



ANORMAL HEMOGLOBİNLERİN TANISINDA MLPA TASARIMI

Çağrı COŞKUN

**Temmuz 2010
DENİZLİ**

ANORMAL HEMOGLOBİNLERİN TANISINDA MLPA TASARIMI

**Pamukkale Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi
Biyofizik Anabilim Dalı**

Çağrı COŞKUN

Danışman: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

**Temmuz 2010
DENİZLİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ ONAY FORMU

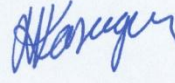
Çağrı ÇOŞKUN tarafından, Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY yönetiminde hazırlanan “**Anormal Hemoglobinlerin Tanısında MLPA Tasarımı**” başlıklı tez tarafımızdan okunmuş kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY
Jüri Başkanı (Danışman)

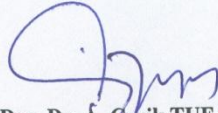


Doç. Dr. Ayfer ATALAY
Jüri Üyesi



Yrd. Doç. Dr. Nedim KARAGENÇ
Jüri Üyesi

Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 10.07.2018 tarih ve 2018/13-4 sayılı kararıyla onaylanmıştır.




Doç. Dr. A. Çevik TUFAN
Müdür

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenciliğim boyunca, öğrenimim ve eğitimim için desteklerini esirgemeyen değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY ve anabilim dalımız öğretim üyesi Sayın Yrd. Doç. Dr. Ayfer ATALAY' a teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım sırasında katkıda bulunan bölümümüz asistanlarına ve her zaman yanımda olan aileme çok 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

: 
: Çağıl COŞKUN

ÖZET

ANORMAL HEMOGLOBİNLERİN TANISINDA MLPA TASARIMI

Coşkun, Çağıl
Yüksek Lisans Tezi, Biyofizik ABD
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

Temmuz 2010, 57 sayfa

MLPA, Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification kelimesinin baş harflerinden oluşmuş olup, ligasyona bağımlı çoklu prob amplifikasyonu anlamına gelmektedir. Yöntem ilk olarak Schouten ve ark. tarafından 2002 yılında tanımlanmıştır ve MLPA yöntemiyle birden fazla odaktaki gen delesyonları ile duplikasyonları tek bir reaksiyonla tanımlanabilmektedir. Çalışılan bölgedeki gen miktarlarının belirlenmesi amacıyla taşıyan MLPA yönteminde, gen bölgelerinde tek veya her iki allelde meydana gelebilecek delesyonlar ve duplikasyonlar nedeni ile oluşan gen miktarlarındaki artış ve azalışlar görüntülenebilmekte ve hesaplanabilmektedir.

Anormal hemoglobine yol açan globin gen yapısındaki değişiklikler proteinin yapı ve işlevine yansımaktadır. Elektroforetik ve kromatografik yöntemlerle anormal hemoglobinlerin davranış değişikliği, DNA dizi analizi ile değişikliğe neden olan gensel özellik saptanıp anormal hemoglobin kimliklendirilmesi gerek toplum ve gerekse de premarital (doğum öncesi) taramalarda birçok zorlukla karşılaşılabilmektedir.

Tez çalışmasında; Hb S için bir MLPA sistemi tasarlanarak, MLPA yöntemi ile Hb S modelinde ilgili mutasyonun tanımlanması ve tek nükleotit değişikliklerinin saptanmasında MLPA yönteminin kullanılabilirliği irdelenmiştir. Çalışmamızda Pamukkale Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı DNA bankasından Hb S heterozigot ve Hb S homozigot örnekler kullanılmıştır. Bu amaçla, hem beta globin geninin 6. kodonunda meydana gelen $GAG > GTG$ mutasyonu ile oluşan Hb S' in, hem de kodon 2 $CAC > CAT$ ve kodon 5 $-CT$ polimorfizmlerinin varlıklarının MLPA yöntemi üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Sonuç olarak, MLPA yönteminin, geliştirilmesi ve sonuçların daha özgün hale getirilmesi ile anormal hemoglobinlerin ve tek nükleotit değişikliklerin belirlenmesinde bir tanı yöntemi olarak kullanılabilirliğine ilişkin veriler elde edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anormal Hemoglobin, Hb S, SNP, MLPA, Bioteknoloji

ABSTRACT**MLPA APPROACH IN ABNORMAL HEMOGLOBIN RECOGNATION**

Coşkun, Çağıl
MSc Thesis, Biophysics
Supervisor: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

July 2010, 57 pages

MLPA (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) is a multiplex PCR method described by Schouten et al in 2002. This method includes the detection of exon deletions, duplications and abnormal copy numbers of different genomic DNA samples, also allows multiple targets to be amplified with only a single primer pair. Dosage quotients may be calculated for any pair of amplicons caused by any gene deletion or duplication.

Abnormal hemoglobins present different electrophoretic and chromatographic behaviors. These genetic differences can be identified with DNA sequencing methods. These molecular methods pose some difficulties in the molecular diagnosis of abnormal hemoglobins also with cost ineffective problems in premarital and prenatal diagnostic approaches.

In this thesis study, Hb S was used as an abnormal hemoglobin target and probe consists of a two oligonucleotides which recognise target sites on the DNA or PCR product. Heterozygous and homozygous Hb S samples were from DNA Bank in Pamukkale University Department of Biophysics. According to the obtained results, in beta globin gene mutation on sixth codon resulting GAG>GTG, on second codon polymorphism CAC>CAT and fifth codon mutation resulting –CT were investigated by MLPA method. Depending on our results, we can conclude that as a diagnostic approach, MLPA method can be improved to detect abnormal hemoglobin variants and single nucleotide differences.

Key Words: Abnormal Hemoglobin, Hb S, SNP, MLPA, Biotechnology

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
İçindekiler	v
Şekiller Dizini	vi
Tablolar Dizini	vii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Hemoglobin Yapısı ve İşlevi.....	3
2.2 Globin Genlerinin Yapısı ve İşlevi.....	4
2.3 Hemoglobin Türleri.....	5
2.4 Anormal Hemoglobinler.	7
2.5 Anormal Hemoglobinlerin Laboratuvar Tanısında Kullanılan Yöntemler.....	10
2.5.1 Protein Düzeyindeki Yöntemler.....	10
2.5.2 Gen Düzeyindeki Yöntemler.....	11
2.6 MLPA Yöntemi.....	15
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	23
3.1 Örneklerin Seçimi.....	23
3.2 DNA Dizi Analizi.....	24
3.3 MLPA Tasarımı.....	25
3.4 MLPA Yöntemi.....	26
3.4.1 Örneklerin PCR Yöntemiyle Kalıplarının Hazırlanması.....	27
3.4.2 Hibritleşme.....	28
3.4.3 Ligasyon.....	29
3.4.4 Hedef DNA Denatürasyonu ve Probların Amplifikasyonu.....	30
3.4.5 Kapiler Elektroferezde Fragment Analizi.....	31
4. BULGULAR	32
4.1 Mg ²⁺ Optimizasyonu.....	34
4.2 Sıcaklık Optimizasyonu.....	35
4.3 Örneklerin PCR Kalıpları ile Yapılan Çalışmalar.....	37
4.4 Örneklerin PCR Kalıpları ile Genomik DNA'larının Birlikte Çalışılması.....	40
4.5 Genomik DNA Örnekleri ile Yapılan Beş'li Çalışmalar.....	41
5. TARTIŞMA	47
6. SONUÇ.....	52
7. KAYNAKLAR.....	53
8. ÖZGEÇMİŞ.....	57

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 2.1 Globin genleri.....	5
Şekil 2.2 β ve δ globin zincirlerindeki amino asit farklılıkları	6
Şekil 2.3 Globin genleri üretim dönemleri	6
Şekil 2.4 İnsan globin genleri	7
Şekil 2.5 Dde I enzim kesim sonuçları	12
Şekil 2.6 SPR spektroskopisinde rol alan fiziksel olaylar.....	14
Şekil 2.7 MLPA prob elemanları	16
Şekil 2.8 Hedef DNA denatürasyonu.....	17
Şekil 2.9 Hibritleşme.....	17
Şekil 2.10 Ligasyon.....	18
Şekil 2.11 Ligasyon sonrası hedeften ayırma ve problemlerin amplifikasyonu.....	18
Şekil 2.12 Birden fazla sayıda prob kullanıldığında gen miktarlarının belirlendiği formül.....	19
Şekil 2.13 Kapiler elektroforezde tek bir probun fragment analiz sonucu.....	19
Şekil 2.14 α globin zincirinde meydana gelen gen delesyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmada elde edilen ham veriler.....	20
Şekil 2.15 α globin zincirinde meydana gelen gen delesyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmada kullanılan standart büyüklükler.....	21
Şekil 2.16 α globin zincirinde meydana gelen gen delesyonlarının belirlenmesinde kullanılan problemlerin gen üzerine yerleşimi ve delesyonların meydana geldiği bölgeler.	21
Şekil 2.17 Sağlıklı bireye ait deney sonuçları.....	22
Şekil 2.18 Alfa talasemili bireye ait deney sonuçları.....	22
Şekil 3.1 Beta globin gen ailesi.....	25
Şekil 3.2 Prob tasarımı.....	26
Şekil 4.1 Örnek çoğaltılmış prob PCR sonucunun kapiler elektroforez görüntüsü...	32
Şekil 4.2 Örnek çoğaltılmış prob PCR sonucunun kapiler elektroforez görüntüsü...	33
Şekil 4.3 Örnek çoğaltılmış prob PCR sonucunun kapiler elektroforez görüntüsü...	33
Şekil 4.4 Çalışmada kullanılacak standart büyüklüklerin kapiler elektroforez görüntüsü.....	34
Şekil 4.5 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.6 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması.....	36
Şekil 4.7 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması.....	37
Şekil 4.8 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması.....	38
Şekil 4.9 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması.....	39
Şekil 4.10 101656 numaralı örneğin kalıp PCR ürünlerinin pik yükseklik / pik alanı sonuçları.....	41
Şekil 4.11 101656 numaralı örneğin genomik DNA' sının pik yükseklik / pik alanı sonuçları.....	41
Şekil 4.12 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması.....	43
Şekil 4.13 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması.....	44
Şekil 4.14 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması.....	44
Şekil 4.15 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması.....	45
Şekil 4.16 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması.....	46

TABLOLAR DİZİNİ

	SAYFA
Tablo 2.1 Türkiye’de saptanan anormal hemoglobin türleri	8
Tablo 2.2 Türkiye’de 2002 yılından sonra belirlenen anormal hemoglobin türleri.....	9
Tablo 2.3 Denizli yöresinde saptanan anormal hemoglobinler.....	9
Tablo 3.1 Çalışmamızda kullanılan örnekler.....	24
Tablo 3.2 DNA dizi analizinde kullanılan primerler.....	24
Tablo 3.3 DNA dizi analizi reaksiyon karışımı.....	25
Tablo 3.4 PCR karışımı.....	27
Tablo 3.5 İlgili bölgeye özgü primer çifti.....	27
Tablo 3.6 Kalıpların hazırlanması için kullanılan sıcaklık döngü programı....	28
Tablo 3.7 Hib _{mix}	28
Tablo 3.8 Hibridizasyon işlemi için kullanılan sıcaklık döngü programı.....	28
Tablo 3.9 Lig _{mix}	29
Tablo 3.10 Ligasyon işlemi için kullanılan sıcaklık döngü programı.....	29
Tablo 3.11 PCR karışımı.....	30
Tablo 3.12 Problemlere özgü primer çifti.....	30
Tablo 3.13 Problemlerin amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngü programı.	30
Tablo 3.14 Fragment analizi için reaksiyon karışımı.....	31
Tablo 4.1 Mg ²⁺ titrasyonu verileri.....	35
Tablo 4.2 62 °C’de örneklerin fragment analiz verileri.....	35
Tablo 4.3 63 °C’de örneklerin fragment analiz verileri.....	36
Tablo 4.4 62 °C’de Hb S homozigot örneklerin fragment analizi.....	37
Tablo 4.5 62 °C’de örneklerin fragment analizi.....	38
Tablo 4.6 60 °C’de örneklerin fragment analizi.....	39
Tablo 4.7 62 °C’de 101656 numaralı örneğin PCR ürünleri ve genomik DNA’sının fragment analizi.....	40
Tablo 4.8 60 °C’de 101656 numaralı örneğin genomik DNA fragment analiz sonuçları.....	42
Tablo 4.9 62 °C’de 101656 numaralı örneğin genomik DNA fragment analiz sonuçları.....	42
Tablo 4.10 62°C’de 102280 numaralı örneğin fragment analiz sonuçları.....	43
Tablo 4.11 62°C’de 101671 numaralı örneğin fragment analiz sonuçları.....	43
Tablo 4.12 62°C’de 100963 numaralı örneğin fragment analiz sonuçları.....	44
Tablo 4.13 62°C’de 102613 numaralı örneğin fragment analiz sonuçları.....	45
Tablo 4.14 60°C’de 102280 numaralı örneğin fragment analiz sonuçları.....	45
Tablo 5.1 Çalışmamızda kullanılan örnekler ve deneysel çalışma sonuçları.....	49

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

2,3 DPG:	2,3 Difosfogliserat
CMC:	Karboksimetilselüloz
dNTP:	Deoksiribonükleotid trifosfat
ddNTP:	Dideoksiribonükleotid trifosfat
DEAE:	Dietilaminoetil
DNA:	Deoksiribonükleik asit
DTCS:	Dye Terminator Cycle Sequencing
HPLC:	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
MLPA:	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
PCR:	Polimeraz zincir reaksiyonu
RNA:	Ribonükleik asit
SPR:	Surface plasmon resonance spectroscopy
UBA:	Uzunluğu belirli aralık

1. GİRİŞ

Hemoglobin bozuklukları, gerek ülkemizde gerekse dünyada rastlanan en önemli kalıtsal hastalıklardandır (Weatherall 2001, Altay 2002, Akar 2007). Globin genlerinin yapısında bulunan ekzonlarda oluşan mutasyonlar, amino asit kodlarının değiştirmektedir. Bunun sonucunda kalıtsal klinik sorunlara sebep olan anormal hemoglobinler olduğu gibi, herhangi bir klinik belirti göstermeyen ve kalıtım yolu ile aktarılabilen anormal hemoglobinler de ortaya çıkmaktadır (Huens 1970). Anormal hemoglobinlerin belirlenmesinde hem protein düzeyindeki yöntemler, hem de gen düzeyindeki yöntemler kullanılmaktadır. Protein düzeyindeki yöntemlerden kromatografik ve elektroforetik yöntemlerin kullanılması anormal hemoglobinlerin kesin tanısından daha çok bir ön tanısı şeklinde olmaktadır. Bu hemoglobinlerin kesin tanısı gen düzeyindeki yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Gen düzeyindeki yöntemlere restriksiyon enzim kesimi, SPR spektroskopisi ve DNA dizi analizi örnek verilebilir. Restriksiyon enzim kesiminin uygulanmasındaki temel sorun, enzim tanıma bölgesinde gerçekleşebilecek farklı mutasyonların da benzer sonuç vermesinden kaynaklanmaktadır. SPR spektroskopisi kullanımındaki temel sorun ise, sensör yüzeylerinin kaplanması, temizlenmesi, analit miktarları ve ayrıntılı saha çalışmalarının henüz başlangıç aşamasında olmasıdır. DNA dizi analizi yönteminin, zaman ve ekonomik sorunları nedeniyle kullanımı sınırlı kalmaktadır.

Birçok hastalığı gen düzeyinde anlaşılır kılan DNA düzeyinde yapılan molekül sel tanımlamaya yönelik yöntemler hızlı ve artan biçimde gelişmektedir. Yeni gelişen tanı yöntemlerinden biri olan MLPA, uygulama kolaylığı, yüksek duyarlılığı, güvenilirliği, göreceli ucuzluğu ve tek bir reaksiyonda 40' dan fazla farklı odağın incelenmesini olanak kılan bir yöntemdir.

Hb S, orak hücre anemisini oluşturan yani kalıtsal klinik bir sebebe neden olan bir anormal hemoglobin türüdür. Beta globin geninin 6. kodonunda yer alan glutamik asit (GAG) yerine valin (GTG) geçmesiyle oluşan Hb S' in belirlenmesinde hem protein düzeyindeki yöntemler hem de gen düzeyindeki yöntemler kullanılmaktadır (Itano 1956).

Bu tez çalışmasında, Hb S anormal hemoglobinin belirlenmesinde kullanılmak üzere bir MLPA probu tasarlanarak, elde edilen sonuçlar ile bu anormal hemoglobin türünün belirlenmesi ayrıca tek nükleotit değişimleri için MLPA yönteminin uygunluğunun ve bir tanı yöntemi olarak kullanılabilirliğinin değerlendirilmesi amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Hemoglobin Yapısı ve İşlevi

Hemoglobin, eritrositler içerisinde bulunan ve yaklaşık olarak 65000 dalton ağırlığa sahip olup, her biri yapısında demir atomu içeren hem grubu bulunduran dört polipeptit zincirinden oluşmuş tetramerik yapıya sahip bir metaloproteindir. Bu globin zincirleri farklı gen aileleri tarafından kodlanmaktadır. İki zincir, 16. kromozomda bulunan α -benzeri globin genleri (α veya ζ), diğer iki zincir ise 11. kromozomda β -benzeri globin genleri (ϵ , γ , δ veya β) tarafından kodlanmaktadır (Fathallah 2006). İlk defa 1959 yılında x-ışını kristallografisi yöntemi ile hemoglobin molekülünün yapısı belirlenmiş, ayrıca bu çalışma bir proteinin 3 boyutlu yapısının başarılı bir şekilde gösterildiği ilk çalışma olmuştur (Collins 1984, Perutz 1960, Perutz 1978). Başlıca görevi, oksijenin solunum organlarından dokulara, karbondioksitin ise dokulardan solunum organlarına taşınması olan hemoglobinin diğer bir özeliği ise fizyolojik yapılanmada güçlü bir tampon sistemi oluşturmasıdır. Deoksihemoglobinin protonlara ilgisinin yüksek olması, hemoglobin molekülünün kandaki derişiminin yüksek ve içerisindeki amino asitlerin pK değerlerinin fizyolojik pH' a yakın olması, kanın ve diğer vücut sıvılarının pH değerini sabit tutmasına yardımcı olmaktadır. Hemoglobinin ayrıca CO ve NO' nun bağlanmasında ve taşınmasında da önemli bir görevi vardır. Nitrik oksit, hemoglobindeki sistein bölgelerine ve hem gruplarındaki demirlere bağlanarak kan damar çeperlerinin gevşemesini sağlar ve bu sayede kan basıncını azaltarak basıncın düzenlenmesine yardımcı olmaktadır (Perutz 1978, Schechter 2008, Bermek 1997). Toksik bir gaz olan CO' nun ise O₂ yerine hem grubuna bağlanması, hemoglobin molekülünün normal O₂ bağlama ve taşıma görevini engellemektedir.

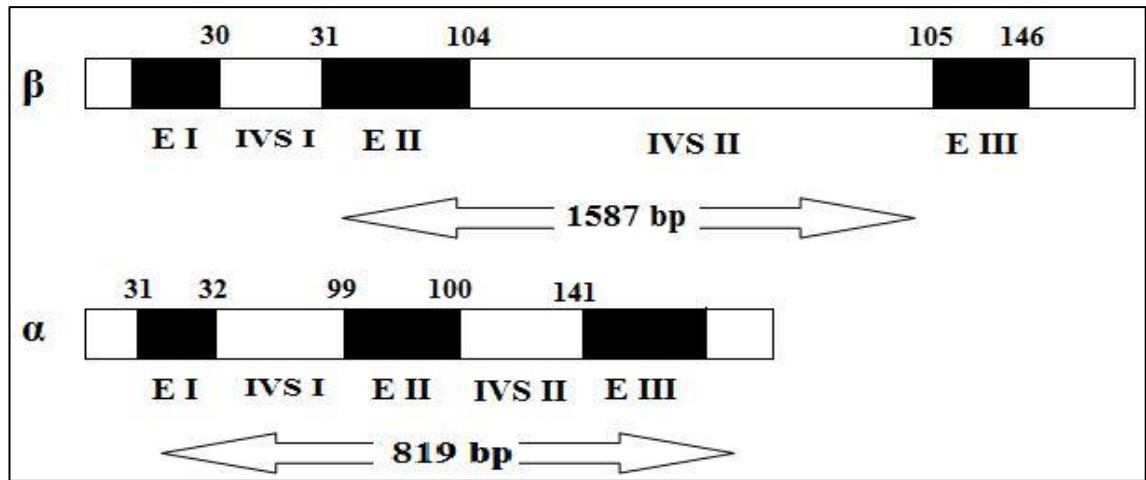
Oksijen bağlama bölgesi olarak görev yapan hem grupları, polipeptit yapısındaki globin zincirleri içerisinde gömülü durumda bulunmaktadır. Her hem grubu moleküler oksijeni (+2) değerlikli demir iyonu ile birleştirme özelliğine sahiptir. Hem grupları içerisindeki demir iyonlarının oksijene olan ilginliği, pH düzeyindeki azalma ve artma ile doğru orantılıdır (Jensen 2004). Ayrıca Hb'nin % 50 satürasyonu için gerekli O₂ basıncı olan p50; proton, CO₂, 2,3 DPG ve sıcaklık artışı ile artmakta, bu ise Hb molekülünün O₂' e olan ilginliğini azaltmaktadır (Winslow 2007).

Hemoglobin molekülü, deoksihemoglobinin karakterize ettiği oksijene ilgisi düşük olan (tense-gergin) ve oksihemoglobinin karakterize ettiği oksijene ilgisi yüksek olan (relaxed-gevşek) olmak üzere iki yapı arasında dengededir. Oksijen molekülünün (ve/veya diğer ligandların) bulunmadığı durumda hemoglobin molekülü, ekstra tuz köprülerinin olması sebebiyle termodinamik olarak daha kararlı durumda bulunduğu T yapıda kalma eğilimindedir. Oksijenin hemoglobine bağlanabilmesi için molekülün oksijen ilginliğini artırıcı koşullar gereklidir. Özellikle T yapısına yol açan tuz bağlantıları koparılmalıdır (Bettati 1997).

