

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI
PROF. DR. ÖZGÜR ÇOĞULU

HEMOGLOBİN A₂ DEĞERİNİ DÜŞÜREN
DELTA GLOBİN GEN DEĞİŞİKLİKLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

UZMANLIK TEZİ
DR. AYŞE NUR KAVASOĞLU

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. FERDA ÖZKINAY

İZMİR 2017

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince yardımlarını ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, birlikte yürüttüğümüz tez döneminde bilgi ve deneyimleriyle yolumu aydınlatan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Ferda Özkınay'a çok teşekkür ederim.

İyi bir uzman olma yolunda eğitimime yaptıkları katkıları için Prof. Dr. Özgür Çoğulu'ya, Doç. Dr. Hüseyin Onay'a, Doç. Dr. Haluk Akın'a, Doç. Dr. Emin Karaca'ya, Doç. Dr. Asude Durmaz'a, Doç. Dr. Burak Durmaz'a ve Doç. Dr. Ayça Aykut'a,

Tez sürecimin her evresinde yaptığı katkılar ile bana destek olan Doç. Dr. Tahir Atik'e,

Bu süreçte tecrübelerini paylaşan, desteklerini her zaman yanımda hissettiğim Uzm. Dr. Erhan Parıltay'a, Uzm. Dr. Aslı Ece Solmaz'a ve Uzm. Dr. Esra Işık'a,

Asistanlığımın her döneminde birlikte olmaktan büyük keyif aldığım, birçok anıyı paylaştığımız ve beraber yürüttüğümüz asistan hekim arkadaşlarım Dr. Esra Arslan'a, Dr. Taha Reşit Özdemir'e, Dr. Merve Saka Güvenç'e, Dr. Biray Ertürk'e, Dr. İsmihan Merve Tekin'e, Dr. Hasan Taşlıdere'ye, Dr. Hilmi Bolat'a, Dr. Tuba Sözen Türk'e, Dr. Emine İpek Ceylan'a, Dr. Zehra Cengisiz'e ve Dr. Semih Aşıkocalı'ya,

Eğitim sürecim boyunca bana işin inceliklerini öğreten, yardımcı olan ve dostluklarını paylaşan tüm teknisyen, biyolog, sekreter ve personele,

Beni bugünlere getiren ve her koşulda yanımda olan başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme,

Hayatta birlikte yol aldığımız sevgili eşim Uzm. Dr. Gökçe Kavasoglu'na ve iki yıl önce aramıza katılan can kızım biricik Zeynep'ime

TEŞEKKÜR EDERİM.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL DİZİNİ	v
TABLO DİZİNİ	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER	ix
ÖZET	xii
ABSTRACT	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Hemoglobin Yapısı Ve Fonksiyonu.....	3
2.2 Globin Gen Kümeleri.....	4
2.2.1 Alfa Globin Gen Kümesi.....	5
2.2.2 Beta Globin Gen Kümesi.....	6
2.3 Hemoglobin Dönüşümü Ve Eritropoez.....	7
2.4 Anemi.....	9
2.4.1 Hemolitik Anemi.....	10
2.4.1.1 Hemoglobinopatiler.....	10
2.4.1.2 Talasemiler.....	12
2.4.1.2.1 Beta Talasemi.....	13
2.4.1.2.1.1 Beta Talasemi Patofizyolojisi ve Klinik Formları.....	13
2.4.1.2.1.2 Kalıtsal Geçiş.....	16
2.4.1.2.1.3 Beta Talasemi Epidemiyolojisi ve Türkiye'deki Durum.....	16
2.4.1.2.2 Delta Globin Gen Değişiklikleri ve Önemi.....	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
3.1 Olgu Seçimi.....	20
3.2 Olgularda Moleküler Genetik Çalışma.....	21

3.2.1 Örneklerin Toplanması ve DNA İzolasyonu.....	21
3.2.2 Genomik Dna'ların Spektrofotometrik Ölçümleri	22
3.2.3 Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması Ve PCR Amplifikasyonu.....	22
3.2.4 Amplifiye Edilen Bölgenin Değerlendirilmesi.....	24
3.2.5 PCR Ürünlerinin Birinci Pürifikasyon İşlemi.....	25
3.2.6 Pürifikasyon Ürünlerinin Cycle Sequencing İşlemi.....	26
3.2.7 Ürünlerin İkinci Pürifikasyon İşlemleri.....	27
3.2.8 Örneklerin Sekans Cihazına Yüklenmesi.....	28
3.2.9 Saptanan Varyantların Değerlendirilmesi.....	28
4. BULGULAR.....	29
5. TARTIŞMA.....	46
6. SONUÇ.....	58
7. KAYNAKLAR.....	59

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 2.1: Erişkin Hemoglobin HbA yapısı (A), HbA'nın üç boyutlu yapısı (B)...	3
Şekil 2.2: Alfa globin gen kümesi şematik gösterimi.....	5
Şekil 2.3: Alfa globin gen kümesi DNazI duyarlı bölgelerin (HS) şematik gösterimi	6
Şekil 2.4: Beta globin gen kümesi şematik gösterimi.....	6
Şekil 2.5: Beta globin gen kümesi DNazI duyarlı bölgelerin (HS) şematik gösterimi	7
Şekil 2.6: Embriyonik, fetal ve doğum sonrası dönemde globin sentezi.....	8
Şekil 2.7: LCR ve beta globin gen kümesinin insan gelişiminin farklı evrelerindeki etkileşimleri	9
Şekil 2.8: Alfa ve beta talasemininin dünyadaki dağılımı.....	13
Şekil 2.9: Beta talasemi patofizyolojisi.....	14
Şekil 2.10: Beta talasemi otozomal resesif kalıtımın şematik gösterimi.....	16
Şekil 2.11: <i>HBD</i> geni lokalizasyonu.....	18
Şekil 2.12: Hemoglobin varyantı oluşturan <i>HBD</i> değişikliği taşıyan bir bireyde HPLC örneği	19
Şekil 3.1: Yedi olgu DNA'sının amplifiye edilmiş <i>HBD</i> geni (2164bp) PCR ürünü jel görüntüsü	25
Şekil 4.1: HbA ₂ fraksiyonunda ikinci piki olan Olgu 10'nun HPLC analizi görüntüsü	30
Şekil 4.2: Olgu 1'in HPLC görüntüsü.....	38
Şekil 4.3: Olgu 1'in Sanger dizi analizi elektroferogram görüntüsü.....	39
Şekil 4.4: Olgu 25 (A) ve babasının (B) HPLC görüntüleri.....	40
Şekil 4.5: Olgu 25, anne ve babasının c.14 C>T (A), c.294 C>T (B) ve c.316-174_316-173delAT (C) değişiklikleri için Sanger dizi analizi elektroferogram görüntüsü	42

Şekil 4.6: Olgu 35 (A) ve annesinin (B) HPLC görüntüleri.....	44
Şekil 4.7: Olgu 35, anne ve babasının Sanger dizi analizi elektroferogram görüntüsü	44
Şekil 5.1: De Angioletti ve ark.'larının çalışmasında HPLC analizi sonucu HbA ₂ fraksiyonunda ikinci pik olan örnekler	49
Şekil 5.2: Farklı türlerde 117. aminoasidin dizilimi.....	56
Şekil 5.3: Arjinin ve Prolin aminoasitlerinin şematik yapısı.....	56
Şekil 5.4: Arijin aminoasidinin Prolin aminoasidine dönüşmesi sonucu Hidrojen bağının kurulmasının engellenmesinin şematik gösterimi	57
Şekil 5.5: Aminoasit değişimi ile molekülün yapısının şematik gösterimi.....	57

