



**DENİZLİ YÖRESİNDE GÖZLENEN Hb D-LOS ANGELES
MUTASYONUNUN BETA GLOBİN GEN AİLESİ HAPLOTİP
ANALİZİ**

Onur ÖZTÜRK

**Mart 2007
DENİZLİ**

**DENİZLİ YÖRESİNDE GÖZLENEN Hb D-LOS ANGELES
MUTASYONUNUN BETA GLOBİN GEN AİLESİ HAPLOTİP
ANALİZİ**

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

Onur ÖZTÜRK

Danışman: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

**Mart 2007
DENİZLİ**

TEŞEKKÜR

Tez çalıőmam ve yüksek lisans öğrenciliğim boyunca, öğrenimim ve eğitimim için, desteklerini esirgemeyen değerli tez danıőmanım Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY ve anabilim dalımız ğretim yesi sayın hocam Yrd. Doç. Dr. Ayfer ATALAY' a teőekkürlerimi sunarım. Katkılarından dolayı çalışma arkadaőlarım ve ilgileri ile her an yanımda hissettiğim aileme, sevgili ablama ve kız arkadaőıma 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 :

ÖZET

DENİZLİ YÖRESİNDE GÖZLENEN Hb D-LOS ANGELES MUTASYONUNUN BETA GLOBİN GEN AİLESİ HAPLOTİP ANALİZİ

Öztürk, Onur

Yüksek Lisans Tezi, Biyofizik ABD

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

Denizli yöresinde anormal hemoglobinler ve beta talasemiler, T.C. Sağlık Bakanlığı Denizli Hemoglobinopati Merkezi verilerine göre % 3.5 oranındadır. Denizli ili, ülkemizde Hemoglobinopati Kontrol Programı uygulanan 33 il merkezinden bir tanesidir. Anormal hemoglobinler yöremizde toplum sağlığı açısından önemli kalıtsal hastalıklar arasında yer almaktadır. Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobinler içerisinde Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln], % 57.8 oranı ile en sık gözlenen anormal hemoglobindir. Diğer taraftan yöremizde Hb S [β 6(A3)Glu→Val], Hb G-Coushatta [β 22(B4)Glu→Ala], Hb E-Saskatoon [β 22(B4)Glu→Lys], Hb C [β 6(A3)Glu→Lys], Hb J-İran [β 77(EF1)His→Asp], Hb Beograd [β 121(GH4)Glu→Val] gibi hemoglobin türlerine de rastlanmaktadır.

Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln]'a ilişkin çalışma sayısı, bu anormal hemoglobin türünün Hb S [β 6(A3)Glu→Val]'e oranla daha az görülmesi ve belirgin bir sağlık sorunu oluşturmaması nedeni ile az sayıdadır. Özellikle beta globin gen ailesi haplotip çalışmaları belirtilen nedenlerle yaygın değildir. Yayınlanmış tek çalışma PAÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı tarafından yapılan ve dünyadaki dördüncü özgün odağı tanımlayan çalışmadır. Ülkemizde Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] olgularındaki beta globin gen ailesi haplotiplerine ilişkin, ayrıntılı veri bulunmamaktadır.

Tez çalışmasında; yöremizde sıklıkla rastlanan Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] mutasyonu taşıyan bireylerde, ϵ -globin, G γ /A γ -globin, $\psi\beta$ -globin, δ -globin ve β -globin genleri üzerinde bulunan toplam yedi odak için, beta globin gen ailesi haplotip analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, yöremizde gözlenen olguların büyük oranda Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - + +] ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bu haplotipin normal popülasyonda da ilk sırada olması mutasyonun yerel haplotip üzerinde gelişmiş olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Hb D-Los Angeles, Hb D-Punjab, Beta globin, Haplotip

ABSTRACT

THE BETA GLOBIN GENE CLUSTER HAPLOTYPES ASSOCIATED WITH Hb D-LOS ANGELES IN DENIZLI PROVINCE

Öztürk, Onur

M. Sc. Thesis in Biophysics

Supervisor: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

March 2007, 40 pages

In Denizli province of Turkey, carrier rate for abnormal hemoglobins and beta-thalassemsias is 3.5 % according to the data obtained from Turkish Ministry of Health, Denizli Hemoglobinopathy Center. The city of Denizli is one of the 33 target cities of which Hemoglobinopathy Control Program is applied as premarital screening in Turkey. In Denizli province, the most common abnormal hemoglobin variant is Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] with a frequency of 57% of the total abnormal hemoglobins observed. In addition, Hb S [β 6(A3)Glu→Val], Hb G-Coushatta [β 22(B4)Glu→Ala], Hb E-Saskatoon [β 22(B4)Glu→Lys], Hb C [β 6(A3)Glu→Lys], Hb J-Iran [β 77(EF1)His→Asp], Hb Beograd [β 121(GH4)Glu→Val] are also observed.

Since Hb D-Los Angeles is not an hemoglobin variant presenting a severe clinical picture, the research on this mutation is not commonly seen in the related literature. Regarding to the beta globin gene cluster haplotypes, the data is not available in detailed manner for the Turkish cases observed. There is only one exception that the Pamukkale University Medical Faculty Department of Biophysics has recently published a novel haplotype [- + - - + +] which is known as the fourth haplotype in the published cases in the world population. Considering all these information, the beta globin gene cluster haplotypes in association with the Hb D-Los Angeles cases for the Turkish population, especially in Denizli province is not known.

In this study, beta globin gene cluster haplotype analyses was done for the Hb D-Los Angeles cases observed in Denizli province. According to our results; Hb D-Los Angeles mutation observed in Denizli province is in association with Mediterranean haplotype I [+ - - - + +]. In normal population the highest frequency haplotype is also Mediterranean haplotype I [+ - - - + +]. Our results demonstrates that the Hb D-Los Angeles should have arisen mostly on local Mediterranean haplotype I.

Keywords: Hb D-Los Angeles, Hb D-Punjab, Beta globin, Haplotype

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
Teşekkür.....	i
Bilimsel Etik Sayfası.....	ii
Özet	iii
Abstract	iv
İçindekiler	v
Şekiller Dizini	vi
Tablolar Dizini	vii
Simgeler ve Kısaltmalar Dizini	viii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Hemoglobin yapısı ve işlevi	2
2.2 Hemoglobin türleri	3
2.3 Anormal hemoglobinler	5
2.3.1 Beta globin gen ailesi; yapı ve işlevi	7
2.3.2 Haplotip analizi	9
2.3.3 Hb D-Los Angeles.....	12
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	14
3.1 Genomik DNA izolasyonu	14
3.2 EcoRI enzim kesimi ve DNA dizi analizi.....	16
3.3 Haplotip analizi.....	17
3.3.1 İlgili odakların PCR yöntemi ile çoğaltılması.....	18
3.3.2 PCR ürünlerinin saflaştırılması.....	20
3.3.3 PCR ürünlerinin ilgili restriksiyon enzimi ile kesimi.....	20
3.4 Haplotip sıklıklarının belirlenmesi.....	21
4. BULGULAR	22
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	31
6.	37
KAYNAKLAR.....	
7. ÖZGEÇMİŞ	41

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 2.1 İnsan globin genleri ve üretim dönemleri şeması.....	4
Şekil 2.2 Santral dogma.....	4
Şekil 2.3 İnsan beta globin gen ailesi, LCR bölgesi ve Sıcak nokta	8
Şekil 2.4 Yeniden düzenlenmiş yapılanma (<i>recombination</i>) ve gen dönüşümü (<i>gene conversion</i>) işlemleri	9
Şekil 2.5 Haplotip analizinin temel yaklaşımı	10
Şekil 2.6 Arlequin (3.1) yazılımı için ayarlar ekranı	11
Şekil 2.7 Hb D-Los Angeles EcoRI enzim kesimi	12
Şekil 2.8 Haplotiplerde kullanılan odaklar ve beta globin gen ailesi içerisindeki evrimsel ilişkiler.....	13
Şekil 3.1 Heterozigot Hb D-Los Angeles mutasyonunun, geri primer kullanılarak dizi analizi ile tanımlanması.....	17
Şekil 3.2 Haplotip analizi için kullanılan restriksiyon enzimi kesim odakları	17
Şekil 4.1 EcoRI enzim kesimi ile beta globin geni kodon 121' deki Hb D-Los Angeles (GAA→CAA) mutasyonunun saptanması.....	22
Şekil 4.2 5'-ε bölgesi, Hinc II restriksiyon enzimi kesim sonuçları.....	23
Şekil 4.3 Gγ bölgesi, Hind III restriksiyon enzimi kesim sonuçları.....	23
Şekil 4.4 Aγ bölgesi, Hind III restriksiyon enzimi kesim sonuçları.....	24
Şekil 4.5 5'-ψβ bölgesi, Hinc II restriksiyon enzimi kesim sonuçları.....	24
Şekil 4.6 3'-ψβ bölgesi, Hinc II restriksiyon enzimi kesim sonuçları.....	25
Şekil 4.7 5'-β bölgesi, Ava II restriksiyon enzimi kesim sonuçları.....	25
Şekil 4.8 3'-β bölgesi, Hinf I restriksiyon enzimi kesim sonuçları.....	26

TABLO DİZİNİ

	SAYFA
Tablo 2.1 Denizli yöresinde saptanan anormal hemoglobinler	5
Tablo 2.2 Türkiye’ de saptanan anormal hemoglobin türleri	6
Tablo 2.3 Beta globin gen ailesi için tanımlanmış bazı haplotip türleri ...	13
Tablo 3.1 PCR yönteminde kullanılan primer çifti ve özellikleri.....	16
Tablo 3.2 EcoRI PCR karşımı ve uygulama biçimi.....	16
Tablo 3.3 PCR karşımı.....	18
Tablo 3.4 İlgili odaklara özgü restriksiyon enzimleri ve primer çiftleri ...	19
Tablo 3.5 PCR için kullanılan sıcaklık döngü cihazı programları.....	19
Tablo 3.6 Bölgelere özgü enzim kesim karşımları ve bekletme süreleri...	20
Tablo 4.1 Hb D-Los Angeles heterozigot olgulara ait enzim kesim sonuçları	27
Tablo 4.2 Normal olgulara ait enzim kesim sonuçları.....	28
Tablo 4.3 Hb D-Los Angeles heterozigot olgulara ait haplotip analizi sonuçları.....	29
Tablo 4.4 Normal olgulara ait haplotip analizi sonuçları.....	30
Tablo 5.1 Hb D-Los Angeles haplotip analizi sonuçları ve bazı haplotip türleri.....	35
Tablo 5.2 Normal olgulara ait haplotip ilişkileri.....	36

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

DPG	2,3-Difosfogliserat
IHP	Inositol hegzakis fosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
EDTA	Etilendiamin tetraasetikasit
RNA	Ribonükleik asit
LCR	Beta geni kontrol bölgesi
RFLP	Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi
SDS	Sodyum dodesil sülfat
STE	Tuz-Tris-Etilendiamin tetraasetikasit
IVS-II	Intervening Sequence-II

1.GİRİŞ

Toplum sağlığı açısından önemli kalıtsal hastalıklar arasında yer alan anormal hemoglobinler ve sebep oldukları sağlık sorunları, 1959 yılında, M.F. Perutz ve arkadaşlarının (Perutz 1968) hemoglobin yapısını tarif etmelerinden günümüze dek birçok araştırmacı tarafından çalışma konusu olmuştur. Anormal hemoglobinlerden kaynaklanan sağlık sorunlarının temeli gensele (gene zđ) olduğundan, mümkün olan tedavi yöntemi yine gen kaynaklı olmalıdır. Günümüzde bu yönde çalışmalar bulunmakla birlikte henüz gen tedavisi uygulaması olanaklı değildir. Bunun sonucu olarak, anormal hemoglobinlerin, evlilik öncesi tanıda saptanması ve doğum öncesi tanı ile sağlıklı bireylerin doğumuna katkıda bulunulması, tüm dünyada olduğu gibi Denizli yöresinde de uygulanan tek geçerli korunma yöntemidir.

Hemoglobin molekülü ile yapılan çalışmalarla birlikte, farklı coğrafyalarda, farklı mutasyonlara sahip çok sayıda anormal hemoglobinin varlığı bilinmektedir (Globin Gene Server 2007). Bu anormal hemoglobinlerden Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln], yöremizde gözlenen hemoglobin mutasyonları içerisinde, en yüksek bulunma yüzdesine sahiptir (Atalay 2005). İnsan beta globin gen ailesi, kromozom 11'in kısa kolunda 60 kilobaz uzunluğunda bir bölgeyi kapsamaktadır. Beta globin gen ailesi üzerinde, belirlenmiş odakların restriksiyon enzimleri kullanılarak incelenmesi haplotip analizlerinin temelini oluşturmaktadır. Haplotip analizleri, incelenen mutasyonların gensele kökenlerinin ortaya çıkarılmasında yararlı veriler oluşturabilmektedir. Bu verilerin elde edilerek değerlendirilmesi, ilgili mutasyonların izlenmesinde antropolojik yaklaşımlara katkıda bulunmakta olup, ayrıca mutasyonların oluşum mekanizmalarının tartışılması, bu mekanizmaların modellenmesi ve bu noktadan hareketle olası gen tedavisi yaklaşımlarına da değerli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, yöremizde sıklıkla rastlanan Hb D-Los Angeles mutasyonuna ilişkin olarak beta globin gen ailesi haplotiplerinin ortaya konulması öngörülmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Hemoglobin yapısı ve işlevi:

Hemoglobin, hem grupları içeren, zayıf kovalent olmayan bağlar ile birbirine bağlı dört globin zincirinden oluşmuş dördüncül (tetramerik) yapıya sahip bir moleküldür. Globin zincirleri türlerine göre, iki özdeş alfa (α veya ζ) ve beta (ϵ , γ , δ veya β) globinler olarak adlandırılır. Temel olarak hemoglobinin, oksijenin solunum organından dokulara, karbondioksit ve protonların dokulardan solunum organına taşınması olmak üzere iki işlevi bulunmaktadır. Bunun yanında hemoglobinin, kanın ve dolaylı olarak diğer vücut sıvılarının pH değerini sabit tutma özelliği de vardır. Hemoglobinin bu özelliği deoksihemoglobinin protonlara olan ilgisinden kaynaklanmaktadır. Bu bakımdan, hemoglobin molekülü hem kandaki yüksek derişimleri hem de içeriğinde yer alan aminoasitlerin fizyolojik pH' ye yakın olan pK' ları sayesinde güçlü bir tampon sistemi oluşturmaktadır. Bu özellikleri ile hemoglobin molekülü, eritrositler içerisinde işlev görmektedir (Bermek 1997, Wada 2002, Çelebi 2005).

