

9782

T.C.  
Marmara Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü  
Biyokimya Anabilim Dalı

BETA TALASSEMİ HASTALARINDA  
GEN AMPLİFİKASYON VE HİBRİDİZASYON YÖNTEMLERİ İLE  
NOKTA MUTASYONLARIN ARAŞTIRILMASI

(DOKTORA TEZİ)

ZEHRA OYA (ÖZBİLEN) UYGUNER

Danışman: Prof.Dr.TURAY YARDIMCI

İstanbul - 1989

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu

Lisansüstü çalışmalarında ve doktora tezimin her aşamasında değerli bilgi ve görüşlerinden yararlandığım danışmanım sayın hocam **Prof.Dr.Turay Yardımcı**'ya, bana laboratuvarlarında her türlü imkanı tanıyan ve değerli önerilerini esirgemeyen TÜBİTAK Marmara Bilimsel Araştırma Enstitüsü Temel Bilimler Biyoloji bölüm başkanı sayın **Prof.Dr.Engin Bernek** ve bölüm baş uzmanı sayın **Doç.Dr.Beyazıt Çirakoğlu**'na, bu bölümde araştırma görevlisi sevgili **Ayşe Güray**'a ve bölümdeki tüm arkadaşlarıma her türlü yardımlarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca  $\beta$ -talassemi olgularını temin eden değerli insan **Prof.Dr. Muzaffer Aksoy**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Sevgili aileme ve sayın **Yaşar Yıldırım**'a bu tezi tamamlayabilmem için bana göstermiş oldukları manevi destek ve sabırlarından ötürü en samimi duygularıyla teşekkür ederim.

## - İ Ç İ N D E K İ L E R -

I- GİRİŞ VE AMAÇ	1
II- GENEL BİLGİLER	3
1. İnsan Hemoglobinlerinin Yapıları ve Sentezleri	3
2. İnsanda Normal Globin Gen Yapıları	5
3. $\beta$ -Globin Gen Ekspresyonu	6
4. $\beta$ -Globin Gen Regülasyonu	9
5. $\beta$ -Globin Gen Kümesinde DNA Polimorfizmi	10
6. $\beta$ -Globin Gen Mutasyonlarının Haplotipler İle İlgisi	11
7. $\beta$ -Talassemi	12
8. Türk Toplumunda $\beta$ -Talassemi	13
9. Genetik Hastalıkların Teşhisinde Kullanılan Rekombinant DNA Yöntemleri	14
a) Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizm Analizleri-RFLP Analizleri	14
b) Sentetik Oligonükleotid Probları ile RFLP Analizleri	15
c) Gen Amplifikasyonu ve Sentetik Oligonükleotid Prob Hibridizasyonu ile Nokta Mutasyonların Tayin Edilmesi	17
III- ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER	22
1. Kimyasal Maddeler	22
2. Malzeme ve Aletler	24
3. Solüsyonların ve Tamponların Bileşimleri	25
4. Yöntemler	27
a) Kan Örneklerinin Toplanması	27
b) DNA Eldesi ve Konsantrasyonun Hesaplanması	27
c) Amplifikasyon Primerleri ve Prob Olarak Kullanılan Oligonükleotidler	31
d) Gen Amplifikasyonu	33
e) Agaroz Gel Elektroforezi İçin İzleyicinin Hazırlanması ve İncelenmesi	34
f) Agaroz Gel Elektroforezi ve Amplifikasyon Ürünlerinin İncelenmesi	34
g) Dot-Blot	36
h) Sentetik Oligonükleotidlerin 5'-ucundan $^{32}\text{P}$ ile İşaretlenmesi	36
i) Sephadex G-25'in Hazırlanması	37
j) Problarda Yüzde İnkorporasyonun Hesaplanması	38
k) Hibridizasyon	38
l) Otoradyografi	39
m) Naylon Membrandan Probun Uzaklaştırılması	40
IV- BULGULAR VE SONUÇ	41
1. Kan Örneklerinde DNA Konsantrasyonu	41
2. Agaroz Gel Elektroforezinde İzleyicinin İncelenmesi	42

3. Amplifikasyon Ürünlerinin Agaroz Gel Elektroforezinde İncelenmesi	43
4. Probların Yüzde İnkorporasyonlarının Hesaplanması	46
5. Hibridizasyon Derecelerinin ( $T_H$ ) ve Hibridizasyonda Kullanılan Probların Total Dakikada Sayım Değerleri ile Spesifik Aktivitelerinin Hesaplanması	47
6. Otoradyografik Neticelerin Değerlendirilmesi	48
<b>V- TARTIŞMA</b>	51
<b>VI- ÖZET</b>	54
<b>VII- SUMMARY</b>	56
<b>VIII- KAYNAKLAR</b>	58
<b>EK 1. TERİMLER VE KISALTMALAR</b>	70

## I. GİRİŞ VE AMAÇ

$\beta$ -Talassemi, kalıtsal bir kan hastalığıdır ve klinik olarak anemi, hemoliz ve yetersiz eritropoez bulguları ile tanımlanır(1,2). Kuzey ve Orta Afrika, Orta Doğu, Hindistan, Çin, Güney Doğu Asya ve en çok Akdeniz bölgesinde yoğunlaşmış olup dünya nüfusunun % 3'ünün  $\beta$ -talassemi geni taşıdığı tahmin edilmektedir(3).  $\beta$ -Talassemi ülkemizde de çok sık rastlanan bir hemolitik anemi tipi olup, Çavdar ve Arcasoy tarafından Türkiye genelinde bu hastalığın heterozigot insidansı % 2 olarak saptanmıştır(4,5).

Günümüzde, bir çok ülkede, hastalıklı gen taşıyıcılar- da doğum kontrolü uygulanmasının yanısıra bu ailelerde bebek- lerin prenatal teşhislerinin yapılması önem kazanmaktadır.

Talassemi teşhisinde genel olarak kullanılan yöntem- leri, kan sayımı, periferik kan yaymasında eritrositlerin görünümü, gerek elektroforez, gerekse kromatografi ve alkali denatürasyon teknikleri ile HbA<sub>2</sub> ve HbF tayinleridir.

Son yıllarda, rekombinant DNA teknolojisinin gelişti- rilmesi ile insan hemoglobinleri üzerinde yapılan çeşitli ça- lışmalar, temel genetik prensiplerine açıklık getirmesi ya- nında hastalığın analizinde yeni biyokimyasal genetik yöntem- lerin uygulanabilmesine de yardımcı olmuştur. Bu teknoloji

sayesinde, talassemi moleküler düzeyde incelenebilmektedir.

Bu çalışmanın amacı,  $\beta$ -talassemili hastalarda moleküler düzeyde inerek nokta mutasyonların tespitidir. Bunun için gen amplifikasyonu ve normal ve mutant sentetik oligonükleotidler ile hibridizasyon yöntemleri kullanılmıştır. Standartlaştırılmış olan bu yöntemlerin ülke çapında kullanılarak taramaların yapılması ile Türkiye'de görülen  $\beta$ -talassemilerin moleküler düzeyi hakkında, istatistiksel olarak anlamlı sayıda bilgilerin elde edilmesi mümkün olacaktır. Bu bilgilerin birikimi, etnik gruplarda ne tip mutasyonların bulunduğu konusunda bize daha kesin bilgiler verecektir. Ayrıca, bu yeni teknolojinin, Türkiye'de prenatal tanı laboratuvarlarında uygulanması ve yaygınlaştırılması, bu yöndeki sağlık problemlerimizi çözmeye yönelik önemli bir adım olacaktır.

## II- GENEL BİLGİLER

### 1. İNSAN HEMOGLOBİNLERİNİN YAPILARI VE SENTEZLERİ

Yetişkin insan hemoglobini (Hb) 4 heme bağlı bir çift  $\alpha$  (141 a.a.) ve bir çift  $\beta$  (146 a.a.) polipeptid zincirlerinden meydana gelmiş bir tetramer moleküldür.

Kemik iliğinde eritrositer yapım süresinde, erken eritroblast devresinde globin mRNA sentezi, bu devreyi takip eden polikromatofilik eritroblast devresinde ise globin polipeptid zincir sentezi maksimuma ulaşır ve zincir sentezi retikülosit devresinde de devam eder. Daha sonra çekirdeğin kaybolması ile oluşan eritrositler dolaşıma katılır. Bu devrede protein sentezi yapılmaz.

Eritrositlerin hemoglobini için gerekli olan demir, ince barsak epitelinden emilir. Kemik iliğinde transferrine bağlanarak taşınır. Eritroblast membranından transferrine bağlı demir indirgenerek içeri alınır. Mitokondride demir, hem sentetaz enzimi yardımı ile protoporfirinle birleşerek hem oluşur. Sentezi bitmiş, veya henüz sentezlenmekte olan globin zincirleri, eğer heme bağlanan bölgelerin sentezleri tamamlanmış ise derhal hem ile birleşirler ve hemoglobin tetramerini oluştururlar.

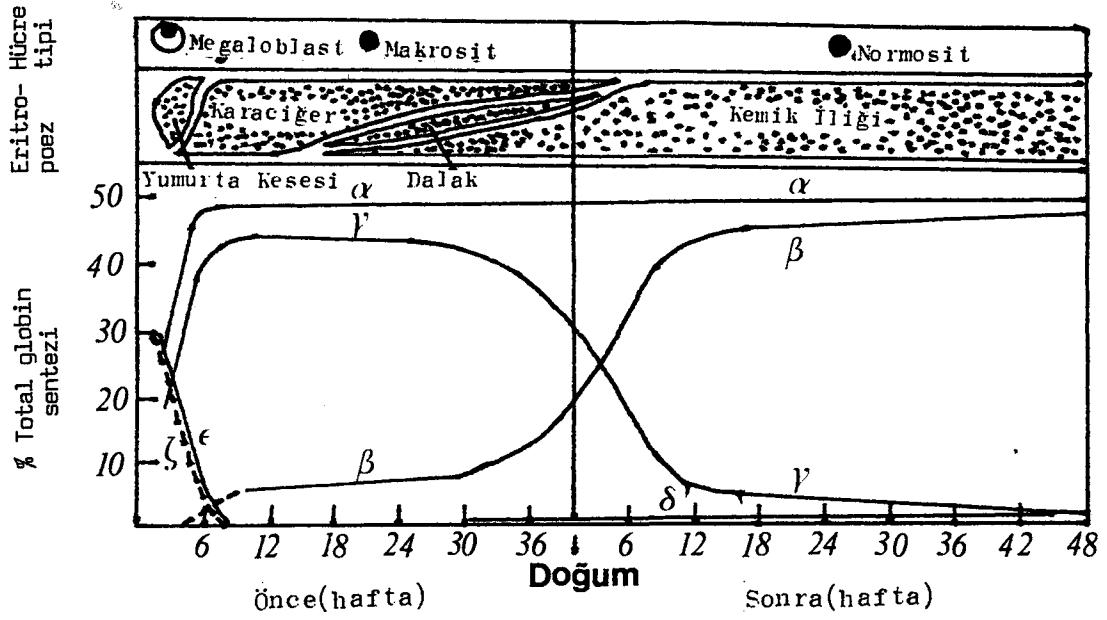
Normal bir erişkinde genel olarak HbA mevcuttur. Her

bir eritrosit hücresinde üç ya da daha fazla tipte  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  diye isimlenen globin polipeptid zincirleri bulunur ve yoğunluklarının oranlarına göre birleşerek hemoglobin tetramerini oluştururlar.  $\alpha$  ve  $\beta$  globin grubu zincir sentezleri dengeli olduğu sürece hemoglobin iki çift polipeptid zincirinden meydana gelir ve eritrositin ömrü boyunca kararlı kalır. Bazı hastalıklarda olduğu gibi globin zincirlerinin sentezleri ya da parçalanmaları (degredasyon) dengesiz ise, zincirlerden biri diğerinden daha fazla olduğu için, fazla olan zincir hücre içinde birikmeye başlar. Fazla miktardaki  $\alpha$  zincirleri monomerik, fazla  $\beta$  ve  $\gamma$  zincirleri tetramerik ( $\beta_4$ -Hemoglobin H,  $\gamma_4$ -Hemoglobin Barts) yapıları oluştururlar. Bu hemoglobinler normal hemoglobine kıyasla oldukça dayanıksızdırlar. Hücre içinde çökerek eritrositin ömrünü kısaltırlar ve hemolitik anemiye neden olurlar.

Yetişkin ve fetal hemoglobinlerde  $\alpha$  zincirleri ile bileşik  $\beta$ ,  $\gamma$  ve  $\delta$  zincirleri bulunur (HbA:  $\alpha_2\beta_2$ , HbA<sub>2</sub>:  $\alpha_2\delta_2$ , HbF:  $\alpha_2\gamma_2$ ). Embroya da ise  $\alpha$ ,  $\zeta$  ve  $\epsilon$  zincirlerinden oluşan hemoglobinler bulunur (Hb Portland:  $\zeta_2\gamma_2$ , Hb Gower 1:  $\zeta_2\epsilon_2$ , Hb Gower 2:  $\alpha_2\epsilon_2$ ).

Şekil 1'de, doğumdan önce ve sonra insan hemoglobinlerinin gelişimi gösterilmektedir. Hb Gower 1, Hb Gower 2 ve Hb Portland gebeliğin 10 uncu haftasında kaybolurlar ve fetal hayatın başlıca hemoglobini olan HbF kendini gösterir. Yetişkin Hb'inin % 97'sini oluşturan HbA doğumdan önce sentezlenmeye başlar, doğumdan sonra ise başlıca hemoglobini oluşturur. Bu sürede yetişkin Hb nin % 1-2,5'ğini teşkil eden HbA<sub>2</sub> de sentezlenmeye başlar. Burada dikkat edilmesi gereken en önemli nokta  $\beta$ -zincirinin, gebeliğin 2. ve 3. trimestirlerinde küçük miktarlarda da olsa ortaya çıkmaya başlamasıdır. Bu nedenle,  $\beta$ -talasseminin erken (prenatal) tanısı fetal kan tahlilleri ile mümkün olabilir.





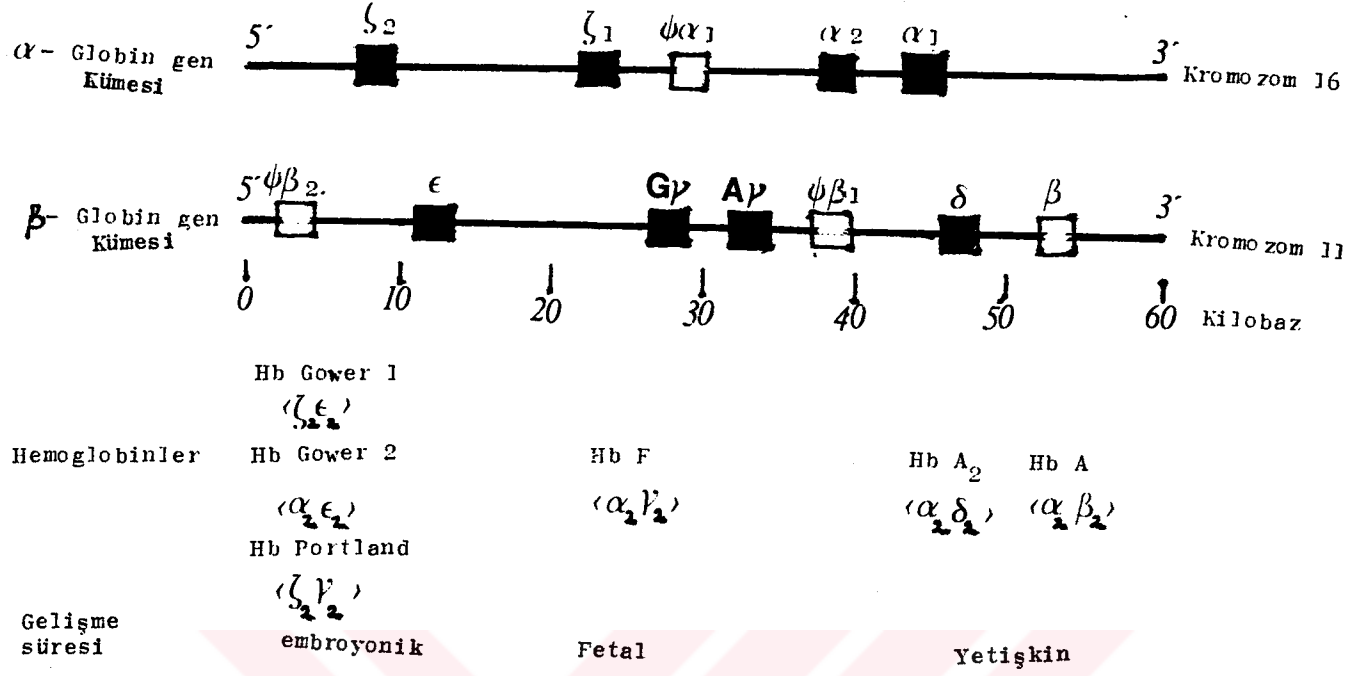
Şekil 1- Doğumdan önce ve sonraki devrelerde çeşitli globinlerin total globine karşı sentez yüzdeleri.

## 2. İNSANDA NORMAL GLOBİN GEN YAPILARI

Rekombinant DNA teknolojisi ile insan globin genleri Şekil 2'de gösterildiği gibi haritalanmıştır(6).

İnsan  $\alpha$ -globin gen kümesi 16 ıncı kromozomun ve insan  $\beta$ -globin gen kümesi 11'inci kromozomun kısa kollarında yer almaktadırlar(7-10).

$\alpha$ -Globin genleri iki fonksiyonel kopyadan oluşur ve bunlar aynı polipeptidi şifrelerler. İki  $\zeta$  geninden 5' bölgede bulunanın fonksiyonel olduğu tespit edilmiştir.  $\beta$ -globin gen kümesini 5'dan 3' yönüne doğru inceleyecek olursak, bir embriyonik gen ( $\epsilon$ ), iki fetal gen ( $\gamma$ ) ( $G_\gamma$  ve  $A_\gamma$ ), bir psödogen ( $\psi_\beta$ ), bir delta geni ( $\delta$ ) ve bir adet beta geni ( $\beta$ ) görülür. Psödogenler globin genine benzemekle beraber herhangi bir proteini şifrelemezler. Diğer globin genlerinde de olduğu gibi, burada da genler DNA üzerinde embriyonik fetal ve yetişkin sırasına göre dizilmiştirlerdir.

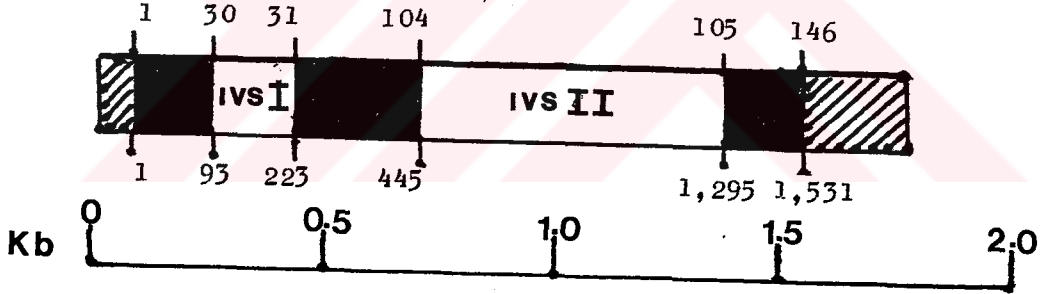


Şekil 2- 16 ıncı ve 11 inci kromozomların kısa kollarında yer alan globin gen kümeleri ve oluşturdukları hemoglobiner (Genler arası mesafeler 1000 nükleotid çifti, 1 kilobaz (kb), olarak belirtilmiştir).