2.2 Globin Genlerinin Yapısı ve İşlevi

Tüm globin genleri benzer genel yapıya sahiptir. Her globin geninin üst kesiminde yerleşmiş bulunan ve gen transkripsiyon oranını kontrol eden bir promotor bölge bulunmaktadır. Bu promotor bölge RNA Polimeraz II için bir bağlayıcı bölgedir. Bu globin genleri, genetik bilgileri içeren blokları kodlayan ekzonları ve bu 3 ekzon bölgesinin arasında bulunan intronları içermektedir (Fucharoen 2002).

Alfa globin gen ailesi (5'- ζ - α 2- α 1-3') 16. kromozomun kısa kolunda yaklaşık 25 kb'lık bir alanda yer alırken, beta globin gen ailesi (5'- ϵ -G γ -A γ - ψ η - δ - β -3') 11. kromozomun kısa kolunda yaklaşık 60 kb'lık bir alanda yer almaktadır. Alfa globin gen ailesi içerisinde bulunan alfa globin geni 819 bp' den oluşurken, beta globin gen ailesi içerisinde bulunan beta globin geni ise 1587 bp' den oluşmaktadır (Şekil 2.1) (Clark 2004). Genlerin 5' ucu tarafında 51 nükleotit uzunluğunda bir cap bölgesi ve protein sentezini başlatan kodon (AUG) bulunmaktadır. Ekzon III' ün sonunda ise dur (*stop*) kodonunu takip eden ve Poli A kuyruğuna kadar uzanan DNA dizisi yer almaktadır (Fucharoen 2002, Orkin 1984).

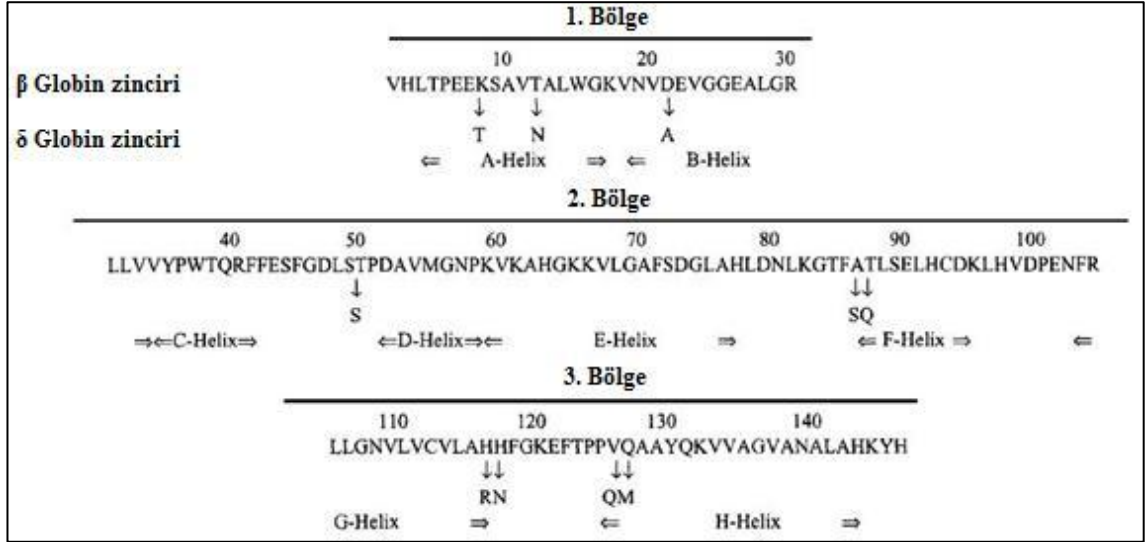


Şekil 2.1 Globin genleri (Clark 2004)

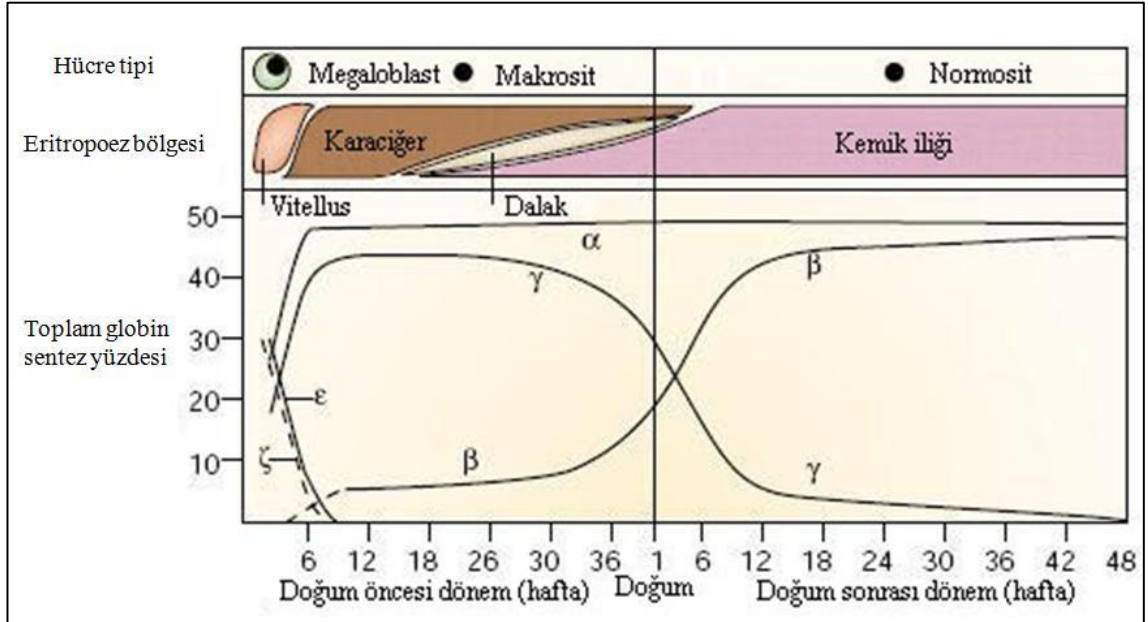
2.3 Hemoglobin Türleri

Hemoglobin molekülü, yaşamın değişik evrelerinde (embriyonik, fetal ve erişkin) alt birim içeriklerine göre yapısal farklılıklar göstermektedir. Embriyonik, fetal ve erişkin dönemdeki hemoglobinler dördüncül yapıda olup, iki (α) ve iki (β) globin zincirlerinden oluşmaktadır. Erişkin dönemdeki hemoglobinler α globin zincirine ek olarak beta (HbA , $\alpha_2 \beta_2$) ve delta (HbA_2 , $\alpha_2 \delta_2$) globin zinciri ile birleşiktir. Bu dönemde α globin zinciri her iki hemoglobin türü için de aynı iken farklı olan polipeptit zincirleri beta ve delta globin zincirleridir. β globin zincirindeki toplam 146 amino asitten 10'u delta globin zinciri için farklıdır. Bu farklı olan amino asitler ise; $\beta 9(A6)Ser > \delta 9(A6)Thr$, $\beta 12(A9)Thr > \delta 12(A9)Asn$, $\beta 22(B4)Glu > \delta 22(B4)Ala$, $\beta 50(D1)Thr > \delta 50(D51)Ser$, $\beta 86(F2)Ala > \delta 86(F2)Ser$, $\beta 87(F3)Thr > \delta 87(F3)Gln$, $\beta 116(G18)His > \delta 116(G18)Arg$, $\beta 117(G19)His > \delta 117(G19)Asn$, $\beta 125(H3)Pro > \delta 125(H3)Gln$, $\beta 126(H4)Val > \delta 126(H4)Met$ şeklindedir (Vasudevan 1998, Inagaki 2000) (Şekil 2.2). Fetal dönemde görülen HbF , iki α ve iki γ globin zincirinden oluşmaktadır. Embriyonik hemoglobinler ise doğumdan önce vitellus kesesindeki gelişim süresince bulunan hemoglobindir ve doğumdan kısa süre sonra HbF 'e dönüşmektedir. Bu hemoglobinler, alfa globin benzeri zincirler (ζ , zeta zincirleri) ile gama (Hb Portland, $\zeta_2 \delta_2$) veya epsilon globin zincirlerinin (Hb Gower 1, $\zeta_2 \epsilon_2$), (Hb Gower 2, $\alpha_2 \epsilon_2$) dördüncül yapıyı oluşturması sonucu meydana gelir (Şekil 2.3). α ve β globin gen ailesinin yerleşimi şekil 2.4'de gösterilmiştir.

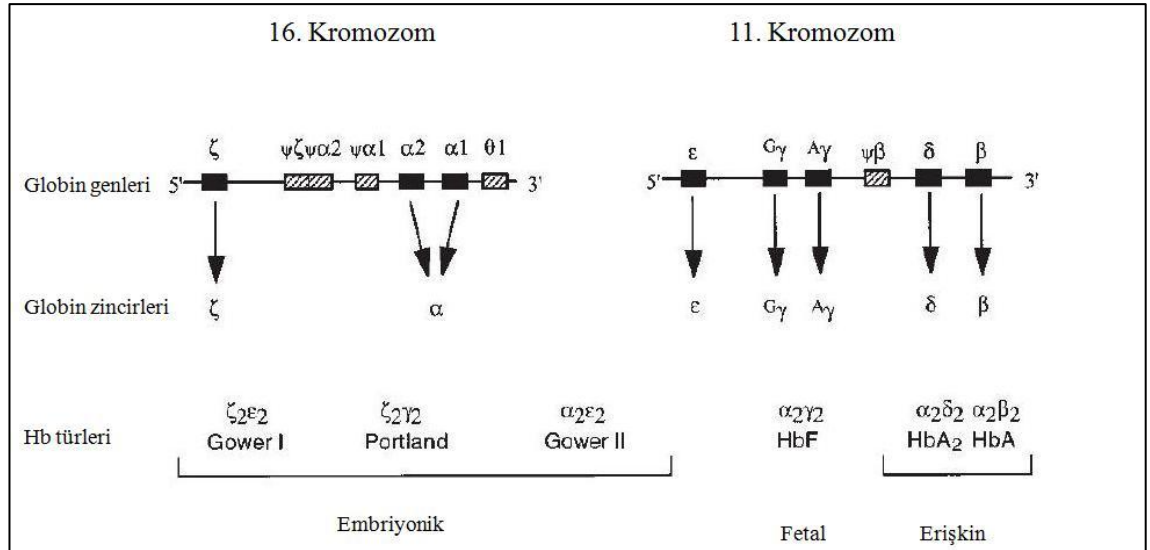
Yaşamın ilk yılında HbF, HbA ve HbA₂' e dönüşür (Weatherall 2001, Ho 1999). Doğumdan 6 ay sonra hemoglobinlerin % 97-98' i HbA ($\alpha_2 \beta_2$), yaklaşık olarak % 2' si de HbA₂ ($\alpha_2 \delta_2$)'dir. Ayrıca yetişkinlerde HbF oranı % 0-1 arasındadır (Maniatis 1980).



Şekil 2.2 β ve δ globin zincirlerindeki amino asit farklılıkları (Vasudevan 1998)



Şekil 2.3 Globin genleri üretim dönemleri (Weatherall 2001)



Şekil 2.4 İnsan globin genleri (Ho 1999)

2.4 Anormal Hemoglobinler

Anormal hemoglobinler; nokta mutasyonları, nükleotit eklenmesi (*insertion*), nükleotit çıkması (*deletion*) gibi gensel değişiklikler sonucu oluşmaktadır. Bilinen anormal hemoglobin türlerinden % 90' ndan fazlası bir globin zincirindeki tek amino asit değişiminden kaynaklanır ve bunların % 60' ı beta globin zincirinde olmaktadır (Fucharoen 2002).

Globin genlerinin yapısında bulunan ekzonlardaki DNA dizilerinde oluşan mutasyonlar, amino asit kodlarını değiştirmektedir. Bunun sonucunda kalıtsal klinik sorunlara sebep olan farklı hemoglobin türleri olduğu gibi, herhangi bir klinik belirti göstermeyen ve kalıtım yolu ile aktarılabilen anormal hemoglobinler de ortaya çıkmaktadır (Huens 1970).

Dünyada 700'e yakın anormal hemoglobin türü bildirilmiştir (Huisman 1996). 2002 yılında Türkiye genelinde yapılan çalışmada 42 adet anormal hemoglobin türünün varlığı gösterilmiştir (Altay 2002). Bu anormal hemoglobinlerden 13 tanesi α globin, 24 tanesi β globin, biri de δ globin zincirindeki amino asit değişikliklerini içermektedir (Tablo 2.1). Daha sonra yapılan çalışmaların ışığı altında ülkemizde bildirilen anormal hemoglobin türlerinin sayısının 88 olduğu belirtilmektedir (Tablo 2.2) (Akar 2007).

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- Coushatta	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 yılından sonra belirlenen 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	β 6 (A3) Glu --->Lys
Hb E- Saskatoon	B22 (B4) Glu --->Lys
Hb G- Coushatta	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

Çalışma bölgemiz olan Denizli yöresinde birçok anormal hemoglobin türü bildirilmiş olup, bu Hb türlerinden bazıları ülkemizde ilk kez görülen olgulardır. T.C. Sağlık Bakanlığı Denizli Hemoglobinopati Merkezi verilerine göre Denizli bölgesinde anormal hemoglobinler ve beta talasemi taşıyıcılığı oranı % 3,5 olarak belirtilmektedir. Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobin türleri ve bulunma yüzdeleri Tablo 2.3’ de gösterilmiştir.

Tablo 2.3 Denizli yöresinde saptanan anormal hemoglobinler

Anormal Hemoglobin	Mutasyon	Bulunma yüzdesi (%)	Kaynak
Hb D- Los Angeles	β 121(GH4)Glu --->Gln	57,8	Atalay 2005
Hb S	β 6(A3)Glu--->Val	21,9	Atalay 2005
Hb G-Coushatta	β 22(B4)Glu--->Ala	15,6	Atalay 2005
Hb E- Saskatoon	β 22(B4)Glu--->Lys	3,1	Atalay 2005
Hb C	β 6(A3)Glu--->Lys	1,6	Atalay 2005
Hb J-İran	B77 (EF1) His--->Asp	-	Köseler 2006
Hb Beograd	B121 (GH4) Glu--->Val	-	Atalay 2007
Hb Yaizu	B79(EF3)Asp--->Asn	-	Atalay 2008
Hb D Ouled Rabah	B19(B1)Asn--->Lys	-	Köseler 2008
Hb Tunis	B124(H2)Pro--->Ser	-	Köseler 2009
Hb Hinsdale	B139(H17)Asn--->Lys	-	Yayın Aş.

Hemoglobin S, kalıtsal klinik sorunlara sebep olan anormal hemoglobinlerden biridir. Beta globin geninin 6. kodonunda glutamik asiti kodlayan GAG yerine GTG dönüşümü ile valin amino asidinin kodlanması sonucu oluşan bu anormal hemoglobin türü ilk defa Pauling tarafından 1949 yılında tanımlanmıştır (Ashley-Koch 2000, Pauling 1949). Fizyolojik pH' da negatif yüklü bulunan glutamik asitin, yüksüz ve hidrofobik özelliğe sahip valin ile yer değiştirmesi hemoglobinin daha az çözünen bir yapı kazanmasına neden olur. Sonuç olarak hemoglobin kristal benzeri yapılar oluşturma eğilimi göstererek hemoglobinlerin oraklaşmasına sebep olur. Oksijen taşıyan hemoglobinlerin oraklaşması kan akışının yavaşlamasına neden olur. Böylece oksijensiz kalan dokularda hasarlar gerçekleşir. Hb S, ülkemizde ilk defa Aksoy ve ark. tarafından bildirilmiştir (Aksoy 1963). Günümüze kadar gelişen süreçte hemoglobin türleri üzerinde yapılan çalışmalar gelişerek sürmektedir.

2.5 Anormal Hemoglobinlerin Laboratuvar Tanısında Kullanılan Yöntemler

Anormal hemoglobinlerin yapısal analizi; anormal hemoglobin varlığının ve anormal hemoglobin türünün belirlenmesi olmak üzere iki kısımdan oluşmaktadır. Protein düzeyindeki analizler, benzer hemoglobin varyantlarının tanımlanmasında açık ve kesin bir ayırım sağlamamaktadır. Protein düzeyindeki yöntemler, genellikle gen düzeyindeki yöntemler için bir ön-tanı aşamasıdır. Anormal hemoglobin varlığının, protein düzeyindeki yöntemler ile belirlenmesini takiben kesin tanı işlemi gen düzeyindeki analizlerin yapılması ile gerçekleştirilmektedir.

2.5.1 Protein Düzeyindeki Yöntemler

Negatif ve pozitif yüklere sahip proteinler olan hemoglobinlerin, bu yüklerinden faydalanılarak iyon değişim kromatografisi ile ayrımı sağlanabilmektedir. Bu çalışmalarda kullanılan anyon değiştirici kolon materyali DE-52' dir. DE-52, DEAE-Selüloz içerikli olup glisin-KCN tamponu içermektedir. Sabit faz olan DE-52 ile dolu bir kolon üzerine, hazırlanan hemolizat uygulanır. İçerisinde NaCl bulunan hareketli fazın tuz derişiminin giderek artırılması suretiyle hemoglobinlerin ayrımı sağlanır ve böylece anormal hemoglobinlerin varlığı belirlenebilmektedir. Fakat anormal hemoglobinler için kesin veya ayırıcı bir tanı söz konusu değildir. Örneğin;

kromatografik düzeyde yapılan laboratuvar analizlerinde, Hb-S, Hb-D Los Angeles, Hb-G Coughatta ve Hb-Beograd benzer davranış göstermektedir (Atalay 2007).

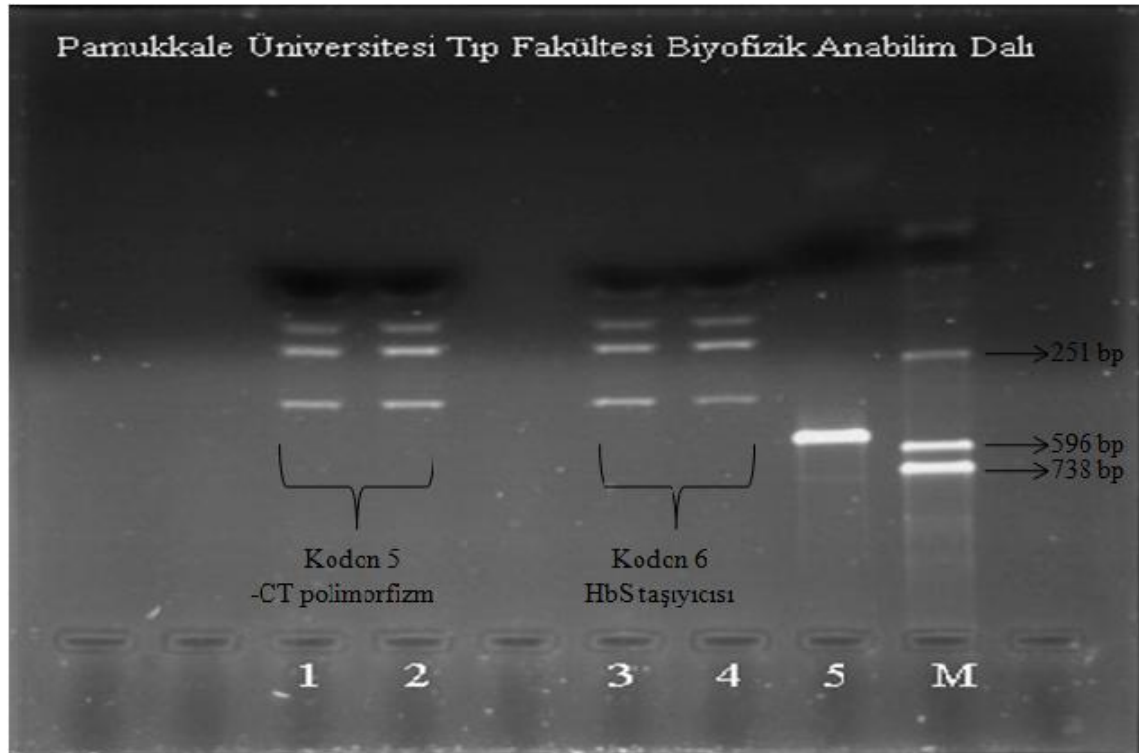
Anormal hemoglobinlerin varlığının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden bir diğeri de elektroforez yaklaşımıdır. Bu yöntem, farklı pH' larda değişken yüklere sahip olan hemoglobinlerin elektriksel alandaki hareketlerine dayanmaktadır. Hemoglobinler alkali pH ortamında negatif yüke sahip olup anoda, asit ortamında ise pozitif yüke sahip olup katoda doğru hareket etmektedirler. Farklı yükler kazanan hemoglobin türleri hem asidik hem de alkali ortamda birbirlerinden ayrılabilirler. Selüloz asetat ve agaroz yapılı membranlara hemoglobin elektroforezi uygulanabilmektedir (Wada 2002, Hartwell 2005). Kromatografik yöntemlerde olduğu gibi bu yöntem de anormal Hb' lerin kesin tanısı için belirleyici bir yaklaşım değildir. Örneğin; alkali Hb elektroforezinde Hb-D Los Angeles, Hb-G Coughatta, Hb-Beograd v.b bazı hemoglobinler Hb S gibi elektroforetik davranış göstermekle birlikte bu hemoglobinlerden Hb-D Los Angeles, Hb-G Coughatta, Hb-Beograd asit Hb elektroforezinde HbA gibi davranmaktadır. Bu farklı davranış biçimleri özellikle premarital taramada karışıklıklara neden olabilmektedir (Atalay 2007)

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), Hb varyantlarının belirlenmesinde önemli bir yaklaşımdır. Bu yaklaşımın uygulanmasın da hareketli sıvı faz bulunmaktadır. HPLC' de sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için basınç uygulanması gerekir. Örnek bileşenleri, sabit faz ile bileşiğin kovalent olmayan etkileşimlerine bağlı olarak göç ederler. Kolon dolgu maddesi olarak silika matriks üzerinde anyon değiştirici HPLC de dietilaminoetil, katyon değiştirici HPLC' de ise karboksimetilselüloz (CMC) kullanılmaktadır (Hartwell 2005).