TABLO DİZİNİ

Tablo 2.1: Alfa ve beta globin gen kümesi arasındaki farklar.....	4
Tablo 2.2: WHO'ya göre anemi tanısında kullanılan hemoglobin konsantrasyon değerleri ve buna göre anemi şiddetinin değerlendirilmesi	9
Tablo 2.3: Hemolitik aneminin kazanılmış ve herediter nedenlerine göre sınıflandırılması	10
Tablo 2.4: Dünyada hemoglobinopati gen taşıyıcılığı prevalansı.....	11
Tablo 2.5: Türkiye'de sık görülen hemoglobinopatiler.....	12
Tablo 2.6: Beta talaseminin fenotip ve genotipleri ile klinik bulguları.....	15
Tablo 3.1: Çalışmaya alınma ve alınmama kriterleri.....	21
Tablo 3.2: <i>HBD</i> geni dizi analizi için kullanılan primerler.....	23
Tablo 3.3: Amplifikasyon için PCR karışımı hazırlanışı.....	23
Tablo 3.4: Amplifikasyon için PCR koşulları.....	24
Tablo 3.5: Cycle Sequencing İçin Hazırlanan Karışım.....	27
Tablo 3.6: Cycle Sequencing İçin PCR Koşulları.....	27
Tablo 4.1: Katılımcıların cinsiyet dağılımı.....	29
Tablo 4.2: HbA ₂ 'si %2 ve altında, MCV değeri 80 fL'nin ve MCH değeri 27 pg'nin altında olan olguların (Grup 1) yaş, cinsiyet, hematolojik parametreleri, demir parametreleri ve bilinen alfa-beta mutasyon analizi sonuçları	31
Tablo 4.3 HbA ₂ fraksiyonunda ikinci pik olan olguların (Grup 2) yaş, cinsiyet, hematolojik parametreleri, demir parametreleri ve bilinen alfa-beta mutasyon analizi sonuçları	33
Tablo 4.4: Olguların hematolojik parametrelerinin ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri	34
Tablo 4.5: <i>HBD</i> analizi sonucu saptanan değişiklikler.....	36

Tablo 4.6: <i>HBD</i> geni dizi analizinde varyasyon saptanan olguların hematolojik parametreleri ile bilinen alfa ve beta talasemi mutasyon analizi sonuçları	37
Tablo 4.7: Olgu 25'in anne ve babasının hematolojik parametreleri.....	42
Tablo 4.8: Olgu 35'in anne ve babasının hematolojik parametreleri.....	45



KISALTMALAR VE SİMGELER

α : alfa

β : beta

γ : gama

δ : delta

ϵ : epsilon

ζ : zeta

μ l: Mikrolitre

ACMG: The American College of Medical Genetics and Genomics

Bç: baz çifti

ddH₂O: Double - Distilled Water

Dl: desilitre

DMSO: Dimetil Sülfoksit

DNA: Deoksiriboz Nükleik Asit

dNTP: Deoksinükleotid Trifosfat

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

EKLF: Erythroid Krüppel-Like Factor

EPO: Eritropoetin

FL: femtolitre

G: gram

G6PD: Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz

GATA1: Gata Binding Protein 1

Hb: Hemoglobin

HBA: Hemoglobin Alpha Locus

HBB: Hemoglobin Beta Locus

HBD: Hemoglobin Delta Locus

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HS: Hipersensitif Bölge

JMJD3: Jumonji Domain Containing 3, Histone Lizin Demetilaz

Kb: Kilobaz

LCR: Lokus Kontrol Bölgesi

Max: Maksimum

MCH: Ortalama Eritrosit Hemoglobini

MCHC: Eritrosit ortalama hemoglobin yoğunluğu

MCV: Ortalama Eritrosit Hacmi

MgCl₂: Magnezyum Klorid

Min: Minimum

ml: mililitre

MRE: major DNA region regulating expression

NFE2: Nuclear Factor, Erythroid 2

Ng: Nanogram

Ort: Ortalama

Örn: Örneğin

PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Pg: pikogram

Pmol: pikomol

RBC: Eritrosit

RDW: Kırmızı Kan Hücreleri Dağılım Genişliği

Rpm: rounds per minute

Sp1: Specificity Protein 1

SS: Standart Sapma

TBE: Tris/Borate/EDTA

TDBK: Total Demir Bağlama Kapasitesi

TMPRSS6: Transmembrane Protease Serine 6

TTP: Trombotik Trombositopenik Purpura

UTR: Kodlanmayan Bölge

WHO: Dünya Sağlık Örgütü



ÖZET

Giriş ve Amaç: Bir hemoglobinopati hastalığı olan beta talasemi, hemoglobinin beta globin sentez defekti sonucu oluşur. Beta talasemi taşıyıcılığı tanısı koymada yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sonucu ortaya çıkan HbA₂ değerinin önemi büyüktür. Beta talasemi taşıyıcılığında HbA₂ seviyesinin artmış olması beklenmektedir. Ancak bazı durumlarda HbA₂ değeri artış göstermemektedir. HbA₂ değerini düşüren nedenler arasında en az araştırılmış olanı delta globin gen değişiklikleridir. Delta globin gen değişiklikleri klinik olarak bulgu vermese de beta talasemi taşıyıcılığının tanınmasında yanlış tanıya sebep olabilmektedir. Çünkü HbA₂ değeri, delta globin azalmasına bağlı olarak normal ya da normalin altında olabilmektedir. Bu sebeple talasemi taşıyıcılığının sık görüldüğü bölgelerde talasemi önleme programları için delta globin gen değişikliklerinin ortaya konması önemlidir. Bu çalışmada beta talaseminin sık görüldüğü ülkemizde dizi analizi ile HBD geni varyasyonlarını ortaya koyarak, delta globin gen varyasyon sıklığını ve bu varyasyonların tiplerini ortaya koymayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na alfa veya beta talasemi mutasyon analizi için başvurmuş toplam 50 olgu alınmıştır. HbA₂ değeri elektroforezde %2 ve altında, mikrositoz ve hipokromisi olan 40 olgu ve HbA₂ fraksiyonunda ek pik saptanan 10 olgu bulunmaktadır. Bu olgularda Sanger dizi analizi yöntemiyle *HBD* geni değişiklikleri araştırılmıştır.

Bulgular: Çalışmada 8 olguda toplam 7 farklı varyasyon tespit edilmiştir. Saptanan 7 varyasyonun 5'i daha önce tanımlanmıştır. İki varyasyon (c.350 G>C ve c.-172 A>T) ise ilk defa bu çalışmada saptanmıştır. Saptanan değişiklikler; 1 olguda tanımlı c.-115 A>G mutasyonu, 1 olguda tanımlı c.14 C>T mutasyonu ve 2 farklı benign varyasyon (c.294 C>T, c.316-174_316-173delAT), 1 olguda varyant hemoglobin oluşturan ve ilk defa bu çalışmada tanımlanan c.350 G>C varyasyonu ve 5 olguda bir tanesi bu çalışmada tanımlanan 2 farklı varyasyondur (c.315+429 T>C, c.-172 A>T).

