



**ANORMAL HEMOGLOBİNLERİN SPR YÖNTEMİ İLE
GEN DÜZEYİNDE TANISI**

Emre ÜSTEL

**Temmuz 2006
DENİZLİ**

**ANORMAL HEMOGLOBİNLERİN SPR YÖNTEMİ İLE
GEN DÜZEYİNDE TANISI**

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

Emre ÜSTEL

Danışman: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

**Temmuz 2006
DENİZLİ**

TEŐEKKÖR

Tez çalıőmam boyunca bana teorik ve pratik bilgilerini sabırla aktaran, yardımlarını eksik etmeyen tez danıőmanım Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY'a ve anabilim dalımız öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Ayfer ATALAY'a sonsuz teőekkürlerimi sunarım. Yaőamım boyunca her türlü desteği veren, en değerli varlığım olan sevgili aileme ve eőime, çalışma süresince bana yardım eden tüm çalışma arkadaşlarıma teőekkürü borç bilirim.

Bu tezin tasarımı, hazırlanması, yürütülmesi, araştırılmalarının 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 : Emre ÜSTEL

ÖZET**ANORMAL HEMOGLOBİNLERİN SPR YÖNTEMİ İLE
GEN DÜZEYİNDE TANISI**

Üstel, Emre
Yüksek Lisans Tezi, Biyofizik ABD
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

Temmuz 2006, 40 Sayfa

Anormal hemoglobinler ve talasemiler, ülkemizde ve dünyada rastlanan en önemli kalıtsal sorunlardan biridir. 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- Coughatta, 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, birbirleri ile etkileşim kurabilen moleküller arasındaki etkileşimin incelenebilmesi, enzim ya da radyoaktif madde gibi herhangi bir işaretleyiciye gereksinim duyulmaksızın bu çalışmaların yapılabilmesini sağlayan bir biyosensör türüdür.

Bu tez çalışmasında, Hb S ve Hb C anormal hemoglobinleri 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 tanısı

ABSTRACT**SPR BASED MOLECULAR DIAGNOSIS OF ABNORMAL
HEMOGLOBINS AT GENE LEVEL**

Üstel, Emre

M. Sc.Thesis in Biophysics

Supervisor: Prof. Dr. Erol Ömer ATALAY

July 2006, 40 Pages

Thalasseмии and abnormal hemoglobins are one of the most important genetic diseases observed in the World populations 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-Cosuhatta 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 novel biophysical approach for the identification of biologically interacting molecules without using labelling systems. SPR is a real-time biosensor system which does not require any label for the detection of interacting molecules.

The aim of this thesis study is to diagnose the Hb S and Hb C mutations 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, Molecular diagnose

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 Hemoglobın yapısı ve işlevi	2
2.2 Hemoglobın türleri	3
2.3 Anormal hemoglobınler	5
2.4 Anormal hemoglobınlerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler ...	7
2.4.1 Hemoglobın elektroforezi	7
2.4.2 İzoelektrik odaklama	8
2.4.3 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	8
2.4.4 PCR ürünün restriksiyon enzim analizi	9
2.4.5 ARMS yöntemi	10
2.5 SPR spektroskopisi	11
2.5.1 Işığın kırılması: Snell kanunu	12
2.5.2 Plazmon rezonans	14
3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER	18
3.1 Genomik DNA izolasyonu	18
3.2 Mutasyonların bulunduğu bölgenin PCR yöntemi ile çoğaltılması ...	20
3.3 PCR ile çoğaltılan ürünün saflaştırılması	21
3.4 Saflaştırılan PCR Örneklerinin O.D ölçümü	22
3.5 SPR analizi	22
3.5.1 CMD küvetin aktive edilmesi ve avidin kaplanması ...	23
3.5.2 Avidin kaplı küvete biotinli PCR ürününün bağlanması ...	24
3.5.3 Tek iplikli PCR ürünü üzerine oligo problemlerin gönderilmesi ...	24
3.5.4 Biotinli PCR ürününün küvetten uzaklaştırılması	25
4. BULGULAR	26
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	33
6. KAYNAKLAR	37
7. ÖZGEÇMİŞ	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

	SAYFA
Şekil 2.1 Alfa ve beta globin genlerinin kromozomlar üzerindeki yerleşimi ...	4
Şekil 2.2 İnsan globin genlerinin üretim dönemleri şeması	4
Şekil 2.3 Beta globin geni ve bazı mutasyonların yerleri	5
Şekil 2.4 Hb J- İran örneğinin alkali ve asit ortamdaki elektroforezi	8
Şekil 2.5 Hb D-Los Angeles örneğinde EcoRI enzim kesimi	10
Şekil 2.6 Snell kanunu	13
Şekil 2.7 Toplam iç yansıma	13
Şekil 2.8 Evanescent alan oluşumu	15
Şekil 2.9 a) IAsys Affinity Sensör cihazının görünüşü	16
b) SPR cihazında kullanılan küvetin görünüşü	16
Şekil 2.10 CMD küvete bağlayıcı sabitlemesi ve etkileşim analizi	17
Şekil 3.1 SPR çalışmasında uygulanacak basamaklar	18
Şekil 3.2 Beta globin geninin çoğaltım bölgesi	20
Şekil 4.1 CM Dextran küvete avidin kaplanması	26
Şekil 4.2 Heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürününün bağlanması ve tek iplik hale getirilmesi sonucu alınan SPR sinyali	27
Şekil 4.3 Heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürünü üzerine normal prob gönderilmesi sonucu alınan SPR sinyali	28
Şekil 4.4 Normal oligo probun heterozigot Hb S içeren PCR ürününden uzaklaştırılması sonucu alınan SPR sinyali	28
Şekil 4.5 Heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürünü üzerine mutant prob gönderilmesi sonucu alınan SPR sinyali	29
Şekil 4.6 Heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürününün küvetten uzaklaştırılması sonucu alınan SPR sinyali	30
Şekil 4.7 Heterozigot Hb C içeren biotinli PCR ürününün küvete bağlanması sonucu alınan SPR sinyali	30
Şekil 4.8 Heterozigot Hb C içeren biotinli PCR ürünü üzerine normal prob gönderilmesi	31
Şekil 4.9 Heterozigot Hb C içeren biotinli PCR ürünü üzerine mutant prob gönderilmesi	32

TABLO DİZİNİ

	SAYFA
Tablo 2.1 Türkiye’de saptanan anormal hemoglobin türleri	6
Tablo 2.2 Denizli yöresinde evlilik öncesi çalışmalarda saptanan anormal hemoglobinler	7
Tablo 3.1 PCR karışımı	20
Tablo 3.2 PCR yöntemindeki primerlerin özellikleri	21
Tablo 3.3 PCR amplifikasyonunun koşulları	21
Tablo 3.4 Biotinli PCR örneklerinin derişimi ve yoğunluğu	22
Tablo 4.1 Bir küvete art arda bağlanan PCR ürünü sayısı ve alınan yanıt	32

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

ARMS	Allele özgü amplifikasyon yöntemi
CMD	Karboksimetil dekstran
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksiniükleotid trifosfat
EDC	1-etil-3-(3-dimetillaminopropil) 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
SSPE	Tuz sodyum fosfat-EDTA tamponu
STE	Tuz tris EDTA

1.GİRİŞ

Talasemiler ve anormal hemoglobinler, dünyada ve özellikle ülkemizin de yer aldığı Akdeniz kuşağında karşılaşılan en yaygın kalıtsal hastalıklardan bir tanesidir. Bu kalıtsal hastalıklar gen kaynaklı oldukları için, sağlıklı bireylerin doğmasına yardımcı olabilmek amacıyla hemoglobinopati kontrol programları uygulanmaktadır. Bu programlar doğrultusunda, evlilik öncesinde bireylerin molekül olarak kimliklendirilmesi sağlanmakta ve olası taşıyıcı evliliklerinde çiftler doğum öncesi molekül tanı yöntemleri hakkında bilgilendirilerek sağlıklı bireylerin doğmasına yardımcı olmaya çalışılmaktadır.

Hemoglobin bozuklukları protein ve gen düzeyinde yapılan çalışmalar ile tanımlanabilmektedir. Protein düzeyindeki tanı yöntemleri; hemoglobin elektroforezi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, HbA₂ miktarının saptanması gibi elektroforetik ve kromatografik yaklaşımları içermektedir. Gen düzeyindeki tanı yöntemleri ise; günümüzde daha çok, RFLP, SNP, nokta emdirim hibritleme, DNA dizi analizi ve benzeri yöntemler PCR tabanlı yaklaşımlara dayalı biçimde uygulanmaktadır. Ülkemizde yapılan çalışmalarda birçok farklı hemoglobin türü tanımlanmasının yanı sıra, beta talasemilerin gen düzeyindeki baz değişiklikleri tespit edilmiştir. Denizli yöresinde; evlilik ve doğum öncesi dönemde uygulanan hemoglobinopati kontrol programı çerçevesinde, Hb G-Coushatta [β 22(B4)Glu>Ala], Hb D-Los Angeles[β 121(GH4)Glu>Gln] ve Hb S [β 6(A3)Glu>Val] gibi anormal hemoglobin türleri sıklıkla gözlenmektedir. Elektroforetik ve kromatografik yöntemlere dayalı biçimde uygulanan evlilik öncesi tarama çalışmalarında, Hb G-Coushatta [β 22(B4)Glu>Ala], Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)Glu>Gln] gibi anormal hemoglobinler, orak hücre anemisine neden olan Hb S [β 6(A3)Glu>Val] ile karıştırılabilmektedir. Bu karışıklığın nedeni, bu tür anormal hemoglobinlerin Hb S ile özellikle alkali ortamda yapılan çalışmalarda, benzer elektroforetik ve kromatografik özellikler göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Bu nedenle hemoglobinopati kontrol programında saptanan bu tür anormal hemoglobinlerin gen düzeyinde tanımlanması daha bilgilendirici olması açısından önemlidir. Bu çalışmamızda; güncel ve yeni bir biyofiziksel yaklaşım olan SPR yaklaşımı kullanılarak, Hb S [β 6 (A3) (GAG--->GTG)] ve Hb C [β 6 (A3) (GAG--->AAG)] modellerinde molekül tanı yönteminin geliştirilmesi amaçlanmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1 Hemoglobin yapısı ve işlevi

Oksijenin taşınmasından sorumlu olan hemoglobin, kemik iliğinde oluşan ve morfolojik olarak çift yüzlü içbükey yapı gösteren kırmızı küreler (eritrositler) içerisinde yer alır. Hemoglobin üçüncül ve dördüncül yapısı X-ışını analizi ile ortaya konan ilk oligomerik proteindir. Perutz ve arkadaşlarının bu sonuçların elde edilebilmesinde önemli katkıları bulunmaktadır. Oksihemoglobinin 2.8 Å^olük seçicilik kullanılarak yapılmış modeli 1968, deoksihemoglobinin ise 1970 yılında ortaya konulmuştur (Perutz 1968, Briehl 1978, Finch 1973).

Hemoglobin, her biri içinde gömülü durumda hem grubu içeren ve globin olarak tanımlanan globinin dört alt birimlerinden oluşur. Bu alt birimler iki tane özdeş alfa (α veya ζ) ve iki tane beta (ϵ , γ , δ veya β) türü olarak tanımlanır. Bu yapılanması ile tetramerik bir protein olma özelliği taşıyan hemoglobin molekülü, kırmızı küreler içerisinde oksijen taşıma işlevini üstlenir (Ho 2000, Bermek 1997).

Hem grubu, globin molekülü yapısında yer alan hidrofobik bir çukura gömülü biçimde bulunur. Demir atomu, globin içerisine gömülü biçimde bulunan hem grubu ile düzlemsel-kare-düzenleşim kompleksi (*square planar coordination complex*) oluşturur. Bu yapılanma içerisindeki demir atomu, beş numaralı düzenleşim bağı ile globin yapısında yer alan F8 konumundaki histidin imidiazol grubunun nitrojen atomuna bağlıdır. Oksihemoglobinde altı numaralı düzenleşim bağı molekül oksijen ile deoksihemoglobinde ise globine ait F7 histidin ile oluşturulur. Demir atomunun çapı altı odaklı düzenleşim kompleksi oluşturduğunda, hem düzlemi içerisinde yer alabilecek genişliktedir. Oksijen ile veya F7 histidin ile bağ kurulmadığı konumda ise, kompleksin altıncı düzenleşim odağı ortadan kalktığından ötürü, demir atomu çapında bir genişleme oluşarak, demir atomu hem düzleminin 0.75 Å^o kadar dışında ve F8 histidine yakın konumda bulunmaktadır. Demir atomunun bu özelliği nedeni ile hem düzlemi içerisindeki hareketi doğal olarak globinin üç boyutlu yapısına da yansımaktadır. Bunun bir sonucu olarak oksijenlenme sürecinde hemoglobin molekülünün tümü, üç boyutlu uzayda yapı değişikliğine uğramaktadır. Bu yapısal değişikliklerin kararlı biçimde korunmasında, globin alt birimleri arasındaki tuz köprülerinin katkısı olduğu bilinmektedir. Tüm bu değişimlerin sonucunda; β_1 ve β_2 globin alt birimleri arasındaki

uzaklık 33.4 Å - 40.3 Å Oksi-Hb-deoksi-Hb arasında değişiklik gösterir. Bu değişken yapısal farklılıklar, oksijene ilgisi düşük olan T (*tight-sıkı*) ve yüksek olan R (*relaxed-gevşek*) formlar olarak tanımlanır (Wada 2002, Tekman 1981, Çelebi 2005, Nelson 2000).

