



**SPR YÖNTEMİ İLE H_b D-LOS ANGELES' IN
GEN DÜZEYİNDE TANISI**

Ceylan AYADA

**Aralık 2006
DENİZLİ**

**SPR YÖNTEMİ İLE Hb D-LOS ANGELES'İN
GEN DÜZEYİNDE TANISI**

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

Ceylan AYADA

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Ayfer ATALAY

**Aralık 2006
DENİZLİ**

TEŞEKKÜR

Tez çalıřmam sűresince bana her tűrlű desteęi veren deęerli tez danıřmanım Yrd. Doç. Dr. Ayfer ATALAY ve anabilim dalımız bařkanı Prof. Dr. Erol Őmer ATALAY' a çok teőekkűr ederim. Çalıřmalarım boyunca desteklerini esirgemeyen tűm çalıřma arkadařlarım teőekkűrű bir borç bilirim. Hayatımın her anında daima madden ve manen benimle beraber olan ve bana yařama gűcű veren sevgili annem ve ablam bařta olmak űzere tűm aileme minnetlerimi sunarım.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırmalarının yapılması ve bulgularının analizlerinde 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 : Ceylan AYADA

ÖZET

SPR YÖNTEMİ İLE Hb D-LOS ANGELES' IN GEN DÜZEYİNDE TANISI

Ayada, Ceylan
Yüksek Lisans Tezi, Biyofizik ABD
Tez Danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Ayfer Atalay

Aralık 2006, 38 sayfa

Anormal hemoglobinler ve talasemiler, ülkemizde ve dünyada rastlanan en önemli kalıtsal sorunlardan birini oluşturmaktadır. Bu sorun gen kaynaklı olduğu için, hasta bireylerin doğmasını önlemek amacıyla evlilik öncesi tarama çalışmaları yapılmaktadır. Denizli yöresinde yapılan evlilik öncesi tarama çalışmalarında çeşitli anormal hemoglobin türlerinin varlığı saptanmıştır. Yöremizde Hb G-Coushatta, Hb D-Los Angeles türü anormal hemoglobinler beklenenden daha yüksek oranda bulunmaktadır. Bu hemoglobin türleri, evlilik öncesi tarama ve tanımlama çalışmalarında Hb S ile sıklıkla karıştırılabilmektedir.

SPR spektroskopisi, birbiri ile ilişkili moleküller arasındaki etkileşimin incelenebilmesinde, radyoaktif yada non-radyoaktif madde gibi herhangi bir işaretleyiciye gereksinim duyulmaksızın biyofiziksel çalışmaların yapılabilmesini sağlayan gerçek zamanlı bir biyosensör türüdür.

Bu tez çalışmasında, anormal bir hemoglobin olan Hb D-Los Angeles model olarak kullanılıp, SPR yöntemi ile gen düzeyinde tanısının yapılması amaçlanmıştır. Elde edilen veriler doğrultusunda SPR spektroskopisinin, anormal hemoglobinlerin hızlı ve ucuz tanısına yönelik aday bir yöntem olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Anormal hemoglobinler, SPR spektroskopisi, Mutasyon analizi, Hb D-Los Angeles

ABSTRACT**SPR BASED DIAGNOSIS OF Hb D-LOS ANGELES AT GENE LEVEL**

Ayada, Ceylan
M. Sc. Thesis in Biophysics
Supervisor: Yrd. Doç. Dr. Ayfer Atalay

December 2006, 38 pages

Abnormal hemoglobins and thalassemias are one of the most important genetic diseases observed in the world population as well as in Turkey. Since the problem is in genetic level, premarital screening programs are necessary for the prevention of these diseases leading to prenatal diagnostic approaches. In Denizli province of Turkey, many different abnormal hemoglobins, especially Hb D-Los Angeles, Hb G-Coushatta and Hb S are observed in premarital screening program. The molecular diagnosis of these abnormal hemoglobins has some difficulties due to their similar electrophoretic and chromatographic properties.

SPR spectroscopy is a real-time biosensor which does not require any labelling system for the identification of biologically interacting molecules.

The aim of this thesis is to diagnose the Hb D-Los Angeles mutation at gene level by using SPR approach. According to our results, SPR approach merits for the molecular detection of abnormal hemoglobins in premarital screening programs as a quick and cheap testing system.

Keywords: Abnormal hemoglobins, SPR spectroscopy, Mutation analysis, Hb D-Los Angeles

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 molekülünün yapısı ve işlevi | 2 |
| 2.2 Hemoglobin sentezi ve hemoglobin tipleri | 5 |
| 2.3 Anormal hemoglobinler ve talasemiler | 8 |
| 2.3.1 Türkiye’de anormal hemoglobinler ve talasemiler | 9 |
| 2.3.2 Denizli yöresinde anormal hemoglobinler ve talasemiler | 11 |
| 2.4 Hemoglobin bozukluklarını tayin etme yöntemleri | 12 |
| 2.4.1 Protein düzeyinde yapılan çalışmalar | 12 |
| 2.4.2 Gen düzeyinde yapılan çalışmalar | 12 |
| 2.4.2.1 Restriksiyon enzim kesim yöntemleri | 13 |
| 2.5 SPR (<i>Surface Plasmon Resonance</i>)..... | 14 |
| 3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER | 19 |
| 3.1 Genomik DNA İzolasyonu | 19 |
| 3.2 Beta globin gen bölgesinin PCR yöntemi ile çoğaltılması | 20 |
| 3.3 PCR ürünlerinin saflaştırılması | 22 |
| 3.4 SPR Analizi | 22 |
| 3.4.1. CM Dekstran (Karboksimetil Dekstran) Küvetin Aktive Edilmesi ve Eco RI ile kaplanması..... | 23 |
| 3.4.2 Eco RI kaplı küvete biotinli PCR ürününün gönderilmesi | 24 |
| 4. BULGULAR | 25 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇ | 30 |
| 6. KAYNAKLAR | 35 |
| 7. ÖZGEÇMİŞ | 38 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | SAYFA |
|--|--------------|
| Şekil 2.1 a) Deoksi hemoglobindeki Fe-Hem düzlem ilişkisi | |
| b) Oksi hemoglobindeki Fe-Hem düzlem ilişkisi | 4 |
| Şekil 2.2 16. ve 11. kromozomlarda yer alan globin gen bölgeleri, farklı yaşam dönemlerindeki ürünleri | 6 |
| Şekil 2.3 İnsanda yaşamın farklı dönemlerinde hemoglobin alt birimlerinin sentezi | 7 |
| Şekil 2.4 Hb D-Los Angeles örneğinde Eco RI enzim kesimi | 14 |
| Şekil 2.5 Evanescence alan | 17 |
| Şekil 2.6 IAsys SPR şeması | 17 |
| Şekil 2.7 SPR spektroskopisinden elde edilen bağlanma ve ayrılma kinetik eğrileri | 18 |
| Şekil 4.1 CM Dekstran küvete Eco RI kaplanması (1. aşama)..... | 25 |
| Şekil 4.2 Normal hemoglobin dizisi içeren PCR ürününün Eco RI ile etkileşimi (2. aşama) | 26 |
| Şekil 4.3 Normal hemoglobin dizisi içeren PCR ürünü eklenen çalışma için işlenmiş sonuçlar (2. aşama)..... | 26 |
| Şekil 4.4 Heterozigot Hb D-Los Angeles hemoglobin dizisi içeren PCR ürününün Eco RI ile etkileşimi (3. aşama)..... | 27 |
| Şekil 4.5 Heterozigot Hb D-Los Angeles anormal hemoglobin dizisi içeren PCR Ürünü eklenen çalışma için işlenmiş sonuçlar (3. aşama)..... | 27 |
| Şekil 4.6 Heterozigot Hb D-Los Angeles hemoglobin dizisi içeren PCR ürününün Eco RI ile etkileşimi (4. aşama)..... | 28 |
| Şekil 4.7 Heterozigot Hb D-Los Angeles anormal hemoglobin dizisi içeren PCR Ürünü eklenen çalışma için işlenmiş sonuçlar (4. aşama)..... | 28 |
| Şekil 4.8 Heterozigot Hb D-Los Angeles hemoglobin dizisi içeren PCR ürününün Eco RI ile etkileşimi (5. aşama)..... | 29 |
| Şekil 4.9 Heterozigot Hb D-Los Angeles anormal hemoglobin dizisi içeren PCR Ürünü eklenen çalışma için işlenmiş sonuçlar (5. aşama)..... | 29 |

TABLO DİZİNİ

| | SAYFA |
|---|--------------|
| Tablo 2.1 İnsanda bulunan hemoglobin çeşitleri, alt birim yapıları ve var oldukları hayat dönemleri | 8 |
| Tablo 2.2 Türkiye’de saptanan anormal hemoglobin türleri | 10 |
| Tablo 2.3 Denizli yöresinde evlilik öncesi çalışmalarda saptanan anormal hemoglobinler | 11 |
| Tablo 3.1 PCR karışımı | 21 |
| Tablo 3.2 PCR yöntemindeki primerlerin baz dizileri | 21 |
| Tablo 3.3 PCR koşulları | 21 |
| Tablo 3.4 Biotinli PCR örneklerinin derişimi | 22 |

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------|---|
| ARMS | Allele özgü amplifikasyon yöntemi |
| CMD | Karboksimetil dekstran |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| dNTP | Deoksiribonükleotid trifosfat |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid |
| EDTA | Etilendiamin tetraasetikasit |
| HPLC | Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi |
| NHS | N-hidroksisüksinimid |
| PBS | Fosfatlı tuz tamponu |
| PBS/T | Tween 20 içeren fosfatlı tuz tamponu |
| PCR | Polimeraz zincir reaksiyonu |
| RFLP | Restriksiyon fragmenti uzunluk polimorfizmi |
| SDS | Sodyum dodesil sülfat |
| SNP | Tek nükleotid polimorfizmi |
| SPR | Yüzey plazmon rezonans |
| STE | Tuz-Tris-Etilendiamin tetraasetikasit |
| Chan | Kanal |

1. GİRİŞ

Dünyada olduğu gibi ülkemizde de sıklıkla rastlanan hemoglobin bozuklukları, en önemli kalıtsal sorunlardan birini oluşturmaktadır. Bu nedenle, kalıtsal hastalıkların molekül düzeyde tanımlanmasına yönelik çalışmalarda hemoglobin, önemli ve iyi bir model olarak kullanılabilir. Hemoglobin bozukluklarının nedeni, genlerde meydana gelen mutasyonlar olduğu için, hasta bireylerin doğmasının engellenmesi günümüzde uygulanan tek önemli girişim olarak değerlendirilmektedir. Bu amaçla, dünyada ve ülkemizde hemoglobinopati kontrol programları uygulanmaktadır. Kontrol programlarının ilk basamağını, bireylerin hemoglobin bozuklukları açısından molekül düzeyde kimliklendirilmesi oluşturmaktadır. İkinci aşamada ise, taşıyıcı bireylerin evlilikleri sonucunda doğabilecek hasta kişilerin, doğum öncesi tanı yöntemleri ile tespit edilmesi amaçlanmaktadır. Denizli İl Sağlık Müdürlüğü verilerine göre, Denizli yöresindeki beta-talasemi ve anormal hemoglobin sıklığı % 3,5 olarak bildirilmektedir. Ayrıca son yapılan çalışmalarda tarih boyunca göçler nedeniyle Denizli yöresindeki anormal hemoglobine neden olan mutasyonlarının çeşitliliği gösterilmiştir. Bu nedenle, yöremizde hemoglobinopati kontrol programı çerçevesinde uygulanacak olan tanı çalışmaları, halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır.

Hemoglobin bozukluklarının tanısı için yapılan çalışmalar, protein ve gen düzeyinde olmak üzere iki ana başlık altında toplanabilmektedir. Günümüzde uygulanan gen düzeyindeki çalışmalar; işaretleyici kullanımı ve uzun çalışma süreleri gerektirmesi gibi sorunları beraberinde getirmektedir. Özellikle, doğum öncesi tanı aşamasında yapılan çalışmaların hızlı ve elde edilen verilerin güvenilir olması çok büyük önem taşımaktadır.

SPR spektroskopisi ile, enzim yada radyoaktif madde gibi bir işaretleyiciye gereksinim duyulmadan, molekül etkileşimlerin doğası hakkında daha kesin veriler elde edilmektedir. SPR spektroskopisi kullanarak, DNA-protein etkileşimi temeline dayalı olarak planlanan çalışmada, model olarak seçilen anormal hemoglobin mutasyonunun, gen düzeyinde ayırıcı tanısının yapılabilmesi için hızlı ve güvenilir bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmektedir.

2. Genel Bilgi:

2. 1. Hemoglobin molekülünün yapısı ve işlevi:

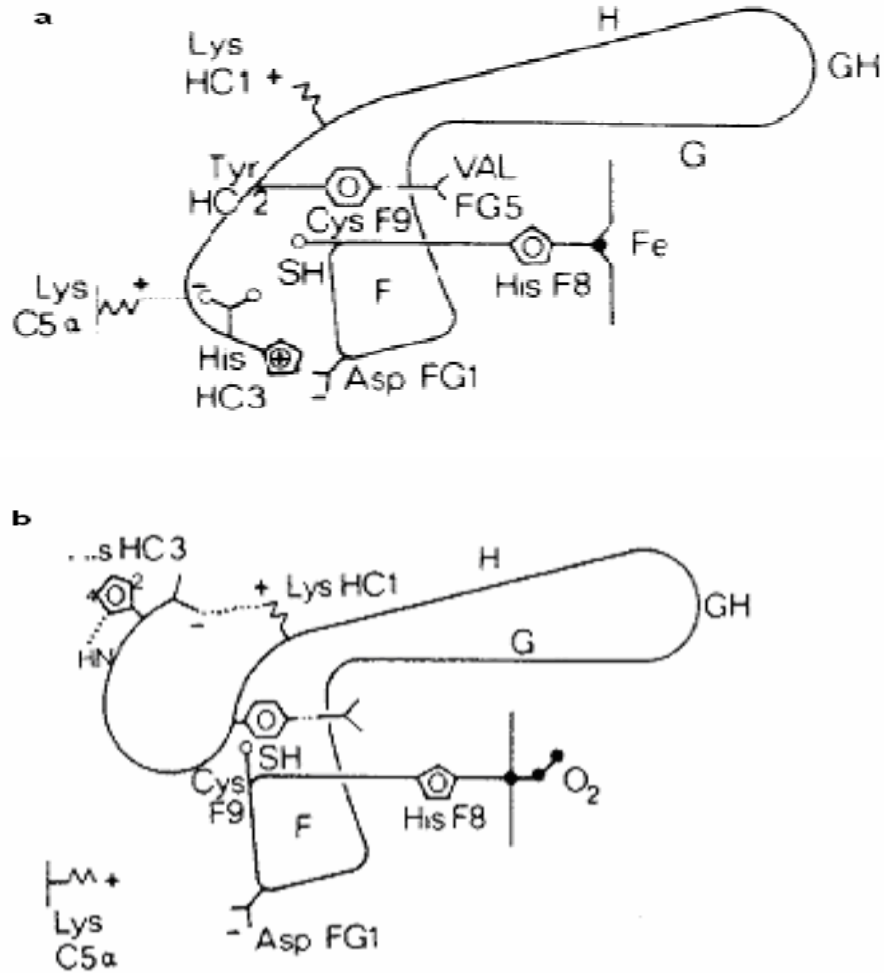
Yüksek organizasyonlu canlılar, atmosferde %21 oranında bulunan oksijeni kullanarak, besin maddelerinden ihtiyaç duydukları enerjiyi elde edebilmek için, güçlü oksitleme mekanizmaları bulundurmaktadırlar. Bu canlılarda, atmosferden alınan oksijenin kullanılacağı yere taşınması dolaşım sistemi tarafından gerçekleştirilmekte, oksijeni taşıyan molekül sistemini ise hemoglobin oluşturmaktadır. Hemoglobin molekülü, oksijen yoğunluğunun yüksek olduğu ortamda oksijeni bağlamakta, oksijen yoğunluğunun düşük olduğu ortamda ise oksijenden ayrılabilir. Bu özelliğinden dolayı hemoglobin molekülü, dokulara oksijen taşınmasında etkin bir taşıyıcı sistemi oluşturmaktadır (Bermek 1997).