2.5.2 Gen Düzeyindeki Yöntemler

Restriksiyon enzim analizi, anormal hemoglobinlerin gen düzeyinde tanımlanmasında kullanılan yöntemlerden biridir. Restriksiyon enzimleri, kısa DNA dizilimlerini özgül olarak tanıyıp DNA' yı kesen proteinlerdir. Restriksiyon

enzimlerinin, PCR yöntemiyle çoğaltılan genomik DNA' daki kendilerine özgü bölgeleri kesip kesmemesine göre anormal hemoglobinler belirlenebilir. Her bir anormal hemoglobin türü için farklı bir restriksiyon enzimi kullanılmaktadır. Enzim kesimi yapılan PCR ürünü, elektroforezde yürütüldükten sonra UV ışık altında görüntülenerek PCR ürünü bantlarının kesilip kesilmemesine göre değerlendirme yapılmaktadır. Çoğu restriksiyon enzimi, kendine özgü DNA bölgesini kesemediğinde anormal hemoglobin türünün varlığına işaret ederken, bazı restriksiyon enzimleri ise kendine özgü DNA bölgesini kestiğinde anormal hemoglobinin türünü işaret etmektedir. Bu yöntemin uygulanmasındaki problem, enzim tanıma bölgesinde bulunabilecek farklı bir mutasyon veya polimorfizmin benzer bir sonuç vermesidir. Örneğin Hb S, beta globin geninin 6. kodonunda gerçekleşen $GAG > GTG$ mutasyonu, için özgün restriksiyon enzimi Dde I enzimidir. Dde I enzimi 5'-- CTNAG --3' dizilimine sahip DNA bölgesinde C ve T nükleotitleri arasından kesmektedir. Dde I enziminin DNA bölgesini kesemediği durumda Hb S olduğu belirtilmektedir. Fakat beta globin geninin 5. kodonunda gerçekleşen -CT polimorfizmi için yapılan Dde I enzim kesim sonuçlarında Hb S ile aynı sonuçları vermektedir (Şekil 2.5). Dolayısıyla bir Dde I enzim kesim sonucunda Hb S anormal hemoglobin türünün varlığı kesin olarak belirtilemez.

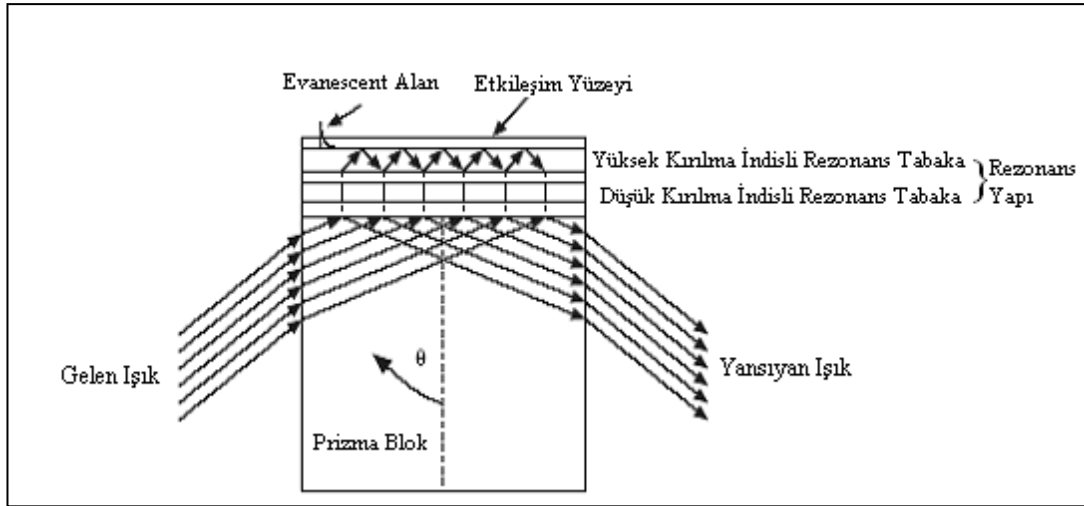


Şekil 2.5 Dde I enzim kesim sonuçları

Şekil 2.5’ de 5 numaralı örnek PCR yöntemiyle çoğaltılmış olup 536 bp’ lik uzunluğa sahip bir bölgedir. 1-2 ve 3-4 numaralı örnekler sırasıyla kodon 5 -CT polimorfizm ve kodon 6-Hb S taşıyıcısı örneklerini içermektedir. 1, 2, 3 ve 4 numaralı örnekler PCR yöntemiyle çoğaltılmış olup 536 bp’ lik uzunluğa sahip bölgelerdir ve amplifiye edilen bu örnekler Hb S için özgün olan Dde I enzimi ile kesildiklerinde aynı sonuçları vermektedirler. Dolayısıyla bu enzim kesimi ile örneklerin Hb S taşıyıcısı mı yoksa kodon 5 polimorfizmine mi sahip oldukları kesin olarak belirlenemez.

Anormal hemoglobinlerin gen düzeyinde tanımlanmasını olanak sağlayan bir diğer yöntem ise madde ve ışık etkileşimini temel alan SPR (Surface plasmon resonance) spektroskopisidir. Herhangi bir işaretleyici kullanmadan ışık-madde etkileşiminin gerçek zamanlı olarak incelenmesini sağlayan SPR biyosensörleri, bu avantajlarıyla en önemli biyosensörlerden biri haline gelmiştir (Homola 1999). SPR biyosensörlerinde altın tabaka üzerindeki biyomolekül sel etkileşimler algılanmaktadır. Altın sensör yüzeyine immobilize edilen hedef biyomolekülün diğer biyomoleküllerle bağlanabilme ilginliği, yüzeye gönderilen lazer ışının saniyedeki açısal değişiminin (arc sec) zamana bağlı grafiği, moleküller arası etkileşimin doğası hakkında bilgi verir. Ayrıca farklı sıcaklıklarda işaretleyici kullanılmadan yapılan bu çalışmalarla etkileşimin termodinamik özellikleri belirlenebilmektedir (Van Wiggeren 2007).

Yüzey plazmonları, iletken bir yüzey üzerinde (genellikle metal) yayılan dalgalardır. Bunlar, yüzey üzerine düşürülmüş ve iletken yüzeyin serbest elektronlarıyla etkileşim halindeki ışık dalgalarıdır. Uygun bir dalga boylu ve geliş açısındaki ışın ile metal yüzeyin etkileşimi sonucunda serbest elektronların cevabı, yüzey üzerinde ışık dalgasının rezonansında salınması şeklinde gerçekleşir. Etkileşim sonrası evanescent adı verilen ve yüzey üzerine farklı moleküllerin bağlanmasına bağlı olarak giderek sönmüş elektromanyetik alan oluşturulur. Bu alan sayesinde gönderilen ışın kırılarak geri yansımakta ve ışındaki bu kırılmaların zamana bağlı grafikleri ile sensör yüzeyi üzerindeki etkileşimlerin doğası belirlenebilmektedir (Barnes 2003) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 SPR spektroskopisinde rol alan fiziksel olaylar

Yüzey plasmon rezonans spektroskopisi ile küçük moleküllerin adsorpsiyonu, ligand-reseptör bağlanmaları, protein-protein etkileşimleri, antijen-antikor bağlanmaları, DNA ve RNA hibritleşmesi, protein-DNA etkileşimleri gibi analit ve yüzey arasında gerçekleşen etkileşimler hakkında bilgi edinilebilmektedir (Haes 2002). Anormal hemoglobinlerin ve talasemilerin belirlenmesinde SPR yöntemi belirleyici bir yöntem olarak kullanılmaktadır. Beta globin geninin 6. kodonunda glutamik asit yerine valin geçmesiyle oluşan Hb S anormal hemoglobinin belirlenmesinde ve beta³⁹(C>T), beta^{IVS-1}(G>A), beta+IVS-1-6(T>C), beta+IVS-1-110(G>A) gibi talasemi mutasyonlarının incelenmesinde SPR yöntemi kullanılmıştır (Atalay 2006, Feriotto 2004).

Anormal hemoglobinlerin gen düzeyinde kesin tanısında en çok kullanılan yöntem ise DNA dizi analiz yöntemidir. Dizi analizi, bir DNA molekülünde belirli bir bölgenin nükleotit diziliminin belirlenmesi anlamına gelmektedir. İlk dizi analizi tekniği 74 nükleotitlik bir tRNA molekülü dizisinin belirlenmesinde kullanılmıştır (Holley 1965). 1970'lerin başlarında hızlı DNA dizi analiz yöntemlerindeki gelişmeler artmıştır.

Günümüzde kullanılan dizi analiz sistemleri non-radyoaktif olup floresan işaretleyiciler kullanılarak yapılmaktadır. Yöntemin temeli; 3' ucunda OH grubu bulunmayan ddNTP'lerin kullanılmasına dayanmaktadır. Yöntemde kalıp olarak kullanılacak DNA, bu DNA'nın belirli bölgesini sınırlayan primer, amplifiye edilecek DNA'nın uzamasını sağlayacak nükleotitler (dNTP), zincir uzamasını 3' ucunda OH

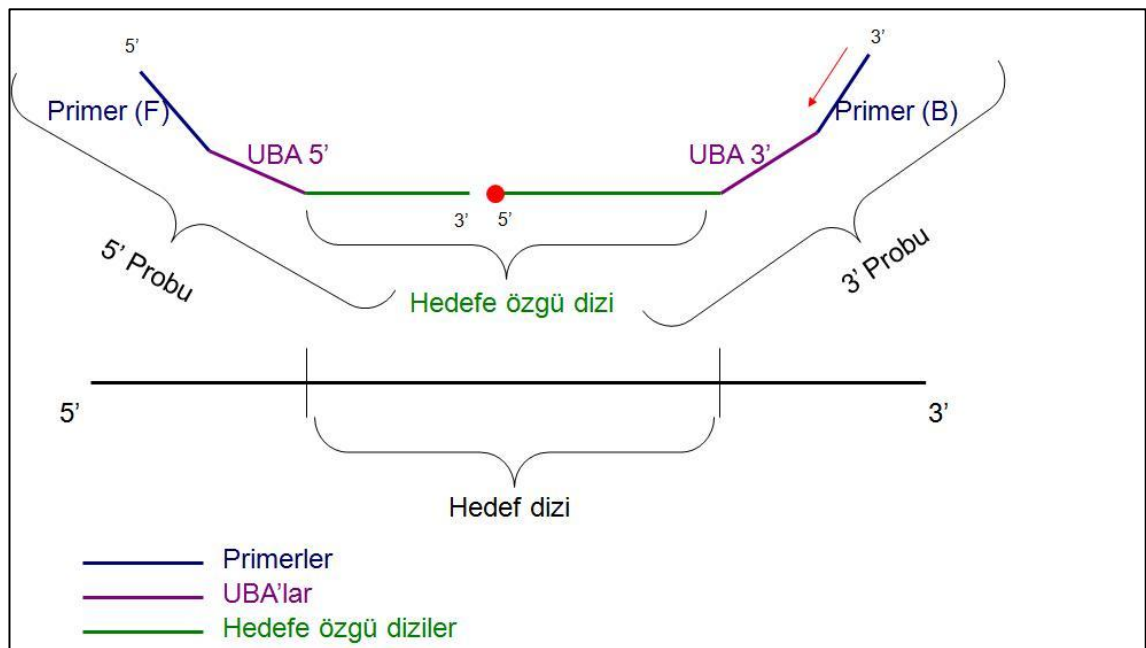
grubu bulunmadığı için sonlandırarak işaretli nükleotitler (ddNTP) ve bu nükleotitleri yeni zinciri oluşturmak için bağlayacak olan Taq DNA polimeraz kullanılmaktadır. Sentezlenen her bir yeni kalıp zincir ucuna 3' ucunda OH bulunmayan ddNTP' nin gelmesi ile uzama durmaktadır. Reaksiyon sonucunda elde edilen DNA parçaları kapiler elektroforezde yürütülerek, molekül ağırlığına göre dizi analizi sisteminde en küçük moleküler ağırlığa sahip olan DNA parçası en önde olmak üzere lazer ışını sayesinde okuma yapılır.

2.6 MLPA Yöntemi

MLPA, Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification kelimesinin baş harflerinden oluşmuş olup, ligasyona bağımlı çoklu prob amplifikasyonu anlamına gelmektedir. Yöntem ilk olarak Schouten tarafından 2002 yılında tanımlanmıştır ve MLPA yöntemiyle birden fazla odaktaki gen delesyonları ve duplikasyonları tek bir reaksiyonla tanımlanabilmektedir (Kozlowski 2008). Çalışılan bölgedeki gen miktarlarının belirlenmesi amacını taşıyan MLPA yöntemiyle, gen bölgelerinde tek veya her iki allelde meydana gelebilecek delesyonlar ve duplikasyonlar yüzünden oluşan gen miktarlarındaki artış ve azalışlar görüntülenebilmekte ve hesaplanabilmektedir. Uygulamanın kolaylığı, yüksek duyarlılığı, güvenilirliği ve göreceli ucuzluğu bu yöntemin gen düzeyindeki tanı laboratuvarlarında hızlı bir şekilde kabul edilmesini sağlamıştır (Gonzalez 2008, Gouas 2008).

MLPA problemleri 2 oligonükleotitten oluşmaktadır. Her bir oligonükleotit ise primer, uzunluğu belirli aralık (UBA) ve hedefe özgü dizilerden meydana gelir (Şekil 2.7). Problemlerde kullanılan primer çiftleri, multiplex bir analizin gerçekleştirilmesi için aynı olmalıdır. Yani tüm MLPA problemlerinde aynı primer çifti kullanılabilir. Primerler ilgilenilen genomik DNA bölgesinde tümleyicisi bulunmayan dizilerden seçilmelidir ve genellikle 19-25 nükleotit uzunluğundadır. MLPA yönteminde birden fazla sayıda odağın incelenmesi için birden fazla sayıda prob kullanılacağından dolayı, bu problemlerin analiz sonucunda birbirlerine karışmasını önlemek ve dizi analizinde sinyallerin farklı yerlerde çıkış noktaları vermelerini sağlamak için UBA' lar kullanılmaktadır. UBA' lar sayesinde her bir prob farklı nükleotit uzunluklarına sahip olur ve dolayısıyla dizi analizindeki sinyalleri farklı yerlerde çıkmaktadır. UBA' ların uzunlukları 2-400 nt arasında olmakta ve analizi yapan cihazın kapasitesine bağlı olarak daha da

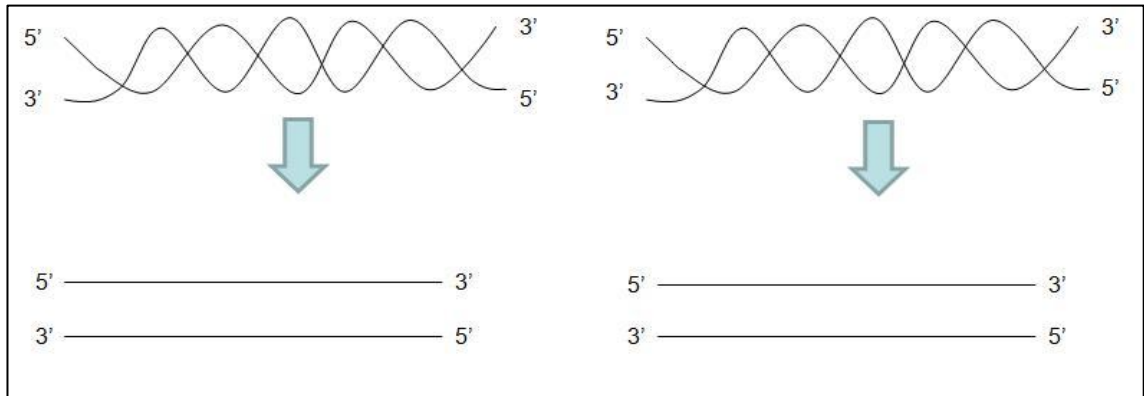
arttırılabilmektedir. Ayrıca aynı uzunluğa sahip problemlerin dizi analizinde sinyallerinin karışmasını önlemek amacıyla primer çiftlerinin farklı renklerde işaretlenmesi yapılabilmektedir. Bu sayede aynı uzunluğa sahip farklı renklerde sinyaller elde edilmektedir. Hedefe özgü diziler ise ilgilenilen DNA bölgesi baz alınarak tasarlanan dizilerdir. Bu diziler ilgilenilen gen bölgesinin tümleyicisidir. İki oligonükleotitin ligasyonunu sağlamak için hedefe özgü dizi ile başlayan oligonükleotitin ucu fosfor ile işaretlenip ligasyonun sağlanması gerekmektedir. Hedefe özgü dizilerin uzunlukları bir oligonükleotitte 21-30 nt arasında, diğer oligonükleotitte ise 25-43 nt arasında olabilmektedir (Kozlowski 2008, Schouten 2002, Dijk 2005).



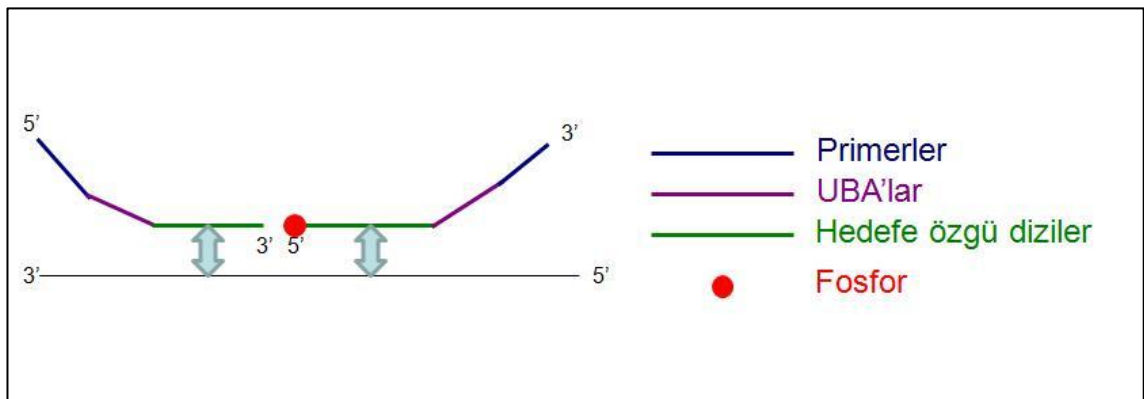
Şekil 2.7 MLPA prob elemanları

MLPA yöntemi; hedef DNA denatürasyonu, hibritleşme, ligasyon, ligasyon sonrası hedeften ayırma (*denaturation*), amplifikasyon ve sinyallerin elde edilmesi olmak üzere 5 basamakta gerçekleşmektedir (Şekil 2.8, 2.9, 2.10, 2.11). Yöntemdeki temel yaklaşımda, problemlerdeki hedefe özgü dizilerin hedefteki varlığının belirlenmesinden sonra bu problemlerin ligasyon işlemiyle bağlanmış durumdaki kalıpları PCR yöntemiyle çoğaltılmakta ve dolayısıyla kullanılan hedef genomik DNA üzerinde herhangi bir çoğaltım işlemi uygulanmamaktadır. Öncelikle ilgilenilen hedef bölgeyi içeren çift iplikli genomik DNA'nın denatürasyon işlemi ile ipliklerinin arası açılmaktadır. Bu işlemi DNA'nın üzerine problemlerin eklenmesi ve problemlerin hibritleşmesi izlemektedir. Eğer ilgilenilen gen bölgesi ile probda bulunan hedefe özgü diziler birbirlerinin

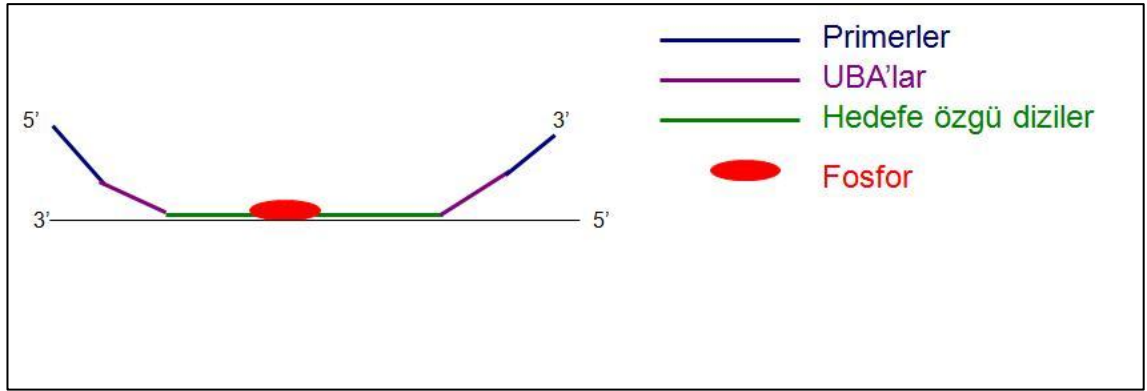
tümleyicisi ise problemlerin bu DNA bölgesine hibritleşmesi gerçekleşmektedir. Hibritleşme işlemi sonrasında ligasyon basamağı gelmektedir. Problemlerin hedef bölgeye hibritleşmesi doğru bir şekilde gerçekleştiğinde ligasyon işlemi ile hibritlenen iki oligonükleotit birbirlerine bağlanır. Ligasyonlu problemlerin, DNA'dan denatüre edildikten sonra gen üzerinde dizisi bulunmayan primerler ile amplifikasyonu sağlanmaktadır. Ligasyon işlemi başarısız olan problemler, (yani hedef bölgede meydana gelen bir gen delesyonu sonucu problemlerin bu bölgeye hibritleşememesi ve oligonükleotitlerin ligasyonunun gerçekleşmemesi) iki primer çiftini içermeyeceğinden dolayı amplifikasyonu sağlanamaz. Kullanılan primerlerden birisi floresan işaretlidir. Amplifikasyonu gerçekleştirilen problemlerden sinyal elde edilmesi işlemi ise kapiler elektroforezde gerçekleşmektedir. Uzunlukları farklı olan problemler, kapiler elektroforezde farklı hızlarda yürürler ve farklı yerlerde sinyal vermektedirler. Hibritleşme ve ligasyon basamakları başarısızlıkla sonuçlanan problemlerin amplifikasyonu sağlanamadığından herhangi bir sinyal elde edilememektedir (Kozlowski 2008, Dijk 2005, Sellner 2004).