Sonuç: Yeni bulunan 2 varyasyondan biri yeni hemoglobin varyantı HbA₂-Bornova olarak dünya literatürüne kazandırılmış, diğeri ise The American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) kriterlerine göre benign olarak değerlendirilmiştir. Varyasyon saptanan olguların laboratuvar bulguları değerlendirilerek fenotip-genotip korelasyonuna katkı sağlanmıştır. Türkiye popülasyonundaki *HBD* geni varyasyon dağılımı ilk kez değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: delta talasemi, *HBD*, HbA₂, varyasyon

ABSTRACT

Introduction and purpose: Beta thalassemia is a hemoglobinopathy which results from hemoglobin beta globin synthesis defect. HbA₂ levels assessed by high performance liquid chromatography (HPLC) are essential parameter for the diagnosis of beta thalassemia carriers. HbA₂ levels is expected to be increased in beta thalassemia carriers. However, in some cases, the HbA₂ level does not increase. Among the causes that lowered HbA₂ level, the least researched is the delta globin gene variations. Although delta globin gene variations have no clinical implications, the co-inheritance of beta thalassemia mutations may lead to misdiagnosis. Because, HbA₂ levels remain normal or low due to decreased delta chain production. For this reason, the detection of delta globin variations is important in countries that have a high incidence of beta thalassemia carriers. In this study, we aimed to reveal the *HBD* gene variations by sequence analysis to investigate the frequency and types of these variations in our country where beta thalassemia is common.

Materials & Methods: A total of 50 patients who applied for the analysis of alpha or beta thalassemia mutations in Ege University Medical Faculty Hospital Medical Genetics Department were included in the study. There were 40 cases presenting microcytosis and hypochromia with the HbA₂ level of 2% or less than 2% and 10 cases with a second peak in the HbA₂ fraction. In these cases, HBD gene changes were investigated by Sanger sequence analysis.

Results: In this study, seven different variations were detected in 8 cases. Five of the 7 detected variations have been described previously. Two variations were identified for the first time in this study. Seven variations defined in the study were as follows; 1 previously reported c.115 A>G mutation in one case; 1 previously reported c.14C>T mutation and 2 benign variations (c.294 C>T, c.316-174_316-173delAT) in one case; 1 novel c.350 G> C variation, which formed a variant hemoglobin and was first described in this study; 2 variations (c.315+429 T>C, c.-172 A>T), one of was defined in this study in 5 cases were identified.

Conclusion: One of the two novel variants was introduced to world literature as a new hemoglobin variant HbA₂-Bornova and the other was benign according to ACMG criteria. This study contributed to the phenotype-genotype correlation by evaluating the laboratory findings of the cases that detected variation. *HBD* gene sequencing analysis was assessed for the first time in the Turkish population.

Keywords: Delta thalassemia, *HBD*, HbA₂, variation

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Hemoglobinopatiler, globin zincirinin azalmış sentezi veya yokluğu ile ya da globin zincirinin yapısında defekt sonucu oluşur. En sık olarak alfa ve beta globin zincirinde defekt ile oluşur [1]. Dünyada en yaygın monogenik hastalık grubudurlar. Dünya popülasyonunun %7'sinin bu hastalıklar açısından taşıyıcı olduğu tahmin edilmektedir [2]. Malarya için endemik olan bölgelerde yoğun olarak bulunsa da, göçler ile dünyanın her ülkesinde görülmektedirler [3, 4]. Hemoglobinopatiler ve talasemiler her yıl 300,000 hasta çocuğun dünyaya geldiği, ciddi bir dünya sağlık sorunudur [5].

Talasemi, ilk defa 1925 yılında Thomas Cooley ve Pearl Lee tarafından, splenomegali ve karakteristik kemik değişiklikleri bulunan çocuklarda oluşan ciddi bir anemi çeşidi olarak tanımlanmıştır. İlk vakaların Akdeniz bölgesindeki çocuklarda tanımlanmasından ötürü hastalık, Yunanca deniz anlamına gelen “thalassa” ve anemi anlamına gelen “emia” sözcüklerinden köken alarak “thalassemia” olarak ifade edilmiştir [6, 7]. Daha sonra bu bozuklukların Akdeniz çevresi ülkelerle sınırlı olmadığı, tropikal ülkeleri de içine alan geniş bir alanda görüldüğü ortaya çıkmıştır ve şimdi tüm dünyayı etkilediği bilinmektedir [7]. Dünya popülasyonunun %1,5'unun beta talasemi taşıyıcısı olduğu ve her yıl 60,000 hasta çocuğun dünyaya geldiği bildirilmektedir [3].

1950'lerde erişkin tip hemoglobinlerin minör komponenti olan HbA₂ bulunmuştur. 1970'lerde globin genleri klonlanmış ve sekansı yapılabılır hale gelmiştir. Bu sayede talasemilerin patofizyolojisi ve moleküler temeli daha iyi anlaşılmıştır. Bu yıllarda dünyada talasemi kontrol programları oluşturulmaya başlanmıştır [7].

Ülkemizde hastalığın görülme sıklığı göz önüne alınarak 2003 yılında, 33 ilde Hemoglobinopati Kontrol Programı başlatılmış ve merkezler kurulmuştur. Bu programda hemoglobinopatilerin önlenmesinde en önemli adım, evlilik öncesi çiftlerin taşıyıcılık testinden geçmesi ve her ikisi de taşıyıcı olan çiftlerin belirlenerek çocuk sahibi olmadan önce genetik danışmanlıktan yararlanmaları yoluyla yeni hasta doğumunun engellenmesidir [5]. Beta talasemi taşıyıcılığı tanısı koymada HbA₂ değerinin önemi büyüktür. Beta talasemi taşıyıcılığında HbA₂ seviyesinin artmış olması beklenmektedir. Ancak bazı durumlarda HbA₂ değeri artış göstermemektedir. HbA₂

değerini düşüren nedenler arasında en az araştırılmış olanı delta globin gen değişiklikleridir [8, 9].

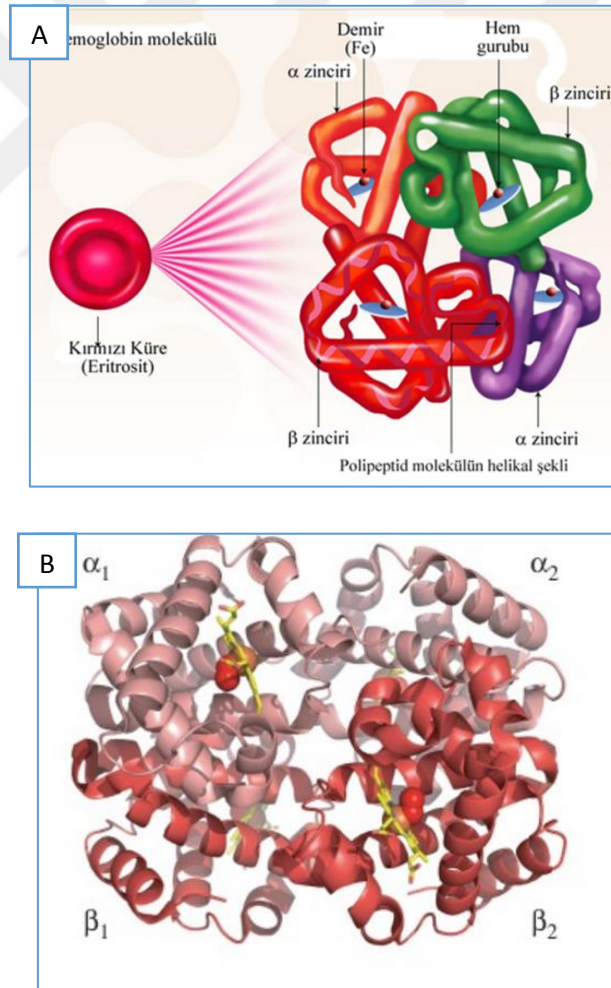
Delta globin gen değişiklikleri tek başına klinik olarak bulgu vermese de beta talasemi taşıyıcılığının tanınmasında yanlış tanıya sebep olabileceği için dikkate alınmalıdır. Beta talasemi taşıyıcılarında yüksek beklenen HbA₂ değeri, delta globin değişikliği olan bireylerde normal ya da normalin altında olabilmektedir. Bu sebeple talasemi taşıyıcılığının sık görüldüğü bölgelerde talasemi önleme programları için delta globin gen değişikliklerinin ortaya konması önemlidir [10, 11].

