüksek gen akışının olduğunu göstermektedir. Hamrick ve Loveless' e (1984) göre akrabalık dışı çiftleşen (*outcrossing*) popülasyonların ortak özelliği popülasyon içi yüksek değerde gensel çeşitlilik ve popülasyonlar arası düşük değerde gensel farklılık olmasıdır. Popülasyonlar arası gen akışı (*gene flow*) arttığında popülasyonlar arası gensel farklılık azalmaktadır. Fiksasyon indeksleri (F-istatistiği) sonuçlarına bakıldığında, popülasyonlar için hesaplanan genel F_{IS} değeri -0,03 olarak belirlenmiştir. Sonuçlar F_{IS} değerinin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($P > 0.05$), böylece iki popülasyonunda Hardy – Weinberg dengesinde olduğunu göstermektedir (Silva vd 2008). F_{IS} değerine göre popülasyonların HW dengesinde olması iki popülasyon için genotip sıklıklarının ortaya çıkışında, haplotip çeşitlerinin ve sıklıklarının nesilden nesile değişmeyeceği ve popülasyonlarda rastgele çiftleşme (random mating) olgusunun hakim olduğu sonucunu ifade etmektedir. Ek olarak F_{IT} ($F_{IT} = 0.009$, $P > 0.05$) değerinin sıfıra yaklaşması, P – değeri bulgusu popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu yani gensel sürüklenme olayının olmadığını göstermektedir. Denizli yöresindeki normal ve Hb S mutasyonu taşıyıcısı bireylerden elde edilen haplotip analizi sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildiğinde ise $F_{ST} = 0.08$, $P < 0.05$ olacak şekilde normal ve Hb D-Los Angeles popülasyon karşılaştırmasından farklı olarak 2 kat daha fazla gensel farklılık gözlenmektedir (bkz. Tablo 4.4). Benzer şekilde F_{IT} , F_{IS} sonuçları ile P – değerleri normal ve Hb S popülasyonlarının gensel olarak benzer olmasa da süreç içinde Hardy – Weinberg dengesini sağladığını ifade etmektedir. F_{ST} fiksasyon indeksi aynı zamanda gen akışı parametresinin (Nm) hesaplanmasında kullanılmaktadır (bkz. Tablo 4.5). Nm parametresi gensel uzaklığın belirlenmesi açısından oldukça yararlı ve güvenilir bilgiler sağlamaktadır. Normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonları haplotip verilerinden elde

edilen sonuçlar açısından karşılaştırıldığında $N_m > 1$ ($N_m = 1,4$), normal ve Hb S popülasyonları karşılaştırıldığında $N_m < 1$ ($N_m = 0,6$) olarak saptanmıştır. N_m değeri bulgularına göre de sonuçlar, Normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarının gensel olarak benzer ve ortak kökene sahip olduğunu desteklemektedir. Normal ve Hb S popülasyonları açısından N_m bulgusu değerlendirildiğinde ise iki popülasyon arasında tarihsel göç gibi bir olayın etkisiyle gensel sürüklenmeden kaynaklanan gensel farklılığın olduğu görülmektedir (bkz. Tablo 4.5).

Haplotip analizi verilerinden elde edilen mismatch dağılımı testi sonuçlarına göre normal, Hb D-Los Angeles ve Hb S popülasyonlarına ait bulgular Tablo 4.6' da sunulmuştur. İlk iki popülasyon için mutasyonel zaman birimini ifade eden Tau değeri istatistiksel olarak birbirine yakın iken, Hb S popülasyonuna ait Tau değeri farklı olarak saptanmıştır. Diğer taraftan θ_0 ve θ_1 , popülasyonun nüfus artışından önceki ve sonraki büyüklük değerleri ilk iki popülasyon için istatistiksel olarak benzer bulunmuştur. Ancak Hb S popülasyonuna ait θ_0 ve θ_1 değerleri normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarından açık bir şekilde farklıdır. Popülasyonlar için rg indekslerinin düşük değerlerde ve SSD P-değerlerinin > 0.05 olması bu popülasyonların nüfussal olarak ortak geçmişe sahip olduğunu göstermektedir (Xiao vd 2011). SSD ve rg indeksleri ilk iki popülasyon için neredeyse eşit olarak bulunmuş iken bu değerler Hb S popülasyonu için açık bir şekilde farklıdır (Bkz Tablo 4.6). Bu durum Hb S popülasyonu için, nüfus artışı değerinin normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarından farklı olduğunu göstermektedir. SSD ve rg indekslerinin p- değerleri, H_0 hipotezinin kabul edilip edilemeyeceğini göstermektedir. Dolayısıyla bu istatistiksel analiz, gözlenen verilerin tahmin edilen ya da beklenene ne kadar iyi uyduğunu, ondan ne kadar farklılık gösterdiğini incelememiz için matematiksel bir temel oluşturur. Bu teste uyumun mükemmelliği (*goodness of fit*) adı verilmektedir. SSD ve rg indekslerinin P değeri < 0.05 ise ani popülasyon yayılması modeli altında, gözlenen çift farklılığı dağılımı beklenenden farklıdır ve dağılım multimodal olarak ortaya çıkmaktadır. H_0 hipotezi dağılımın unimodal olduğunu ifade etmektedir. Buna göre $P > 0.05$ olduğunda H_0 hipotezi kabul edilir ve dağılım unimodaldır denir. Bu sonuç popülasyonlar arasındaki gözlenen ikili çeşitlilik dağılımının, ani popülasyon yayılması modeli altındaki beklenen çeşitlilikten istatistiksel olarak önemli derecede farklı olmadığını göstermektedir. Ayrıca unimodal dağılım, popülasyon nüfusunun herhangi bir kısıtlama veya göç olayı etkisi altında kalmadan üstel olarak düzgün bir şekilde arttığını ifade etmektedir.

Bulgularımızda her popülasyon için SSD ve rg indekslerinde $P > 0.05$ olarak bulunmuş ve dağılımları unimodal olarak belirlenmiştir.