Tetramerik bir protein olan hemoglobinin birincil yapısında, alfa ve beta globin genlerinin okunan bölgelerinde oluşabilecek mutasyonlar nedeni ile anormal hemoglobinler oluşmaktadır. Bu mutasyonlar, normal yapı ve işlevi değiştirebilecek düzeyde ise sağlık sorunlarına neden olan hemoglobin türleri oluşmaktadır. Bu tür hemoglobinlere örnek olarak, orak hücre anemisine neden olan Hb S [$\beta_6(A3)Glu>Val$] verilebilir.

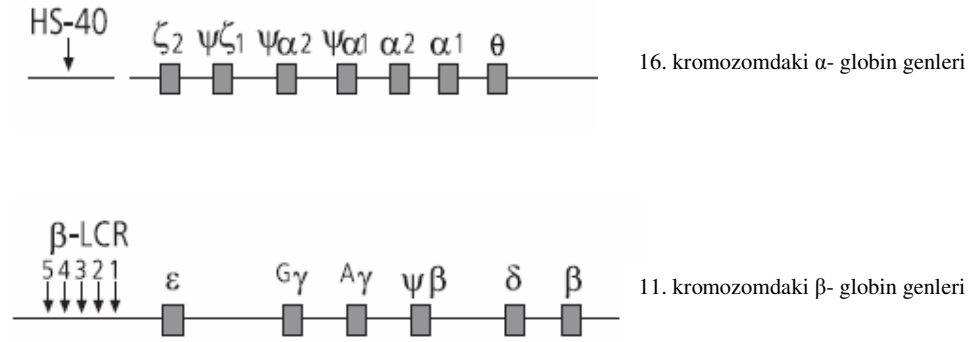
2.2 Hemoglobin türleri:

İnsan hemoglobin yapısı embriyonik, fetal ve erişkin yaşam boyunca değişim gösterir. Normal embriyonik hemoglobinler sırasıyla Hb Gower-1 ($\xi_2\varepsilon_2$), Hb Gower-2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) ve Hb Portland ($\xi_2\gamma_2$) olarak adlandırılır. Fetal yaşamda Hb F ($\alpha_2\gamma_2$), erişkin yaşamda ise Hb A ($\alpha_2\beta_2$) bulunmaktadır. Erişkin yaşamdaki hemoglobinler arasında aynı zamanda, Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) ve Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) yer almakta, ancak bunların toplam hemoglobin içerisindeki oranları, sırası ile % 1,0–4,0 ve % 0,0–2,0 arasında değişmektedir (Ho 2000).

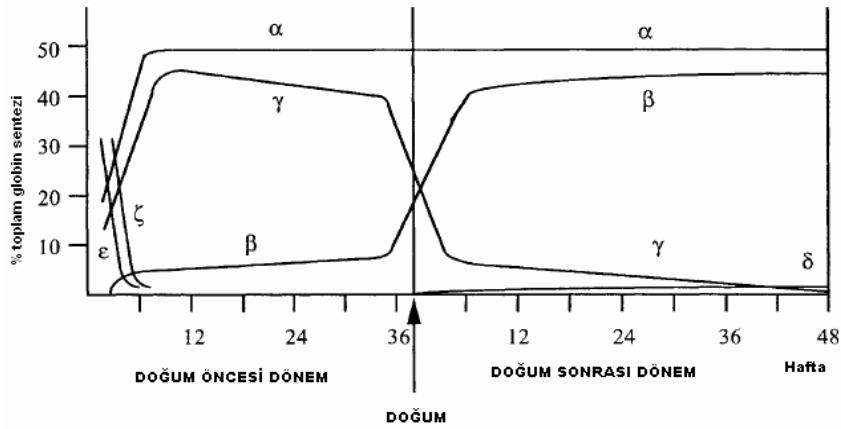
Yaşamın farklı evrelerinde gerekli olan hemoglobinlerin oluşabilmesi için gerekli olan alfa ve beta türü globinler genetik kontrol altında sentezlenmektedir. Alfa globin gen ailesi kromozom 16, beta globin gen ailesi kromozom 11'de yer almaktadır. Şekil 2.1'de bu genler ve kromozomlardaki yerleşimi gösterilmiştir. Sentezlenen globin türlerine özgü genler, ilgili evrede protein sentezi yapmakta, görevini tamamlayan genlerin ise işlevleri baskılanmaktadır. Şekil 2.2'de, yaşamın farklı evrelerinde sentezlenen hemoglobin türleri gösterilmektedir.

Globin genleri arasındaki en önemli benzerliklerden birisi, üç ekzon ve iki introndan oluşmalarıdır (Şekil 2.3). Bilindiği gibi, ekzonlarda yer alan DNA dizileri ilgili proteini kodlamaktadır. Ekzonlarda oluşabilecek olası mutasyonlar amino asit kodlarını değiştiriyor ise, yapısal ve/veya işlevsel özellikleri normalden farklılaşan anormal hemoglobinler ortaya çıkmaktadır (Weatherall 2001).

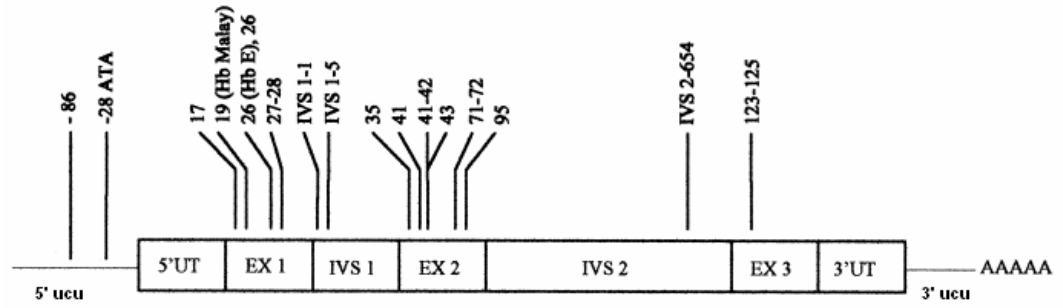
Bu tür anormal hemoglobinler; Hb S [$\beta 6(A3) \text{ GAG} > \text{GTG}$, Glu > Val] örneğinde olduğu gibi kalıtsal klinik sorun ortaya çıkarabildiği gibi herhangi bir klinik belirti vermeksizin de kalıtım yolu ile aktarılabilmektedir.



Şekil 2.1 Alfa ve beta globin genlerinin kromozomlar üzerindeki yerleşimi (Weatherall 2001)



Şekil 2.2 İnsan globin genlerinin üretim dönemleri şeması (Ho 1999)



Şekil 2.3 Beta globin geni ve bazı mutasyonların yerleri (Sirichotiyakul 2003)

2.3 Anormal hemoglobinler:

Kalıtsal hemoglobin bozuklukları, yapısal hemoglobin türleri ve talasemiler olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Yapısal hemoglobin türleri α ve β zincirlerindeki tek amino asit değişikliklerine neden olan mutasyonlar nedeni ile oluşurlar. Bu hemoglobin bozukluklarının birçoğu herhangi bir klinik belirti vermemekte, buna karşın bazı türleri hemoglobinin yapısal ve işlevsel özelliklerini değiştirerek klinik sorunlara neden olmaktadır (Çelebi 2005).

Dünyada bilinen 700'den fazla yapısal hemoglobin türü saptanmıştır. Bu anormal hemoglobin türlerinden Hb S, Hb C, Hb E ve Hb D sık rastlananlar içinde yer alır (Çelebi 2005). Bu anormal hemoglobinlerin hematolojik özellikleri ve elektroforetik hareketleri tanımlanmış ve ortaya çıkan bu farklı oluşumların molekül temelini mutasyonlar nedeni ile oluşan amino asit farklılıklarından meydana geldiği belirlenmiştir (Ahmed 2001). Bu anormal hemoglobin mutasyonlarının % 34'ü α globin zincirinde, % 55'i β globin zincirinde, %8'i γ globin zincirinde ve %3'ü δ globin zincirinde tanımlanmıştır. Birçok mutasyon tek nükleotit değişimiyle oluşmuş olsa da bazı mutasyonlar tek veya daha fazla nükleotit eklenmesiyle (*insertion*), çıkması ile (*deletion*) veya globin genlerinin yeniden düzenlenmesiyle oluşmuştur (Viprakasit 2004, Wajcman 2001).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda, Tablo 2.1'de gösterildiği gibi, yaklaşık olarak 42 anormal hemoglobin türü tanımlanmış olup, bunlardan 13 tanesi α globin zincirinde, 24 tanesi β globin zincirinde, 1 tanesi de δ globin zincirinde yer almaktadır (Altay 2002).

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

Anormal Hemoglobinin İsmi	Mutasyon
α - globin zincirinde oluşan 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 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 anormal hemoglobinler	
Hb F-Başkent	γ 128 (H6) Ala--->Thr (GCT--->ACT)

Denizli yöresinde yapılan çalışmalarda da çeşitli anormal hemoglobin türleri bulunmuş olup sıklıkları bildirilmiştir (Tablo 2.2) (Atalay 2005).

Tablo 2.2 Denizli yöresinde evlilik öncesi çalışmalarda saptanan anormal hemoglobinler (Atalay 2005)

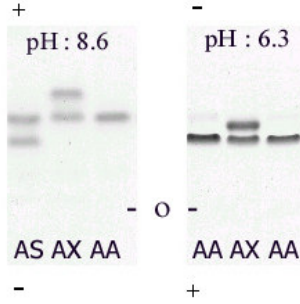
Anormal Hemoglobin İsmi	Mutasyon	Bulunma Yüzdesi (%)
Hb D- Los Angeles	$\beta 121(\text{GH4})\text{Glu} \rightarrow \text{Gln}$	57,8
Hb S	$\beta 6(\text{A3})\text{Glu} \rightarrow \text{Val}$	21,9
Hb G-Coushatta	$\beta 22(\text{B4})\text{Glu} \rightarrow \text{Ala}$	15,6
Hb E- Saskatoon	$\beta 22(\text{B4})\text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$	3,1
Hb C	$\beta 6(\text{A3})\text{Glu} \rightarrow \text{Lys}$	1,6

2.4 Anormal hemoglobinlerin tanımlanmasında kullanılan yöntemler

Günümüzde kullanılan protein ve gen düzeyindeki tanı yöntemleri, hemoglobin türlerinin tanımlanmasını ve bunların kimliklendirilmesini mümkün kılmaktadır. Alkali ve asit ortamda yapılan hemoglobin elektroforezi, izoelektrik odaklama ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi gibi protein düzeyindeki yöntemlerin yanı sıra, gen düzeyindeki tanı çalışmalarında PCR tabanlı yöntemler, hemoglobin türlerinin tanımlanmasında oldukça sık biçimde kullanılan yöntemlerdir.

2.4.1 Hemoglobin elektroforezi

Elektroforez yöntemi, hemoglobin türlerinin analizi için kullanılan yaygın bir yaklaşımdır. Bu yöntem, elektrik alanında farklı yükler içeren farklı globin zincirlerinin veya farklı hemoglobin türlerinin hareketine dayanır. Hemoglobinler alkali pH'da negatif yüklerle yüklenerek anoda doğru, asit ortamda ise pozitif yüklerle yüklenerek katoda doğru hareket etmektedirler. Hemoglobin elektroforezi için selüloz asetat ve agaroz yapıdaki membranlar kullanılmaktadır (Hartwell 2005). Ortam pH'sının etkisiyle farklı yük kazanan hemoglobin türleri asidik veya alkali ortamlarda birbirlerinden farklı hızlarda göç ederek birbirlerinden ayrılabilir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Hb J- İran örneğinin alkali ve asit ortamdaki elektroforezi (Köseler 2006)

2.4.2 İzoelektrik odaklama

Elektroforez tabanlı olan bu yöntem yüksek derecede ayırma kapasitesine sahiptir. Çalışılması oldukça zahmetli ve zaman alıcı bir yaklaşım olmasına rağmen hemoglobin türlerinin tanımlanmasında kullanılmaktadır. Net yüklerinin sıfır olduğu pH'da hemoglobin türlerinin göç etmesine dayanan bir yöntemdir. Hemoglobin varyantlarının göç sırası alkali elektroforezi ile aynıdır ve Hb C, Hb E, Hb O, Hb S, Hb D ve Hb G'yi birbirlerinden ayırabilir. Bunun yanında Hb A ve Hb F'i de ayırabilir. İzoelektrik odaklama metodunun ince tabaka gel ve kapiler olmak üzere iki farklı çeşidi vardır (Clarke 2000).