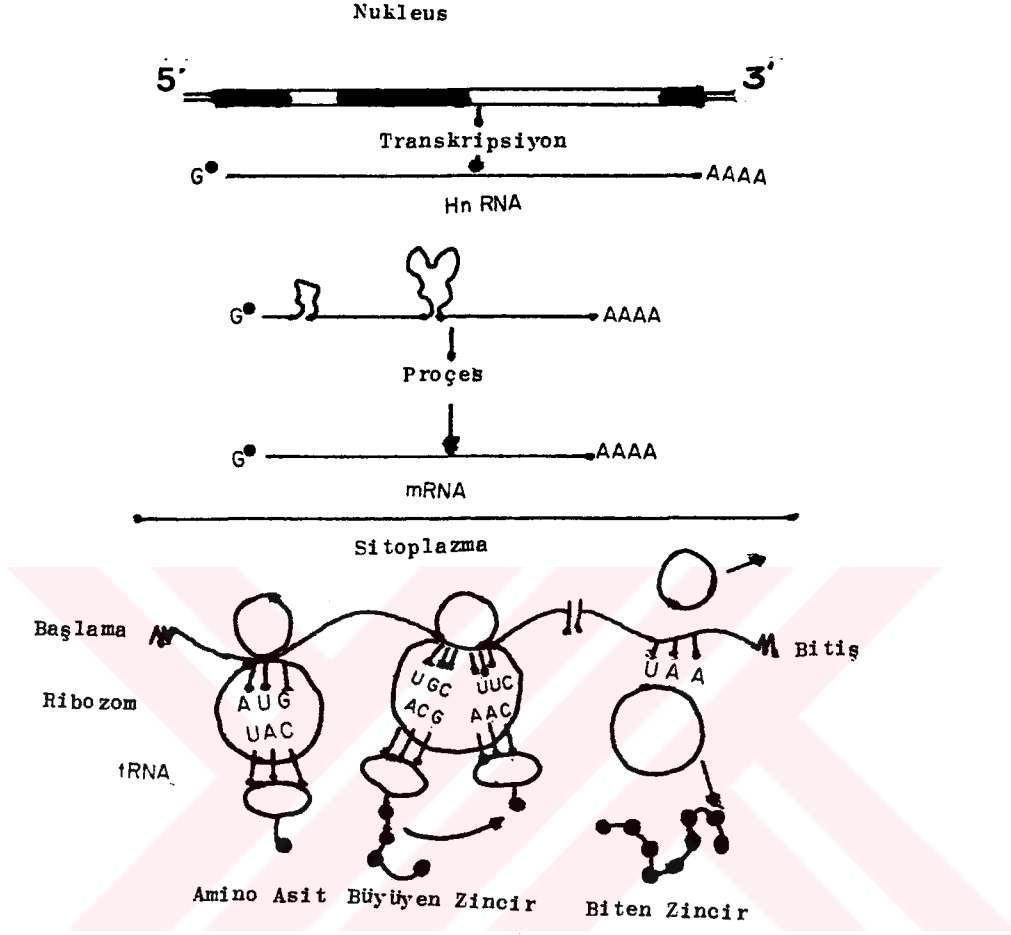
### 3- $\beta$ -GLOBİN GEN EKSPRESYONU

1977 den günümüze, rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler ile prob cDNA ların başarı ile klonlanması ve total genomik gen kütüphanelerinin oluşturulması sonucunda insan globin gen bölgelerinin izolasyonu ve karakterizasyonu mümkün olmuştur(11). Ekspres edilen tüm genlerin ve genler arası DNA nın büyük bir bölümünün dizi analizleri yapılmıştır(12,13). Bu deneyler sonucunda,  $\beta$ -globin geninin 2 defa intron veya "interveining sequence" (IVS) denilen değişik uzunlukta, olgun mRNA da bulunmayan DNA zincirleri ile bölüdüğü gösterilmiştir (Şekil 3). İtronların yanlarını kaplayan eksonlar proteinleri şifreleyen DNA bölgeleridir. Ayrıca 5' ve 3' uçlarında translasyona uğramayan kısa DNA bölgeleri de vardır.

$\beta$ -Globin geni, transkripsiyona uğrayarak ağır nükleer mRNA (Hn RNA) yı meydana getirir. Hn RNA, nukleusda post transkripsiyonel modifikasyona uğrayarak intronları ayrılır, "splicing", ve mRNA nın 5' ucuna "cap", 3' ucuna poli (A) zincirinin ilavesi ile olgun mRNA meydana gelir. Nukleusda tamamlanan olgun mRNA sitoplazmaya geçerek burada translasyona uğrar (Şekil 4). 5' "cap" in mRNA yı fosfataz ve nukleazlardan koruyarak stabilitesini arttırdığı, poli (A) nın ise mRNA nın stabilitesini arttırdığı ancak translasyon için mutlaka gerek olmadığı görüşü kabul edilmektedir. Muhtemelen, intronlar, dengesiz meoz çaprazlaşmasına neden olabilecek yanlış kromazomal dizilmeyi önlemeye yardımcı olduğu görüşü vardır. Yapısal genlerin dışında kalan bu DNA parçacıklarının gen ekspresyonunun regülasyonunda önemli rolü olduğu açıktır(2).



Şekil 3- İnsan  $\beta$ -globin geni (■: kodlanan bölgeler; ▨: 5' ve 3' da yer alan translasyona uğramayan bölgeler; IVS-I ve IVS-II: intronlar). Diagram üzerindeki numaralar amino asitin kodon pozisyonunu, altındaki numaralar ise nukleotid pozisyonunu göstermektedir.



Şekil 4- Eukaryotlarda gen ekspresyonu

Son senelerde, oldukça yüksek oranda talassemnin hatalı "splicing" nedeni ile hatalı globin mRNA ların oluşmasından kaynaklandığı anlaşılmaktadır(14,15). Hatalı mRNA "splicing"i muhtemelen diğer genetik hastalıkların da altında yatan bir sebeptir. Bu nedenle mRNA "splicing" olayı biyoloji ve tıpta büyük bir ilgi alanıdır.

"Splicing" in hatasız olarak gerçekleştirilmesini tayin eden en önemli faktör Hn mRNA daki nukleotid dizisidir. Bir çok "splice" bölgelerinde yapılan karşılaştırmalar intronların GT ile başladığını ve AG ile bittiğini göstermekte-

dir(16,17). Bu bölgelerdeki homoloji, "splicing" enzimleri tarafından tanınması için korunmaktadır, ancak sadece iki nükleotidin, bölünme noktasını işaretleyici tek faktör olması yeterli değildir. Yapılan araştırmalarda, "splice" bölgesinin çok yakınında nükleotid dizileri arasında büyük bir benzerlik olduğu görülmektedir. Bunlara "consensus" nükleotid dizileri denilmektedir(17). Bu "consensus" nükleotid dizilerinde görülen mutasyonlar da, Hn mRNA'nın hatalı bir şekilde bölünmesine ve dolayısı ile değişik talassemi tiplerinin oluşmasına neden olmaktadır(14).

#### 4- $\beta$ -GLOBİN GEN REGÜLASYONU

Daha önce, globin gen yapıları bahsedilirken,  $\beta$ -globin gen ailesinde beş adet transkripsiyonel olarak aktif genin bulunduğu bildirilmiş idi. Gelişim süresinde değişik genler farklı dokularda farklı zamanlarda ekspresyona uğramaktadırlar. Örneğin embroyonik  $\epsilon$  geni yumurta kesesinde, insan  $\gamma$ -globin geni fetal karaciğerinde ve  $\beta$ -globin geni ile  $\delta$ -geni primer olarak kemik iliğinde ekspres edilmektedirler(2). Hibrid genler ile yapılan çalışmalarda,  $\beta$ -globin gen ekspresyonunu regüle eden faktörlerin transkripsiyon bölgesinin 5' ve 3' bölgelerinde bulunduğunu göstermektedir(18).

Globin gen ekspresyonunun regülasyonunu moleküler düzeyde incelemek için insan hibrid  $\gamma$ - $\beta$  genleri fare embryosuna enjekte edilerek bu genlerin ekspresyonları incelenmiştir(19). Elde edilen sonuçlar, 5' bölgesinin genin başlama/durma veya pozitif/negatif regülasyonu ile ve 3' bölgesinin ise ekspresyon için gerekli olmadığı halde, zaten aktif olan genin regülasyonuna etki ettiği tezini ortaya çıkarmıştır(19).

Daha sonra yapılan araştırmalarda,  $\beta$ -globin geninin bir promoter iki "enhancer" elementi içerdiği gösterilmiştir.

tir(20). Promoter,  $\beta$ -globin geninin, transkripsiyona başlama bölgesinin 160 bp yukarısındadır. Transkripsiyonal "enhancer" elementleri ise dokuya spesifik olup, biri yapısal  $\beta$ -globin geninde ikinci intronda ve diğeri 3'-"flanking" dizi zincirinde (Pst 1 kesim noktasının altında) yer almaktadır(20).

##### 5- $\beta$ -GLOBİN GEN KÜMESİNDE DNA POLİMORFİZMİ

DNA da sıklıkla rastlanan sessiz veya tabii nükleotid çeşitliliğine polimorfizm denir.

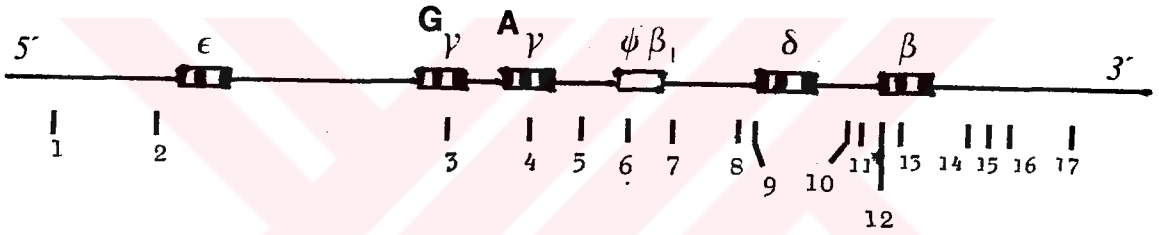
İnsan genomunda görülen genetik değişkenlikler hakkında bilgi edinilmesi 1970 senelerinde başlamıştır. Harris ve arkadaşları, inceledikleri 104 proteine ait genetik farklılaşmaları, temel alarak, insanlardaki beher gene ait ortalama heterozigotluğun % 6 oranında olabileceğini belirtmişlerdir(21,22). Bu analizler sadece şifre bölgelerinin polimorfizmi ile ilgilidir. Ancak dikkati çeken noktalar, polimorfik yapıya çoğunlukla gen içinde intronlarda rastlanması ve nükleotidde eksilme, "deletion", veya ilave, "insertion", görülse de gene de tek bir nükleotidin yer değişmesi, "substitution", ile polimorfik yapının oluşmasıdır.

İnsanlarda DNA polimorfizmi, ilk defa Lawn ve arkadaşları(23) ve Kan ve Dozy(18) tarafından 1978'de keşfedilmiştir. Lawn ve arkadaşları,  $\delta$ -globin geninin ikinci intronunda (IVS-2) Pst 1 (Restriksiyon enzim) polimorfizmini ortaya çıkartırken, Kan ve Dozy'de  $\beta$ -globin geninin 3' bölgesinde 5 kb lik Hpa 1 (Restriksiyon Enzim) polimorfizmini ortaya çıkarmışlardır.

DNA polimorfizmi iki deneysel yöntem ile tanımlanabilir. Birincisi, klonlanan DNA parçalarının dizi analizlerinde farklılıkların tayin edilmesidir. İkinci yöntem ise, DNA daki spesifik nükleotid dizilerini tanıyan ve o bölgeden kesen

restriksiyon enzimlerini kullanarak zincir uzunluklarının incelenmesidir (RFLP Tekniği).

Yukarıda bahsedilen restriksiyon enzim metodu ile  $\beta$ -globin gen kümesinde, 17 yaygın polimorfizm ortaya çıkarılmıştır(19). Bunlardan 12'si genler arası zincirleme, "flanking region", üçü intronda, bir tanesi psödogende, ve bir tanesi de  $\beta$ -globin geninin ilk eksonundadır (Şekil 5). Değişik etnik gruplarda rastlanan polimorfik nükleotid sıklığı Antonarakis ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada tablo halinde gösterilmiştir(24).



Şekil 5-  $\beta$ -Globin gen kümesinde polimorfik restriksiyon bölgeleri.(1: Taq I, 2: Hinc II, 3 ve 4: Hind III, Pvu II, 6 ve 7: Hinc II, 8: Rsa I, 9: Taq I, 10: Hinf I, 11: Rsa I, 12: Hgi AI, 13: Ava II, 14: Hpa I, 15: Hind III, 16: Bam HI, 17: Rsa I).

## 6. $\beta$ -GLOBİN GEN MUTASYONLARININ HAPLOTİPLER İLE İLGİSİ

Orkin ve arkadaşları, globin geninde hastalığa neden olan mutasyonların kromozomal haplotipler ile ilgili olabileceğini savunmuşlardır(25). Eğer bu tez doğru olsa idi, spesifik mutasyonların spesifik haplotipler üzerinde bulunması gerekirdi. Yapılan araştırmalarda görülen mutasyonların % 85'inin tek bir kromozomal haplotip üzerinde bulunduğu saptanmıştır(26).

## 7- $\beta$ -TALASSEMİ

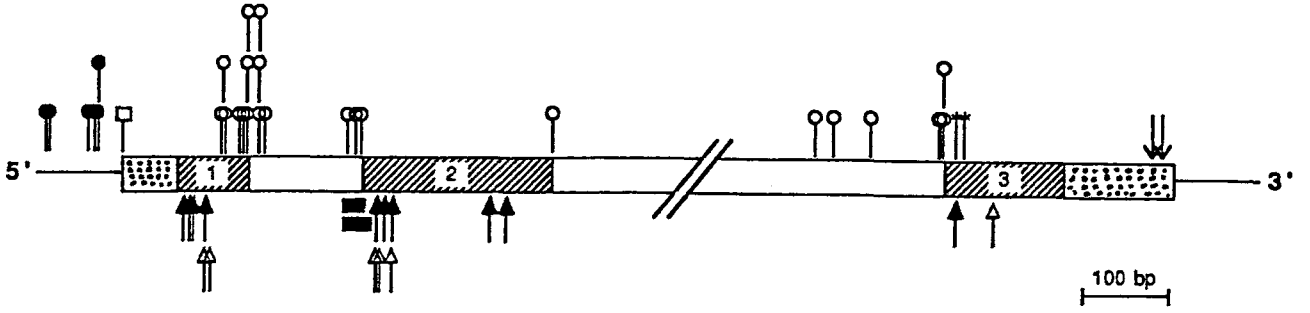
$\beta$ -Talassemi, eritroid hücrelerinde,  $\alpha$ -globine relatif olarak  $\beta$ -globinin yetersizliği ya da eksikliğinin görüldüğü durumları kapsayan heterojen bir gruptur(2).  $\beta$ -Talassemi için heterozigot olan yani sadece bir  $\beta$ -globin geni etkilenmiş olan bireyler, klinik olarak genelde sağlıklıdır. İki  $\beta$ -globin geni de mutasyonlardan etkilenmiş olan  $\beta$ -talassemi homozigot bireyler genelde çok şiddetli bir anemik tabloya sahiptirler, ve yaşamlarının devamı için daimi bir tıbbi muayeneye ihtiyaçları vardır. Bu duruma talassemi major denir. Nadir de olsa, homozigotların daha az etkilendikleri hafif bir tedaviye veya hiç tedaviye gerek duymadıkları durumlar da vardır. Genelde bu duruma talassemi intermedia denir. Bu iki durum arasındaki klinik farklılıklar çok net olmadığı için, bu tip tarifler yanlış yönlendirmelere ve bireyin gerçek genotipinin anlaşılmasının engellenmesine neden olmaktadır(19). Bazı durumlarda,  $\beta$ -talassemimin iki tipini birbirinden ayırmak faydalıdır:  $\beta^0$ -talassemide, hiç  $\beta$ -globin geni sentezlenmez,  $\beta^+$ -talassemide ise  $\beta$ -globin polipeptidi vardır, ancak miktar olarak çok azdır.

Talasseminin genel moleküler mekanizması, gende görülen moleküler lezyonlar, ("deletion", "insertion", "substitution"), neticesinde ortaya çıkan hatalı transkripsiyon, hatalı RNA proçesi ve hatalı translasyondur.

Günümüzde  $\beta$ -globin geninde 51 adet nokta mutasyonları, üç adet delesyon bilinmektedir(3). Ayrıca  $\beta$ -talassemi fenotipi gösteren iki adet stabil olmayan globin tanımlanmıştır(3). Talasemik mutasyonlar Lanclos ve Kutlar'ın hazırlamış oldukları bir raporda liste olarak sunulmuştur(27). Stabil olmayan globinler Hb-İndianapolis(28) ve Hb-Showa-Yakushiji(29), belki de yöntemlerin yeterince hassas olmaması nedeni ile kanda teşhis edilememektedirler. Bu nedenle, bu globin mRNA ların



translasyona uğrayıp uğramadıkları henüz açıklığa kavuşmamıştır. Şekil 6'da,  $\beta$ -talassemi mutasyonlarının  $\beta$ -globin genindeki yerleri ve  $\beta$ -globin gen ekspresyonunda spesifik olarak etkilenen faktörler görülmektedir.



Şekil 6-  $\beta$ -Talassemide nokta mutasyonlar ( ▨ :  $\beta$ -globin geni; □ : intronlar; ▤ : Translasyona uğramayan bölgeler. Mutasyonların etkilendikleri mekanizmalar: ○ : "splicing"; | : transkripsiyon; □ : "cap" bölgesi; ↓ : RNA kopması; ↑ : "frame-shift"; ▲ : "nonsense" kodon; \* : stabil olmayan globin; ■ : delesyon).

## 8- TÜRK TOPLUMUNDA $\beta$ -TALESSEMİ

Türk toplumu üzerinde,  $\beta$ -talassemnin moleküler patolojisi ile ilgili bilgiler yetersizdir. Bilindiği gibi, Türk toplumu genetik olarak farklı kökenlerden bir araya gelmektedir. Bu nedenle, en sık rastlanan mutasyonların tayininde belirli bir görüşe varabilmek için, her bir etnik gruptan istatistiksel olarak anlamlı sayıda hasta ve risk gruplarına ait  $\beta$ -globin gen analiz bilgilerinin toplanması gerekmektedir.

Yapılan çeşitli yayınlarda, Türkiye'de, homozigot  $\beta$ -talassemi grubundan hematoloji kliniklerine başvuran hastaların büyük bir bölümünün hafiften şiddetliye varan semptomlar gösterdiği belirtilmiştir(30-34).

Bir çalışmada, Türkiye'de en sık rastlanan  $\beta$ -talassemik allelin  $\beta^+$ IVS-1 nt 110 mutasyonu olduğu belirtilmiştir(35).