İnsan saf oksijen soluduğunda dahi, kanda oksijenin kısmi basıncı 101,3 kPa (760 mmHg) olacağından, 100 cm³ kan içinde, fiziksel yoldan 2,3 cm³ oksijen çözünebilir. Oysaki insanın dinlenme halinde bile oksijen gereksinimi bu değerden çok daha yüksektir (5 cm³ oksijen/100 cm³ kan). Kandaki derişimi 15 gr/100 ml olan hemoglobin molekülleri, fiziksel yoldan kanda çözünebilir oksijen miktarının 65 kat fazlasını kimyasal yoldan bağlayabilmekte ve oksijen taşınımında temel bir rol oynamaktadır. Bu yol ile kandaki oksijenin % 97' si hemoglobine bağlı olarak taşınır (Pehlivan 2004, Hardison 1998). Hemoglobin, içinde bulunduğu ortamdaki derişim değişimlerine göre, yapısal olarak, oksijene ilgisi düşük olan T (*tense*-gergin) veya yüksek olan R (*relaxed*-gevşek) formlarını alabilir. T formundan farklı olarak R formunda tuz köprüleri bulunmamaktadır. Ayrıca oksijen bağlama eğilimleri arasında 3,5 kcal/mol enerji farkı vardır (Bettati 1998).

Hemoglobin yapısı ve işlevi termodinamik açıdan ele alındığında, yapısal modeli ve işlevi ile termodinamik kanunları arasında tamamen bir bütünlük olduğu görülmüştür. Hemoglobinin farklı fizyolojik koşullarda gösterdiği değişik yapısal ve işlevsel özellikler, allosterik etkileşimlerin termodinamik açıdan incelenebilmesini

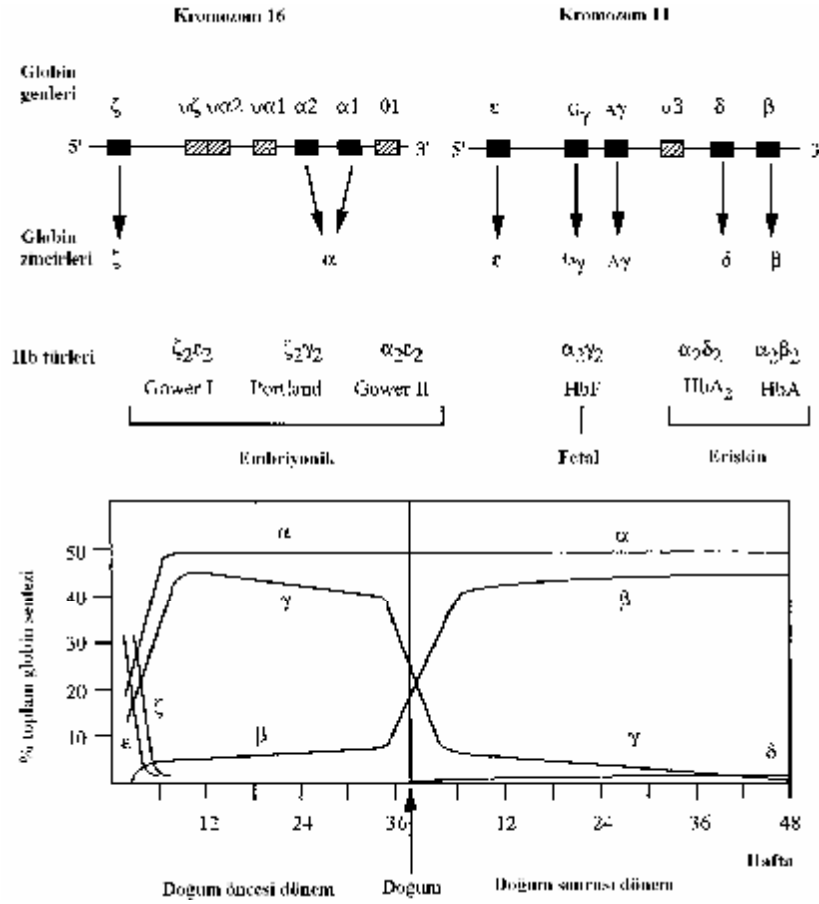
sağlamıştır. Hemoglobinin oksijen ile ilişkisi sıcaklık, DPG ve IHP değişkenlerine bağlı olarak Gibbs serbest enerjisi (ΔG), entalpi (ΔH) ve entropi (ΔS) gibi termodinamik nicelikler açısından incelenmiştir. DPG hemoglobinin oksijene olan ilgisini azaltır. Hemoglobine oksijen ve DPG bağlanması arasında ters bir ilişki vardır. DPG, hemoglobinin α ve β zincirleri arasındaki bir boşluğa bağlanır. Hemoglobin T durumunda iken, zincirler arasında bir DPG molekülünün girebileceği kadar boşluk oluşur ve DPG bu bölgeye bağlanarak T formunu kararlı hale getirip, hemoglobinin oksijene ilgisini azaltmaktadır. R durumuna geçiş ise DPG' nin bağlandığı cebi daraltır ve bu nedenle DPG yapıdan ayrılır. DPG ve IHP derişiminin artması hemoglobinin T yapıya geçmesi ve oksijene eğiliminin azalması anlamına gelmektedir. Yapılan bir çalışmada deneysel olarak sıcaklık arttığında Gibbs serbest enerjisinin daha negatif değerlere değiştiği gözlenmiştir. Bu değişim, hemoglobin molekülüne DPG veya IHP bağlandığı ve bunun sonucunda da Gibbs serbest enerjisinin azalarak sistem tarafından iş yapıldığını göstermektedir. Kuramsal olarak da biyolojik bir sistemin yapabileceği iş miktarı, en fazla serbest enerjisindeki azalma kadardır. Yapılan bu çalışmada, hemoglobin ile oksijen arasındaki ilişkiden yararlanılarak, hemoglobinin yapı ve işlevi termodinamik yasaları ile tanımlanmaktadır (Pehlivan 2004, Çelebi 2005, Bordbar 2006).

2.2 Hemoglobin türleri:

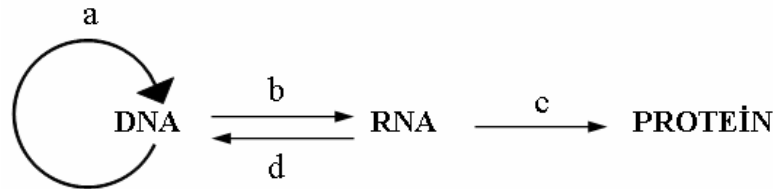
Hemoglobin, yaşamın embriyonik, fetal ve erişkin dönemlerinde yapısal farklılıklar gösterir. Tüm normal hemoglobinler dördüncül yapıda olup, iki alfa (α) ve iki beta (β) globin zincirlerinden oluşur. Erişkin ve fetal hemoglobinler alfa globin zincirine ek olarak, beta (Hb A, $\alpha_2\beta_2$), delta (Hb A₂, $\alpha_2\delta_2$) veya gama globin zinciri (Hb F, $\alpha_2\gamma_2$) ile yapılanmıştır. Embriyonik hemoglobinler ise, alfa globin benzeri zincirler (ζ , zeta zincirleri) ile gama (Hb Portland, $\zeta_2\gamma_2$) veya epsilon globin zincirlerinin (Hb Gower 1, $\zeta_2\epsilon_2$), (Hb Gower 2, $\alpha_2\epsilon_2$) dördüncül yapıyı oluşturması sonucu meydana gelir (Ho 2000). Bu hemoglobinler alfa ve beta globin genlerinin kontrolü altında sentezlenmektedir. Alfa globin gen ailesi kromozom 16, beta globin gen ailesi ise kromozom 11'de yer almaktadır (Şekil 2.1).

Hemoglobin sentezinde, ilgili genlerin kontrolü molekülse açıdan DNA'nın denetimi altında gerçekleşmektedir. Bununla birlikte DNA'daki kodlar, RNA aracılığı ile bir protein olan hemoglobine dönüşmektedir. DNA'yı oluşturan nükleotid

dizilerinin sahip olduğu bilgiye göre, hemoglobinin dördüncül yapısını oluşturan bileşenler olan globinler üretilmektedir. Gen düzeyindeki bilginin akışı; replikasyon, transkripsiyon, translasyon evreleri ile açıklanmaktadır (Şekil 2.2). DNA bilgisinde yer alan farklılıklarda, DNA’ daki bilginin RNA’ ya aktarılması (transkripsiyon) ve RNA’ daki bilginin proteine dönüştürülmesi (translasyon) aşamalarında oluşan hatalarda, protein anormallikleri gözlenir.



Şekil 2.1 İnsan globin genleri ve üretim dönemleri şeması (Ho 1999)



Şekil 2.2 Santral dogma (a.Replikasyon, b.Transkripsiyon, c.Translasyon, d.Ters Transkripsiyon)

2.3 Anormal Hemoglobinler:

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

Dünya çapında 700 üzerinde farklı anormal hemoglobin bildirilmiştir (Huisman 1996). Türkiye geneli göz önüne alınarak yapılan çalışmada ise, 42 adet anormal hemoglobin türünün varlığı gösterilmiştir (Altay 2002). Bu anormal hemoglobinlerden 13 tanesi α globin zincirinde, 24 tanesi β globin zincirinde, biri de δ globin zincirinde yer almaktadır (Tablo 2.2). Evlilik öncesi tarama programının uygulandığı Denizli yöresinde, T.C Sağlık Bakanlığı Denizli Hemoglobinopati Merkezi verilerine göre, anormal hemoglobinler ve β -talasemi taşıyıcılığı oranı % 3.5 olarak saptanmıştır. Ayrıca, Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobinlerin çeşitliliği ve bulunma oranları ile ilgili çalışma yapılmış olup, sonuçları yayınlanmıştır (Tablo 2.1). Bu sonuçlara göre, Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobin dağılımına bakıldığında % 57.8 ile Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] birinci sırada yer almaktadır (Atalay 2005). Türkiye geneline bakıldığında ise, Hb D-Los Angeles % 0,2 bulunma sıklığı ile ikinci en yaygın anormal hemoglobin çeşididir (Altay 2002). Bu yayınlanmış veriler, yöremizde Hb D-Los Angeles'ın yaygın olarak gözlendiğini ortaya koymaktadır.

Tablo 2.1: Denizli yöresinde saptanan anormal hemoglobinler (Atalay 2005)

Anormal Hemoglobin	Mutasyon	Bulunma yüzdesi (%)
Hb D- Los Angeles	β 121(GH4)Glu --->Gln	57,8
Hb S	β 6(A3)Glu--->Val	21,9
Hb G-Coushatta	β 22(B4)Glu--->Ala	15,6
Hb E- Saskatoon	β 22(B4)Glu--->Lys	3,1
Hb C	β 6(A3)Glu--->Lys	1,6

Tablo 2.2 Türkiye’de saptanan anormal hemoglobin türleri (Altay 2002)

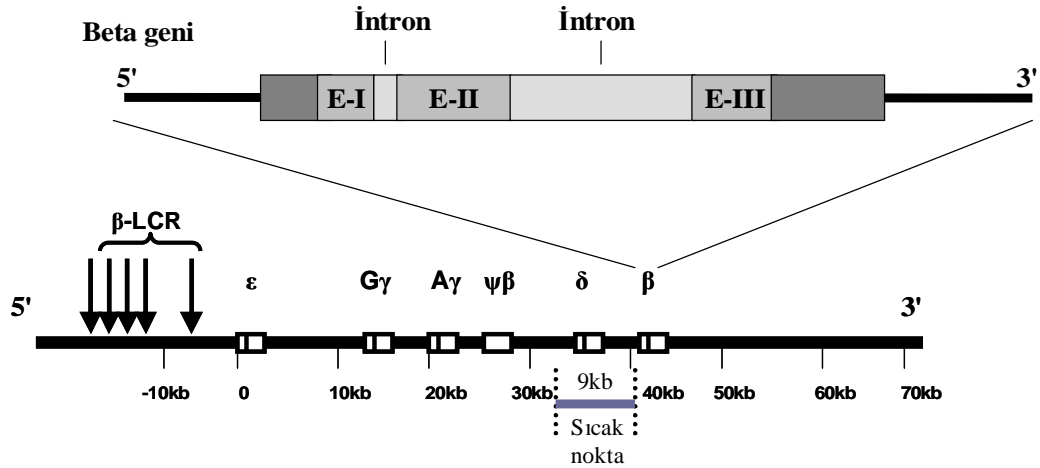
Anormal Hemoglobin	Mutasyon
α - globin zincirinde oluşan mutasyonlar ve neden oldukları anormal hemoglobinler	
Hb O-Padova	α 30(B11) Glu ---> Lys (GAA--->AAG)
Hb Hasharon	α 47(CE5) Asp---> His (GAC--->CAC)
Hb Montgomery	α 48(CE6) Leu ---> Arg (CTG--->CGG)
Hb Adana	α 59(E8) Gly ---> Asp (GGC--->GAC)
Hb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