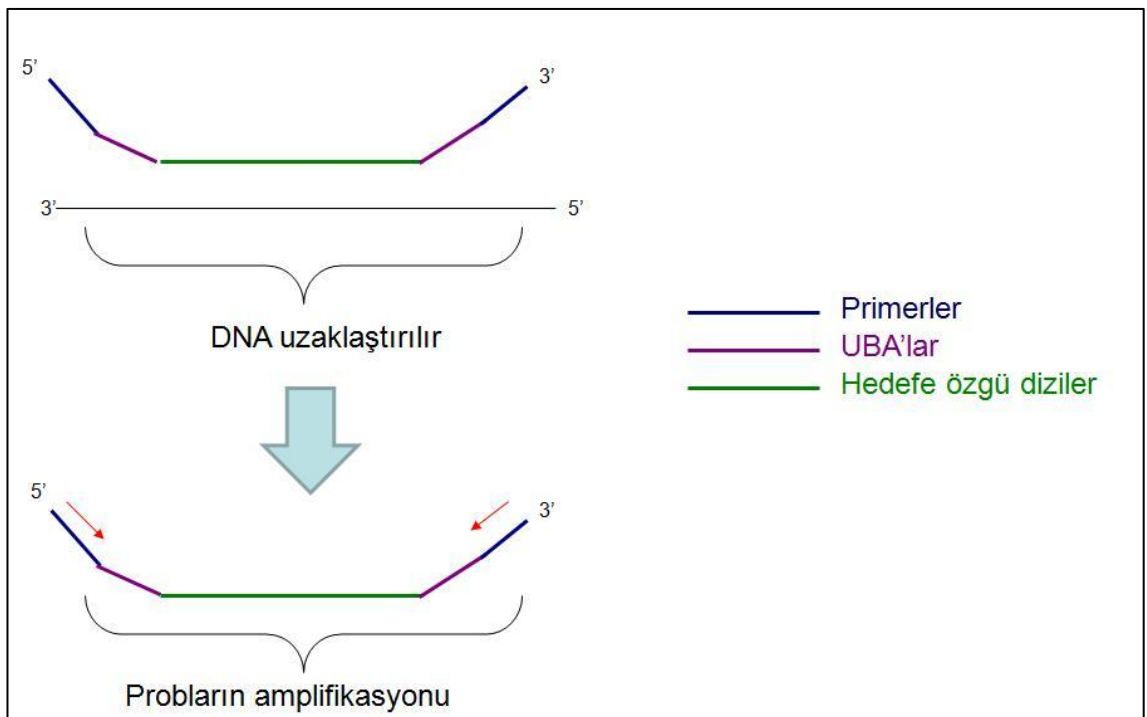
Şekil 2.8 Hedef DNA denatürasyonu



Şekil 2.9 Hibritleşme



Şekil 2.10 Ligasyon



Şekil 2.11 Ligasyon sonrası hedeften ayırma ve probların amplifikasyonu

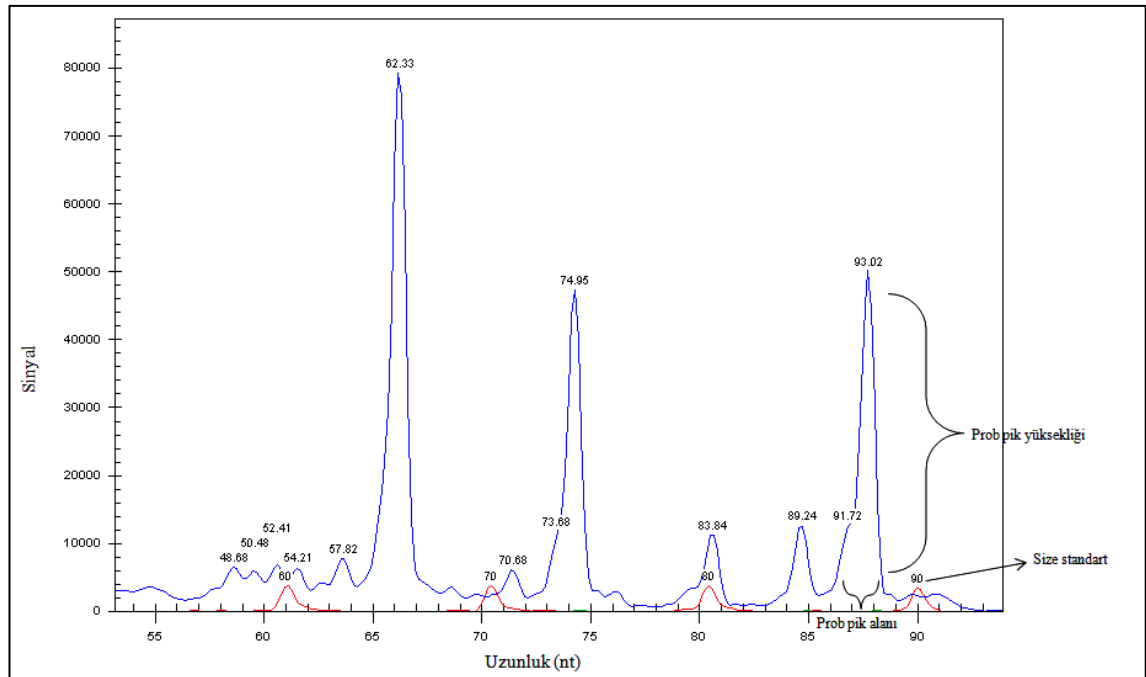
Her bir probdan elde edilen sinyallerin kontrol proba göre normalizasyonu yapılmakta ve probların sinyal kararlılıklarındaki (alan/yükseklik oranı) azalış ve artışlar, ilgilenilen gen bölgesinde delesyon veya duplikasyon olup olmadığını vermekte, dolayısıyla gen miktarlarındaki azalış ve artışları göstermektedir. Örnek problardan elde edilen sinyallerin, kontrol grubundan elde edilen sinyallere oranı 1 ise hedef bölgede herhangi bir gen delesyonu veya duplikasyonu söz konusu değildir. Bu oran 0.5 ise hedef DNA bölgesinin bir allelinde mutasyon yani heterozigot bir durum söz konusudur. Dolayısıyla probun sadece tek bir allele hibridizasyonu gerçekleşmiştir. Oran 1.5 ise hedef DNA bölgesinin bir allelinde duplikasyon söz konusudur (Gouas

2008, Kozlowski 2008). Kontrol pikinin gözlemlendiği yerde hiçbir pik elde edilememesi yani oranın 0 olması ilgilenilen DNA bölgesinin her iki allelinde de böyle bir hedef dizinin bulunmadığını göstermektedir. Şekil 2.12’ de Ahn ve ark.’nın 2007 yılında yaptıkları ve birden fazla sayıda prob’ un kullanıldığı çalışmada, gen miktarlarının belirlenmesinde kullandıkları formül gösterilmektedir (Ahn 2007)

$$\text{Gen miktarı} = \frac{\text{Hasta test piki yüksekliği} / \text{Hasta referans piki yüksekliği}}{(\text{Kontrol test piki yüksekliği} / \text{kontrol referans piki yüksekliği})_{\text{ortalama}}}$$

Şekil 2.12 Birden fazla sayıda prob kullanıldığında gen miktarlarının belirlendiği formül (Ahn 2007)

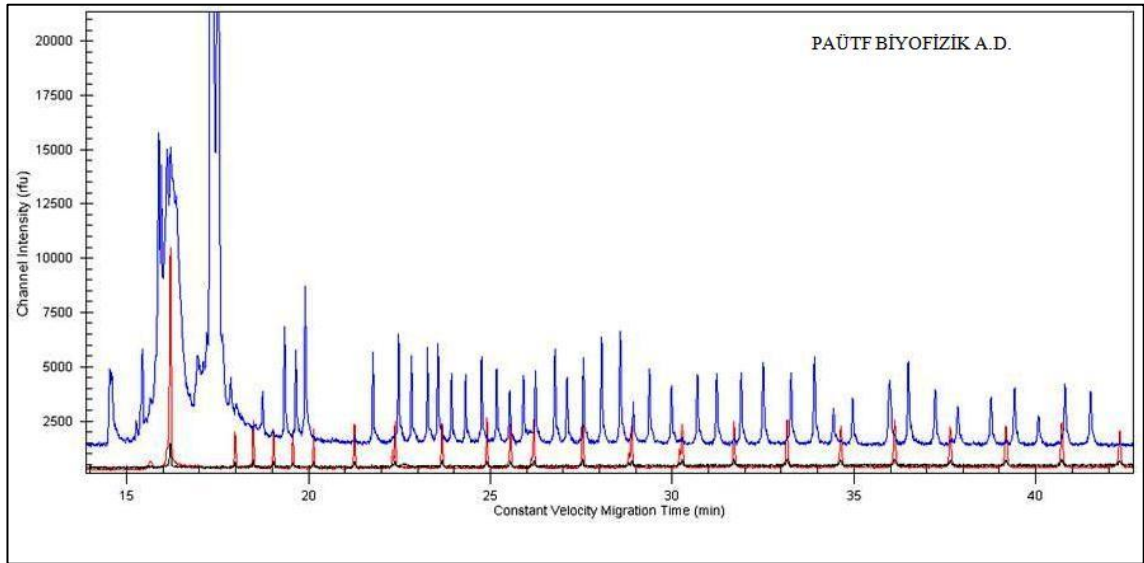
Tek bir prob kullanıldığında elde edilen fragment analiz sonuçları Şekil 2.13’de verilmektedir. Prob primeri mavi renk ile işaretli olduğundan dolayı mavi renkli pikler problemleri, kırmızı renkli pikler ise size standart’ ı göstermektedir. Dizi analiz sistemi, pik yüksekliklerini, pik alanlarını ve problemlerin uzunluklarını analiz sonucunda otomatik olarak vermektedir.



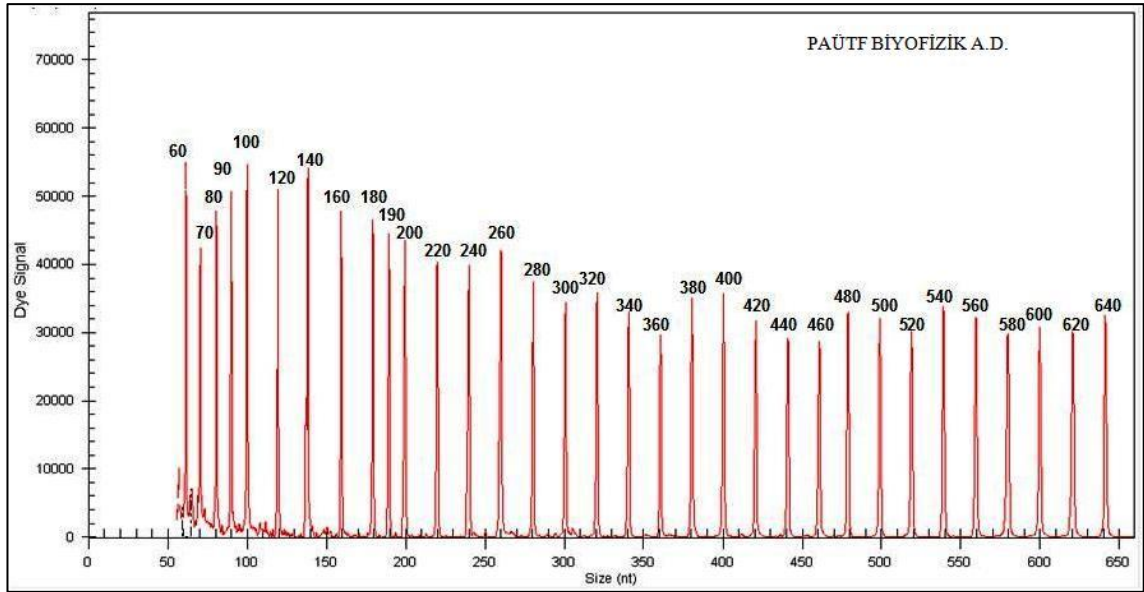
Şekil 2.13 Kapiler elektroforezde tek bir probun fragment analiz sonucu

Bu yöntemde, diğer yöntemlerin aksine ilgilenilen DNA bölgesi çoğaltılmayıp, bu bölgelere hibritleşen ve ligate olan problemlerin amplifikasyonu gerçekleştirilmektedir. Dolayısıyla kapiler elektroforezde DNA parçaları değil, amplifiye olan problemler görüntülenmektedir. Hibritleşme ve ligasyon basamakları gerçekleşmeyen problemler amplifiye olmadıklarından kapiler elektroforez görüntülenmesinde sonuç alınmamaktadır.

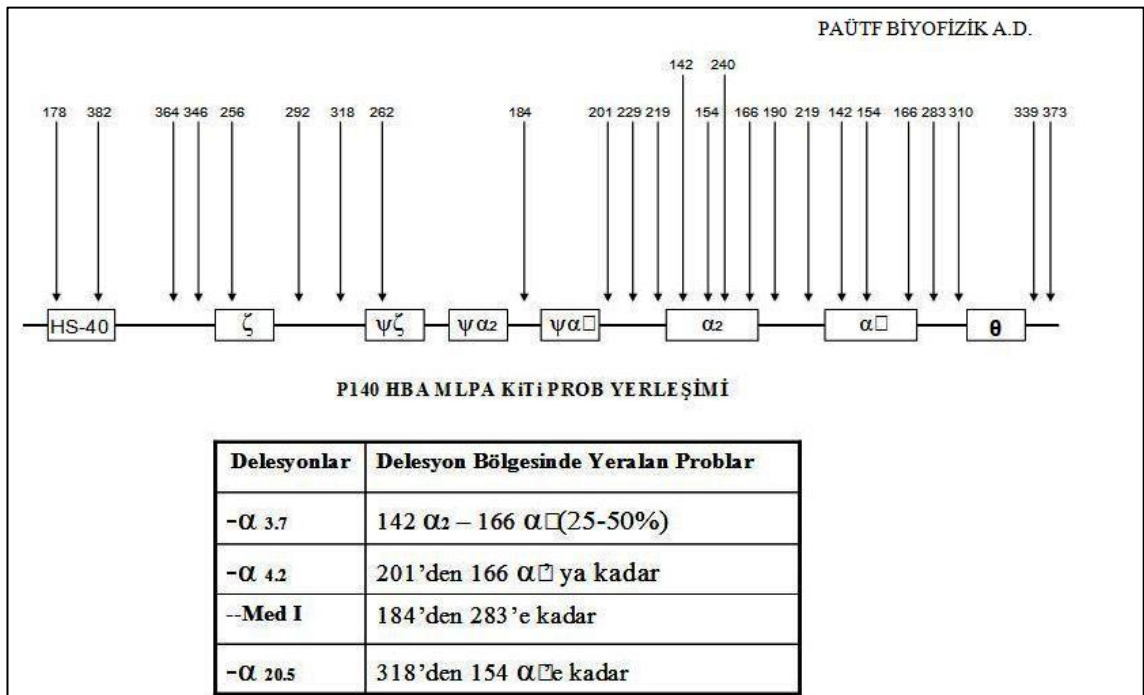
Eğer birden fazla prob kullanılır ise daha önce belirtildiği gibi farklı hedef bölgelerine yönelik problemlerin karıştırılmaması amacıyla, gerek farklı floresan işaretleyiciler ve gerekse de prob uzunluklarından yararlanılmaktadır. Pamukkale Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yapılmış olan yayınlanmamış bir çalışmada çoklu prob ile alfa globin genlerindeki delesyonların saptanmasına çalışılmıştır (Atalay E.Ö 2010). Bu çalışmada moleküler yöntemlerle delesyonları bilinen örnekler kullanılmıştır. Alfa globin geni üzerinde 190, 219, 240 ve 256 nükleotitik problemlerin hedeflerinde delesyon olduğu bilinmektedir. Buna göre yapılan analizde kullanılan çok sayıda probun hasta DNA'sında hedef olmadığı için hibritleşmediği ve dolayısıyla problemlerin amplifiye olmadıkları görülmektedir. Şekil 2.14' de bu çalışmada elde edilen kaba veriler, Şekil 2.15' de kullanılan standart büyüklükleri verilmektedir. Şekil 2.16' da ise kullanılan problemlerin alfa globin gen ailesi üzerindeki yerleşimleri ile bilinen delesyonlar tanımlanmaktadır. Şekil 2.17' de sağlıklı bireye ait, şekil 2.18' de ise alfa talasemili bireye ait deney sonuçları gösterilmektedir.



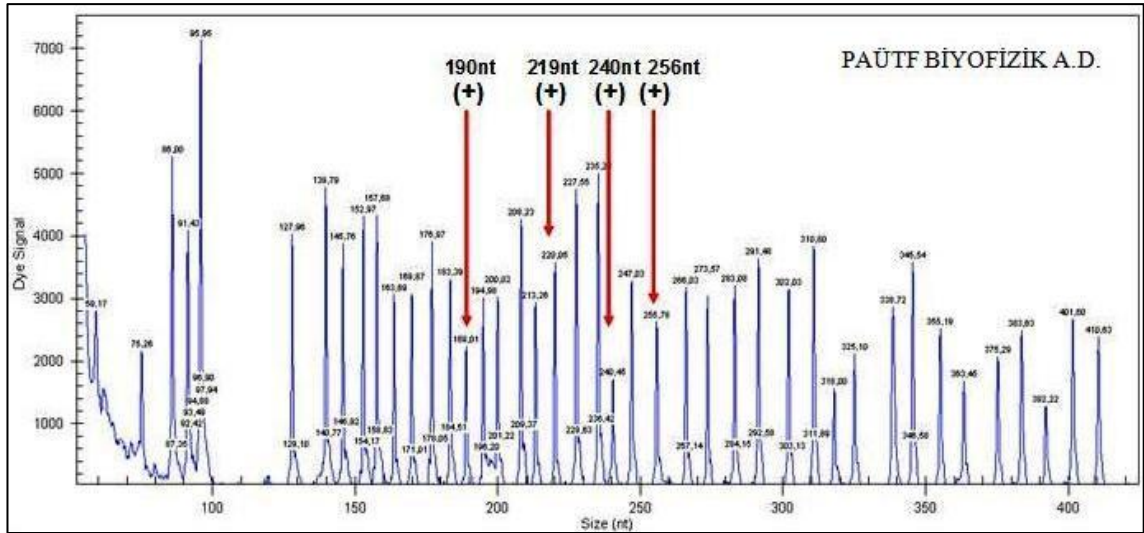
Şekil 2.14 α globin zincirinde meydana gelen gen delesyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmada elde edilen ham veriler (PAÜTF Biyofizik A.D.)



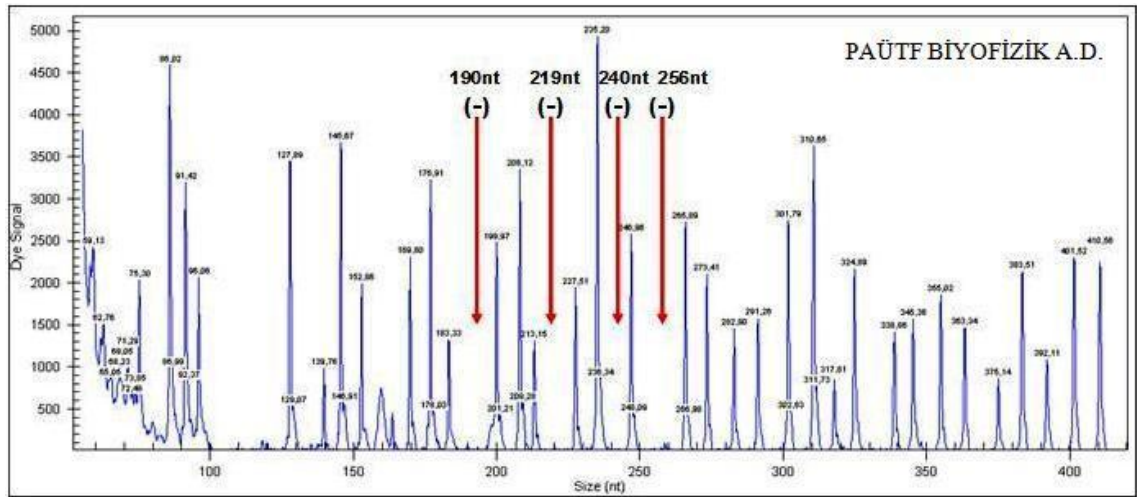
Şekil 2.15 α globin zincirinde meydana gelen gen delesyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmada kullanılan standart büyüklükler (PAÜTF Biyofizik A.D.)



Şekil 2.16 α globin zincirinde meydana gelen gen delesyonlarının belirlenmesinde kullanılan problemlerin gen üzerine yerleşimi ve delesyonların meydana geldiği bölgeler (PAÜTF Biyofizik A.D.)



Şekil 2.17 Sağlıklı bireye ait deney sonuçları (PAÜTF Biyofizik A.D.)



Şekil 2.18 Alfa talasemili bireye ait deney sonuçları (PAÜTF Biyofizik A.D.)

MLPA yöntemi diğer laboratuvar tanı yöntemleriyle karşılaştırıldığında daha güvenilir ve göreceli ucuz bir yaklaşımdır. MLPA çalışmalarında tüm problemler için aynı çift primerin kullanılması ve 45 veya daha fazla farklı odağın tek bir reaksiyonda incelenebilmesi yöntemin avantajlarından biridir. Yöntemin diğer bir avantajı ise çok az miktarda DNA ile (20 ng) çalışılabilmesidir. (Cremonesi 2007, Schouten 2002, Sellner 2004). Gen duplikasyonları diğer anormal hemoglobin tanı yöntemleriyle belirlenemezken MLPA yöntemiyle belirlenebilmektedir. Ayrıca MLPA yönteminde çok büyük baz uzunluğuna sahip genomik DNA ile çalışılabilir.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Tez çalışmamızda, Hb S için bir MLPA probu tasarlanarak, MLPA yöntemi ile Hb S modelinde ilgili mutasyonun tanınması amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak Hb S [$\beta 6$ (A3) Glu --->Val (GAG--->GTG)] anormal hemoglobine sahip DNA örnekleri seçilmiştir. Hb S için uygun bir MLPA probu tasarlandıktan sonra PCR yöntemi ile denatürasyon, hibritleşme, ligasyon ve problemlerin amplifikasyonu işlemleri gerçekleştirilmiş olup BECKMAN CEQTM8000 dizi analizi sisteminde problemlerden sinyaller elde edilmiştir.