Türkiye'de, Adana, Ankara, Kıbrıs ve İstanbul yöresinden toplanan ve klinik bulguları hafif ile ağır düzeyde seyreden  $\beta$ -talassemik 47 adet hasta kan numunesinden elde edilen 94 kromozomda, Amerika'da yapılan amplifikasyon ve sentetik problemler ile hibridizasyon deneyleri, 40 kromozomda IVS-I'de 110'uncu nükleotidde G  $\rightarrow$  A, 22 kromozomda IVS-I de 6'nci nükleotidde T $\rightarrow$ C, 13 kromozomda 8'inci kodonda "frame-shift", 4 kromozomda IVS-I de 1'inci nükleotidde G $\rightarrow$ A, 2 kromozomda 39'uncu kodonda C $\rightarrow$ T, 2 kromozomda IVS-I de 5'inci nükleotidde G $\rightarrow$ T, 2 kromozomda -87'inci nükleotidde C $\rightarrow$ G, ve 1 kromozomda IVS-II de 245'inci nükleotidde C $\rightarrow$ G mutasyonlarına rastlandığı tespit edilmiştir(36).

#### 9- GENETİK HASTALIKLARIN TEŞHİSİNDE KULLANILAN REKOMBİNANT DNA YÖNTEMLERİ

Son yıllarda, bir çok genetik hastalıkların moleküler yapısı rekombinant DNA teknolojisinin uygulanması ile açıklığa kavuşmuştur(37). Genetik hastalıklar ile ilgili olarak, özellikle gendeki DNA'nın polimorfik yapılarının tayini, prenatal teşhis için çok kıymetli klinik bilgiler temin etmemize yardımcı olmuştur(18,38-41).

Gen düzeyinde mutasyonların tayin edilmesi için kullanılan yöntemleri üç bölüme ayırabiliriz:

##### a) Restriksiyon Parça Uzunluğu Polimorfizm Analizleri-RFLP Analizleri

Bilindiği gibi restriksiyon enzimleri çift sarmal DNA'nın spesifik bir dizisini tanıyarak, o noktada DNA'yı keser. Örneğin Mae I restriksiyon enzimi, DNA da CTAG dizisini tanıyarak

ve DNA'nın hangi bölgesinde böyle bir dizi varsa, o noktadan DNA'yı keser.  $\beta$ -Globin geninde 39 uncu kodonda, C yerine T'nin geçmesi ile görülen mutasyonda, normalde CCAG olan dizi mutasyon sonucunda CTAG'ye dönüşür ve normalde Mae I'in tanımadığı dizi, mutantta Mae I tarafından tanınır ve kesilir. Bu noktadan kesilen mutant DNA normal DNA'ya kıyasla daha düşük molekül ağırlığında bir parçadır. Agaroz gel elektroferizini takiben yapılan Southern blot (DNA'nın membrana transferi), ve DNA probları ile yapılan hibridizasyonlar otoradyografi yöntemi ile tespit edilir.

RFLP analizlerinde ilk başarı, Huntington hastalığının insanlarda 4. kromozom üzerinde polimorfik DNA ile bağlantılı olduğunun gösterilmesidir(42). Bazı nörolojik ve psikiyatrik hastalıklar ile birkaç kalıtsal kanser tipinin kromozomal anormallikleri RFLP analizleri ile tayin edilmiştir(43).

b) Sentetik Oligonükleotid Probları ile RFLP Analizleri

Bu yöntemde, sentetik deoksiribonükleotid problemler kullanılarak  $\beta$ -globin geninde polimorfizm, yani haplotip tayini yapılır. Bu analizlerle belirli etnik grupların belirli mutasyonlar gösterdiği tespit edilmiştir(25). Mutasyonun pozitif tanımlanmasında, DNA küçük sentetik oligomerik bir prob ile hibridize olur. Örneğin  $\beta$ -geninin 39 uncu kodon civarındaki dizisine bakacak olursak, mutant gen ile normal gen arasındaki farkı tespit edebiliriz.

Normal: 5' TACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTT 3'

Mutant: 5' TACCCTTGGACCTAGAGGTTCTTT 3'

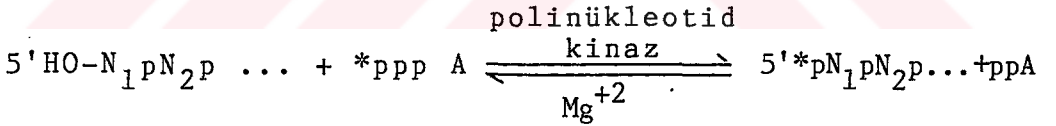
Normal ve mutant genler bir nükleotid farkı ile birbirlerinin aynısıdır. Böylece, normal DNA dizisi ile hibridize olacak fakat mutant DNA'sı ile hibridize olmayacak bir küçük deoksiribonükleotid zinciri sentezlemek mümkündür. Prob ile

hibridizasyon neticesi oluşan çift sarmal DNA termal stabiliteye dayalı olduğu için, 19-20 nükleotidden daha uzun proplar tek bir baz uyumsuzluğunda yeterli derecede destabilizan etki gösteremeyecektir(44). 19 bp uzunluğundaki propların insan genomundaki tek kopya dizileri tanımasındaki yeterliliği de gösterilmiştir(45). Bu görüşten hareket ederek, 39'uncu kodondaki mutasyonu tayin etmek için aşağıdaki dizileri içeren proplar sentezlenebilir:

Normal prob: 5' CCTTGGACCCAGAGGTTCT 3'

Mutant prob: 5' CCTTGGACCTAGAGGTTCT 3'

Spesifik bir tampon ve sıcaklıkta, normal prob normal DNA ya, mutant prob ise sadece mutant DNA ya hibridize olur.  $^{32}\text{P}$  ile propların 5' uçları işaretlenerek bu proplar radyoaktif izleyici olarak kullanılırlar. İşaretleme işlemini, polinükleotid kinaz enzimi, aşağıda gösterildiği gibi gerçekleştirerek, ATP'nin  $^{32}\text{P}$ - işaretli  $\gamma$ -fosfatını DNA molekülünün 5'-hidroksil grubuna transfer eder:



İlgili kromozomal DNA izole edildikten sonra, restriksiyon enzimi ile kesilir ve  $\beta$ -globin geni yaklaşık 2.0 kb uzunluğunda bir parçaya bölünür. Bu DNA zinciri, agaroz gel elektroforezinde diğer genomik zincirlerden ayrılır. Daha sonra Southern blot ve prob ile hibridizasyon yapılır. Eğer hasta, bu spesifik mutasyon için homozigot ise sadece mutant prob ile hibridize olur. Eğer hasta heterozigot ise hem mutant ve hem de normal prob ile hibridize olur. Hasta normal ise normal prob ile hibridize olur.

Sentetik oligonükleotid yöntemi, ilk olarak, orak hücre anemisi(45),  $\alpha$ -1 antitripsin eksikliği(47), ve bazı  $\beta$ -ta-

lasemilerin prenatal teşhisinde(48,49) kullanılmıştır.

Yukarıda bahsedilen yöntemlerin kullanılması ile yapılan teşhislerde büyük ilerlemeler kaydedilmiş olmasına rağmen bu yöntemlerin bazı dezavantajları vardır. Teşhisin yapılabilmesi için, her bir restriksiyon enzim kesiminde 10 µg gibi çok fazla miktarda DNA ya ihtiyaç vardır ve işlemlerin tamamlanması 10-15 gün sürer. Ayrıca, haplotip tayini ile direkt mutasyon teşhisinin yapılması meiotik rekombinasyondan ötürü yanlış tanı verebilir. Şimdiye kadar bu durumda iki meiotik rekombinasyon bildirilmiştir(50,51). Homozigot β-talasemi olarak doğan bir çocuğa, gebeliğin ilk üç ayında korion villüsü'nden elde edilen DNA üzerinde uygulanan RFLP analizleri ile β-talasemi trait olarak yanlış teşhis konmuştur. Çocuğun aile fertleri içinde yapılan kromozom çalışmalarına göre babadaki meiotik rekombinasyonun bu yanlış tanıya sebep olduğu anlaşılmaktadır(52).

c) Gen Amplifikasyonu ve Sentetik Oligonükleotid Probes Hibridizasyonu ile Nokta Mutasyonlarının Tayini

Kromozomal mutasyonların direkt tespitinde en büyük ilerleme, ilk olarak Saiki ve arkadaşları tarafından tarif edilen gen amplifikasyonunun başarı ile uygulanması ile elde edilmiştir(53).

Gen üzerinde istenen bölgenin amplifikasyonu, ilk defa, in vitro koşullarda, polimerazın katalize ettiği zincir reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde, amplifiye edilecek bölgenin 5' ve 3' uç kısımlarının dizi analizleri bilinmeli ve bu bölgelere ait primerlerin işlem esnasında hazır bulundurulması gerekir. Primerler seçilirken, β-globin geninin mutasyon bölgesini kapsamasına ve δ-gen bölgesi ve DNA'nın diğer bölgeleri ile mümkün minimum homoloji içerecek dizide olmasına dikkat edilmelidir. Yapılan çalışmalar δ-gen

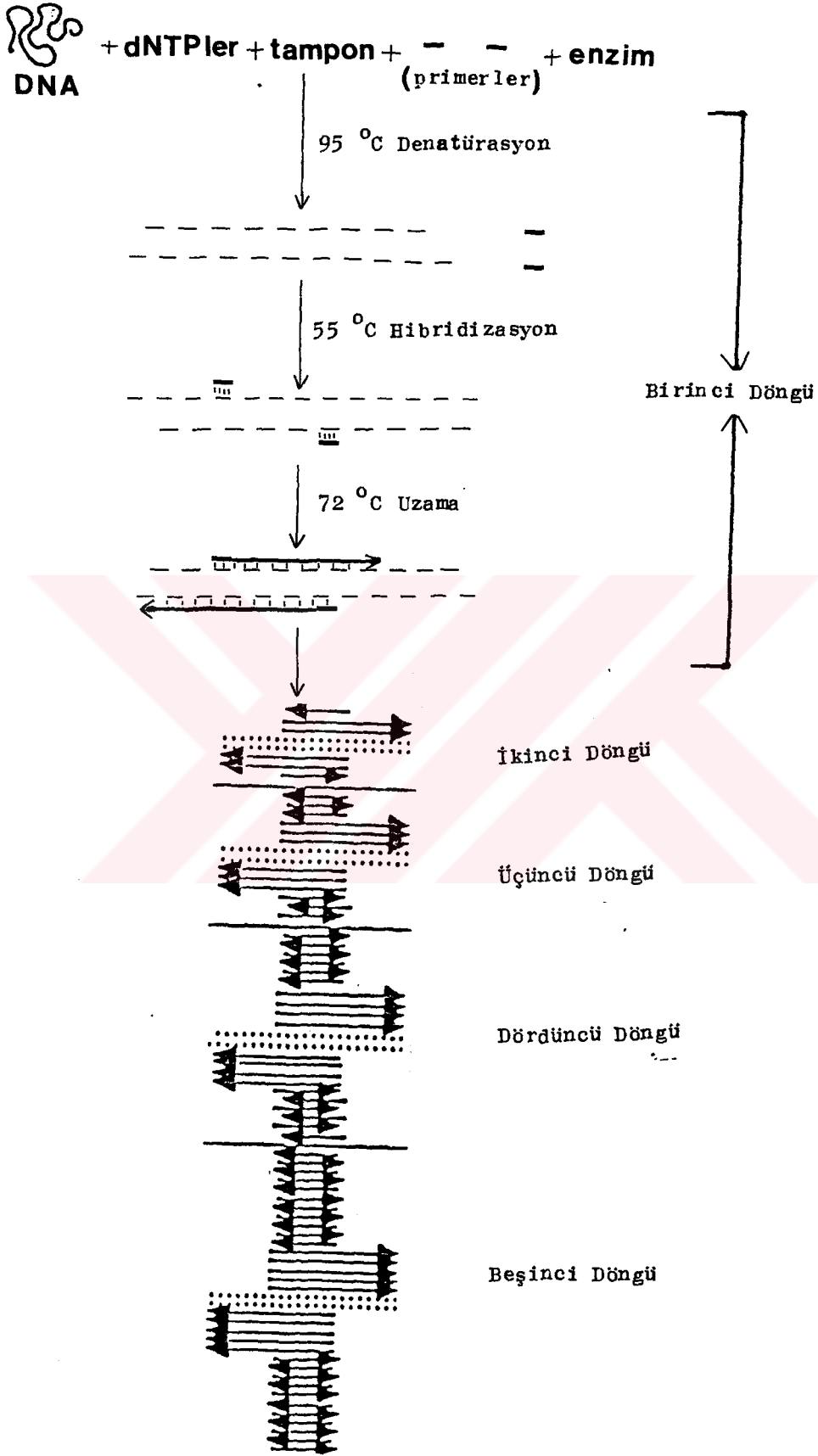
bölgesi ile sadece üç baz çiftinin uyumsuzluğunun bu bölgede olabilecek herhangi bir amplifikasyonu önlemeye yeterli olduğu görülmüştür(54).

Amplifiye edilecek DNA dizisinin enzimatik olarak saf şekilde bulunmasına gerek yoktur; dizi kompleks bir karışımın ufak bir parçası olabilir, yani insan DNA sının tümü içinde tek kopya bir gen olabilir. Reaksiyon sonunda elde edilen ürün, 5' ve 3' uç noktalarına isabet eden primerler arasında kalan bir dsDNA molekülüdür. Şekil 7'de amplifikasyon yöntemi şematik olarak gösterilmiştir.

DNA, iki primer ve dört deoksiribonükleotid trifosfatın yüksek molar konsantrasyonunu içeren reaksiyon tamponu içinde denatüre edilir. Böylece DNA templet vazifesini rahatlıkla görür.

Reaksiyon  $T_4$  DNA polimeraz veya E.Coli'nin DNA polimeraz 1 Klenow Fragmenti ilave edildikten sonra, iki primer arasında kalan ve DNA'nın karşıtı olan dizi sentezlenmeye başlar(55). İşleme ardı ardına uygulanan, farklı sıcaklıklarda denatürasyon, hibridizasyon ve uzatma, "extention", işlemleri ile devam edilir. Reaksiyona, istenen uzunluktaki dizi istenen miktarda elde edilinceye kadar devam edilir. İlk döngüde ve bunu takip eden her bir döngüde, orijinal templete hibridize olan her bir oligonükleotid belirsiz uzunlukta ssDNA molekülü üretir. Bu ürünler, döngü sayısına göre lineer olarak birikmeye başlar. Uzun ürünler, bundan sonraki döngüde, bir diğer oligonükleotid için templet vazifesi görür ve bu oligonükleotidlerin uzaması spesifik uzunlukta oligonükleotid molekülünün meydana gelmesini sağlar. Her bir döngüdeki kopyalamanın başarı ile gerçekleştiği kabul edilirse, beher döngünün verimi % 62 olarak hesaplanmıştır(56).

Bu yöntem sayesinde spesifik DNA dizileri, selektif



Şekil 7- Gen Amplifikasyonu

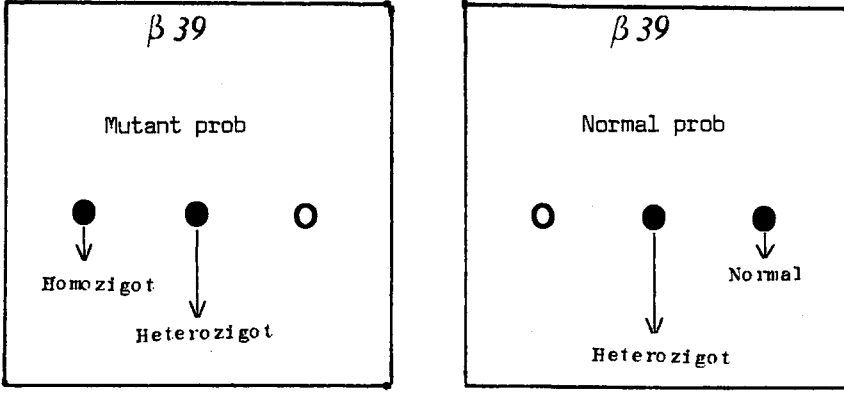
olarak zenginleştirilerek, genlerde dizilerin değişkenliği(53,57,58), kromozomal düzenlemelerin incelenmesi(59), genomik nükleotid dizilerinin yüksek verimlilikte klonlanması(60) ve mitokondrial ve genomik DNA ların direkt olarak dizilerinin tayin edilmesi(61-65), mümkün olmaktadır.

Bu yöntemin güçlüğü, polimeraz enziminin termolabil olmasındandır. Sentezlenen DNA parçalarının birbirinden ayrılması için ısı denatürasyonu gerektiğinden, her döngü reaksiyona taze enzim ilavesi ile gerçekleştirilir. Eğer aynı anda birden fazla amplifikasyon yürütülüyorsa, hata riski artar. Son zamanlarda polimeraz enziminin yerine, termofilik bir bakteri olan Thermus aquaticus'dan saflaştırılan taq polimeraz enzimi kullanılmaya başlanmıştır(66). Taq polimeraz 95°C de uzun süreli inkübasyonlara dayanıklı olduğu için bu yöntemi oldukça basite indirgeyerek amplifikasyon yönteminin spesifikliğini, verimliliğini ve hassasiyetini arttırmıştır. (67,68). Taq polimeraz ile, 2000 bp uzunluğundaki DNA zincirlerinin amplifikasyonlarında da başarı elde edilmiştir(67).

Amplifikasyon işleminin ardından, amplifiye edilen DNA dot-blot şeklinde iki kopya membran üzerine aynı miktarlarda tatbik edilir(69). Daha önce tarif edildiği gibi, bir membran radyoaktif işaretli normal prob ile ve diğeri mutant prob ile hibridize edilir.

Aşağıda dot blotta hibridizasyon işlemi şematik olarak görülmektedir (Şekil 8). Sağda normal ile, solda mutant prob ile hibridizasyonu görülmektedir. Şeklin en sağındaki blot normal probun hibridize olduğunu fakat mutantın hibridize olmadığını göstermektedir. Bu nedenle bu kromozomda, aranan mutasyonun bulunmadığı görülmektedir. Her bir şeklin ortasındaki blot, kromozomun aranan mutasyon için heterozigot, en soldakinin ise homozigot olduğunu göstermektedir.





Şekil 8- Dot-Blot Hibridizasyonu (O: Hibridize olmayan, ●: Hibridize olan).

Prenatal teşhisde, gen amplifikasyonu büyük avantajlar getirmiştir. Örneğin, bir seri mutasyonun tayini için çok az miktarda DNA (yaklaşık 0,5 µg) yeterli olduğu gibi, işlem çok daha kısa sürede tamamlanarak, nokta mutasyonun bulunup bulunmadığına dair direkt ve sağlıklı sonuçlar elde edilir. Ayrıca tanı için aile çalışmaları (family studies) ile bağ analizlerine (linkage analysis) gerek yoktur. Ancak, β-talassemi veya incelenen genetik hastalığa neden olan mutasyon önceden bilinmiyorsa, ilgili gen kümesinin günümüze kadar bilinen bütün mutasyonlara göre hazırlanmış sentetik oligonükleotid proplar ile taranması veya kromozomun dizi analizinin yapılması gereklidir(70). Bu nedenle, bazı durumlarda, β-talasseminin prenatal teşhisi yapılırken RFLP analizlerini de beraberinde uygulamak gerekebilir ve genelde günümüzde haplotip tayinleri için klonlanmış DNA propları geniş çapta kullanılmaktadır(71).