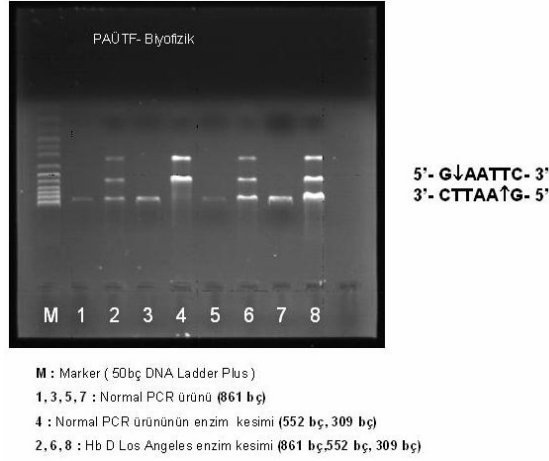
2.4.3 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde, sabit ve hareketli faz vardır. Kolon içerisinden hareketli fazın sürekli geçmesi için yüksek basıncın güç uygulaması gereklidir. Örnek solüsyon, sıvı hareketli faz ile birlikte sabit fazın arasından geçer. Örnek bileşenleri, sabit faz ile bileşiğin non-kovalent etkileşimine göre göç ederler. Etkileşim derecesi, göç derecesi ve bileşenlerin ayrılması ile tanımlanır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, talasemiler ve hemoglobin varyantlarının tanımlanmasında hızlı ve doğru sonuç verme yeteneğinde olduğundan önemli bir yöntemdir. HPLC yönteminde çok az miktarda kan, hemoglobin varyantlarının ayrılmasında yeterlidir (Clark 2004).

2.4.4 PCR ürünün restriksiyon enzim analizi

Restriksiyon endonükleazlar özgün nükleotit dizilerini tanıyarak kendilerine özgü biçimde belirli DNA dizilerini kesebilirler. Genomik DNA'dan PCR yöntemi ile çoğaltılan gen bölgesinde seçilen restriksiyon endonükleaz için bir kesim bölgesi bulunuyorsa, restriksiyon enzimi PCR ürününü keserek iki DNA parçasına ayıracaktır. Eğer çoğaltılan DNA parçasında enzim kesim bölgesi bulunmuyorsa restriksiyon endonükleaz kesim yapamayacaktır (Walker 2000). Bu tür bir çalışmaya örnek olarak Hb D-Los Angeles'ın [β 121 (GH4) Glu--->Gln] tanımlanması verilebilir. Hb D-Los Angeles [β 121 (GH4) Glu--->Gln], beta globin geninin 121. kodonunda gelişen GAA>CAA mutasyonu nedeni ile ortaya çıkmaktadır.

Bu mutasyonun bulunduğu bölge PCR yöntemi ile çoğaltılmakta ve EcoRI enzim kesim çalışması yapılmaktadır. EcoRI enzimi çift iplikli DNA (dsDNA-*double stranded*) üzerinde yer alan 5'-GAATTC-3' dizisini tanıyarak kesmektedir. Hb D-Los Angeles mutasyonu bu dizinin ilk sırasında yer alan GAA>CAA dönüşümüdür. Enzim bu dönüşümü tanıyamadığı için mutant allelde kesim yapamamaktadır. Şekil 2.5'de bu yaklaşım ile yapılmış bir çalışma örneklenmiştir. Bu yöntemin uygulanmasında karşılaşılan temel sorun, enzim tanıma bölgesinde gerçekleşebilecek başka mutasyonların da benzer sonuç vermesinden kaynaklanmaktadır. Tanıma bölgesinde yer alan GAA dizisi normal beta globin genine ait 121. kodonu kodlamaktadır. Diğer taraftan bu dizide farklı bir mutasyon olduğunda bu çalışmada elde edilecek sonuç Hb D-Los Angeles gibi gözükcektir. Buna bir örnek olarak Hb Beograd [β 121 (GH4) Glu-->Val] verilebilir. Hb Beograd aynı kodonda gelişen farklı bir mutasyon (GAA>GTA) türüdür. Elektroforetik ve kromatografik özellikleri Hb D-Los Angeles'a benzediğinden, yapılacak çalışmalarda Hb Beograd, Hb D-Los Angeles gibi sonuç verebilecektir. Bundan dolayı, ayırıcı molekülse tanı için özgün problemler ile nokta emdirimi (*dot-blot*) veya DNA dizi analizi çalışmalarının yapılması gerekmektedir.



Şekil 2.5 Hb D-Los Angeles örneğinde EcoRI enzim kesimi

2.4.5 ARMS yöntemi

ARMS nokta mutasyonların tanımlanmasında çok yaygın olarak kullanılan PCR tabanlı bir yöntemdir. Allele özgü amplifikasyon 3' ucu nükleotidinin özgünlüğüne bağlı olarak gerçekleşir. Hedef genomik DNA ortak primer ve hedeflenen mutasyon için allele özgün primer karşılığı ile çoğaltılır. PCR primerinin 3' nükleotidinin özdeşliği hedef DNA bölgesinin çoğaltımının başarısı için önemlidir. Mutasyona özgü primer içeren tüp içerisinde mutant allel varlığı PCR ürününün elde edilmesini sağlar. Eğer bu nükleotidin hedef dizide karşılığı yoksa hedef DNA bölgesinin çoğaltımı gerçekleşmez. Bir başka deyişle mutant primer normal dizi ile eşleşmeyerek normal DNA'yı çoğaltamaz. ARMS-PCR kuramsal olarak bilinen mutasyonları ortaya çıkarma avantajına sahiptir. ARMS-PCR, hızlı, pahalı olmayan ve işaretli primere gerek duyulmayan tanımlama metodudur. Birden fazla mutasyon birden fazla ARMS primerleri kullanılarak tek PCR ile görüntülenebilir (Old 2003, Newton 1989).

2.5 SPR spektroskopisi:

Madde ve ışık etkileşimleri, özellikle biyolojik olayların incelenmesinde, analizinde ve derişimin belirlenmesinde günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır. Madde ve ışık etkileşimini özetlememiz gerektiğinde bu konuda ilk tanımlanması gereken kavram, Hertz tarafından bulunan ve fotoelektrik olay olarak da bilinen, yüzeyi ışık ile karşılaşan bir metalden elektronların yayılmasıdır. Fotoelektrik etki, metaldeki bir elektrona tek bir fotondan enerji aktarılması sonucu ortaya çıkar. Madde-ışık etkileşimini temel alan SPR spektroskopisi, aynı zamanda, gerçek zamanlı madde-madde etkileşiminin herhangi bir işaretleyici kullanılmaksızın izlenebilmesini olanaklı kılan bir biyosensör sistemidir.

Biyosensörler adından da anlaşıldığı gibi, biyolojik molekülleri kullanan gelişmiş ve duyarlı algılama sistemleridir. Canlılara bu uyarıları algılamayı mümkün kılan biyolojik maddelerin analiz sistemleri ile birleştirilmesi biyosensörlerin geliştirilebilmesine olanak tanımıştır. Biyosensörlerin temel işlevi biyolojik bir olayın elektriksel sinyallere dönüştürülerek elde edilecek verilerin değerlendirilmesini kolaylaştırmaktır. Biyosensörler, biyolojik algılayıcı (*reseptör*) ve fiziksel dönüştürücü (*transducer*) bileşenlerden oluşmaktadır. Biyosensörlerin yapısında görev alan biyobileşenler genellikle biyoreseptör olarak adlandırılır. Bu biyoreseptörler arasında en yaygın kullanılanlar enzimler, antikorlar, mikroorganizmalar ve nükleik asitlerdir. Dönüştürücüler, reseptörlerin biyolojik yanıtının ölçülebilir fiziksel bir sinyale dönüştürmektedirler. Biyosensörler tıp, biyoteknoloji, tarım, gıda, eczacılık, çevre kirliliği, savunma sanayi gibi birçok konuda kullanım alanı bulmaktadır (Telefoncu 1999, Sonezaki 2000, Zourob 2005, Emanuel 2000).

Son yirmi yılda kimyasal ve biyolojik miktarların belirlenmesinde optik sensörlerin geliştirilmesi için çok sayıda araştırma yapılmıştır. İlk optik kimyasal sensör, absorpsiyon spektrumundaki değişiklikleri ölçme temeline dayalı olup, CO₂ ve O₂ derişimlerinin ölçülmesi için geliştirilmiştir. Daha sonra elipsometri, spektroskopi (luminesans, fosforesans, floresans, Raman), interferometri ve yüzey plazmon rezonans gibi optik yöntemlere dayalı sistemler biyosensör olarak kullanılmaya başlanmıştır (Homola 2005).

1982 yılında Nylander ve Liedberg, SPR'ı gaz algılayıcı ve biyosensör olarak kullanılabileceğini gösteren çalışmalar yapmışlardır. SPR tabanlı tanı sistemleri fizik, kimya ve biyoloji alanlarındaki çalışanların ilgisini çekmiş ve bu şekilde kullanım alanları genişleyerek yaygınlaşma eğilimi göstermiştir.

SPR tabanlı sensör teknolojisi, biyomolekül sel etkileşimin herhangi bir işaretleyiciye gerek olmadan gerçek zamanlı biçimde izlenmesine olanak sağladığı için lider teknoloji haline dönüşmüştür (Homola 1999). SPR sistemleri, optik ve plazmon rezonansı olarak bilinen iki fiziksel ilkenin birlikte kullanımı ile ortaya çıkan gerçek zamanlı biyomolekül sel etkileşim analizi sistemi olarak tanımlanmaktadır.

2.5.1 Işığın kırılması: Snell kanunu:

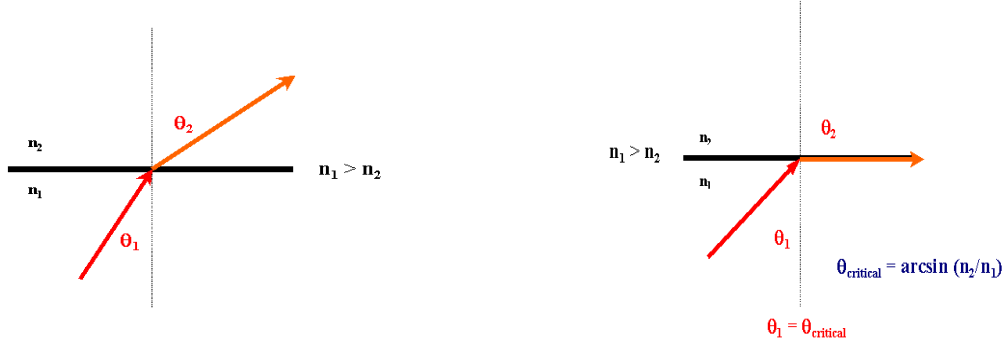
Işık bir ortamdan farklı bir ortama geçerken, iki ortamın fizikokimyasal özelliklerine bağlı olarak doğrultusunda değişiklik olur. Işık yolunun bu değişimine kırılma adı verilmektedir. Bir ışık ışınının saydam bir ortamdan diğerine geçerken doğrultusunun değişmesindeki temel sebep, farklı ortamlarda farklı hızlarda gitmesidir.

Bu özelliklere bağlı olarak, maddenin kırılma indisi (n), ışığın boşluktaki hızı (c) su, hava gibi saydam ortamlardaki hızının (v) oranıyla belirlenmekte ve;

$$n = \frac{\text{ışığın boşluktaki hızı } c}{\text{ışığın ortamdaki hızı } v} = \frac{c}{v}$$

eşitliği ile gösterilmektedir.

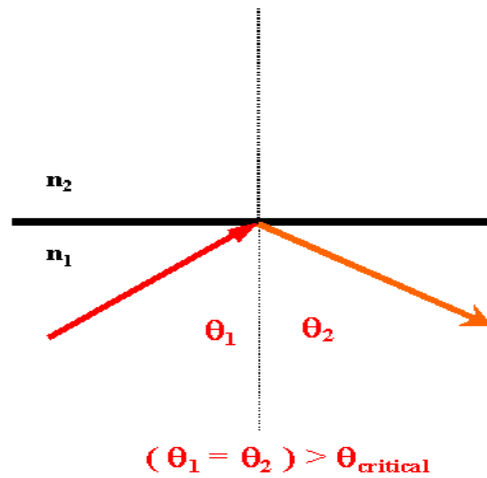
Snell kanuna göre ışık bir ortamdan başka bir ortamın sınırını geçerken $n_1 \sin \theta_1$ çarpımı sabit kalmakta ve $n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2$ olarak ifade edilmektedir. Şekil 2.6'da özellikleri gösterilen Snell kanununa göre; $n_2 > n_1$ ise, ışık demeti normale doğru bükülür; $n_2 < n_1$ ise, demet normalden uzaklaşacak şekilde bükülür ve iki ortam arasındaki yüzeye dik gelen ışınlar yön değiştirmeden ikinci ortama girerler. Snell kanunu göz önüne alındığında $n_2 < n_1$ olduğu durumunda geliş açısına bağımlı olarak θ_2 açısı 90° 'ye ulaştığında ışık n_1 ve n_2 ortamlarının birleşim yerinde yüzeye paralel olarak devam eder (Bueche 2000).



Şekil 2.6 Snell kanunu

Hiçbir açının sinüsü 1'den büyük ($\sin 90^\circ = 1.00$) olmadığı göz önüne alındığında, ışığın geliş açısı yeterince büyükse iki ortamın birleşim sınırında ışık geriye yansımaya Şekil 2.7'de gösterildiği gibi gelişecektir. Bu olaya toplam iç yansımaya denir.

Toplam iç yansımaya kuralına göre, yansıyan ışık açısı, gelen ışığın açısına eşit olmaktadır. Işığın bu özelliği, optik fiberlerin çalışma prensibini oluşturmaktadır. Optik fiberler yumuşakça bükülmüş cam olup bir uçtan giren ışık kırılmalarda toplam iç yansımaya uğrayarak, bir cismin karmaşık yapısının resmini bir yerden başka bir yere nakledebilir. Optik fiberler tıp ve biyolojik alanlarda yaygın olarak kullanılmasının yanı sıra düşük enerji kayıplarından dolayı haberleşmede de kullanılmaktadır (Bueche 2000).