3.1 Örneklerin Seçimi

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı DNA bankasından Hb S heterozigot ve Hb S homozigot örnekler alınmıştır. Bu örnekler DNA bankasına konulurken bireylerden bilgilendirilmiş onay formu alınmış olup, anonim hale getirilmektedir. Ayrıca kodon 2 CAC \rightarrow CAT ve kodon 5 -CT polimorfizminin tasarlanan prob üzerinde herhangi bir etkisi olup olmadığının araştırılması amacıyla da DNA bankasından kodon 2 ve kodon 5 polimorfizmini içeren örnekler seçilmiştir. Dizi analizi ile çıkan sonuçların bir kontrol grubu ile karşılaştırılması gerekmektedir. Bu amaçla da hem kodon 2, hem kodon 5, hem de kodon 6 açısından normal olan bir örnek DNA bankasından seçilmiştir (Tablo 3.1).

Tablo 3.1 Çalışmamızda kullanılan örnekler

	Kod numarası	Kodon 2	Kodon 6	Durum
1	101656	CAC	GAG	Kodon 2:Normal Kodon 6:Normal
2	101671	CAT	GAG	Kodon 2:Hom. Kodon 6:Normal
3	102280	CAC	GA/TG	Kodon 2:Normal Kodon 6:Het.
4	101672	CAC/T	GAG	Kodon 2:Het. Kodon 6:Normal
5	102307	CAC/T	GA/TG	Kodon 2:Het. Kodon 6:Het
6	100587	CAC	GTG	Kodon 2:Normal Kodon 6:Hom
7	100963	CAC	GTG	Kodon 2:Normal Kodon 6:Hom.
8	101023	CAC	GTG	Kodon 2:Normal Kodon 6:Hom.
9	102613	CAC	GAG	Kodon 2:Normal Kodon 6:Normal

3.2 DNA Dizi Analizi

Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı DNA bankasından alınan ve MLPA çalışmamızda kullanılacak olan örneklerin dizileri, BECKMAN CEQTM8000 dizi analizi sistemiyle belirlenmiş ve doğrulanmıştır. DNA dizi analizi yönteminde kullanılan primerler Tablo 3.2’ de, DNA dizi analizi reaksiyon karışımı Tablo 3.3’ de verilmiştir.

Tablo 3.2 DNA dizi analizinde kullanılan primerler

Primer çifti	PCR ürünü
PAM 604 →5’ - GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG GA - 3’ PAM 605 →5’ - CTT TGC CAC ACT GAG TGA GC - 3’	536 bp

Tablo 3.3 DNA dizi analizi reaksiyon karışımı

DNA dizi analizi reaksiyon bileşenleri	Tek tüp için miktar	Derişimler
DNA	7 µl	0,03 µg/µl
DTSC mix	11 µl	-
Primer (604 veya 605)	2 µl	1,6 pmol
Toplam Hacim	20 µl	

DNA dizi analizi yönteminde, Beckman Coulter Genome Lab™ Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) Kiti ile MLPA çalışması için kullanılacak örneklerin dizileri belirlenmiştir. Reaksiyon, 94 °C’ de 20 sn, 55 °C’ de 20 sn ve 68 °C’ de 1,30 dk olmak üzere toplam 30 döngü olarak gerçekleştirilmiştir.

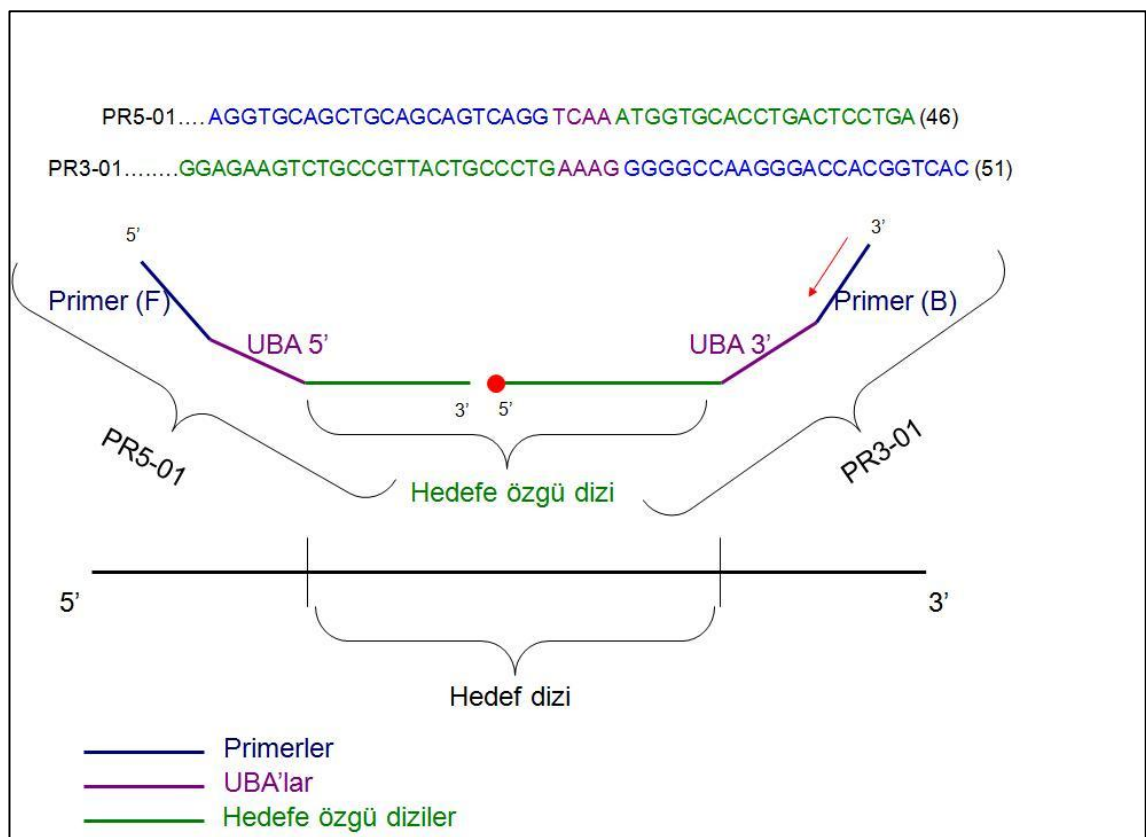
3.3 MLPA Tasarımı

MLPA yönteminin en önemli aşamalarından biri probun tasarlanmasıdır. Tez çalışmamızda Hb S anormal hemoglobinin tanımlanması için bir prob tasarlanmıştır. Hb S beta globin geninin 6. kodonunda GAG→GTG dönüşümünün olmasıyla meydana gelmektedir. Dolayısıyla tasarlanan probun hedefe özgü dizini beta globin geni içerisinde seçilmiş olup 6. kodonu kapsayacak şekilde oluşturulmuştur (Şekil 3.1).

Promotor	E I
ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACC ATGGTG CAC CTG ACT CCTGAG GAGAAG TCT	
M V-1 H-2 L-3 T-4 P-5 E-6 E-7 K-8 S-9	
GCC GTT ACT GCC CTG TGG GGC AAG GTG AAC GTG GAT GAAGTT GGT GGT GAG GCC CTG GGC AGG	
A-10 V-11 T-12 A-13 L-14 W-15 G-16 K-17 V-18 N-19 V-20 D-21 E-22 V-23 G-24 G-25 E-26 A-27 L-28 G-29 R-30	
IVS-I	
TTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATA	
GGCACTGACTCTCTGCGCTATTGGTCTATTTCCACCCTTAGG	
E II	
CTG CTG GTG GTC TAC CCT TGG ACC CAG AGG TTC TTT GAG TCC TTT GGG GAT CTG TCC ACT CCT GAT GCT GTT	
L-31 L-32 V-33 V-34 Y-35 P-36 W-37 T-38 Q-39 R-40 F-41 F-42 E-43 S-44 F-45 G-46 D-47 L-48 S-49 T-50 P-51 D-52 A-53 V-54	
ATG GGC AAC CCT AAG GTG AAG GCT CAT GGCAAG AAA GTG CTC GGT GCCTTT AGT GAT GGC CTG GCT CAC CTG	
M-55 G-56 N-57 P-58 K-59 V-60 K-61 A-62 H-63 G-64 K-65 K-66 V-67 L-68 G-69 A-70 F-71 S-72 D-73 G-74 L-75 A-76 H-77 L-78	
GAC AAC CTC AAG GGC ACC TTT GCC ACA CTG AGT GAG CTG CACTGT GAC AAG CTG CAC GTG GAT CCT GAG AAC	
D-79 N-80 L-81 K-82 G-83 T-84 F-85 A-86 T-87 L-88 S-89 E-90 L-91 H-92 C-93 D-94 K-95 L-96 H-97 V-98 D-99 P-100 E-101 N-102	
TTC AGG	
F-103 R-104	

Şekil 3.1 Beta globin gen ailesi

Dolayısıyla probumuzun hedef dizini; ilk oligonükleotit için 5'-- ATG GTG CAC CTG ACT CCT GA--3' ve ikinci oligonükleotit için 5'--GGA GAA GTC TGC CGT TAC TGC CCT G--3' şeklindedir. MLPA prob tasarımımda primer dizilerinin insan genomunda tümleyicisi bulunmaması gerekir. Bu yüzden tasarladığımız probun primer dizileri fare ağır zincirlerinden belirlenmiştir. Forward primerimiz 5'-- AGG TGC AGC TGC AGC AGT CAG G--3' şeklinde iken reverse primerimiz 5'-- GGG GCC AAG GGA CCA CGG TCA C--3' şeklindedir. Uzunluğu belirli aralıklar ise ilk oligonükleotit için 5'--TCA A--3' dizisinde iken ikinci oligonükleotit için 5'-- AAA G-3' şeklindedir (Şekil 3.2). Probumuzun toplam uzunluğu ise 97 nükleotittir.



Şekil 3.2 Prob tasarımı

3.4 MLPA Yöntemi

Tez çalışmamızda MLPA yöntemi, hem genomik DNA üzerinde hem de PCR yöntemiyle kalıpları hazırlanmış örnekler üzerinde denendi. Bu yüzden örneklerin PCR yöntemiyle kalıpları hazırlandı. PCR yöntemi ile örnek kalıplarının hazırlanması işlemi, sıcaklık döngü cihazı (*Technogene Thermo Cycler*) kullanılarak yapılmıştır. MLPA

yöntemi basamaklarından olan denatürasyon, hibritleşme, ligasyon, hedef bölgenin ayrılması ve problemlerin amplifikasyonu işlemleri de sıcaklık döngü cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmalarımız sırasında en uygun Mg^{2+} konsantrasyonunu ve sıcaklık aralıklarını belirlemek için optimizasyonlar yapıldı.

3.4.1 Örneklerin PCR Yöntemiyle Kalıplarının Hazırlanması

Beta globin geni içerisinde yer alan ve 6. kodonu da içerisine alan 536 bp' lik bölge, bölgeye özgü primer çifti kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltıldı. İlgili bölgelerin çoğaltılması için Tablo 3.4' de verilen 50 μ l' lik PCR karışımları hazırlandı. Bu PCR karışımı içerisindeki bölgeye özgü primer çifti Tablo 3.5' de verilmiştir. PCR yöntemiyle örneklerin kalıplarının hazırlanması işlemi, sıcaklık döngü cihazı kullanılarak Tablo 3.6' de verilen program ile yapıldı. Daha sonra, elde edilen PCR ürünü, % 1' lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

Tablo 3.4 PCR karışımı

PCR bileşenleri	Tek tüp için miktar	Derişimler
DNA	3 μ l	0,03 μ g/ μ l
Tampon (Buffer Fermantas 10X)	5 μ l	10 X
dNTP _{Mix} (Fermantas)	5 μ l	0,05 mM
Mg^{2+} (Fermantas)	5 μ l	16 mM
Primer I	1 μ l	10 pmol
Primer II	1 μ l	10 pmol
Taq DNA polimeraz (Fermantas)	1 μ l	1u/ μ l
Steril dH ₂ O	29 μ l	-
Toplam Hacim	50 μ l	

Tablo 3.5 İlgili bölgeye özgü primer çifti

Primer çifti	PCR ürünü
PAM 604 →5' - GGT TGG CCA ATC TAC TCC CAG GA - 3'	536 bp
PAM 605 →5' - CTT TGC CAC ACT GAG TGA GC - 3'	

Tablo 3.6 Kalıpların hazırlanması için kullanılan sıcaklık döngü programı

Sıcaklık döngüleri	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Denatürleme	94 °C	30 sn	30
Primer eşleşmesi (<i>annealing</i>)	56 °C	15 sn	
Primer uzaması (<i>extension</i>)	72 °C	30 sn	

3.4.2 Hibritleşme

MLPA yönteminin bir diğer basamağında, tasarlanan probumuzun örnek DNA' ların tümleyici dizisiyle hibritleşmesi gerçekleştirilmiştir. Örnek DNA' ların hedef dizisi üzerinde herhangi bir mutasyon olduğunda prob, ligasyonun gerçekleştiği uçta DNA üzerine hibridize olamayacaktır. Hibritleşme işlemi için tablo 3.7' de verilen 10 µl' lik Hib_{mix}' ler hazırlandı. Hibritleşme basamağı sıcaklık döngü cihazı kullanılarak tablo 3.8' de verilen program ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.7 Hib_{mix}

Hib _{mix} bileşenleri	Tek tüp için miktar	Derişimler
DNA (0,03 µg/µl)	6 µl	0,03 µg/µl
Prob (PR5-01) (IDT)	1,5 µl	10 pmol/µl
Prob (PR3-01) (IDT)	1.5 µl	10 pmol/µl
Taq DNA ligase buffer (BioLabas)	1 µl	10X
Toplam Hacim	10 µl	

Tablo 3.8 Hibritleşme işlemi için kullanılan sıcaklık döngü programı

Sıcaklık	Süre
25°C	20 dk
98°C	5 dk
25°C	5 dk
95°C	1 dk
60°C (Sıcaklık titrasyonu)	Gece boyu

İçerisinde 6 µl örnek DNA' nın bulunduğu tüpler *Technogene Thermo Cycler* cihazına yerleştirilerek 25 °C' de 20 dk ve 98 °C' de 5 dk da tutuldu. Bu sayede DNA 'ların denatürasyonu gerçekleştirildi. Denatüre edilen DNA' lar üzerine 25 °C' de problemlerimiz ve Taq DNA ligase buffer'ı eklendi. Hib_{mix} 95 °C de 1 dk ve 60 °C' de gece boyunca bekletilerek hibritleşme işlemi gerçekleştirildi. En uygun deneysel sıcaklıkların bulunması sırasında 60 °C' de ki gece boyu bekleme sıcaklığı daha sonra 62 °C ve 63 °C olarak denendi.

3.4.3 Ligasyon

MLPA yönteminin ligasyon basamağında, hibritleşme işlemi başarıyla sonuçlanan problemlerin ligasyonu gerçekleştirilmiştir. Hibritleşme işlemi gerçekleşmeyen problemlerin ligasyon işlemide gerçekleşemeyecektir. Ligasyon işlemi için Tablo 3.9' de verilen Lig_{mix}' ler hazırlandı. Ligasyon basamağı sıcaklık döngü cihazı kullanılarak Tablo 3.10' de verilen program ile gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.9 Lig_{mix}

Lig _{mix} bileşenleri	Tek tüp için miktar	Derişimler
Taq DNA ligase (BioLabs)	1 µl	40u/µl
Taq DNA ligase buffer (BioLabs)	3 µl	10X
sdH ₂ O	26 µl	-
Toplam Hacim	30 µl	

Tablo 3.10 Ligasyon işlemi için kullanılan sıcaklık döngü programı

Sıcaklık	Süre
54°C	3 dk
54°C	15 dk
98°C	5 dk
4°C	Son bekletme

İçerisinde hibritleşme işlemi gerçekleştirilen 10 µl' lik örneklerin bulunduğu tüpe 54 °C' de Lig_{mix} eklendi. Daha sonra tüpler 54 °C' de 15 dk ve 98 °C' de 5 dk tutuldu ve işlem 4 °C' de son buldu. En uygun sıcaklığın bulunması çalışması sırasında 54 °C' lik sıcaklık 60 °C ve 62 °C olarak denendi. 4 °C' lik son bekletme, sıcaklık döngü programından çıkartıldı.

3.4.4 Hedef DNA Denatürasyonu ve Probların Amplifikasyonu

Hibritleşme ve ligasyon işlemleri sonrası, problar uygun primerler yardımıyla amplifiye edildi. Probların amplifikasyonu öncesinde 94 °C’ de ki denatürleme sıcaklığı ile hedef DNA probdan uzaklaştırıldı. Bu aşamada hibritleşme ve ligasyon işlemleri başarısız problar amplifiye edilemezken, bu işlemleri başarıyla sonuçlanan problar amplifiye edilirler. Probların amplifikasyonu işlemi için Tablo 3.11’ de verilen 50 µl’ lik PCR karışımları hazırlanarak Tablo 3.13’ de verilen sıcaklık döngü programıyla amplifikasyon gerçekleştirildi. Bu PCR işlemi için problara özgü primer çifti tablo 3.12’ de verilmiştir.

Tablo 3.11 PCR karışımı

PCR bileşenleri	Tek tüp için miktar	Derişimler
DNA	3 µl	0,03µg/µl
Tampon (Buffer Fermantas 10X)	5 µl	10X
dNTP _{Mix} (Fermantas)	5 µl	0,05 mM
Mg ²⁺ (Fermantas)	5 µl	16 mM
PR5-F (IDT)	1 µl	10 pmol/µl
PR3-B (IDT)	1 µl	10 pmol/µl
Taq DNA polimeraz (Fermantas)	1 µl	1 u/ µl
Steril dH ₂ O	29 µl	-
Toplam Hacim	50 µl	

Tablo 3.12 Problara özgü primer çifti

Primer çifti
PR5-F → 5’ - AGG TGC AGC TGC AGC AGT CAG G – 3’
PR3-B → 5’ - GTG ACC GTG GTC CCT TGG CCC C – 3’

Tablo 3.13 Probların amplifikasyonu için kullanılan sıcaklık döngü programı

Sıcaklık döngüleri	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
Denatürleme	94 °C	30 sn	30
Primer eşleşmesi (<i>annealing</i>)	56 °C	15 sn	
Primer uzaması (<i>extension</i>)	72 °C	30 sn	

3.4.5 Kapiler Elektroferezde Fragment Analizi

Probların amplifikasyon işlemleri gerçekleştirildikten sonra, kapiler elektroferezde fragment analizi yapılarak bulgular elde edildi. Fragment analizi için tablo 3.14' de verilen reaksiyon karışımı hazırlandı.

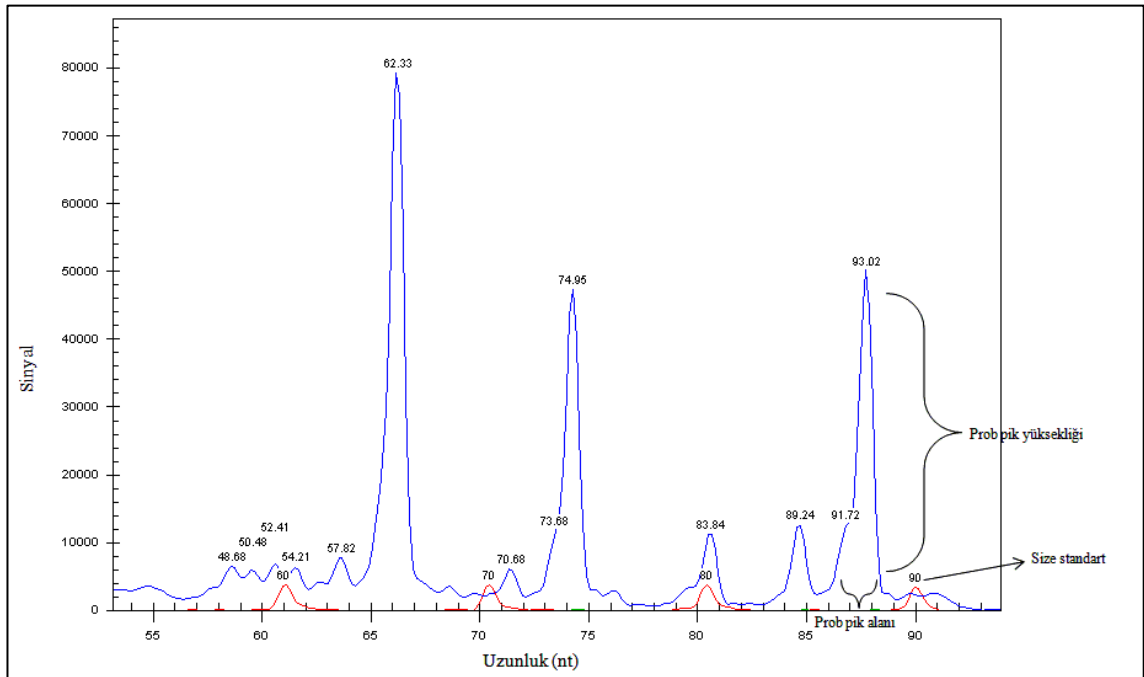
Tablo 3.14 Fragment analizi için reaksiyon karışımı

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
Sample Loading Solution	40 µl
Prob	10 µl
Size standart	2 µl
Toplam Hacim	52 µl

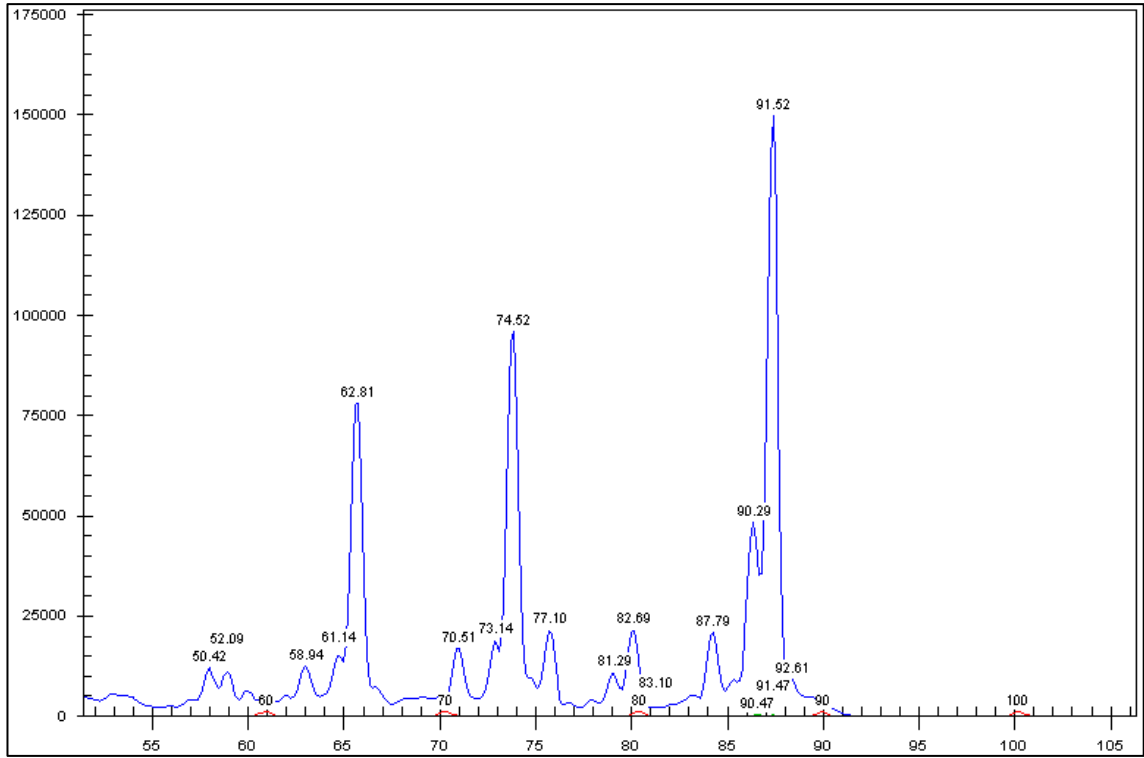
4.BULGULAR

Tez çalışmamızda, Hb S anormal hemoglobini taşıyan ve normal bireylere ait DNA örnekleri, Pamukkale Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Hemoglobinopati DNA arşivinden alınmıştır. Bu mutasyonun belirlenmesi için uygun bir prob tasarlandıktan sonra hem genomik DNA örnekleri hem de kalıp DNA örnekleri üzerinde bu problemlerin hibridizasyonu, ligasyonu ve amplifikasyonu gerçekleştirildi. Kapiler elektroforezde fragment analizi yapılarak MLPA yönteminin Hb S anormal hemoglobini açısından normal olan bireylerde ve bu mutasyonu taşıyan bireylerde nasıl sonuçlar verdiği incelenerek bu yöntemin tek nükleotit değişimleri için uygun bir yöntem olup olmadığı incelendi.