### III- ARAÇ, GEREÇ VE YÖNTEMLER

#### 1. KİMYASAL MADDELER

Adenosin 5'( $\gamma$ - $^{32}$ P)Trifosfat ( $\gamma$  $^{32}$ PdATP), Trietil amonyum tuzu, 5000 Ci/mmol (Amersham)  
Agaroz (Sigma)  
Amonyum bi karbonat (Fluka)  
Amonyum klorür (Fluka)  
Amonyum sülfat (Merck)  
Asetik Asit, glasiyel (Merck)  
Bovin Serum Albumin, BSA (Sigma)  
Bromofenol Mavisi (Merck)  
2'-Deoksiadenosin 5'-Trifosfat, dATP (Boehringer Mannheim)  
2'-Deoksiganosin 5'-Trifosfat, dGTP (Boehringer Mannheim)  
2'-Deoksisitidin 5'-Trifosfat, dCTP (Boehringer Mannheim)  
2'-Deoksitimidin 5'-Trifosfat, dTTP (Boehringer Mannheim)  
DL-Ditioteritol, DTT (Sigma)  
Etanol (Merck)  
Eter (Merck)  
Etidyum bromür, EB (Sigma)  
Etilendamin tetraasetik asit, disodyum tuzu, EDTA (Merck)  
Fenol (Merck)  
Fikol-Tip 400 (Sigma)  
Hidroklorik asit (Merck)  
8-Hidroksikuinolin (Sigma)  
Hind III, 20.000 ünite/ml (Biolabs)

İzo amil alkol (Merck)  
Kloroform (Merck)  
 $\lambda$ , Lambda DNA Metillenmemiş (Biolabs)  
Magnezyum asetat (Sigma)  
Magnezyum klorür (Sigma)  
2-Merkaptoetanol (Sigma)  
Oligonükleotidler (Symbicom)  
Polinükleotid Kinaz, 10.000 ünite/ml (Biolabs)  
Polivinilpirolidon, PVP (Sigma)  
Potasyum glutamat (Sigma)  
Potasyum meta bi sülfid (Merck)  
Primerler R-37 ve R-47 (Symbicom)  
Proteinaz K (Sigma)  
Röntgen banyosu (Kodak, D-76)  
Sephadex G-25, Medium, 50-150  $\mu$ m (Pharmacia)  
Sodyum asetat (Merck)  
Sodyum azit (Merck)  
Sodyum bi hidrojen fosfat (Merck)  
Sodyum dodesil sulfat, SDS (Sigma)  
Sodyum hidroksit (Merck)  
Sodyum klorür (Fluka)  
Sodyum sulfid (Merck)  
Sodyum tiosulfat (Merck)  
Taq Polimeraz, 5.000 ünite/ml (Anglian)  
Tri sodyum sitrat (Sigma)  
Tris (2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiyol) (Sigma)

## 2. MALZEME VE ALETLER

Adsorban kağıt (Whatman 3 MM)

Agaroz gel aleti (TÜBİTAK)

Banyolar : Su (Eppendorf, Haake SWIS 20, Nüve BM 101)

: Yağ (Multi-block heater, Lab-Line)

Dolaplar : +4°C (Arçelik)

: -20°C (Beko)

: -70°C (GFL)

Dot-Blot (Bio-Rad)

Elektroforez güç kaynağı (EPS 400/500, Pharmacia)

Enjektör, steril (Impex)

Filmler : Polaroid, siyah-beyaz

Siyah-beyaz, negatif (İlford FP4)

Röntgen (Kodak X-Omat)

Filtreler:Whatman GF/C

Steril Filtre, 0,2 µm (Sartorius Minisart NML)

Millipore, 0.45 µm

Naylon membran, 0.45 µm (Nytran NY 13, Schleicher Schuell)

Fotoğraf Makinası (Polaroid MP-4, Land Camera)

İnkübatör (Nüve)

Liyofilizatör (TÜBİTAK)

Magnetik karıştırıcı (Spin master, Cole/Parmer)

Mikropipetler (Gilson ve Eppendorf)

Mikrosantrifüj tüpleri (Eppendorf)

Otoklav (TÜBİTAK)

PH-Metre (EMAF)

Radyoaktif Detektör (Mini-monitor)

Santrifüjler: Sorvall, RC5-C (DuPont)

(Motorları: . Sabit (Fix) SS-34

. Salınan (Swing-bucket) HS-4)

Mikrosantrifüj (Eppendorf, 5415)

β-Sintilasyon sayacı (LKB Wallac, 1212 Rackbeta)

Spektrofotometre (Varian DMS 90)-(Kuvartz Küvetler-Hellman)

Teraziler: Hassas (Mettler H31)

Normal (Mettler PE2000)

Ultraviöle ışın vericisi, kısa dalga (Foto Dyne)

### 3. SOLÜSYONLARIN VE TAMPONLARIN BİLEŞİMLERİ

Agaroz gel yükleme tamponu: % 0,05 Bromofenol Mavisi  
% 20 Fikol, tip 400  
(1xTAE, pH 7,8 ile hazırlanır)

50x Denhardt'ın tamponu : % 1 Fikol, tip 400  
% 1 Polivinilpirolidon  
% 1 Bovin serum albumin

25 mM dNTP karışımı : 25 mM dATP  
25 mM dCTP  
25 mM dGTP  
25 mM dTTP  
(0,1 N NaOH ile pH 8,8'e ayarlanır).

10x Kinaz Tamponu : 700 mM Tris.HCl, pH 7,6  
100 mM MgCl<sub>2</sub>  
5 mM DTT

10x Potasyum Glutamat Tamponu : 1 M Potasyum glutamat  
250 mM Tris.asetat pH 7,6  
100 mM Magnezyum asetat  
50 µg/ml Bovin serum albumin  
5 mM 2-Merhaptoetanol

Proteinaz K Tamponu : 100 mM Tris.HCl, pH 7,5  
1 mM EDTA, pH 8,0  
1 mM DTT

- 20x SSC : 3 M NaCl  
0,3 M Tri sodyum sitrat  
(12 M HCl ile pH 7,0'a ayarlanır)
- 20x SSPE : 3 M NaCl  
0,2 M Sodyum bi hidrojen fosfat  
0,02 M EDTA, pH 8,0  
(10 N NaOH ile pH 7,4'e ayarlanır)
- 1x STE : 10 mM Tris.HCl, pH 8,0  
100 mM NaCl  
1 mM EDTA, pH 8,0
- 10x TAE : 400 mM Tris  
40 mM EDTA, pH 8,0  
200 mM Sodyum asetat  
(Asetik asit ile pH 7,8'e ayarlanır).
- 5x Taq Enzim Tamponu : 335 mM Tris.HCl, pH 8,8  
83 mM Amonyum sülfat  
33,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
50 mM 2-merkapttoetanol  
0,85 mg/ml Bovin serum albumin
- 1x TE : 10 mM Tris.HCl, pH 8,0  
1 mM EDTA, pH 8,0

Not: Kullanılan tüm maddeler mümkün olan en saf kalitededir. Tamponlar distile su içinde hazırlanıp 0,45 µm Millipore filtresinden veya 0,2 µm lik steril filtreden süzülüp otoklavlanarak kullanıldı.

#### 4. YÖNTEMLER

##### a) Kan Örneklerinin Eldesi

Yapılan analizlerde, klinik tablosu hafiften şiddetliye varan anemi ve  $\beta$ -talassemi bulguları gösteren 9 adet EDTA lı (1 mg EDTA/ml-kan) hasta kanı ile bir adet sağlıklı gönüllü kanı kullanılmıştır(72). Kan örneklerinin alındığı olguların hematolojik ve klinik bulguları Tablo 1'de özetlenmiştir.

##### b) DNA Eldesi ve Konsantrasyonun Hesaplanması

DNA eldesi için, Gross-Bellard ve ark. ile Grossens ve ark.'nın yöntemleri modifiye edilerek kullanılmıştır(73, 74).

5 ml EDTA lı kan örneği, 10 ml.lik tüplerde, +4°C de 2500xg de (6000 rpm, rotor: SS-34) 15 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Supernatan atıldı. Hücre peleti, 3 defa, +4°C de 2500 xg de 10 dakika, % 0,9 NaCl ile yıkandı. Pelet, 50 ml lik tüplere aktarılarak üzerine 15-20 ml 131 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ve 0,9 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  içeren lizat solüsyonu ilave edildi ve eritrositlerin liziz olması için, 15 dakika kadar buz içinde bekletildi. Lizis işleminin tamamlanmasından sonra, tüp, +4°C de, 10.000xg de (yaklaşık 7000 rpm, rotor: HS-4), 10 dakika, fren kullanılmadan santrifüj edildi. Hemolizat (süpernatant) atılarak, tüp adsorban bir kağıt üzerine ters çevrilerek kısa bir süre bekletildi ve tüp dibine yapışan pelet 10 ml 1x STE tamponu ile yıkandı. Daha sonra, tüp üzerine, 4,5 ml 1x STE ilave edilerek pelet süspansiyonu yapıldı. Son konsantrasyonu 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  proteinaz K içeren proteinaz K tamponu ve SDS (% 1) ilave edildi. Bir proteolitik enzim olan proteinaz K, nükleik asit izolasyonlarında son 15 seneden beri kullanılmakta olup, SDS gibi keotropik ajanlar ile aktive edildiği

**Tablo 1**  
Kan Örneklerinin Alındığı Olguların Hematolojik ve Klinik Bulguları

Normal Degerler		Hb (g/dl)	K.K. ( $10^{12}/L$ )	Hematokrit (%)	OE <sub>V</sub> (fl)	OE <sub>H</sub> (pg)	OE <sub>HK</sub> (g/dl)	HbA <sup>a</sup> (%)	HbF <sup>b</sup> (%)	Teşhis <sup>c</sup>
	Erkek (E)	14-18	4,2-5,4	42-52	80-96	27-31	32-36	1,8-3,2	<2	
	Kadın (K)	12-16	3,6-5,0	36-46						
Olgu	Örnek No	Yaş Cinsiyet								
S.B.	1	45-K	4,45	34	76,4	20,7	27,0	5,8	0	$\beta^+$ -talassemi
A.E.	2	29-E	2,88	22	76,4	26,0	34,0	2	32,5	$\beta^0$ -talassemi
L.B.	3	32-E	4,2	33	78,5	21,2	27,0	5	1,5	$\beta^+$ -talassemi
A.G.	4	45-E	6,7	33,1	49,4	17,6	35,6	3,3	0,9	-
N.K.	5	27-K	3,316	26	78,4	22,6	28,8	5	15	$\beta^+$ -talassemi
S.K.	6	11-K	3,86	32	83,0	24,3	29,3	4,7	0	$\beta^+$ -talassemi
F.K.	7	18-E	4,5	35	78,0	21,6	27,7	4,8	1	$\beta^+$ -talassemi
S.K.	8	34-K	4,5	32	71,1	21,1	29,7	4,2	0	$\beta^+$ -talassemi
H.G.	9	20-E	5,03	44,9	89,2	31,2	35,0	2,9	1,4	-
O.Ö.	10	28-K	4,7	42	89,3	31,9	35,2	2,5	0,5	Sağlıklı gönüllü

(Hb:hemoglobin; K.K.:Kırmızı küre; OE<sub>V</sub>:Ortalama eritrosit volüm; OE<sub>H</sub>:Ortalama eritrosit hemoglobini;  
OE<sub>HK</sub>:Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu)  
(a) DEAE kolon kromatografisi (2) - (b) Alkali denatürasyon yöntemi (2) - (c) Prof.Dr.Muzaffer Aksoy tara-  
findan yapılmıştır.



bilinmektedir(75). Süspansiyon yapılmış pelet, bu karışım içinde, 37°C de, bir gece (16 saat) bekletildi. Ertesi gün, doymuş fenol solüsyonu ile DNA ekstraksiyonu yapıldı.

Ticari kristalize fenol, 182°C de distile edildikten sonra, koyu renkli cam şişelerde +4°C'de saklandı. Nükleik asit izolasyonlarında kullanılan doymuş fenol, Maniatis ve ark.'larının tarif ettiği gibi hazırlandı(76).

+4°C de katı distile fenol, 68°C ye getirilerek eritildi. Üzerine son konsantrasyon % 0,1 olacak şekilde 8-hidroksikuinolin ilave edildi. 8-Hidroksikuinolin, anti oksidan vazifesi görür, kısmen RNaz'ı inhibe eder ve metal iyonları için çelasyon ajanıdır. Sarı renkte olması ise ayrılan fazların kolaylıkla tanınmasına yardımcı olur. Eritilen fenol, bir kaç defa eşit hacimde tris tamponları (1,0 M Tris-HCl, pH 8,0 ardından 100 mM Tris-HCl, pH 8,0 ve % 0,2 2-Merkaptoetanol) ile ekstre edildi. Bu işleme, sıvı fazın pH'sı 7,6 nın üstüne yükselinceye kadar devam edildi. Bu şekilde hazırlanan doymuş fenol, koyu renkli cam şişelerde, +4°C de bir ay dayanıklıdır.

Nükleik asit karışımı, iki defa eşit hacimde doymuş fenol:kloroform:izoamil alkol (25:24:1) ve bir defa eşit hacimde kloroform:izoamil alkol (24:1) ile ekstre edildi. Kloroform proteinleri denatüre etmek için ve izoamil alkol ise ekstraksiyon esnasında köpürmeyi önlemesi ve organik fazın sıvı fazdan kolaylıkla ayrılması için kullanıldı.

Sıvı fazdan fenolün uzaklaştırılması için bir defa su ile doyurulmuş eter ile ekstraksiyon yapıldı. Ekstraksiyon esnasında, örnek kaybını ve DNA ya zarar verebilecek serbest radikallerin oluşmasını önlemek için, eter su ile doyuruldu(76).

Ekstraksiyon sonucunda, nükleik asitler 1/10 hacim 3M sodyum asetat, pH 5,0 ve 2,5 hacim saf etanol ilavesi ile çöktürüldü.

Beyaz renkli, saç görünümlü çökelek, iki defa % 70 etanol ve bir defa saf etanol ile yıkanarak liyofilize edildi. Kuru pelet, 1 ml TE içinde çözüldü ve -20°C de saklandı.

DNA ların 260 nm de ve 280 nm de O.D. değerleri alındı.

Nükleik asitlerin maksimum absorpsiyonu, 260 nm'de olduğundan, bu değer DNA konsantrasyonunun hesaplanmasında kullanıldı(76). 260 nm de ölçülen 1 O.D., 1 ml de yaklaşık 50 µg çift sarmal DNA ya karşılıktır. Ayrıca  $OD_{260}/OD_{280}$  oranı nükleik asitlerin saflıklarının tanımlanmasında kullanılan bir değer olup, bu protein ve fenolden arınmış saf DNA için 1,8 dir. Protein ve fenol kontaminasyonunda bu değer 1,8'in altına düşmekte, RNA kontaminasyonunda ise 2 ye çıkmaktadır. Bu durumlarda DNA miktarlarının kesin olarak hesaplanması mümkün değildir.

Konsantrasyon hesabı için -20°C de saklanan DNA örnekleri oda sıcaklığına getirilerek çözüldü. Bu örneklerden 5 µl alınarak, % 1 SDS ile 1 ml ye tamamlandı, saf % 1 SDS'ye karşı, 260 nm ve 280 nm de absorpsiyonları okundu. Aşağıdaki denkleme göre konsantrasyonları hesaplandı (Tablo 3).

1 O.D. = 50 µg/ml DNA olduğuna;

$$\frac{O.D. \times 50 \mu\text{g/ml} \times 200 \text{ (Seyrelti faktörü)}}{1000 \mu\text{l/ml}} = \dots \frac{\mu\text{g/ml}}{\text{DNA}}$$

c) Amplifikasyon Primerleri ve Prob Olarak Kullanılan Oligonükleotidler

Amplifikasyonda kullanılan primerler 20, prob olarak kullanılan oligonükleotidler ise 19 deoksiribonükleik asit uzunluğunda olup dizi analizleri Tablo 2'de gösterilmiştir.

Primerler (R-37 ve R-47),  $\beta$ -globin geninin "cap" noktası 'O' kabul edilirse, -76 ıncı deoksiribonükleotidden başlayarak, IVS-I,1, IVS-I,6, IVS-I,110 ve  $\beta$ -39'uncu kodon mutasyonlarını kapsayacak şekilde, ikinci eksonun +451 inci deoksiribonükleotidinde son bulan 527 deoksiribonükleik asitlik bir diziyi içermektedir.

Tablo 2

Primerlerin (R-37, R-47) ve Prob Olarak Kullanılan Sentetik Oligonükleotidlerin,  $\beta$ -Globin Geni Üzerindeki Pozisyonları, Dizi Analizleri ve Tipleri

No	Pozisyon	5' Dizi Analizi 3'	Tip
R-37	-76 cap'a göre 5'	CCAATCTACTCCCAGGAGCA	Primer
R-47	+451 Exon 2	CACTCAGTGTGGCAAAGGTG	Primer
I	IVS-I,1	GCAGATTGGTATCAAGGTT	Mutant
II	IVS-I,1,6	GCAGGTTGGTATCAAGGTT	Normal
III	IVS-I,6	GCAGGTTGGCATCAAGGTT	Mutant
IV	IVS-I,110	CTGCCTATTGGTCTATTTT	Normal
V	IVS-I,110	CTGCCTATTAGTCTATTTT	Mutant
VI	Ekson 2,kodon 39	CCTTGGACCCAGAGGTTCT	Normal
VII	Ekson 2,kodon 39	AGAACCTCTAGGTCCAAGG	Mutant

Prob olarak kullanılan sentetik oligonükleotidler de aşağıdaki mutasyonlar bulunmaktadır.

I no.lu sentetik oligonükleotidde birinci intronun

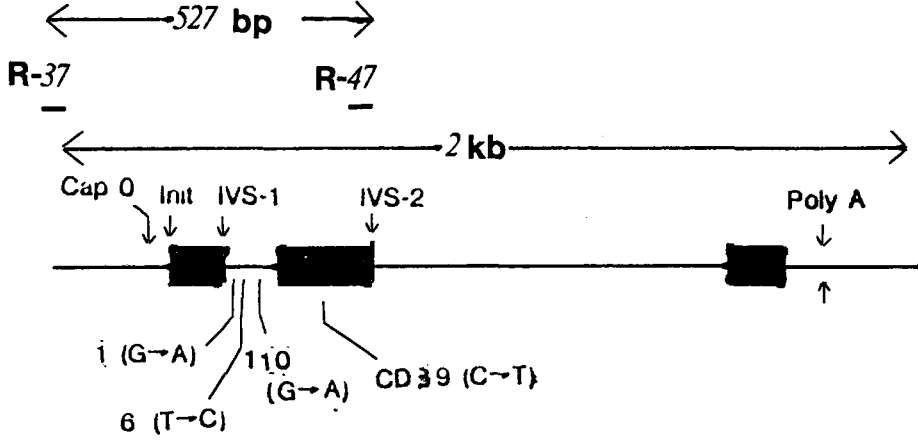
(IVS-I), birinci nükleotidinde G'nin yerini A almıştır. Genel bilgiler bölümünde de bahsedildiği gibi gen üzerindeki "splice" bölgelerinin GT donör (5') ve AG akseptör (3') dinükleotidleri daima korunmaktadır. Bu noktalarda meydana gelen mutasyonlar "splicing" mekanizmasına etki etmektedir(25). Akdeniz bölgesinde çok sık rastlanan bu  $\beta$ -mutant genine  $\beta^0$  denilir.

II no.lu sentetik oligonükleotidde birinci intronun (IVS-I), altıncı nükleotidinde T nin yerini C almıştır. Bu mutasyon, birinci intronun "consensus" dizisinde görülür. Bu yer değiştirme, mRNA "splicing" mekanizmasının fonksiyonunu normalin altına düşürür, fakat gene de bir miktar sağlıklı mRNA oluşabilir(25). Bu nedenle, bu  $\beta$ -mutant genine  $\beta^+$  denilir.