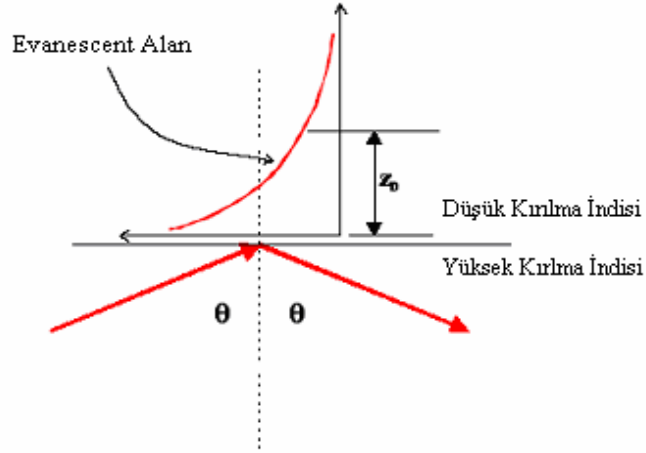
Şekil 2.7 Toplam iç yansımaya

2.5.2 Plazmon rezonans:

SPR spektroskopisinde kullanılan diğer fizik ilkesi ise plazmon rezonansıdır. Plazmon, bir metal yüzeyindeki yük yoğunluğu dalgasıdır. Bir başka deyişle, yüzey plazmon rezonans, metal ve dielektrik sabiti arasındaki ilişki gibi, zıt işaretlerin dielektrik sabiti ile iki ortamın ara yüzeyinde bulunabilen yük-yoğunluk titreşimleridir. Yük yoğunluk dalgaları elektromanyetik dalgalar ile birleştirilir.

Işık bir metal yüzeye çarptığında metalik iletkenlik elektronlarınca oluşturulan plazmonu uyarır. Plazmon rezonansı kritik bir ışık dalga boyunda ve geliş açısında oluşur ve bu durumda metal yüzeyinden yansıyan ışık minimumda kalır. Dielektrik/metal/dielektrik şeklinde bir düzenlemede kritik açı metale komşu ortamın dielektrik sabitine çok bağlıdır.

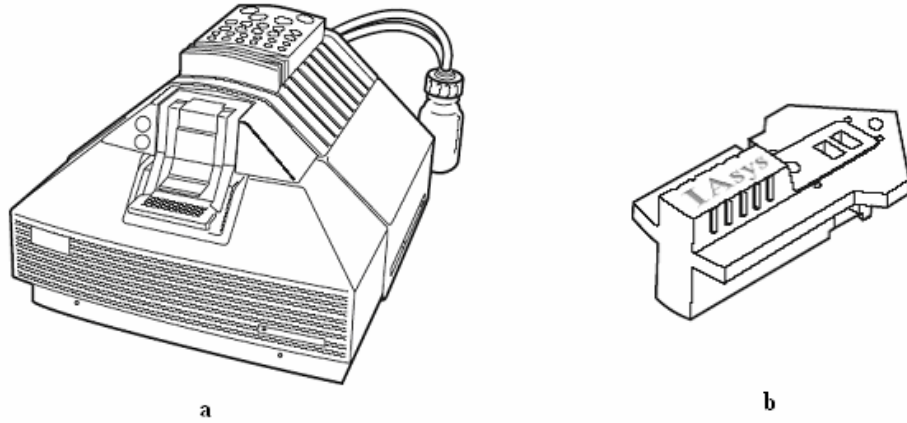
Uygun dalga boyunda ışığın metal yüzeye çarpması, metal yüzeyinde *evanescent* alan adı verilen, yüzeyden uzaklaştıkça sonsuzda sönümlenen bir elektromanyetik alan oluşturur. Toplam iç yansımaya neden olan bir kritik açıyla metalik yüzeye gelen ışık, metalin yüzeyinde oluşan *evanescent* alan etkisiyle ışığın dönüş açısında değişiklik oluşturur. Metal yüzeyine farklı moleküllerin kovalent bağlanması veya metal yüzeyine kovalent bağlanan moleküllerle sıvı ortamdaki moleküllerin etkileşimleri bu elektromanyetik alanda değişikliklere neden olmaktadır (Şekil 2.8). *Evanescent* alanda oluşan bu değişimler ışığın dönüş açısındaki değişikliklerinin tespit edilmesine ve bu şekilde molekülse etkileşimlerin doğasının saptanması mümkün olmaktadır. Işık, kırılma indisi farklı iki materyalin ara yüzeyinde yansıdığı anda ışık enerjisi tamamen yansıyan ışığın yayıldığı madde içinde tutulamaz. İkinci bir materyal içinde, yansıma noktasından uzakta enerjide etkili bir azalma vardır. Bu alan arka alan olarak tanımlanır, çünkü enerji bu yönde yayılamaz. Arka alan mesafesi ışığın dalga boyu ile karşılaştırılabilir bir mesafedir ve büyüklüğü ışığı geçiren materyalin kırılma indisleri, ışığın gelme açısı ve dalga boyu ile ayarlanabilir (Uslan 1999).



Şekil 2.8 Evanescent alan oluşumu

Snell kanunu ve plazmon rezonans ilkelerinin bir arada kullanıldığı SPR spektroskopisinde, altın veya gümüş metal yüzey olarak kullanılmaktadır. SPR spektroskopisi, 670 nanometre dalga boyunda lazer etkisiyle altın tabaka üzerindeki biyomolekül sel etkileşimleri algılamak üzere tasarlanmıştır. Altın yüzeye sabitlenen hedef biyomolekülün (bağlayıcı, ligand) diğer biyomoleküllerle (bağlanan, ligate) bağlanabilme hevesliliği (affinity), detektör tarafından algılanan ışığın saniyedeki açılal değışiminin (arc sec) zamana bağıli grafiğı (kinetik eğri), moleküller arası bu etkileşimin doğası hakkında bilgi verir. Bu kinetik eğri, hem yüzeye bağlanan molekül miktarı (derişim), hem de iki molekül arasındaki birleşme - ayrılma (assosiasyon-dissosiasyon) kinetikleri hakkında yüksek kesinlikle ayrıntılı bilgi vermektedir (de Jong 2005).

Bizim laboratuvarımızda bulunan Şekil 2.9a'da gösterilen IAsys Affinity Sensör, molekül sel etkileşimlerin gerçek zamanlı, nicel olarak izlenmesini sağlayan bir sistemdir. Ölçümler, Şekil 2.9b'de gösterilen iki tane mikro kuyu içeren küvette, moleküllerin doğal ortamlarındaki koşullar gibi yapılabilmekte ve işaretlemeye veya örneklerin saflaştırılmasına gerek duyulmamaktadır. Bu özelliğı ile canlı hücreler de test sistemi olarak kullanılabilir.



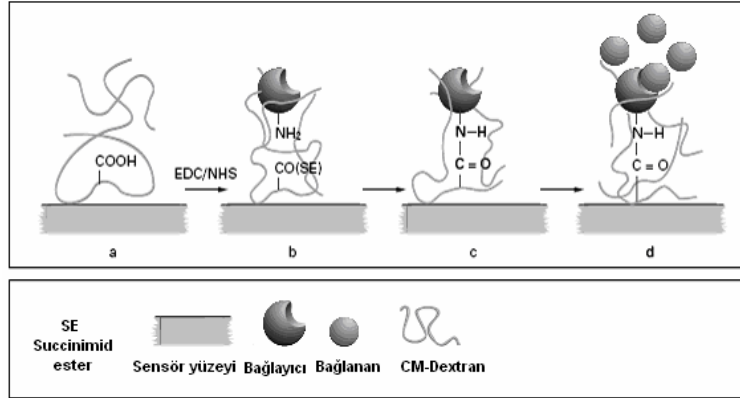
Şekil 2.9 a) IA sys Affinity Sensör cihazının görünüşü
b) SPR cihazında kullanılan küvetin görünüşü

Işık rezonant açıda çift tabakadan geçer ve rezonant tabakada yayılır. Tünel oluşturma yöntemi dönüşümlüdür ve ışığın kaçmasına izin verir. Faz bulma, sadece rezonant tabakada yayılan ışığın bileşenlerini ayırmak için kullanılır.

Işığın *evanescent* alanı rezonant tabakada yayılır, sensör yüzeyinde de bağlanma olayları incelenir. *Evanescent* alanın yoğunluğu sensör yüzeyinden uzaklaştıkça eksponensiyel olarak azalır. Hızla azalan alan yoğunluğu sadece sensör yüzeyine yakın olan etkileşimleri ve alan içindeki bağlı ligandların kontrolünü sağlar.

IA sys optik sensörü, özellikle *evanescent* alan içinde meydana gelen kırılma indisindeki en küçük değişimlere yanıt verir. Bu sensör derişim hesaplanmasında moleküllerin tanımlanmasında, birden fazla moleküler etkileşimin belirlenmesi gibi birçok alanda kullanılabilir.

IA sys Affinity Sensör cihazında kullanılan CMD küvet, protein ve nükleik asitlerinde içinde bulunduğu biyomoleküler etkileşimlerin geniş oranda uygulamasında kullanılır. Bağlayıcılar CMD yüzeye kovalent olarak tutunurlar. Bağlayıcıların CMD yüzeye kovalent olarak tutunmaları için EDC/NHS gereklidir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10 CMD küvete bağlayıcı sabitlenmesi ve etkileşim analizi

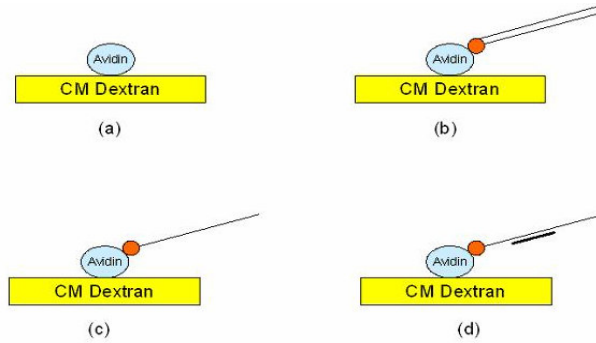
CMD küvette etkileşim analizlerinin yapılabilmesi için öncelikle CMD küvetin aktive edilmesi gerekir (Şekil 2.7a). Dekstranın karboksimetil grupları, NHS-esterleri aktive etmek için değiştirilir. Daha sonra amino grupları içeren avidin gibi bağlayıcılar eklenir. Böylece proteinin amino grupları ile NHS yer değiştirir (Şekil 2.7b). Kovalent sabitlemeden sonra (Şekil 2.7c) etkileşim analizinin yapılabilmesi için biotin gibi bağlanan yapılar gönderilir (Şekil 2.7d). Böylece sensör yüzeyinde meydana gelen etkileşimler analiz edilebilir. IAsys Affinity Sensör cihazında etkileşim analizleri için CMD küvetten başka, amino, karboksilat ve biotin kaplı küvetler de kullanılır.

Bu tür bağlayıcı ve bağlanan moleküller arasındaki etkileşimleri yapabilmek için en iyi modellerden bir tanesi avidin-biotin ilişkisidir. Avidin, biotin için dört bağlanma bölgesi içeren tetramerik bir proteindir. Avidin, EDC/NHS yardımı ile CMD yüzeye kolayca sabitlenir ve sonra biotinli molekülleri tutabilir. Bu tutma yaklaşımı ilgi çekicidir; çünkü biotinli moleküllerin avidine bağlanabilme hevesliliği oldukça yüksektir ve bundan dolayı aralarındaki ilişki ortamın koşullarıyla kolayca bozulmaz.

SPR sensör teknolojisi tıp, biyoteknoloji ve ilaç kontrolü gibi birçok önemli alanda biyolojik ve kimyasal maddelerin analizi ve tanımlanması için gereklidir. SPR spektroskopisi, biyolojik ve kimyasal örnekleri yüksek özgünlük ve duyarlılıkla tanımlamasının yanında bu analizlerin düşük maliyetli olması bu sensörün kullanımı oldukça artmıştır. Gelecekte SPR teknolojisi daha da geliştirilerek her alanda kullanılması sağlanabilecektir.

3. GEREÇLER VE YÖNTEMLER

Bu tez çalışmasında kullanılan örnekler, Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı DNA Bankasından alınmış olup, daha önce molekül sel tanı yöntemleriyle mutasyonları tanımlanmıştır. Model olarak kullanılan Hb S [$\beta 6$ (A3) (GAG--->GTG)] ve Hb C [$\beta 6$ (A3) (GAG--->AAG)] anormal hemoglobinlerini içeren beta globin gen bölgesi uygun primerler kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Daha sonra SPR spektroskopisi ile yapılacak analizde izlenecek yol, Şekil.3.1'de şematize edildiği gibi CMD küvete avidin kaplanması (a), avidin- biotin ilişkisi ile PCR ürününün bağlanması (b), çift iplikli PCR ürününün tek iplikli hale getirilmesi (c) ve ilgili problemlarla etkileşimlerinin (d) yapılması basamaklarından oluşur.



Şekil 3.1 SPR çalışmasında uygulanacak basamaklar

3.1 Genomik DNA izolasyonu:

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 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı atıldı.
3. Çökelti üzerine 1x retikülosit salin çözeltisi eklendi ve 600 g'de 15 dakika santrifüjlendi. Bu yıkama işlemi en az üç kez yapıldı.
4. Son yıkamadan sonra hücre çökeltisi üzerine üç ml soğuk lizat çözeltisi eklendi ve çözelti berraklaşınca kadar buz içerisinde bekletildi. Çözelti berraklaştıktan sonra 1900 g'de 15 dakika santrifüjlendi ve üst sıvı atıldı.
5. Nükleer pellet 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 µg/ml derişiminde proteinaz-K ve % 1 SDS eklendi.