Bu çalışmada Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na alfa ve/veya beta talasemi mutasyon analizi için başvuran ve HbA₂ seviyesi düşük olan olguların Sanger dizi analizi yöntemiyle HBD geni dizi analizi yapılmıştır. Bu çalışmada daha önce ülkemizde yapılmamış olan *HBD* geni dizi analiziyle, HbA₂ düzeyini düşüren delta globin gen varyasyonları araştırarak ülkemizdeki delta globin gen varyasyon sıklığını ve bu varyasyonların tiplerini ortaya koymayı amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 HEMOGLOBİN YAPISI VE FONKSİYONU

Hemoglobin (Hb), dokuların ihtiyaç duyduğu oksijen transportunu sağlayan dördüncül (tetramerik) yapıda bir proteindir [12]. Bu molekülün 3 boyutlu yapısı ilk defa 1960 yılında Dr. Perutz ve arkadaşları tarafından X-ışını kristallografisi ile ortaya konmuş [13] ve bu çalışma ile Dr. Perutz, 1962’de Kimya dalında Nobel ödülüne layık görülmüştür [14]. Hb, yaklaşık 64,400 dalton ağırlığında, her biri bir polipeptid zinciri (globin) ve bir hem grubundan oluşmuş dört alt birimden meydana gelen bir yapıdır (Şekil 2.1). Aminoasitlerin sıralanması birincil yapıyı, bu yapının hidrojen bağlarıyla heliksler şeklinde bir araya gelmesi ikincil yapıyı, polipeptid zincirlerin katlanarak üç boyutlu form oluşturması üçüncül yapıyı meydana getirir [15]. Dördüncül yapı, dört polipeptid zincirinin birleşmesi ile ortaya çıkar [14, 16].



Şekil 2.1: Erişkin Hemoglobin HbA yapısı (A); HbA'nın üç boyutlu yapısı (B) (sarı: protoporfirin IX halkası, kırmızı küre: O₂, turuncu küre: demir atomu) [17, 18]

Hemoglobin molekülünde bulunan hem halkası, bütün hemoglobinlerde aynıdır ve globin zinciri tarafından meydana getirilen cepler içerisinde yer almaktadır. Hem grubu, bir protoporfirin IX ve iki değerlikli demir (Fe^{+2}) kompleksinden meydana gelir. Hem içindeki demir atomları, O_2 'i bağlayarak transportu sağlar. Globin zincirleri ise, 141 aminoasitten oluşan alfa (α) ve 146 aminoasit içeren beta (β) globin zincirleri (zeta - ζ , alfa1 - α_1 , alfa2 - α_2 , epsilon - ϵ , gama - γ , delta - δ , beta - β) olmak üzere farklılık gösterir [3, 19, 20].

2.2 GLOBİN GEN KÜMELERİ

Hemoglobinin yapısındaki globin zincirlerini ifade eden, iki ayrı kromozom üzerinde, iki farklı gen kümesi yer almaktadır (Şekil 2.2, Şekil 2.3) [21]. Alfa ve beta globin gen kümesi arasındaki farklar Tablo 2.1'de gösterilmiştir.

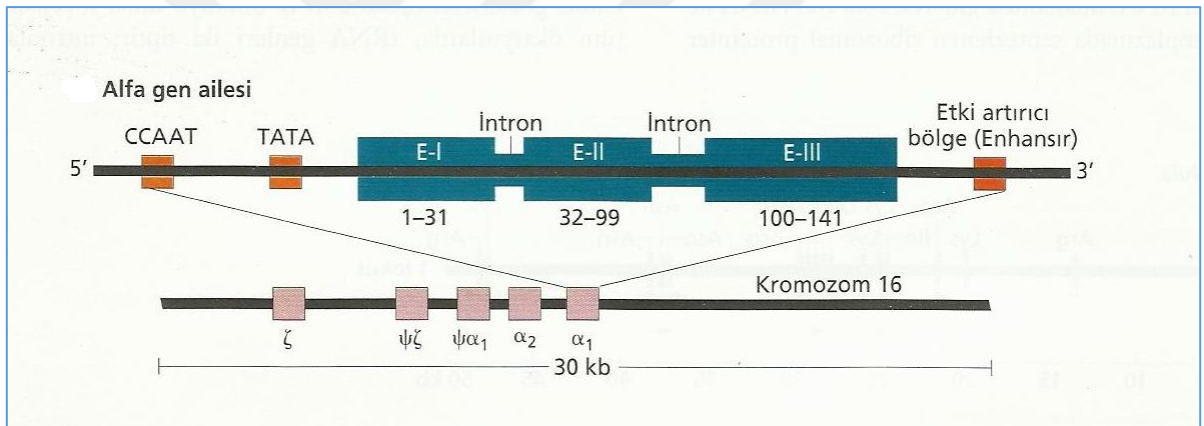
ÖZELLİK	α – globin gen kümesi	β - globin gen kümesi
Konum	16p13.3 telomerik	11p15.5 intersitisyel
Guanin – Sitozin içeriği	%54	%39.9
CG dinükleotid zengin adacıklar	Sık	Yok
Gen yoğunluğu	Yüksek	Düşük
Kromatin	Açık	Kapalı
Replikasyon zamanı	Erken	Geç
Sık mutasyon çeşidi	Delesyonlar	Nokta mutasyonları
İntergenik bölgelerin evrimi	Hızlı	Yavaş
Hibrid ekspresyonu	Erken	Geç
Polycomb represif kompleks bağlanması	Var	Yok
H3K27me3 kromatin modifikasyonu	Var	Yok
JMJD3 enzimi	Gerekli	Gerekli değil

Tablo 2.1: Alfa ve beta globin gen kümesi arasındaki farklar [22]

2.2.1 Alfa Globin Gen Kümesi

Alfa globin gen kümesi, 16. kromozom kısa kolunda (16p13.3) yer alır. Yaklaşık 30 kb (kilobaz) uzunluğunda olan bu gen kümesi 5'- ζ 2- $\Psi\zeta$ 1- $\Psi\alpha$ 2- $\Psi\alpha$ 1- α 2- α 1- θ -3' genlerini içermektedir. Zeta (ζ) ve iki alfa (α 1 ve α 2) geni işlevsel genlerdir. Zeta geni, daha önce belirtildiği gibi, embriyonel hayatta ifade edilirken, α 1 ile α 2 geni fetal ve erişkin dönemde aktiftir. Bu genlerin dışında fonksiyonel olmayan yalancı genler (pseudogen, $\Psi\zeta$ - $\Psi\alpha$ 2- $\Psi\alpha$ 1) de alfa gen ailesi içinde yer almaktadır [23].

Alfa globin gen kümesi genleri, iki intron ve üç ekzon içerir ve 141 aminoasit kodlarlar. ζ , α 1 ve α 2 genlerindeki ekzon dizileri hemen hemen aynıdır. Ekzon 1, 1-31 arasındaki aminoasitleri; ekzon 2, 32-99 arasındaki aminoasitleri; ekzon 3 ise 100-141 arası aminoasitleri ifade ederek polipeptid zincirini oluşturur (Şekil 2.2) [21, 24].