V no.lu sentetik oligonükleotidde birinci intronun (IVS-I), 110'uncu nükleotidinde G nin yerini A almıştır. Akdeniz bölgesinde yaygın olan bu mutasyon, intron içinde normal mRNA oluşumu ile yarışan yeni bir akseptör "splice" noktasının bulunmasına ve gerçek mRNA oluşumundaki verimin düşmesine neden olur(77,78). Bu RNA tiplerinde mRNA'nın sitoplazmaya transportu gerçekleşmez veya transport olsa dahi mRNA stabil değildir ve derhal parçalanır. Ayrıca anormal mRNA'nın translasyon esnasında prematüre terminasyonu da söz konusudur. Bu,  $\beta$ -mutant genine  $\beta^+$  denilir.

VII no.lu sentetik oligonükleotidde ekson 2 de, 39 uncu kodonda C nin yerini T almıştır. Akdeniz bölgesinde ve özellikle Sardinya adasında çok sık görülen bu mutasyon  $\beta$ -globin geninde anlamsız "nonsense", ya da "frame shift", mutasyonu meydana getirir ki bu durum translasyon esnasında prematüre zincir terminasyonuna ve dolayısı ile  $\beta$ -globin polipeptid sentezinin engellenmesine neden olur(79-81). Bu gene  $\beta^0$ -tipi denilir.

Primerler ile sentetik oligonükleotidlerin  $\beta$ -globin genindeki yerleri Şekil 9'da görülmektedir.



Şekil 9- Primerler (R-37, R-47) ile mutant bölgelerin,  $\beta$ -globin genindeki pozisyonları. Siyah renkli kutular soldan sağa sırasıyla ekson 1, ekson 2 ve ekson 3'ü göstermektedir.

#### d) Gen Amplifikasyonu

Amplifikasyon yöntemleri laboratuvarımızdaki koşullara göre modifiye edilerek kullanılmıştır(53,67,82).

Bir mikrosantrifüj tüpüne, son hacmi 50  $\mu$ l olacak şekilde 0,5  $\mu$ g. DNA örneği, 1x Taq enzim tamponu, 1,5 mM dNTP karışımı (1,5 mM dATP, 1,5 mM dCTP, 1,5 mM dGTP, 1,5 mM TTP), 1  $\mu$ M R-37 ve 1  $\mu$ M R-47 ilave edildi. Reaksiyon karışımı üzerine, buharlaşmayı önlemek için 20  $\mu$ l mineral yağı ilave edildi. Mikrosantrifüj tüpü 95°C de 5 dakika yağ banyosunda bekletilerek DNA'nın denatürasyonu temin edildi. Daha sonra 55°C de su banyosunda 1 dakika bekletilerek primerlerin DNA'nın ilgili bölgelerine spesifik olarak hibridizasyonu temin edildi(67). Mikrosantrifüj tüpüne hazırlanan enzim karışımından (0,5 ünite/ $\mu$ l Taq polimeraz, 1x Taq Enzim tamponu, 1,5 mM dNTP karışımı) 2  $\mu$ l ilave edilerek su banyosunda enzimin en verimli çalışma sıcaklığı olan 72°C de 3 dakika bekletil-

di. Daha sonra mikrosantrifüj tüpü, 1 dakika 95°C de denatürasyon, 1 dakika 55°C de hibridizasyon (primer eşleşmesi) ve 3 dakika 72°C de zincir uzama işlemlerinin gerçekleşmesi için tutuldu ve bu döngü 25 defa tekrarlandı. 10 uncu döngüden sonra 2 µl ve 20 inci döngüden sonra 1 µl Taq enzim karışımından ilave edilerek, aktivitesi azalan enzimin yerine takviye yapıldı. Amplifikasyon işleminden sonra örnekler -20°C de saklandı.

e) Agaroz Gel Elektroforezi İçin İzleyicinin Hazırlanması ve İncelenmesi

Agaroz gel elektroforezinde izleyici olarak, Hind III reaksiyon enzimi ile kesilmiş λ DNA sı kullanıldı.

Daha önce laboratuvarımızda yapılan bir çalışmada potasyum glutamat tamponunun, bir çok restriksiyon enzimi kesimlerinde yeterli ve verimli olduğu gösterilmiş idi(83). 10 µg γ DNA, 1x Potasyum glutamat tamponu içinde 37°C su banyosu içinde bir gece (16 saat) bırakıldı. Ertesi gün, son konsantrasyonu % 5 ficol (Tip 400) verecek oranda agaroz gel yükleme tamponu ilave edilerek, -20°C de saklandı.

Hazırlanan izleyiciden 0,5 µg alınarak % 0,8 lik agaroz gelde 1x TAE tamponu içinde, 4 saat, 7 volt/cm de (70 V) yürütüldü.

Elektroforez sonunda gel, U.V. ışın vericisi üzerinde incelenerek, Polaroid kamera ile resmi çekildi.

f) Agaroz Gel Elektroforezi ve Amplifikasyon Ürünlerinin İncelenmesi

DNA agaroz gel elektroforezinin prensibi, alkalın ya da nötral pH değerlerinde DNA molekülünün fosfat gruplarının

negatif yük ile yüklenmesi ve DNA molekülünün baz kompozisyonu ne olursa olsun, bir elektrik akımı verildiğinde daima anoda doğru hareket etmesi şeklinde açıklanabilir(84). DNA moleküllerinin hareketleri arasındaki fark karşılaştıkları dirence bağlı olarak değişir. Agaroz gelde DNA molekülleri gelin porları içinden geçerek hareket ederler ve böylece DNA molekülleri zincir uzunluklarına göre birbirlerinden ayrılırlar.

Agaroz gel elektroforezi kaynak da da belirtildiği şekilde hazırlandı(76). Gen amplifikasyon ürünlerini gel üzerinde izlemek için 1x TAE tamponu içinde %1,4 lük agaroz geli hazırlandı. DNA bantlarının U.V. ışığı altında görünebilirliğini temin etmek için bir florasen boya maddesi olan etidyum bromür, gel içinde son konsantrasyonu 0,5 µg/ml olacak şekilde önceden ilave edildi.

DNA amplifikasyonu sonucunda elde edilen ürünlerin verimleri farklı olacağı için önce her bir örnekten eşit hacimde (4 µl) alınarak ve son hacminde % 5 ficol (tip 400) içerecek miktarda agaroz gel yükleme tamponu ile karıştırılarak 5 volt/cm de 4 saat yürütüldü. Amplifikasyon bantları ve bantların yoğunluğu U.V. ışın verici üzerinde tespit edilerek polaroid kamerada resmi çekildi.

Moleküler izleyici olarak kullanılan λ/Hind III, amplifiye olan DNA nın zincir uzunluklarının tespit edilmesine yardımcı oldu. İzleyici parçalarının yükleme noktasına (orijine) olan uzaklıklarına karşılık, zincir uzunluklarının (bp olarak) 10 tabanına göre alınan logaritmik değerlerine göre çizilen standart grafik ile amplifiye DNA nın uzunluğu hesaplandı.

Yukarıda tetkik edilen amplifikasyon bantlarının yoğunluklarına göre yapılan DNA konsantrasyon ayarlamaları,

% 1,4 lük agaroz gel elektroforezinde incelenerek doğrulandı. Böylece her bir örnekten eşit miktarda DNA'nın dot-blot'a yüklenmesi gerçekleştirilebildi.

g) Dot-Blot

Dot-blot için gereken deneysel yöntemlerden modifiye edilerek kullanıldı(76).

Yükleme hacimleri 5-10 µl arası değişen amplifikasyon ürünleri, son hacimleri 100 µl olacak şekilde, 0,4 M NaOH ve 25 mM EDTA, pH 8,0 tamponu içinde, oda sıcaklığında 30 dakika bekletilerek denatüre edildi. Yüklemeden 5 dakika önce distile su ile ıslatılan naylon membran, vakumlu dot-blot cihazına yerleştirilerek örnek yüklemesi yapıldı. Blot olukları, 100-200 µl 2x SSC ile yıkandı. Blot bir adsorban kağıt üzerinde, oda sıcaklığında kurutuldu. Daha sonra naylon membran 2 saat 80°C de tutuldu. Havadan nem almayacak şekilde korunan naylon membran hibridizasyon için saklandı.

h) Sentetik Oligonükleotidlerin 5'-ucundan <sup>32</sup>P ile İşaretlenmesi

Radyoaktif madde ile işaretleme yöntemi modifiye edilerek yapıldı(76).

İşaretlemede, bir oligonükleotid zincirinin 5'-hidroksil ucu  $\gamma$ <sup>32</sup>PdATP kullanılarak işaretlendiği için yüksek spesifik aktivitede izotop (5000 Ci/mmol) ve optimum koşullar kullanıldı.

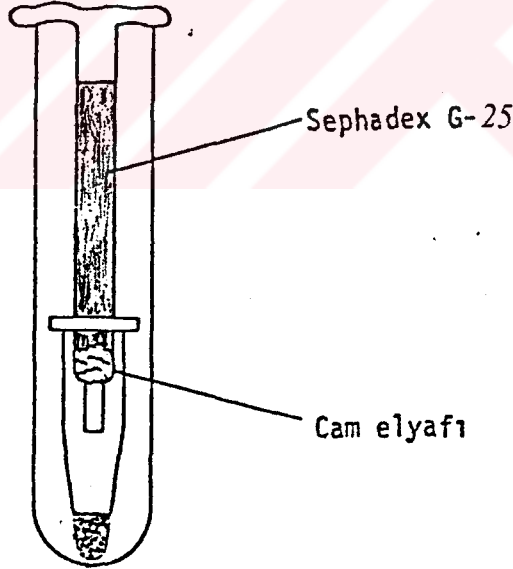
Bir mikrosantrifüj tübüne, son hacmi 50 µl olacak şekilde, 40 pmole oligonükleotid, 1x kinaz enzim tamponu, 100 µCi  $\gamma$ <sup>32</sup>PdATP ve 2 ünite polinükleotid kinaz enzimi ilave edildi. 37°C de su banyosunda inkübe edildi. Mikrosantrifüj tübüne 2 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0 ilavesi ile reaksiyon durduruldu.



### i) Sephadex G-25'in Hazırlanması

1 g Sephadex G-25 1x STE içinde karıştırıldı ve 20 dakika bekletildikten sonra supernatan atıldı. Bu işlem iki defa daha tekrarlandıktan sonra, Sephadex G-25, 1x TNE ve koruyucu olarak % 0,05 sodyum azit içinde +4°C de saklandı.

Gel filtrasyon prensibine göre işleyen Sephadex G-25, 1000 ile 5000 daltonluk makromolekülleri birbirinden ayırır. Çalışmada, tek zincir 19 nükleotidlik (yaklaşık 6000 dalton) oligonükleotidleri, yaklaşık 325 daltonluk dNTP lerden ayırmak için Sephadex G-25'i kullanmak yeterli görüldü. Yüksek molekül ağırlıklı DNA, gel filtrasyon metodu ile kolondan ayrılırken, dNTP gibi küçük moleküller Sephadex'e bağlı kalırlar. Genellikle iki metod kullanılır: 1) Kolon kromatografisi, 2) Şırınga içinde G-25 Sephadex'in santrifüjlenmesi (Şekil 10).



Şekil 10- Şırınga içinde G-25 Sephadex'in hazırlanması

Ayırma için çalışmada ikinci yöntem kullanıldı. 1 ml -lik plastik şırınganın dibine silikonlanmış cam elyafı yerleştirildi. Yatak hacmi 0,9 ml olacak şekilde 1x TNE içinde G-25 Sephadex ilave edildi. Şırınga, uygun bir santrifüj tü-

büne yerleştirilerek 1600xg (4500 rpm, rotor: SS-34) de 4 dakika çevrildi. Santrifüjden sonra Sephadex'in muntazam bir şekilde şırıngaya yerleştiği görüldü. Bu işlem, Sephadex G-25, 0,9 ml hizasına gelinceye kadar tekrarlandı. Daha önce 52 µl olan <sup>32</sup>P işaretli prob, 1x TNE ile 500 µl'ye tamamlanarak şırıngaya tatbik edildi. Aynı süre ve hızda santrifügasyon uygulandı. Santrifügasyon sonucunda <sup>32</sup>P işaretli oligonükleotid eppendorf tüpünde, serbest  $\gamma$ <sup>32</sup>P dATP ise şırıngada kaldı.

#### j) Problarda Yüzde İnkorporasyonunun Hesaplanması

Radyoaktif işaretleme işleminin verimi, ya da yüzde inkorporasyonu, Sephadex G-25 den önce ve sonra, Whatman GF/C kağıtlarına damlatılan 2 µl örneğin  $\beta$ -sintilasyon aletinde Çerenkov okuması yapılarak hesaplandı (Tablo 4). <sup>32</sup>P nin enerji spektrumunun % 80'i Çerenkov etki sınırının yani 0,5 MeV nin üzerinde olması, ucuz ve kolay olan bu okuma yönteminin kullanılabilmesini sağlamıştır. Çerenkov'un <sup>32</sup>P için verimi yaklaşık % 40 dır(87).

Sephadex G-25 den sonraki sayım/dakikanın önceki sayım/dakikaya bölünmesi ile oligonükleotidlerdeki yüzde inkorporasyon hesaplandı (Tablo 4).

Mikrosantrifüj tüplerinde muhafaza edilen <sup>32</sup>P işaretli sentetik oligonükleotidler kurşun bir kap içinde -20°C de muhafaza edildi. <sup>32</sup>P nin yarılanma ömrü 14,3 gün olduğu için maddenin bu süreden önce kullanılması daha yüksek spesifik aktivitede prob kullanımını temin etmiştir.

#### k) Hibridizasyon

Dot-blot için hibridizasyon yöntemi modifiye edilerek kullanıldı(54).

Dot-blot için hibridizasyon dereceleri ( $T_H$ ), aşağıdaki denkleme göre hesaplandı(88).

$$T_H = T_D - 3^{\circ}\text{C}$$

$$T_D = 2(A+T) + 4(G+C)$$

$T_H$ : Hibridizasyon derecesi

$T_D$ : Dissosiyasyon derecesi

Naylon membran, önce 5-10 ml 5xSSPE, 5x Denhardt'ın solüsyonu ve % 0,5 SDS içinde ilgili oligonükleotid için hesaplanan hibridizasyon derecesinde ( $T_H$ ), 1 saat inkübe edildi. Bir saat sonra, aynı tampon içinde veya taze tampon hazırlanarak, radyoaktif prob ilave edildi ve 2 saat aynı derecede inkübe edildi.

Hibridizasyon süresinin tamamlanmasından sonra, naylon membran 2defa, 500 ml lik 2x SSPE ve % 0,1 SDS içinde, oda sıcaklığında, 10 dakika ve 1 defa 500 ml lik 5x SSPE ve % 0,1 SDS içinde  $T_H$  derecesinde, 10 dakika yıkandı. Membran kısa bir süre, adsorban bir kağıt üzerinde kurumaya bırakıldı. İnce bir naylon torbaya geçirilerek otoradyografiye hazırlandı.

#### 1) Otoradyografi

Otoradyografi,  $^{32}\text{P}$  nin parçalanarak radyasyon ışınlamaya başlaması ile meydana gelen floresentin oluşturduğu uzun dalga boylu fotonların röntgen filmi tarafından kaydedilmesidir.  $-70^{\circ}\text{C}$  deki ekspozisyon floresent periyodunu uzatarak, kısa sürede netice elde edilmesini sağlar.

Otoradyografi karanlık odada gerçekleştirildi. İnce naylon kağıda sarılı naylon membran kasetin içine yerleştirildikten sonra aynı büyüklükte kesilen röntgen filmi dikkatlice membran üzerine yerleştirilerek sabitleştirildi. Kasetin

her iki yüzeyinde bulunan şiddetlendirici levhalar arasına sandviç yapılan film, 4-18 saat,  $-70^{\circ}\text{C}$  de bekletildi(85).

Film kaseti,  $-70^{\circ}\text{C}$  den çıkarılarak aşağıdaki şekilde karanlık odada banyo edildi:

Kodak röntgen banyosu	: 5 dakika
Su banyosu	: 1 dakika
Sabitleştirici banyo	: 10 dakika
(Sodyum tiosülfat 200 g	
Sodyum sülfat 12 g	
Potasyum meta bi sülfat 12 gm)	
Akar su altında çalkalama	: 15 dakika

Film oda sıcaklığında kurutuldu.

#### m) Naylon Membrandan Proben Uzaklaştırılması

Naylon membranlar yapıları nedeni ile çok dayanıklı oldukları için, üzerindeki radyoaktif prob uzaklaştırılarak başka bir prob ile yeniden hibridizasyona tabi tutulabilir(86).

Naylon membran 2 defa 10 dakika, oda sıcaklığında 50 mM NaOH içinde yıkandı. Daha sonra, tamponu 5 defa değiştirerek oda sıcaklığında TE içinde yıkandı.

Yıkama işlemlerinin tamamlanmasından sonra, radyoaktif maddenin tamamiyle uzaklaşıp uzaklaşmadığı, radyoaktif detektör ile kontrol edildi. Radyoaktivitenin tamamiyle uzaklaşmadığı durumlarda yıkama işlemi tekrarlandı.

#### IV- BULGULAR ve SONUÇLAR

##### 1. KAN ÖRNEKLERİNİN DNA KONSANTRASYONU

Tablo 3'de 9 hasta ve 1 normal olgudan alınan kan örneklerinin DNA saflıkları ve konsantrasyonları görülmektedir.

Tablo 3

DNA'ların Saflıkları ve Konsantrasyonları

Örnek No	OD <sub>260</sub>	OD <sub>280</sub>	OD <sub>260</sub> /OD <sub>280</sub>	µg/µl
1	0,051	0,033	1,54	0,51
2	0,167	0,093	1,79	1,67
3	0,049	0,029	1,68	0,49
4	0,045	0,029	1,55	0,45
5	0,057	0,033	1,72	0,57
6	0,069	0,041	1,68	0,69
7	0,153	0,058	2,6	1,53
8	0,119	0,070	1,7	1,19
9	0,051	0,034	1,5	0,51
10	0,042	0,030	1,4	0,42

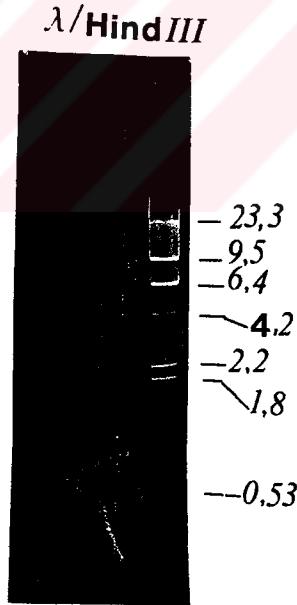
Kan örneklerinin alındığı olguların klinik bulguları Tablo 1'de özetlenmiştir.

7 no.lu örnek haricindeki örneklerde protein ve fenol kontaminasyonu, 7 no.lu örnek de ise RNA kontaminasyonu olduğu  $OD_{260}/OD_{280}$  oranında 1,8 değerlerinden farklı değerler bulgusu ile belirlenmektedir.

Bu düzeydeki kontaminasyon, gen amplifikasyonu yönteminin işlerliğini etkilemediğinden daha ileri bir saflaştırma uygulanmamıştır.