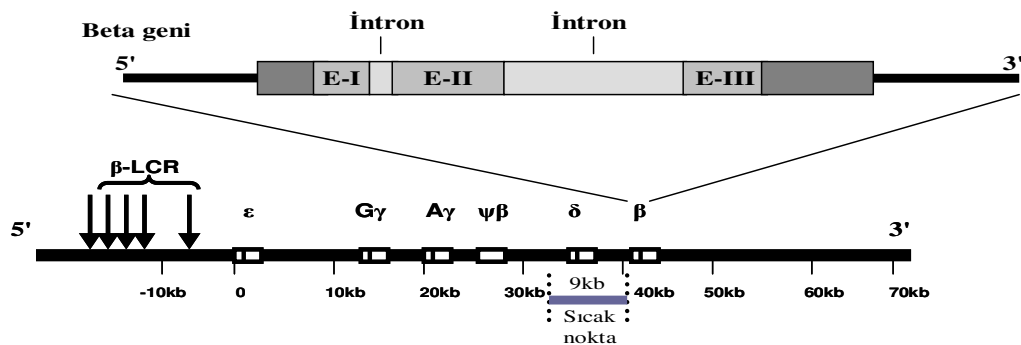
Bu sonuç Hb S popülasyonunun toplam nüfus içinde üstel olarak düzgün bir şekilde arttığını göstermektedir. Ancak popülasyon büyüme parametreleri (θ_0 ve θ_1), mutasyonel zaman (Tau) değeri ile SSD ve rg indekslerine bakıldığında normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonları ortak bir gensel nüfus artışı ve gensel kökeni gösterirken Hb S popülasyonu bunlardan ayrılmaktadır.

Haplotip analizi verilerinin tarafsızlık (*neutrality*) test istatistiği çerçevesinde incelenmesi amacı ile Tajima D ve $F_u F_s$ tarafsızlık testleri uygulanmıştır (bkz. Tablo 4.7). İstatistiksel olarak anlamlı olmayan ($P > 0.05$) Tajima D değeri, popülasyonların nötral dengede olduğunu ifade etmektedir. Böyle popülasyonlarda gözlenen nadir varyasyonların sayısı her zaman düşük olmaktadır. Pozitif Tajima D değeri heterozigotluğun seçilimli bir avantaja sahip olduğunu, negatif Tajima D değeri ise belirli bir allelin diğer allel arasında seçilimli bir avantaja sahip olduğunu ifade etmektedir. Ayrıca negatif değerler bir dış etki ile popülasyonda hızlı nüfus artışı olduğunu ifade etmektedir. Bulgularımız üç popülasyonda pozitif Tajima D değerini ve her biri için $P > 0.05$ olduğunu göstermektedir. Sonuçlar üç popülasyonunda dengede olduğunu ancak Tajima D değerlerine bakıldığında Hb S popülasyonunun diğer iki popülasyondan farklı olduğu görülmektedir. $F_u F_s$ testi nüfussal genişleme hareketlerine oldukça duyarlı bir test olarak ifade edilmektedir. İstatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) kabul edilen negatif F_u test sonuçları incelenen popülasyonların ortak nüfussal büyümeye sahip ve aynı gen havuzuna ait olduklarını ifade etmektedir. Ancak üç popülasyon için $F_u F_s$ testi sonuçlarına bakıldığında, Hb S popülasyonunun gensel köken açısından farklı olduğu açık bir şekilde görülmektedir.

Çalışmamızda haplotip analizi verileri için moleküler çeşitlilik analizi indeksleri belirlenmiştir (bkz. Tablo 4.11). Moleküler çeşitlilik analizi indekslerinden Teta S ve Teta π bir bölgedeki popülasyonlar arasındaki çeşitliliği tanımlamaktadır. Bulgularımızdaki Teta S ve Teta π değerleri normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonları için ortak bir gensel kökeni temsil ederken, Hb S popülasyonunun bu iki popülasyondan gensel köken açısından ayrıldığını desteklemektedir. Ek olarak gen çeşitliliği ve nükleotid çeşitliliği değerleri arasındaki uyum üç popülasyonun dengede olduğunu göstermektedir.

Haplotip analizi verileri incelendiğinde, her üç popülasyondaki odakların Hardy-Weinberg dengesinde ($P > 0.05$) olduğu saptanmıştır (bkz. Tablo 4.8, 4.9 ve 4.10). Allel dağılımının Hardy-Weinberg denkleğine uygunluk gösterip göstermemesi önemlidir. Toplumlarda akrabalık, göç vs gibi belli bir allelin seçilmesine yönelik bir etki olmadığı zaman kuşaklar arasında allel dağılımları rastgele düzenlenir. Akriba evliliklerinin yoğun olması ve göç gibi etkenler popülasyonların Hardy-Weinberg denkleğinden sapmasına neden olmaktadır. Ölçülen değerler ile beklenen değerler arasında gerçek bir fark olmadığı kabul edilerek “sıfır hipotezi” (H_0) kurulmaktadır. Arlequin yazılımında sıfır hipotezi, genotipik sıklıkların beklenen değerde olduğunu ve nesilden nesile değişmeyeceğini ifade etmektedir. Bu durumda haplotip çeşitleri ve sıklıkları bu üç popülasyon için dengeye ulaşmıştır. Denizli yöresindeki Hb D-Los Angeles ile normal popülasyon haplotip analizi verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi, bu iki popülasyonun haplotip çeşitliliği açısından ortak gensel kökeni temsil ettiği varsayımını güçlü bir şekilde desteklemektedir.

Beta globin gen ailesinin 3' ucu tarafında delta (δ) ve beta (β) genleriyle ilişkili yaklaşık dokuz kilobaz uzunluğunda sıcak nokta (hot spot) olarak adlandırılan bölge, gen dönüşümü (*gene conversion*) ve yeniden düzenlenmiş yapılanma (*recombination*) çalışmaları için bilgilendirici veri üretebilen bir odaktır (Şekil 5.1). Beta globin gen ailesinin bir üyesi olan beta geni, bu bölgeye yakınlığı, içinde Hb D-Los Angeles mutasyonunu bulundurması ve framework analizi ile Hb D-Los Angeles mutasyonun polimorfik framework odakları ile ilişkisinden yola çıkılarak mutasyon oluşum işlemlerini anlamaya yönelik veri sağlaması bakımından çalışmamıza konu olmuştur.



Şekil 5.1 İnsan beta globin gen ailesi, beta geni, LCR bölgesi ve sıcak nokta (Ho 2000, Currat vd 2002).

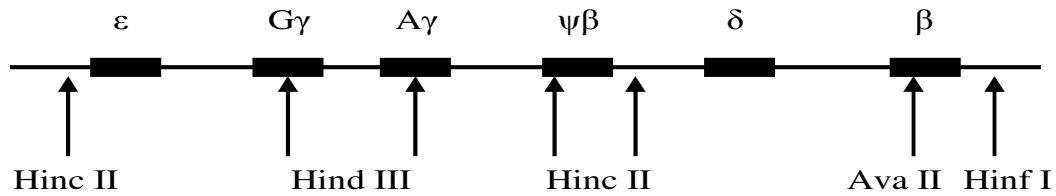
Bu bakış açısı altında Denizli yöresindeki normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan bireylere ait DNA' larda, tüm beta globin geni dizi analizi yöntemi ile incelenmiş ve beta globin genindeki 5 odağı kapsayan framework analizleri gerçekleştirilmiştir (bkz. Tablo 4.12). Buna göre normal popülasyona ait framework çeşitleri ve sıklıkları sırası ile CCTCT (% 27,9), CCGCT (% 22,9), TGTCC (% 15,2) şeklinde belirlenmiştir. Diğer taraftan, Hb D-Los Angeles popülasyonuna ait framework çeşitleri ve sıklıkları ise CCGCT (% 52,5), CCTCT (% 16,2), CGGCT (% 10,0) olarak belirlenmiştir.