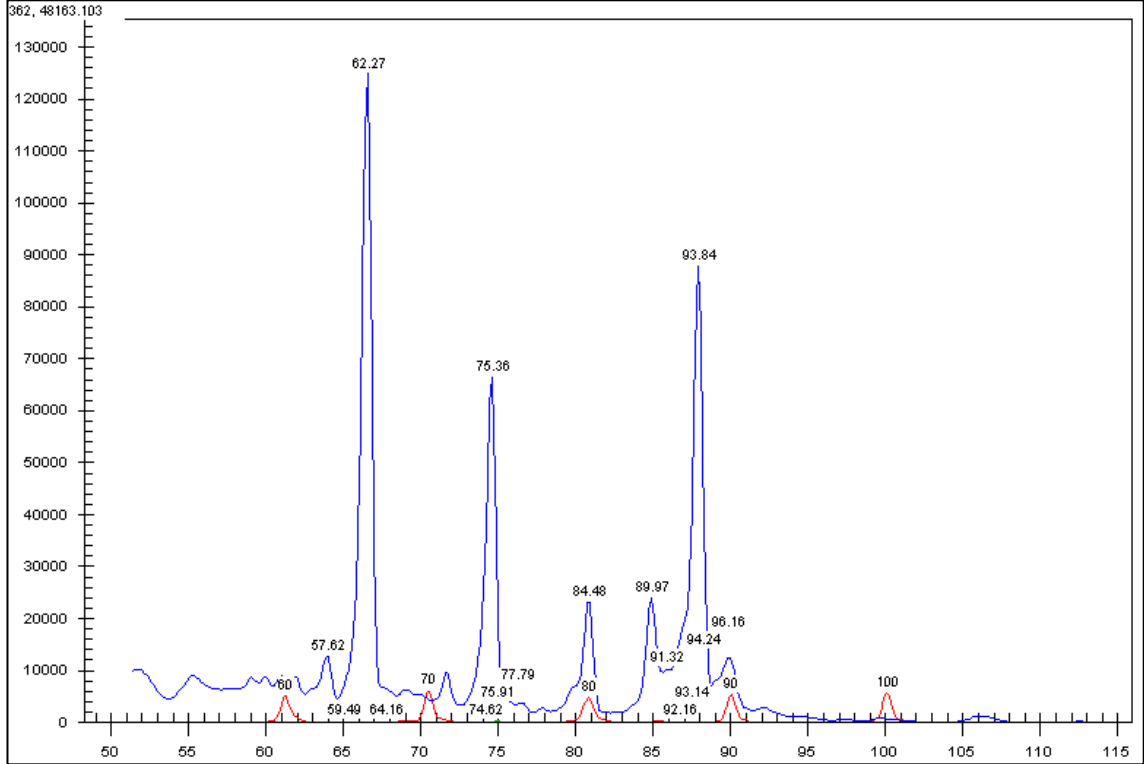
Problemlerin amplifikasyonu sonrasında kapiler elektroforezde gerçekleştirilen fragment analizi sonuçları Şekil 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4’ de ki gibi elde edilmektedir.



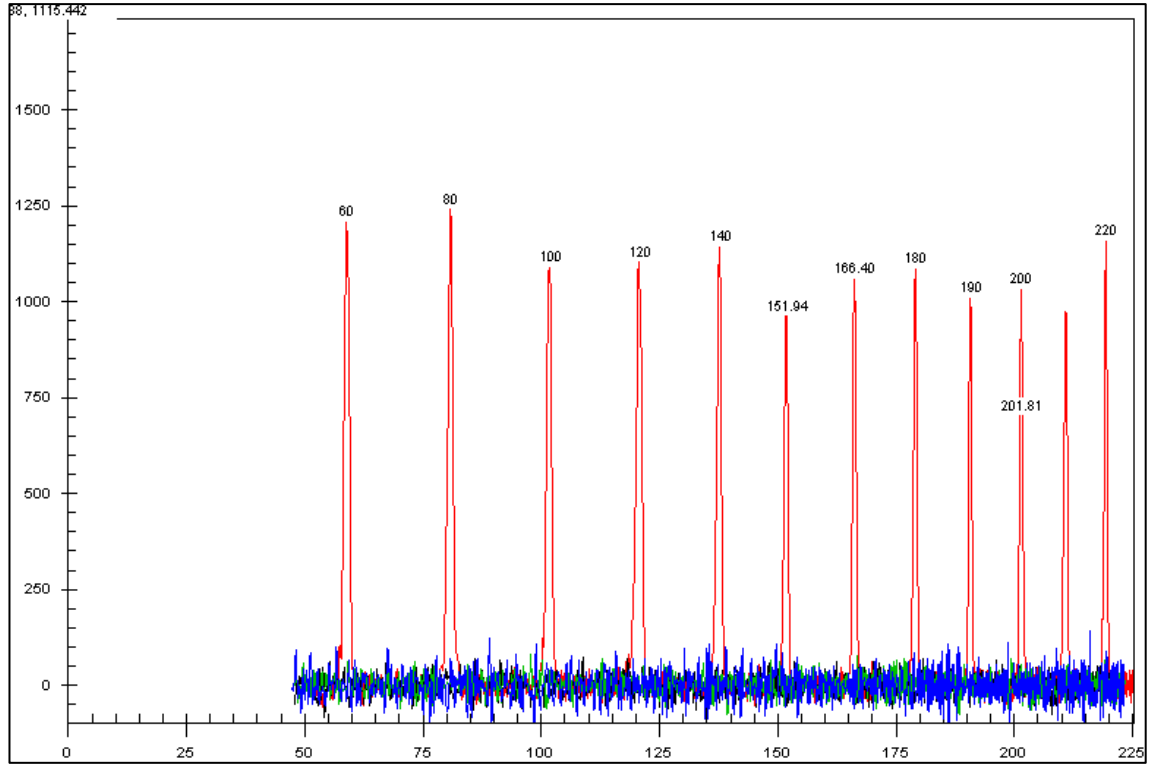
Şekil 4.1 Örnek çoğaltılmış prob PCR sonucunun kapiler elektroforez görüntüsü



Şekil 4.2 Örnek çoğaltılmış prob PCR sonucunun kapiler elektroforez görüntüsü



Şekil 4.3 Örnek çoğaltılmış prob PCR sonucunun kapiler elektroforez görüntüsü



Şekil 4.4 Çalışmada kullanılacak standart büyüklüklerin kapiler elektroforez görüntüsü

Prob primerimiz mavi renk ile işaretli olduğundan dolayı mavi renkli pikler problemleri, kırmızı renkli pikler ise size standart' ı göstermektedir. Dizi analiz sistemi analiz sonucunda otomatik olarak pik yükseklikleri, pik alanlarını ve problemlerin uzunlukluklarını vermektedir.

4.1 Mg²⁺ Optimizasyonu

Kontrol grubu olarak kullanılacak, hem kodon 6 hem de kodon 2 ve kodon 5 açısından normal olan 101656 numaralı DNA örneğinin PCR uygulaması sonucunda 536 bp' lik bölgesi çoğaltıldı. Çalışmada beş farklı tüpte aynı DNA örneğinin PCR kalıbı, farklı Mg derişimleri kullanılıp çoğaltılarak Mg²⁺ titrasyonu gerçekleştirildi. Hibritleşme ve ligasyon işlemleri sonrası kapiler elektroforezde fragment analizi yapılarak en uygun Mg²⁺ konsantrasyonu bulundu (Tablo 4.1). Ligasyon işlemi 54 °C 'de gerçekleştirildi.

Tablo 4.1 Mg²⁺ titrasyonu verileri

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik Yüksekliği/Pik Alanı
101656-1	90.18	192279	142342	0,740289
101656-2	90.80	198775	159077	0,800287
101656-3	90.98	10841	9278	0,855825
101656-4	91.56	198053	137767	0,695607
101656-5	91.02	232892	152399	0,654376

En uygun Mg²⁺ derişiminin bulunması amacıyla yönelik olarak 12 mM (101656-1), 14 mM (101656-2), 15 mM (101656-3), 16 mM (101656-4) ve 18 mM (101656-5) derişime sahip Mg²⁺ kullanılarak titrasyon yapılmıştır. En uygun olma kriteri 97 nükleotitlik prob uzunluğuna en yakın olma şeklinde tanımlanmıştır. Bu bağlamda en uygun Mg²⁺ derişiminin 16 mM olduğu belirlenmiştir.

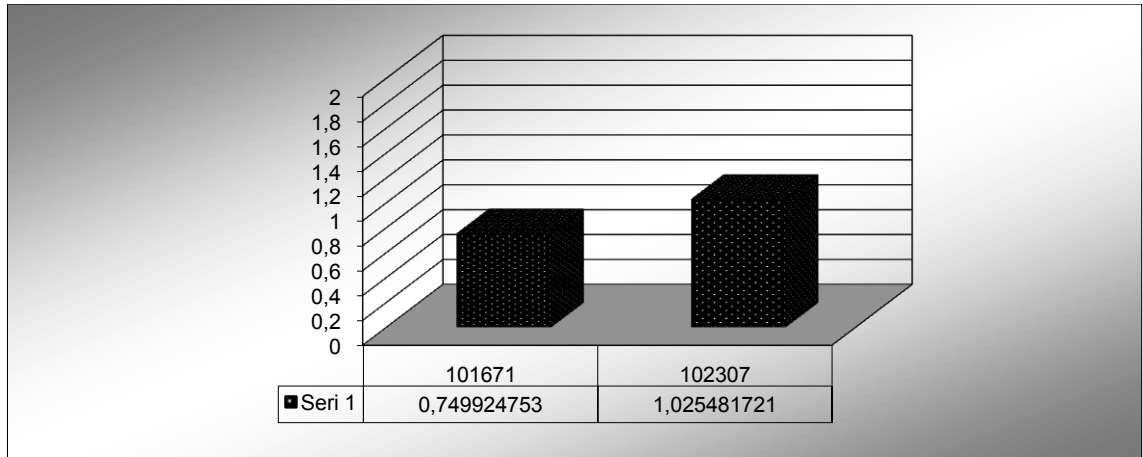
4.2 Sıcaklık Optimizasyonu

İkinci aşamada, kodon 6 ve kodon 2 açısından heterozigot ve normal olan DNA örneklerinin 536 bp' lik bölgesi PCR işlemi sonrası amplifikasyonu gerçekleştirilip, 62 °C' de problemlerin hibritleşmesi, ligasyonu ve amplifikasyonu sonrasında fragment analizi yapılmıştır (Tablo 4.2). Analiz sonucu örneklerden alınan pik yükseklik / pik alanı oranları, kontrol örnekten alınan sonuç ile karşılaştırılmıştır (Şekil 4.5). Karşılaştırma şekilleri, kontrol örneğinin pik yükseklik/pik alanı' nın oranının 1 kabul edilip diğer örneklerin pik yükseklik / pik alanlarına orantılanması ile oluşturulmuştur.

Tablo 4.2 62 °C' de örneklerin fragment analiz verileri

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı	X/Y
101671	96.80	18062	9422	0,521648	0,749925
102307	96.94	211766	151058	0,713325	1,025482

X: Örneklerin pik yüksekliği / pik alanı Y: Kontrol grubu pik yüksekliği / pik alanı (0.695607)



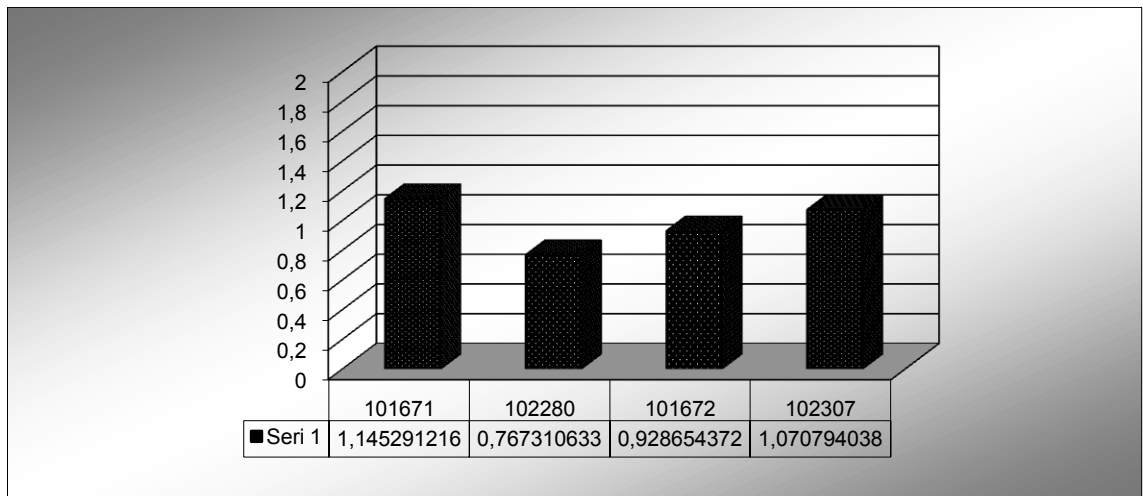
Şekil 4.5 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması

Üçüncü aşamada, bir önceki çalışma sıcaklığı 63 °C' ye çıkartılıp işlemler gerçekleştirildi. Fragment analizi sonucu alınan verileri Tablo 4.3, örneklerin kontrol grubu ile karşılaştırılması ise Şekil 4.6 ' da verilmiştir.

Tablo 4.3 63 °C' de örneklerin fragment analiz verileri

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı	X/Y
101671	96.12	171672	136765	0,796665	1,145291
102280	95.86	279124	148980	0,533741	0,767311
101672	96.02	187375	121039	0,645972	0,928654
102307	94.69	198083	147541	0,744844	1,070794

X: Örneklerin pik yüksekliği / pik alanı Y: Kontrol grubu pik yüksekliği / pik alanı (0.695607)



Şekil 4.6 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması

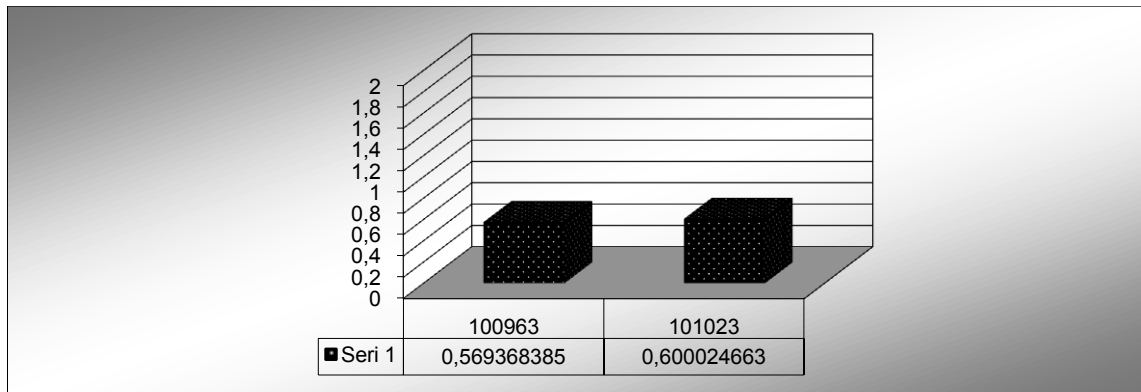
4.3 Örneklerin PCR Kalıpları ile Yapılan Çalışmalar

Dördüncü aşamada, Hb S açısından homozigot olan örneklerin 536 bp' lik bölgesinin PCR işlemi ile amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra, problemlerin hibritleşmesi, ligasyonu, amplifikasyonu ve fragment analizi yapılmıştır. Ayrıca verileri karşılaştırmak açısından, bu çalışma içerisinde 101656 nolu kontrol DNA örneği ile de aynı işlemler aynı sıcaklıkta yapılmış fakat kontrol örneğinden herhangi bir veri alınmadığından, verilerin karşılaştırılmasında 54 °C' de elde edilen kontrol örnek oranı (0.695607) kullanılmıştır. Ligasyon işlemi 62 °C' de gerçekleştirilmiş olup alınan veriler Tablo 4.4, verilerin karşılaştırılması ise Şekil 4.7' de verilmiştir.

Tablo 4.4 62 °C' de Hb S homozigot örneklerin fragment analizi

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı	X/Y
100963	95.97	392415	155417	0,396053	0,569368
101023	96.66	287009	119791	0,417377	0,600025

X: Örneklerin pik yüksekliği / pik alanı Y: Kontrol grubu pik yüksekliği / pik alanı (0.695607)



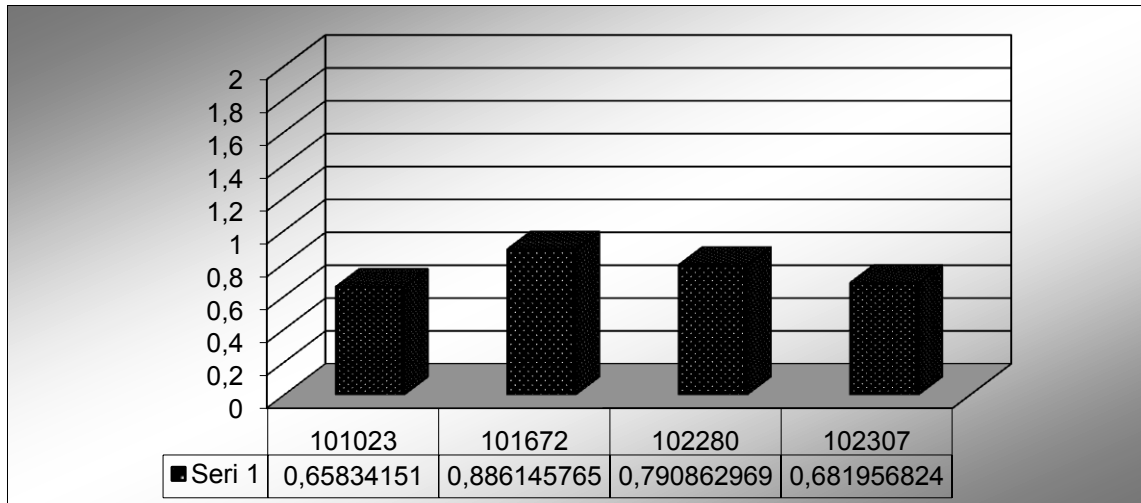
Şekil 4.7 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması

Beşinci aşamada, örneklerin 536 bp' lik bölgesinin PCR işlemi ile amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra, problemlerin hibritleşmesi, ligasyonu, amplifikasyonu ve fragment analizi yapılmıştır. Ayrıca verileri karşılaştırmak açısından, bu çalışma içerisinde 101656 nolu kontrol DNA örneği ile de aynı işlemler aynı sıcaklıkta uygulanmıştır. Ligasyon işlemi 62 °C' de gerçekleştirilmiş olup alınan veriler Tablo 4.5, verilerin karşılaştırılması ise Şekil 4. 8' de verilmiştir.