Şekil 2.2: Alfa globin gen kümesi şematik gösterimi [24]

Alfa globin gen ailesi, ζ -globin mRNA “cap” bölgesinin 10 (HS-10), 33 (HS-33), 40 (HS-40) ve 48 (HS-48) kb yukarı (upstream) bölgelerinde tanımlanmış dört eritroid spesifik DNaz I duyarlı bölge (hipersensitif bölge-HS) içerir (Şekil2.3) . Yapılan çeşitli çalışmalarla yalnızca HS-40 (Hipersensitif bölge-40) bölgesinin ekspresyonda önemli etkisi olduğu gösterilmiştir [25].

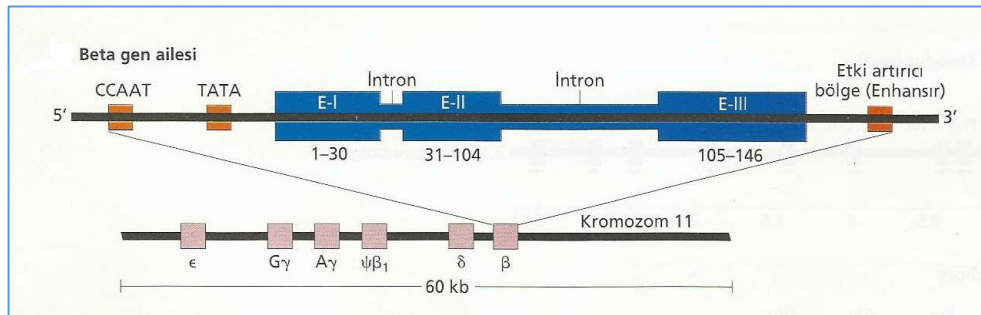


Şekil 2.3: Alfa globin gen kümesi DNazI duyarlı bölgelerin (HS) şematik gösterimi [26]

2.2.2 Beta Globin Gen Kümesi

Beta globin gen kümesi, 11. kromozom kısa kolunda (11p15.4) yer alır. Yaklaşık 60 kb uzunluğunda olan bu gen kümesi sırasıyla 5'-ε-Gγ-Aγ-Ψβ-δ-β-3' genlerini içermektedir. Bu sıra aynı zamanda hemoglobin dönüştürme sırasıyla aynıdır. Epsilon geni embriyonik, gama genleri ise fetal genler olup, delta ve beta genleri doğumdan itibaren aktif olan genlerdir. Beta globin gen kümesinde bir adet pseudogen (Ψβ) bulunur (Şekil2.4) [27].

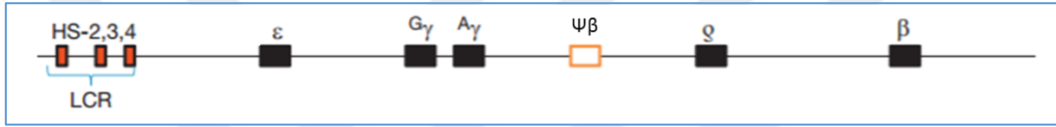
Üç ekzon ve iki introndan meydana gelen epsilon, gama, beta ve delta genleri 146 aminoasit kodlamaktadırlar. Beta globin gen kümesi üyesi olan Gγ ile Aγ genleri yapısal olarak benzerdirler. Aralarındaki fark, 136. aminoasit pozisyonunda Aγ geninin Alanin ve Gγ geninin Glisin içermesidir. Doğumda Gγ ve Aγ yüzdesi sırasıyla %68 ve %32 iken, bu oran altı ay sonra erişkin HbF seviyesine iner [19].



Şekil 2.4: Beta globin gen kümesi şematik gösterimi [24]

Beta globin gen kümesinde transkripsiyon, gen ifadesi için gerekli DNA (deoksiriboz nükleik asit) dizileri olan promoter, enhancer ve silencer ile bu dizilere

bağlanan proteinler arasındaki kompleks etkileşimler ile düzenlenir [28]. Beta globin gen kümesinin kontrolü, β lokus kontrol bölgesi (β -locus control region, β -LCR) tarafından sağlanır. β -LCR yaklaşık 20kb uzunluğunda, ϵ geninin 6-18kb önünde yer almaktadır [29]. Bu bölge DNazI tarafından kesilmeye duyarlı olan 5 DNA bölgesi (HS) içerir. LCR'de 5 farklı HS dizisi bulunur. Bu diziler HS1, HS2, HS3, HS4 ve HS5'ten oluşmakta ve bu dizilerden her biri, transkripsiyonu aktifleştirmede ya da baskılamada görev almaktadırlar (Şekil2.5) [30, 31]. Bu bölgeler, ortalama olarak 200-300 bp uzunluğunda ve DNazI duyarlılığı için gerekli tanıma bölgelerine bağlanan NF-E2, EKLF, GATA-1 ve Sp1 gibi birçok transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesini oluştururlar [20, 32, 33].



Şekil 2.5: Beta globin gen kümesi DNazI duyarlı bölgelerin (HS) şematik gösterimi [34]

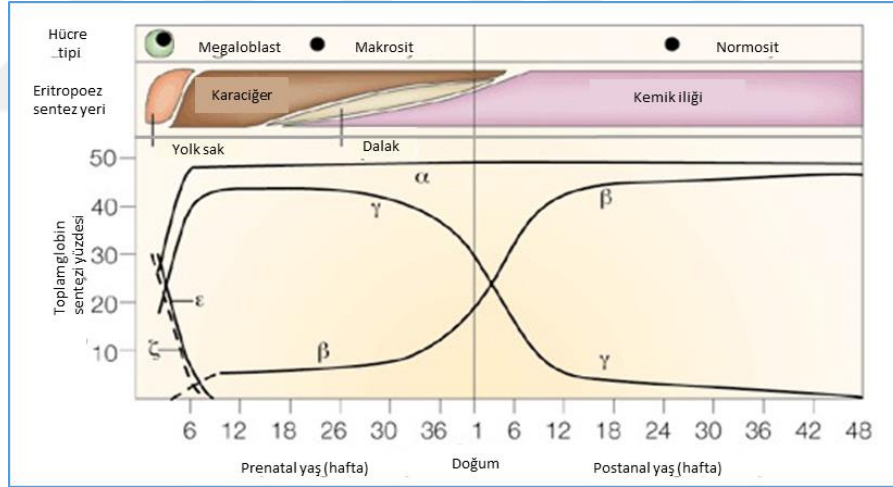
LCR'nin önemi, HS bölgelerinin tamamı veya bir kısmının etkilendiği delesyonlarda beta globin geninin inaktive olmasıyla gösterilmiştir [35]. β -benzeri globin gen kümesi bunlara ek olarak TATA, CAAT ve duplike edilmiş CACCC kutularının bulunduğu 5' promoter dizileri ile de düzenlenir [35, 36].

2.3 HEMOGLOBİN DÖNÜŞÜMÜ VE ERİTROPOEZ

Yenidoğan ve erişkin hemoglobinlerin farklılığı ilk olarak 19. yüzyıl sonlarında tespit edilmiş, embriyonik ve yetişkin kanın birbirinden farklı oksijen afinitesi gösterdiği 20.yy başlarında ortaya konmuştur. Yaşam boyunca, embriyonik, fetal ve yetişkin dönemde, değişen oksijen ihtiyacına göre farklı hemoglobin tipleri sentez edilmesi "hemoglobin dönüşümü" (hemoglobin switching) olarak ifade edilmektedir [29] [37].