2.3.1 Beta globin gen ailesi; yapı ve işlevi

Alfa ve beta globin gen aileleri içinde bulunan genler hemoglobin sentezi için amino asitleri kodlamakla görevlidir. Alfa globin gen ailesi (5'- ζ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ -3') kromozom 16'nın kısa kolunda bulunurken, beta globin gen ailesi (5'- ϵ - $G\gamma$ - $A\gamma$ - $\psi\eta$ - δ - β -3') kromozom 11'in kısa kolunda yaklaşık 60 kb'lık bir alanda yer almaktadır. Daha önce belirtildiği gibi, her iki gen ailesinde yer alan genler, insanın gelişim evrelerine bağlı olarak ifade edilir. Her iki beta globin gen ailesinden zeta (ζ) ve epsilon (ϵ) embriyonik dönemde, gama ($G\gamma$, $A\gamma$) genleri fetal dönemde, delta (δ) ve beta (β) genleri ise erişkin dönemde ifade edilmektedir. Ayrıca beta globin gen ailesi içinde herhangi bir amino asit kodlamayan dolayısı ile protein ürünü oluşturamayan psödo ($\psi\eta$) geni yer almaktadır (Ho 2000, Chen 1990). Beta globin geninin 5' ucunda, yaklaşık olarak 16 kb uzunluğunda beta geni kontrol bölgesi (β LCR) yer almaktadır (Levings 2002) (Şekil 2.3). Beta geni kontrol bölgesi, protein sentezi aşamasında beta globin genlerinin ifade edilmesinde düzenleyici rol oynamaktadır (Ho 2000, Hardison 1998, Athanassiadou 2004). Tüm beta globin genlerinde ortak olarak 3 ekzon ve 2 intron bulunmaktadır (Şekil 2.3). Ekzonlarda yer alan DNA dizileri ilgili proteini kodlamaktadır. Yine, her genin 5' ucu tarafında yaklaşık 50 nükleotid uzunluğunda bir cap bölgesi ve protein sentezini başlatan kodon (AUG) yer almaktadır. Ekzon III'ün sonunda ise dur kodonunu takip eden ve Poli A kuyruğuna kadar uzanan DNA dizisi bulunmaktadır. Bu dizi transkripsiyonun bitiş sinyalini içermektedir. Poli A kuyruğu (AAT AAA) ise mRNA'nın kararlılığını ve ribozomlara bağlanmasını sağlamaktadır.

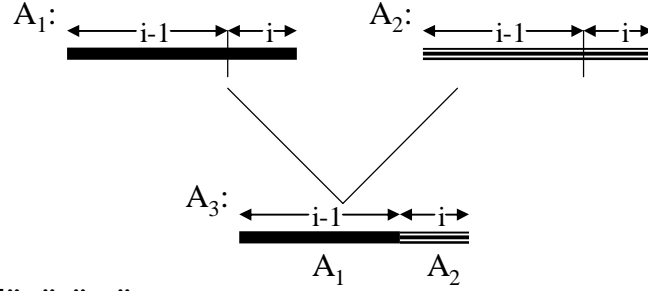
Beta globin gen ailesi gibi tüm gen aileleri, ürünleri aynı genel işlevi gören bölgesel gen gruplarıdır. Gen ailesi içinde yer alan genler arasındaki DNA dizi benzerliği, bunların ortak atasal genden geldikleri hipotezinin doğmasına sebep olmuştur. Bu işlevlerin keşfedilmesine yönelik, beta globin gen ailesinin içindeki polimorfizm odakları son 20 yıl içerisinde araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Currat 2002). Gen ve protein düzeyinde yapılan çalışmalar sonucu, gen çeşitlenmesi, mutasyon işlevleri ve molekül evrim süreci ile ilgili yeni yaklaşımlar ortaya çıkmıştır. Gen çeşitliliğinin oluşmasında gen duplikasyonu en önemli işlevlerden biridir. Gen duplikasyonundan sonra oluşan gen kopyalarında, işlevini kaybettikleri, yeni işlevler kazandıkları ya da işlevlerini kısmen yerine getirebildikleri mutasyonlar

gerçekleşebilir (Aguileta 2004). Gen duplikasyonları genellikle yeniden düzenlenmiş yapılanma (*recombination*) olayından sonra gerçekleşir (Papadakis 1999). DNA dizi homolojisi içeren iki kromozom boyunca, eşdeğer pozisyonlardaki genetik bilgi değiş tokuşuna yeniden düzenlenmiş yapılanma adı verilmektedir. Gen dönüşümü (*gene conversion*), DNA'nın yeniden düzenlenmiş yapılanması sonucu ortaya çıkar. Gen dönüşümü iki yakın ve bağlantılı gen arasında, karşılıklı olmayan (*non-reciprocal*) gensel değiş tokuş olarak tanımlanmaktadır (Şekil 2.4). Bu bakış açısı altında, beta globin gen ailesi üzerinde yeniden düzenlenmiş yapılanma ve gen dönüşümünü konu alan çalışmalarda, 3' ucuna yakın, delta (δ) ve beta (β) genlerini içinde bulunduran yaklaşık 9 kb uzunluğundaki bölgede önemli oranda yeniden yapılanma saptanmıştır (Currat 2002) (Şekil 2.3). Sıcak nokta (*hot spot*) olarak adlandırılan bu bölgede genler arası uzaklık az olduğu için yeniden yapılanma oranı yüksek olduğu gösterilmiştir (Schneider 2002, Falchi 2005, Currat 2002). Beta globin gen ailesi içindeki genler yapı, işlev ve organizasyonları ile gen duplikasyonu ve molekül evrim araştırmalarına büyük destek sağlayabilmektedir. Beta globin gen ailesi üzerinde, ilgili araştırmalara ve tez çalışmamıza konu olan haplotip analizi, gensel köken incelemelerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

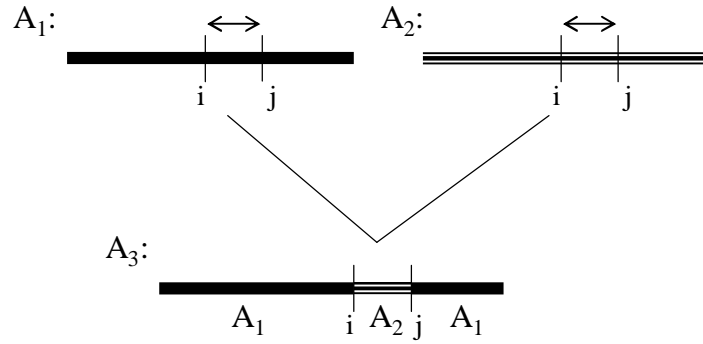


Şekil 2.3 İnsan beta globin gen ailesi, LCR bölgesi ve Sıcak nokta (Ho 2000, Currat 2002).

Yeniden düzenlenmiş yapılanma:



Gen dönüşümü:

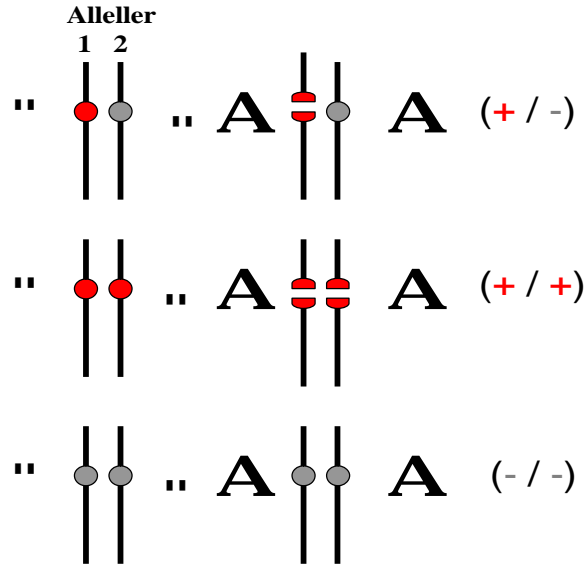


Şekil 2.4 Yeniden düzenlenmiş yapılanma (*recombination*) ve gen dönüşümü (*gene conversion*) işlemleri (Lajoie 2005).

2.3.2 Haplotip analizi:

Haplotip analizi, polimorfizm gösterebilen odakların PCR yöntemi ile çoğaltılıp, RFLP yönteminin uygulanması ve elde edilen sonuçların mutasyon taşıyan allel ile olan ilişkilerinin istatistiksel olarak değerlendirilmesi işlemidir. Polimorfizm, herhangi bir sorun yaratmayan, bölgesel nükleotid değişimleri olarak tanımlanır. Polimorfizmler, nesilden nesile kalıtılma özelliklerinden dolayı gensel köken araştırmaları için oldukça değerlidir. Söz konusu polimorfizmlerin yerlerini belirleyebilmek için restriksiyon endonükleazlar kullanılmaktadır. Restriksiyon endonükleazlar, kendilerine özgü nükleotid dizilerini tanıyarak kesebilmektedir. RFLP, DNA dizisi üzerinde yer alan tanımlanmış enzim kesim bölgelerinin, bu bölgelere özgü restriksiyon enzimleri yardımı ile izlenmesini sağlayan bir yöntemdir. Bu yönteme göre, DNA dizisinde, restriksiyon enzimine özgü enzim kesim bölgelerinin bulunması artı (+), bulunmaması eksi (-) işaretleri ile temsil edilir (Şekil

2.5). RFLP yöntemi uygulandıktan sonra sonuçlar, agaroz DNA elektroforezi ile gözlemlenir.

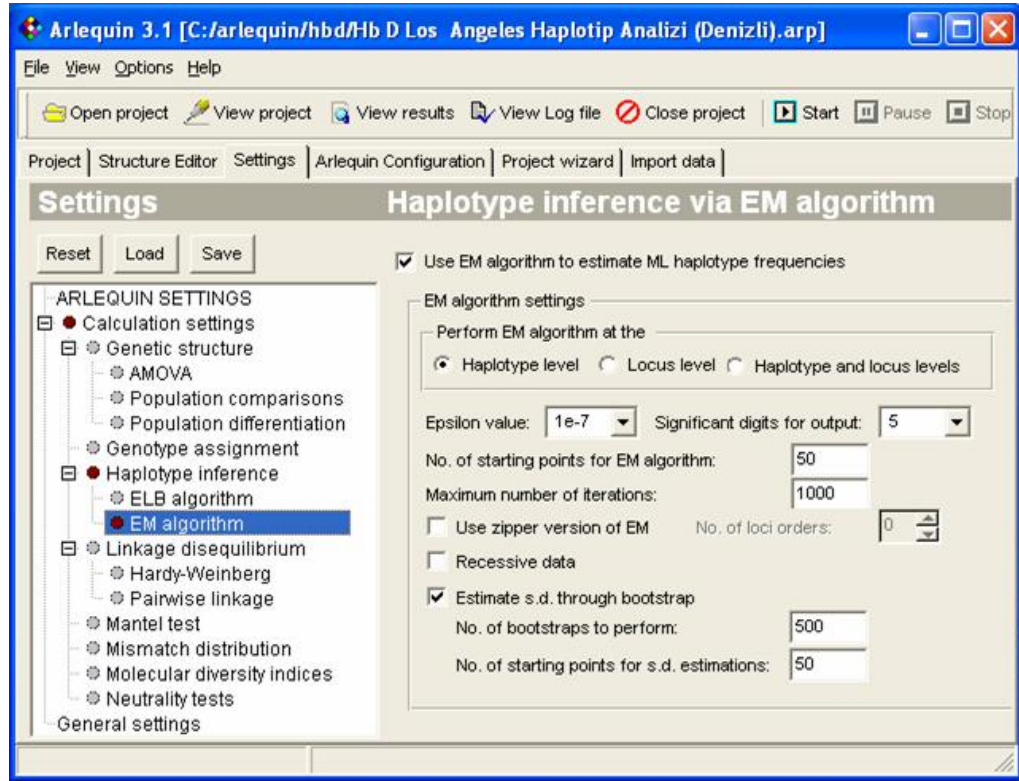


Şekil 2.5 Haplotip analizinin temel yaklaşımı

(" :Restriksiyon enzimi, Enzim kesim bölgesi; ●: Var ●:Yok)

Bu polimorfik odaklar yeniden düzenlenmiş yapılanma (*recombination*), duplikasyon ve gen dönüşümü (*gene conversion*) işlemlerinin ürünü olduklarından, haplotip çalışmaları ile elde edilen sonuçlar, genetik köken araştırmalarında oldukça değerli veriler olarak kabul edilmektedir. Bu verilerin değerlendirilmesi ve anlamlı hale getirilmesi, aile çalışmaları ve istatistik tabanlı yazılımlar ile mümkün olmaktadır. Arlequin (ver 3.1) yazılımı, bu amaca yönelik olarak geliştirilmiş ve popülasyon genetiği verilerinin işlenmesinde kullanılmaktadır (Excoffier, Laval ve Schneider 2006). Bu tez çalışmasında mutasyon taşıyan alleller ile popülasyon arasındaki ilişkiyi belirlemek için kullanılan arlequin yazılımı, ML (*Maximum-Likelihood*) yöntemi ile EM (*Expectation Maximization*) algoritmasını kullanarak haplotip sıklıklarını hesaplayabilmektedir. ML (*Maximum-Likelihood*) yöntemi genetik köken araştırmaları için oldukça iyi bir değerlendirme olanağı sağlar (Weir 2006). Arlequin (ver 3.1) yazılımında EM algoritmasının çalışma ilkesi başlıca dört adımda incelenebilmektedir. İlk adımda, program haplotip frekanslarını rasgele değerlendirmekte, ikinci adımda ise bu verileri kullanarak Hardy-Weinberg eşitliğine dayalı olarak her fenotip için beklenen genotip sıklıklarını hesaplamaktadır. Üçüncü

adımında, yeni oluşan haplotip ve genotip sıklıkları ile karşılaştırır, son adım olan dördüncü adımda ise epsilon değerini, önceden tanımlanmış değerle karşılaştırarak haplotip sıklıkları dengeye ulaşınca kadar ikinci ve üçüncü adımları tekrarlar. Şekil 2.6'da arlequin (3.1) yazılımı kullanılarak Hb D-Los Angeles için yapılan çalışmadaki yazılım ayarları ekranı gösterilmiştir.