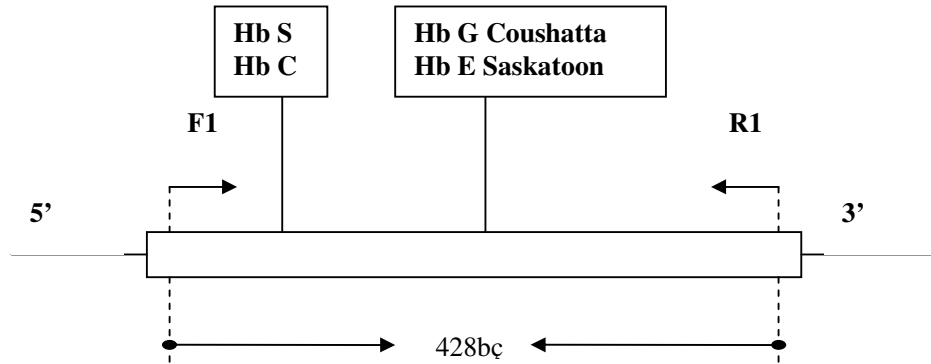
7. Tüp 37 °C'ta 2-4 saat veya gece boyu bekletildi.
8. İnkübasyondan alınan tüp üzerine eşit miktarda doymuş fenol çözeltisi eklendi ve 11.000 g'de 15 dakika santrifüj yapıldı ve üst sıvı temiz mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
9. Üst faz üzerine eşit miktarda, kloroform / izoamilalkol (24:1) eklendi ve 11.000 g'de 15 dakika santrifüjlendi.
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 dakika santrifüj yapıldı.
12. Etanol atıldıktan sonra steril saf su ile çözüldü.
13. Elde edilen DNA'nın derişimi ve optik yoğunluğu (O.D₂₆₀) değeri DNA Fotometre (*Eppendorf*) ile ölçüldü.

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 çözeltisi:**
 - Sodyum klorür, 100 mM
 - Tris-HCl, 10 mM
 - EDTA, 1 mM
- **Proteinaz K (Amresco, 20mg/ml)**
- **10 x SDS**
 - 10 gr SDS, 100 ml distile suda çözülür.

3.2 Mutasyonların bulunduğu bölgenin PCR yöntemi ile çoğaltılması:

Hb S, Hb C, Hb G-Coushatta, Hb E-Saskatoon ve Hb E gibi anormal hemoglobinlerin bulunduğu, beta globin geninin 428 bç uzunluğundaki bölgesi PCR yöntemiyle çoğaltıldı (Şekil 3.2). Belirli miktarlarda PCR bileşenleri konularak 50µl'lik karışım hazırlandı (Tablo 3.1). Bu PCR karışımı içerisinde bulunan primerlerin dizisi ve büyüklükleri Tablo 3.2'de verilmiştir. PCR işleminde, heterozigot Hb S (HbAS) ve Hb C(Hb AC) içeren DNA'lar kullanılmıştır.



Şekil 3.2 Beta globin geninin çoğaltım bölgesi

Tablo 3.1 PCR karışımı

PCR bileşenleri	Tek tüp içerisindeki miktar	Reaksiyon Derişimleri
DNA(0,03µg/µl)	3 µl	0,09µg/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 300(10pmol/µl)	2 µl	20 pmol
PAM 303(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 özellikleri

Primer Adı	Primer Dizisi	Büyüklüğü
PAM 300	5'-Biotin-ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC-3'	20-mer
PAM 303	5'-CAA AGG ACT CAA AGA ACC TC-3'	20-mer

Çoğaltmak istediğimiz gen bölgesinin çoğaltımı için ısı döngü cihazında (*Technogene Thermo Cycler*) Tablo 3.3' deki şekilde ısı döngüsü uygulandı. Bu çoğaltım reaksiyonu daha sonra %1'lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme cihazında (*UVItec*) görüntülendi.

Tablo 3.3 PCR amplifikasyonunun koşulları

Olay	Sıcaklık	Süre	Döngü
Denatürasyon	94 °C	30 s	30
Primer Bağlanması (<i>annealing</i>)	55 °C	15 s	
Uzama (<i>extension</i>)	72 °C	30 s	
Son Uzama (<i>final extension</i>)	72 °C	3 d	1

3.3 PCR ile çoğaltılan ürünün saflaştırılması:

PCR ile çoğaltılan genomik DNA' nın saflaştırılması için *EZ-10 Spin Column PCR Product Purification Kit* kullanıldı. Aşağıda sıralanan basamaklar uygulandı.

1. PCR reaksiyonu karışımı, 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne konuldu ve üzerine üç hacim bağlama tamponu (Binding Buffer) eklendi.
2. Karışım solüsyonu, kolon içerisine aktarıldı ve iki dakika oda sıcaklığında bekletildi. Daha sonra 5000 rpm' de iki dakika santrifüj yapıldı.
3. Kolon içerisinden geçen sıvı atıldı. Yıkama tamponu (Wash Solution Buffer) üzerine dört hacim %96-100 etanol eklenerek kullanıma hazırlandı. Daha sonra kolon içine 500 µl yıkama tamponu eklendi ve 8000 rpm bir dakika santrifüjlendi.
4. Kolon içerisine tekrar 500 µl yıkama tamponu eklendi ve 10.000 rpm bir dakika santrifüjlendi.
5. Kolon 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 30-50 µl toplama tamponu eklendi. Oda sıcaklığında iki dakika bekletildikten sonra 10.000 rpm bir dakika santrifüj yapıldı.
6. Tüp içerisinde toplanan PCR ürünü kullanılmaya hazırlandı.

3.4 Saflaştırılan PCR örneklerinin O.D ölçümü:

Saflaştırılan biotinli PCR ürünlerinden 5 µl alındı ve üzerine 45 µl dH₂O eklendi. 1:10 oranında sulandırılan örneklerin derişimi ve optik yoğunluğu (O.D₂₆₀) DNA Fotometre'de (*Eppendorf*) ölçüldü (Tablo 3.4).

Tablo 3.4 Biotinli PCR örneklerinin derişimi ve yoğunluğu

PCR Ürünleri	Derişim	260nm/280nm
Hb AS (100991)	35 ng/µl	2,01
Hb AS (101211)	30 µg/µl	1,80
Hb AS (101213)	40 ng/µl	1,73
Hb AC (100200)	35 ng/µl	2,16

3.5 SPR analizi:

Kullanılan çözeltiler:

- **EDC stok (1,15 gr):** 15 ml steril distile suda çözüldü.
- **NHS stok (200 mg):** 15 ml steril distile suda çözüldü.
- **Asetat buffer (10 mM, pH;5) (1 lt):** 2 M asetik asit ile pH ayarlandı.
CH₃COONa : 0,82 gr
- **PBS (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)**
- **5 X SSPE (pH;6,8) (1 lt) :**
NaCl: 43,5 gr
NaH₂PO₄.2H₂O : 6,9 gr
EDTA: 1,85 gr

3.5.1 CMD küvetin aktive edilmesi ve avidin kaplanması

IASys SPR optik sensör cihazında CMD küvetin aktive edilmesi ve üzerine avidin kaplanması için, cihazın kullanma kılavuzundaki Protokol 1.1 uygulandı. Öncelikle avidin (Sigma A-9275, St. Louis, MO-63178, USA) asetat buffer (10mM, pH:5.0) ile çözüldü ve derişimi 200 µg/ml olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra cihazın deney parametreleri, sıcaklık 22 °C, karıştırıcı hızı %85, örnekleme aralığı bir saniye olarak ayarlandı. Küvet, 80 µl hacmi olan iki tane mikro kuyu içerir. Bunlardan sadece bir tanesi avidin ile kaplandı. Diğer kuyu avidin ile kaplanmayıp kontrol kuyusu olarak kullanıldı.

1. CMD küveti SPR cihazının içine yerleştirdikten sonra üç defa 50 µl PBST ile yıkandı. Dengeye gelmesi için 10 dakika beklendi. Daha sonra beş dakika kayıt alındı.
2. Yüzeyi aktive etmek için 200 µl EDC ile 200 µl NHS karıştırıldı. Bu EDC/NHS karışımından 40 µl eklenerek kuyular iki defa yıkandı ve yedi dakika kayıt alındı.
3. Üç defa 50 µl PBS/T ile yıkandı ve bir dakika kayıt alındı.
4. Üç defa 40 µl asetat buffer (10 mM pH 5,5) ile küvet yıkandı ve bir dakika kayıt alındı.
5. Küvetin 1 no'lu kuyusuna 40 µl avidin (200 µg/ml) eklendi. Diğer kuyu kontrol amaçlı olduğu için avidin kaplaması yapılmadı.
6. Dört dakika kayıt alındıktan sonra 50 µl PBS/T ile kuyular yıkandı ve bir dakika kayıt alındı.
7. Reaksiyona girmeyen NHS-ester bağlarını bloklamak için 40 µl etanolamin (1 M pH 8,5) ile iki defa yıkandı ve üç dakika kayıt alındı.
8. Üç defa 50 µl PBS/T ile kuyular yıkandı ve bir dakika kayıt alındı.
9. Kovalent olmayan bağların küvetin yüzeyinden ayrılması için üç defa 40 µl 10 mM HCl ile yıkadıktan sonra iki dakika kayıt alındı.
10. Üç defa 50 µl PBS/T ile küvet yıkandı ve bir dakika kayıt alındı. Daha sonra ne kadar avidin kapladığımız hesaplandı.

3.5.2 Avidin kaplı küvete biotinli PCR ürününün bağlanması:

Avidin kaplı küvete biotinli PCR ürünü bağlanması için cihazın deney parametreleri, sıcaklık 25 °C, karıştırıcı hızı %85, örnekleme aralığı bir saniye olacak şekilde ayarlandı. Biotinli PCR ürünleri liyofilize edildikten sonra 40 µl PBS/T ile çözüldü.

1. Küvet üç defa 50 µl PBS/T ile yıkandı, dört dakika kayıt alındı.
2. 30 µl PCR ürünü + 50 µl PBS/T karışımı hazırlandı. Küvetin her iki kuyusuna hazırlanan PCR ürünü – PBS/T karışımından 40 µl eklendi ve 12 dakika kayıt alındı.
3. Her iki kuyu üç defa 50 µl PBS/T ile yıkandı ve bir dakika kayıt alındı.
4. Biotinli PCR ürününü tek iplikli hale getirebilmek için 40 µl 40 mM NaOH-1M NaCl çözeltisi ile üç defa yıkandı ve üç dakika kayıt alındı.
5. Her iki kuyu üç defa 50 µl PBS/T ile yıkandı ve iki dakika kayıt alındı.
6. Biotinli PCR ürünü avidin-biotin etkileşimi ile 1 no'lu kuyuya bağlandı.

3.5.3 Tek iplikli PCR ürünü üzerine oligo problemlerin gönderilmesi:

Küvete bağlanan biotinli PCR ürünü ilk önce tek iplikli hale getirildi. Daha sonra üzerine normal oligo prob olan PAM 305 eklendi. Normal prob, biotinli PCR ürününden uzaklaştırıldıktan sonra mutant oligo prob olan PAM 306 gönderildi. Hibridizasyon reaksiyonu için cihazın deney parametreleri, sıcaklık 25 °C, karıştırıcı hızı %85, örnekleme aralığı bir saniye olacak şekilde ayarlandı.

1. Küvet 50 µl 5X SSPE ile üç defa yıkandı ve beş dakika kayıt alındı.
2. 40 µl PAM 305 (10 pmol/µl), 40 µl 5X SSPE ile birleştirilerek 80 µl'lik karışım hazırlandı. Aynı şekilde 40 µl PAM 306(10 pmol/µl) ile 40 µl 5X SSPE birleştirildi.
3. Küvetin her iki kuyusuna derişimi 5 pmol/µl olan normal probdan (PAM 305) 40 µl eklendi ve dört dakika kayıt alındı.
4. Küvet 50 µl 5X SSPE ile üç defa yıkandı ve bir dakika kayıt alındı.
5. İlk kuyuda biotinli PCR ürünü ile etkileşen normal probu küvetten uzaklaştırmak için 50 µl 50 mM NaOH eklendi ve iki dakika kayıt alındı.
6. Küvet 50 µl 5X SSPE ile üç defa yıkandı ve üç dakika kayıt alındı.

7. Küvetin her iki kuyusuna derişimi 5 pmol/ μ l olan mutant probdan (PAM306) 40 μ l eklendi ve üç dakika kayıt alındı.
8. Küvet 50 μ l 5X SSPE ile üç defa yıkandı ve bir dakika kayıt alındı.

3.5.4 Biotinli PCR ürününün küvetten uzaklaştırılması:

Küvete bağlanan tek iplikli biotinli PCR ürünü, küvete başka örnek bağlamak için uzaklaştırılır. Uzaklaştırma reaksiyonu için cihazın deney parametreleri, sıcaklık 25 °C, karıştırıcı hızı % 85, örnekleme aralığı ise bir saniye olacak şekilde ayarlandı.