Tablo 5.1 Popülasyonlara ait framework analizi sonuçları ve literatürde yer alan framework çeşitleri.

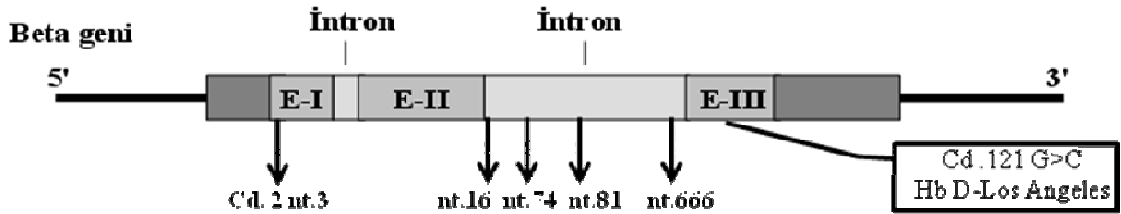
Beş polimorfik odağın yer aldığı beta geni Framework Analizi sonuçları							
Normal Olgular				Hb D-Los Angeles Mutasyonlu Olgular			
No:	Framework	%	s.d.	No:	Framework	%	s.d.
1.	CCTCT	27.9	0.041	1.	CCGCT	52.5	0.056
2.	CCGCT	22.9	0.038	2.	CCTCT	16.2	0.041
3.	TGTCC	15.2	0.033	3.	CGGCT	10.0	0.033
Beta globin gen Framework çeşitleri ve sınıfları (Orkin and Antonarakis, 1982)							
Codon 2		IVSII					
nt 3		nt 16	nt 74	nt 81	nt 666		
FW 1	C	C	G	C	T		
FW 2	C	C	T	C	T		
FW 3A	T	G	T	C	C		
FW 3	T	G	T	T	C		

Framework verilerinin istatistiksel analizi ile elde edilen normal popülasyon Hardy-Weinberg denkliği sonuçlarına göre 1., 3. ve 5. polimorfik lokuslar Hardy-Weinberg dengesinden sapma ($P < 0.05$) göstermektedir (bkz. Tablo 4.17). Bu durum normal popülasyona ait framework çeşitlerinin ve sıklıklarının heterojen bir şekilde dağılımını açıklamaktadır. Bunun yanında Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı popülasyonda sadece 3. polimorfik lokus Hardy-Weinberg dengesinden sapma ($P < 0.05$) göstermektedir (bkz. Tablo 4.18). Bu bulgu, Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı popülasyonda, CCGCT framework çeşidinin sadece 3. lokustaki sapmadan kaynaklanarak % 52.5 gibi yüksek bir değerde ortaya çıkmasını açıklamaktadır. İki popülasyon için de haplotip analizi verilerinden elde edilen, yüksek sıklığa sahip haplotip türünün ortak olmasına, haplotip analizi verileri kullanılarak yapılan çeşitli istatistiksel testlerle bu iki popülasyonun ortak kökene sahip olduğu güçlü bir şekilde

desteklenmesine rağmen framework analizi sonuçlarından elde edilen en yüksek sıklıkla ortaya çıkan framework türlerinin farklı olması bu popülasyonların farklı gensel kökene sahip olduklarını desteklemektedir. Ancak haplotip analizi, tüm beta globin gen ailesi içindeki 7 polimorfik odak incelenmesi ile (Şekil 5.2), framework analizi ise sadece beta geni içinde Hb D-Los Angeles mutasyonuna çok yakın 5 polimorfik odağın incelenmesi ile gerçekleştirilmektedir (Şekil 5.3). İki popülasyonun gensel köken olarak ortak olduğunu gösteren güçlü bulguların olması, beta geni içindeki mutasyonun, framework çeşitliliğine neden olan polimorfik odaklara ait nükleotidin oluşması üzerinde değiştirici bir etkisi olduğunu düşünmemize neden olmaktadır (Şekil 5.3). Bu varsayım iki popülasyon için de ortak olan haplotip türlerinin en yüksek sıklıkta ortaya çıkmasının aksine farklı framework türlerinin yüksek sıklıkta ortaya çıkmasını açıklamaktadır.



Şekil 5.2 Beta globin gen ailesi üzerinde haplotip analizi polimorfik odakları.



Şekil 5.3 Beta geni üzerinde framework analizi polimorfik odakları ve Hb D-Los Angeles mutasyonunun yerleşimi.

Çalışmamızda framework analizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen molekül sel varyans analizi (AMOVA) sonuçlarına göre iki popülasyon arasında % 13.86 ($F_{ST} = 0.13$, $P < 0.05$) gibi haplotip analizi sonuçlarından elde edilen popülasyon arası farklılık değerlerine (% 4.27, ($F_{ST} = 0.04$, $P < 0.05$)) göre yüksek oranda gensel farklılık olduğu gözlenmiştir (bkz. Tablo 4.13). Fiksasyon indeksleri (F-istatistiği) sonuçlarına bakıldığında, popülasyonlar için hesaplanan genel F_{IS} değeri 0,34 ($P < 0.05$) olarak belirlenmiştir. F_{IS} değerinin bire yaklaşması heterozigotluğun azaldığını yani

popülasyon içi seçilimli çiftleşme (*inbreeding*) olayının varlığını ifade etmektedir. (0 ; *random mating* – 1 ; *inbreeding*). Analiz sonucuna göre $p < 0,05$ ise popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinden (HWE) saptığı yorumu yapılmaktadır. Framework analizi sonuçları kullanılarak hesaplanan F_{IS} değeri bulgusu popülasyonların Hardy-Weinberg dengesinden saptığını ve popülasyon içi seçilimli çiftleşme olgusunun varlığını işaret etmektedir. F_{IT} değerinin sifıra yaklaşması p-değerine bağlı olarak popülasyonun Hardy-Weinberg dengesinde olduğunu yani rastgele çiftleşme olayının varlığını, bire yaklaşması ise gensel sürüklenme ve seçilimli çiftleşme olayının varlığını ifade etmektedir (0 ; HWE – 1 ; *genetic drift and inbreeding*). Bulgularımızda F_{IT} değeri $0,43$ ($P < 0.05$) olarak belirlenmiştir. Bu sonuç gensel sürüklenme ve seçilimli çiftleşme gibi olguların varlığına işaret etmektedir. Normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonları framework verilerinden elde edilen bulgular kullanılarak $Nm < 1$ ($Nm = 0,4$) değeri hesaplanmaktadır (bkz. Tablo 4.14). Normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonları açısından framework Nm bulgusu değerlendirildiğinde, haplotip Nm bulgusundan farklı olarak iki popülasyon arasında tarihsel göç gibi bir olayın etkisiyle gensel sürüklenmeden kaynaklanan gensel farklılığın olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Framework analizi sonuçları ile elde edilen F-istatistiği (F_{IS} , F_{ST} , F_{IT}), Nm ve AMOVA bulguları haplotip analizi ile elde edilen bulguları açık bir şekilde desteklememektedir. Hardy-Weinberg dengesi sonuçlarına benzer şekilde bu durum, framework analizi için araştırılan 5 polimorfik odağın nükleotid oluşumunun, Hb D-Los Angeles mutasyonundan etkilenebileceği yorumunu yapmamıza yol açmaktadır. Söz konusu mutasyonun bu etkisi ile, framework verilerinden yola çıkılarak Hb-D Los Angeles popülasyonu ile normal popülasyon arasında yapılan gensel analiz sonuçlarının değişebileceği düşünülmektedir.