Hemoglobin molekülü, dördüncül yapısı tamamen açıklanan ilk oligomerik protein olarak bilinmektedir. Molekül ağırlığı 66.000 dalton olan hemoglobin molekülü, demir bağlayan ve her biri yaklaşık 16.500 dalton molekül ağırlığına sahip polipeptit yapısındaki dört globin zinciri tarafından oluşturulmaktadır (Bermek 1997, Mario 1998). Bir hemoglobin molekülü iki farklı tipteki globin zincirlerinden her birinin iki tanesinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Bu globin zincirleri normal yetişkin hemoglobin tipinde alfa (α) ve beta (β) adlarını almakta, farklı hemoglobin çeşitlerini oluşturan farklı globin zincirleri bulunmaktadır. Globin zincirleri, aralarında bulunan non-kovalent etkileşimler sayesinde üç boyutlu şekilde yapılabilmektedirler (Ho 2000). Benzer globin zincirlerinin (alfa-alfa, beta-beta) değme noktalarında az, benzer olmayan globin zincirlerinin (alfa-beta) değme noktalarında ise çok sayıda non-kovalent etkileşim bulunmaktadır. Globin zincirleri arasındaki en uzun değme noktasını, alfa-1 ve beta-1 arasında yer alan, 34 amino asit uzunluğundaki B, G, H heliks bölgeleri oluşturmaktadır. Bunun yanında, alfa-1 ve beta-2 arasındaki değme bölgesinde 19 amino asit bulunmaktadır (Perutz 1968, Briehl 1978, Finch 1973, Perutz 1968, Sodeman 1974, Huisman 1976). Hemoglobin molekülünü oluşturan her bir polipeptit zincirinde bulunan amino asitler, polar olanları molekülün dışında, polar olmayanları molekülün içinde olacak şekilde yerleşim göstermektedir. Bu şekilde yapılan hemoglobin molekülü, sulu bir ortam olan kan içerisinde çözünürlük özelliği gösterebilmektedir (Bermek 1997, Perutz 1968, Briehl 1978, Finch 1973, Perutz 1968, Sodeman 1974, Huisman 1976).

Felix Haurowitz, 1937 yılında oksijenli ve oksijensiz hemoglobinlerin kristal yapılarında farklılıklar gözlemlemiş, daha sonra ise Perutz ve arkadaşları X-ışınları kristalografisi yöntemi ile ilk kez 1959 yılında, hemoglobin molekülünün kristal yapısını tamamen açıklamışlardır. Çalışmalar sonucunda,oksi ve deoksi hemoglobinlerin üçüncül ve dördüncül yapıları arasında belirgin farklılıkların olduğu bulunmuştur. Gözlenen bu farklılıklar, alfa alt biriminin C-terminalindeki arjinin amino asitleri ile beta alt biriminin C-terminalindeki histidin amino asitleri arasında bulunan tuz köprülerinden kaynaklanmaktadır. Deoksi hemoglobin molekülü, dört alt birimin C-terminallerindeki amino asitler arasında bulunan tuz köprüleri tarafından baskı altında tutulmakta ve gergin bir yapı göstermektedir. Gergin yapı, hemoglobindeki oksijen bağlanma bölgeleri olan hem oyuklarının üç boyutlu yapısını etkileyerek, oksijenin hem grupları ile etkileşimini zorlaştırmaktadır. Oksijen moleküllerinin bağlanması sonucunda, globin zincirlerinin üç boyutlu yapısında değişiklikler meydana gelmekte ve zincirler arasındaki tuz köprüleri yıkılmaktadır. İki beta zincirinin hem grupları birbirlerinden uzaklaşırken, alfa zincirindeki hem grupları birbirlerine yaklaşmaktadır. Bu nedenle,oksi hemoglobin gevşek bir yapı göstermektedir. Gevşek yapıdaki hemoglobin alt birimlerinin, oksijen ilginlikleri benzer hale gelmekte ve artmaktadır. Bu tür bir yapılanma sonucunda genel olarak, oksijenin hemoglobine bağlanması kolaylaşmaktadır (Bermek 1997, Bettati 1998).

Hemoglobin molekülünün, oksijen taşınmasını sağlayan, düzlemsel bir protoporfirin halkasından ve bu halkanın ortasında bulunan bir iki değerlikli demir (Fe^{+2}) atomundan oluşan hem grupları, yapılarında bulunan demir atomları sayesinde oksijen bağlayabilmektedirler. Her bir globin zinciri, hidrojen bağları aracılığıyla bir hem grubu ile ilişki kurmaktadır. Bu nedenle, bir hemoglobin molekülünün oksijen bağlayabileceği dört aktif bölgesi bulunmaktadır (Bermek 1997, Perutz 1968, Briehl 1978, Finch 1973, Perutz 1968, Sodeman 1974, Huisman 1976, Çelebi 2005). Hem grupları, polipeptit zincirinin oluşturduğu küresel yapının dışında polar olmayan amino asitlerin çevrelediği hidrofobik oyuğa yerleşmekte ve hemoglobin molekülünün yüzeyinde olabilecek en uzak noktalarda bulunmaktadır. Oksijen molekülünün Fe^{+2} iyonuna bağlanıp bağlanmamasına göre demir, yapmış olduğu 1 Å' luk kaymalar sonucunda, bağlı olduğu histidin grubunun da hareketine ve tüm globin zincirlerinin üç boyutlu yapısının değişmesine neden olmaktadır (Şekil 2.1). Globin zincirlerinin yapısında meydana gelen bu değişiklik, hemoglobin molekülünün O_2 ile olan etkileşiminde büyük önem

taşımaktadır. Hemoglobin molekülünün oksijen ile bağlanmasında önemli rol oynayan globin zincirlerinin temas noktalarını oluşturan amino asitlerin evrim boyunca değişmemiş oldukları bilinmektedir (Bermek 1997).



Şekil 2.1 a- Deoksi hemoglobindeki Fe-Hem düzlem ilişkisi

b- Oksi hemoglobindeki Fe-Hem düzlem ilişkisi (Bettati 1998)

Hemoglobin molekülünün oksijen ile bağlanması sırasında, üç boyutlu yapısında meydana gelen değişikliklere bağlı olarak gerçekleşen olayların tümüne, işbirlikli (kooperasyon) oksijen bağlanması adı verilmektedir (Bermek 1997, Çelebi 2005). Benzer durum, oksijenin hem gruplarından ayrılması sırasında da gerçekleşmektedir. Hem grupları arasındaki bu özellik nedeniyle hemoglobinin oksijen bağlama derecesi (doymuşluk derecesi), oksijen kısmi basıncı değişikliklerine bağlıdır (Çelebi 2005). Bu etkileşim sonucunda, hemoglobinin O_2 doyum eğrisi, S biçiminde (*sigmoidal*) bir grafik oluşturmaktadır. Bu eğri, düşük kısmi O_2 basıncında hemoglobinin O_2 ' ne olan

ilginliğinin az, yüksek kısmi O₂ basıncında ise hemoglobinin O₂'ne olan ilginliğinin fazla olduğunu göstermektedir (Bermek 1997). H⁺ iyonları, CO₂ ve bazı organik fosfat bileşikleri oksijenin bağlandığı bölgeler dışında hemoglobine bağlanarak, hemoglobinin molekül yapısında değişikliklere neden olmakta ve hemoglobinin oksijene olan ilginliğini etkileyerek, oksijen bağlanma eğrisinde sağa veya sola kaymalara neden olmaktadır (Çelebi 2005).

2.2. Hemoglobin sentezi ve hemoglobin tipleri:

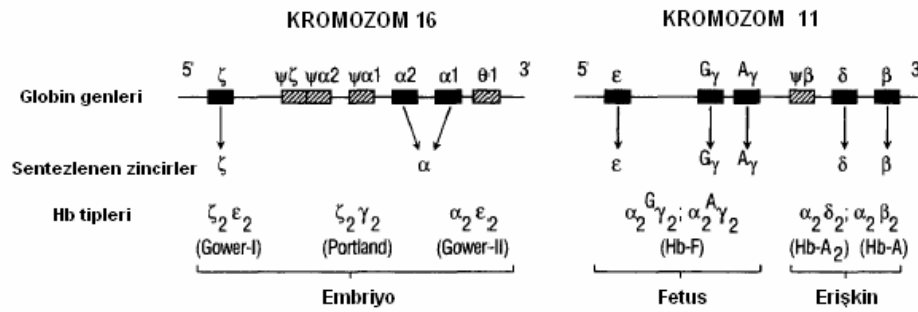
Hem grubu ve globin zincirlerinin ortak üretimine bağlı olarak hemoglobin sentezi gerçekleşmektedir. Eritrosit öncüllerinde, hem grubu, mitokondri ve sitoplazma kısımlarında sentezlenmektedir. Olgun eritrositler mitokondri içermedikleri için hem grubunu sentezleyememektedirler (Yüregir 1990).

Normal erişkin hemoglobin molekülünün protein kısmını oluşturan alfa ve beta globin zincirleri, globin genlerinin ürünleri olarak sentez edilmektedirler. Globin genleri, genel olarak aynı yapısal özellikleri göstermektedirler. İnsan globin genleri; üç ekzon, iki intron, 5' ve 3' uçlarında ise gen ifadesini düzenleyici bölgeler içermektedirler (Weatherall 2001).

İnsan 16. kromozomunun kısa kolunda 40 kilobaz uzunluğundaki DNA bölgesine alfa gen ailesi yerleşmiştir. Alfa globin gen ailesi içinde yer alan yetişkin ve fetal dönemde 141 amino asitten oluşan alfa globin zincirlerinin sentezlenmesinden sorumlu olan alfa globin genleri, 3' ucunda iki kopya halinde yer almakta, alfa 2 (α_2) ve alfa 1 (α_1) olarak adlandırılmaktadır. Her iki genden, aynı yapısal özelliklere sahip olan ürünler sentez edilmekte ve hemoglobin A, A₂, F'in yapısına katılmaktadır. Embriyonik dönemin ilk birkaç haftasında sentezlenen Gower-1, Gower-2 ve Portland adı verilen hemoglobinlerin yapısına alfa globin gen ailesi içinde yer alan zeta 1 (ζ_1) ile zeta 2 (ζ_2) gen ürünleri katılır (Şekil 2.2) (Huisman 1997).

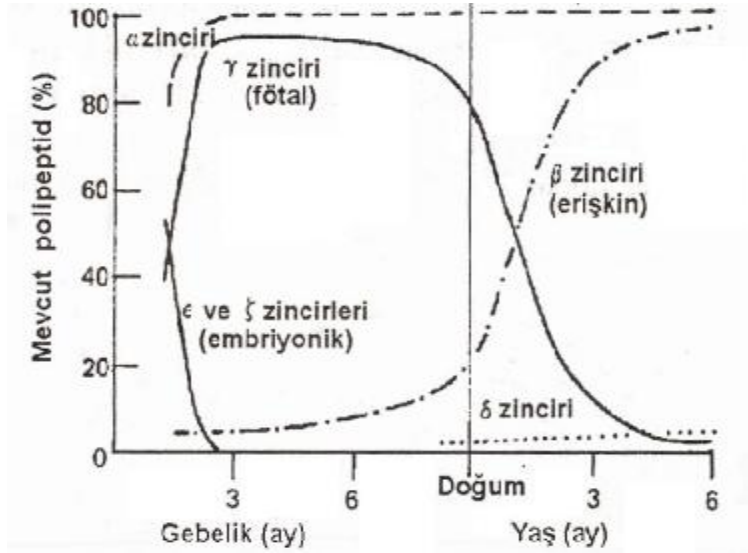
Beta globin gen ailesi 11. kromozomun kısa kolu üzerinde 60 kilobaz uzunluğundaki DNA bölgesine yerleşmiştir. Bu gen ailesinde yer alan işlevsel genlerin ürünleri 146 amino asit uzunluğunda olup, 5' ucundan başlayarak 3' ucuna doğru embriyonal dönemden yetişkin döneme doğru gelişim boyunca sırayla ifade

edilmektedir. Şekil 2.2' de gösterildiği gibi beta globin gen bölgesinin 5' ucunda yer alan, döllenen sonra ilk on iki hafta içinde ifade edilen ve embriyonik gen olarak adlandırılan epsilon gen ürünü hemoglobin Gower-I ($\zeta_2\epsilon_2$) ve Gower-II ($\alpha_2\epsilon_2$)' nin yapısına katılmaktadır. Fötal evrede ifade edilen gama G ve gama A gen ürünleri hemoglobin Portland ve hemoglobin F ($\alpha_2\gamma_2$)' nin yapısına katılmaktadır. Gama G ve gama A genleri arasındaki farklılık, gama G globin zincirinin 139. amino asitinin glisin olması, gama A globin zincirinde ise aynı pozisyonda alanin içermesinden kaynaklanmaktadır. Beta globin gen ailesi sonunda yer alan delta ve beta genleri yetişkin dönemde ifade edilmektedir. Bu genlerin ürünleri ise normal yetişkin hemoglobinleri olan hemoglobin A₂ ($\alpha_2\delta_2$) ve A ($\alpha_2\beta_2$)'nin yapısına katılmaktadır (Huisman 1997).