Eritroblastlar altı değişik polipeptid zinciri sentezleyebilmektedir. Bunlar alfa, beta, gama, delta, epsilon ve zetadır. Bu globinleri ifade eden genler, hayatın farklı dönemlerinde aktifleşmekte ya da baskılanarak ekspresyonları engellenmektedir.

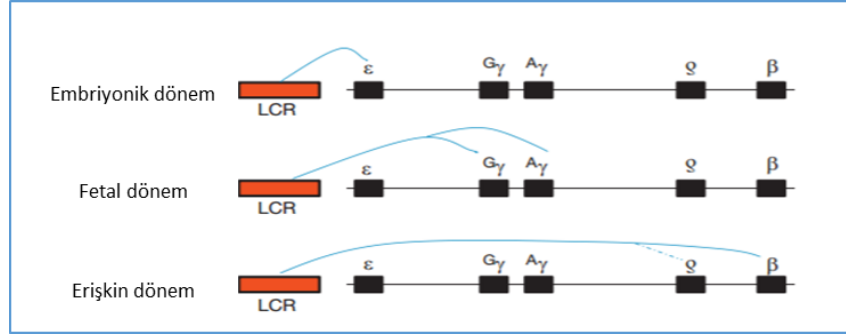
Embriyonik globin sentezi, gebeliğin üç ile sekizinci haftası arasında vitellüs kesesinde gerçekleşir. Embriyonik yaşamın erken dönemlerinde Hb Gower 1 ($\zeta_2\varepsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2\varepsilon_2$) ile Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) ile hemoglobin sentezi başlar. Gebeliğin 5. haftasından itibaren hemoglobin üretimi fetal karaciğere doğru geçiş gösterir ve 8. haftasında fetal karaciğer, HbF ($\alpha_2\gamma_2$) ve az miktarda HbA ($< \%10$) sentez görevini üstlenir. HbF üretimi dalakta da mevcuttur. Gebeliğin 13. haftasında embriyonik hemoglobinler kaybolarak, fetal hemoglobin olan HbF baskın hale gelir. 18. haftadan itibaren doğuma kadar olan süreçte eritrosit üretimi fetal karaciğerden kemik iliğine doğru geçmeye başlar. Gebeliğin 35. haftasında HbF miktarı düşmeye ve HbA miktarı artmaya başlar. Doğumdan sonra da bu durum devam eder. Doğumdan sonra 6. aydan itibaren Hb üretimi esas olarak kemik iliğine gerçekleşmeye başlar ve bu durum erişkin dönemde de geçerliliğini korur (Şekil 2.6). Erişkinlikte yaklaşık %97 oranında HbA, yaklaşık %3'ten daha az oranda HbA₂, %1'in altında HbF olmak üzere üç temel hemoglobin bulunur [38-42].



Şekil 2.6: Embriyonik, fetal ve doğum sonrası dönemde globin sentezi [39]

Alfa ve beta globin gen kümeleri, içerdikleri genlerin ifadesinin başlaması için özgün promotör bölgeler ile etkileşebilen elementler içerirler. Bu elementler, gen ailelerinin DNaz-HS bölgelerinde yer alırlar ve alfa globin gen ailesi için bir HS 40 dizisi, beta globin gen ailesi için ise beta geni kontrol bölgesi (LCR) içinde yer alan beş HS (HS1, HS2, HS3, HS4, HS5) diziden oluşurlar. Bu dizilerin her biri, transkripsiyonu

aktive edici veya baskılayıcı moleküller için bağlanma bölgesi olarak düzenlenmişlerdir ve hemoglobin dönüşümünü kontrolünden sorumludurlar (Şekil2.7) [23, 29, 32].



Şekil 2.7: LCR ve beta globin gen kümesinin insan gelişiminin farklı evrelerindeki etkileşimleri [43]

2.4 ANEMİ

Anemi, eritrosit (RBC) kütlelerinde veya hemoglobin konsantrasyonunda azalma olarak tanımlanabilir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre, anemi prevalansı yaklaşık olarak 5 yaş altı çocuklarda %39, 5-14 yaş arası çocuklarda %48, 15-59 yaş arası kadınlarda %42, 15-59 yaş arası erkeklerde %30 ve 60 yaş üstü erişkinlerde %45 olarak belirtilmiştir [44]. Anemi tanısı için kabul edilen değerler yaş, cinsiyet, etnik köken gibi faktörlere göre değişkenlik göstermektedir. WHO'ya göre çocukluk ve erişkinlik dönemi için ortalama kabul edilen değerler Tablo 2.2'de gösterilmiştir.

YAŞ	HAFİF g/dl	ORTA g/dl	ŞİDDETLİ g/dl
6-59 ay	10 – 10,9	7 – 9,9	< 7
5-11 yaş	11 – 11,4	8 – 10,9	< 8
12-14 yaş	11 – 11,9	8 – 10,9	< 8
Kadın > 14 yaş	11 – 11,9	8 – 10,9	< 8
Erkek > 14 yaş	11- 12,9	8 – 10,9	< 8

Tablo 2.2: WHO'ya göre anemi tanısında kullanılan hemoglobin konsantrasyon değerleri ve buna göre anemi şiddetinin değerlendirilmesi [45]

2.4.1 Hemolitik Anemi

Ortalama ömrü 100-120 gün olan eritrositlerin prematür yıkımına bağlı oluşan anemiler hemolitik anemi grubu içinde yer alır [46]. Hemolitik anemi sınıflandırması, örnekleri ile birlikte Tablo 2.3'te özetlenmiştir.

Erişkinlerde Hemolitik Anemi Sınıflaması	
<u>Kazanılmış</u>	<u>Hereditör</u>
İmmün kaynaklı	Membran defektleri
Otoimmün	Sferositoz
Sıcak tip	Eliptositoz
Soğuk tip	Enzim eksiklikleri
Alloimmün	G6PD eksikliği
Tranfüzyon reaksiyonları	Piruvat kinaz eksikliği
Yenidoğanın hemolitik hastalığı	Hemoglobinopatiler
İlaç ilişkili	HbS
Eritrosit fragmantasyon sendromları	Stabil olmayan hemoglobinler
Mikroanjiopatik hemolitik anemi (TTP)	HbC
Arterio-venöz malformasyon	
Kardiyak hemoliz	
Marş hemoglobinürisi	
Enfeksiyonlar (malarya)	
Parksimal nokturnal hemoglobinüri	
Karaciğer ve böbrek hastalıkları	

Tablo 2.3: Hemolitik aneminin kazanılmış ve hereditör nedenlerine göre sınıflandırılması (G6PD: Glukoz 6 fosfat dehidrogenaz, HbS: orak hücreli anemi, TTP: trombotik trombositopenik purpura) [47]

2.4.1.1 Hemoglobinopatiler

Hemoglobinopatiler, globin zincirinin azalmış sentezi veya yokluğu (örn. talasemiler) ile ya da hemoglobin protein yapısında defekt sonucu yapısal hemoglobin varyantlarının oluşumu (örn. orak hücreli anemi) ile karakterize olan, sıklıkla alfa ve

beta globin gen değişiklikleri sonucu oluşan durumlardır [1]. Globin genleri dışında, fenotipi etkileyen birçok gen olduğu saptanmıştır. Bu genler dahil hemoglobin hastalıkları ile ilgili, 223 gende regülasyonu ve ekspresyonu etkileyen 2637 varyasyon tespit edilmiştir [48]. Hemoglobinoatiler dünyada en yaygın monogenik hastalıklardır ve daha önce malaryanın sık görüldüğü bölgelerde yoğunluk göstermektedirler. Malaryanın endemik olduğu bu bölgelerde bireylerin %3-40'ı bu varyantları taşımaktadır ve hemoglobinopati prevalansı 1000 canlı doğumda 0,3-25 olarak bildirilmektedir [49, 50]. Günümüzde, küresel göçlerden ötürü hemoglobinoatiler Akdeniz, Asya ve Afrika'dan çıkıp Avrupa, Amerika ve Avusturalya'da da endemik hale gelmişlerdir (Tablo 2.4). Hemoglobinoatiler anormal hemoglobinler ve talasemiler olarak iki ana gruba ayrılabilir [4, 7, 51, 52].