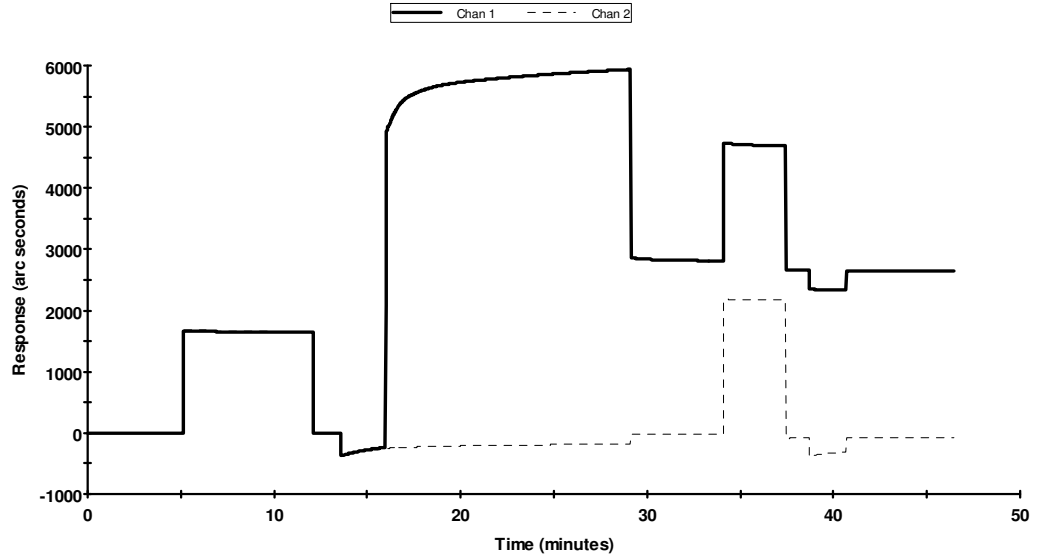
1. Küvet 50 μ l PBS/T ile üç defa yıkandı ve üç dakika kayıt alındı.
2. Her iki kuyuya 40 μ l 20 mM HCl eklendi ve iki dakika kayıt alındı. Böylece biotinli PCR ürünü küvetten uzaklaştırıldı.
3. Küvet 50 μ l PBS/T ile üç defa yıkandı ve dört dakika kayıt alındı.

4.BULGULAR

Çalışılan Hb S ve Hb C örnekleri, Biyofizik Anabilim dalına ait olan hemoglobin arşivinden alınmış olup anonim biçimde kullanıldı.

Anormal hemogloblin olan Hb S [$\beta 6$ (A3) (GAG--->GTG)] ve Hb C [$\beta 6$ (A3) (GAG-->AAG)] taşıyan kişilerden elde edilen DNA'lerden PCR uygulaması sonucunda 428 bç'lik bölge çoğaltıldı. 5' ucu biotinli olan PCR örnekleri avidin kaplı SPR küvetine bağlanarak, normal ve mutasyona özgü olan problemlerle olan etkileşimleri incelendi.

SPR çalışmasında ilk aşama, CMD küvete avidin kaplanmasıdır. CMD küvet hacmi 80 μ l olan iki tane mikro kuyu içerir. Her iki kuyu EDC / NHS ile aktive edildikten sonra sadece 1 no'lu kuyu 200 μ g/ml avidin ile kaplanmış olup, 2 no'lu kuyu ise avidin ile kaplanmadı. Böylece 2 no'lu kuyu solüsyon değişimlerinden oluşan farkı ortadan kaldırmak için avidin ile kaplanmayıp kör alınması için kullanıldı. Avidin ile kaplanan kuyudan alınan SPR yanıtı yaklaşık olarak 2500 -3000 arc saniye kadardır (Şekil 4.1).

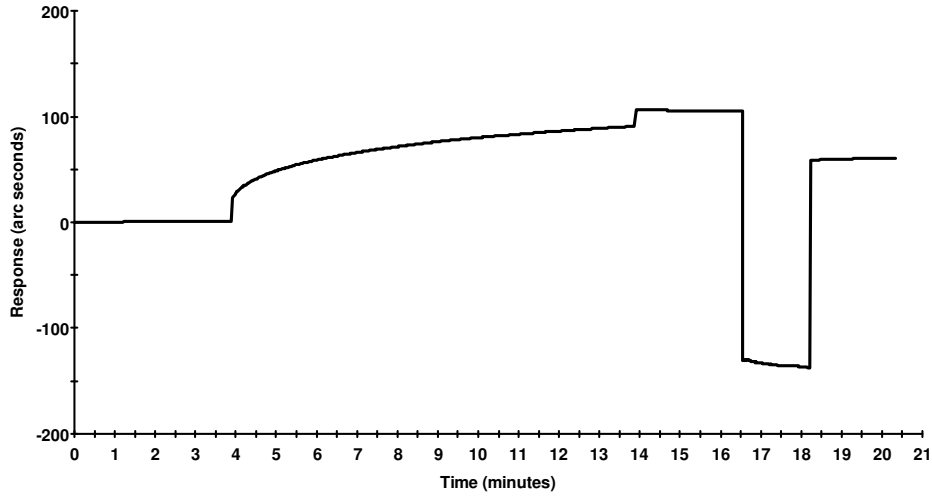


Chan 1. Avidin ile kaplı küvet

Chan 2. Avidin ile kaplanmayan küvet

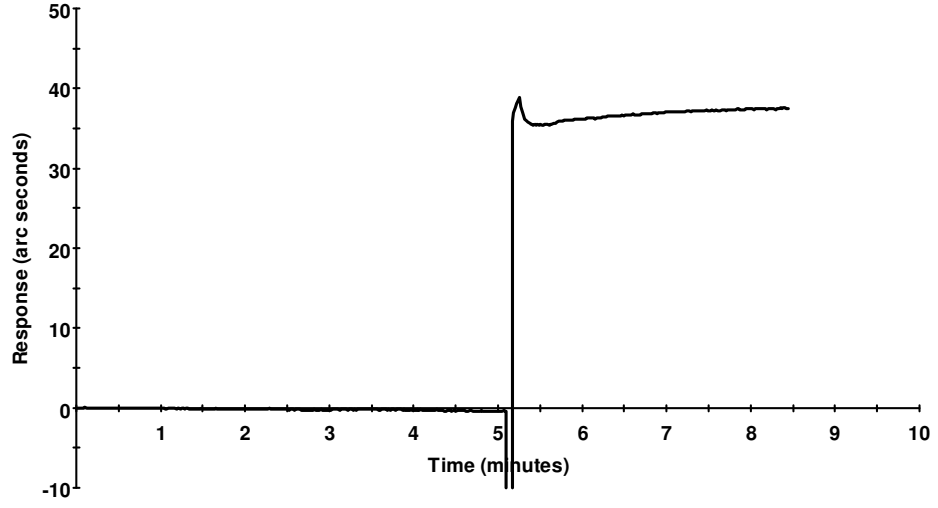
Şekil 4.1 CMD küvete avidin kaplanması

SPR analizinin ikinci aşamasında, Hb S [$\beta 6$ (A3) (GAG--->GTG)] mutasyonunu heterozigot formda taşıyan bireyden elde edilen 5' – biotinli PCR ürünü, avidin kaplı olan 1 no'lu kuyuya bağlandı. 5' – biotinli çift iplikli (ds) PCR ürünü avidin – biotin etkileşimi ile küvete bağlandıktan sonra 40 mM NaOH-1M NaCl çözeltisi eklenerek tek iplikli (ss) PCR ürünü haline getirildi. Çift iplikli PCR ürününün bağlanmasıyla alınan yanıt 100 arc saniye, daha sonra tek iplik haline getirilmesiyle alınan yanıt yaklaşık 50 arc saniye kadardır (Şekil 4.2).



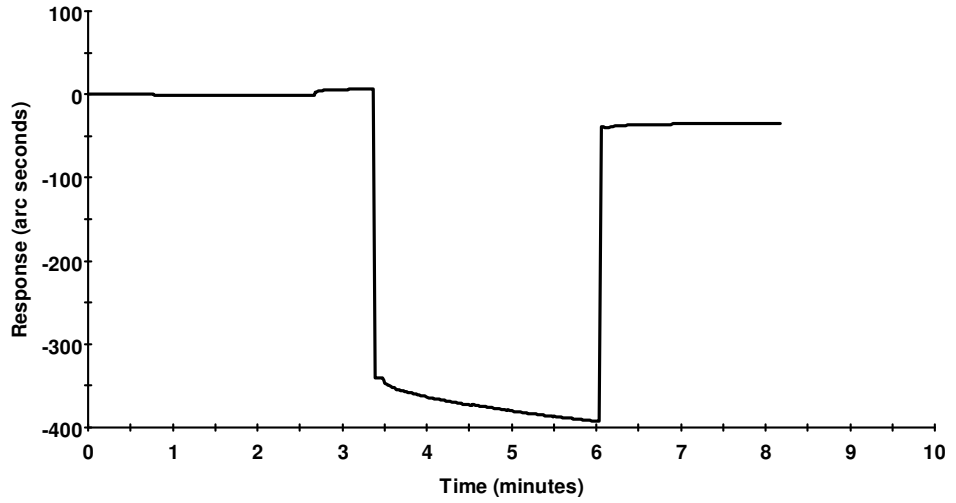
Şekil 4.2 Heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürününün bağlanması ve tek iplik haline getirilmesi sonucu alınan SPR sinyali

Heterozigot Hb S (Hb AS) olan biotinli PCR ürünü küvete bağlanıp, tek iplikli hale getirildikten sonra üzerine normal prob gönderildi. Normal prob, heterozigot olan Hb S'in normal allel ile etkileşim gösterdi. Bu normal allel- normal prob etkileşimi sonucu alınan yanıt 40 arc saniye kadar olmuştur (Şekil 4.3).



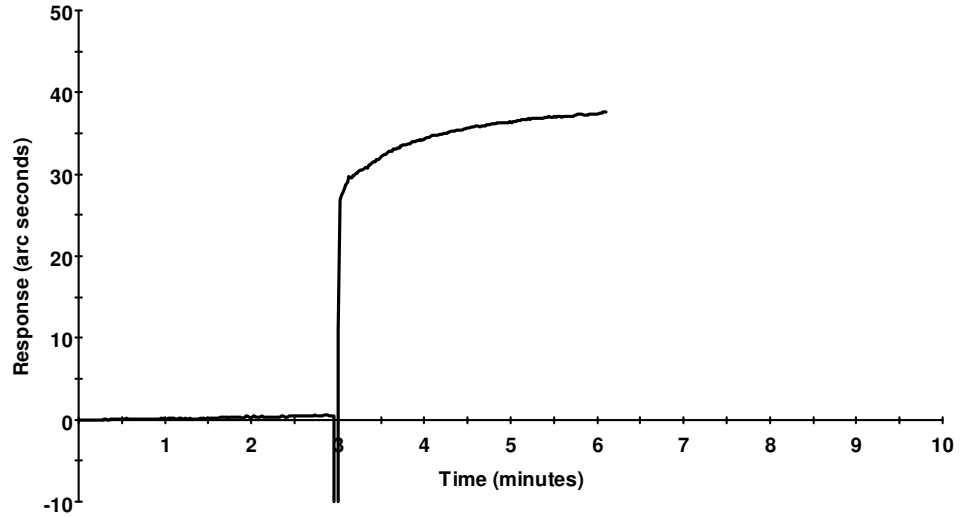
Şekil 4.3 Heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürünü üzerine normal prob gönderilmesi sonucu alınan SPR sinyali

Heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürünü ile etkileşen normal oligo prob, üzerine 50 mM NaOH eklenmesiyle PCR ürününden uzaklaştırıldı (Şekil 4.4).



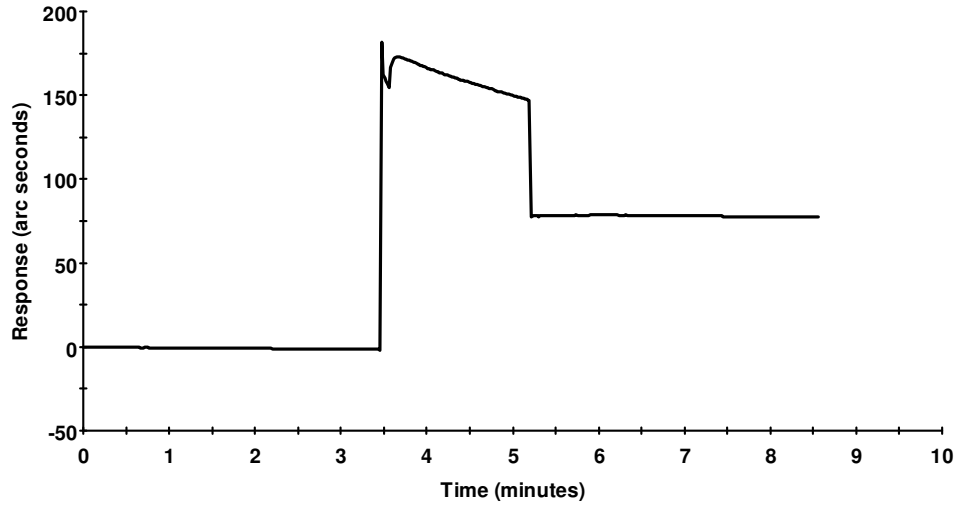
Şekil 4.4 Normal oligo probun heterozigot Hb S içeren PCR ürününden uzaklaştırılması sonucu alınan SPR sinyali

Normal oligo probun uzaklaştırılmasıyla rejenere edilen kuyu içerisine, heterozigot Hb S'in mutant alleli ile etkileşim gösterecek mutant oligo probu gönderildi. Böylece heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürünü – prob etkileşimi sonucunda alınan yanıt yaklaşık olarak 35 arc saniye kadardır (Şekil 4.5).