Şekil 2.2 16. ve 11. kromozomlarda yer alan globin gen bölgeleri, farklı yaşam dönemlerindeki ürünleri (Siyah kutular fonksiyonel gen bölgelerini temsil etmektedir) (Huisman 1997).

Gelişim boyunca, globin genlerinin ifadesinin düzenlenmesi, globin değişikliği (*globin switching*) olarak adlandırılmakta ve gelişimsel gen ifadesinde klasik örnek olarak gösterilmektedir. İki globin zincirine ait genler, 5' ucundan 3' ucuna doğru gelişim boyunca sırayla ifade edilmektedir. Gelişime bağlı olarak ifade edilen zincirlerin birbirlerine oranları Şekil 2.3' de gösterilmektedir. Bu ifade sonucu alfa, beta ve benzeri genlerin ürünleri dengeli miktarda üretilmektedir. Globin genlerinin sırayla ifade edilmesi aşamalarında, eritropoiezin gerçekleştiği organlar değişmektedir (Ganong 1985).



Şekil 2.3 İnsanda yaşamın farklı dönemlerinde hemoglobin alt birimlerinin sentezi (Ganong 1985).

Döllenmenin 3. ve 8. haftalarında, eritropoiez sarı kesede (*yolk sac*) meydana gelmektedir. Bu dönemde sırasıyla; Gower-I, Gower-II, Portland hemoglobinleri sentezlenmektedir. Döllenmenin yaklaşık 5. haftasından itibaren, eritropoiez embriyonik karaciğerde gerçekleşmeye başlar. İstisnalar olmakla beraber, döllenmeden sonra on ikinci haftadan itibaren fötal eritrositlerde hemoglobin F sentezi görülür. Fötal hemoglobinde bulunan γ -zincirlerinin, hemoglobin A'daki beta globin zincirlerindeki histidin grupları yerine serin grupları taşınması, hemoglobin F' nin oksijene olan ilgini artırır. Hemoglobin F' nin bu özelliği, düşük kısmi oksijen basıncında yaşayan fötusa gerekli oksijenin sağlanmasında katkıda bulunur. Doğumdan sonra gama globin zincirinin sentezi azalırken, beta globin zincirinin sentezi artmaktadır. Bu değişime rağmen doğumdan yedi-sekiz ay sonrasına kadar hemoglobin F, önemli miktarda sentezlenmeye devam etmektedir. Ancak HPFH (*Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin*) olarak adlandırılan durumda, γ -globin zincir sentezi doğumdan sonra azalmadan devam etmekte ve buna bağlı olarak Hb F miktarı normal değer üzerinde tespit edilmektedir (Ganong 1985).

Normal yetişkin hemoglobini olan hemoglobin A ($HbA: \alpha_2\beta_2$), iki alfa ve iki beta globin zincirinden meydana gelmektedir. Hemoglobin A, doğumdan sonra on sekiz ile yirmi dört hafta içinde temel hemoglobin konumunu almaktadır. Bir diğer yetişkin hemoglobin türü olan hemoglobin A₂ ($HbA_2: \alpha_2\delta_2$) iki alfa ve iki delta globin

zincirinden oluşmaktadır. Hemoglobin A₂, normal yetişkinlerde toplam hemoglobinlerin, ortalama % 3-3,5'ini oluşturmaktadır (Ganong 1985). Hemoglobin A₂ miktarının ölçülmesi, β -talasemi tespitinde yol gösterici bir ön tanı olarak kullanılmaktadır. İnsanda bulunan hemoglobin tipleri, alt birim yapıları ve var oldukları hayat dönemleri Tablo 2.1' de özet halinde verilmiştir.

Tablo 2.1 İnsanda bulunan hemoglobin çeşitleri, alt birim yapıları ve var oldukları hayat dönemleri (Çelebi 2005)

| Hemoglobin Tipi | Alt birimleri | Varolduğu Hayat Dönemi |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------|
| Portland | $\zeta_2\gamma_2$ | Erken fetal dönem |
| Gower-I | $\zeta_2\varepsilon_2$ | Erken fetal dönem |
| Gower-II | $\alpha_2\varepsilon_2$ | Erken fetal dönem |
| F | $\alpha_2\gamma_2$ | Geç fetal dönem |
| A | $\alpha_2\beta_2$ | Normal yetişkindeki baskın tip |
| A ₂ | $\alpha_2\delta_2$ | Normal yetişkindeki % 2' si |

2. 3. Anormal hemoglobinler ve talasemiler:

Globin genlerinde oluşabilecek değişimlere bağlı olarak ortaya çıkan kalıtsal hemoglobin bozuklukları, iki ana başlık altında toplanabilmektedir. Bunlardan biri hemoglobin molekülünün yapısal bozukluklarını kapsamakta ve anormal hemoglobinler adını almaktadır. Diğer hemoglobin bozukluklarını ise, globin zincirlerinin üretilmemesi veya normalden az üretilmesi sonucu oluşan talasemiler oluşturmaktadır (Tuzmen 2001, Old 2003). Dünyada yaygın bir şekilde gözlenen hemoglobin bozukluklarının sıklığı, Dünya Sağlık Örgütü (WHO: *The World Health Organization*) tarafından yaklaşık %5,1 olarak bildirilmiştir (Arcasoy 2003).

Hemoglobin molekülünü oluşturan globin zincirlerinin amino asit dizilimlerini kodlayan genlerde oluşabilecek mutasyonlar, hemoglobin molekülünün yapısında ve/veya işlevinde değişikliklere neden olabilir (Tuzmen 2001, Hardison 1998). Pauling tarafından 1949 yılında Hb S' nin keşfinden bu yana, dünyada yaklaşık 900' ün üzerinde anormal hemoglobin türü belirlenmiş bulunmaktadır (Tuzmen 2001,

Sanchaisuriya 2004, Ou 2001, Wajcman 2001). Bu nedenle anormal hemoglobinler, coğrafik veya etnik olarak sınıflandırılmaktadır (Tuzmen 2001). Örneğin, Hb D Los Angeles, ilk kez Pencap'ta keşfedildiği için Hb D Punjab olarak da adlandırılmıştır. Daha sonra bu hemoglobinin Hindistan, Pakistan, İran, İngiltere, Hollanda, Avustralya, Yunanistan, Yugoslavya, Çin ve Türkiye' de de bulunduğu bildirilmiştir (Altay 2002, Yıldız 2005, Atalay 2005).

Globin genlerindeki mutasyon nedeniyle globin zincirlerinin normalden az üretilmesi veya hiç üretilmemesi talasemi adı verilen hastalığın temelini oluşturmaktadır (George 2004). Talasemi kelimesi Yunanca "denize ait" anlamını taşımaktadır. İlk kez 1927 yılında, Cooley tarafından Yunan, İtalyan ve Suriyeli kişilerde tanımlanan talasemi hastalığı, bu nedenle önceleri Cooley veya Akdeniz anemisi olarak ifade edilmekteydi. Günümüzde dünyanın her yerinde talasemi hastalığı bildirilmiştir. (Arcasoy 2003, Nienhuis 1984). Talasemilerde dengeli bir şekilde üretilmeyen globin zincirleri, hemoglobinin kararlı tetramer yapısının oluşumunu engellemekte ve buna bağlı olarak eritrosit öncüllerinin eritropoiez sürecinde normal gelişim gösterememesine neden olmaktadır. Normal hemoglobin üretimi olmaması nedeniyle talasemilerde, hipokrom mikrositer formda eritrositler gözlenir (Tuzmen 2001).

2.3.1. Türkiye' de anormal hemoglobinler ve talasemiler:

Ülkemizde yöresel farklılıklar göstermekle beraber sıklıkla rastlanan çeşitli hemoglobin bozuklukları, yapılan çalışmalarla tanımlanmıştır (Atalay 1993). İlk kez Aksoy tarafından Hb S' nin ülkemizde bildirilmesinden sonra, günümüzde 42 anormal hemoglobinin varlığı tespit edilmiştir (Altay 2002). Bu anormal hemoglobinlerin 13 tanesi α globin zincirinde, 24 tanesi β globin zincirinde, 1 tanesi γ globin zincirinde, 2 tane hibrid hemoglobin, 2 tane yapısal değişim içeren zincir uzaması ve beta globin zincirinden amino asit çıkarımı ve eklenimi olarak tanımlanmaktadır. Türkiye' de saptanan anormal hemoglobin türleri Tablo 2.2' de gösterilmektedir (Altay 2002)

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

| Anormal Hemoglobinin İsmi | 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 | β 22 (B4) Glu --->Lys (GAA--->AAA) |
| Hb G- Coushatta | β 22(B4) Glu --->Ala (GAA--->GCA) |
| Hb D-İran | β 22 (B4) Glu --->Gln (GAA--->CAA) |
| Hb E | β 26 (B8) Glu --->Lys(GAG--->AAG) |
| Hb Knossos | β 27 (B9) Ala--->Ser (GCC--->TCC) |
| Hb Hakkâri | β 31 (B13) Leu--->Arg (CTG--->CGG) |
| Hb G-Copenhagen | β 47 (CD6) Asp--->Asn (GAT--->AAT) |
| Hb Summer Hill | β 52 (D3) Asp--->His (GAT--->CAT) |
| Hb Hamadan | β 56 (D7) Gly--->Arg (GGC--->CGC) |
| Hb J-Antakya | β 65 (E9) Lys--->Met (AAG--->ATG) |
| Hb City of Hope | β 69 (E13) Gly--->Ser (GGT--->AGT) |
| Hb J-İran | β 77 (EF1) His--->Asp (CAC--->GAC) |
| Hb G-Szuhu | β 80(EF4)Asn--->Lys (AAC--->AAAveya AAG) |
| Hb İstanbul Saint Etienne | β 92 (F8) His--->Gln (CAC--->CAA veya CAG) |
| Hb N-Baltimore | β 95 (FG2) Lys--->Glu (AAG--->GAG) |
| Hb Köln | β 98 (FG5) Val--->Met (GTG--->ATG) |
| Hb D-Los Angeles | β 121 (GH4) Glu--->Gln (GAA--->CAA) |
| Hb O-Arab | β 121 (GH4) Glu--->Lys (GAA--->AAA) |
| HbBeograd | β 121 (GH4) Glu--->Val (GAA--->GTA) |
| Hb Sarrebourg | β 131 (H9) Gln--->Arg (CAG--->CGG) |
| Hb Brockton | β 138 (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) |

Bir Akdeniz ülkesi olan Türkiye’de, tespit edilen β -talasemi mutasyonları sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Talasemi çalışmaları, ülkemizde ilk kez 1941 yılında Aksoy ve arkadaşları tarafından başlatılmıştır (Aksoy 1982). Çeşitli araştırmacılar Türkiye’deki β -talasemi sıklığını yaklaşık %2 olarak bildirmektedir. Ülkemizde

β -talasemiye neden olan birçok farklı mutasyonun varlığı bildirilmiştir. Genellikle Akdeniz ülkeleriyle benzerlik göstermekle birlikte Türkiye'nin coğrafik konumu ve yapısı nedeniyle, beta globin mutasyonlarında birçok çeşitliliğin varlığı ortaya konulmuştur. Beta globin mutasyonlarındaki bu çeşitlilik Hb D Los Angeles, Hb G Coughatta gibi anormal hemoglobinin de gözlenmesine neden olmaktadır. Bu farklı anormal hemoglobin türlerinin varlığı, evlilik öncesi tarama programlarında zaman zaman bazı sorunlarla karşılaşılmasına neden olabilmektedir (Atalay 1993, Atalay 2005, Yıldız 2005, Altay 2002, Tadmouri 1998, Tadmouri 2001, Tadmouri 2001).

2.3.2. Denizli yöresinde anormal hemoglobinler ve talasemiler:

Türkiye'nin İç Ege bölgesinde yer alan Denizli yöresinde, hemoglobin bozukluklarının sıklığı yaklaşık %3,5 olarak bildirilmiştir. Denizli yöresinde yapılan çalışmalarda çeşitli anormal hemoglobin tipleri bulunmuş olup bu hemoglobin çeşitleri Tablo 2.3'de gösterilmiştir (Atalay 2005). Bu bölgede saptanan anormal hemoglobin türleri içinde %53,9 oranıyla Hb D Los Angeles en sık görülen anormal hemoglobin türüdür (Yıldız 2005).

Tablo 2.3 Denizli yöresinde evlilik öncesi çalışmalarda saptanan anormal hemoglobinler (Atalay 2005)

| Anormal Hemoglobin İsmi | 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-Coughatta | 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 |

* Gözlenen anormal hemoglobinler içindeki oranı ifade etmektedir

Çeşitli araştırmacıların verdikleri sonuçlara göre, yöremizdeki β -talasemi sıklığı yaklaşık %2,6-3,7 arasında bildirilmiştir. Ana Bilim Dalımızda yapılan çalışmalarda, Denizli yöresinde rastlanan β -globin mutasyonlarının çeşitliliği ayrıntılı olarak tanımlanmıştır (Yıldız 2005).

2. 4. Hemoglobin bozukluklarını tayin etme yöntemleri:

Hemoglobin bozuklukları gibi kalıtsal hastalıkların kontrolünde en etkili yol, toplum taramaları ile taşıyıcıların saptanması, bunlara genetik danışma verilmesi ve doğum öncesi (*prenatal*) tanı yöntemlerini kullanarak hasta bebek doğumunun önlenmesi şeklinde sıralanmaktadır (Arcasoy 2003, Bahadır 2004).

Hemoglobin bozuklukları, protein düzeyinde ve gen düzeyinde yapılan çalışmalarla belirlenir. Protein ve gen düzeyindeki yöntemlerin seçimi tüm koşullar değerlendirilerek yapılabilmektedir. Özellikle doğum öncesi tanı aşamasında verilerin hızlı ve güvenilir şekilde elde edilebilmesi büyük önem taşımaktadır (Arcasoy 2003, Old 2003, Bahadır 2004).

2. 4. 1. Protein düzeyinde yapılan çalışmalar:

Protein düzeyinde, erişkindeki hemoglobin çeşitlerinin tespit edilmesi, anormal hemoglobinlerin ve talasemilerin belirlenmesinde ilk adımı oluşturmaktadır (Bahadır 2004). Bu düzeyde yapılan laboratuvar tanı yöntemleri; izoelektrik odaklama (IEF: *isoelectric focusing*), iyon değişim kolon kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC: *high-performance liquid chromatography*), elektrospray kütle spektroskopisi (ES/MS: *Electrospray mass spectrometry*), orak hücre taraması (oraklaşma testi), alkali ve asit elektroforez yöntemleri şeklinde özetlenebilir (Wajcman 2001, Tuzmen 2001, Old 2003, Bahadır 2004, Gwendolyn 2000).