BÖLGE	GEN TAŞIYICILIĞI (%)
Afrika	5-30
Arap toplumu	4-40 >60 (bazı bölgeler)
Orta Asya ve Hindistan	10-20
Güney ve Batı Asya	5-40 >70 (bazı bölgeler)
Amerika Birleşik Devletleri	5-20
İtalya	7-9
Yunanistan	6-7
Türkiye	7-10
Almanya, İngiltere, Portekiz, İspanya, Fransa, Hollanda, Belçika, İskandinav ülkeleri	0,5-1 5 (göçmen)
Arnavutluk, Yugoslavya, Hırvatistan, Bosna-Hersek, Bulgaristan	2-5
Rusya	Nadir

Tablo 2.4: Dünyada hemoglobinoatide gen taşıyıcılığı prevalansı [53]

Çoğu hemoglobin gen varyantı nadirdir ve zararsızdır, ancak bazı varyantların taşıyıcılığı malaryaya karşı koruyucu olduğu için yaygındır. En sık saptanan varyant, α^+ talasemi, sıklıkla iyi seyirlidir. Bununla birlikte, hemoglobin S, C, E, D Punjab, β talasemi ya da α^0 talasemi taşıyıcılığının kombinasyonları ciddi hemoglobin hastalığı ile sonuçlanabilir. [49].

Talasemi ve hemoglobinopatiler, Türkiye için önemli halk sağlığı sorunlarının başında gelmektedir. Türkiye’de beta talasemi taşıyıcılığı sıklığının ortalama %2,1 olduğu bildirilse de, bu oranın %13 olduğu bölgeler de vardır (Tablo 2.5) [54-56].

Bölge	α -talasemi %	β -talasemi %	Hb S %	Hb D %
Çukurova bölgesi	3.3 ^{1*}	2.3-4.6	3-47	0.3
Güney Türkiye	8	2.4-13.1	2.5	-
Batı Türkiye	-	0.7-3.6	0.5	-
Ege Bölgesi	-	2.6-5.1	0.5	-
Marmara Bölgesi	-	3.4-11.7	2.5	-
Orta Anadolu	3.6 ^{2**}	2.1	-	-

Tablo 2.5: Türkiye’de sık görülen hemoglobinopatiler [56]

2.4.1.2 Talasemiler

Talasemiler, hemoglobin yapısındaki globin zincirlerinden bir veya birden fazlasının yapım azlığı ya da hiç sentezlenmemesi ile karakterize, kronik hemolitik anemiye yol açan, kalıtsal bir grup hematolojik hastalıktır [57]. Talasemiler dünyada en sık görülen, ciddi halk sağlığı problemi oluşturan, tek gen hastalıklarıdır. Tüm dünyada yaklaşık olarak 270 milyon globin gen mutasyonu taşıyıcısı olduğu tahmin edilmekte ve her yıl yaklaşık 400.000 bu hastalıklardan etkilenmiş birey dünyaya gelmektedir [16, 51].

α globin zincirinin yokluğu ya da azlığı α -talasemi, β globin zincirinin yokluğu ya da azlığı β -talasemi olarak adlandırılır [7]. Alfa talasemi daha yaygın bir dağılıma sahip olmasına rağmen her iki talasemi de birçok toplumda yüksek orandadır. Ağırlıklı olarak Akdeniz ülkelerinde, Hintli, Çinli ve Güney Asya kökenli bireylerde gözlenirler (Şekil 2.8) [40].



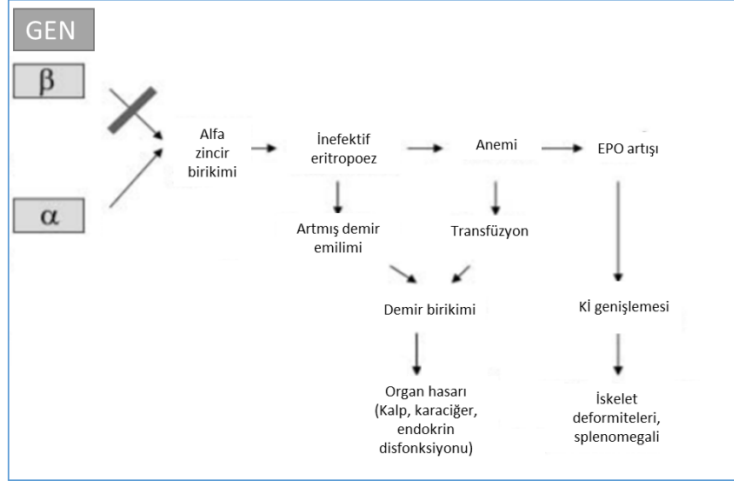
Şekil 2.8: Alfa ve beta talasemininin dünyadaki dağılımı [2]

2.4.1.2.1 Beta Talasemi

Beta talasemi, azalmış beta globin zinciri üretimi ya da bu üretimin hiç olmaması ile karakterize, dünyada en sık görülen monogenik hastalıklardan birisidir [58].

2.4.1.2.1.1 Beta Talasemi Patofizyolojisi Ve Klinik Formları

Beta talasemide beta globin zinciri ile alfa globin zinciri miktarı arasında dengesizlik vardır. Serbest alfa zincirleri inklüzyon cisimcikleri halinde eritrosit prekürsör hücrelerinde çökerler ve intramedüller yıkımın oluşmasına sebep olurlar. Ayrıca dolaşımda bulunan alfa zincir inklüzyonlarını içeren olgun eritrositlerin yıkımına bağlı olarak da hemolitik anemi gerçekleşir (Şekil 2.9) [51, 59].



Şekil 2.9: Beta talasemi patofizyolojisi [59]

Beta talasemide klinik tablo, alfa ve beta zincirlerinin dengesizliğine bağlıdır. Beta globin zincirinin üretilmediği durumda β^0 -talasemiler, üretimin normalden az olduğu durumda ise β^+ -talasemi olarak adlandırılırlar [36, 60]. Beta talasemi çoğunlukla otozomal resesif kalıttır. Nadir görülen dominant beta talasemilerden ayrı olarak beta talasemi majör ve intermedia hastaları, β^0 veya β^+ genleri açısından homozigot ya da birleşik heterozigottur [3].

Etkilenmiş allellerin heterozigot, homozigot ya da birleşik heterozigot olma durumlarına göre, yelpazesi asemptomatik ya da kan tranfüzyon ihtiyacı olmasına kadar değişiklik gösteren, üç klinik fenotip tanımlanmıştır.