Framework analizi verilerinden elde edilen mismatch dağılımı testi sonuçlarına göre normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarına ait bulgular Tablo 4.15’ de sunulmuştur. Bu test, popülasyonların tarihsel nüfus genişleme süreçlerini Teta (θ) parametresi üzerinden modellemektedir. Popülasyonlar için rg indekslerinin düşük değerlerde ve SSD P-değerlerinin > 0.05 olması bu popülasyonların nüfussal olarak ortak geçmişe sahip olduğunu göstermektedir (Xiao vd 2011). Bu bakımdan popülasyon büyüme parametreleri (θ_0 ve θ_1), mutasyonel zaman (Tau) değeri ile SSD ve rg indekslerine bakıldığında, normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarında en sık gözlenen framework türlerinin farklı olmasından etkilenmemiştir ve ortak bir gensel nüfus artışı

ile gensel kökeni gösteren sonuçlar elde edilmiştir. Bulgularımıza göre SSD ve rg indekslerine ait P- değerleri dağılımının unimodal olduğunu göstermektedir. Unimodal dağılım, popülasyon nüfusunun herhangi bir kısıtlama veya göç olayı etkisi altında kalmadan üstel olarak düzgün bir şekilde arttığını ifade etmektedir. Bu durum, framework analizi verilerinden elde edilen mismatch dağılımı testi sonuçlarına göre de yöremizde normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarının nüfussal olarak bir göç olayı ile şekillenmediğini göstermektedir. Popülasyon genişleme parametresi olan Tau değeri, popülasyonun tek bir jenerasyondan son büyüklüğüne ulaşması için geçen zamanı hesaplamaktadır. Rogers tarafından 1995 yılında yayınlanan istatistiksel yöntemle göre $\theta_1 = 2uN_0$, $\theta_2 = 2uN_1$ ve $\tau = 2ut$ (u; mutasyon oranı) parametreleri modellenerek bu parametrelerin güven aralıkları bildirilmiştir. Bu modelde haplotipler verileri ile hesaplanan τ (Tau; mutasyonel zaman birimi) değerinden yola çıkılarak popülasyonun olası yaşı belirlenebilmektedir. Çalışmada insan mitokondriyel nükleotid diverjans oranı güven aralığı milyon yılda % 2 - % 4 olarak ifade edilmektedir. % 4 diverjans oranına karşılık mutasyon oranı $u = 15 \times 10^{-4}$, % 2 diverjans oranına karşılık mutasyon oranı $u = 7.5 \times 10^{-4}$, jenerasyon sayısı $1/2u$ ve jenerasyon yaşı da her jenerasyon başına 25 yıl olarak bildirilmektedir. Bu veriler ile zaman parametresi için güven aralığı 8333–16666 yıl olarak hesaplanmaktadır. Bu zaman parametresinin istatistiksel olarak hesaplanan tau değeri ile çarpımı incelenen gen bölgesi üzerinden, popülasyonun ilk nüfus büyüklüğünden son nüfus büyüklüğüne ulaşmaya kadar geçen zamanı yaklaşık olarak ifade etmektedir (Rogers 1995). Bu bilgiler doğrultusunda; Nükleotid diverjans oranı; % 4 olduğunda, mutasyonel oran; $u = 15 \times 10^{-4}$, jenerasyon sayısı; $1/2u = 1/0.003 = 333.3333$ olarak hesaplanmaktadır. Jenerasyon yaşı her jenerasyon başına 25 yıl ise $333.333 \times 25 = 8333$ yıl alt sınırın yaklaşık değeri olarak belirlenmektedir. Nükleotid diverjans oranı; % 2 olduğunda mutasyonel oran; $u = 7.5 \times 10^{-4}$, jenerasyon sayısı; $1/2u = 1/0.0015 = 666.666$ olarak hesaplanmaktadır. Jenerasyon yaşı her jenerasyon başına 25 yıl ise $666.666 \times 25 = 16666$ yıl üst sınırın yaklaşık değeri olarak belirlenmektedir. Hb D-Los Angeles popülasyonu için, $\tau = 1.8$ olduğundan, $1.8 \times 8333 = 15.000$ yıl ve $1.8 \times 16666 = 30.000$ yıl olarak hesaplanmaktadır. Bu sonuç Hb D-Los Angeles popülasyonunun oluşumunun 15.000 ile 30.000 yıl önce yaklaşık olarak bu aralıkta bir zamana tarihlendiğini göstermektedir. Normal popülasyonu için, $\tau = 2.4$ olduğundan, $2.4 \times 8333 = 20.000$ yıl ve $2.4 \times 16666 = 40.000$ yıl olarak hesaplanmaktadır. Bu sonuç ise normal popülasyonunun oluşumunun 20.000 ile 40.000 yıl önce yaklaşık olarak bu aralıkta bir zamana tarihlendiğini göstermektedir. Tarihsel göç yolları ile ilgili yapılan mtDNA