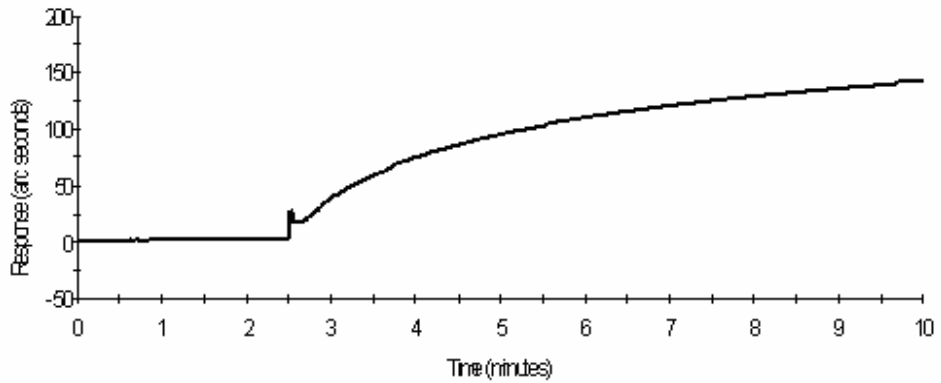
Şekil 4.5 Heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürünü üzerine mutant prob gönderilmesi sonucu alınan SPR sinyali

Heterozigot Hb S örneği için yapılan SPR analizinin son aşaması, heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürününün küvetten uzaklaştırılmasıdır. Avidin – biotin etkileşimi ile küvete bağlanan biotinli PCR ürünü 20 mM HCl eklenerek küvetten uzaklaştırıldı. Bunun sonucunda alınan yanıt bizim küvete bağladığımız PCR ürünü kadar olmuştur (Şekil 4.6).



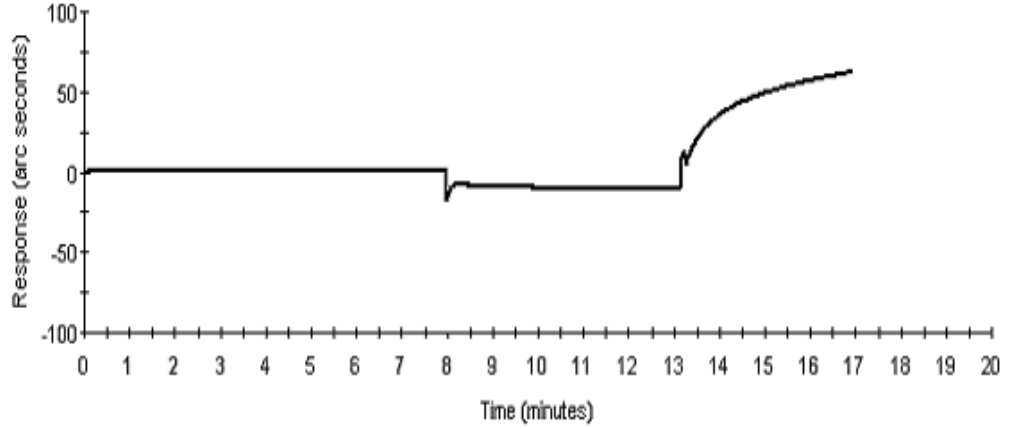
Şekil 4.6 Heterozigot Hb S içeren biotinli PCR ürününün kuvetten uzaklaştırılması sonucu alınan SPR sinyali

Daha sonra aynı avidin kaplı CMD küvet üzerine heterozigot Hb C [$\beta 6$ (A3) (GAG-->AAG)] anormal hemoglobini içeren biotinli PCR ürünü eklendi. Heterozigot Hb C içeren biotinli PCR örneği avidin kaplı olan 1 no'lu kuyuya bağlandı. Bu bağlanma sonucunda yaklaşık olarak 150 arc saniye kadar yanıt alınmıştır (Şekil 4.7).



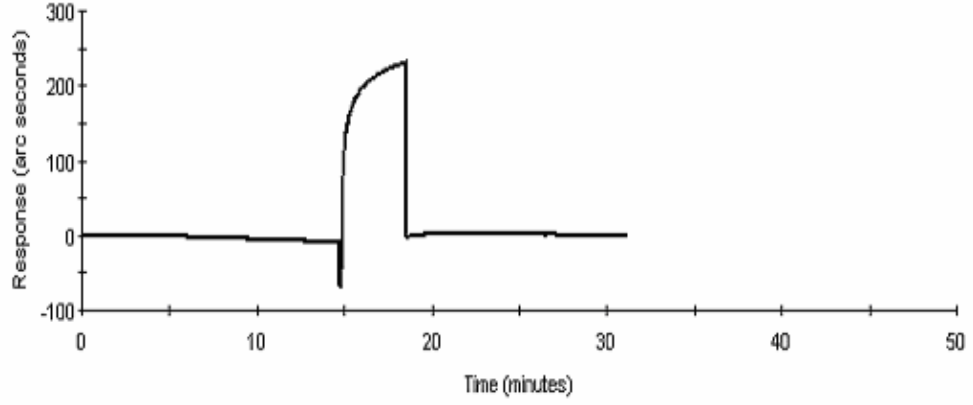
Şekil 4.7 Heterozigot Hb C içeren biotinli PCR ürününün kuvete bağlanması sonucu alınan SPR sinyali

Çift iplikli heterozigot Hb C içeren biotinli PCR ürünü küvete bağlandıktan sonra 40 mM NaOH-1M NaCl çözeltisi eklenerek tek iplikli PCR ürünü haline getirildi. Tek iplikli PCR ürünü üzerine normal allele özgü olan normal prob gönderildi. Bu etkileşim sonucu alınan yanıt yaklaşık 60 arc saniye kadar olmuştur (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 Heterozigot Hb C içeren biotinli PCR ürünü üzerine normal prob gönderilmesi sonucu alınan SPR sinyali

Normal probu PCR ürününden uzaklaştırmak için 50 mM NaOH eklendi. Daha sonra heterozigot Hb C içeren biotinli PCR ürününün mutant alleli ile etkileşecek olan mutant prob gönderildi. Mutant allel- mutant prob etkileşimi sonucu alınan yanıt 240 arc saniye kadardır (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Heterozigot Hb C içeren biotinli PCR ürünü üzerine mutant prob gönderilmesi sonucu alınan SPR sinyali

Yapılan çalışmanın son kısmında ise CMD küvet avidin ile kaplandıktan sonra kaç defa PCR ürününün bağlandığını ve bunlardan nasıl sonuç alabileceğimiz incelendi. Çalışmada, rastgele seçilen heterozigot Hb S içeren PCR ürünleri kullanıldı (Tablo 4.1).

Tablo 4.1 Bir küvete art arda bağlanan PCR ürünü sayısı ve alınan yanıt

Küvete bağlanan PCR ürünleri	Etkileşim sonucu alınan yanıt (arc san)
1.	150 arc saniye
2.	100 arc saniye
3.	60 arc saniye
4.	30 arc saniye
5.	10 arc saniye

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Talasemi ve hemoglobin bozuklukları, gerek ülkemizde ve gerekse de dünyada rastlanan en önemli kalıtsal sorunlardan bir tanesidir. Her ne kadar bu kalıtsal sorunlar öncelikli olarak Akdeniz kuşağında gösterilmiş olsa da yapılan çalışmalarda tüm dünyada değişik oranlarda varlığı gösterilmiştir. Sorun gen kaynaklı olduğundan sağlıklı bireylerin doğmasına yardımcı olabilmenin tek yolu, günümüzde prenatal tanı uygulamalarının yapılabilmesidir. Bu nedenle, gerek dünyada ve gerekse ülkemizde hemoglobinopati kontrol programları uygulanmaktadır. Bu programlardaki temel yaklaşım, özellikle evlilik öncesi dönemde bireylerin molekül sel olarak kimliklendirilmesinin sağlanmasıdır. Bu şekilde evlilik öncesi taramadan geçmiş taşıyıcı çiftlerin sağlıklı çocuklara sahip olabilmelerine katkıda bulunulması mümkün olmaktadır. Denizli İl Sağlık Müdürlüğü verilerine göre, yöremizdeki beta talasemi ve anormal hemoglobin sıklığı % 3,5 düzeyindedir. Denizli yöresinde evlilik öncesi tarama programına dayalı olarak yapılan bir çalışmada % 57,8 Hb D-Los Angeles [β 121 (GH4) Glu--->Gln], % 21,9 Hb S [β 6(A3)Glu--->Val], % 15,6 Hb G-Coushatta [β 22(B4)Glu--->Ala], % 3,1 Hb E-Saskatoon [β 22(B4)Glu--->Lys] ve % 1,6 oranında Hb C'nin [β 6(A3)Glu--->Lys] varlığı gösterilmiştir (Atalay 2005). Bu sonuçlar doğrultusunda, yöremizde rastlanan anormal hemoglobinler arasında Hb D-Los Angeles [β 121 (GH4) Glu--->Gln] ve Hb G-Coushatta'nın [β 22(B4)Glu--->Ala] beklenenden yüksek oranda bulunduğu gösterilmiştir. Bu hemoglobin türleri herhangi bir sağlık sorunu yaratmamakla birlikte, elektroforetik ve/veya kromatografik yöntemlerle yapılan evlilik öncesi tarama ve tanımlama çalışmalarında orak hücre anemisine yol açan Hb S [β 6(A3)Glu--->Val] ile sıklıkla karıştırılabilmektedir. Bunun nedeni ise; Hb D-Los Angeles [β 121 (GH4) Glu--->Gln] ve Hb G-Coushatta'nın [β 22(B4)Glu--->Ala] alkali ortamdaki elektroforetik ve DE-52 kolon kromatografisindeki özelliklerinin Hb S [β 6(A3)Glu--->Val] ile benzer olmasından kaynaklanmaktadır. Alkali ortamda yapılan elektroforezde, Hb S [β 6(A3)Glu--->Val], Hb D-Los Angeles [β 121 (GH4) Glu--->Gln], Hb G-Coushatta [β 22(B4)Glu--->Ala] ve Hb Beograd [β 121 (GH4) Glu--->Val] benzer elektroforetik hareketlilik göstermektedir. Asit hemoglobin elektroforezinde ise Hb S dışındaki hemoglobinler Hb A ile benzer elektroforetik davranış ortaya koymaktadır. Benzer problemler kromatografik yöntemlerde de geçerlidir. Bu anormal hemoglobinlerin sahip olduğu mutasyonların gen düzeyinde saptanması sorunu çözmemekte ve bazı özel durumlarda yeterli veri sağlayamamaktadır. Buna bir örnek

olarak Hb D-Los Angeles'ın [β 121(GH4)(GAA--->CAA)] gen düzeyinde tanımlanmasında önerilen restriksiyon enzim çalışması verilebilir. EcoRI enzimi çift iplikli DNA dizisi üzerinde yer alan 5'-GAATTC-3' dizisini tanıyarak kesilme özelliği taşımaktadır. Hb D-Los Angeles [β 121(GH4)(GAA--->CAA)]'ın saptanmasında 121. kodonda oluşan mutasyon nedeniyle enzim kesim yeri ortadan kalkmakta ve normal dizi ile Hb D-Los Angeles mutasyonu taşıyan dizi ayırt edilebilmektedir. Buna karşın, yöremizde rastlanan Hb Beograd [β 121 (GH4) (GAA--->GTA)] mutasyonu da 121.kodonda yer almaktadır. Aynı kodonda yer alan iki farklı hemoglobin türünün ayırıcı tanısı EcoRI enzim kesimi ile tanımlanamamaktadır. Benzer elektroforetik davranış ve EcoRI kesimleri nedeni ile ayırıcı molekül tanı için DNA dizi analizi gerekmektedir.

Denizli yöresindeki hemoglobin çeşitliliği, evlilik öncesi tarama programında önem kazanmaktadır. Bireylerin evlilik öncesi dönemde doğru biçimde tanımlanması, bu programın prenatal tanıya katkısı için temel gereksinimdir. Yöremizde Hb D-Los Angeles-beta talasemi kombinasyonları da bildirilmiştir (Yıldız 2005). Hb D-Los Angeles ve Hb G-Coushatta-beta talasemi kombinasyonları, elektroforetik ve kromotografik olarak yapılan evlilik öncesi tarama uygulamalarında yanıltıcı sonuçlar vermektedir. Evlilik öncesi tarama çalışmaları alkali hemoglobin elektroforezi, DE-52 kromotografisi veya benzer biçimde HPLC sistemleri ile yapılmakta ve hemogram ile desteklenmektedir. Olası anormal hemoglobin saptandığında, bu hemoglobinin tanımlanabilmesi için, PCR uygulamasını temel alan RFLP, SNP, nokta emdirim hibridizasyon ve dizi analizi gibi özel laboratuvar ve uzmanlık gerektiren ileri yöntemlerin kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Belirtilen bu yaklaşımlar tarama programı için yüksek maliyet taşımaktadır.

Tez çalışmasının yürütüldüğü Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı hedefleri içerisinde genetik sorunların doğru biçimde tanımlanmasına yönelik bir öngörüm planı bulunmaktadır. Beta globin geni üzerinde yer alan anormal hemoglobinler, bu planlama içerisinde yer alan modellerden bir tanesidir. Bu tez çalışmasında, molekül tanıda yer alabilecek niteliklere sahip bir biyofiziksel yaklaşım olan SPR spektroskopisi kullanılmıştır.