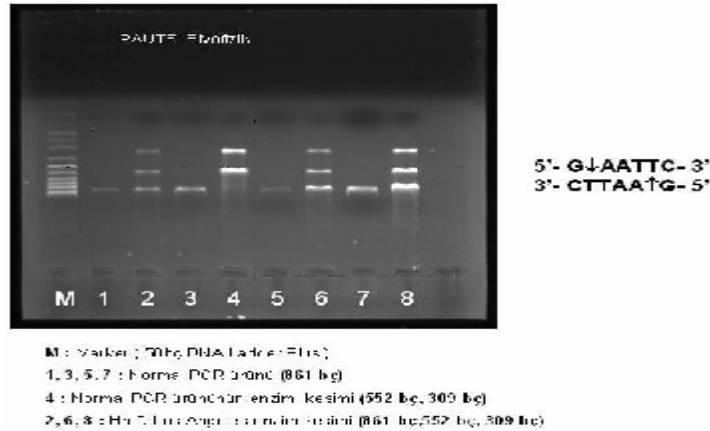
Şekil 2.6 Arlequin (3.1) yazılımı için ayarlar ekranı.

Bu uygulama ile elde edilen haplotipleme sonuçlarının, Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan allel ile ilişkisi belirlenebilmektedir. Şekil 2.6'da, geliştirilmiş yeni sürüm arlequin (3.1) yazılımına ait uygulama örneğinde görüleceği üzere, genetik çeşitlilik incelemeleri, F-istatistiği ve popülasyonlar arası genetik ilişkiler, LD (*linkage disequilibrium*) ve popülasyon içi çeşitlilik, çoklu genotiplere ait gametik faz değerlendirmeleri, nüfus dağılımları ve yaygınlık testleri, Hardy-Weinberg kesin testi, moleküler çeşitlilik analizi (*AMOVA*) gibi popülasyon genetiğini ilgilendiren birçok konuda veri değerlendirme olanağı sağlamaktadır (Excoffier ve Heckel 2006).

2.3.3 Hb D-Los Angeles

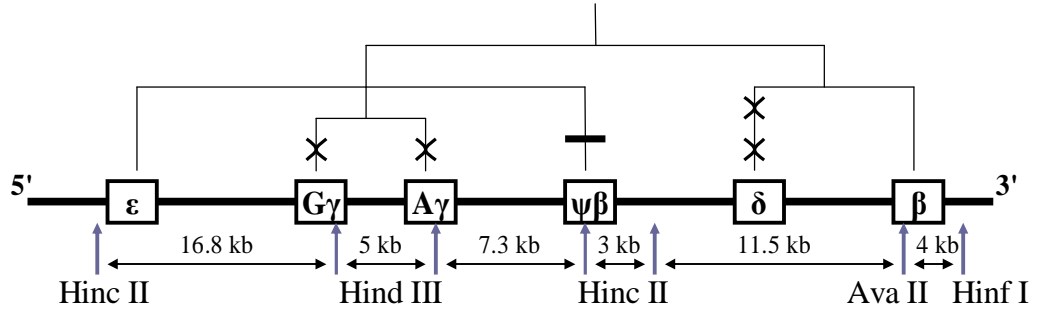
D-Punjab, D-Nort Carolina, D-Portugal, D-Chicago ve Oak Ridge isimleri ile de bilinen Hb D-Los Angeles mutasyonu, beta zinciri kodon 121'de G>C baz yer değiştirmesi ile glutamik asit yerine glutamin gelmesi sonucu oluşan amino asit farklılığından kaynaklanmaktadır. Hb D Los Angeles klinik olarak belirti vermeyen bir anormal hemoglobin türüdür. Daha önce belirtildiği üzere, Hb D-Los Angeles Denizli yöresinde gözlenen anormal hemoglobin türleri içinde % 57.8 sıklık ile ilk sırada yer almaktadır. Aynı zamanda, Denizli yöresinde yapılan çalışmada Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] olgularına özğü beta globin haplotiplerine ait, yeni bir haplotip çeşidi bildirilmiştir (Atalay 2007-a).

Hb D-Los Angeles'ın ayırıcı tanısı ilk olarak kromatografik ve elektroforetik özelliklerinden yararlanarak iyon değiştirici kolon kromatografisi ve hemoglobin elektroforezi teknikleri kullanılarak yapılmaktadır. Protein düzeyinde yapılan bu tetkiklerden sonra gen düzeyinde, PCR ürününün restriksiyon enzim analizi yapılmaktadır. Normal beta globin geninin 121. kodonu GAA, 122. kodonu ise TTC baz dizisine sahiptir. Hb D-Los Angeles mutasyonunda 121. kodon CAA, 122. kodon ise TTC nükleotid dizilimi göstermektedir. Gen düzeyinde yapılan bu analiz için, çift iplikli DNA (*dsDNA-double stranded*) üzerinde yer alan 5'-GAATTC-3' dizisini tanıyarak kesen, EcoRI restriksiyon endonükleaz kullanılmaktadır. Şekil 2.7' de gösterildiği gibi mutasyon taşıyıcısı bireylerde, PCR yöntemi ile çoğaltılan ilgili allele özğü PCR ürünü EcoRI enzimi tarafından kesilememektedir.



Şekil 2.7 Hb D-Los Angeles EcoRI enzim kesimi (Üstel 2006)

Tez çalışmamızda, yöremizde sıklıkla rastlanan Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] mutasyonu taşıyan bireylere ait, beta-globin gen ailesi içerisindeki ϵ -globin, $G\gamma$ / $A\gamma$ -globin, $\psi\beta$ -globin, δ -globin ve β -globin genleri üzerinde bulunan toplam yedi enzim kesim bölgesi için beş adet Restriksiyon enzimi kullanılarak haplotip analizi yapılması amaçlanmaktadır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8 Haplotiplemede kullanılan odaklar ve beta globin gen ailesi içerisindeki evrimsel ilişkiler. Enzim kesim bölgesi (↑), gen dönüşümü (X), baskılanmış gen (-) (Currat 2002, Chen 1990).

Beta globin gen ailesi haplotip analizleri, antropolojik veriler oluşturabildiği gibi, aynı zamanda da mutasyonların oluşum işlergelerinin tartışılabilmesi ve bu noktadan hareketle olası gen tedavisi çalışmalarının yapılabilmesine de, değerli katkılar sağlayabilmektedir. Bu bakış açısı altında; elde edilmesi hedeflenen Hb D-Los Angeles haplotip çeşitleri ile literatür haplotipleri arasında karşılaştırmalı analizin yararlı olacağı öngörülmektedir. Tablo 2.3'de literatürde tanımlanmış bazı haplotip türü örnekleri verilmektedir.

Tablo 2.3 Beta globin gen ailesi için tanımlanmış bazı haplotip türleri (Falchi 2005).

Haplotip	5'-e Hinc II	Gg Hind III	Ag Hind III	5'-yb Hinc II	3'-yb Hinc II	5'-b Ava II	3'-b Hinf I
I	+	-	-	-	-	+	+
II	-	+	+	-	+	+	+
III	-	+	-	+	+	+	-
V	+	-	-	-	-	+	-
VII	+	-	-	-	-	-	+
VIII	-	+	-	+	-	+	-
IX	-	+	-	+	+	+	+

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Tez çalışmamızda kullanılan, Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln] mutasyonu taşıyan bireyler ile normal bireylere ait DNA örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı Hemoglobinopati DNA arşivinden alınmıştır. Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan bireylerden kan alınırken, kendilerine veya ebeveynlerine bilgilendirilmiş onay formu verilerek yazılı onayları alınmaktadır. Bilgilendirilmiş onay formu ile yazılı onayları alınmış kişilerden elde edilen DNA örnekleri, Biyofizik Anabilim Dalı DNA arşivine anonim olarak konulmaktadır. Normal ve mutasyon taşıyıcısı bireylere ait beta globin gen bölgeleri, uygun primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Haplotip analizinin devam eden aşamalarında ise sırası ile enzim kesimi ve istatistiksel değerlendirme çalışmaları yapılmıştır.

3.1. Genomik DNA İzolasyonu:

1. Potasyum EDTA' lı tüplere, beş ml kan örneği alındı.
2. Bir ml kan örneği üzerine beş ml 1x retikülosit tuz çözeltisi eklenip karıştırıldı ve 600 g' de 15 dakika santrifüjlenerek üst sıvı atıldı.
3. Çökelti üzerine 1x retikülosit tuz çözeltisi eklendi ve 600 g' de 15 dakika santrifüjlendi. Bu işlem en az üç kez uygulandı.
4. Son çökelti üzerine üç ml soğuk lizat çözeltisi eklendi ve çözelti berraklaşmaya kadar buz içerisinde bekletildi. Çözelti berraklaştıktan sonra 1900 g' de 15 dakika santrifüjlendi ve üst sıvı atıldı.
5. Bu çökelti üzerine, bir ml 1x STE çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve 1900 g' de 15 dakika santrifüjlendi ve üst sıvı atıldı. Bu yıkama işlemi iki kez tekrarlandı.
6. Nükleer pellet üzerine, 0,45 ml 1x STE çözeltisi eklendi ve mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 100 μ g/ml derişiminde proteinaz-K ve % 1 SDS eklendi.
7. Tüp 37 °C' ta 2-4 saat veya gece boyu bekletildi.

8. İnkübasyondan alınan tüp üzerine eşit miktarda doymuş fenol çözeltisi eklendi ve 11.000 g' de 15 dakika santrifüjlendi. Üst sıvı temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
9. Üst sıvı üzerine eşit miktarda, kloroform / izomamilalkol (24:1) eklendi ve 11.000 g' de 15 dakika santrifüjlendi.
10. Üst sıvı alınıp üzerine 1/10 oranında 3 M sodyum asetat (pH:5) ve saf etanol eklendi. DNA tüp içerisinde belirginleşinceye kadar bekletildi. DNA ipliksi görünüm aldıktan sonra steril mikrosantrifüj tüpü içerisine aktarıldı.
11. Tüp içerisindeki DNA üzerine %70'lik etanol eklendi ve 11.000 g' de 15 dakika santrifüjlendi.
12. Etanol atıldıktan sonra steril saf su ile çözüldü.
13. Elde edilen DNA'nın derişimi (O.D₂₆₀) değeri "Eppendorf DNA Fotometre" ile tespit edildi.

Kullanılan çözeltiler:

§ 5x Retikülosit tuz çözeltisi:

Potasyum klorür 25 mM,
Magnezyum klorür 35mM,
Sodyum klorür 686 mM

§ Lizat çözeltisi:

Potasyum bikarbonat 10 mM,
Amonyum klorür 155 mM,
Disodyum EDTA 0,1 mM

§ STE çözeltisi:

Sodyum klorür 100 mM,
Tris-HCl 10 mM,
EDTA 1 mM

§ Proteinaz K (Amresco, 20mg/ml)

§ 10 x SDS:

SDS, (% 10 çözelti)

3.2 EcoRI enzim kesimi ve DNA dizi analizi:

Hb D-Los Angeles mutasyonunun gen düzeyinde tanısını yapabilmek için, 121. kodonu içeren 861 bç uzunluğundaki PCR ürünü içerisinde yer alan 5'-GAATTC-3' dizisini tanıyarak kesen, EcoRI restriksiyon enzimi kullanılmıştır. PCR ürünü elde etmek için Tablo 3.1'de verilen primer dizileri kullanılarak, Tablo 3.2'deki PCR koşulları uygulanmıştır. PCR sonucu % 1'lik agaroz jel elektroforezinde olumlu biçimde doğrulandıktan sonra EcoRI restriksiyon enzimi ile kesim yapılmıştır.

EcoRI kesimi için elde edilen PCR ürünleri 3.3.2' de belirtilen yöntemle temizlenmiştir. Alkol çöktürme yöntemi ile temizlenen PCR ürününden 10 µl alınarak 2 µl EcoRI tamponu (10x), 7 µl steril saf su, ve 1ml 10 u/µl EcoRI enzimi eklenerek 37°C' de gece boyu bekletilmiştir. Bekletme süresinin sonunda kesim ürünleri % 1' lik agaroz jelde gözlenerek kayıtlanmıştır.

Tablo 3.1 PCR yönteminde kullanılan primer çifti ve özellikleri.