filojenez, paleoantropolojik, arkeolojik, topocoğrafik, paleoklimatolojik çalışmalar ile fosil bulgularından elde edilen sonuçlar modern insanın yaklaşık 46.000 yıl önce Türkiye üzerinden Avrupa kıtasına göç ettiğini ve kolonizasyon sürecine başladığını göstermektedir (Oppenheimer 2012). Sonuçlarımız normal popülasyonun en erken yaklaşık 40.000 yıl önce Denizli yöresinde kolonize olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar literatürde yer alan gense tabanlı göç zamanı verilerini açık bir şekilde desteklemektedir. Bununla beraber Hb D-Los Angeles popülasyonunun en erken yaklaşık 30.000 yıl önce kolonize olduğu sonucuna ulaşılmaktadır. Literatürde, anormal hemoglobinlerin tarihsel ipek yolu ticareti ve savaşlar aracılığı ile tüm dünyaya yayıldığı varsayımı tartışılmaktadır. Ancak en erken yaklaşık 30.000 yıl gibi çok uzun süre önce olduğu hesaplanan Hb D-Los Angeles mutasyonunun, insanın gelişmişlik düzeyini gösteren ticaret ve savaş gibi çok daha yakın zamana ait tarihlerle ilişkilendirilmiş göç yolları ile yayıldığı varsayımı bulgularımız ile desteklenmemektedir. Sonuçlarımız, model olarak seçtiğimiz Hb D-Los Angeles mutasyonu eğer yöremizde normal popülasyon üzerinde bir dış etki ile kendiliğinden oluşmadı ise yaklaşık olarak 72.000 yıl önce modern insan Afrika kıtasından ayrılırken bu mutasyonu taşıyor olmasını ya da ayrıldıktan sonraki 40.000 yıl içerisinde mutasyonun oluştuğunu desteklemektedir. Bu durum, modern insanın en erken yaklaşık 40.000 yıl önce Anadolu coğrafyasında kolonize olmasının ardından yaklaşık 10.000 yıl sonra Hb D-Los Angeles mutasyonunun ikinci bir göç dalgası ile bölgeye geldiği varsayımının düşünülebileceği anlamına gelmektedir.

Framework analizi verileri test edilerek elde edilen Arlequin bulgularımız iki popülasyonda pozitif Tajima' s D değerini ve her biri için $P > 0.05$ olduğunu göstermektedir (bkz. Tablo 4.16). Bu bulgulara göre iki popülasyonun da dengede olduğu ifade edilebilmektedir. Böyle popülasyonlarda nadir varyasyonların sayısı her zaman düşük olmaktadır. İstatistiksel olarak anlamlı olmayan ($P > 0.05$) negatif Fu' s test sonuçları incelenen popülasyonların ortak nüfussal büyümeye sahip olmadığını ve farklı gen havuzuna ait olduklarını ifade etmektedir. Fu' s testi sonuçları framework analizinde Hb D-Los Angeles mutasyonun, framework odakları üzerinde etkisi olduğu varsayımımızı desteklemektedir.

Çalışmamızda framework analizi verileri için molekülse çeşitlilik analizi indeksleri belirlenmiştir (bkz. Tablo 4.19). Molekülse çeşitlilik analizi indekslerinden Teta S ve

Teta π bir bölgedeki popülasyonlar arasındaki çeşitliliği tanımlamaktadır. Bulgularımızda iki popülasyon için hesaplanan Teta S değerleri neredeyse eşit olarak bulunmuştur. Bu durum normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonları için ortak bir gensel kökeni temsil ederken, Teta π değerleri, çift farklılıklarını referans alarak hesaplanması nedeniyle iki popülasyon için farklılık ifade etmektedir. Hb D-Los Angeles mutasyonunun polimorfik framework odakları üzerindeki değiştirici etkisi bu testte de çift farklılıkları sayılarını değiştirerek kendini göstermektedir.

Son olarak normal ve Hb D-Los Angeles popülasyonlarının framework analizi sonuçlarına bağlantı dengesizliği (*Linkage Disequilibrium, (LD)*) testi uygulanmıştır (bkz. Tablo 4.20 ve 4.21). Birbirine yakın yerleşimli genler ve polimorfik odaklar kuşaklar boyunca bir arada kalıtılırlar. Böylece yeni haplotipler veya frameworkler (rekombinant ürünler) ortaya çıkmamaktadır. Bu olaya bağlantı (*linkage*) adı verilir. Bağlantı dengesizliği (LD) aynı kromozom üzerinde ya da farklı iki kromozom üzerinde yer alan iki ya da daha fazla lokustaki allellerin rastlantısal olmayan bağlantılarıdır. Belirli lokuslardaki polimorfizmlerin rastgele olmayan şekilde birliktelikleri onların bağlantı dengesizliği (LD) ile ölçülür. Bağlantı dengesizliği kavramında tüm bireylerde aynı allel ya da aynı framework türünün seçilmesi durumu aranmaktadır. Arlequin yazılımında LD sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlılığının belirlenmesi için Ki-Kare test istatistiği kullanılmaktadır. Ki-Kare testi ile “iki lokus arasında LD vardır” şeklinde kurulan H_0 hipotezinin ret edilip edilemeyeceğine karar verilmektedir. İstatistiksel olarak $P < 0.05$ şartı sağlandığında H_0 hipotezi kabul edilir. Sıfır (H_0) hipotezinin kabul edilmesi, değişkenlerin birbirinden bağımsız olmadığı, diğer bir ifadeyle, değişkenler arasında bağlantı bulunduğu anlamını taşımaktadır. Çalışmamızda, normal popülasyondan elde edilen bağlantı dengesizliği sonuçlarına bakıldığında tüm lokus çiftleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) biçimde LD belirlenmiştir (bkz. Tablo 4.20). Bu durum normal popülasyonda gözlenen framework çeşitliliğinin ve sıklıklarının sonraki nesillerde de mevcut dağılımını koruyacağını göstermektedir. Ancak Hb D-Los Angeles popülasyonundan elde edilen bağlantı dengesizliği sonuçlarına bakıldığında sadece (2, 3) lokus çiftinde ($P = 0,08517$), istatistiksel olarak $P > 0.05$ olacak biçimde LD tespit edilmemiştir (bkz. Tablo 4.21). Diğer lokus çiftleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) biçimde LD belirlenmiştir. Bu sonuç, Tablo 4.18’ de Hb D-Los Angeles popülasyonu için Hardy-Weinberg denkliği bulgusundaki 3. lokusun ($P < 0.05$) Hardy-Weinberg dengesinden sapması ile uyumlu

olarak framework çeşitliliğinin normal popülasyondan farklı olmasını açıklamaktadır. Aynı kromozom üzerinde birbirine çok yakın yerleşimli genlerin ya da polimorfik odakların mayoz sırasında parça değişimine uğraması (*crossing over*) ve birbirinden bağımsız olarak bir sonraki kuşağa kalıtılması çok zordur. Böylelikle birbirine yakın yerleşimli genler ve polimorfik odaklar kuşaklar boyunca bir arada kalıtılmakta ve yeni haplotipler (rekombinant ürünler) ortaya çıkmamaktadır. Ancak, Hb D-Los Angeles popülasyonu LD sonuçlarına göre, istatistiksel olarak 2. ve 3. lokuslar arasındaki bağlantı gücünün düşük olarak belirlenmesi, birbirine yakın konumda bulunan bu iki polimorfik odağın Hb D-Los Angeles mutasyonu etkisi ile mayoz sırasında parça değişimine uğrayarak birbirlerinden bağımsız biçimde bir sonraki kuşağa aktarılmış olabileceğini düşünmemize neden olmaktadır.