SPR spektroskopisi, birbirleri ile etkileşim kurabilen moleküller arasındaki etkileşimlerin tanımlanmasında kullanılan güncel bir biyofiziksel yaklaşımdır. Bu yaklaşımda, enzim, radyoaktif madde gibi herhangi bir işaretleyiciye gereksinim duyulmamaktadır. Tüm bu özellikleri ile SPR spektroskopisi gerçek zamanlı etkileşim

analizi tabanına dayalı bir biyosensör türüdür. Bu yöntem enzim-substrat, protein-protein, protein-nükleik asit, nükleik asit-nükleik asit ve hormon-reseptör gibi birçok etkileşim türünde kullanım alanı bulabilmektedir. Bu kullanım alanı içerisinde canlı hücrelerinde hedef olarak yer aldığı örnekler vardır (Emanuel 2000, Oh 2004, Vostiar 2003). Feriotto ve ark. 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 2004, Feriotto 2004). Feriotto ve arkadaşlarının yaptığı çalışma beta-talasemi mutasyonları modelinde yapılmış ilk uygulamadır. Anormal hemoglobinler modelinde ise anabilim dalımız bünyesinde yapılan, Hb S [β_6 (A3) (GAG--->GTG)] mutasyonuna ilişkin çalışma bu alanda yayınlanan üçüncü makaledir. Bu makalede, heterozigot ve homozigot Hb S [β_6 (A3) (GAG--->GTG)] mutasyonlarının SPR sistemi ile gen düzeyinde ayırıcı tanısını yapılabildiği gösterilmiştir (Atalay 2006).

Bu tez çalışmasında, anormal hemoglobin olan Hb S [β_6 (A3) (GAG--->GTG)] ve Hb C [β_6 (A3) (GAG--->AAG)] model olarak kullanılıp SPR yöntemi ile gen düzeyinde tanısının yapılması amaçlanmıştır. Bu iki anormal hemoglobinin ortak noktası her ikisinin de aynı kodonda yer almasıdır. Bu doğrultuda daha önceden tanımlanmış, heterozigot Hb S ve Hb C içeren DNA örnekleri kullanılmıştır. Bu DNA örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı hemoglobinopati DNA arşivinden alınmıştır. DNA arşivinde yer alan örnekler için kişilerden “Bilgilendirilmiş Onay Formu” alınmakta ve örnekler çalışmalarda anonim olarak kullanılmaktadır. Bu her iki anormal hemoglobinin bulunduğu, beta globin geninin 428 bç uzunluğundaki bölgesi, uygun primerler kullanılarak PCR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Elde edilen PCR ürünleri, 5' primerlerinin biotinli olması nedeni ile avidin ve streptavidin gibi moleküllere bağlanabilmektedir. Çalışmamızda SPR küvetine hedef DNA bağlanmasında bu yaklaşım kullanılmıştır. Biotin-avidin ilişkisi ile küvete bağlanan PCR ürünleri 40 mM NaOH-1M NaCl çözeltisi ile tek iplikli hale dönüştürülmüş ve 11 mer'lik oligo probalar ile mutasyonlar izlenmiştir. Mutasyonların izlenmesinde, heterozigotluk ve homozigotluk, normal ve mutant probalar kullanılarak gözlenmiştir. SPR kayıtları alındıktan sonra probaların uzaklaştırılmasında 50 mM NaOH kullanılmış ve küvetin nötralizasyonu PBS/T ile sağlanmıştır. Çalışma tamamlandıktan sonra hedef DNA'ların küvet ile olan ilişkisi (avidin-biotin ilişkisi) 20 mM HCl uygulamasını izleyen PBS/T nötralizasyonu ile gerçekleştirilmiştir.

Heterozigot Hb S örneğinde normal ve mutant problemler ile alınan SPR kayıtları 35-40 arc saniye (Şekil 4.3– 4.5), heterozigot Hb C ile elde edilen SPR kayıtları ise normal prob için 60 arc saniye, mutant prob için ise 250 arc saniye olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8– 4.9). Hb C ile elde edilen SPR sinyalinin yüksekliğinin nedeni bilinmemektedir. Bu sinyal yüksekliğinin, model sistemin rutine uygulanması sürecinde gözden geçirilmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda kullanılan model sistem, işaretli problemlerin kullanıldığı nokta emdirimi (dot-blot) hibritleme yöntemi ile temelde aynıdır. Buna karşın SPR sistemi, nokta emdirimi hibritleme yöntemine göre çok daha hızlı olup herhangi bir işaretleyiciye gereksinim duymamaktadır. Diğer taraftan yöntemin bir diğer üstünlüğü hedef prob eşleşmesindeki T_m değerinden bağımsız olmasıdır. Yöntem bu üstünlükleri ile kısa sürede ve sabit sıcaklıkta analizlerin yapılabilmesini olanaklı kılmaktadır.

Hb S ve Hb C gibi nokta mutasyonlarında izlenen bilgi, tek nükleotid farklılığından kaynaklanmaktadır. Bu farklılığın algılanması SPR yöntemi ile kesin, doğru ve hızlı biçimde gerçekleştirilebilmektedir. Restriksiyon enzim kesimi, ARMS gibi yöntemlere karşı kullanılmış olduğumuz yaklaşım bu açıdan da üstünlük sağlamaktadır. SPR yaklaşımının aynı kuvvette birden fazla örneğin yüklenebilmesini olanaklı kılmakta ve ortalama 180 dolar olan kuvvet maliyetinin düşürülebilmesini sağlayabilmektedir. Rutin uygulamaya dönüşüm sürecinde çoklu kullanımın standart şekle dönüştürülmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak SPR spektroskopisinin, yörenizde oldukça sık görülen anormal hemoglobinlerin hızlı ve ucuz tanısına yönelik aday biyofiziksel bir yöntem olduğu belirlenmiştir. Bu yaklaşımın geliştirilerek rutin kullanıma dönüşümü, özellikle hemoglobinopati kontrol programında önemli bir yer tutan evlilik öncesi tarama çalışmalarına değerli katkılarda bulunabilecektir.

6.KAYNAKLAR

- Ahmed M, Stuhmann M, Bashawri L, Kühnau W, El- Harith A, Harith E.(2001) The β -globin genotype E121Q/W15X (cd121GAA→CAA/cd15TGG→TGA) underlines Hb D/ β -(0) thalassaemia marked by domination of haemoglobin D. *Ann Hematol*, 80: 629- 633.
- Altay Ç. Abnormal Hemoglobins in Turkey. *Turk J Haematol* (2002);19 (1): 63-74.
- Atalay EÖ, Koyuncu H, Turgut B, Atalay A, Yıldız S, Bahadır A, Köseleler A.(2005) High Incidence of Hb-D Los Angeles[β 121(GH4) Glu--->Gln] in Denizli Province, Aegean Region of Turkey. *Hemoglobin*,29 (4): 307- 310.
- Atalay EÖ, Üstel E, Yıldız S, Atalay A.(2006) SPR (Surface Plasmon Resonance) based molecular detection of Hb S (beta 6, GAG->GTG) at gene level. *Hemoglobin*, 30 (3): 385-391.
- Bermek E, Nurten R, Tiryaki D, Gökçe S. (1997) Biyofizik Ders Notları. *İstanbul Üniversitesi Tıp Fak. Yayınları*, No. 188, İstanbul, s 145- 150
- Briehl R. (1978) Sick Cell: A Metastable Disease. *Nature*, 276: 666-668.
- Bueche FJ, Jerde DA.(2000) Fizik İlkeleri Cilt-2, Çolakoglu K (ed). *Palme Yayınları*: 168 İkinci Baskı, Ankara, s 713-720.
- Clark BE, Thein SL. (2004) Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin.Lab. Haem*, 26: 159- 176.
- Clarke GM, Higgins TN. (2000) Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. *Clinical Chemistry*, 46(8): 1284- 1290.
- Çelebi G.(2005) Biyofizik Cilt 1. *Barış Yayınları*, Üçüncü Baskı, İzmir, s 44- 50.
- de Jong LA, Uges DR, Franke JP, Bischoff R. (2005) Receptor-ligand binding assays: Technologies and applications. *Journal of Chromatography B*, 829(1-2): 1- 25.
- Emanuel PA, Dang J, Gebhardt JS, Aldrich J, Garber EAE, Kulaga H, Stopa P, Valdes JJ, Dion – Schultz A. (2000) Recombinant antibodies: a new reagent for biological agent detection. *Biosensors & Bioelectronics*, 14: 751- 759.
- Feriotto 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.
- Feriotto G, Breveglieri G, Finotti A, Gardenghi S, Gambari R. (2004) Real-time multiplex analysis of four beta-thalassemia mutations employing surface plasmon resonance and biosensor technology. *Lab Invest*, 84(6):796-803.
- Finch JT, Perutz MF, Bertles JF. (1973) Structure of Sickled Erythrocytes and of Sick Cell Hemoglobin Fibers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 70(3): 718-722.
- Hartwell SK, Srisawang B, Kongtawelert P, Christian D, Grudpan K.(2005) Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta*, 65: 1149- 1161.
- Ho PJ. (1999). The Regulation of β globin gene expression and β thalassemia. *Pathology*, 31: 315- 324.
- Ho PJ, Thein SL. (2000) Gene regulation and deregulation: a β globin perspective. *Blood Reviews*, 14: 78- 93.
- Homola J, Yee SS, Gauglitz G.(1999) Surface plasmon resonance:review. *Sensors and Actuators B*, 54: 3- 15.

- Homola J. (2003) Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Anal. Bioanal. Chem*, 377: 528- 539.
- Homola J, Vaisocherova H, Dostalek J, Piliarik M.(2005) Multi- analyte surface plasmon resonance biosensing. *Methods*, 37: 26-36.
- IASys Technical Resources, Affinity Sensors, 2nd ed, Cambridge, England, 1996.
- IASys Plus User' s Guide, Affinity Sensors, 2nd ed, Cambridge, England, 1996.
- IASys Plus Product Notes, Affinity Sensors, 2nd ed, Cambridge, England, 1996.
- IASys Plus Methods Guide, Affinity Sensors, 2nd ed, Cambridge, England, 1996.
- Köseler A, Atalay A, Koyuncu H, Turgut B, Bahadır A, Atalay EÖ. (2006) Molecular identification of a rare hemoglobin variant Hb J-Iran [beta 77 (EF1) His>Asp] in Denizli province of Turkey. *Turk J Haematol*. (Basılmak üzere kabul edilmiştir)
- Nelson DL, Cox MM. (2000) Lehninger Principles of Biochemistry; **Worth Publishers**, NewYork, s 213.
- Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF. (1989) Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system(ARMS). *Nucleic Acids Research*, 17(7): 2503- 2516.
- 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 JM.(2003) Screening and genetic diagnosis of haemoglobin disorders. *Blood Rev*, 17 (1): 43- 53.
- Perutz MF, Muirhead H, Cox JM. (1968) The Three Dimensional Fourier Synthesis of Horse Oxyhemoglobin at 2.8Å° Resolution. *Nature*, 218:131.
- Sirichotiyakul S, Saetung R, Sanguanserm Sri T. (2003). Analysis of β -Thalassemia Mutations in Northern Thailand Using an Automated Fluorescence DNA Sequencing Technique. *Hemoglobin*, 27(2): 89-95.
- Sonezaki S, Yagi S, Ogawa E, Kondo A. (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.
- Tekman Ş, Öner N.(1981) Genel Biyokimya Dersleri. *İstanbul Üniversitesi Yayınları, No.2810*, İstanbul, s 200-205.
- Telefoncu A. (1999) Biyosensörlere Genel Bakış. Biyosensörler. Kuşadası-Türkiye, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. *Tübitak Yayınları*, s. 1-10.
- Uslan HA.(1999) İmmünosensörler, in Telefoncu A (ed) Biyosensörler. Kuşadası-Türkiye, Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu. *Tübitak Yayınları*, s 204.
- Viprakasit V, Chinchang W, Pung- Amritt P, Tanphaichitr SV. (2004) Identification of Hb Q-India (α 64 Asp---> His) in Thailand. *Hematology*, 9 (2): 151- 155.
- 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.
- Wada Y.(2002) Advanced analytical methods for hemoglobin variants. *Journal of Chromatography B*, 781: 291- 301.

- Wajcman H, Prehu C, Michau JB, Prome D, Riou J, Godart C, Mathis M, Hurtrel D, Galacteros F.(2001) Abnormal Hemoglobins: Laboratory Methods. *Hemoglobin*, 25 (2): 169- 181.
- 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.
- Yıldız S, Atalay A, Bağcı H, Atalay EÖ. (2005) Beta-thalassemia mutations in Denizli province of Turkey. *Turk. J. Haematol*, 22(1): 19- 23.
- Zourob M, Mohr S, Brown BJ, Fielden PR, McDonnell MB, Goddard NJ.(2005) Bacteria detection using disposable optical leaky waveguide sensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 21: 293- 302.

7. ÖZGEÇMİŞ

1978 yılında Denizli’de doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Denizli’de tamamladım. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü lisans programından 2002 yılında mezun oldum. Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyofizik Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans programına 2003 yılında başladım. Yüksek lisans eğitimi süresinde 2004 yılında bir seneliğine Macaristan’da Biological Research Center’ın düzenlediği International Training Course programına katıldım.