2. 4. 2. Gen düzeyinde yapılan çalışmalar:

1980'li yılların ikinci yarısında, ısıya dayanıklı DNA polimerazların kullanımıyla kolaylaşan polimeraz zincir tepkimesini (*PCR: Polymerase Chain Reaction*) temel alan gen düzeyinde molekül sel tanı yöntemlerinin gelişimi hemoglobin bozukluklarının tanısını kolaylaştırmıştır. (Tuzmen 2001, Arcasoy 2003).

Globin genlerinde yer alan olası mutasyonların tespit edilmesi için PCR tabanlı yöntemler özetle; ARMS (*amplification refractory mutation system*), restriksiyon enzim analizleri (RFLP: *Restriction fragment length conformational polymorphism*), dot-blot

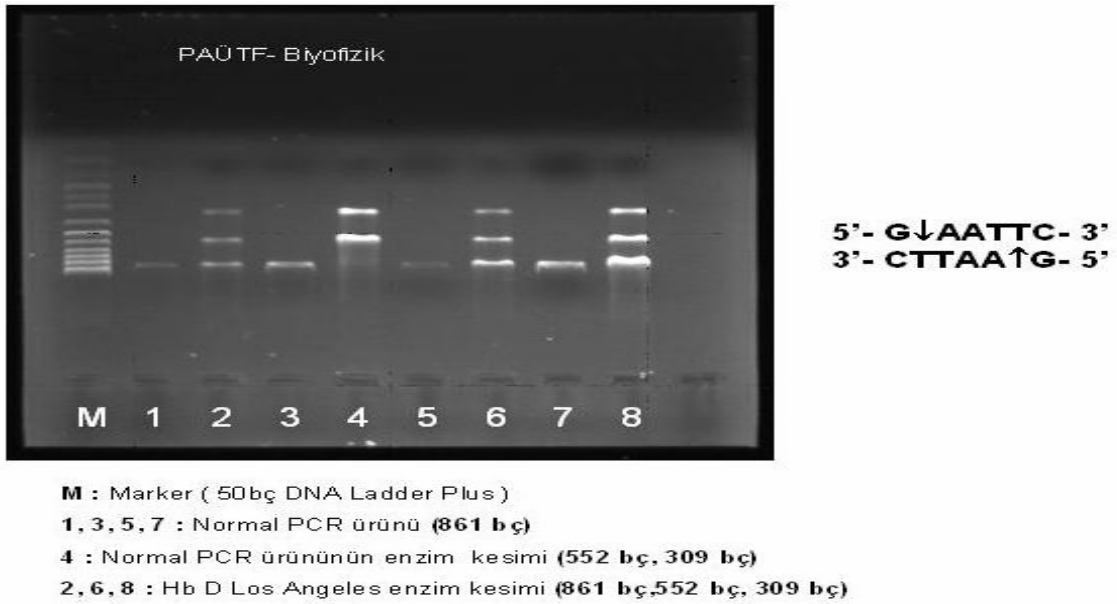
analizleri, DGGE (*denaturation gradient gel electrophoresis*), SSCP (*single strand conformational polymorphism*), DNA dizi analizi uygulamalarını kapsamaktadır. Doğum öncesi tanı gen düzeyindeki mutasyonların tespit edilmesi ile gerçekleştirilmektedir (Tuzmen 2001, Arcasoy 2003, Yıldız 2005, Bahadır 2004, Gwendolyn 2000).

Ülkemizde Akdeniz, Ege, Marmara Bölgesi illeri başta olmak üzere, 33 ili kapsayan, sağlık bakanlığının kontrolü altında yürütülen hemoglobinopati tanı ve önlem çalışmaları etkin bir şekilde sürdürülmektedir (Arcasoy 2003). Bu çalışmalar kapsamında, özellikle doğum öncesi tanı aşamasında zaman baskısının yaratmış olduğu olumsuzlukların giderilmesi gerekmektedir. Ana Bilim Dalımızda, yüzey plazmon teknolojisi kullanarak, molekül sel etkileşimlerin doğasına yönelik araştırmaların yapılabilmesi ve buna bağlı olarak hemoglobin bozukluklarının daha hızlı ve doğru molekül sel tanısını hedefleyen çalışmalar programlanmaktadır.

2.4.2.1 Restriksiyon enzim kesim yöntemleri

Restriksiyon endonükleazlar belirli nükleotit dizilerini tanıyarak çift iplikli DNA (*dsDNA-double stranded*) molekül ünü özgün olarak kesmektedirler. Restriksiyon endonükleazların özgün dizilerinde herhangi bir mutasyon oluşmuş ise, enzim, kesim işlemini gerçekleştirememektedir. Endonükleazların bu özelliği, PCR yöntemi ile çoğaltılan genomik DNA'da bulunması olası mutant genlerin saptanmasını mümkün kılmaktadır (Walker 2000). RFLP yöntemine, Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)GAA>CAA,Glu>Gln]'ın gen düzeyinde mutasyonunun tespit edilmesi örnek olarak verilebilir. Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu>Gln], beta globin geninin 121. kodonunda oluşan GAA>CAA mutasyonu nedeniyle glutamik asitin glutamine dönüşümüyle tanımlanan bir anormal hemoglobin türüdür. Eco RI enzimi çift iplikli DNA üzerinde yer alan 5'-GAATTC-3' dizisini tanıyarak kesim yaptığı için normal beta globin PCR ürünlerinde kesim yapabilmektedir. Buna karşın Eco RI enzimi, Hb D-Los Angeles geninin PCR ürünlerindeki GAA>CAA değişimi nedeniyle kesim yapamamaktadır. Bu enzim kesim yöntemiyle normal hemoglobin ile Hb D-Los Angeles'ın gen düzeyinde ayırıcı tanısı yapılabilmektedir. Bu yöntem ile yapılmış bir çalışma, Şekil 2.4'de örneklendirilmektedir. Ancak 121. kodondaki farklı bir mutasyonda enzim kesimi açısından aynı sonucu verdiği için karışıklıklara neden

olmakta ve Hb D-Los Angeles gibi gözükebilmektedir. Buna bir örnek olarak Hb Beograd [β 121(GH4)Glu>Val] verilebilir. Hb Beograd aynı kodonda gelişen farklı bir mutasyonun (GAA>GTA) ürünüdür. Aynı zamanda Hb Beograd'ın elektroforetik ve kromatografik özellikleri Hb D-Los Angeles'a benzediğinden, yapılacak çalışmalarda bu iki anormal hemoglobin türü birbirinden ayırt edilemeyecektir. Bu nedenlerden dolayı, RFLP yöntemi ile molekül sel tanı her zaman ayırıcı tanı vermediği için tek nükleotit de ğişiminin saptandığı yöntemlere gereksinim duyulmaktadır (Üstel 2006).



Şekil 2.4 Hb D-Los Angeles örneğinde Eco RI enzim kesimi

2. 5. SPR (*Surface Plasmon Resonance*):

Yüzey plazmon rezonans spektroskopisi (SPR), herhangi bir işaretlemeye gerek duyulmadan, molekül sel etkileşimlerin doğası hakkında gerçek zamanlı olarak bilgi veren, optiksel bir biyosensör olarak kullanılmaktadır (Mc Donnell 2001, Homola 1999). İlk kez 1982'de; Nylander ve Liedberg SPR yöntemi kullanarak elde ettiği verileri yayınlamışlardır (Homola 1999). Güncel biyofiziksel bir yaklaşım olan SPR spektroskopisi, 1990 yılında ticari amaçla kullanılmaya başlanmış, daha sonra kullanımı hızla yayılarak bugün molekül sel etkileşimlerin irdelenmesinde yaygın kullanım alanı bulmuştur (Mc Donnell 2001, Homola 1999, Bertucci 2003).

SPR analizlerinde, etkileşen moleküllerin çok küçük miktarlarıyla molekülse etkileşimler kısa sürede ve herhangi bir işaretleyiciye (izotop, enzim vb.) gerek duyulmaksızın gerçek zamanlı olarak yapılabilmektedir. Bunun yanı sıra SPR analizleri yapılırken, etkileşimleri incelenecek olan maddelerin saflaştırılmasına ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu koşullarda yapılan analizler moleküllerin doğası hakkında gerçekçi bilgiler verebilmektedir (Mc Donnell 2001, Bertucci 2003, IAsys Plus, Sonezaki 2000). SPR analizleri ile protein-protein, ilaç-reseptör, antijen-antikor, DNA/RNA-protein, DNA-DNA, hücre-protein ilişkileri araştırılabilir (IAsys Plus). Bu yöntemle; molekülse tanımlama, moleküllerin birbirlerine olan ilginlik derecesi, konsantrasyonları, çoklu-molekülse etkileşim analizleri gibi birçok konuda araştırma yapılabilir (Mc Donnell 2001, Homola 1999, Bertucci 2003, IAsys Plus). Talasemi ve anormal hemoglobin gibi kalıtsal hastalıklara neden olan mutasyonların tespit edilmesi amacıyla da SPR kullanımı rapor edilmiştir. Özellikle zamanla sınırlı doğum öncesi tanı çalışmalarında, SPR analizleri kullanılarak hızlı ve güvenilir sonuçların alınması için yöntemlerin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır (Feriotta^a 2004, Atalay 2006).

SPR spektroskopisinin çalışma prensibi; ışık kırınımı (*Snell Kanunu*) ve plazmon rezonansı ilkeleri olmak üzere iki temel fizik ilkesini esas almaktadır. Belli bir ortamda yoluna devam eden ışık farklı yoğunlukta bir ortama geçtiğinde, doğrultusunda meydana gelen değişim özelliğine “ışığın kırılması” olarak adlandırılmaktadır. Işık, kırılma indisi yüksek bir ortamdaki gelip, kırılma indisi düşük bir ortama geçerken geliş açısından farklı bir açıyla kırılarak yoluna devam eder. Bu davranış biçimi, $n_1 > n_2$, $n_1 \cdot \sin \theta_1 = n_2 \cdot \sin \theta_2$ eşitliği ile ifade edilir. Kırılma açısı 90° olduğunda ışık ikinci ortama geçmeden iki ortamı ayıran ara yüzey boyunca yoluna devam eder. Bu durumdaki ışığın geliş açısı kritik açı olarak tanımlanır. Işığın geliş açısı kritik açıdan daha büyük ise ışık aynı ortamda kalarak geri yansır. Bu olaya toplam iç yansıma adı verilir (Homola 1999, IAsys Plus).

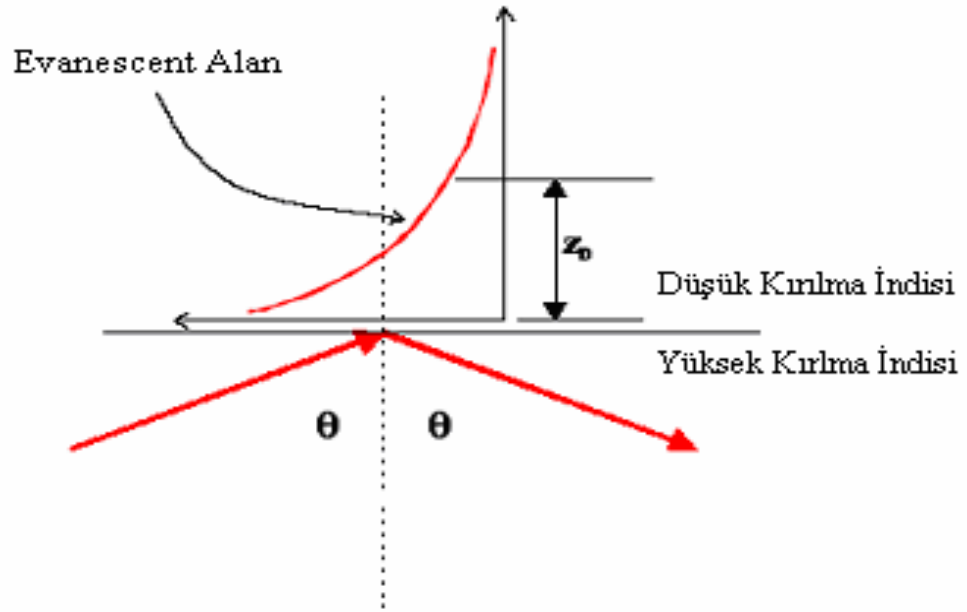
Yirminci yüzyılın başlarında Wood belli bir dalga boyundaki ışık altın, gümüş gibi bir metal yüzeye çarptığında yüzeyde plazmon rezonansı gelişebildiğini tanımlanmıştır. Yüzey plazmonlarının ışıkla uyarılması sonucunda toplam iç yansımanın etkilenmesi metodu ise ilk kez altmışlı yılların sonlarında Kretschmann ve Otto tarafından tarif edilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda yüzey plazmonları hakkındaki araştırmalar artmış ve plazmonların ana özellikleri değerlendirilmiştir. Plazmon rezonansı oluşturabilen bir metal yüzey üzerinde sabitlenmiş hedef molekül ile oluşan

etkileşimlerin refraktif indeks değişikliklerine neden olması ilgili etkileşimin doğasına ilişkin bilgi verebilmektedir (Homola 1999).