6. SONUÇ

Tüm bu değerlendirmeler ışığında, haplotip analizi verileri kullanılarak gerçekleştirilen istatistiksel analizlerden elde edilen bulgular, normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonlu bireylerin oluşturduğu popülasyonların gensel olarak ortak bir kökene sahip olduğunu güçlü bir şekilde desteklemektedir. Beta geni de dahil olmak üzere, tüm beta globin gen ailesini temsil eden 7 polimorfik odağın test edilmesi ile gerçekleştirilen haplotip analizinin aksine, framework analizi sadece beta genini temsil eden ve Hb D-Los Angeles mutasyonuna yakın 5 polimorfik odağın test edilmesi ile gerçekleştirilmiştir (bkz. Şekil 5.2 ve 5.3). Framework analizi verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi ise haplotip analizi verilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesinden farklı olarak iki popülasyonun ortak gensel köken bulgusunu desteklememektedir. Ancak, Framework analizinin LD, Hardy-Weinberg denkliği, teta S, Tau gibi istatistik sonuçları, iki popülasyon arasındaki bu farklı köken bulgusunun, Hb D-Los Angeles mutasyonunun etkisi ile ortaya çıkabileceğini düşünmemize neden olmaktadır. Çalışmamızda tartışılan tüm bulgular, model olarak seçtiğimiz Hb D-Los Angeles mutasyonunun dünyada farklı kökenleri temsil eden çeşitli haplotipler ile ilişkili olması, Denizli yöresinde normal popülasyon ile karşılaştırıldığında gensel olarak ortak köken bulgusunun desteklenmesi, framework sonuçlarının Hb D-Los Angeles mutasyonunun polimorfik odakların çeşitlenmesinde etkili olabileceği bulgusunu desteklemesi, iki popülasyonda da tek bir jenerasyondan son büyüklüğüne ulaşması için geçen zamanın (Tau) günümüzden oldukça eski bir tarihi ifade etmesi gibi nedenlerden dolayı bu mutasyonun dünyanın farklı bölgelerinde bulunmasını, yakın zamana ait tarihsel göç yolları ile ilişkilendirilerek açıklamaya çalışmanın oldukça güç olduğunu düşünmemize neden olmaktadır.

Sonuç olarak polimorfik odaklar kullanılarak yapılan gensel analiz çalışmalarının giderek yaygınlaşması ile elde edilen verilerin, mutasyon oluşum işlemlerinin tartışılabilmesi ve bu noktadan hareketle olası gen tedavisi çalışmalarının yapılabilmesinde değerli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aguileta, G., Bielawski, J.P., Yang, Z. (2004). Gene conversion and functional divergence in the β -globin gene family. *Journal of Molecular Evolution*, 59: 177–189.
- Altay, Ç. (2002). Abnormal hemoglobins in Turkey. *Turkish Journal of Haematology*, 19 (1): 63–74.
- Akar, E., Akar, N. (2007). A review of abnormal hemoglobins in Turkey. *Turkish Journal of Haematology*, 24: 143–145.
- Akarsu, N. (2006). Haplotip bağlantı (Linkage) analizi. *Türk Farmakoloji Derneği Eğitim Sempozyumu*, 2 Haziran 2006 – Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Van, sf: 20–23.
- Antonarakis, S.E., Orkin, S.H., Kazazian, H.H., Jr., Goff, S.C., Boehm, C.D., Waber, P.G., et al.(1982). Evidence for multiple origins of the β -E-globin gene in Southeast Asia. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 79(21): 6608–11.
- Antonini, E., Brunori, M. (1970). Hemoglobin. *Annual Review of Biochemistry*, 39: 977–1042.
- Ardlie, K.G. et al. (2002). Patterns of Linkage disequilibrium in the human genome. *Genetics*, vol:3 299–309.
- Atalay, EÖ., Atalay, A., Koyuncu, H., Öztürk, O., Kösel, A., Özkan, A., Demirtepe S. (2008). Rare Hemoglobin Variant Hb Yaizu Observed in Turkey, *Medical Principles and Practice*, 17 (4): 321–324.
- Atalay, E.Ö., Atalay, A., Üstel, E., Yıldız, S., Öztürk, O., Kösel, A., Bahadır, A. (2007). Genetic origin of Hb D-Los Angeles according to beta globin gene cluster haplotypes. *Hemoglobin*, 31(3): 387–91.
- Atalay, EÖ., Koyuncu, H., Turgut, B., Atalay, A., Yıldız, S., Bahadır, A., Kösel, A. (2005). High Incidence of Hb-D Los Angeles [β 121(GH4) Glu→Gln] in Denizli province, Aegean Region of Turkey. *Hemoglobin*, 29 (4): 307- 310.
- Athanassiadou, A. (2004). Gene therapy for the haemoglobinopathies. *Journal of Cell and Molecular Biology*, 3:1–7.
- Bansal, A., et al. (2003). Bioinformatics for Geneticists. Edited by Michael R. Barnes and Ian C. Gray ISBNs: 0-470-84393-4 (HB); 0-470-84394-2 (PB), Chapter 11, 218-245.
- Bermek, E., Nurten, R., Tiryaki, D., Gökçe, S. (1997). Biyofizik Ders Notları. *İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Yayınları*, No. 188, İstanbul, s 145–150.
- Bettati, S., Mozzarelli, A., Perutz M.F. (1998). Allosteric mechanism of haemoglobin: rupture of salt-bridges raises the oxygen affinity of the T-structure. *Journal of Molecular Biology*, 281: 581–585.

- Bordbar, A-K., Mousavi, S.H-A. and Dazhampanah, H. (2006). Analysis of oxygen binding by hemoglobin on the basis of mean intrinsic thermodynamic quantities. *Acta Biochimica Polonica*, 53(3): 536–568.
- Borg, J. (2009). Genetic recombination as a major cause of mutagenesis in the human globin gene clusters. *Clinical Biochemistry*, Volume 42, Issue 18, December 2009, 1839–1850.
- Chen, L.Z., Easteal, S., Board, G.P. and Kirk, R.L. (1990). Evolution of β -globin haplotypes in human populations. *Molecular Biology and Evolution*, 7(5):423–437.
- Crow, J.F., Aoki, K. (1984). Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA 8, 6073–6077.
- Curat, M., Excoffier, L. (2004). Modern Humans Did Not Admix with Neanderthals during Their Range Expansion into Europe. *PLoS Biology*, 2(12): e421.
- Curat, M., Trabuchet, G., Rees, D., Perin, P., Harding R.M., Celegg J.B., Langaney, A. and Excoffier L. (2002). Molecular analysis of the β -globin gene cluster in the Niokholo Mandenka population reveals a recent origin of the β^S Senegal mutation. *Journal of Human Genetic*, 70: 207–223.
- Çelebi, G. (2011). Biyofizik Cilt 1. *Barış Yayınları*, Dördüncü Baskı, İzmir, s 44–50.
- Dönbak, L. (2005). Variants of Human Hemoglobin (Hb). *KSU. Journal of Science and Engineering*, 8(2)-2005.
- Efremov, G.D. et al (1982). Hemoglobinopathies in Yugoslavia. *Hemoglobin*, 6 (6), 643–651.
- El-kalla, S., Mathews, A.R. (1997). Hb D-Punjab in the United Arab Emirates *Hemoglobin*, 21(4), 369-375.
- Ewens, W.J. (1972). The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theoretical Population Biology*, 3:87–112.
- Excoffier, L. and Heckel, G. (2006). Computer programs for population genetics data analysis:a survival guide. *Nature Reviews Genetics*, Vol.7: 745–758.
- Excoffier, L., Laval, G.,and Schneider, S. (2006). An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis, *Arlequin ver 3.5.1.3 user manual 2011*. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>
- Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131:479–491.