Tablo 4.5 62 °C’ de örneklerin fragment analizi

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı	X/Y
101023	94.67	5081	3852	0,758118	0,658342
101672	94.31	38634	39424	1,020448	0,886146
102280	94.17	3450	3142	0,910725	0,790863
102307	93.19	31497	24735	0,785313	0,681957
Kontrol					
101656	94.54	1412	1626	1,151558	

X: Örneklerin pik yüksekliği / pik alanı Y: Kontrol grubu pik yüksekliği / pik alanı (1,151558)

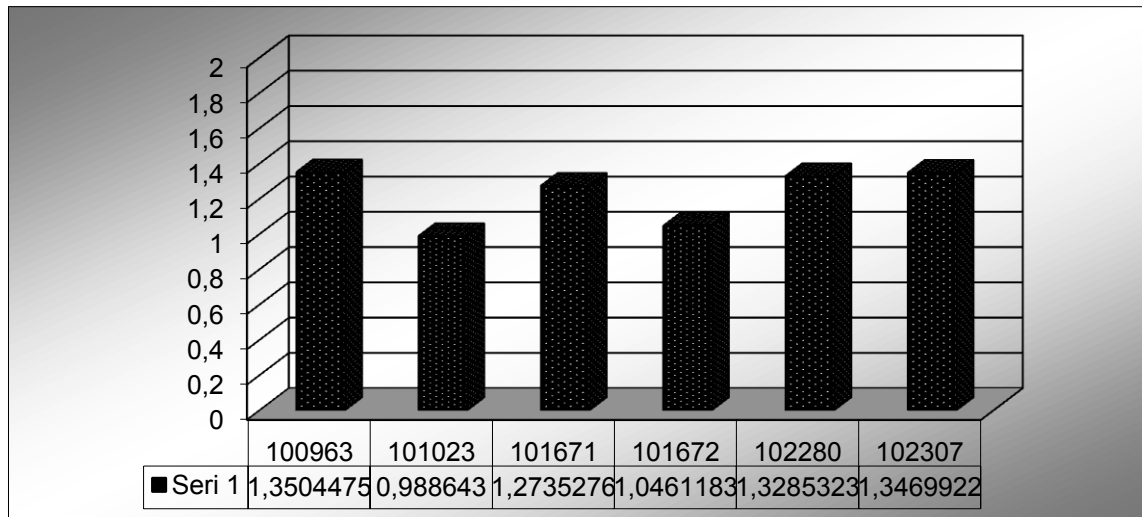
**Şekil 4.8** Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması

Altıncı aşamada, bir önceki çalışmada 97 nükleotit prob uzunluğuna yaklaşamadığı için ligasyon sıcaklığında değişiklik yapıldı. Örneklerin 536 bp’ lik bölgesinin PCR işlemi ile amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra, problemlerin hibritleşmesi, ligasyonu, amplifikasyonu ve fragment analizi yapılmıştır. Ayrıca verileri karşılaştırmak açısından, bu çalışma içerisinde 101656 nolu kontrol DNA örneği ile de aynı işlemler aynı sıcaklıkta uygulanmıştır. Ligasyon işlemi 60 °C’ de gerçekleştirilmiş olup alınan veriler Tablo 4.6, verilerin karşılaştırılması ise Şekil 4.9’de verilmiştir.

Tablo 4.6 60 °C' de örneklerin fragment analizi

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı	X/Y
100963	91.63	28172	26479	0,939905	1,350447
101023	94.63	1587	1092	0,688091	0,988643
101671	93.47	12567	11139	0,886369	1,273528
101672	94.97	5318	3872	0,728093	1,046118
102280	94.33	28667	26507	0,924652	1,328532
102307	96.70	1824	1710	0,9375	1,346992
Kontrol					
101656	93.22	6592	4588	0,695995	

X: Örneklerin pik yüksekliği / pik alanı Y: Kontrol grubu pik yüksekliği / pik alanı (0,695995)

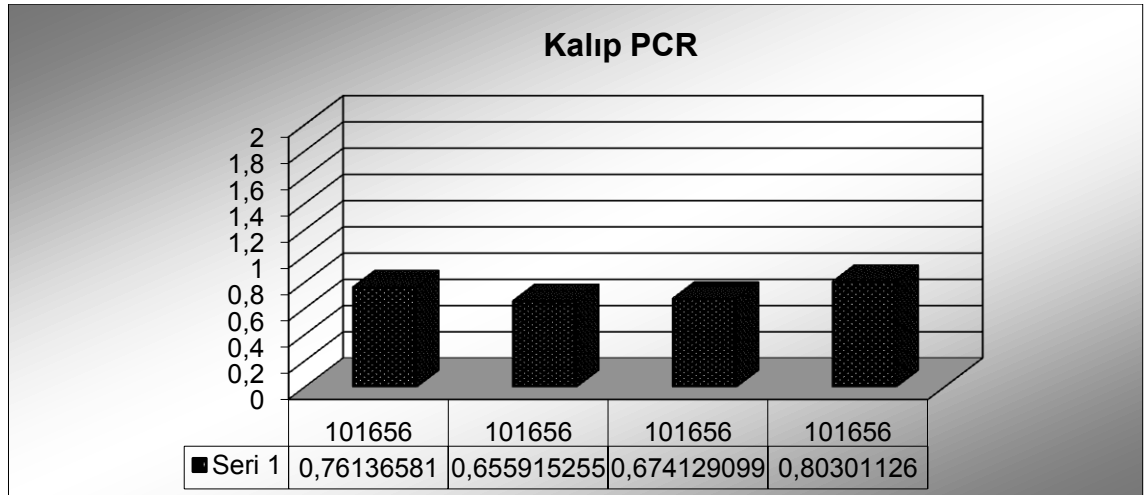
**Şekil 4.9** Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması

4.4 Örneklerin PCR Kalıpları ile Genomik DNA' larının Birlikte Çalışılması

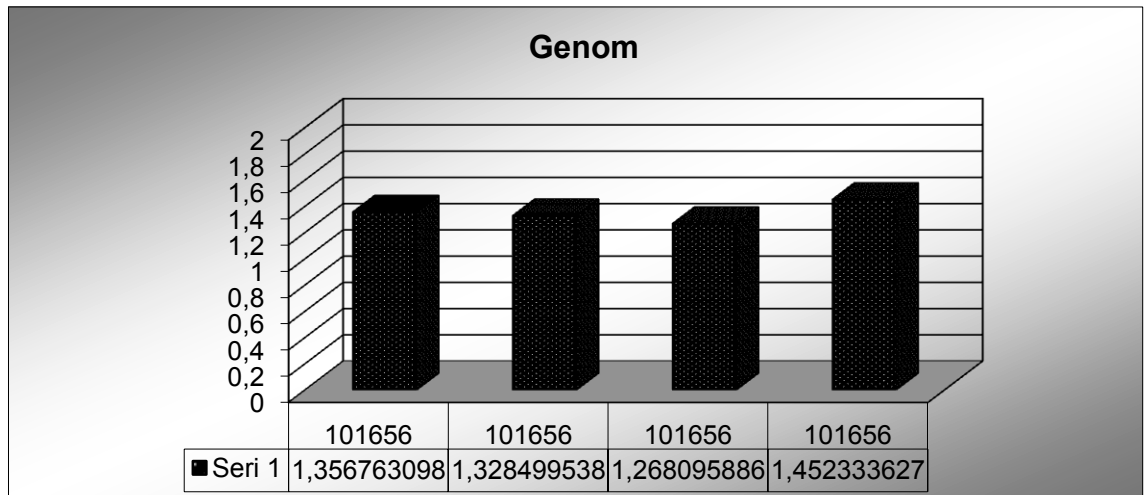
Yedinci aşamada ise kontrol grubu olan 101656 numaralı DNA örneğinin hem 536 bp' lik bölgesi çoğaltılarak kalıp PCR' ları ile hem de genomik DNA örneği ile çalışıldı. 62 °C' de problemlerin hibritleşmesi, ligasyonu ve amplifikasyonu gerçekleştirildikten sonra fragment analizi sonucunda problemlerin bağlanması bakımından kalıp PCR ürünleri ile genomik DNA arasında herhangi bir farklılık olup olmadığı gözlenmeye çalışıldı. 101656 numaralı örneğin 4 kalıp PCR ürünü ve 4 genomik DNA' sı çalışılıp fragment analizi sonucu alınan veriler Tablo 4.7, kalıp PCR ürünlerinin pik yükseklik/pik alanı oranları Şekil 4.10, genomik DNA pik yükseklik / pik alanı oranları ise Şekil 4.11' de verilmiştir. Bu çalışmamızda kontrol grubu 101656 numaralı örnek kullanıldığından karşılaştırılma yapılmamıştır.

Tablo 4.7 62 °C' de 101656 numaralı örneğin PCR ürünleri ve genomik DNA' sının fragment analizi

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı
101656K	96.85	167256	127343	0,761366
101656K	97.00	219010	143652	0,655915
101656K	97.09	224681	151464	0,674129
101656K	97.28	192544	154615	0,803011
101656	94.25	107399	145715	1,356763
101656	93.84	63787	84741	1,3285
101656	94.37	42634	54064	1,268096
101656	94.02	39745	57723	1,452334



Şekil 4.10 101656 numaralı örneğin kalıp PCR ürünlerinin pik yükseklik / pik alanı sonuçları



Şekil 4.11 101656 numaralı örneğin genomik DNA' sının pik yükseklik / pik alanı sonuçları

4.5 Genomik DNA Örnekleri ile Yapılan Beş'li Çalışmalar

Önceki aşamalarda 101656 numaralı örneğin kalıp PCR ürününün fragment analizi sonucunu kontrol olarak kullanmıştık. Bundan sonraki çalışmalarda genomik DNA örnekleri ile çalışılacağından, kontrol örneğin genomik DNA' sının fragment analizi sonucunu kontrol olarak kullanılmıştır. Bu amaçla sekizinci aşamada 101656 numaralı örneğin genomik DNA' sının 60 °C' de ve 62 °C' de probalar ile hibritleşmesi ve ligasyonu gerçekleştirildikten sonra problemlerin amplifikasyonu sonrası fragment analizi yapıldı. 60 °C' de ki fragment analiz sonuçları Tablo 4.8, 62 °C' de ki fragment analiz sonuçları ise Tablo 4.9' da verilmiştir.

Tablo 4.8 60 °C’ de 101656 numaralı örneğin genomik DNA fragment analiz sonuçları

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı
101656-1	91.32	2651	3162	1,192757
101656-2	90.79	9090	11023	1,212651
101656-3	92.31	6682	8437	1,262646
101656-4	92.21	9564	13785	1,441343
101656-5	92.33	8863	12608	1,422543

Ortalama: 1,3064

Tablo 4.9 62 °C’ de 101656 numaralı örneğin genomik DNA fragment analiz sonuçları

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı
101656-1	92.19	59548	90109	1,513216
101656-2	92.08	52363	72037	1,375723
101656-3	92.96	66803	98546	1,475173
101656-4	93.05	61998	93562	1,509113
101656-5	86.75	76021	115565	1,520172

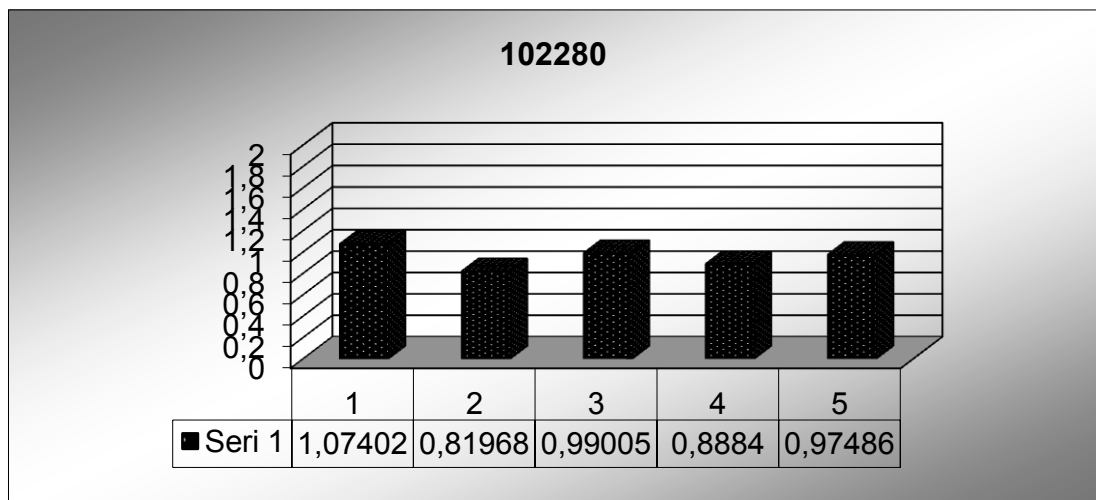
Ortalama 1.478

Bundan sonraki aşamada ise genomik DNA örneklerinin 5’ erli çalışılmalarına geçilmiş ve çalışılan sıcaklıkta kontrol olarak 101656 numaralı genomik DNA örneğinin pik yükseklik/pik alanı oranlarının ortalaması kullanılmıştır. 62 °C’ de 102280, 101671, 100963 ve 102613 numaralı örneklerin fragment analiz sonuçları sırasıyla Tablo 4.10, 4.11, 4.12 ve 4.13 ve 4.14’ de verilmiştir. Analiz sonucunda verilerin kontrol grubu ile karşılaştırılması ise Şekil 4.12, 4.13, 4.14, 4.15 ve 4.16’da verilmiştir.

Tablo 4.10 62 °C' de 102280 numaralı örneğin fragment analiz sonuçları

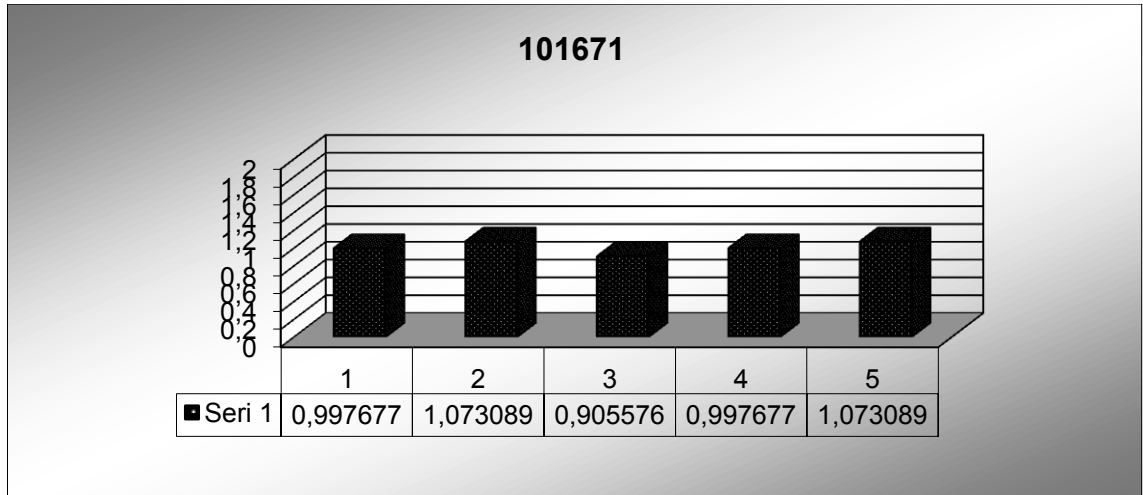
Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı	X/Y
102280-1	91.52	94582	150140	1,587406	1,074023
102280-2	92.09	64650	78323	1,211493	0,819684
102280-3	92.62	80103	117214	1,463291	0,990048
102280-4	93.69	59686	78371	1,313055	0,8884
102280-5	92.68	31165	44904	1,440847	0,974863

X: Örneklerin pik yüksekliği / pik alanı Y: Kontrol grubu pik yüksekliği / pik alanı (1,478)

**Şekil 4.12** Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması**Tablo 4.11** 62 °C' de 101671 numaralı örneğin fragment analiz sonuçları

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı	X/Y
101671-1	93.26	86967	114436	1,315855	0,890295
101671-2	89.18	61321	82775	1,349864	0,913304
101671-3	93.24	2716	4833	1,779455	1,203961
101671-4	92.20	62575	92271	1,474567	0,997677
101671-5	94.57	2662	4222	1,586026	1,073089

X: Örneklerin pik yüksekliği / pik alanı Y: Kontrol grubu pik yüksekliği / pik alanı (1,478)

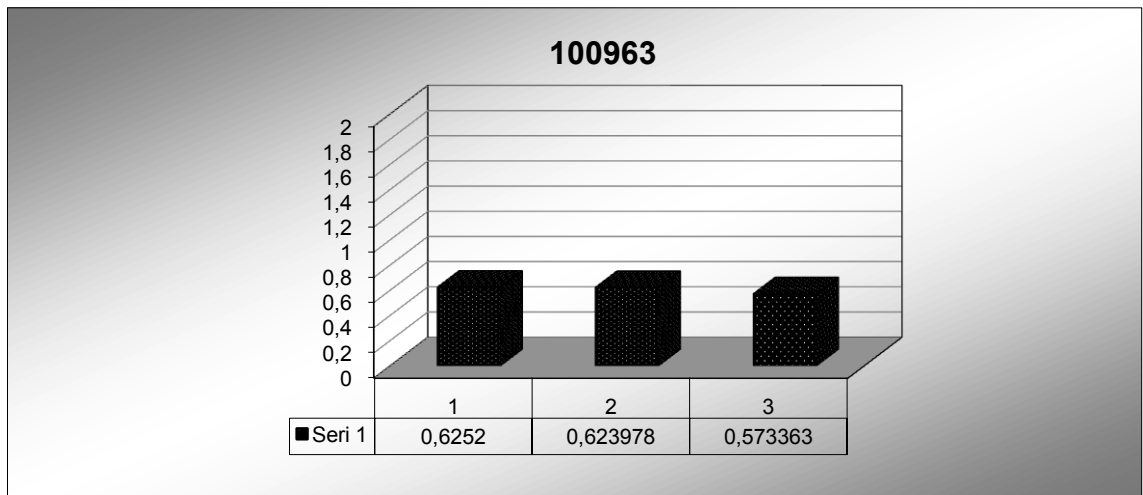


Şekil 4.13 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması

Tablo 4.12 62 °C' de 100963 numaralı örneğin fragment analiz sonuçları

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı	X/Y
100963-1	91.31	161162	148921	0,924045	0,6252
100963-2	91.44	162898	150231	0,92224	0,623978
100963-3	92.06	189264	160388	0,84743	0,573363

X: Örneklerin pik yüksekliği / pik alanı Y: Kontrol grubu pik yüksekliği / pik alanı (1,478)

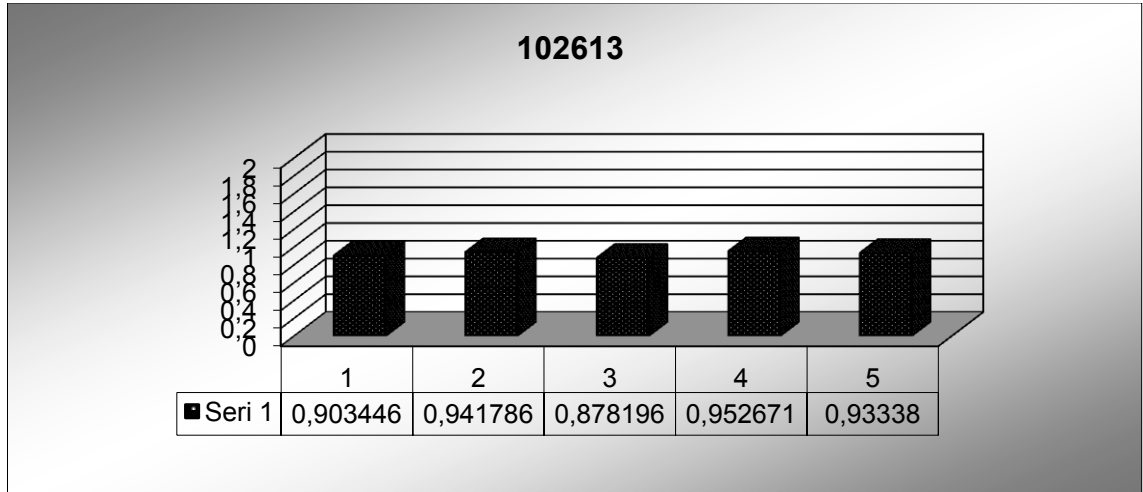


Şekil 4.14 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması

Tablo 4.13 62 °C' de 102613 numaralı örneğin fragment analiz sonuçları

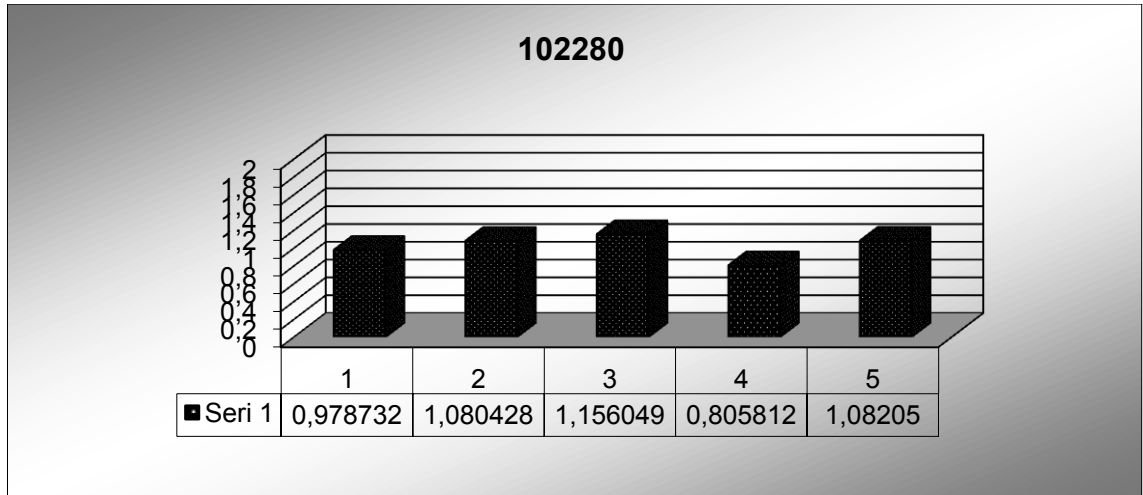
Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı	X/Y
102613-1	92.46	31295	41788	1,335293	0,903446
102613-2	92.48	77383	107714	1,391959	0,941786
102613-3	92.55	71597	92931	1,297973	0,878196
102613-4	93.02	35018	49307	1,408047	0,952671
102613-5	93.20	23974	33073	1,379536	0,93338

X: Örneklerin pik yüksekliği / pik alanı Y: Kontrol grubu pik yüksekliği / pik alanı (1,478)

**Şekil 4.15** Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması**Tablo 4.14** 60 °C' de 102280 numaralı örneğin fragment analiz sonuçları

Örnekler	Uzunluk	Pik alanı (rfuxmm)	Pik yüksekliği (rfu)	Pik yüksekliği/Pik alanı	X/Y
102280-1	92.42	29521	37746	1,278615	0,978732
102280-2	92.68	26449	37332	1,411471	1,080428
102280-3	92.95	44142	66666	1,510262	1,156049
102280-4	92.64	43633	45933	1,052712	0,805812
102280-5	92.62	19367	27377	1,41359	1,08205

X: Örneklerin pik yüksekliği / pik alanı Y: Kontrol grubu pik yüksekliği / pik alanı (1,3064)



Şekil 4.16 Analiz sonucu verilerin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA

Hemoglobin bozuklukları, gerek ülkemizde gerekse de dünyada rastlanan en önemli kalıtsal hastalıklardandır (Weatherall 2001, Altay 2002, Akar 2007). Globin genlerinin yapısında bulunan ekzonlarda oluşan mutasyonlar, amino asit kodlarını değiştirmektedir. Bunun sonucunda kalıtsal klinik sorunlara sebep olan anormal hemoglobinler olduğu gibi, herhangi bir klinik belirti göstermeyen ve kalıtım yolu ile aktarılabilen anormal hemoglobinler de ortaya çıkmaktadır (Huens 1970).