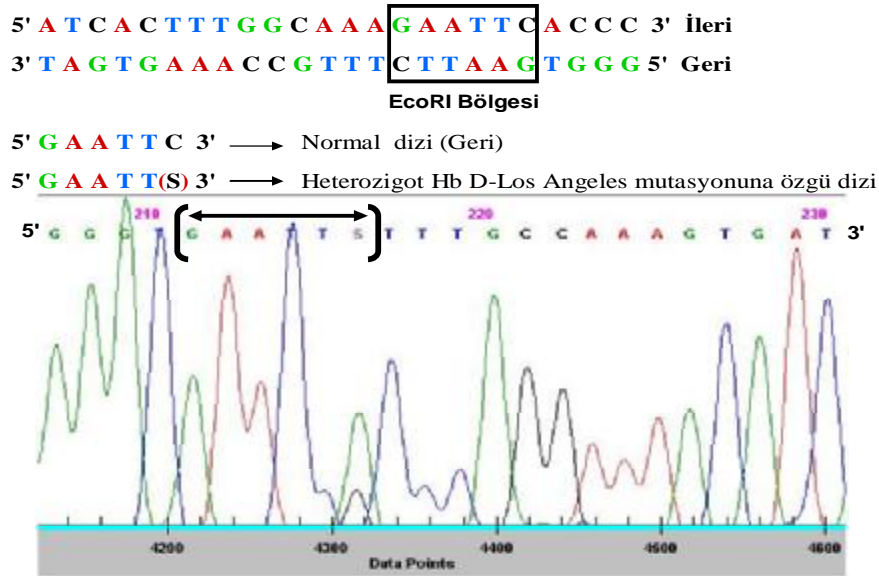
Primer Adı	Primer Dizisi
PAM 200 (36-mer)	5'-Biotin-AAA TTA GGA TCC CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC-3'
PAM 201 (36-mer)	5'-TAT AAT AAG CTT GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA-3'

Tablo 3.2 EcoRI PCR karşımı ve uygulama biçimi.

PCR bileşenleri	Tek tüp için miktar	Derişimler
DNA (0.03 µg/µl)	2 µl	0,06 µg/ 50 µl
Tampon (Buffer BIORON 10X)	5 µl	1 X
dNTP _{Mix} (BIORON, 0.5 mM)	5 µl	0,05 mM
Mg ⁺⁺ (BIORON, 16 mM)	5 µl	1,6 mM
Primer I (10 pmol/µl)	2 µl	20 pmol
Primer II (10 pmol/µl)	2 µl	20 pmol
Taq DNA polimeraz (BIORON, 1 u/µl)	5 µl	0,2 u/ 50 µl
Steril dH ₂ O	24 µl	-
Toplam Hacim	50 µl	50 µl

PCR Uygulaması: 95°C 5 dak ön denatürleme, 94° 30 sn, 65° 25 sn, 72° 30 sn 25 döngü, 72°C 5 dak.

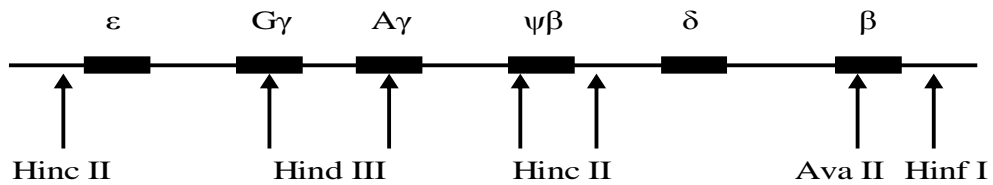
Hb D-Los Angeles mutasyonunun gen düzeyinde tanımlanması için ikinci olarak DNA dizi analizi tekniği kullanılmıştır. Dizi analizi yönteminde, Beckman Coulter Genome Lab™ Methods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing Kit'i ile PCR yöntemi kullanılarak hazırlanan DNA parçalarının nükleotid dizileri saptanmıştır. Şekil 3.1' de Hb D-Los Angeles mutasyonunun dizi analizi yöntemi ile tanımlanmasına yönelik bir örnek gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Heterozigot Hb D-Los Angeles mutasyonunun, geri primer kullanılarak dizi analizi ile tanımlanması.(S: G/C)

3.3 Haplotip analizi

Beta globin gen ailesine özgü haplotip analizi için, Şekil 3.2'de verildiği gibi toplam yedi odak kullanılmıştır. Bu odaklar sırası ile 5'ε, Aγ, Gγ, 5'ψβ, 3'ψβ, 5'β, 3'β şeklinde dizilmiştir. Her odak ayrı ayrı uygun primerler ile çoğaltılmakta ve ayrı ayrı elde edilen PCR ürünleri ilgili odaktaki polimorfizme özgü restriksiyon enzimleri ile kesilerek ortaya çıkan kesim parçaları agaroz jelde tanımlanmaktadır



Şekil 3.2 Haplotip analizi için kullanılan restriksiyon enzimi kesim odakları.

3.3.1 İlgili odakların PCR yöntemi ile çoğaltılması:

Beta globin gen ailesi içerisinde yer alan, yedi enzim kesim bölgesi, bölgelere özgü primer çiftleri kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldı. İlgili bölgelerin çoğaltılması için Tablo 3.3' de verilen 50 μ l' lik PCR karışımı hazırlandı. Bu PCR karışımı içerisindeki, enzim kesimi için kesim bölgelerini çoğaltacak olan primer çiftleri ve enzim kesim bölgelerine özgü restriksiyon enzimleri ile, ilgili odaklar Tablo 3.4' de gösterilmiştir.

PCR yöntemi ile çoğaltım işlemi, sıcaklık döngü cihazı (*Technogene Thermo Cycler*) kullanılarak Tablo 3.5' de verilen programlar ile yapıldı. Daha sonra, elde edilen PCR ürünü, % 1' lik agaroz jelde yürütülerek, jel görüntüleme cihazı ile görüntülendi.

Tablo 3.3 PCR karışımı.

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

Tablo 3.4 İlgili odaklara özgü restriksiyon enzimleri ve primer çiftleri

Odak	RE*	Primer çifti	PCR ürünü
5'ε	Hinc II	PRE 105→5'-TTC CTG TTT GAT GAC AAA TTC-3' PRE 106→5'-AGT CAT TGG TCA AGG CTG ACC-3'	760 bç
G _γ	Hind III	PRE 102→5'-AAG TGT GGA GTG TGT ACA TGA-3' PRE 103→5'-TGC TGC TAA TGC TTC ATT ACA A-3'	781 bç
A _γ	Hind III	PRE 103→5'-TGC TGC TAA TGC TTC ATT ACA A-3' PRE 104→5'-TAA ATG AGG AGC ATG CAC ACA C-3'	766 bç
5'ψβ	Hinc II	PRE 107→5'-GAA CAG AAG TTG AGA TAG AGA-3' PRE 108→5'-ACT CAG TGG TCT TGT GGG CT-3'	701 bç
3'ψβ	Hinc II	PRE 109→5'-TCT GCA TTT GAC TCT GTT AGC-3' PRE 110→5'-GGA CCC TAA CTG ATA TAA CTA-3'	592 bç
5'β	Ava II	PRE 111→5'-GTG GTC TAC CCT TGG ACC CAG AG-3' PRE 112→5'-TTC GTC TGT TTC CCA TTC TAA ACT-3'	328 bç
3'β	Hinf I	PRE 113→5'-AGT TAG AGG CTT GAT TTG GAG G-3' PRE 114→5'-GTT AAG GTG GTT GAT GGT ACC-3'	638 bç

*: Restriksiyon Enzimi

Tablo 3.5 PCR için kullanılan sıcaklık döngü cihazı programları.

Odak	Sıcaklık döngüleri	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
G _γ	Denatürleme	94 °C	30 sn	
A _γ	Primer eşleşmesi (<i>annealing</i>)	55 °C	15 sn	
5'β	Primer uzaması (<i>extension</i>)	72 °C	30 sn	30
3'β		72 °C	5 dak	
	Denatürleme	94 °C	30 sn	
5'ε	Primer eşleşmesi (<i>annealing</i>)	50 °C	15 sn	
3'ψβ	Primer uzaması (<i>extension</i>)	72 °C	30 sn	30
		72 °C	5 dak	
	Denatürleme	94 °C	30 sn	
5'ψβ	Primer eşleşmesi (<i>annealing</i>)	53 °C	15 sn	30
	Primer uzaması (<i>extension</i>)	72 °C	30 sn	
		72 °C	5 dak	

3.3.2 PCR ürünlerinin saflaştırılması:

Genomik DNA kullanılarak çoğaltılan PCR ürünleri, etanol çöktürme yöntemi ile saflaştırıldı

1. PCR reaksiyonu karışımı, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve üzerine 1:10 hacim sodyum asetat ve 800 µl saf etanol eklendi. Bu karışım yaklaşık 1 saat -20 °C'de bekletildi.
2. Örnekler 12.000 rpm'de 15 dk. santrifüjlendikten sonra üst sıvı uzaklaştırıldı.
3. Çökelti üzerine 200 µl % 70' lik etanol eklendi ve 12.000 rpm'de 2 dk. santrifüjlendi. Santrifüjlemeden sonra üst sıvı uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
4. Yıkama işleminden sonra çökelti, vakumlu santrifüj (*Speed Vac*) ile kurutuldu. Çökelti üzerine 20–30 µl steril dH₂O eklenerek enzim kesimine hazır hale getirildi.

3.3.3 PCR ürünlerinin ilgili restriksiyon enzimi ile kesimi:

Beta globin gen ailesi içerisindeki enzim kesim bölgelerini içeren PCR ürünleri ile bu bölgelere özgü restriksiyon enzimleri kullanılarak hazırlanan karışımlar ve bekletme süreleri Tablo 3.6'da gösterilmektedir. İlgili odak için elde edilen restriksiyon enzim kesimleri %1-1.5 'luk agaroz jelde gözlemlenerek kayıtları.

Tablo 3.6 Bölgelere özgü enzim kesim karışımları ve bekletme süreleri.

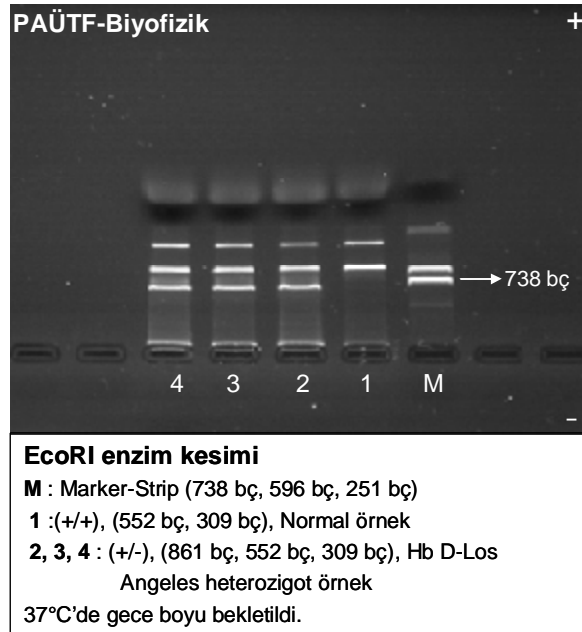
Gγ, Aγ Hind III Enzim kesimi karışımı	5'ε, 3'ψβ, 5'ψβ Hinc II Enzim Kesimi karışımı
Tek tüp için; 10 µl - PCR ürünü 2 µl - Tampon (Buffer NEB2 10x) 1 µl - Hind III enzimi (NEB 20 u/µl) 7 µl - Steril dH ₂ O 20 µl - Toplam karışım	Tek tüp için; 10 µl - PCR ürünü 2 µl - Tampon (Buffer Tan. Fermentas 10x) 0.1 µl - Hinc II enzimi (Fermentas 10 u/µl) 8 µl - Steril dH ₂ O 20 µl - Toplam karışım
Karışım 37°C'de gece boyu bekletildi	Karışım 37°C'de 2 saat bekletildi
5'β Ava II Enzim Kesimi karışımı	3'β Hinf I Enzim Kesimi karışımı
Tek tüp için; 10 µl - PCR ürünü 2 µl - Tampon (Buffer Bme 18I) 0.5µl - Ava II enzimi (BIORON 5 u/µl) 7.5 µl- Steril dH ₂ O 20 µl - Toplam karışım	Tek tüp için; 10 µl - PCR ürünü 2 µl - Tampon (Buffer R+) 0.5 µl - Hinf I enzimi (Fermentas 10 u/µl) 7.5 µl - Steril dH ₂ O 20 µl - Toplam karışım
Karışım 37°C'de 2 saat bekletildi	Karışım 37°C'de 2 saat bekletildi

3.4 Haplotip sıklıklarının belirlenmesi:

Elde edilen enzim kesimi sonuçlarının değerlendirilmesi amacı ile, popülasyon içi ve popülasyonlar arası genetik veriler üretilmesine yönelik, temel yöntemler ve istatistiksel testleri içinde bulunduran Arlequin (3.1) yazılımı kullanılmıştır. Hb D-Los Angeles mutasyonu ile ilişkili haplotipin belirlenmesi amacı ile bu yazılımdan yararlanılmıştır. Normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan bireylerin haplotipleri ile bu haplotiplere ait allel sıklıkları hesaplanarak tanımlanmıştır.

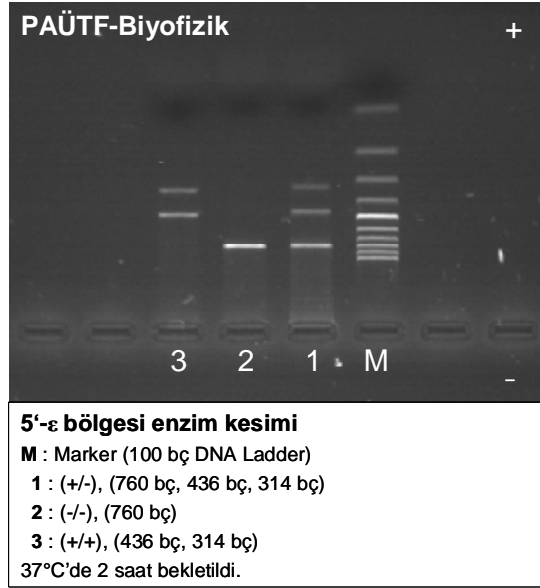
4.BULGULAR

Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan ve normal bireylere ait DNA örnekleri, Pamukkale Üniversitesi Biyofizik Anabilim Dalı Hemoglobinopati DNA arşivinden alınmış olup, anonim biçimde kullanılmıştır. Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı 40 bireye ait DNA örneklerinin, EcoRI enzim kesim bölgesi içeren 861 bç uzunluğundaki DNA parçası PCR yöntemi ile çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünlerinin EcoRI restriksiyon enzimi ile tepkimesi sonucu oluşan bandlar, agaroz DNA elektroforezi ile jel görüntüleme cihazında gözlemlenmiştir (Şekil 4.1).