- Falchi, A., Giovannoni, L., Vacca, L., Latini, V., Vona, G. and Varesi, L. (2005). β -globin gene cluster haplotypes associated with β -thalassemia on Corsica Island. *American Journal of Hematology*, 78: 27–32.
- Fioretti, G., Angioletti M.D., Pagano, L., Lacerna, G., Viola, A., Bonis, C.D., Scarallo, A. and Carestia, C. (1993). DNA polymorphisms associated with Hb D-Los Angeles [β 121(GH4) Glu→Gln] in Southern Italy. *Hemoglobin*, 17(1):9–17.
- Fu, Y. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147:915–925.
- Fucharoen, S., Changtrakun, Y., Surapot, S., Fucharoen, G. and Sanchaisuriya, K. (2002). Molecular characterization of Hb D-Punjab [β 121(GH4) Glu→Gln] in Thailand. *Hemoglobin*, 26(3): 261–269.
- Giardine, B., et al. (2011). Systematic documentation and analysis of human genetic variation in hemoglobinopathies using the microattribution approach. *Nature Genetics*, 20;43(4):295–301.
- Globin Gene Server. WEB_1. (2012). <http://globin.cse.psu.edu/> (Güncelleme; April 2012).
- Hamrick, J.L., Loveless, M.D. (1986). Isozym variation in tropical trees; procedures a preliminary results. *Biotropica*, 18, 201–207.
- Harano, T., Et al. (1987). Hemoglobin D-Los Angeles [β 121 (GH4) Glu→Gln] in Japan. *Hemoglobin*, 11(2), 177–180.
- Hardison, R. (1998). Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *The Journal of Experimental Biology*, 201:1099–1117.
- Hasan, A.U., et al. (2008). Genetic diversity in two sibling species of the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes on Guadalcanal in the Solomon Islands. *BMC Evolutionary Biology*, 8:318.
- Henry, R.E., Bettati, S., Hofrichter, J., Eaton, E.W. (2002). A tertiary two state allosteric model for hemoglobin. *Biophysical Chemistry*, 98 (1–2): 149–164.
- Ho, P.J. (1999). The regulation of β -globin gene expression and β -thalassemia. *Pathology*, 31: 315–324.
- Ho, P.J., Thein S.L. (2000). Gene regulation and deregulation: a β -globin perspective. *Blood Reviews*, 14: 78–93.
- Huisman, T.H.J. (1993). The Structure and Function of Normal and Abnormal Hemoglobins. *Baillieres Clin Haematol*, 6:1–30.
- Huisman, T.H.J. (1995). *Human Hemoglobin*, (Blod Disease of Infancy and Childhood. 7.th ed., Mosby- Year Book. Inc., St Louis: Ed. Miller, D.R., Baehner, R.L).

- Husquinet, H., Parent, M.T. (1986). Hemoglobin D-Los Angeles [β 121 (GH4) Glu→Gln] in the province of Liege, Belgium *Hemoglobin*, 10(6), 587-592.
- Itano, H.A., (1951). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, USA, 37:775.
- Itano, H.A. (1956). The hemoglobins. *Annual Review of Biochemistry*, 25: 331–348.
- Klug, W.S., Cummings, M.R. (2002). Hardy-Weinberg Kanunu, Genetik Kavramlar, Çev. Ed.: Öner, C. *Palme Yayıncılık*, Ankara. s. 686–692.
- Köseler, A., Atalay, A., Koyuncu, H., Turgut, B., Bahadır, A., Atalay, E.Ö. (2006). Molecular identification of a rare hemoglobin variant, Hb J-Iran [β 77(EF1)His>Asp] in Denizli province of Turkey, *Turkish Journal of Haematology*, 23 (3): 164–166.
- Köseler, A., Bahadır, A., Koyuncu, H., Atalay, A., Atalay, E.Ö. (2008). First observation of Hb D-Ouled Rabah [β 19(B1)Asn>Lys] in the Turkish population. *Turkish Journal of Haematology*, 25 (1): 51–53.
- Köseler, A., Koyuncu, H., Öztürk, O., Bahadır, A., Demirtepe, S., Atalay, A., Atalay, E.Ö. (2010). First observation of Hb Tunis [β 124(H2) Pro>Ser] in Turkey, *Turkish Journal of Haematology*, Volume: 27 Issue: 2 Pages: 120-122 DOI: 10.5152/tjh.2010.11.
- Levings, P.P. and Bungert, J. (2002). The human β -globin locus control region. *European Journal of Biochemistry*, 269: 1589–1599.
- Li et al. (1986). A note about the incidence and origin of Hb D-Punjab in Xinjiang, People's Republic of China. *Hemoglobin*, 10(6), 667–671.
- Li, L.Y. (2009). Genetic diversity and historical demography of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in Yellow Sea and Bohai Sea based on mitochondrial DNA analysis. *African Journal of Biotechnology*, Vol. 8 (7), pp. 1193–1202.
- Lischka, A. (1984). Hemoglobin D "Los Angeles" in an Austrian family: biochemical identification, clinical aspects, and kindred study. *Hemoglobin*, 8 (4), 353–361.
- Lukens, J.N., Lee, G.R. (1993). The Abnormal Hemoglobins. *Wintrobe's Clinical Hematology*, Lea and Febiger Com., Pennsylvania: Ed. Lee, G.R., Bithell, C.T., Foerster, J., Athens, J.W., Wkens, J.N.).
- Marinucci, M. (1982). Hemoglobinopathies in Italia. *Hemoglobin*, 6 (3), 247–255.
- Masala, B. (1992). Hemoglobinopathies in Sardinia. *Hemoglobin*, 16 (4), 331–351.
- Oppenheimer, S. (2012). Out-of-Africa, the peopling of continents and islands: tracing uniparental gene trees across the map. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B* 367, 770–784.