Hem protein düzeyindeki yöntemler, hem de gen düzeyindeki yöntemler ile bu anormal hemoglobinlerin belirlenmesine çalışılmaktadır. Tez çalışmamızda incelediğimiz Hb S, orak hücre anemisini oluşturan yani kalıtsal klinik bir sebebe neden olan bir anormal hemoglobin türüdür. Hb S, beta globin geninin 6. kodonunda yer alan ve glutamik asidi kodlayan GAG kodonunun, valin amino asidini kodlayan GTG'ye dönüşmesi ile oluşmaktadır (Itano 1956). Protein düzeyindeki yöntemlerden kromatografik ve elektroforetik yöntemlerin kullanılması anormal hemoglobinlerin kesin tanısından daha çok bir ön tanısı şeklinde olmaktadır. Örneğin Hb S, Hb-D Los Angeles ve Hb-Beograd kromatografik olarak benzer davranış göstermekte, Hb S, Hb-D Los Angeles, Hb-Beograd ve Hb-G Coughatta v.b bazı hemoglobinler alkali ortamda benzer elektroforetik harekete sahip iken, Hb-D Los Angeles, Hb-G Coughatta, Hb-Beograd asit Hb elektroforezinde HbA gibi davranmaktadır (Atalay 2007). Dolayısıyla bu yöntemlerin kullanılması, anormal hemoglobinlerin kesin olarak belirlenmesinde tek başlarına yeterli olamamaktadırlar.

Moleküler tanılamaya yönelik geliştirilen yöntemler ve gen düzeyinde yapılan çalışmaların artması ile hemoglobin bozuklukları DNA düzeyinde belirlenmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerden olan restriksiyon enzim analizi, restriksiyon enzimlerinin kendilerine özgü DNA bölgelerini kesmeleri ve kesim sonuçlarının UV ışık altında görüntülenmesiyle yapılmaktadır. Hb S' in belirlenmesinde kullanılan Dde I restriksiyon enzimi, 5'..CTNAG..3' dizilimine sahip DNA bölgesinde C ve T nükleotitleri arasından kesim yapmaktadır. Bu enzimin kesim yapmadığı allelde bir Hb S mutasyonu olduğu söylenebilir. Fakat beta globin geninin 5. kodonunda meydana gelen polimorfizm de (-CT) Dde I enzim kesim sonuçlarıyla aynı sonucu vermektedir.

Bu yüzden restriksiyon enzim analizi hemoglobin bozukluklarının kesin olarak belirlenmesinde her zaman güvenilir bir yöntem değildir.

Bir diğer gen düzeyindeki yöntemlerden olan, madde-ışık etkileşimini temel alan SPR spektroskopisinin kullanımı bu alanda yer alan aday yöntemlerden birisidir. Bu konuda Pamukkale Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı'nda yapılan bir çalışmada heterozigot ve homozigot Hb S mutasyonlarının bu yaklaşımla saptanabildiği gösterilmiştir (Atalay 2006). Buna karşın sistemde kullanılan sensör yüzeylerinin kaplanması, temizlenmesi, analit miktarları ve ayrıntılı saha çalışmaları henüz başlangıç aşamasındadır.

DNA dizi analizi yöntemi anormal hemoglobinlerin kesin tanısında kullanılan diğer bir yöntemdir. Zincir sonlanma metodu (dideoksi) kullanılarak yapılan dizi analizi yönteminde, işaretli nükleotitlerin kapiler elektroforezde yürümesi ve lazer ışını ile okunması sonucunda analiz yapılmaktadır. Dizi analizi yönteminde bir reaksiyonda sadece belirli bir hemoglobin bozuklukları analiz edilmekte, anormal hemoglobinin bu reaksiyon içerisinde bulunamaması ise yeni bir reaksiyon ile tekrar dizi analizi yapılmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla böyle bir durum hem zaman hem de fiyat açısından bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Gerek protein düzeyindeki yöntemlerin anormal hemoglobinlerin tanısında bir kesin tanı oluşturmaması gerekse de gen düzeyindeki yöntemlerin anormal hemoglobinlerin belirlenmesinde hatalı sonuçlar vermesi, pahalı ve hızlı olmayan yöntemler olması sebebiyle, hemoglobin bozukluklarının belirlenmesinde daha hızlı, ucuz ve de kesin sonuç veren yöntemler geliştirmeye itmiştir.

MLPA yöntemi, uygulama kolaylığı, yüksek duyarlılığı, güvenilirliği, göreceli ucuzluğu ve tek reaksiyonda 40' dan fazla farklı odağın incelenebilmesi ile gen düzeyinde yapılan çalışmalara diğer bir alternatif yöntem olarak tanımlanmıştır (Kozlowski 2008, Gonzales 2008, Gouas 2008).

İlk aşamada Mg^{2+} titrasyonu yapılarak bu yöntemin en iyi çalıştığı Mg^{2+} derişimi bulunmuştur. 54 °C' de yapılan bu çalışmada, en uygun olma kriteri olan 97 nükleotitlik prob uzunluğuna en yakın nükleotit uzunluğunu veren 16 mM derişime sahip Mg^{2+} en uygun derişim olarak bulunmuştur. Bundan sonraki yapılan çalışmalarda bu Mg^{2+} derişimi kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmalarda örneklerden elde edilen sonuçlar, kontrol grubu pik yükseklik/pik alanı oranı'nın 1 kabul edilerek, orantılanarak bulunmuştur.

İkinci ve üçüncü aşamada ise sıcaklık optimizasyonu yapılarak yöntemin çalıştığı en iyi sıcaklık aralığı bulunmuştur. Tasarladığımız prob uzunluğuna en yakın uzunluğu veren sıcaklık 62 °C' de elde edilmiş dolayısıyla bundan sonraki çalışmalarda bu sıcaklık derecesi kullanılmıştır. 62 °C ve 63 °C' de ki veriler karşılaştırıldığında, 63 °C 'de yapılan çalışmada sonuçların yükselmesi, sıcaklık artışının prob özgünlüğünü düşürerek problemlerin özgün olmayan biçimde hedefe bağlandıklarını göstermektedir.

En uygun sıcaklık aralığı olarak bulunan 62 C'de yapılan 4. çalışmamızda homozigot örnekler çalışıldı. Homozigot örnek sonuçlarının teorik olarak 0' a yakın değerlerde olmasını beklemekteyiz. Elde edilen 0.57 ve 0.60 lık sonuçlar ise bize problemlerin özgün olmayan biçimde bilinmeyen dizilere bağlandıklarını göstermektedir

Homozigot, heterozigot ve normal DNA örneklerinin PCR kalıplarının 62 °C' de aynı anda çalışıldığı beşinci aşamada elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde, homozigot örnekten elde edilen 0.65' lik oran, bir önceki çalışmada elde edilen değerler ile uygunluk içerisindedir. Teorik olarak kendi içlerinde değerlendirme yapıldığında en düşük sonucun kodon 6 bakımından homozigot örnek, sonra hem kodon 6 hem de kodon 2 bakımından heterozigot örnek, daha sonra kodon 6:heterozigot kodon 2: normal örnek ve en yüksek sonucunda kodon 6:normal kodon:2 heterozigot örnekten alınması beklenmektedir. Bu çalışmada da elde edilen sonuçlar teorik olarak beklenen durumdadır (Kd 6:homozigot = 0,66 < Kd 6: Het, Kd 2: Het = 0,68 < Kd 6: Het, Kd 2:Normal = 0,79 < Kd 6: Normal, Kd 2: Het = 0,89). Dolayısıyla prob ligasyonun gerçekleştiği noktada meydana gelen bir mutasyon, problemlerin ligasyonunu çok daha fazla etkilemektedir. Altıncı aşamada aynı örnekler için 60 °C' de alınan sonuçların yüksek çıkması, yine optimum sıcaklıktan farklı sıcaklıkta çalışmanın prob

özgünlüğünü düşürdüğünü ve problemlerin özgün olmayan biçimde bağlanmalar gerçekleştiği şeklinde değerlendirilmektedir.

Kalıp PCR ürünleri ve genomik DNA'nın MLPA çalışmasında nasıl bir etkisinin olduğunu karşılaştırmak için yaptığımız yedinci aşamada ise genomik DNA'dan elde edilen sonuçların, kalıp PCR ürün sonuçlarının yaklaşık iki katı olduğu gözlemlenmiştir. Beta globin geninin 6. kodonunda gerçekleşen mutasyon sonucu oluşan Hb S' in belirlenmesine yönelik tasarladığımız MLPA probumuzun, aynı zamanda benzer dizilere sahip olan delta globin geni üzerine de hibridize olması, genomik DNA örnekleri için yapılan çalışmalarda daha yüksek bir sonuç elde edilebileceği anlamını taşımaktadır. PCR kalıpları için böyle bir durum söz konusu değildir. Çünkü beta globin geninin amplifikasyonunu sağlayan primerler delta globini amplifiye edememektedir ve dolayısıyla delta globin geni PCR kalıplarımızda bulunmamaktadır.

Bundan sonraki çalışmalarda DNA örnekleri 5' erli şekilde çalışıldı. Öncelikle genomik DNA örneğini kalıp olarak kullanacağımız için 101656 numaralı genomik DNA örneğini tek başına 60 °C ve 62 °C 'de 5' erli gruplar halinde çalışıldı (Tablo 4.9, 4.10) ve kontrol sonuçları alındı.

Genomik DNA örnekleri ile yapılan çalışmalarda çıkan sonuçların (homozigot hariç) yüksek olmasının sebebi, tasarlanan problemlerin delta globin geni ile de hibridize olmasıdır. Ligasyonun gerçekleştiği yer olan kodon 6 da ki mutasyonun, kodon 2 ' de gerçekleşen mutasyona göre problemin bağlanmasını daha çok etkilemektedir (102280=0.95, 101671=1,009). Homozigot genomik DNA örneğinden alınan sonuç, homozigot örneklerin PCR ürününden alınan sonuç ile aynı çıkmaktadır. Ayrıca kodon 5 polimorfizminin tasarladığımız prob üzerindeki etkisine baktığımızda, kodon 5 deki bir polimorfizmde kodon 6 ya yönelik yapılan çalışmayı etkilediği düşünülmektedir

6.SONUÇ

Elde edilen veriler değerlendirildiğinde, Hb S' in belirlenmesi için tasarladığımız probun çalıştığı gözlenmiştir. Pik yükseklik/pik alanlarının beklenenden yüksek çıkmasını da göz önüne alarak prob tasarımının daha özgün hale getirilmesi gerekli olup, genomik DNA çalışmalarında beta globin geni ile birlikte genomdaki diğer dizilerinde (özellikle delta ve pseudo beta globin) sonuçlara katkısı göz ardı edilmemelidir. Ayrıca kodon 2 ve kodon 5 polimorfizminin de sonuçlara etki etmesi, prob tasarımında ligasyon harici noktalarda meydana gelebilecek polimorfizm veya mutasyona sebep olan nükleotit değişimlerinin de elde edilen sonuçları etkilediği tasarımda göz önüne alınmalıdır.

Sonuç olarak MLPA yönteminin, anormal hemoglobinlerin ve tek nükleotit değişimlerinin, hızlı ucuz ve güvenilir bir şekilde belirlenmesinde uygun bir yöntem olduğu gözlenmiştir. Bir diğer elde edilen sonuç, prob hedefinin delesyon ve/veya insersiyon türü odakların incelenmesine oranla tek nükleotit değişikliklerinde daha dikkatle kullanılmasının gerekliliğidir. Yapılacak daha ileri çalışmalar ile bu yöntemin geliştirilmesi ve sonuçların daha özgün hale getirilmesi ile çok sayıda anormal hemoglobin türünün aynı anda tanımlanabilmesinde değerli katkılar sağlayabilecektir.

7. KAYNAKLAR

- Ahn JW., Ogilvie CM., Welch A., Thomas H., Madula R., Hills A., Donaghue C., Mann K. (2007) Detection of subtelomere imbalance using MLPA: validation, development of an analysis protocol, and application in a diagnostic centre. *BMC Med. Genet.*, 8:9.
- Akar E, Akar N. (2007) A review of abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk. J. Haemato.*, 24: 143-145.
- Aksoy M. (1963) The first observation of homozygous hemoglobin S-alpha thalassemia disease and two types of sickle cell thalassemia disease: (A) Sickle cell-alpha-thalassemia disease, (B) Sickle cell-beta thalassemia disease. *Blood*, 22:757-769.
- Altay Ç. (2002) Abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk. J. Haematol.*, 19 (1): 63-74.
- Ashley-Koch A., Yang Q., Olney RS. (2000) Sickle Hemoglobin (Hb S) Allele and Sickle Cell Disease: A Huge Review. *Am. J. Epidemiol.*, 151-9.
- Atalay EÖ., Koyuncu H., Turgut B., Atalay A., Yıldız S., Bahadır A., Köseleler 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.
- Atalay EÖ., Üstel E., Yıldız S., Atalay A.(2006) SPR (Surface Plasmon Resonance) based molecular detection of Hb S (beta 6, GAG->GTG) at gene level. *Hemoglobin*, 30 (3): 1-7.
- Atalay A., Koyuncu H., Köseleler A., Özkan A., Atalay EO. (2007) Hb Beograd [β 121(GH4)Glu-->Val, GAA-->GTA] in the Turkish population. *Hemoglobin*, 31 (4): 491-493.
- Atalay EÖ., Atalay A., Koyuncu H., Öztürk O., Köseleler A., Özkan A., Demirtepe S. (2008) Rare Hemoglobin Variant Hb Yaizu Observed in Turkey, *Med. Princ. Pract.*, 17 (4): 321-324.
- Atalay EÖ. (2010) Yayınlanmamış makale, kişisel görüşme.
- Barnes WL., Dereux A., Ebbesen TW. (2003) Surface plasmon subwavelength optics. *Nature*, 424(6950): 824-830.
- Bermek E., Nurten R., Tiryaki D., Gökçe S. (1997) Biyofizik Ders Notları. **İstanbul Üniversitesi Tıp Fak. Yayınları**. No. 188, İstanbul, s 145–150.
- Bettati S., Mozzarelli A. (1997) T state hemoglobin binds oxygen noncooperatively with allosteric effects of protons, inositol hexaphosphate, and chloride. *J. Biol. Chem.*, 272(51): 32050-5.

- Clark BE., Thein SL. (2004) Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin. Lab. Haem.*, 26: 159-176.
- Collins FS., Weissman SM. (1984) The Molecular Genetics of Human Hemoglobin. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 31:315-462.
- Cremonesi L., Ferrari M., Giordano PC., Harteveld CL., Kleanthous M., Papasavva T., Patrinos GP., Traeger-Synodinos J. (2007) An overview of current microarray-based human globin gene mutation detection methods. *Hemoglobin*, 31(3):289-311.
- Çelebi G. (2005) Biyofizik Cilt 1. **Barış Yayınları**, Üçüncü Baskı, İzmir, s 44-50.
- Dijk MCV., Rombout PD., Boots-SprengerSH., Straatman H., Bernsen MR., Ruitter DJ., Jeuken JW. (2005) Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification for the Detection of Chromosomal Gains and Losses in Formalin-Fixed Tissue. *Diagn. Mol. Pathol.*, 14(1):9-16.
- Fathallah H., Atweh GF. (2006) DNA hypomethylation therapy for hemoglobin disorders: Molecular mechanisms and clinical applications. *Blood Reviews*, 20: 227-234.
- Feriotto G., Breveglieri G., Finotti A., Gardenghi S., Gambari R. (2004) Real-time multiplex analysis of four beta-thalassemia mutations employing surface plasmon resonance and biosensor technology. *Lab. Invest.*, 84 (6): 796-803.
- Fucharoen S., Winichagoon P. (2002) Thalassemia and Abnormal Hemoglobin. *Int. J. Hematol.*, 72(2): 83-89.
- Gonzalez JR., Carrasco JL., Armengol L., Villatoro S., Jover L., Yasui Y., Estivill X. (2008) Probe-specific mixed-model approach to detect copy number differences using multiplex ligation-dependent probe amplification(MLPA). *BMC Bioinformatics*, 9: 261.
- Gouas L., Goumy C., Veronese L., Tchirkov A., Vago P. (2008) Gene dosage methods as diagnostic tool for the identification of chromosome abnormalities. *Pathol. Biol. (Paris)*, 56(6):345-353.
- Haes AJ., Duyne PV. (2002) A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.*, 124(35):10596-604.
- Hartwell SK., Srisawang B., Kongtawelert P., Christian D., Grudpan K.(2005) Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta*, 65: 1149-1161.
- Ho P.J. (1999) The regulation of β -globin gene expression and β -thalassemia. *Pathology*, 31: 315-324.
- Holley RW., Apgar J., Everett GA., Madison JT., Marquisee M., Merrill SH., Penswick JR., Zamir A. (1965) Structure of a ribonucleic acid. *Science.*, 147:1462-1465.

- Homola J., Yee SS., Gauglitz G. (1999) Surface plasmon resonance sensors: Review. *Sens. Actuators B.*, 54:3-15.
- Huens ER. (1970) Diseases due to abnormalities of hemoglobin structure. *Annu. Rev. Med.*, 21: 157-178.
- Huisman T.H.J., Carver M.F.H. and Efremov G.P. (1996). A syllabus of human hemoglobin variants. The Sickle Cell Anemia Foundation in Augusta, GA, *Globin Gene Server*. <http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/variants/> (12-04-2010).
- Inagaki K., Inagaki J., Dumoulin A., Padovan JC., Chait BT., Popowicz A., Manning LR, Manning JM. (2000) Expression and properties of recombinant HbA2 (alpha2delta2) and hybrids containing delta-beta sequences. *J. Protein Chem.*, 19 (8): 649-662.
- Itano HA. (1956) The hemoglobins. *Annu. Rev. Biochem.*, 25: 331-348.
- Jensen FB. (2004) Red blood cell pH, the Bohr effect, and other oxygenation-linked phenomena in blood O₂ and CO₂ transport. *Acta Physiol Scand.*, 182:215-227 .
- Kozłowski P., Jasinska AJ., Kwiatkowski DJ. (2008) New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. *Electrophoresis*, 29(23):4627-4636 .
- Köseler A., Atalay A., Koyuncu H., Turgut B., Bahadır A., Atalay EÖ. (2006) Molecular identification of a rare hemoglobin variant, Hb J-Iran [beta77(EF1)His>Asp] in Denizli province of Turkey, *Turk. J. Haematol.*, 23 (3): 164-166.
- Köseler A., Bahadır A., Koyuncu H., Atalay A., Atalay EÖ. (2008) First observation of Hb D-Ouled Rabah [beta19(B1)Asn>Lys] in the Turkish population. *Turk. J. Haematol.*, 25 (1): 51-53.
- Köseler A., Koyuncu H., Öztürk O., Bahadır A., Demirtepe S., Atalay A, Atalay EÖ, (2009) First observation of Hb Tunis [beta124(H2) Pro>Ser] in Turkey, *Turk. J. Haematol.* (Yayınlanmak üzere kabul edildi)
- Maniatis T., Fritsch EF., Lauer J., Lawn RM. (1980) The molecular genetics of human hemoglobins. *Annu. Rev. Genet.*, 14: 145-178.
- Orkin HS. (1984) The mutation and polymorphism of the human β -globin gene and its surrounding DNA. *Ann. Rev. Genet.*, 18: 131-71.
- Pauling L., Itano HA., Singer SJ., Wells IC. (1949) Sickle Cell Anemia, a molecular Disease. *Science*, 110: 543-548.
- Perutz MF., Rossmann MG., Cullis AF., Muirhead H., Will G., North AC. (1960) Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis. *Nature*, 185: 416-22.

- Perutz MF. (1978) Hemoglobin Structure and Respiratory Transport. *Sci. Am.*, 239(6):92-125.
- Schechter AN. (2008) Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood*, 112(10): 3927-3938.
- Schouten JP., McElgunn CJ., Waaijer R., Zwijnenburg D., Diepvens F., Pals G. (2002) Relative quantification of 40 nucleic acid sequences multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res.*, 30(12):57.
- Sellner LN., Taylor GR. (2004) MLPA and MAPH: New Techniques for Detection of Gene Deletions. *Hum. Mutat.*, 23(5):413-419.
- VanWiggeren GD., Bynum MA., Ertel JP., Jefferson S., Robotti KM., Thrush EP., Baney DM., Killeen KP. (2007) A novel optical method providing for high-sensitivity and high-throughput biomolecular interaction analysis. *Sens. Actuators B.*, 127:341-349.
- Vasudevan G., McDonald JM. (1998) Analysis of the global architecture of hemoglobin A₂ by heme binding studies and molecular modeling. *J. Protein Chem.*, 17 (4): 319-327.
- Wada Y. (2002). Advanced analytical methods for hemoglobin variants. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 781: 291-301.
- Weatherall DJ., Clegg JB. (2001) Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization.*, 79 (8): 704-712.
- Winslow RM. (2007) The role of hemoglobin oxygen affinity in oxygen transport at high altitude. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 158(2-3):121-127.

8. ÖZGEÇMİŞ

3 Temmuz 1986 yılında Denizli’de doğdum. İlk ve orta öğretimimi Ankara’ da, lise eğitimimi ise İzmir ve Denizli’ de tamamladım. 2004-2008 yılları arasında Pamukkale Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü lisans programında okuyarak bu programı ikincilikle bitirdim. 2008 yılında Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı’nda yüksek lisans programına başladım.