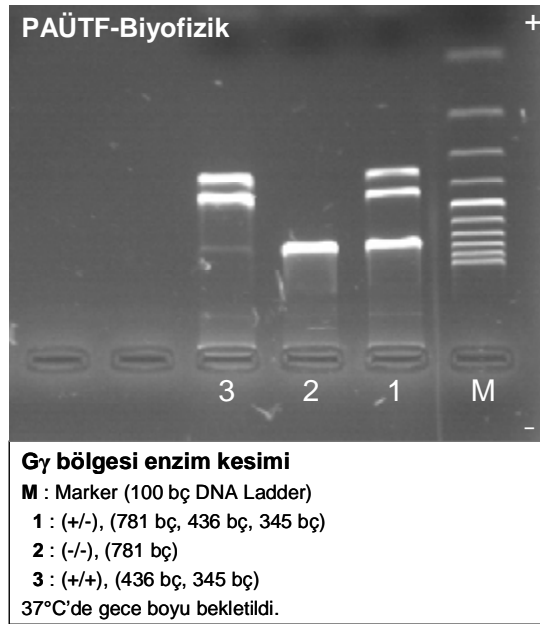


Şekil 4.1 EcoRI enzim kesimi ile beta globin geni kodon 121' deki Hb D-Los Angeles (GAA→CAA) mutasyonunun saptanması.

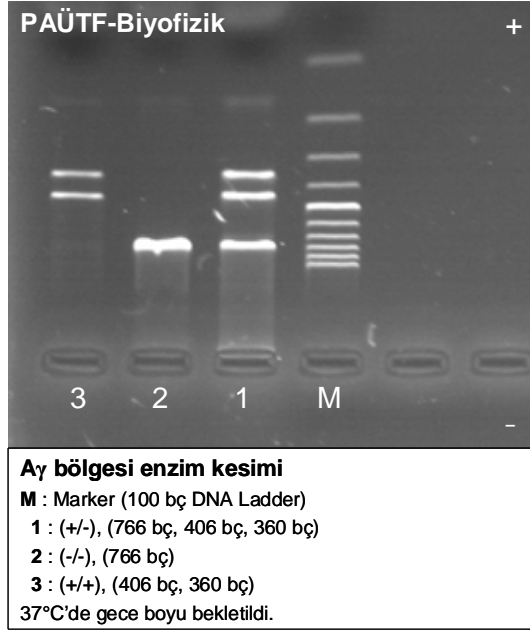
Normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan bireylere ait DNA örneklerinde, beta globin gen ailesi haplotip analizi için kullanılan odaklar, gereçler ve yöntemler bölümünde bahsedildiği şekilde PCR yöntemi kullanılarak çoğaltılmıştır. PCR ürünleri, ilgili haplotip odağına özgü restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra ortaya çıkan kesim parçaları, agaroz DNA elektroforezinde 20-30 dakika yürütülmüş ve görüntüleme sonrasında değerlendirilmiştir. (Şekil 4.2-8)



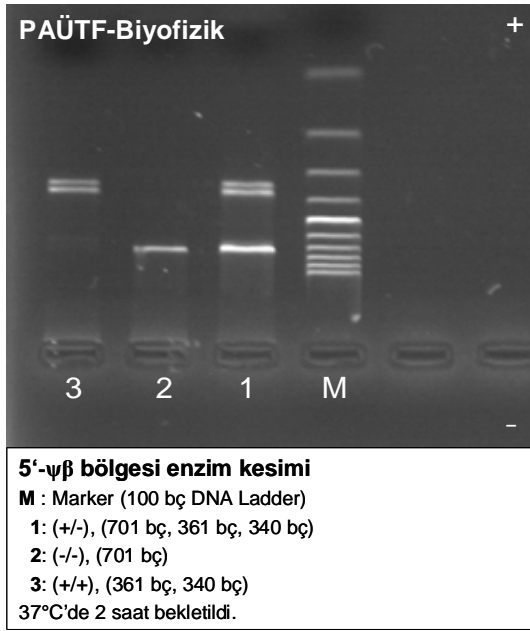
Şekil 4.2 5'-ε bölgesi, Hinc II restriksiyon enzimi kesim sonuçları.



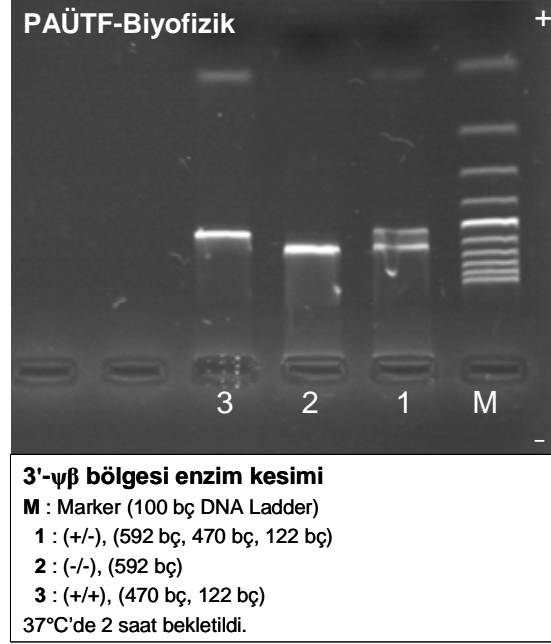
Şekil 4.3 Gy bölgesi, Hind III restriksiyon enzimi kesim sonuçları.



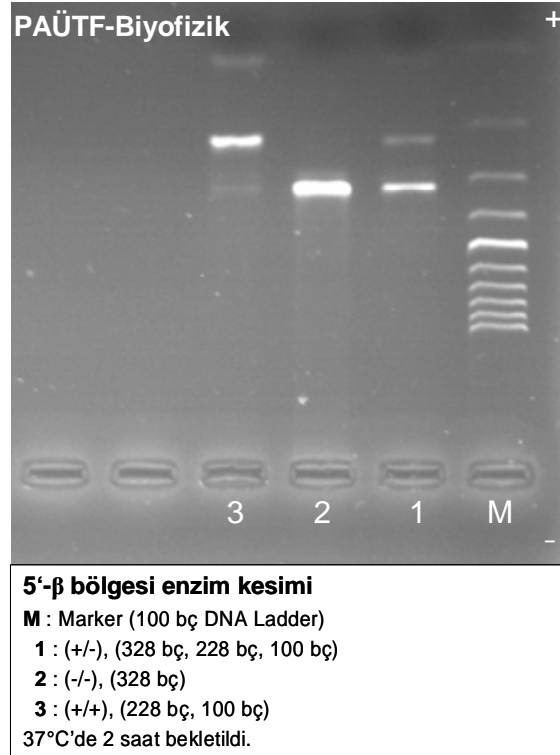
Şekil 4.4 Aγ bölgesi, Hind III restriksiyon enzimi kesim sonuçları.



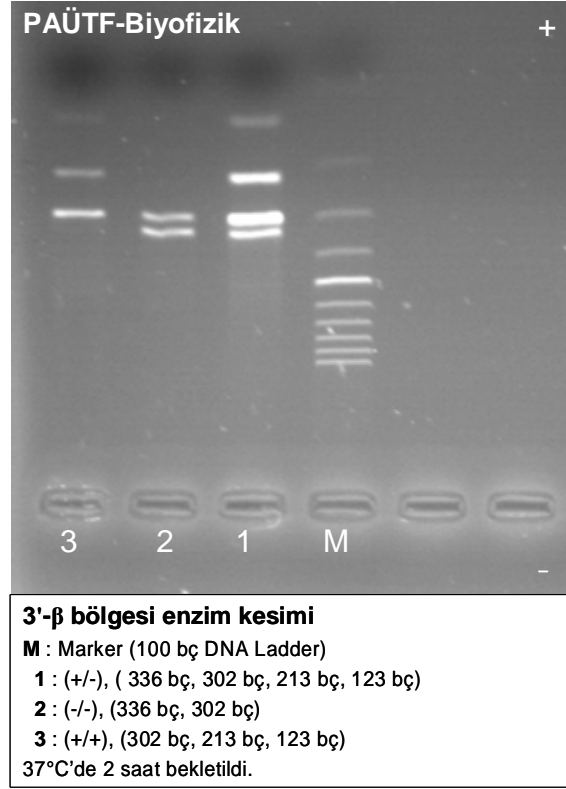
Şekil 4.5 5'-ψβ bölgesi, Hinc II restriksiyon enzimi kesim sonuçları.



Şekil 4.6 3'- $\psi\beta$ bölgesi, Hinc II restriksiyon enzimi kesim sonuçları.



Şekil 4.7 5'- β bölgesi, Ava II restriksiyon enzimi kesim sonuçları.



Şekil 4.8 3'- β bölgesi, Hinf I restriksiyon enzimi kesim sonuçları.

Beta globin gen ailesinde yer alan odaklara özgü enzim kesim sonuçları, Tablo 4.1 ve Tablo 4.2' de verilmiştir.

Tablo 4.1' de Hb D-Los Angeles heterozigot bireylere özgü ve Tablo 4.2'de normal bireylere özgü sonuçlar yer almaktadır. Normal ve heterozigot Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan bireylere ait haplotip sonuçları, Arlequin yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. Arlequin yazılımı ile elde edilen sonuçlar Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireyler için Tablo 4.3 ve normal bireyler için Tablo 4.4'de yer almaktadır.

Tablo 4.1 Hb D-Los Angeles heterozigot olgulara ait enzim kesim sonuçları.

No	DNA Kodu	Haplotip*							No	DNA Kodu	Haplotip*						
		1	2	3	4	5	6	7			1	2	3	4	5	6	7
1	100219	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	21	100560	-/-	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
2	100220	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	22	100563	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
3	100221	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	23	100564	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
4	100222	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	24	100565	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
5	100233	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	25	100572	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
6	100292	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-	26	100573	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+
7	100315	+/+	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	27	100574	-/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+
8	100322	-/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	28	100576	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
9	100324	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	29	100621	-/-	+/+	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+
10	100325	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	30	100665	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+
11	100327	-/-	+/+	+/+	-/-	+/-	+/+	+/+	31	100666	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+
12	100330	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	32	100668	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+
13	100425	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	33	100672	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+
14	100429	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	34	100705	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+
15	100430	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	35	101284	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
16	100437	-/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	36	100192	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+
17	100438	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	37	100218	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+
18	100439	-/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	38	100302	+/-	+/+	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+
19	100525	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	39	100303	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+
20	100526	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	40	100575	+/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+

(*) (1) ϵ -Hinc II, (2) G_γ -Hind III, (3) A_γ -Hind III, (4) $5'\psi\beta$ -Hinc II, (5) $3'\psi\beta$ -Hinc II, (6) $5'\beta$ -Ava II, (7) $3'\beta$ -Hinf-I

Tablo 4.2 Normal olgulara ait enzim kesim sonuçları.

No	DNA Kodu	Haplotip*							No	DNA Kodu	Haplotip*						
		1	2	3	4	5	6	7			1	2	3	4	5	6	7
1	100029	-/-	+/+	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+	38	101345	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
2	100030	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	-/-	39	101349	+/-	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+
3	100031	-/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	+/+	40	101355	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
4	100034	+/+	+/+	-/-	-/-	+/-	+/-	+/+	41	101365	+/-	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+
5	100036	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	42	101366	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+
6	100040	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	43	101367	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
7	100050	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+	44	101372	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+
8	100054	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	45	100985	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
9	100058	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	46	101000	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
10	100064	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	47	101006	+/-	+/+	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-
11	100066	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	48	101051	+/+	+/-	-/-	+/-	+/-	-/-	+/+
12	100068	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-	49	101066	+/-	+/+	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-
13	100070	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	50	101124	+/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+	+/-
14	100071	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	51	101126	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-
15	100076	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	52	101130	+/-	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+
16	100078	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	53	101132	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
17	100079	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	54	101147	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
18	100081	+/-	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/-	55	101148	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/+
19	100083	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	56	101170	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-
20	101276	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-	57	101176	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/-
21	101277	-/-	+/+	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	58	101265	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/-	+/-
22	101282	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/+	59	101375	+/-	+/+	+/-	-/-	+/-	-/-	+/-
23	101283	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	60	101377	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
24	101285	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/+	61	101407	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/+	+/-
25	101297	-/-	+/+	-/-	+/+	+/+	+/-	+/-	62	101420	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
26	101299	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	63	100037	+/-	+/+	-/-	-/-	+/-	+/+	+/-
27	101301	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	64	100039	+/-	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-
28	101305	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	-/-	65	100041	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
29	101306	-/-	+/+	+/-	+/-	+/-	+/-	-/-	66	100042	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-
30	101310	+/-	+/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	67	100045	-/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/+	+/-
31	101311	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/+	68	100047	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
32	101319	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	-/-	69	100048	-/-	+/+	+/-	-/-	+/-	+/+	+/-
33	101323	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/+	70	100051	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
34	101324	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	+/+	+/-	71	100077	+/-	+/+	-/-	+/-	+/-	+/+	+/-
35	101322	+/-	+/-	+/-	-/-	+/-	+/+	+/+	72	100080	+/-	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-
36	101330	-/-	+/+	+/-	+/-	+/+	+/-	+/+	73	100255	+/-	+/+	+/-	-/-	-/-	+/+	+/-
37	101343	+/-	+/-	-/-	+/-	+/-	+/-	+/-	74	100254	+/-	+/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/-

(*) (1) ϵ -Hinc II, (2) G_{γ} -Hind III, (3) A_{γ} -Hind III, (4) $5'\psi\beta$ -Hinc II, (5) $3'\psi\beta$ -Hinc II, (6) $5'\beta$ -Ava II, (7) $3'\beta$ -Hinf-I

Tablo 4.3 Hb D-Los Angeles heterozigot olgulara ait haplotip analizi sonuçları.