## 2. AGARUZ GEL ELEKTROFOREZİNDE İZLEYİCİNİN İNCELENMESİ

Resim 1'de agaroz gel elektroforezinde yürütülen izleyicinin verdiği DNA bantları görülmektedir.

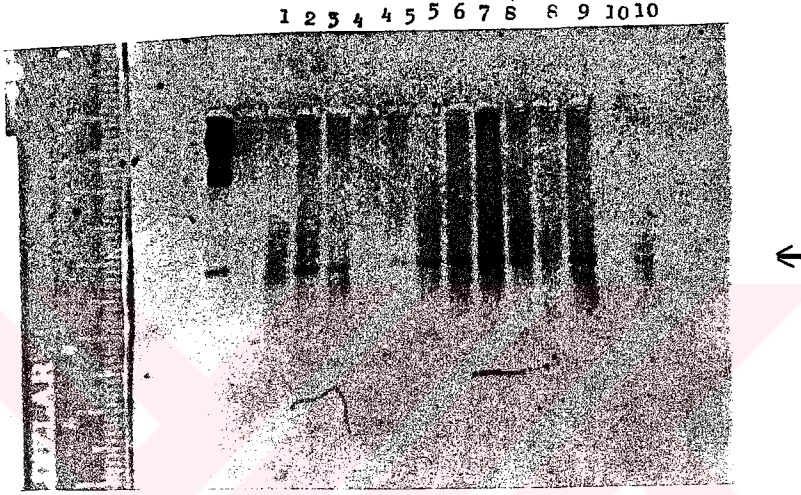


**Resim 1-** Lambda ( $\lambda$ )/Hind III izleyicinin agaroz gel elektroforezinde verdiği bantlar.

Resimde de görüldüğü gibi  $\lambda$  DNA sının, Hind III restriksiyon enzimi ile, 23,3, 9,5, 6,4, 4,2, 2,2, 1,8 ve 0,53 kb lik olmak üzere 7 adet fragmana kesildiği görülmektedir.

### 3. AMPLİFİKASYON ÜRÜNLERİNİN AGARUZ GEL ELEKTROFOREZİNDE İNCELENMESİ

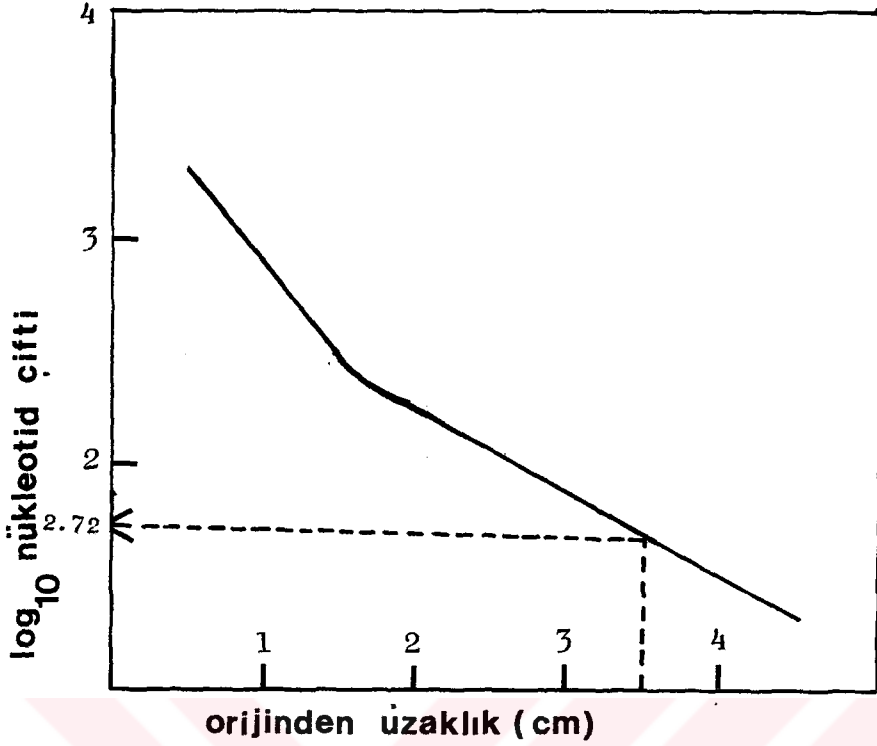
Resimde 2 de amplifikasyon ürünlerinin elektroforez sonunda agaroz gelin U.V. ışın yansıtıcısı üzerinde, polaroid kamera ile çekilen resmi görülmektedir.



**Resim 2-** Amplifikasyon ürünlerinin, agaroz gel elektroforezi sonucunda verdiği bantlar. En sol şeritte moleküler izleyici olarak kullanılan  $\lambda$ /Hind III görülmektedir. Resim üzerindeki numaralar, Tablo 1'de verilen örnek numaralarıdır. Ok işaretli bölgede görülen bantlar, her örnekte gen amplifikasyonunun farklı yoğunluklarda fakat her örnekte gerçekleştiğini göstermektedir (Bazı örnekler çift tatbik edilmiştir).

Şekil 11'de  $\lambda$ /Hind III izleyicisine göre çizilen standart eğri üzerinde amplifikasyon ürününün bp olarak zincir uzunluğunun hesaplanması gösterilmektedir.

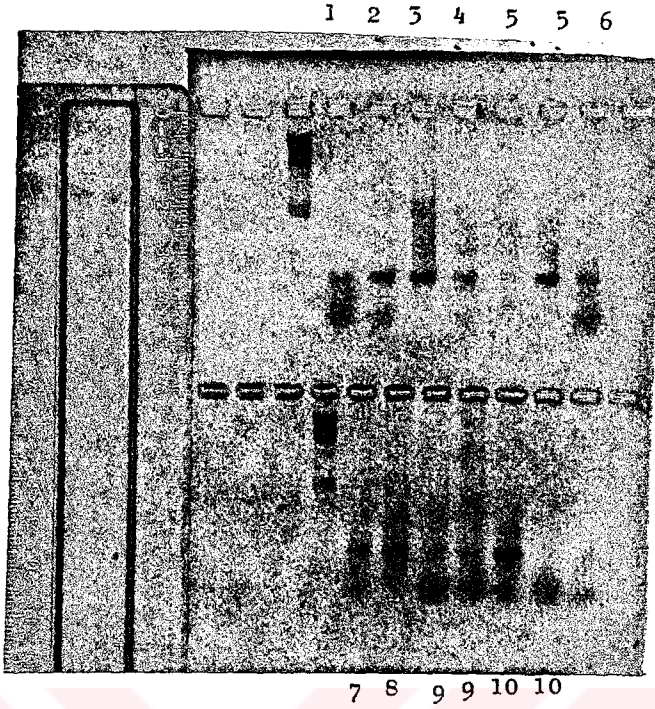
Resim 2'de görüldüğü gibi amplifikasyon ürünlerinin orijinden uzaklıkları 3,5 cm dir. Bu değer standart eğrinin dikey ekseninde 2,72 değerini vermiştir ki bu değer 524 bp ye tekabül eder. Bu sonuca göre, amplifiye edilmek istenen total 527 bp lik DNA fragmanının tamamı amplifiye edilmiştir.



Şekil 11-  $\lambda$ /Hind III izleyicisinin fragmanlarının agaroz gel elektroforezinde orijinden olan uzaklıklarına karşı, bp olarak zincir uzunluklarının 10 tabanına göre alınan logaritmik değerleri ile çizilen standart eğri (düz çizgi) ve amplifikasyon ürününün bu standart eğriye göre zincir uzunluğunun hesaplanması (kesik çizgiler).

Resim 3'de amplifikasyon ürünlerinin Resim 2'deki bant yoğunluklarına göre konsantrasyon ayarlamalarının yapılmasından sonra agaroz gel elektroforezinin U.V. ışın yansıtıcısı üzerinde polarid kameradan çekilmiş resmi gösterilmektedir.





**Resim 3-** Konsantrasyon ayarlaması yapıldıktan sonra, amplifikasyon ürünlerinin, agaroz gel elektroforezi sonucu verdiği bantlar. En sol şeritte moleküler izleyici olarak kullanılan  $\lambda$ /Hind III görülmektedir. Resim üzerindeki ve altındaki numaralar Tablo 1'de verilen örnek numaralarıdır (Bazı örnekler çift tatbik edilmiştir).

Dot-blota yüklenecek amplifiye DNA miktarlarının tespiti için Resim 2'deki bant yoğunluklarına göre ayarlanan ve Resim 3'de göz ile tespit edilen bantların örnek no.larına göre kullanılan hacimleri aşağıda belirtilmiştir.

<u>Örnek no</u>	<u>Hacim (<math>\mu</math>l)</u>
1	10
2	5
3	5
4	10
5	7
6	7
7	5
8	9
9	5
10	10

Resim 3, yukarıda belirtilen hacimlerin, agaroz gel elektrofezinde eşit yoğunlukta bantlar verdiğini göstermektedir.

#### 4. PROBLARIN YÜZDE İNKORPORASYONLARININ HESAPLANMASI

Tablo 4'de, Sephadex G-25 den sonraki sayım/dakika, önceki sayım/dakika değerleri ile, bu değerlerin birbirlerine göre orantıları sonucu hesaplanan yüzde inkorporasyon değerleri gösterilmektedir.

Tablo 4

<sup>32</sup>P ile İşaretli Probların Sephadex G-25 den Sonraki ve Önceki sayım/dakika Değerleri ile İnkorporasyon Yüzdeleri

Oligonükled Numarası*	Sephadex G-25		% İnkorporasyon
	Sonra (sayım/dakika)	Önce(sayım/dakika)	
I	91846	147333	% 62
II	37626	85254	% 44
III	218632	266671	% 81
IV	115968	131740	% 88
V	51940	56043	% 92
VI	153945	224009	% 68
VII	119980	253582	% 47

\*Oligonükleotid numaraları Tablo 2'de verilmiştir.

Normal ve mutant olmak üzere yedi ayrı oligonükleotidin <sup>32</sup>P ile 5' uç işaretleme çalışmalarında % 44-% 92 arası değişen değerlerde inkorporasyon elde edilmiştir.

## 5. HİBRİDİZASYON DERECELERİNİN ( $T_H$ ) VE HİBRİDİZASYONDA KULLANILAN PROBLARIN TOTAL DAKİKADA SAYIM DEĞERLERİ İLE SPESİFİK AKTİVİTELERİNİN HESAPLANMASI

Yöntemlerde (k) belirtilen denkleme göre yapılan hesaplamalar sonucu proplar için elde edilen hibridizasyon dereceleri Tablo 5'de belirtilmiştir.

Tablo 5

Oligonükleotid Probları İçin Hesaplanan Hibridizasyon Dereceleri

Oligonükleotid Numarası*	Hibridizasyon Derecesi ( $T_H$ )
I	51°C
II	53°C
III	55°C
IV	49°C
V	47°C
VI	60°C
VII	58°C

\* Oligonükleotid numaraları Tablo 2'de verilmiştir.

Hibridizasyon dereceleri 49°C ile 60°C arasında değişmektedir.

Tablo 4'de, Sephadex G-25 sonrası verilen sayım/dakika değerleri 2  $\mu$ l lik örnekten elde edilmiştir. Total hacmi 500  $\mu$ l olan her bir prob için, bu değerlerin 250 (500  $\mu$ l/2  $\mu$ l) ile çarpımı, propların total sayım/dakika değerlerini verir. Bu değer, reaksiyonda kullanılan gram cinsinden oligonükleotid ağırlığına ( $0,25 \times 10^{-6}$  g=40 pmole) bölünmesi ile her bir radyoaktif probun spesifik aktivitesi hesaplanır(89) (Tablo 6).

**Tablo 6**

Hibridizasyonda Kullanılan Probların Total Dakikada Sayım Değerleri ile Spesifik Aktiviteleri

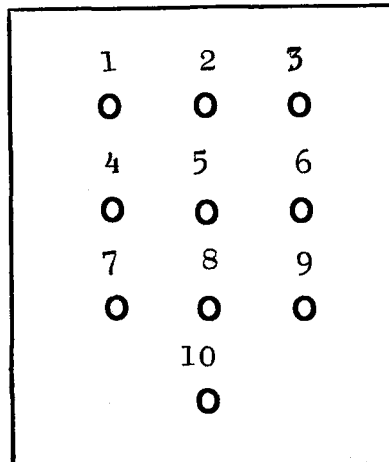
Oligonükleotid Numarası*	Bir hibridizasyonda kullanılan sondalar	
	total-sayım/dakika	sayım-dakika/gram
I	22,9 milyon	$9,16 \times 10^{13}$
II	9,4 milyon	$3,76 \times 10^{13}$
III	54,6 milyon	$2,18 \times 10^{14}$
IV	28,9 milyon	$1,15 \times 10^{14}$
V	12,9 milyon	$5,16 \times 10^{13}$
VI	38,4 milyon	$1,53 \times 10^{13}$
VII	29,9 milyon	$1,19 \times 10^{14}$

\*Oligonükleotid numaraları Tablo 2'de verilmiştir.

Hibridizasyonda kullanılan problemlerin total sayım/dakika değerleri  $(9,4-54,6) \times 10^6$  arası değiştiği görülmüştür. Spesifik aktiviteleri  $1,53 \times 10^{13}$  ile  $2,18 \times 10^{14}$  arası farklı değerler vermiştir.

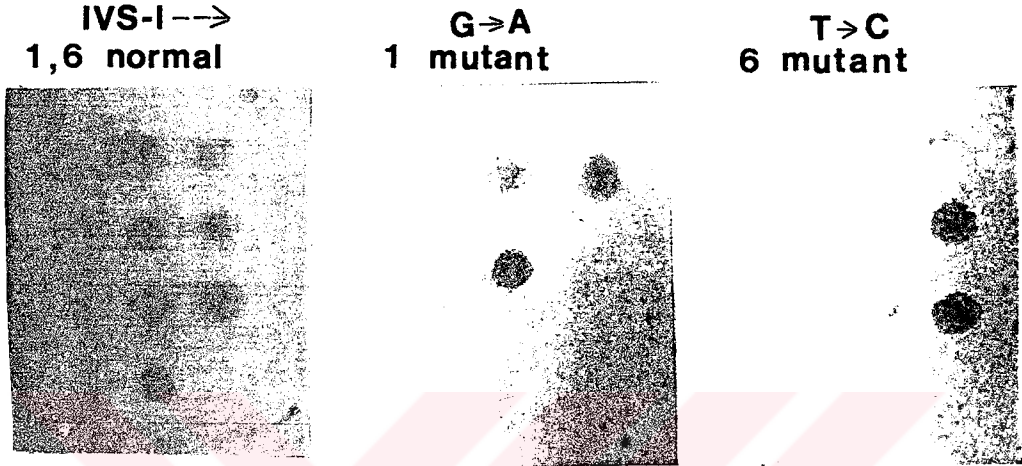
## 6. OTORADYOGRAFİDE NETİCELERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Şekil 12'de dot-blot da kullanılan örnek düzeni, ve Resim 4, 5 ve 6 da dot-blot kağıtlarının röntgen filmine ekspozite edilmelerinden sonra polaroid kamerada çekilen resimleri gösterilmiştir.



Şekil 12- Dot-blot da kullanılan örnek düzeni. Numaralar Tablo 1'de verilmiştir.

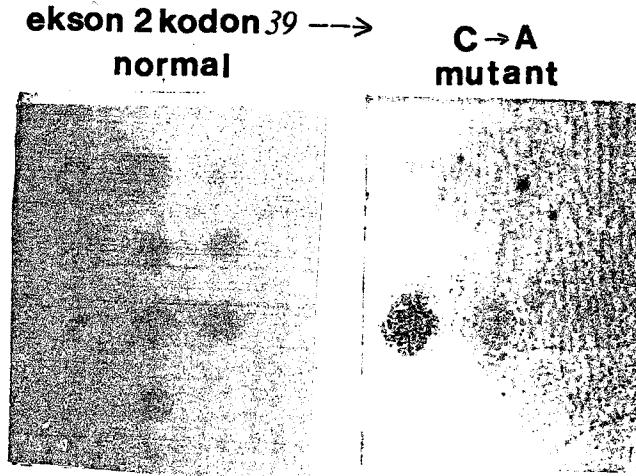
Resim 4'de, dot-blot'un IVS-I nt 1,6 normal, IVS-I nt 1 mutant ve IVS-I nt 6 mutant hibridizasyonlarından sonra röntgen filmine ekspozite edilmesini takiben polaroid kamerada çekilen resimleri gösterilmiştir.



Resim 4- IVS-I nt 1,6 normal, IVS-I nt 1 mutant ve IVS-I nt 6 mutant hibridizasyonları.

Bu sonuca göre, 2, 3 ve 5 no.lu örneklerin IVS-I nt 1 de G->A mutasyonu için heterozigot, 6 ve 9 no.lu örneklerin ise IVS-I nt 6 da T->C mutasyonu için heterozigot oldukları tanısı konmuştur.

Resim 5'de, dot-blot'un ekson 2 kodon 39 normal ve mutant hibridizasyonlarından sonra röntgen filmine ekspozite edilmesini takiben polaroid kamerada çekilen resimleri gösterilmiştir.



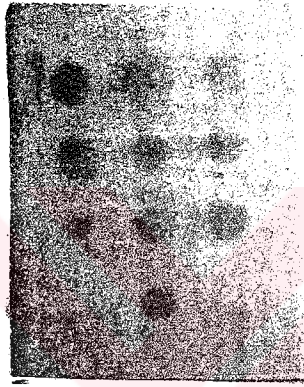
Resim 5- Ekson 2 kodon 39 normal ve mutant hibridizasyonları

Bu sonuca göre 7 no.lu örneğin ekson 2 kodon 39 da C→A mutasyonu için heterozigot olduğu tanısı konmuştur.

Resim 6'da, dot-blot'un IVS-I nt 110 normal ve mutant hibridizasyonlarından sonra röntgen filmine ekspozite edilmesini takiben polaroid kamerada çekilen resimleri gösterilmiştir.

IVS-I 110 →  
normal

G→A  
mutant



YOK

Resim 6- IVS-I nt 110 normal ve mutant hibridizasyonları

Bu sonuca göre, 9 örneğin hiç birinde IVS-I nt 110 da G→A mutasyonuna rastlanmamıştır.

Klinik tabloları anemi ve β-talassemi veren 9 adet hastada ve bir adet sağlıklıda Tablo 2'de gösterilen mutasyonların bulunup bulunmadığı incelendi. 9 adet DNA izolatının üçünde IVS-I nt 1 de, ikisinde IVS-I nt 6 da ve birinde ekson 2 kodon 39 da mutasyon bulunduğu saptandı. Her biri hem normal hem de ilgili mutant ile hibridizasyon verdiği için hepsine bu mutasyonlar için heterozigot teşhisi konuldu. IVS-I nt 110 da G→A mutasyonuna rastlanmadı. Kontrol olarak kullanılan sağlıklı gönüllüden izole edilen DNA, bütün normaller ile hibridize olup hiç bir mutant ile hibridize olmadı.

## V- TARTIŞMA

Talassemler, hemoglobin sentezindeki kusurlar nedeni ile meydana gelen hereditör mikrositer anemilerdir. Bunların hafif şekilleri talassemi minör (heterozigot) adını alırlar. Bu vakalara daha ağır talassemlerin (homozigot) portörleri gözüyle bakılmalıdır(90).