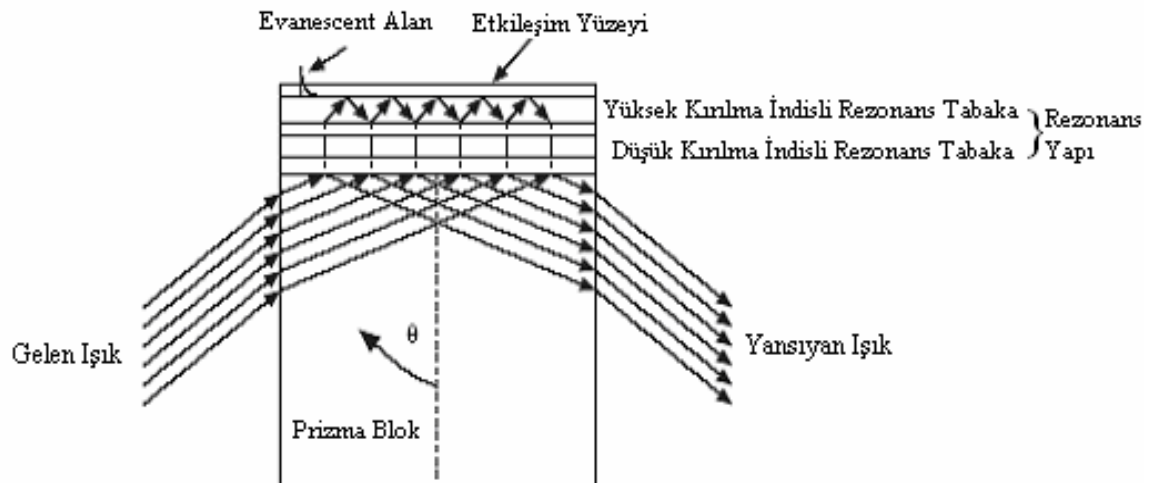
Toplam iç yansımaya uğrayan ışık, plazmon rezonansı verebilecek olan yüzeye çarptığında, yüzeyde bir manyetik alan oluşmaktadır. Yüzeyde manyetik alanın oluşturduğu elektrik alan sonucunda meydana gelen “yük yoğunluğu dalgası” plazmon olarak adlandırılmaktadır. Plazmon rezonansı yüzeye çarpan ışığın gelme açısına ve dalga boyuna bağlı olarak meydana gelmektedir. Plazmonlar, kırılma indisleri farklı olan ortamların her ikisinde de genişleyen benzer bir alan yaratmaktadırlar. Bu alan, üstel olarak azalan ve sonsuzda sönümlenen bir özellikte olup “*evanescent* alan” olarak adlandırılmaktadır. Bu alanın dalga boyu, gelen ışığın dalga boyu ile aynıdır ve alandaki azalma dalga boyu mesafesinde gerçekleşmektedir. Tam iç yansıma olayının sonucunda oluşan *evanescent* alanın metal yüzeye girme mesafesi z_0 olarak adlandırılmaktadır. Bu mesafenin dışında kalan alanda meydana gelen değişiklikler algılanmamaktadır. *Evanescent* alanın yüzeye nüfuz etme mesafesi (z_0); ortamların kırılma indisine (n_1, n_2); ışığın gelme açısına (θ) ve ışığın dalga boyuna (λ) bağlı olarak değişmektedir. Verilen tüm bu değerler Şekil 2.5’ de ayrıntılı bir biçimde görülebilmektedir (Homola 1999, IAsys Plus, Telefoncu 1999).

Rezonansa geçebilecek yüzey, prizma blok üzerinde yer almakta, 1 μm kalınlığındaki düşük ve 100 nm kalınlığındaki yüksek kırılma indisli iki dielektrik katmandan oluşmaktadır. Düşük kırılma indisli tabaka, hava boşluğunun yerini doldururken, yüksek kırılma indisli tabaka ise etkileşim yüzeyini oluşturmaktadır. Bu şekilde tasarlanan IAsys Plus SPR cihazının ayrıntılı bir şeması Şekil 2.6’ da gösterilmektedir (IAsys Plus).

Yüksek kırılma indisli yüzeyde gerçekleşen molekülse etkileşimlere bağlı olarak, *evanescent* alandaki kırılma indisi değişmektedir. Bu değişim, plazmon rezonansı veren



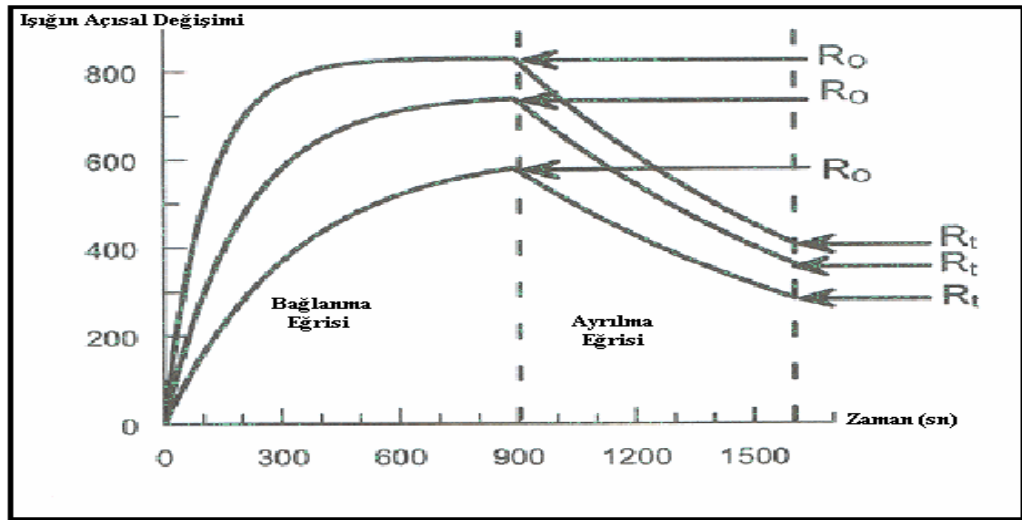
Şekil 2.5 Evanescent alan



Şekil 2.6 IAsys SPR şeması

yüzeyin rezonansa geçme açısını etkilemektedir. Gelen ışık, rezonansa ve gelme açısına bağlı bir şekilde, prizma içinde toplam iç yansıma kurallarına uyarak yoluna devam

etmektedir. Yüzeğe bağlanmanın artmasıyla birlikte gelişen olaylar sonucunda, SPR sinyalinde artma, bağlanmanın azalmasıyla birlikte gelişen olaylar sonucunda ise, SPR sinyalinde azalma gözlenmektedir. Zamana karşı, yansıyan ışığın saniyedeki açısal değışimlerinin değeriendirilmesi sonucunda kinetik eğrilerin verildiği, Şekil 2.7' deki gibi bir grafik elde edilmektedir (IASys Plus).



Şekil 2.7 SPR spektroskopisinden elde edilen bağlanma ve ayrılma kinetik eğrileri

Lazer ışığı ile rezonansa geçen 50 nm kalınlığındaki altın yüzey, mikro karıştırıcı (*vibro-stirrer*) ve örneklerin yüklendiği mikro küvet bileşenlerinden oluşan IASys™ Plus SPR cihazları, araştırmacıya çalışması sırasında bir çok açıdan kolaylık sağlamaktadır. Küvet tasarımı sayesinde, yoğunluğu fazla olan sıvılarla çalışabilmek mümkün olmaktadır. Aynı zamanda, analiz süresince herhangi bir anda örneklerin çıkarılabilmesi veya eklenebilmesi küvet şeklinin sağladığı diğer olumlu bir özelliktir. SPR spektroskopisinin etkileşim yüzeyini oluşturan SPR küvetleri; karboximetil dekstan (*carboxymethyl dextran*: CMD), biyotin ve aminosilan (*aminosilane*: AS) şeklinde farklı özelliklere sahip olabilmektedir (IASys Plus).

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışmasında, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı'nda "Bilgilendirilmiş Hasta Onay Formu" ile bilgilendirilen bireylerin periferik kan hücrelerinden elde edilen DNA örneklerinden oluşan DNA bankasından alınan ve daha önce Hb D-Los Angeles tanısı konulan DNA örnekleri kullanılmıştır. Model olarak kullanılan Hb D-Los Angeles anormal hemoglobini uygun primerler kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır.

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 salin çözeltisi eklenip karıştırıldı ve 600 g' de 15 dk santrifüj yapıldı ve üst sıvı atıldı.
3. Çökelti üzerine 1x retikülosit salin çözeltisi eklendi ve 600 g' de 15 dk santrifüj yapıldı. Bu işlem en az üç kez yapıldı.
4. Çökelti üzerine üç ml soğuk lizat çözeltisi eklendi ve çözelti berraklaşmıncaya kadar buz içerisinde bekletildi. Çözelti berraklaştıktan sonra 1900 g' de 15 dk santrifüj yapıldı ve üst sıvı atıldı.
5. Bu çökelti üzerine, bir ml 1x STE çözeltisi eklenerek karıştırıldı ve 1900 g' de 15 dk santrifüj yapıldı 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 µg/ml derişiminde proteinaz-K ve %1 SDS (sodyum dodesil sülfat) 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 dk santrifüj yapıldı ve üst sıvı temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
9. Üst faz üzerine eşit miktarda, kloroform/izomamilalkol (24:1) eklendi ve 11.000 g' de 15 dk santrifüj yapıldı.
10. Üst faz 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 alındı.
11. Tüp içerisindeki DNA üzerine %70' lik etanol eklendi ve 11.000 g' de 15 dk santrifüj yapıldı.
12. Etanol atıldıktan sonra DNA steril saf su ile çözüldü.

13. Elde edilen DNA' nın derişimi (O.D₂₆₀) "Eppendorf DNA Fotometre" ile tespit edildi.

Kullanılan çözeltiler:

§ 5x Retikülosit salin 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 (tuz tris-EDTA) çözeltisi:

Sodyum klorür, 100 mM

Tris-HCl, 10 mM

EDTA, 1 mM

§ Proteinaz K (Amresco, 20mg/ml)

§ %10' luk SDS (sodyum dodesil sülfat):

3.2. Beta globin gen bölgesinin PCR yöntemi ile çoğaltılması:

Hb D-Los Angeles'ın gen düzeyinde tanısı için 121. kodonu içeren 861 bç uzunluğundaki beta globin gen bölgesi PCR yöntemiyle çoğaltıldı. Bu bölgeyi çoğaltmak için Tablo 3.1' de verilen 50 µl' lik PCR karışımı hazırlandı. Bu PCR karışımı içerisinde bulunan primerlerin özellikleri Tablo 3.2' de verilmiştir. PCR ile heterozigot Hb D-Los Angeles DNA örnekleri ve sadece normal hemoglobin içeren DNA örnekleri kullanılmıştır.

Tablo 3.1 PCR karışımı

| PCR bileşenleri | Tek tüp içerisindeki miktar | Son Derişimleri |
|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------|
| DNA(0,03µg/µl) | 2 µl | 0,06µg/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 |
| PAM 200(10pmol/µl) | 2 µl | 20 pmol |
| PAM 201(10pmol/µl) | 2 µl | 20 pmol |
| Taq DNA polimeraz(BIORON)(1U/µl) | 5 µl | 0,2 U/50µl |
| Steril dH ₂ O | 23µl | - |
| Toplam Hacim | 50 µl | 50 µl |

Tablo 3.2 PCR yöntemindeki primerlerin baz dizileri

| 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' |

Isısal döngü cihazında (*Technogene Thermo Cyclor*) Tablo 3.3'de verilen programla PCR yapıldı. Bu çoğaltım reaksiyonu daha sonra %1'lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme cihazında (*UVItec*) görüntülendi.

Tablo 3.3 PCR koşulları

| Olay | Sıcaklık | Süre | Döngü |
|--|----------|-------|-------|
| Denatürasyon | 94 °C | 30 sn | 25 |
| Primer Bağlanması (<i>annealing</i>) | 65 °C | 15 sn | 25 |
| Uzama (<i>extension</i>) | 72 °C | 30 sn | 25 |
| Son Uzama (<i>final extension</i>) | 72 °C | 5 dk | 1 |

3.3. PCR ürünlerinin saflaştırılması:

Genomik DNA kullanılarak çoğaltılan PCR ürünleri, alkol çöktürme yöntemiyle saflaştırıldı.

1. PCR reaksiyonu karışımı, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve üzerine 1:10 hacim sodyum asetat ve 800 µl saf alkol eklendi ve bu karışım yaklaşık 1 saat -20°C'de bekletildi.
2. Örnekler 12.000 rpm'de 15 dk santrifüj yapıldıktan sonra üst faz uzaklaştırıldı.
3. Pelletin üzerine 200 µl % 70'lik etanol eklendi ve 12.000 rpm 'de 2 dk santrifüj yapıldı. Santrifüj işleminden sonra üst faz uzaklaştırıldı. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı.
4. Yıkama işleminden sonra pellet "*Speed Vac*" ile kurutuldu. Pellet üzerine 30 µl steril dH₂O eklendi.
5. Elde edilen DNA' nın derişimi (O.D₂₆₀) "Eppendorf DNA Fotometre" ile ölçüldü (Tablo 3.4).

Tablo 3.4 Biotinli PCR örneklerinin derişimi

| PCR Ürünleri | Derişim | 260nm/280nm |
|--------------|-----------|-------------|
| Hb AA | 224 ng/µl | 2,01 |
| Hb AD | 242 µg/µl | 1,80 |

3.4. SPR Analizi:

Kullanılan Çözeltiler:

- § EDC [1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid] Stok: 1,15 gr/15 ml steril distile su.
- § NHS (N-hidroksisüksinimid) Stok: 200 mg/15 ml steril distile su.
- § Asetat Tamponu (10 mM, pH: 5) (1 lt): 2 M asetikasit ile titre edildi.
- § PBS (*Tuzlu fosfat tamponu*) (pH: 7,4) (1 lt):
 - NaCl : 8 gr
 - KCl : 0,2 gr
 - Na₂HPO₄.2H₂O : 1,81 gr
 - NaH₂PO₄.2H₂O :0,28 gr
- § PBS/T: PBS + %0,05 Tween 20
- § Etanolamin (1 M, pH 8,5)

§ Eco RI restriksiyon enzimi (20U/ml)

§ Enzim Tamponu

3.4.1. CM Dekstran (Karboksimetil Dekstran) Küvetin Aktive Edilmesi ve Eco RI ile Kaplanması

IASys (*Affinity Sensor*), SPR cihazında CM dekstran küvetin aktive edilmesi ve üzerine Eco RI kaplanması için, cihazın kullanma kılavuzundaki Protokol 1.1 uygulandı. Cihazın deney parametreleri; sıcaklık 22 °C, karıştırıcı hızı %85, örnekleme aralığı 1 sn olarak ayarlandı. Her biri 80 µl hacmi olan iki tane mikro kanal içeren küvetin bir kanalı Eco RI ile kaplandı diğer kanal ise Eco RI ile kaplanmayıp kontrol kanalı olarak kullanıldı.

1. CM dekstran küveti SPR cihazının içine yerleştirdikten sonra üç defa 50 µl PBS/T ile yıkandı. Dengeye gelmesi için 10 dk beklendi. Daha sonra 5 dk kayıt alındı.
2. Yüzeyi aktive etmek için 200 µl EDC ile 200 µl NHS karıştırıldı. Bu EDC/NHS karışımından 40 µl eklenerek kanallar iki defa yıkandı ve 7 dk kayıt alındı.
3. Üç defa 50 µl PBS/T ile kanallar yıkandı ve 1 dk kayıt alındı.
4. Üç defa 40 µl asetat tamponu (10 mM pH 5,5) ile kanallar yıkandı ve 1 dk kayıt alındı.
5. Küvetin 1 no'lu kanalına 40 µl Eco RI (20 U/ µl) eklendi. Diğer kanal kontrol amaçlı olduğu için Eco RI eklemesi yapılmadı.
6. Dört dk kayıt alındıktan sonra 50 µl PBS/T ile kanallar yıkandı ve 1 dk kayıt alındı.
7. Reaksiyona girmeyen NHS-ester bağlarını bloklamak için 40 µl etanolamin (1 M, pH 8,5) ile iki defa kanallar yıkandı ve 3 dk kayıt alındı.
8. Üç defa 50 µl PBS/T ile kanallar yıkandı ve 1 dk kayıt alındı. Daha sonra ne kadar Eco RI kapladığımız hesaplandı.