- Orkin, S.H., Kazazian, H.H., Jr., Antonarakis, S.E., Goff, S.C., Boehm, C.D., et al. (1982). Linkage of β -thalassaemia mutations and β -globin gene polymorphisms with DNA polymorphisms in human beta-globin gene cluster. *Nature*, 296 (5858): 627–31.
- Öztürk, O., (2007). Denizli yöresinde gözlenen Hb D-Los Angeles mutasyonunun beta globin gen ailesi haplotip analizi. Yüksek lisans tezi. *Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Denizli. 41 sf.
- Öztürk, O., Atalay, A., Kösel, A., Özkan, A., Koyuncu, H., Bayram, J., Demirtepe, S., Aksoy, K., Atalay, E.Ö. (2007). Beta globin gene cluster haplotypes of abnormal hemoglobins observed in Turkey. *Turkish Journal of Haematology*, 24:146–154.
- Papadakis, M.N., Patrinos, G.P. (1999). Contribution of gene conversion in the evolution of the human β -like globin gene family. *Human Genetics*, 104:117–125.
- Pehlivan, F. (2011). Biyofizik. *Hacettepe-Taş*, Beşinci Baskı, Ankara, s 264–266.
- Perea, F.J., Casas-Castaneda, M., Villalobos-Arambula, A.R., Barajas, H., Alvarez, F., Camacho, A., Hermosillo, R.M. and Ibarra, B. (1999). Hb D-Los Angeles associated with Hb S or β -thalassemia in four Mexican Mestizo families. *Hemoglobin*, 23(3): 231–237.
- Perutz, M.F. and Lehmann, H. (1968). Molecular pathology of human hemoglobin. *Nature*, 219: 902.
- Perutz, M.F. (1970). Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin. *Nature*, 228 (5273): 726–739.
- Perutz, M.F. (1978). Hemoglobin structure and respiratory transport. *Scientific American*, 239 (6): 92–125.
- Petraglia, M.D., et al. (2010). Out of Africa: new hypotheses and evidence for the dispersal of Homo sapiens along the Indian Ocean rim. *Annals of Human Biology*, May–June 2010; 37(3): 288–311.
- Rahbar, S., Blume, K. (1983). Hemoglobinopathies in the Los Angeles area. *Hemoglobin*, 7(3), 291–295.
- Rahimi, Z., Akramipour, R., Nagel, R.L., Ahmadi, A.S., Merat, A. and Bahrehmand, F. (2006). The β -globin gene haplotypes associated with Hb D-Los Angeles [β 121(GH4) Glu→Gln] in Western Iran. *Hemoglobin*, 30(1): 39–44.
- Rogers, A.R. (1995). Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49, 608–615.
- Rogers, A.R., Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 552–569.

- Schneider, S., Excoffier, L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152, 1079–108.
- Schneider, J.A., Peto, T.E.A., Boone, R.A., Boyce, A.J. and Clegg, J.B. (2002). Direct measurement of the male recombination fraction in the human β -globin hot spot. *Human Molecular Genetics*, 11(3): 207–215.
- Schrier, S.L. (1994). Thalassemia: pathophysiology of red cell changes. *Annual Review of Medicine*, 45: 211–218.
- Silva, E.F., et al. (2008). Diversity and genetic Structure of natural fragmented population of Tapirira Guianensis Aubl. In northeastern Brazil. *Bioremediation biodiversity an bioavailability 2, (special issue 1)* 35–40.
- Slatkin, M. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139: 457–462.
- Slatkin, M., Barton N.H.A. (1989). Comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. *Evolution*, 43 1349–1368.
- Slatkin, M., Hudson, R.R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129, 555–562.
- Stephens J.C., et al. (2001). Haplotype Variation and Linkage Disequilibrium in 313 Human Genes. *Science Express*, 12 July 2001,10.1126/science.1059431.
- Szelenyi, J., et al. (1983). Hemoglobinopathies in Hungary. *Hemoglobin*, 7(3), 297–299.
- Tajima, F. (1989a). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585–595.
- Tajima, F. (1989b). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123:597–601.
- Tajima, F. (1993). Measurement of DNA polymorphism. In: Mechanisms of Molecular Evolution. Introduction to Molecular Paleopopulation Biology, edited by Takahata, N. and Clark, A.G., Tokyo, Sunderland, MA: *Japan Scientific Societies Press, Sinauer Associates, Inc.*, p. 37-59.
- Tokarev, Y.N., Spivak, V.A., (1982). Heterogeneity and distribution of hemoglobinopathies in some parts of the USSR. *Hemoglobin*, 6 (6) , 653–660.
- Üstel, E., (2006). Anormal hemoglobinlerin SPR yöntemi ile gen düzeyinde tanısı. Yüksek lisans tezi. *Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Denizli. sf:45.
- Vella, F., Lehmann, H., (1974). Haemoglobin D Punjab (D Los Angeles). *Journal of Medical Genetics*, 11: 341.

- Wada, Y. (2002). Advanced analytical methods for hemoglobin variants. *Journal of Chromatography B*, 781: 291–301.
- Watterson, G., (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology*, 7: 256–276.
- Weatherall, D.J., Clegg, J.B. (2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, 79(8): 704–712.
- Weir, B.S., Anderson, A.D. and Hepler, A.B. (2006). Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. *Nature Reviews Genetics*, 7: 771–780.
- Weir, B.S. and Cockerham, C.C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38:1358–1370.
- Welch, S.G., Bateman, C. (1993). Hb D-Neath or β 121 (GH4) Glu→Ala: a new member of the Hb D family. *Hemoglobin*, 17(3), 255-259.
- Xiao, Yongshuang., Yan, Zhang., Takashi, Yanagimoto., Jun, Li., Zhizhong, Xiao., Tianxiang, Gao., Shihong, Xu., Daoyuan, Ma. (2011). Population genetic structure of the point-head flounder, *Cleisthenes herzensteini*, in the Northwestern Pacific. *Genetica*, 139:187–198.
- Xing, Jinchuan., et al. (2009). Toward a more uniform sampling of human genetic diversity: A survey of worldwide populations by high-density genotyping. *Genomic*, 96, 199–210.
- Zago, M.A., Costa, F.F., (1988). Hb D-Los Angeles in Brazil: simple heterozygotes and associations with δ -thalassemia and with Hb S. *Hemoglobin*, 12(4), 399-403.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Manisa’ da doğdu. İlkokul eğitimini Edirne’ de, ortaokul ve lise eğitimini Denizli’ de tamamladı. Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü lisans programından 2004 yılında mezun oldu. Aynı yıl, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalında özel öğrenci statüsünde eğitim aldı ve 2004–2007 yılları arasında yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2007 yılında Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. 2009 yılında Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı bünyesinde öğretim elemanı olarak görev yaptı. Aynı anabilim dalında 2011–2012 eğitim-öğretim yılı içerisinde öğretim görevlisi olarak görev aldı.