No	Haplotip	Sıklık	Standart Sapma (SS)
1	1 0 0 0 0 1 1	0.346909	0.057740
2	0 1 1 0 1 1 1	0.298632	0.054972
3	1 0 0 0 0 0 1	0.125000	0.038259
4	1 0 0 0 0 1 0	0.065592	0.031056
5	0 1 0 0 1 1 1	0.025000	0.017043
6	0 1 0 1 0 0 1	0.024241	0.017663
7	0 1 0 1 1 0 0	0.021908	0.016966
8	0 1 0 1 1 0 1	0.016351	0.015529
9	0 1 1 0 0 1 1	0.013868	0.013252
10	0 0 0 0 1 0 1	0.013109	0.012902
11	0 1 0 0 0 0 1	0.012500	0.013212
12	1 1 0 0 0 1 1	0.012500	0.012190
13	1 1 1 0 0 0 1	0.012500	0.012028
14	0 0 0 0 0 0 1	0.011891	0.012114
Arlequin Yazılımı Değişkenleri			
Epsilon değerini kontrol için tekrarlama: 1e-7		Toplam olası haplotip sayısı: 92	
EM algoritması tekrar sayısı: 50		Olası haplotiplerin sıklıkları toplamı: 1	
Allel sayısı: 80		Toplam listelenmiş haplotip sayısı: 14	
En fazla tekrar sayısı: 1000		Listelenmiş haplotiplerin sıklıkları	
toplamı: 1			
SS değerlendirmesi için tekrar sayısı :1000		SS karşılaştırma sayısı: 50	

Tablo 4.4 Normal olgulara ait haplotip analizi sonuçları.

No	Haplotip	Sıklık	Standart Sapma (SS)
1	1 0 0 0 0 1 1	0.266653	0.044010
2	0 1 0 1 1 1 1	0.146688	0.036171
3	1 0 0 0 0 1 0	0.125874	0.034472
4	0 1 1 0 1 1 1	0.062640	0.024809
5	1 0 0 0 0 0 0	0.054387	0.027891
6	1 0 0 0 0 0 1	0.051454	0.025449
7	0 1 0 1 1 0 0	0.045303	0.023963
8	0 1 1 0 1 0 1	0.039325	0.020220
9	0 1 0 1 1 1 0	0.032222	0.022535
10	0 1 0 1 1 0 1	0.029105	0.021453
11	0 1 0 0 0 0 0	0.020265	0.012699
12	0 1 1 0 0 0 1	0.018860	0.014217
13	0 1 1 0 0 0 0	0.016561	0.013095
14	0 1 1 1 1 0 0	0.014477	0.010523
15	1 0 0 0 1 1 0	0.011957	0.009981
16	1 0 0 0 1 1 1	0.009946	0.009528
17	0 1 0 0 1 1 1	0.009725	0.008447
18	1 1 0 1 1 1 0	0.009232	0.008806
19	1 1 0 0 1 1 1	0.007497	0.007517
20	1 1 0 1 1 1 1	0.006757	0.008336
21	1 1 0 1 1 0 1	0.006757	0.007170
22	1 1 0 0 0 0 1	0.006757	0.006687
23	0 1 0 0 1 0 0	0.004017	0.005628
24	1 1 1 0 1 0 0	0.003542	0.004885
Arlequin Yazılımı Değişkenleri			
Epsilon değerini kontrol için tekrarlama: 1e-7		Toplam olası haplotip sayısı: 128	
EM algoritması tekrar sayısı: 50		Olası haplotiplerin sıklıkları toplamı: 1	
Allel sayısı: 148		Toplam listelenmiş haplotip sayısı: 24	
En fazla tekrar sayısı: 1000		Listelenmiş haplotiplerin sıklıkları toplamı: 1	
SS değerlendirmesi için tekrar sayısı :1000		SS karşılaştırma sayısı: 50	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Normal olarak, bir türe ait popülasyon içinde birbirinden farklı bireyler yer almaktadır. Popülasyon içindeki her birey, türün başka bireyleriyle ortak genleri paylaşmasına rağmen, taşıdığı pek çok gen bakımından diğer bireylerden farklı bir gensel yapıya (genotip) sahiptir. Bir genin farklı allellerinden ve allellerin, popülasyon içerisindeki farklı sıklıklarda dağılımından kaynaklanan bu değişimler, popülasyonun bireyleri arasında, morfolojik, fizyolojik, biyokimyasal ve davranış özellikleri bakımından çeşitliliklerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Gen ve gen ürünleri olan proteinler arasındaki bu ve benzeri gensel ilişkiler konusunda hemoglobin molekülü en çok çalışılan model sistemdir.

Hemoglobin sentezinden sorumlu olan genler, çalışılan popülasyonun tüm bireylerinde ortak olarak yer aldığı halde, içerdikleri mutasyonlar nedeni ile anormal hemoglobinler ve talasemiler gibi toplumlarda gözlenen çeşitliliğe sebep olmaktadır. Bu farklılıklar Hb S gibi orak hücre anemisine yol açan ve dolayısı ile sağlık sorunu oluşturan nitelikte olabileceği gibi, sağlık sorunu oluşturmeyen nitelikler de taşıyabilmektedir. Hb D-Los Angeles, sağlık sorunu oluşturmeyen bu tür bir çeşitlilik örneğidir. Bu gensel çeşitliliklere neden olan işlergelerin tanımlanmasına yönelik çalışmalar, gen teknolojisinin hızla geliştiği son 50 yılda birçok araştırmacının konusu olmuştur. Gensel çeşitliliğe neden olan mutasyonların geçmişe dönük izlenmesi (*pedigree*), bu mutasyonları taşıyan bireylerin önceki nesiller boyu takibini gerektirmektedir. İlgilenilen DNA bölgesinde yer alan polimorfizm odakları kullanılarak allel sıklıkları hesaplanması ve bu yolla elde edilen verilerin değerlendirilmesi araştırmacılar tarafından tercih edilmektedir. İngiliz matematikçi Godfrey H. Hardy ve Alman fizikçi Wilhelm Weinberg tarafından geliştirilen matematiksel bir model olan Hardy-Weinberg (HW) kanunu kullanılarak, popülasyonların allel sıklıkları ile ilgili oldukça verimli sonuçlar elde edilmektedir (Klug ve Cummings 2002). HW kanunu gensel çeşitliliğin bir popülasyona ait bireyler arasında nesilden nesile kalıtılabileceğini göstermektedir. İkinci olarak HW kanunu, bir genotipin sıklığının bilinmesi ile diğer genotip sıklıklarının

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

Bu bakış açısı altında, Denizli yöresinde normal ve Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyıcısı bireylerin haplotip analizi ile elde edilen allel sıklıklarının ve haplotip türlerinin karşılaştırmalı analizinin yapılması bu tez çalışmasının amacını oluşturmaktadır.

Talasemiler ve anormal hemoglobinler, dünyada ve özellikle ülkemizin de yer aldığı Akdeniz kuşağında karşılaşılan en yaygın kalıtsal hastalıklar arasında yer almaktadır (Weatherall 2001, Yıldız 2005). Çalışmamıza model olarak seçtiğimiz anormal hemoglobin olan Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu→Gln], Türkiye genelinde görülme sıklığı açısından ikinci sırada yer alan bir anormal hemoglobin türüdür. Bu hemoglobin türünün görülme sıklığı % 0.2 olarak verilmektedir (Altay 2002). Bu durum yöremiz için faklılık göstermektedir. Yöremizde evlilik öncesi tarama çalışmalarında karşılaşılan anormal hemoglobinler arasında, Hb D-Los Angeles % 57.8 ile ilk sırada yer almaktadır (Atalay 2005).

Beta globin gen ailesi, ürünleri hemoglobin molekülünün yapısında yer alan alt birimleri kodlayan bölgesel gen grubudur ve 11. kromozomda yer almaktadır. Beta globin gen ailesi içerisinde saptanan polimorfik odaklar özellikle, Hb S ve beta talasemi mutasyonlarına ilişkin biçimde çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir. Birçok molekül sorunu ile ilişkisi nedeni ile beta globin gen ailesine özgü polimorfizm odakları son 20 yıl içerisinde araştırmacıların ilgisini çekmiştir (Curran 2002, Chen 1990, Falchi 2005).

Tez çalışmamıza konu olan Hb D-Los Angeles mutasyonu temel bir sağlık sorunu oluşturmamasına karşın, göreceli olarak nadir biçimde görülen bir hemoglobin türüdür. Hb D-Los Angeles dünyada sıklıkla gözlenen anormal hemoglobin türlerinden bir tanesidir. Bunun yanı sıra Hindistan' da ve kuzeybatı Çin' de yaygın biçimde gözlenmesinden ötürü, mutasyonun Orta Asya kökenli olduğu ve göçler yolu ile yayıldığı hipotezi bulunmaktadır (Fioretti 1993). Bu hipotezin tartışılabilmesi için, dünyanın farklı bölgelerinde yapılan Hb D-Los Angeles haplotip analizi çalışmalarında, ilgili mutasyonun çoğunlukla Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - + +] ile ilişkili olduğu gösterilmektedir (Perea 1999, Fioretti 1993, Rahimi 2006). Bunun yanında bu anormal hemoglobine ilişkin farklı gensel kökenleri tanımlayan iki adet yeni haplotip türü de bildirilmiştir. Tayland' da beş aileyi kapsayan haplotip analizi çalışmasının verileri doğrultusunda, Hb D-Los Angeles'a ait yeni bir odak olan [- + + - + +] haplotipi tanımlanmıştır (Fucharoen 2002). Bir diğeri ise, Denizli yöresinde PAÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı tarafından yapılan çalışmada rapor edilmiştir. Bu çalışmanın sonucuna göre, Hb D-Los Angeles'a ait [- + - - + +] haplotipi, dünyada Akdeniz ve Tayland tipinden sonra bildirilen üçüncü farklı odak olma özelliğini taşımaktadır (Atalay 2007-a).

Tez çalışmamızda elde edilen bulgular incelendiğinde (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4), Denizli yöresindeki Hb D-Los Angeles olguları ve normal bireylere ait haplotip sıklıklarının sırası ile % 34.6 ve % 26.6 oranlarına sahip biçimde Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - + +] ile ilişkili olduğu saptanmıştır. Bununla beraber, Tablo 4.3' de ikinci sırada % 29.8 sıklıkla yer alan [- + + - + +] Tayland tipi haplotip ve üçüncü sırada % 12.5 sıklıkla [+ - - - - +] Haplotip VII olmak üzere Denizli yöresinin Hb D-Los Angeles mutasyonu ile ilişkili haplotip türleri tanımlanmıştır. Diğer taraftan, normal popülasyona ait haplotip çeşitlerine bakıldığında (Tablo 4.4), ikinci sırada % 14.6 sıklıkla [- + - + + +] Haplotip IX ve üçüncü sırada % 12.5 sıklıkla [+ - - - + -] Haplotip V yer almaktadır. Dünyada anormal hemoglobinlerin kökeni ve haplotip çeşitliliği ile ilgili yapılan çalışmalarda, bu anormal hemoglobinlerin Asya ve Afrika gibi bir merkezden, göç yolları ile ilişkilendirilerek yayıldığı varsayımı üzerinde durulmaktadır. Ancak yöremizdeki Hb D-Los Angeles ve haplotip çeşitliliğini konu alan tez çalışmamızda elde edilen veriler doğrultusunda,

normal popülasyonda ilk sırada yer alan Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - + +]' in aynı zamanda Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan popülasyonda da ilk sırada yer alması, bu mutasyonun yerel haplotip olan Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - + +] üzerinde işlergesi henüz bilinmeyen bir şekilde geliştiğini düşünmemize sebep olmaktadır. Buna ek olarak aynı Hb D-Los Angeles mutasyonunun dünyada bildirilen Tayland [- + + - + +] ve Türk [- + - - + +] tipi gibi iki farklı gensel kökeni gösteren haplotipler ile ilişkili olması, bu mutasyonun göçler ile yayıldığı varsayımını açık bir şekilde desteklemediği kuşkusunu taşınmaktadır. Bu kuşkunun nedeni, Asya kökenli olgulara ilişkin sadece Tayland bulgusunun varlığı, buna karşın Çin ve Hindistan olgularına ilişkin herhangi bir verinin henüz bilinmemesinden kaynaklanmaktadır.