3.4.2 Eco RI kaplı küvete biotinli PCR ürününün gönderilmesi:

Eco RI kaplı kanala biotinli PCR ürünü göndermeden önce, cihazın deney parametreleri; sıcaklık 37 °C, karıştırıcı hızı %65, örnekleme aralığı 1 sn. olacak şekilde ayarlandı.

1. Kanallara 40µl Eco RI tamponu eklendi ve 4 dk kayıt alındı.
2. Küvetin her iki kanalına 5 µl PCR ürünü eklendi ve 60 dk kayıt alındı.
3. Her iki kanal üç defa 50 µl PBS/T ile yıkandı ve 5 dk kayıt alındı.

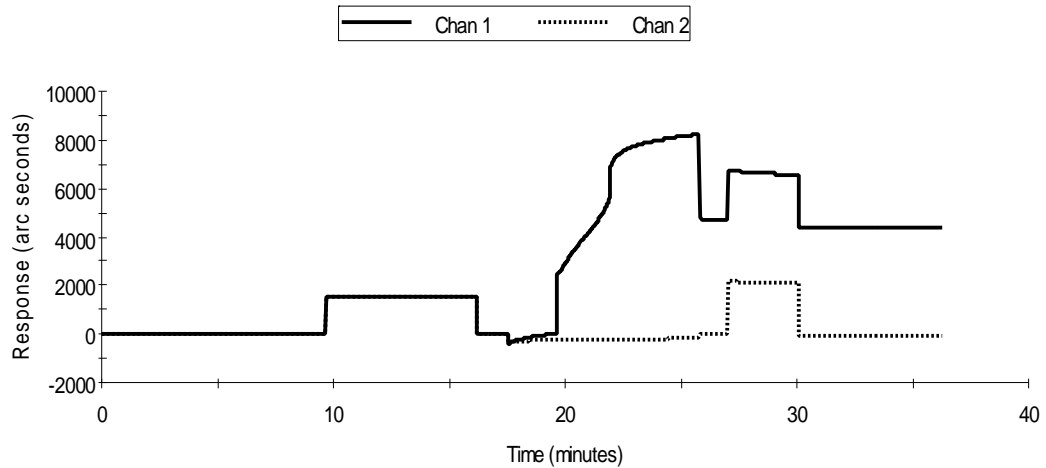
Bu işlem normal hemoglobin ve heterozigot Hb D Los Angeles anormal hemoglobin PCR ürünleri için aynı şekilde uygulandı.

4.BULGULAR

Çalışılan Hb AA ve Hb AD-Los Angeles örnekleri, Pamukkale Üniversitesi Biyofizik Anabilim dalına ait olan hemoglobinopati DNA arşivinden alınmış olup anonim biçimde kullanılmıştır. DNA arşivindeki örnekler için yazılı ‘‘Bilgilendirilmiş Onay Formu’’ bulunmaktadır.

Normal hemoglobin ve heterozigot Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu>Gln] anormal hemoglobin taşıyan kişilerden elde edilen DNA’lardan PCR yöntemi ile çoğaltma işleminden sonra 861 bç’lik ürünler elde edilmiştir. Bu PCR ürünlerinin Eco RI enzimi ile etkileşim farklılıkları SPR analizleriyle incelendi.

SPR çalışmasında ilk aşama, CM Dekstran küvete Eco RI kaplanmasıdır. CM Dekstran küvet her birinin hacmi 80 μ l olan iki tane mikro kanal içerir. Her iki kanal EDC/NHS ile aktive edildikten sonra sadece 1 no’lu kanal 200 U/ μ l Eco RI ile kaplanmış olup, 2 no’lu kanal ise Eco RI ile kaplanmadı. Böylece 2 no’lu kanal solüsyon değişimlerinden oluşan farkı ortadan kaldırmak için Eco RI ile kaplanmayıp kontrol için kullanıldı. Eco RI ile kaplanan kanaldan alınan SPR yanıtının Eco RI ile kaplanmayan kanaldan alınan SPR yanıtından farkı yaklaşık olarak 4000 arc saniye kadardır (Şekil 4.1)



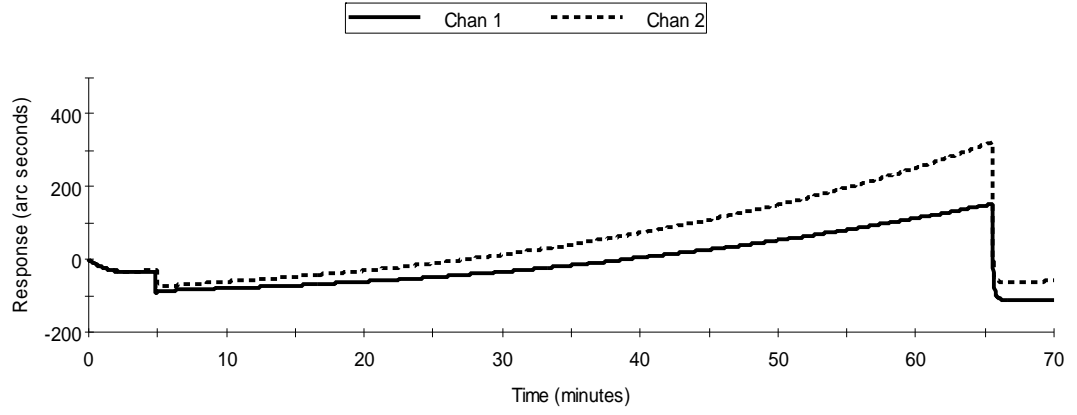
Kanal 1. Eco RI kaplı kanal

Kanal 2. Eco RI kaplı olmayan kanal

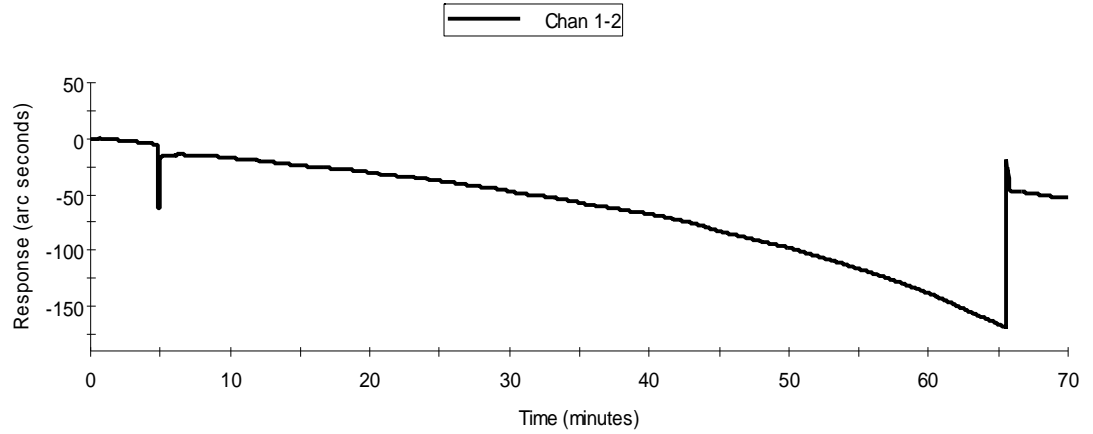
Şekil 4.1 CM Dekstran küvete Eco RI kaplanması (1. aşama)

SPR analizinin ikinci aşamasında, Hb AA taşıyan bireyden elde edilen PCR ürünü, Eco RI kaplı olan 1 no’lu kanal ile Eco RI kaplı olmayan 2 no’lu kanala

gönderildi. Şekil 4.2’de elde edilen kaba veriler IAsys yazılımı tarafından işlendiğinde Şekil 4.3’de görüldüğü gibi -168 arc saniyelik sinyal kaydedilmiştir.



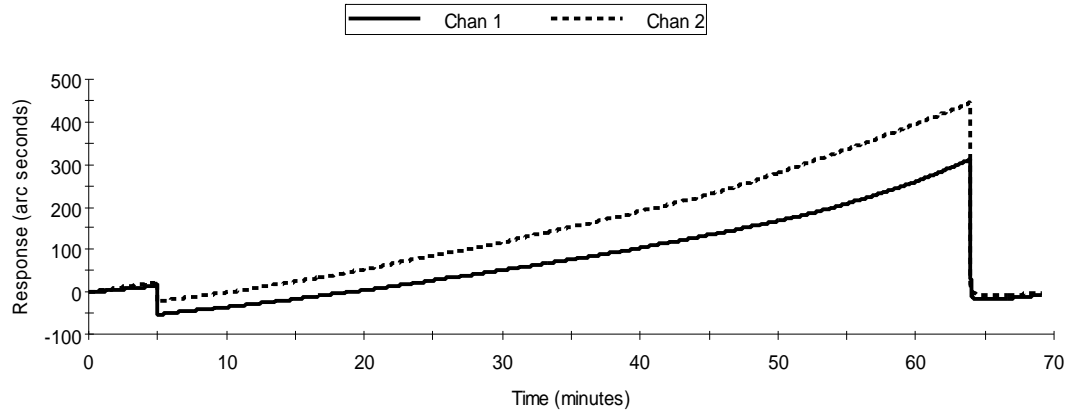
Şekil 4.2 Normal hemoglobin dizisi içeren PCR ürününün Eco RI ile etkileşimi
(2. aşama)



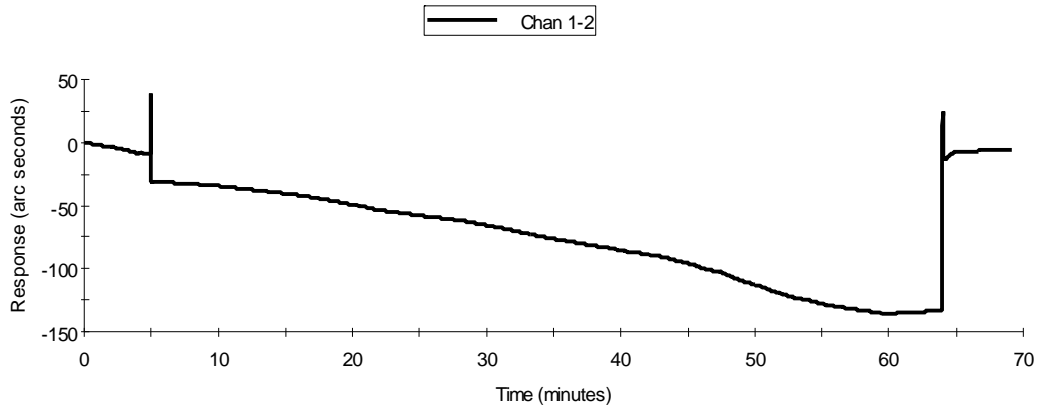
Şekil 4.3 Normal hemoglobin dizisi içeren PCR ürünü eklenen çalışma için işlenmiş sonuçlar (2. aşama)

SPR analizinin üçüncü aşamasında, heterozigot Hb D-Los Angeles (Hb AD) taşıyan bireyden elde edilen PCR ürünü, Eco RI kaplı olan 1 no'lu kanala gönderildi. Şekil

4.4'den elde edilen kaba veriler IAsys yazılımı tarafından işlendiğinde Şekil 4.5'de görüldüğü gibi -150 arc saniye olarak kaydedilmiştir (Şekil 4.5).



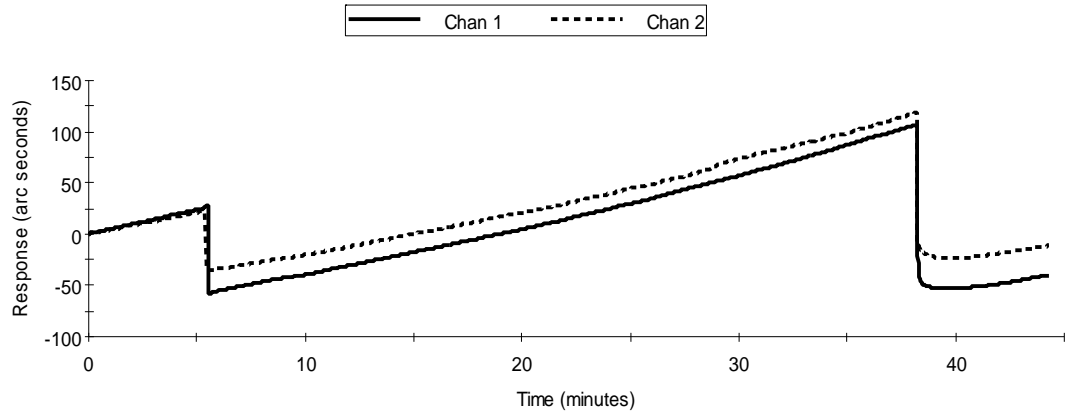
Şekil 4.4 Heterozigot Hb D-Los Angeles hemogloblin dizisi içeren PCR ürününün Eco RI ile etkileşimi (3. aşama)



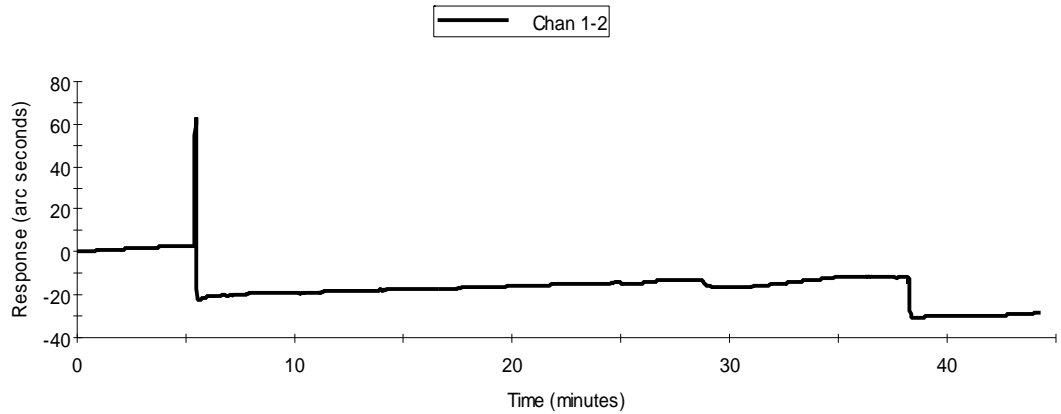
Şekil 4.5 Heterozigot Hb D-Los Angeles anormal hemogloblin dizisi içeren PCR ürünü eklenen çalışma için işlenmiş sonuçlar (3. aşama)

SPR analizinin dördüncü ve beşinci aşamalarında heterozigot PCR ürünlerinin Eco RI kaplı 1 no'lu kanala ard arda gönderilmesi sonucunda PCR ürünü ve Eco RI arasındaki etkileşimin nasıl değiştiği incelendi. İkinci kez heterozigot PCR ürünü

gönderildiğinde, Şekil 4.6'dan elde edilen kaba veriler IAsys yazılımı tarafından işlendiğinde Şekil 4.7'deki -25 arc saniyelik yanıt kaydedildi.