Erişkin insanlardaki hemoglobinin büyük bir bölümü iki alfa ve iki beta globin zincirinden meydana gelmiştir. Erişkinlerdeki hemoglobin A<sub>2</sub> adını alan küçük bir bölümünde ise, beta globin zinciri yerine delta globin zincirleri mevcuttur. Fetusda ise alfa benzeri veya beta benzeri olarak adlandırabileceğimiz daha başka zincirler de vardır. Beta globin gen kümesi kromozom 11'de, alfa globin gen kümesi ise kromozom 16'da yer almaktadır. Her bir kromozom üzerinde beta globin geninin yalnızca tek bir kopyası vardır. Buna karşılık alfa lokusu ve fetal hemoglobinin bir komponenti olan gamma zincirine ait lokus ikişer tanedir. Globin yapılamamasının nedeni beta globin zincirinin yapılamaması ya da sentez hızının azalması ise buna  $\beta$ -talassemi, alfa globin zincirinin yapılamaması ya da sentez hızının azalması ise buna da  $\alpha$ -talassemi denir.

Talassemi, özellikle Akdeniz kökenli insanlarda yaygın olarak bulunur. Bu bölgelerde rastlanan malarya parazitinin mutant alleler için pozitif seleksiyon göstermesi, hastalığın

neden özellikle Akdeniz kökenli insalarda yaygın olduğu hususuna bir görüş getirmektedir(91).

Türkiye'de sıklığı % 2 olarak tespit edilmiş bulunan  $\beta$ -talassemi(4,5), önemli bir sağlık sorunu olmasının yanı sıra hastalıklı doğan bebeklerin bakım ve yaşam masrafları, aileleri için oldukça eziyetli maddi ve manevi yükümlülükler getirmektedir. Bu nedenle, hastalığın risk gruplarında doğum öncesi teşhisinin yapılması sağlıklı doğumları önleyecek ve Türkiye genelinde önemli bir sağlık sorununu çözümlemiş olacaktır. Doğum öncesi, en modern kesin teşhis, ancak DNA globin genlerinin bizzat kendilerinin incelenmesi ile mümkündür.

Rekombinant DNA teknolojisi, hastalıkların moleküler düzeyde anlaşılması için bir devrim yaratmıştır. Bu teknoloji sayesinde insan genomunun en ince ayrıntılarına kadar çalışılması ve bilinmeyenlerin aydınlığa kavuşması mümkün olmuştur.

$\beta$ -talassemi dahil diğer genetik hastalıklarda nokta mutasyonların spesifik teşhisi ilk defa Saiki ve arkadaşları tarafından açıklanan gen amplifikasyon yönteminin uygulanmaya başlanması ile elde edilmiştir(53).

1988 yılı itibari ile,  $\beta$ -talassemiye yol açan 51 adet mutasyon tanımlanmıştır(3). Genelde, belirli mutasyonların insidansı, belirli kökenlerden gelen insanlarda yoğundur. Bu görüşten yola çıkıldığında, risk gruplarının kökenlerine göre insidansı fazla olan mutasyonlara ait sentetik oligonükleotid problemlerin sentezlenmesi mümkündür. Bu problemler, hastalığa neden olan mutasyonun kısa sürede tespit edilmesini sağlayacaktır.

Türkiye'de, DNA düzeyinde yapılan modern moleküler araştırmaların yerleştirilmesi, Türk toplumu kökenlerinde  $\beta$ -talassemiye rastlanan mutasyonların insidansı hakkında sağlıklı bilgiler elde edinmemizi sağlayacaktır. Bu mutasyonlara



göre hazırlanmış sentetik oligonükleotid problemler ile gen amplifikasyon ürünlerinde hibridizasyon yöntemleri  $\beta$ -talassemisinin prenatal tanısını gerçekleştirecektir.

Bu çalışmada, İstanbul'un çeşitli hastanelerinden gönderilen klinik bulguları hafiften şiddetliye varan anemi ve  $\beta$ -talassemi gösteren 9 adet hasta kanı ile kontrol olarak kullanılan bir adet sağlıklı gönüllü kanından DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen DNA'da,  $\beta$ -globin geninin belirli bir bölgesi amplifiye edildi ve şu anda kısıtlı bilgilerimize dayanarak Türkiye'de rastlanan dokuz adet  $\beta$ -talassemi mutasyonlarından (nt-87, IVS-I nt 1, IVS-I nt 5, IVS-I nt 6, IVS-I nt 110, "frame-shift" kodon 8, IVS-2 nt 1, IVS-2 nt 745, kodon 39) dört tanesi seçilerek (IVS-I nt 1, IVS-I nt 6, IVS-I nt 110 ve kodon 39) hazırlanan sentetik oligonükleotid problemleri ile hibridizasyon yapıldı. Otoradyografiler incelendiğinde 9 hastanın 6'sında aranılan mutasyonlardan bir tanesi bulundu. Bunlardan 3'ünde, IVS-I nt 1, 2'sinde IVS-I nt 6 ve birinde kodon 39'da mutasyon görüldü. IVS-I nt 110 mutasyonuna hiç bir hastada rastlanmadı. Bu hastalara ait gen amplifikasyon örneklerinin normal problemler ile de hibridize olması hastaların tespit edilen mutasyonlar için heterozigot olduklarını gösterdi. Kullanılan mutant problemlerle hibridizasyon göstermeyen diğer üç hastada, yukarıda saydığımız diğer mutasyonların veya farklı moleküler lezyonların bulunabileceği görüşü kuvvetlendi.

## VI- ÖZET

En yaygın kalıtsal hastalıklardan biri olan  $\beta$ -talassemiye  $\beta$ -globin geni üzerindeki mutasyonların yol açtığı bilinmektedir. Genetik mutasyonların tanımlanması için ve diğer gen düzeyi çalışmalarda kullanılan gen amplifikasyonu ve sentetik oligonükleotid hibridizasyonu teknikleri, az materyal kullanımı, yüksek duyarlılığı ve teşhiste direkt bir yöntem olması gibi avantajlarıyla üstün bir yere sahiptir.

Bu çalışmada bir sağlıklı ve dokuz anemi veya  $\beta$ -talassemiye bireylerin DNA'sı incelenmiştir.

Yaklaşık 5 ml periferik kan örneğinden elde edilen DNA'nın 0,5  $\mu$ g'ı  $\beta$ -globin geninin ilgili bölgesini sınırlayan primerler, deoksiribonükleotidler (dNTP) ve taq polimeraz içeren bir reaksiyon karışımı içinde, 95°C de bir dakika denatürasyon, 55°C de bir dakika hibridizasyon (primer eşleşmesi) ve 72°C de üç dakika primer zincir uzaması aşamalarını içeren 25 döngülük işleme tabi tutularak amplifiye edildi. Amplifiye DNA örnekleri, agaroz gel elektroforezi ile konantrasyon ayarlamaları yapıldıktan sonra naylon membran üzerine geçirilerek 5' ucundan  $\gamma^{32}\text{P}$  dATP ile işaretlenmiş mutasyon içeren bölgelere özgü 19 nükleotidlik (nt) ayrı tip nokta mutasyon içeren dört adet sentetik oligonükleotid problemleri ile hibridizasyona sokuldu.

Hastaların üçünde IVS-I nt 1 de G→A, ikisinde IVS-I nt 6 da T→C ve birinde ekson 2 kodon 39 da C→A nokta mutasyonları bulunduğu saptandı. Bu hasta örnekleri hem normal hem de mutant problemler ile hibridize oldukları için altı hastanın da bu mutasyonlar için heterozigot olduğu tanısı konuldu. IVS-I nt 110 da G→A mutasyonuna hiç bir hastada rastlanmadı. Kontrol olarak kullanılan örnek, bütün normal problemler ile hibridize olup hiç bir mutant ile hibridize olmadı.



## VII- SUMMARY

It is known that  $\beta$ -thalassemia, one of the most frequently observed hereditary disorders, is caused by the mutations on  $\beta$ -globin gene. Gene amplification and synthetic oligonucleotide hybridization techniques, which are used for the identification of genetic mutations and other studies at the genetic level, are highly respected due to less material requirements, high sensitivity and being direct methods for diagnosis.

In this study, the DNAs of one healthy individual and nine anemic or  $\beta$ -thalassemic patients were studied.

The DNA was isolated from approximately 5 ml of peripheral blood and 0.5  $\mu$ g of that DNA was amplified in a reaction mixture containing primers bordering related area in the  $\beta$ -globin gene, deoxyribonucleotides (dNTPs) and taq polymerase enzyme, by 25 subsequent cycles of denaturation at 95°C for one minute, primer hybridization at 55°C for one minute, and primer extension at 72°C for three minutes. Amplified DNA samples transferred on to nylon membrane after concentrations were adjusted by agarose gel electrophoresis, and hybridized with four different 19 nucleotides (nt) long synthetic oligonucleotide probes, containing point mutations, labelled with  $\gamma$ <sup>32</sup>p dATP at 5' ends.

It was found that three patients had G→A at IVS-I nt 1, two patients had T→C at IVS-I nt 6, one patient had C→A point mutations at exon 2 codon 39. Since each sample hybridized both to the normal and mutant probes, these six patients were identified to be heterozygote for these mutations. None of the patients showed G→A mutation at IVS-I nt 110. Control sample hybridized only to normal probes and did not hybridize to any of the mutant probes.

## VII- KAYNAKLAR

- 1- Loukopoulos,D., Girot,R: The second international conference on thalassemia and hemaglobinopathies. *Nouv.Rev.Fr.Hematol.* 31:5-7, 1989.
- 2- Weatherall,D.J., Clegg,J.B.: *The Thalassaemia Syndromes.* Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, Edinburgh, Boston, Melbourne, 3rd Ed., 1981.
- 3- Kazazian,H.H. Jr., deBoehm,C.D.: Molecular basis and prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia. *Blood*, 72:1107-1116, 1988.
- 4- Aksoy,M.: *Anormal Hemoglobinler ve Thalassemik Sendromlar.* TÜBİTAK, Ankara, 1982, s.42.
- 5- Çavdar,A.O., Arcasoy,A.: *Thalassaemia and abnormal haemoglobins in Turkey.* In: *International Symposium on Abnormal Hemoglobins and Thalassemia.* Ed: Aksoy,M., TÜBİTAK, Ankara, 1975, s.337.
- 6- Schechter,A.N.: *Hemoglobin Structure and Function.* In: *Cecil Textbook of Medicine.* Eds: Wyngaarden,J.B. and Smith, L.H. Jr., W.B.Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janerio, Sydney, Tokyo, 1982, s.877.

- 7- Deisseroth,A., Nienhuis,A., Lawrence,J., Giles,R., Turner, P., Ruddle,F.H.: Chromosomal localization of human  $\beta$ -globin gene in human chromosomal somatic cell hybrids. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 75:1456-1460, 1978.
- 8- Gusella,J., Varsanyi-Breiner,A., Kao,F.T., Jones,C., Puck,T.T., Keys,C., Orkin,S.H., Housman,D.: Precise localization of the human  $\beta$ -globin gene complex in chromosome. Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 78:4458-4460, 1979.
- 9- Lebo,R.V., Carrano,A.V., Burkhart-Schultz,K., Dozy,A.M., Yu,L.C., Kan,Y.W.: Assignment of human  $\beta$ - $\gamma$ , and  $\delta$ -globin genes to the short arm of chromosome 11 by chromosome sorting and DNA enzyme analysis. Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 76:5804-5808, 1979.
- 10- Sanders-Haigh,L., Anderson,W.F., Francke,U.: The  $\beta$ -globin gene is on the short arm of human chromosome 11. Nature, 283:683-686, 1980.
- 11- Forget,B.G., Benz,E.J. Jr., Weissman,S.M.: Normal human globin gene structure and mutations causing the  $\beta$ -thalassemia syndromes. Recombinant DNA Applications to Human Disease. Eds: Caskey,C.T., and White,R.L., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1983, 3-19.
- 12- Efstradiatis,A., Posakony,J.W., Maniatis,T., Lawn,R.M., O'Connell,C. et.al.: The structure and evolution of the human  $\beta$ -globin gene family. Cell, 21:653-668, 1980.
- 13- Poncz,M., Schwartz,E., Ballantine,M., Surrey,S.: Nucleotide sequence analysis of the  $\delta\beta$ -globin gene region in humans. J.Biol.Chem., 258:11599-11609, 1983.

- 14- Treisman,R., Orkin,S.H., Maniatis,T.: Specific transcriptional RNA splicing defects in five cloned  $\beta$ -thalassaemia genes. *Natura*, 302:591-596, 1983.
- 15- Treisman,R., Provafoot,N.J., Shander,M., Maniatis,T.: A single-base change at a splice site in a  $\beta$ -thalassemic gene causes abnormal RNA splicing. *Cell*, 29:903-911, 1982.
- 16- Catterall,J.F., O'Malley,B.W., Robertson,M.A., Staden,R., Tanaka,Y., Brownlee,G.G.: Nucleotide sequence homology at 12 intron-exon junctions in the chick ovalbumin gene. *Nature*, 275:510-513, 1978.
- 17- Breathnach,R., Benoit,C., O'Hare,K., Gannon,F., Chambon,P., Ovalbumin Gene. Evidence for a leader sequence in mRNA and DNA sequences at the exon-intron boundaries. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 75:4853-4857, 1978.
- 18- Kan,Y.W., Dozy,A.M.: Polymorphism of DNA sequence adjacent to the human  $\beta$ -globin structural gene: Relationship to sickle mutation. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 75:5631-5635, 1978.
- 19- Orkin,S.H., Kazazian,H.H. Jr.: The mutation and polymorphism of the human  $\beta$ -globin gene and its surrounding DNA. *Ann.Rev.Genet.*, 18:131-171, 1984.
- 20- Antonio,M., deBoer,E., Habets,G., Grosveld,F.: The human  $\beta$ -globin gene containing multiple regulatory regions: Identification of one promoter and two downstream enhancers. *EMBO J.*, 7:377-384, 1988.
- 21- Harris,H., Hopkinson,D.A., Robson,E.B.: The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants: data on 43 enzyme loci in man. *Ann.Hum.Genet. London*, 37:237-250, 1974.



- 22- Harris,H., Enzyme Variants in human populations. Johns Hopkins, Med.J., 138:245-252, 1976.
- 23- Lawn,R.M., Fritsch,E.F., Parker,R.C., Blake,G., Maniatis, T.: The isolation and characterization of linked  $\gamma$ - and  $\beta$ -globin genes from a cloned library of human DNA. Cell, 15:1157-1174, 1978.
- 24- Antonarakis,S.E., Kazazian,H.H. Jr., Orkin,S.H.: DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. Hum.Genet. 69:1-14, 1985.
- 25- Orkin,S.H., Kazazian,H.H. Jr., Antonarakis,S.E., Goff, S.C., deBoehm,C.D., Sexton,J.P., Waber,P.G., Giardina, P.V.J.: Linkage of  $\beta$ -thalassemia mutations and  $\beta$ -globin gene polymorphism with DNA polymorphisms in the human  $\beta$ -globin gene cluster. Nature, 296:627-631, 1982.
- 26- Kazazian,H.H. Jr., Orkin,S.H., Markham,A.F., Chapman, C.R., Youssoufian,H.A., Waber,P.G.: Quantification of the close association between DNA haplotypes and specific  $\beta$ -thalassemia mutations in mediterraneans. Nature, 300: 152-154, 1984.
- 27- Lanclos,K.D., Kutlar,A.: The thalassemia repository. Hemoglobin, 10:533-558, 1986.
- 28- Adams,J.G., Steinberg,M.H., Boxer,L.A., Baehner,R.L., Forget,B.G., Tsiistrakis,G.A.: The structure of hemoglobin Indianapolis ( $\beta$  112 (614) arginine). An unstable variant detectable only by isotopic labeling. J.Biol.Chem., 254: 3479-3482, 1979.

- 29- Naritomi, Y., Yasushi, N., Nakashima, H., Yokota, E., Imamura, T.: A substitutions of cytosine for thymine. In Codon 110 of the Human  $\beta$ -Globin Gene is a novel cause of  $\beta$ -thalassaemia phenotypes. *Hum.Genet.*, 80:11-15, 1988.
- 30- Aksoy, M.: Thalassaemia Intermedia: A genetic study in 11 patients. *J.Med.Genet.*, 7:47-51, 1970.
- 31- Aksoy, M., Dinçol, G., Erdem, Ş.: Different types of  $\beta$ -thalassemia intermedia. *Acta.Haematol.*, 59:178-189, 1978.
- 32- Altay, Ç., Gürgey, A.: Clinical and haematological evaluation of  $\beta$ -thalassaemia intermedia with increased HbF and HbA<sub>2</sub> in heterozygotes:  $\beta$ -thalassaemia intermedia I. *J.Med.Genet.*, 22:205-212, 1985.
- 33- Gürgey, A., Kayın, S., Kansu, E., Altay, Ç.: Clinical and haematological evaluation of  $\beta$ -thalassaemia intermedia characterised by unusually low HbF and increased HbA<sub>2</sub>:  $\beta$ -thalassemia intermedia II. *J.Med.Genet.*, 22:213-221, 1985.
- 34- Wainscoat, J.S., Old, J.M., Weatherall, D.J.: The molecular basis for the clinical diversity of  $\beta$ -thalassaemia in cypriots. *Lancet*, 1:1235-1237, 1983.
- 35- Akar, N., Çavdar, A.O., Dessi, E., Loi, A., Pirastu, M., Cao, A.:  $\beta$ -thalassaemia mutations in the Turkish population. *J.Med.Genet.*, 24:378-381, 1987.
- 36- Diaz-Chio, J.C., Yang, K.G., Stomming, T.A., Efrenov, D.G., Kutlar, F., Aksoy, M., Altay, C., Gürgey, A., Kılınc, Y., Huisman, T.H.J.: Mild and severe  $\beta$ -thalassemia among homozygotes from Turkey: Identification of the types by hybridization of amplified DNA with synthetic probes. *Blood*, 71:248-251, 1988.

- 37- Ellis,K.P., Davies,K.E.: An appraisal of the application of recombinant DNA techniques to chromosome defects. *Biochem.J.*, 226:1-11, 1985.
- 38- Geever,R.F., Wilson,L.B., Nallaseth,F.S., Milner,P.F., Bittner,M., Wilson,J.T.: Direct identification of sickle cell anemia by blot hybridization. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 78:5081-5085, 1981.
- 39- Wilson,J.T., Milner,P.F., Summer,M.E., Nallaseth,F.S., Fade,H.E., Reindollar,R.H., McDonough,P.G., Wilson,L.B.: Use of Restriction endonucleases for mapping the allele for  $\beta^S$ -globin. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 79:3628-3631, 1982.
- 40- Chang,J.C., Kan,Y.W.: A sensitive new prenatal test for sickle-cell anemia. *New Eng.J.Med.*, 307:30-32, 1982.
- 41- Orkin,S.H., Little,P.F.R., Kazazian,H.H. Jr., deBoehm, C.D.: Improved detection of the sickle mutation by DNA analysis. *New Eng. J.Med.*, 307:32-36, 1982.
- 42- Guzella,J.F., Wexler,N.S., Conneally,P.M., Nayear,S.L., Anderson,M.A., Tanti,R.E., Watkins,P.C., Ottina,K., Wallace,M.R., Sakaguchi,A.Y., Young,A.B., Joulson,I., Bonilla,E., Martin,J.B.: A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease. *Nature*, 306: 234-238, 1983.
- 43- Watkins,P.C.: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP): Application in human chromosome mapping and genetic disease research. *Bio Techniques*, 6:310-320, 1988.