Farklı bir örnek olarak, PAÜ Tıp Fakültesi Biyofizik Ana Bilim Dalı tarafından yapılmış ve henüz yayınlanmak üzere değerlendirme aşamasında olan bir çalışmada, yöremizde % 15.6 oranında bulunan Hb G-Coushatta [β 22(B4)Glu→Ala] anormal hemoglobininin gensel kökeni araştırılmış, bunun için haplotip analizi ve dizi analizi tekniği kullanılmıştır. Çalışmada, Hb G-Coushatta anormal hemoglobininin [- + - + + +] haplotip IX ile ilişkili olduğu belirlenmiştir. Ek olarak gensel köken çalışmalarında ayırıcı bir yöntem olan çerçeve analizi (*framework*) yapılarak, bu mutasyonun kodon 2' de CAC nükleotid dizilimi gösterdiği saptanmıştır. Hb G-Coushatta anormal hemoglobinin ilişkili olduğu Çin [- + + - + + ?] ve Amerikan Coushatta [- + - - + - ?] haplotipi olmak üzere iki farklı haplotip çeşidi bildirilmiştir. Aynı çalışmada, Çin Coushatta' sının kodon 2' de CAC, Amerikan Coushatta' sının ise CAT nükleotid dizilimini gösterdiği belirtilmiştir (Schneider 1964, Li 1999). Çalışmada ayrıca Çin ve Türk Coushatta' sı arasında IVS-II nükleotid 666' da C-T nükleotid farklılığı saptanmıştır (Atalay 2007-b). Bu veriler doğrultusunda, Denizli yöresinde saptanan Hb G-Coushatta anormal hemoglobini gensel köken açısından değerlendirildiğinde, daha önce tespit edilmiş iki farklı odak ile aralarında, tarihsel göç hareketleri ile ilişkilendirilebilecek herhangi bir gensel yakınlık saptanamamıştır.

Beta globin gen ailesinin 3' ucu tarafında delta (δ) ve beta (β) genleriyle ilişkili yaklaşık dokuz kilobaz uzunluğunda sıcak nokta (hot spot) olarak adlandırılan bölge, gen dönüşümü (*gene conversion*) ve yeniden düzenlenmiş yapılanma (*recombination*)

çalışmaları için bilgilendirici veri üretebilen bir odaktır. Çalışmamızda Hb D-Los Angeles'a ait Arlequin analizi sonuçlarına (Tablo 4.3) bakıldığında, sıcak nokta bölgesi ile ilişkili olan son iki odaktaki değişimler (Ava II ve Hinf I, Şekil 3.2), (1), (3) ve (4) numaralı haplotiplerin birbirlerinden farklı gensel kökeni temsil etmesine sebep olmaktadır. Bu haplotiplerin ilk beş odakları birbirleri ile tamamen aynı olmasına rağmen, son iki odakta yer alan farklılıklardan dolayı çeşitlenme göstermektedir. Tablo 4.3 deki (1), (3) ve (4) numaralı haplotiplerin son iki odakları dikkate alınmadığında bu üç haplotipin ortak sıklığı % 53.7' ye kadar yükselmektedir (Tablo 5.1). İlk beş odağın, Akdeniz kuşağı haplotip I [+ - - - + +] ile uyumluluk göstermesi ve normal popülasyonda da bu haplotipin ilk sırada yer alması (Tablo 5.2), bu çeşitliliğin herhangi bir göç olayından çok, işlergesi henüz bilinmeyen gensel bir değişimin, yerel popülasyon üzerinde çeşitliliğe neden olduğu kanısını akla getirmektedir. Hb D-Los Angeles mutasyonunun beta globin geni 121. kodonda yer alması, 3' haplotiplerin değişimine neden olan nokta mutasyonlar veya gen dönüşüm işlergeleri ile ilişkili olabileceği kanısı taşınmaktadır. Beta globin genlerinin 250 milyon yıllık molekül evrim süreci göz önüne alındığında (Hardison 1998), bu çeşitliliği sadece tarihsel göç yolları ile açıklamaya çalışmanın oldukça güç olduğu düşünülmektedir.

Tablo 5.1 Hb D-Los Angeles haplotip analizi sonuçları ve bazı haplotip çeşitleri.

Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan alleller ile ilişkili olan haplotipler							
No:	Hap lo tip	%	5' hap lo tip (ilk 5 odak)	%			
1	+ - - - - + +	34.6					
2	- + + - + + +	29.8					
3	+ - - - - - +	12.5	+ - - - -	53.7			
4	+ - - - - + -	6.5					
Hap lo tip Çeşitleri							
Hap lo tip	5'-ε Hinc II	Gγ Hind III	Aγ Hind III	5'-ψβ Hinc II	3'-ψβ Hinc II	5'-β Ava II	3'-β Hinf I
I	+	-	-	-	-	+	+
II	-	+	+	-	+	+	+
III	-	+	-	+	+	+	-
V	+	-	-	-	-	+	-
VII	+	-	-	-	-	-	+
VIII	-	+	-	+	-	+	-
IX	-	+	-	+	+	+	+

Tablo 5.2 Normal olgulara ait haplotip ilişkileri.

Normal olgulara ait alleller ile ilişkili olan haplotipler				
No:	Haplotip	%	5' haplotip (ilk 5 odak)	%
1	+ - - - - + +	26.6		
2	- + - + + + +	14.6		
3	+ - - - - + -	12.5		
4	- + + - + + +	6.2	+ - - - -	49.6
5	+ - - - - - -	5.4		
6	+ - - - - - +	5.1		

Tüm bu değerlendirmeler ışığında, anormal hemoglobinlerin, farklı coğrafyalarda farklı gensel köken yapıları göstermesi, bu mutasyonların göçlerle mi çeşitlendiği ve yayıldığı yoksa bilinmeyen bir takım çevresel faktörlerin mutasyon oluşum işlemlerini harekete geçirmesi sonucu mu oluştuğu sorusunu akla getirmektedir.

Sonuç olarak haplotip analizi çalışmalarının giderek yaygınlaşmasının, buna bağlı olarak gensel çalışmalar için veri üretmesi, antropolojik veriler oluşturabildiği gibi, aynı zamanda da mutasyonların oluşum işlemlerinin tartışılabilmesi ve bu noktadan hareketle olası gen tedavisi çalışmalarının yapılabilmesinde de, değerli katkılar sağlayabileceği düşünülmektedir.

6.KAYNAKLAR

- Aguileta, G., Bielawski, J.P., Yang, Z. (2004) Gene conversion and functional divergence in the β -globin gene family. **Journal of Molecular Evolution.**, 59: 177-189.
- Altay, Ç., (2002) Abnormal hemoglobins in Turkey. **Turkish Journal of Hematology.**, 19(1): 63-74
- Atalay, E.Ö., Atalay, A., Üstel, E., Yıldız, S., Öztürk, O., Köseleler, A. and Bahadır, A. (2007-**a**) Genetic origin of Hb-D Los Angeles[β 121(GH4)Glu→Gln, GAA→CAA] according to the β -globin gene cluster haplotypes. **Hemoglobin.**, Accepted 22 September 2006 (Yayınlanmak üzere kabul edilmiştir).
- Atalay, E.Ö., Öztürk, O., Köseleler, A., Atalay, A. (2007-**b**) Different genetics origins of a rare hemoglobin variant Hb G-Coushatta (Değerlendirilme aşamasındadır).
- Atalay, E.Ö., 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.
- Athanassiadou, A. (2004) Gene therapy for the haemoglobinopathies. **Journal of Cell and Molecular Biology.**, 3:1-7.
- 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., Perutz M.F. (1998) Allosteric mechanism of haemoglobin: rupture of salt-bridges raises the oxygen affinity of the T-structure. **Journal of Molecular Biology.**, 281: 581-585
- Bordbar, A-K., Mousavi, S.H-A. and Dazhampanah, H. (2006) Analysis of oxygen binding by hemoglobin on the basis of mean intrinsic thermodynamic quantities. **Acta Biochimica Polonica.**, 53(3): 536-568
- Chen, L.Z., Easteal, S., Board, G.P. and Kirk, R.L. (1990) Evolution of β -globin haplotypes in human populations. **Mol. Biol. Evol.**, 7(5): 423-437
- Curat, M., Trabuchet, G., Rees, D., Perin, P., Harding R.M., Celegg J.B.,

- Langaney, A. and Excoffier, L. (2002) Molecular analysis of the β -globin gene cluster in the Niokholo Mandenka population reveals a recent origin of the β^S Senegal mutation. **Journal of Human Genetic.**, 70: 207-223
- Çelebi G. (2005) Biyofizik Cilt 1. **Bariş Yayınları**, Üçüncü Baskı, İzmir, s 44-50.
- Excoffier, L. and Heckel, G.(2006) Computer programs for population genetics data analysis:a survival guide. **Nature Reviews Genetics**.Vol.7: 745-758
- Excoffier, L., Laval, G.,and Schneider, S. (2006).An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis, **Arlequin ver.3.1**(<http://cmgp.unibe.ch/software/arlequin31>)
- Falchi, A., Giovannoni, L., Vacca L., Latini, V., Vona, G. and Varesi L. (2005) β -globin gene cluster haplotypes associated with β -thalassemia on Corsica Island.**American Journal of Hematology.**, 78: 27-32
- Fioretti, G., Angioletti M.D., Pagano, L., Lacerna, G., Viola, A., Bonis, C.D., Scarallo, A. and Carestia, C. (1993) DNA polymorphisms associated with Hb D-Los Angeles [β 121(GH4) Glu→Gln] in Southern Italy. **Hemoglobin.**, 17(1): 9-17
- Fucharoen, S., Changtrakun, Y., Surapot, S., Fucharoen, G. and Sanchaisuriya, K. (2002) Molecular characterization of Hb D-Punjab [β 121(GH4) Glu→Gln] in Thailand. **Hemoglobin.**, 26(3): 261-269
- Globin Gene Server. WEB_1. (2007). <http://globin.cse.psu.edu/>. (28-01-2007).
- Hardison, R. (1998) Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. **The Journal of Experimental Biology.**, 201: 1099-1117
- Ho, P.J., Thein S.L. (2000) Gene regulation and deregulation: a β -globin perspective. **Blood Reviews.**, 14: 78-93
- Ho, P.J. (1999) The regulation of β -globin gene expression and β -thalassemia. **Pathology.**, 31: 315-324
- 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, USA (2007).Globin Gene Server. <http://globin.cse.psu.edu/html/huisman/variants/> (28-01-2007).

- Klug, W.S., Cummings, M.R. (2002) Hardy-Weinberg Kanunu, Genetik Kavramlar, Çev. Ed.: Öner, C. **Palme Yayıncılık.**, Ankara. s. 686-692
- Lajoie, M. and El-Mabrouk, N. (2005) Recovering haplotype structure through recombination and gene conversion. **Bioinformatics.**, 21(2): 173-179
- Levings, P.P. and Bungert J. (2002) The human β -globin locus control region. **Eur. J. Biochem.**, 269: 1589-1599
- Li, J., Wilson, D., Plonczynski, M., Harrell, A., Cook, C.B., Scheer, W.D., Zeng Y-T., Coleman, M.B., Steinberg, M.H. (1999) Genetic studies suggest a multicentric origin for Hb G-Coushatta [β 22(B4)Glu \rightarrow Ala]. **Hemoglobin.**, 23(1):57-67
- Papadakis, M.N., Patrinos G.P. (1999) Contribution of gene conversion in the evolution of the human β -like globin gene family. **Human Genetics.**, 104: 117-125
- Pehlivan, F. (2004) Biyofizik. **Hacettepe-Taş**, ikinci baskı, Ankara, s 264-266
- Perea, F.J., Casas-Castaneda, M., Villalobos-Arambula A.R., Barajas, H., Alvarez, F., Camacho, A., Hermosillo, R.M. and Ibarra B. (1999) Hb D-Los Angeles associated with Hb S or β -thalassemia in four Mexican Mestizo families. **Hemoglobin.**, 23(3): 231-237
- Perutz, M.F. and Lehmann H. (1968). Molecular pathology of human hemoglobin. **Nature.**, 219: 902
- Rahimi, Z., Akramipour, R., Nagel, R.L., Ahmadi, A.S., Merat, A. and Bahrehmand, F. (2006). The β -globin gene haplotypes associated with Hb D-Los Angeles [β 121(GH4) Glu \rightarrow Gln] in Western Iran. **Hemoglobin.**, 30(1): 39-44
- Schneider, J.A., Peto T.E.A., Boone, R.A., Boyce, A.J. and Clegg J.B. (2002). Direct measurement of the male recombination fraction in the human β -globin hot spot. **Human Molecular Genetics.**, 11(3): 207-215
- Schneider, R.G., Haggard, M.E., McNutt, C.W., Johnson, C.W., Bowman, J.E. and Barnett, D.R. (1964). Hemoglobin G-Coushatta: a new variant in an American Indian family. **Science.**, 143:197
- Üstel E., Anormal hemoglobinlerin SPR yöntemi ile gen düzeyinde tanısı. Yüksek lisans tezi. **Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.** Denizli. 2006
- Wada, Y. (2002). Advanced analytical methods for hemoglobin variants. **Journal of Chromatography B.**, 781: 291-301

- Weatherall, D.J., Clegg, J.B. (2001) Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, 79(8): 704-712.
- Weir, B.S., Anderson, A.D. and Hepler, A.B. (2006). Genetic relatedness analysis: modern data and new challenges. **Nature Reviews Genetics.**, 7: 771-780
- Yıldız, S., Atalay, A., Bağcı, H., Atalay, E.Ö. (2005). Beta- thalassemia mutations in Denizli province of Turkey. **Turkish Journal of Heamotology.**, 22(1): 19-23

7. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Manisa' da doğdum. İlkokul eğitimimi Edirne' de, ortaokul ve lise eğitimimi Denizli' de tamamladım. Pamukkale Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fizik Bölümü lisans programından 2004 yılında mezun oldum. Aynı yıl, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı' nda özel öğrenci statüsünde eğitim aldım ve 2005 yılında yüksek lisans programına başladım.