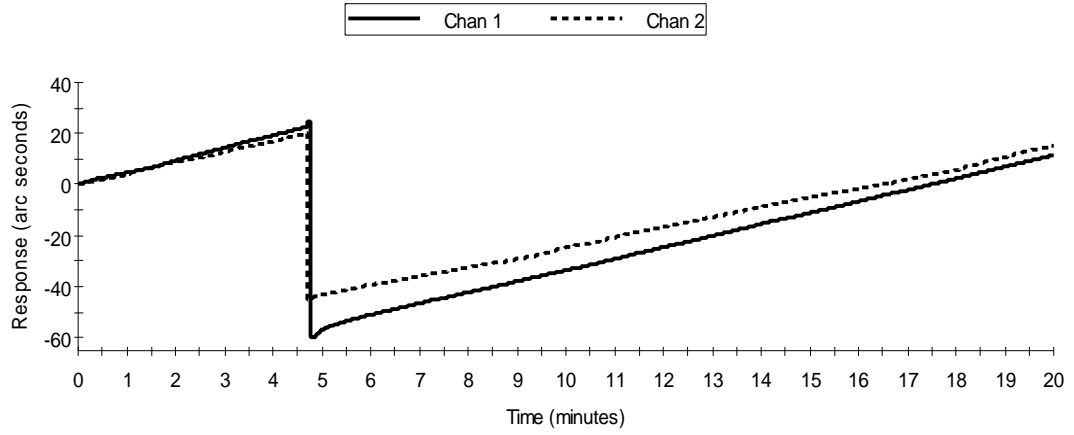
Şekil 4.6 Heterozigot Hb D-Los Angeles hemoglobin dizisi içeren PCR ürününün Eco RI ile etkileşimi (4. aşama)



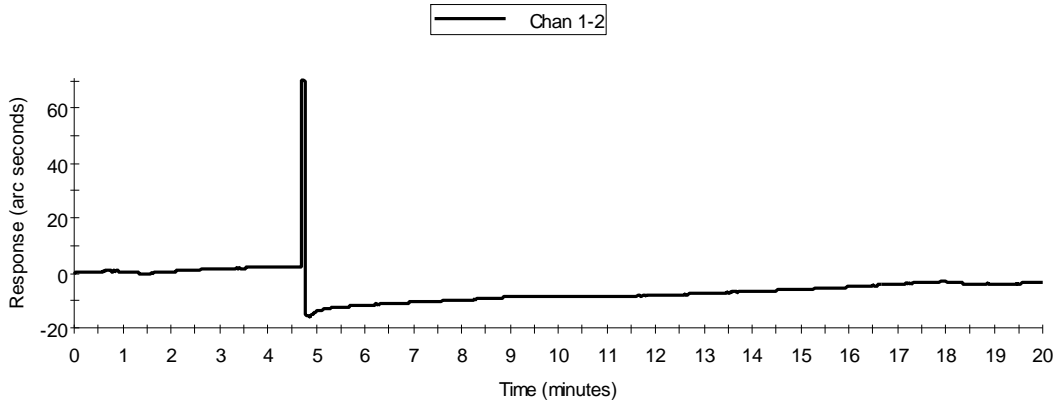
Şekil 4.7 Heterozigot Hb D-Los Angeles anormal hemoglobin dizisi içeren PCR ürünü eklenen çalışma için işlenmiş sonuçlar (4. aşama)

Üçüncü kez heterozigot PCR ürünü gönderildiğinde, heterozigot PCR ürünü ile enzim arasında gerçekleşen etkileşim sonucunda Şekil 4.8' den elde edilen veriler IAsys yazılımı tarafından işlendiğinde ise Şekil 4.9'da görülen -15 arc saniye kaydedilmiş ve

sıfıra yaklaştığı görülmüştür. Yapılan çalışmada enzim bağlı küvetteki enzim aktivitesinin ne kadar süre ile korunduğu hakkında bilgi toplandı.



Şekil 4.8 Heterozigot Hb D-Los Angeles hemoglobin dizisi içeren PCR ürününün Eco RI ile etkileşimi (5. aşama)



Şekil 4.9 Heterozigot Hb D-Los Angeles anormal hemoglobin dizisi içeren PCR ürünü eklenen çalışma için işlenmiş sonuçlar (5. aşama)

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Anormal hemoglobinler ve talasemiler, dünyada olduğu gibi ülkemizde de rastlanan en önemli kalıtsal hastalıklardan birini oluşturmaktadır. Kalıtsal hemoglobin bozukluklarının nedeni genlerde meydana gelen mutasyonlar olduğu için, sağlıklı bireylerin doğmasına katkıda bulunmak amacıyla moleküler tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ve uygulanabilmesi en etkin bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Bu amaçla, dünyada ve ülkemizde hemoglobinopati kontrol programları uygulanmaktadır. Bu programlardaki temel yaklaşım, ilk basamakta evlilik öncesi dönemde bireylerin hemoglobin bozuklukları açısından kimliklendirilmesinin sağlanması şeklinde gerçekleşmektedir. İkinci aşamada ise, taşıyıcı bireylerin evlilikleri sonucunda doğabilecek bireyin, doğum öncesi tanı yöntemleri ile moleküler açıdan tanımlanması amaçlanmaktadır. Denizli İl Sağlık Müdürlüğü verilerine göre yöremizdeki beta talasemi ve anormal hemoglobin sıklığı % 3,5 olarak verilmektedir. Denizli yöresinde evlilik öncesi tarama programına dayalı olarak ana bilim dalımız tarafından yapılmış olan çalışmalarda; % 57,8 Hb D-Los Angeles, % 21,9 Hb S, % 15,6 Hb G-Coushatta, % 3,1 Hb E- Saskatoon ve % 1,6 oranında Hb C gibi anormal hemoglobin türlerinin varlığı gösterilmiştir (Üstel 2006, Atalay 2005). Bu sonuçlar doğrultusunda, yöremizde Hb G-Coushatta ve Hb D-Los Angeles türü anormal hemoglobinlerin beklenenden daha yüksek oranda bulunduğu saptanmıştır.

Tanı çalışmalarında karşılaşılan en önemli sorunlardan biri, Hb D-Los Angeles ve Hb G-Coushatta'nın alkali ortamdaki elektroforetik davranışlarının Hb S ile aynı olmasından kaynaklanmaktadır. Hb S, beta globin geninin altıncı kodonunda yer alan glutamik asit (GAG) yerine, valin (GTG) geçmesiyle oluşan ve orak hücre anemisine neden olan bir anormal hemoglobin türüdür. Hb D-Los Angeles ise, beta globin geninin 121. kodonunda yer alan glutamik asit (GAA) yerine, glutamin (CAA) geçmesiyle oluşmaktadır. Diğer taraftan Hb G-Coushatta ise, beta globin geninin 22. kodonunda yer alan glutamik asit (GAA) yerine, alanin (GCA) geçmesiyle tanımlanan bir anormal hemoglobin türüdür. Asit hemoglobin elektroforezinde, Hb D-Los Angeles ile Hb G-Coushatta, normal hemoglobine benzer elektroforetik harekete sahiptir. Ana bilim dalımız tarafından yapılmış ama henüz yayınlanmamış verilere göre yöremizde nadir olarak karşılaşılan Hb Beograd'm da Hb D-Los Angeles ile benzer elektroforetik harekete sahip olduğu bilinmektedir. Alkali ve asit elektroforez yöntemlerinde olduğu gibi kromatografi yöntemi ile yapılan protein düzeyindeki çalışmalarla Hb D-Los Angeles gibi diğer anormal hemoglobinlerin ayırıcı tanısında güçlükler bulunmaktadır.

Bu nedenle bu tür anormal hemoglobinlerin tanısının gen düzeyinde yapılması gerekmektedir. Örneğin, Hb D-Los Angeles'ın diğer anormal hemoglobin türlerinden ayrılması için gen düzeyinde Eco RI enzimi ile enzim kesimi önerilmektedir. Eco RI enzimi, Hb D-Los Angeles mutasyonunun [β 121(GH4)(GAA--->CAA)] bulunduğu 121. kodonu tanıyarak, mutasyon içeren dizi ile normal diziyi birbirinden ayırabilmektedir. Eco RI enzimi DNA dizileri üzerinde yer alan 5'-GAATTC-3' dizisini tanıyarak kesmektedir. Hb D-Los Angeles mutasyonuna neden olan nükleotid değişimi Eco RI enzim kesim yerini ortadan kaldırmaktadır. Bu nedenle enzim kesimine bağlı olarak, mutasyonun varlığını tespit etmek mümkün olmaktadır (Üstel 2006).

Denizli yöresinde yapılan evlilik öncesi tarama çalışmalarında anormal hemoglobin olan Hb D-Los Angeles'ın, beta-talasemi mutasyonları ile birlikte olduğuna ilişkin bilgiler bulunmaktadır (Yıldız 2005). Yöremizdeki evlilik öncesi çalışmalarda, taşıyıcıların belirlenmesi ve doğum öncesi tanı uygulamasında sağlıklı bireylerin doğumuna katkıda bulunabilmek için talasemi ve anormal hemoglobin mutasyonlarının doğru biçimde tanımlanması gerekmektedir. Anormal hemoglobin çeşitlerinin tanımlanması ve birbirlerinden ayrılması için asit ve alkali hemoglobin elektroforezi, PCR tabanlı teknikler, RFLP ve DNA dizi analizi gibi çok zaman alan ve göreceli olarak pahalı teknikler kullanılmaktadır. Bu tez çalışması; Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalımız hedeflerinden olan, yöremizde sıklıkla görülen anormal hemoglobinlerin doğru biçimde molekül olarak tanımlanmasına dönük, gen düzeyinde hızlı ve ucuz rutin test sistemlerinin geliştirilmesini öngören program içerisinde planlanmıştır. Bu temel hedefe ek olarak, yapılan çalışmalarda molekül etkileşimlerin biyofiziksel olarak açıklanması tez çalışmasının amaçlarından bir diğerini oluşturmaktadır. SPR tabanlı çalışmalar, geliştirilmesi gereken yeni nesil biyofiziksel yöntemlerden birisidir. Molekül etkileşimlerin incelenmesinde, enzim ya da radyoaktif madde gibi herhangi bir işaretleyiciye gereksinim duyulmaksızın analizlerin yapılmasına olanak sağlayan gerçek zamanlı SPR yöntemi yararlı katkılar sağlamaktadır. SPR spektroskopisi, optik ve plazmon rezonans kavramlarını birleştirerek protein-protein, protein-nükleik asit, nükleik asit-nükleik asit, canlı hücre-molekül ve benzeri birçok biyolojik olayda kullanılabilir. SPR tabanlı biyosensörlerin kullanılmasından bu yana, biyomolekül etkileşimlerin farklı alanlarında birçok çalışma yapılmış bulunmaktadır (Emanuel 2000, Oh 2004, Vostiar 2003, Homola 2005, Rebecca 2005, Rebecca 2006). Feriotto ve arkadaşları SPR

biyosensörünü kullanarak kodon 39 (C>T), IVS1/nt.1 (G>A), IVS1/nt.6 (T>C) ve IVS1/nt.110 (G>A) gibi farklı beta talasemi mutasyonlarını tanımlamışlar ve bu mutasyonların homozigot ve heterozigot formlarını birbirlerinden ayırabilen veriler elde etmişlerdir (Feriotto^a 2004, Feriotto^b 2004). Ana bilim dalımızda bu konuda yapılan çalışmanın ilk sonuçları yayınlanmış bulunmaktadır. Bu çalışmada; bir anormal hemoglobin türü olan Hb S [β 6 (A3) (GAG--->GTG)] mutasyonu içeren örneklerde SPR yöntemi ile elde edilen ilk sonuçlar yer almaktadır (Üstel 2006, Atalay 2006).

Mutasyon tespitine dönük, Ana Bilim Dalımızda yapılan çalışmalarda tamamlanmış olan iki tez çalışması bulunmaktadır. ‘‘Hb D-Los Angeles’ in ayırıcı molekül tanısı’’ başlıklı tez çalışmasında, nükleik asit-protein etkileşime dayalı olarak, model alınan anormal hemoglobinin gen düzeyinde ayırıcı tanı çalışmaları yapılmıştır. Etkileşen maddelerden nükleik asit, etkileşim yüzeyine sabitlenmiş daha sonra Eco RI enziminin normal ve anormal hemoglobin dizisi içeren PCR ürünleri ile etkileşimlerine bağlı olarak, SPR spektroskopisi çalışması ile mutasyon tespiti yapılmıştır (Bahadır 2004). ‘‘Anormal hemoglobinlerin SPR yöntemi ile gen düzeyinde tanısı’’ konulu tez çalışmasında ise nükleik asit- nükleik asit etkileşime dayalı olarak mutasyon tespiti çalışmaları yapılmıştır. SPR spektroskopisi çalışmalarında mutasyon taramasının yapıldığı DNA örnekleri, SPR yüzeyine sabitlenmiş ve mutasyona özgü problemlerle mutasyonun saptanabildiği gösterilmiştir (Üstel 2006).

Bu tez çalışmasında; Ana Bilim Dalımız’da yapılmış olan diğer çalışmalardan farklı olarak, protein-DNA etkileşimi temelinde enzim aktivitesinin izlenmesi şeklinde bir yaklaşım öngörülmüştür. Tez çalışması için daha önce tanımlanmış heterozigot formda Hb D-Los Angeles ve normal hemoglobin taşıyan bireylerden elde edilen DNA örnekleri kullanılmıştır. Hb D-Los Angeles’a neden olan baz değişikliğinin bulunduğu 121. kodonu içeren 861 bp uzunluğundaki beta globin gen bölgesi, PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Daha sonra ilk olarak Hb AA PCR ürünleri, Eco RI ile kaplanmış SPR kanalına eklenmiştir. Normal hemoglobinde mutasyonlu bölge olmadığı için Eco RI enziminin her iki aleli tanıyarak kesmesi beklenmiş ve elde edilen sonuçlarda bu davranış gözlenmiştir. Elde edilen işlenmiş SPR verilerine göre enzimin çift iplikli DNA üzerine bağlanarak kesimi, azalan biçimde ilerleyen sinyallerle izlenmiş ve sonuçta -168 arc saniyelik bir düşüş saptanmıştır (Şekil 4.3). Daha sonra Eco RI bağlı kanala heterozigot Hb D-Los Angeles PCR ürünü eklenmiştir. Elde edilen işlenmiş SPR

verilerine göre enzim kesimi, azalan SPR sinyalleri biçiminde gözlenmekte ancak elde edilen eğri normal örneğe göre farklılık göstermektedir. Burada toplam SPR sinyali düşüşü -150 arc saniye olarak saptanmış, eğride normal örneğe oranla farklı biçimde bir düşüş izlenmiştir (Şekil 4.5). SPR sinyallerindeki bu farklılıkların normal ve heterozigot örneklerdeki mutasyondan kaynaklandığı belirlenmiştir.