- 44- Saiki, R.K., Arnheim, N., Erlich, A.: A novel method for the detection of polymorphic restriction sites by cleavage of oligonucleotide probes: Application to sickle-cell anemia. *Biotechnology*, 3:1008-1012, 1985.
- 45- Conner, B.J., Reyes, A.A., Morin, C., Itakura, K., Teplitz, R.L., Wallace, R.B.: Detection of sickle-cell  $\beta^S$ -globin allele by hybridization with synthetic oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:278-282, 1983.
- 46- Sande, J.H., Kleppe, K., Khorana, H.G., Reversal of bacteriophage  $T_4$  induced polynucleotide kinase action. *Biochemistry*, 12:5050-5055, 1973.
- 47- Kidd, V.J., Wallace, R.B., Itakura, K., Woo, S.L.C.:  $\alpha_1$ -Antitrypsin deficiency detection by direct analysis of the mutation in the gene. *Nature*, 304:230-234, 1983.
- 48- Pirastu, M., Kan, Y.W., Cao, A., Conner, B.J., Teplitz, R.L., Wallace, R.B.: Prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia. *New Eng. J. Med.* 309-284-287, 1983.
- 49- Orkin, S.H., Markham, A.F., Kazazian, H.H. Jr.: Direct detection of the common mediterranean  $\beta$ -thalassemia gene with synthetic DNA probes. *J. Clin. Invest.*, 71:775-779, 1983.
- 50- Gerhard, D.S., Kidd, J.R., Egeland, A., Housman, D.E.: Identification of a recent recombination event within the human  $\beta$ -globin gene cluster. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 7875-7879, 1984.
- 51- Old, J.M., Heath, C., Fitches, A.: Meiotic recombination between two polymorphic restriction sites within the  $\beta$ -globin gene cluster. *J. Med. Genet.*, 23:14-18, 1986.

- 52- Camashella,C., Serra,A., Saglio,G., Bertero,M.T., Mazza, U., Terzoli,S., Brambati,B., Cremonesis,L., Tran,M., Ferrari,M.: Meiotic recombination in the  $\beta$ -globin gene cluster causing an error in prenatal diagnosis of  $\beta$ -thalassemia. J.Med.Genet., 25:307-310, 1988.
- 53- Saiki,R.K., Bugawan,T.L., Horn,G.T., Mullis,K.B., Erlich, H.A.: Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ  $\alpha$  DNA with allele specific oligonucleotide probes. Nature, 324:163-166, 1986.
- 54- Diaz-Chico,J.C., Yang,K., Yang,K., Efremov,D.G., Stoming, T.A., Huisman,T.H.J.: The detection of  $\beta$ -globin gene mutations in  $\beta$ -thalassemia using oligonucleotide probes and amplified DNA. Biochem.et.Biophys.Acta., 949:43-48, 1988.
- 55- Keohavong,P., Kat,A.G., Cariello,N.F., Thilly,W.G.: DNA amplification, in vitro using T<sub>4</sub> DNA polymerase. DNA, 7: 63-70, 1988.
- 56- Mullis,K.B., Faloona,F.A.: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Meth. Enzymol.,155:335-350, 1987.
- 57- Emburg,S.H., Schart,S.J., Saiki,R.K., Gholson,M.A., Golbus,M., Arnheim,N., Erlich,H.A.: Rapid prenatal diagnosis of sickle cell anemia by a new method of DNA analysis. New Eng. J.Med., 316:656-661, 1987.
- 58- Bos,J.L., Fearon,E.R., Hamilton,S.R., Vries,M.V., Boom, J.H., Eb,A.J., Vogelstein,B.: Prevalance of ras gene mutations in human colorectal cancers. Nature, 327:293-297, 1987.

- 59- Lee, M.S., Chang, K.S., Cabanillas, F., Freireich, E.J., Truzillo, J.M., Strass, S.A.: Detection of minimal residual cells carrying the t(14;18) by DNA sequence amplification. *Science*, 237:175-178, 1987.
- 60- Scharf, S.J., Horn, G.T., Erlich, H.A.: Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science*, 233:1076-1078, 1986.
- 61- Wrishnik, L.A., Higuchi, R.G., Stoneking, M., Erlich, H.A., Arnheim, N., Wilson, A.C.: Length mutations in human mitochondrial DNA: Direct sequencing of enzymatically amplified DNA. *Nucl. Acid. Res.*, 15:529-542, 1987.
- 62- McMakon, G., Davis, E., Wogan, G.N.: Characterization of c-Ki-ras oncogene alleles by direct sequencing of enzymatically amplified DNA from carcinogen-induced tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:4974-4978, 1987.
- 63- Keohavong, P., Wang, C.C., Cha, R.S., Thilly, W.G.: Enzymatic amplification and characterization of large DNA fragments from genomic DNA. *Gene*, 71:211-216, 1988.
- 64- Wong, C., Dowling, C.E., Saiki, R.K., Higuchi, R.G., Erlich, H.A., Kazazian, H.H. Jr.: Characterization of  $\beta$ -thalassaemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature*, 330:384-386, 1987.
- 65- Engelke, D.R., Hoener, P.A., Collins, F.S.: Direct sequencing of enzymatically amplified human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:544-548, 1988.
- 66- Chien, a., Edgar, D.B., Trela, J.M.: Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile Thermus aquaticus. *J. Bact.*, 127:1550-1557, 1976.

- 67- Saiki,R.K., Gelfard,D.H., Stoffel,S., Scharf,S.J., Higuchi,R., Horn,G.T., Mullis,K.B., Erlich,H.A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239:487-491, 1988.
- 68- Torgersen,H., Blaas,D., Skern,T.: Low cost apparatus for primer directed DNA amplification using *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Analyst.Biochem.*, 176:33-35, 1989.
- 69- Kafatos,F.C., Jones,C.W., Efstratiadis,A.: Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. *Nucl.Acids.Res.* 7:1541-1552, 1979.
- 70- Thein,S.L., Wainscoat,J.S., Old,J.M., Sampietro,M., Firoelli,G., Wallace,R.B., Weatherall,D.J.: Association of thalassemia intermedia with a  $\beta$ -globin gene haplotype. *Br.J.Haematol.*, 65:367-373, 1983.
- 71- Nozari,G., Rahbar,S., Wallace,R.B., Haplotype analysis of the human  $\beta$ -globin gene complex using multiple locus specific oligonucleotide probes. *Anal.Biochem.*, 172:180-184, 1988.
- 72- Gustafson,S., Proper,J.A., Walter Bowie,E.J., Sommer, S.S.: Parameters affecting the yield of DNA from human blood. *Anal.Biochem.*, 165:294-299, 1987.
- 73- Gross-Bellard,M., Oudet,P., Chambon,P.: Isolation of high-molecular weight DNA from mammalian cells. *Eur.J. Biochem.*, 36:32-38, 1973.
- 74- Goossens,M., Kan,Y.Y.: DNA analysis in the diagnosis of hemoglobin disorders. *Meth.Enzym.* 76:805-817, 1981.

- 75- Jenpierre, M.: A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucl. Acids Res.*, 15:9611, 1987.
- 76- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrodi, J.: *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor, New York, 1982.
- 77- Spritz, R.A., Jagadeeswaran, P., Choudary, P.V. et al.: Base substitution in an intervening sequence of a  $\beta^+$ -thalassemia human globin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78:2455-2459, 1981.
- 78- Westaway, P., Williamson, R.: An intron nucleotide sequence variant in a cloned  $\beta^+$ -thalassemia globin gene. *Nucl. Acids Res.*, 9:1777-1788, 1981.
- 79- Moschonas, N., deBoer, E., Grosveld, F.G., Dahl, H.H.M., Skewmaker, C.K., Flavell, R.A.: Structure and expression of a cloned  $\beta$ -thalassemia globin gene. *Nucl. Acids Res.* 9:4391, 1982.
- 80- Orkin, S.H., Goff, S.C., Nathan, D.G.: Heterogeneity of the DNA deletion in  $\gamma\delta\beta$ -thalassemia. *J. Clin. Invest.*, 67:878-884, 1981.
- 81- Trecartin, R.F., Liebhaber, S.A., Chang, J.C., Lee, Y.W., Kan, Y.W.:  $\beta^0$ -thalassemia in Sardinia is caused by a nonsense mutation. *J. Clin. Invest.*, 68:1012-1017, 1981.
- 82- Wong, C., Lowling, C.E., Saiki, R.K., Higuchi, R.G., Erlich, H.A., Kazazian, H.H. Jr.: Characterization of  $\beta$ -thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature*, 330:384-386, 1987.
- 83- Güray, A., Erarslan, A., Özbilen, O.: A buffer system suitable for most restriction enzymes. *DOĞA*, in press.



- 84- Boffey,S.A: Gel Electrophoresis of DNA. In Techniques in Molecular Biology. Eds: Walker,J.M., Gaastra,W., Croom Helm, England, 1983.
- 85- Swanstrom,R., Shank,P.R.: X-Ray intensifying screens greatly enhance the detection by autoradiography of the radioactive isotopes  $^{32}\text{P}$  and  $^{125}\text{I}$ . Anal.Biochem., 86:184-192, 1978.
- 86- Anderson,M.L.M., Young,B.D: Quantitative Filter Hybridization. In: Nucleic Acids Hybridizations. Eds: Hawes, B.D., Higgins,S.J., Practical Approach Series, Iri Press, Oxford, Washington D.C., 1985, 73-137.
- 87- Goulding,K.H.: Radioisotope Techniques. In: A Biologist's Guide To Principles and Techniques of Practical Biochemistry. Eds: Williams,B.L., Wilson,K., William Clowes and Sons Limited, London, 1975, 189-190.
- 88- Beltz,G.A., Jacobs,K.A., Eickbusch,T.T., Cherbas,P.T., and Kafatos,F.C.: Isolation of multigene families and determination of homologies by filter hybridization methods.Meth.Enzymol., 100:266-285, 1983.
- 89- Clark,J.M. Jr., Switzer,R.L.: Experimental Biochemistry. W.H.Freeman and Company, San Francisco, 1977.
- 90- Beutler,E.: Sık Karşılaşılan Anemiler. Gelişim, JAMA, 1:542-546, 1988.
- 91- Rotter,J.I., Diamond,J.M.: What Maintains the Frequencies of Human Genetic Diseases. Nature, 329:289-291, 1987.

## EK 1- TERİMLER VE KISALTMALAR

a.a.	: Amino asit
Allel	: Homolog kromozomların aynı lokusunda bulunan genler.
Anemi	: Çeşitli sebeplere bağlı olarak kanda eritrosit sayısının azalması, hematokrit ve hemoglobin değerlerinin normalin altına düşmesi.
A $\gamma$	: Gama globin geni. Şifrelediği proteinin 136'ıncı kodonu glisin yerine alanin içerir.
$\alpha$	: Alfa
bp	: Baz çifti. Tümleyici iki zincirdeki karşılıklı bir çift baz.
$\beta$	: Beta
cap	: Eukaryotik mRNA moleküllerinin 5' ucunda bulunan yapı. 5'→3' yerine 5'→5' şeklinde üç fosfat grubu ile birleşmiş 7-metilguanosin.
cDNA	: Komplementer DNA. mRNA'ya tümleyici tek zincir DNA.
Consensus dizisi	: Bir sınıf altında toplanan genetik elementlerde, sadece ufak tefek değişiklikler ile daima var olan nükleotid dizileri. Ayrıca farklı organizmalarda aynı proteini şifreleyen genlerin nükleotid dizilerine verilen isim.
DEAE	: Dietilaminoetil.
Delesyon	: Eksilme. DNA'da bir ya da birden fazla nükleotidin eksilmesiyle meydana gelen mutasyon cinsi.
ds DNA	: Çift sarmal deoksiribonükleik asit.
$\delta$	: Delta
EDTA	: Etilen diamintetraasetik asit.
Ekson	: DNA'da ya da RNA'da ekspres edilen gen parçası.
Enhancer dizisi	: Eukaryotlarda ve bazı eukaryotik virüslerde bulunan, ilgili genin 5' ya da 3' bölgesinde, bir kaç kilobaza kadar varabilen uzaklıkta yerleşik olduğu halde transkripsiyonu arttıran DNA zinciri.

- Eritroblast : Eritrositin henüz olgunlaşmamış genç şekli, çekirdekli eritrosit.
- Eritropoez : Eritrositlerin oluşması.
- $\epsilon$  : Epsilon
- Ferritin : % 23'ü  $Fe^{+3}$ 'den oluşan demir proteini kompleksi. Barsak mukozasında, dalakta ve karaciğerde bulunur.
- Flanking bölgesi : Kromozomda genler arasında yer alan sessiz DNA dizileri.
- "Frame-shift"  
Mutasyonu : Çerçeve kayması. Şifrelerin gende, nükleotid ilavesi ya da eksilmesi neticesinde, bir kodona tekabül eden üçlü baz grubunda kayma ve bu nedenle farklı bir amino asiti şifrelemesi.
- Gen kümesi : Kromozomlar üzerinde lokusları birarada olan ilgili genler.
- Gen kütüphanesi : Toplamı tüm genomik DNA'yı içeren klonlanmış DNA parçaları.
- G $\gamma$  : Gama globin geni. Şifrelediği proteinin 136'ıncı kodonu alanin yerine glisin içerir.
- $\gamma$  : Gama
- Haplotip : Birim olarak kuşaktan kuşağa geçen birbirine yakın allel grubu.
- Hb : Hemoglobin
- Hb A : Hemoglobin A ( $\alpha_2\beta_2$ )
- Hb A<sub>2</sub> : Hemoglobin A<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ )
- Hb F : Fetal hemoglobini ( $\alpha_2\gamma_2$ )
- Heterozigot : Kromozomda, tek bir lokus üzerinde iki farklı allel bulunması.
- Hibrid : İki değişik kaynaklı nükleik asit zincirinin tümleşmesi sonucu meydana gelen çift sarmal.
- Hipokromi : Eritrositlerde yetersiz hemoglobin bulunuşu. (Hemoglobin azlığı nedeni ile, eritrositler ve dolayısı ile kan soluk pembe renktedir).

- Homozigot : Kromozomda, tek bir lokus üzerinde aynı allel bulunması.
- Hn RNA : Ağır nükleer RNA.
- İntron (IVS) : Eukaryotik gende bulunan ancak proteine şifrelenmeyen DNA zinciri. İntronlar transkripsiyona uğrarlar, ancak translasyondan önce RNA'dan koparak ayrılırlar ("Intervening Sequence").
- İzotonik : Aynı ozmatik basınca sahip solüsyon.
- Kb : 1000 baz (kilo baz).
- Keotropik ajan : Suyun yapısını parçalayarak, polar olmayan maddelerin polar solvent içinde erirliğini temin eden maddeler.
- Kodon : mRNA'da yer alan ve bir amino asiti şifreleyen üç bazlı grup.
- $\lambda$  faj lambda : Bir bakteriofaj.
- Makrosit : İri hacim gösteren eritrosit; özellikle folik asit eksikliğinde gelişen megaloblastik anemide kanda görülen büyük hacimli eritrosit.
- Megaloblast : İri hacim gösteren çekirdekli genç eritrosit.
- Meiotik rekombinasyon : Meiozda, hücrede iki kromozom arasında olan DNA alışverişi.
- Meioz : Cinsiyet hücrelerinde görülen, türe has kromozom sayısının yarıya inmesi ile belirgin bölünme.
- mRNA : Haberci ribonükleik asit.
- Nonsense mutasyon : mRNA'da terminasyon işareti olan UAG kodonunun oluşmasıyla görülen mutasyon.
- Normosit : Herhangi bir anormallik göstermeyen eritrosit.
- nt : Nükleotid.
- O.D. : Optik dansite.
- OEH : Ortalama eritrosit hemoglobini.

$$\frac{\text{Hemoglobin (g/L)}}{\text{Eritrosit sayısı}(x10^{12}/L)} = \text{pg(pikogram)}(10^{-12}/g)$$

(Normal değerleri 27-31 pg)

- OEHK : Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu.  
$$\frac{\text{Hemoglobin (g/dl)}}{\text{Eritrosit hacmi (L/L)}} = \text{g/dl}$$
  
(Normal değerleri 32-36 g/dl)
- OEV : Ortalama eritrosit hacmi  
$$\frac{\text{Eritrosit hacmi (L/L)} \times 1000}{\text{Eritrosit sayısı (} \times 10^{12} / \text{L)}} = \text{fl (femtolitre)}$$
  
( $10^{-15} \text{L}$ )  
(Normal değerleri: 80-96 fl)
- Poli (A) : Transkripsiyondan sonra mRNA'nın 3' ucuna eklenen poliadenilik asit dizisi.
- Polikromatofilik : Bazı hücrelerde görülen her cins boya ile kolayca boyanabilme niteliği: Özellikle bazı anemi cinslerinde eritrositlerin gösterdiği her cins boya ile kolayca boyanabilme özelliği.
- Polimeraz : Monomerlerden oligomerik moleküller meydana getiren enzim.
- Polimorfizm : DNA dizi çeşitlilięi.
- Primer : Başlatıcı. DNA sentezini başlatmak için, 3' hidroksil grubu içeren kısa bir nükleotid zinciri.
- Psödogen : İşlevi bilinen bir genin homologu olan işlevsiz DNA dizisi.
- $\psi$  : Psi
- Promoter : Genin şifreleme bölgesinin üst kısmında yer alan, RNA polimerazın bağlandığı ve enzimi doğru transkripsiyonel başlama noktasına yönlendiren DNA bölgesi.
- Restriksiyon enzimi : Çift sarmal DNA'nın belirli bir nükleotid dizisini tanıyarak o noktalardan kesen enzimler (Pst I, Hpa I, Taq I, Hinc II, Hind III, Pvu II, Rsa I, Hinf I, Hgi A<sub>1</sub>, Ava II, Bam H<sub>1</sub> Mae I).
- Retikülosit : Protoplazması içinde bazik boyalara boyanan ince ağ yapısı gösteren henüz erişkin şekil kazanmamış eritrosit.
- RFLP : Restriksiyon enziminin tamamın bölgelerinde oluşmuş DNA dizi çeşitliliği. Restriksiyon parça uzunluğu polimorfizm, "Restriction Fragment Length Polymorphism".

RNA proçesi	: Post transkripsiyonel modifikasyon ("splicing", poli(A) ve "cap" ilavesi).
RNaz	: Ribonülez. RNA molekülünü hidrolize eden enzim.
"Splicing"	: Hn RNA molekülünde eksonların arasında bulunan intron dizilerinin kesilerek uzaklaştırılması.
SSC	: Sodyum klorür - sodyum sitrat
ssDNA	: Tek sarmal deoksinibonükleik asit.
SSPE	: Sodyum klorür - sodyum iki hidrojen fosfat - Etilendiamin tetraasetik asit.
STE	: Sodyum klorür-Tris-Etilendiamin tetraasetik asit.
Substitution	: Bir bazın yerine başka bir bazın geçmesi ile görülen mutasyon.
TAE	: Tris-Asetikasit-Etilendiamin tetraasetik asit.
Taq polimeraz	: <u>Thermus aquaticus</u> 'dan izole edilen, yüksek sıcaklıklara dayanıklı polimeraz enzimi.
TE	: Tris-Etilendiamintetraasetik asit.
Transferrin	: Siderofilin; plazmadaki $\beta_1$ -globulin, bir gramı 1,25 g demire tersinir bağlanabilme kapasitesine sahip olup demir transport proteini olarak iş görür.
$\zeta$	: Zeta.

**T. C.**  
**Yükseköğretim Kurulu**  
**Dokümantasyon Merkezi**