SPR küvetine ardışık biçimde örneklerin uygulanması ile yüzeye sabitlenmiş Eco RI enzimi kesim aktivitesinin izlenmesi amaçlanmıştır. Yapılan ardışık örnek uygulamalarında elde edilen verilerde, küvet üzerine sabitlenen enzimin aktivitesinde giderek azalma gözlenmiştir (Şekil 4.7, Şekil 4.9) Bu sonuçlar, daha sonra planlanacak çalışmalarda ilk adımın, küvet yüzeyine bağlanan enzimin aktivite kaybına neden olmayacak şekilde sürekli biçimde korunmasına yönelik geliştirme çalışmalarının önemli bir nokta olduğunu işaret etmektedir.

SPR Spektroskopisi ile gen düzeyinde yapılan moleküler tanı, diğer ayırıcı tanılara göre çok daha kısa süre içinde, özgün sonuç vermektedir. Protein ve gen düzeyinde yapılan, hemoglobinlerin birbirinden ayırt edilmesinde kullanılan diğer yöntemler ile anormal hemoglobinlerin belirlenmesi yaklaşık olarak 2-3 günlük bir zaman sürecinde mümkün olmaktadır. SPR spektroskopisi ile yapılmış ve Eco RI enzim aktivitesine bağlı olarak gözlemlemiş olduğumuz, Hb D-Los Angeles anormal hemoglobinin normal hemoglobinden ayırt etme çalışması, PCR ile kullanılacak örneklerin çoğaltılmasından sonra, yaklaşık bir buçuk saat içerisinde tamamlanmış bulunmaktadır. Ayrıca SPR spektroskopisi ile yapılan çalışmalarda diğer tanı yöntemlerinden önemli bir farklılık olarak, moleküllerin birbirleri ile olan etkileşimleri hakkında daha çok ve gerçek zamanlı bilgi toplanmaktadır. Aynı zamanda SPR analizi radyoaktif veya non-radyoaktif herhangi bir işaretleyiciye gerek duyulmaksızın moleküllerin doğasına ilişkin veri toplanmasına olanak sağlamaktadır. Bunun yanında SPR Spektroskopisi ile yapılan tanı çalışmaları, diğer gen düzeyindeki tanı yöntemleri ile karşılaştırıldığında daha düşük bir maliyetle gerçekleştirilebilmektedir. SPR analizinde kullanılan bir küvete, birbirinden farklı birden fazla PCR ürününün eklenmesi ve kanal yüzeyine bağlı olan madde ile etkileşimlerinin çalışılması mümkün olmaktadır.

Sonuç olarak; bu tez çalışmasında elde edilen veriler ile SPR analizinin moleküler etkileşimlerde yararlı bir yöntem olduğu sonucuna varılmış ve bu verilerin Ana Bilim Dalımız'da yapılan diğer iki çalışma ile karşılaştırılması yapılmıştır. Anormal

hemoglobinlerdeki mutasyonların saptanmasında DNA-DNA etkileşimine dayalı yaklaşımın en güçlü ve özgün sonuçlar verdiği, enzim-DNA ilişkilerinde ise enzim aktivitesinin korunması koşulu ile daha yararlı sonuçlar alınabileceği belirlenmiştir. Enzim aktivitesinin kuvvet üzerindeki sürekliliği ve kararlılığının sağlanmasının, mutasyon-enzim ilişkilerinin aydınlatılmasında, önemli biyofiziksel veriler ortaya koyabileceği sonucuna varılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- Arcasoy A., Canatan D., Köse M. R., Üstündağ M. (2003). **Hemoglobinopati ve Talasemi: Önlem-Tanı-Tedavi. Ulusal Hemoglobinopati Konseyi Yayını.** T.C. Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Gn.Md-Tedavi Hizmetleri Gn. Md.. İkinci Baskı.
- Aksoy M. (1982). Anormal hemoglobinler ve talasemik sendromlar. **Tübitak Yayınları.** No 521. Ankara
- Altay Ç. (2002). Abnormal hemoglobins in Turkey. **Turkish Journal of Heamotology.**19(1). 63-74
- Altay Ç. (2002). The frequency and distiribiution pattern of beta thalassemia mutations in Turkey. **Turkish Journal of Heamotology.** 19(2). 309-315
- Atalay E. Ö., Çirakoğlu B., Dinçolç G., Atalay A., Kılınc Y., Aytekin H., Yüregir G. T., Arpacı A., Bermek E., Aksoy M. (1993). Regional distributions of β -thalassemia mutations in Turkey. **International Journal of Hemotology.** 57. 207-211
- Atalay E. Ö., Koyuncu H., Turgut B., Atalay A., Yıldız S., Bahadır A., Köseler 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 E.Ö., 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.
- Bahadır A.. HbD-Los Angeles' in ayırıcı molekül sel tanısı; Yüksek Lisans Tezi. **Pamukkale Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü.** Denizli. 2004.
- Bermek E., Nurten R., Tiryaki D., Gökçe S. (1997). Biyofizik Ders Notları. **İstanbul Üniversitesi Tıp Fak. Yayınları.** No. 188. İstanbul. s 145-150
- Bertucci C., Cimitan S. (2003). Rapit screening of small ligand affinity to human serum albumin by an optical biosensor. **Joournal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 32. 707-714
- Bettati S., A. Mozzarelli, Max F. Perutz (1998). Allosteric Mechanism of Haemoglobin: Rupture of Salt-bridges Raises the Oxygen Affinity of the T-Structure. **Journal of Molecular Biology.** 281. 581-585
- Briehl R. (1978). Sickel Cell: A Metastable Disease. **Nature.** 276: 666-668.
- Çelebi G. (2005). **Biyofizik.** İzmir. s 44-50
- Emanuel P.A., Dang J., Gebhardt J.S., Aldrich J., Garber E.AE, Kulaga H, Stopa P, Valdes JJ, Dion – Schultz A. (2000). Recombinant antibodies: a new reagent for biological agent detectio. **Biosensors & Bioelectronics.** 14: 751- 759.
- Feriotto^a G., Giulia Breveglieri, Alessia Finotti, Sara Gardenghi, Roberto Gambari (2004). Real-time multiplex analysis of four beta-thalassemia mutations employing surface plasmon resonance and biosensor technology. **Laboratory Investigation.** 2004. 84. 796–803
- Feriotto^b G., Breveglieri G, Gardenghi S, Carandina G, Gambari R.(2004). Surface plasmon resonance and biosensor technology for real-time molecular diagnosis of beta⁰ 39 thalassemia mutation. **Mol Diagn.** 8(1). 33-41.
- Finch JT, Perutz MF, Bertles JF. (1973). Structure of Sickled Erythrocytes and of Sickel Cell Hemoglobin Fibers. **Proc Natl Acad Sci USA.** 70(3): 718-722.
- Ganong WF (1985). Review Of Medical Physiology. 12th edition. **Lange Medical Publications.** California. s 431.
- George P. Patrinos, Belinda Giardine, Cathy Riemer, Webb Miller, David H. K.

- Chui, Nicholas P. Anagnou, Henri Wajcman and Ross C. Hardison (2004). Improvements in the Hb Var database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies. **Nucleic Acids Research**. Vol. 32. s 30-45
- Gwendolyn MC (2000). Trefor NH. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. **Clinical Chemistry**. 46. 8(B). 1284-1290.
- Hardison R., Riemer C., David H. K. Chui, Titus H. J. Huisman, Webb Miller (1998). Electronic Access to Sequence Alignments, Experimental Results and Human Mutations as an Aid to Studying Globin Gene Regulation. **Genomics**. 47. 429-437
- Ho PJ, Thein SL. (2000). Gene regulation and deregulation: α - β Globin perspective. **Blood Reviews**. 14. 78- 93.
- Homola J., Yee S., S. Gaultitz G. (1999). Surface plasmon resonance sensors: Review. **Sensors and Actuators**. 54. 3-15
- Homola J., Vaisocherová H., Dostálek J., Piliarik M. (2005). Multi-analyte surface plasmon resonance biosensing. **Methods**. 37:26-36
- Huisman THJ. (1976). Separation and Characterization of Hemoglobins Forman DT and Matton RW: **Clinical Chemistry**, ACS (American Chemical Society) Symposium Series No.36. s 71-74. Washington
- Huisman Titus H.J. (1997). High performance liquid chromatographic analysis of human hemoglobins and their polypeptide chains: its use in the identification of variants. **Analytica Chimica Acta**. (352). 187-200
- IASys Plus Technical Resources. Thermo LabSystems. Part Number:LAS860001 Issue 3. s 37-40
- Mario N., B. Baudin, J Giboudeau (1998). Qualitative and quantitative analysis of hemoglobin variants by capillary isoelectric focusing. **Journal of Chromography B**. 706: 123-129
- Mc Donnell J. (2001). Surface plasmon resonance: towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. **Current Opinion in Chemical Biology**. 2001. 5:572-577.
- Nienhuis A.W, Anagno N.P., Ley T.J. (1984). Advances in thalassemia research. **Blood**. 63(4):738. s 432-440
- Oh BK, Kim YK, Park KW, Lee WH, Choi, JW. (2004). Surface plasmon resonance immunosensor for detection of Salmonella typhimurium. **Biosensors and Bioelectronics**. 19. 1497- 1504.
- Old J. M. (2003). Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. **Blood Reviews**. 17. 43-53
- Ou Ching-Nan, Cheryl L. Rognerud (2001). Diagnosis of hemoglobinopathies: electrophoresis vs. HPLC. **Clinica Chimica Acta**. 313. 187-194
- Perutz MF, Lehmann H. (1968). Molecular Pathology of Human Hemoglobin. **Nature**. 219: 902
- Perutz MF, Muirhead H, Cox JM (1968). Three Dimensional Fourier Synthesis of Horse Oxyhemoglobin at 2,8Å^o Resolution. **Nature**. 219: 131
- Rebecca L. Rich, Myszka D. G. (2005). Survey of the year 2004 commercial optical biosensor literature. **Journal of Molecular Recognition**. 18: 431-478
- Rebecca L. R., Myszka D. G. (2006). Survey of the year 2005 commercial optical biosensor literature. **Journal of Molecular Recognition**. 19: 478-537
- Sanchaisuriya K., Chunpanich S., Fucharoen G., Fucharoen S. (2004). Multiplex

- allele-specific PCR assay for differential diagnosis of Hb S, Hb D-Punjab, Hb Tak. **Clinica Chimica Acta**. 343:129-134
- Sodeman WA, Sodeman TM (1974). **Pathologic Physiology**. WB Saunders Company. Philadelphia. 6th edition. s 78-81
- Sonezaki S., Shinichi Yagi , Emika Ogawa , Akihiko Kondo (2000). Analysis of the interaction between monoclonal antibodies and human hemoglobin (native and cross-linked) using a surface plasmon resonance (SPR) biosensor. **Journal of Immunological Methods**. 238: 99–106
- Tadmouri G. O., Tüzmen Ş., Özçelik H., Özer A., Baig S. M., Senga E. B., Başak A. N. (1998). Molecular and population genetic analyses of β -thalassemia in Turkey. **American Journal of Hematology**. 57: 215-220
- Tadmouri G. O., Garguer N., Demont J., Perrin P., Başak A. N. (2001). History and origin of β -thalassemia in Turkey: Sequence haplotype diversity of β -globin genes. **Human Biology**.73: 661-674
- Tadmouri G. O., Basak A.N. (2001). β -thalassemia in Turkey: A review of the clinical, epidemiological, molecular, and evolutionary aspects. **Hemoglobin**. 2001. 25(2): 227-239
- Telefoncu A. (1999). Editör. Biyosensörler. Kuşadası-Türkiye. Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. **Tübitak Yayınları**. s 143-155
- Tuzmen S., A. N. Schechter (2001). Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating β -thalassemia mutations. **Blood Reviews**. Vol. 15. s 19-29
- Üstel E.. Anormal hemoglobinlerin SPR yöntemi ile gen düzeyinde tanısı. Yüksek lisans tezi. **Pamukkale Üniversitesi Sağlık bilimleri Enstitüsü**. Denizli. 2006
- Vostiar I, Tkac J, Mandenius CF. (2003). Monitoring of the heat-shock response in Escherichia coli using an optical biosensor. **Analytical Biochemistry**. 322. 156- 163.
- Walker JM, Rapley R. (2000). Molecular biology and Biotechnology. **The Royal Society of Chemistry**. England. s 155- 157.
- Weatherall DJ, Clegg JB.(2001). Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**. 79 (8):704- 712.
- Wajcman H. and etc. (2001). Abnormal hemoglobins: Laboratory methods. **Hemoglobin**. 25(2). 169-181
- Yıldız S., Atalay A., Bağcı H., Atalay E.Ö. (2005). Beta- thalassaemia mutations in Denizli province of Tukey. **Turkish Journal of Heamotology**. 22 (1), 19-23
- Yüregir G. (1990). **Klinik Biyokimya 1**.Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi yayınları No: 12. 1. Baskı. Adana, s 46-51.

7. ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında İzmir' de doğdum. İlk okul eğitimime Denizli' de başlayarak eğitimimi İzmir' in Torbalı ilçesinde tamamladım. Orta okul eğitimime yine Torbalı' da başlayarak, orta okul ve lise eğitimime Denizli' de devam ederek eğitimlerimi tamamladım. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü lisans programında 2003 yılında mezun oldum. Aynı yıl, Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım. Yüksek lisans eğitimim süresinde, 2005 yılında bir sene boyunca Macaristan' nın Szeged ilinde bulunan Biological Reserch Center' ın düzenlemiş olduğu International Training Course programına katıldım. 2006 yılının Eylül ayında Marie Curie Adonis bursunun desteklemiş olduğu doktora programına başladım. Halen, Szeged Üniversitesi Fen Fakültesi doktora programına kayıtlı olup çalışmalarına Biological Reserch Center' da devam etmekteyim.