Beta talasemi majör, beta globin allellerinde homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyon olduğunda meydana gelir. Alfa ve beta globin zincirleri arasında büyük dengesizlik söz konusudur. Şiddetli mikrositik ve hipokromik hemolitik anemi ($Hb < 7$ gr/dl) hayatın ilk yılında ortaya çıkar. Genellikle etkilenmiş bireyler doğduktan 3 ila 6 ay sonra düzenli kan tranfüzyonuna ihtiyaç duyarlar [30, 61, 62]. Tedavisiz olgularda büyüme geriliği, solgunluk, genu valgum, hepatosplenomegali, bacak ülserleri ve kemik iliğinin genişlemesinden kaynaklanan malar kemiklerde belirginleşme, maksiller kemik hipertrofisi gibi iskelet değişiklikleri görülür. Tedavi edilen hastalarda ise demir birikimine bağlı problemler ön plandadır. Demir birikimi büyüme geriliği, dilate kardiyomyopati gibi kalp, fibrozis ve siroz gibi karaciğer, diyabetes mellitus, hipogonadizm gibi endokrin organ problemlerine yol açar [3]. Talasemi majör hastalarının %35-50'sinin 35 yaşından önce öldüğü bildirilmektedir. Kardiyak komplikasyonlar, ölümlerin %71'inden sorumlu tutulmaktadır [63].

Beta talasemi intermediada klinik fenotip talasemi taşıyıcılığı ve talasemi majör arasında değişmektedir. Bu hastaların her iki beta globin geni allelinde beta⁺ talasemi mutasyonu ya da iki beta⁰ mutasyonunun yanında alfa⁰ talasemi mutasyonu birlikteliği ve HbF yüksekliği görülebilir. Heterozigot beta⁰ talasemi mutasyonunun alfa talasemi triplikasyonu ile birlikte görülmesi de intermedia tablosuna yol açabilir. Klinik durumuna göre bu bireyler nadiren transfüzyona ihtiyaç duyabilir ya da hiç ihtiyaç duymayabilirler [30, 39].

Beta talasemi taşıyıcılığında ise hafif anemi görülür. Bu gruptaki bireylerde hipokromik, mikrositik eritrositler, HbA₂ seviyesinde artış ve HbF değeri yüksekliği önemli belirteçlerdir. Talasemi formları ve genotipleri ile birlikte Hb, MCV (ortalama eritrosit hacmi), MCH (ortalama eritrosit hemoglobini) , HbA₂, HbF değerleri Tablo 2.6'da verilmiştir. Sessiz beta talasemi taşıyıcıları ise asemptomatiktirler. Beta globin zincirini hafif düzeyde azaltan, hafif beta⁺ talasemi mutasyonu taşıyanlarda görülürler. [6, 30].

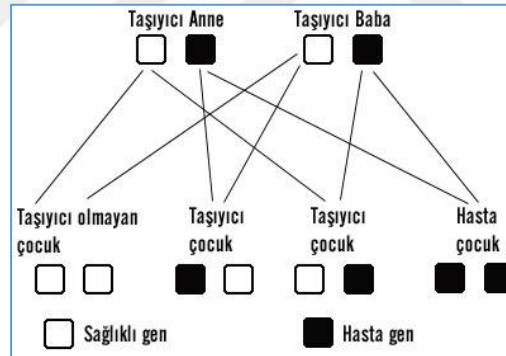
Fenotip	Genotip	Eritrosit değerleri	Hemoglobin Tipi	Başlıca Klinik
Beta talasemi majör	β^+/β^+ β^0/β^0 β^+/β^0	Hb: <7 g/dL MCV: 50 - 60 fL MCH: 14 - 20 pg	HbA ₂ : değişken HbF: 70- 90%	Transfüzyon bağımlı
Beta talasemi intermedia	β^+/β^+ β^+/β^{++} β^+/β^0 β^0/β^0	Hb: 6 - 10 g/dL MCV: 55 - 70 fL MCH: 15 - 23 pg	HbA ₂ : değişken HbF:% 100'e yakın	Değişken transfüzyon bağımlılığı
Beta talasemi taşıyıcılığı	β^{++} β^+ β^0	Hb: 9 - 15 g/dL MCV: 55 - 75 fL MCH: 19 - 25 pg	HbA ₂ : % > 3,2 – 3,5 HbF: % 0,5- 6	Hafif anemi

Tablo 2.6: Beta talaseminin fenotip ve genotipleri ile klinik bulguları [53]

Beta talaseminin nadir olarak dominant kalıtıldığı durumlar da bildirilmiştir. Dominant beta talasemide heterozigot beta globin geni mutasyonu vardır ve splenomegali, solukluk, anemi ve safra taşı oluşma riski artışı meydana gelir. Stabil olmayan beta globin zinciri üretimi sebebiyle klinik tablo oluşur. Dominant beta talasemi mutasyonları oldukça nadirdir. Kalıtılan formları bilinse de sıklıkla ekzon 3'te *de novo* olarak meydana geldikleri ve erişkin dönemde talasemi intermediaya yol açtıkları bildirilmiştir [64-66].

2.4.1.2.1.2 Kalıtsal Geçiş

Beta talasemi, otozomal resesif kalıtılır. Beta globin geni (*HBB*, MIM# 141900) mutasyonları sonucu oluşur. Etkilenmiş bireyin anne ve babası zorunlu heterozigottur ve beta globin geni tek allelinde hastalık yapıcı bir mutasyon taşımaktadırlar. Taşıyıcı anne-babaların her gebelik için hasta çocuk sahibi olma riski %25'tir. Bu ailelerin %50 ihtimal ile asemptomatik taşıyıcı çocuk ve %25 ihtimalle de beta globin gen defekti taşımayan çocuk sahibi olma şansı vardır (Şekil 2.10) [3].



Şekil 2.10: Beta talasemi otozomal resesif kalıtımın şematik gösterimi

2.4.1.2.1.3 Beta Talasemi Epidemiyolojisi

WHO'ya göre dünya genelinde beta talasemi taşıyıcılık oranı %1-5 olarak bildirilmiştir. Uluslararası talasemi federasyonuna göre dünya genelinde talasemili 200.000 hastanın yaşamakta olduğu ve düzenli tedavi aldığı bildirilse de talasemi hastalarının gerçek sayısı bilinmemektedir [36]. Bu sayıya yılda 60.000 infant eklenmektedir. Bu hastaların tedavileri yüksek maliyet gerektirmektedir ve bu da

gelişmemiş ya da gelişmekte olan ülkelerde önemli bir sorundur. Hasta doğumlarının önlenmesi için genetik danışma ve prenatal tanı oldukça önemlidir [2, 36].

Türkiye’de en sık görülen talasemi tipi olan β -talasemi hastalığının taşıyıcı sıklığı, bölgelere göre değişmekle birlikte, yukarıda belirtildiği gibi, ortalama %2,1 olarak bilinmektedir. Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerinde bu sıklık %4,3 olarak bildirilmiştir [54]. Ülkemizde Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde talasemi taşıyıcılığı çok sıktır. İç Anadolu, Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde kesin bir rakam bilinmemekle birlikte, Türkiye genelinde yaklaşık 1,5 milyon taşıyıcı ve 3,000 civarında hasta olduğu bildirilmiştir [5].

Talasemi, Türkiye için önemli bir halk sağlığı sorunudur. Bunun için ilk talasemi merkezi Antalya’da kurulmuş ve ardından Hemoglobino-pati Önleme Programı Trakya, Marmara, Ege, Akdeniz ve Güney Doğu bölgelerinde 33 ilde daha başlatılmıştır. Böylece evlilik öncesinde taşıyıcı bireylerin belirlenerek etkilenmiş çocuk sahibi olma riskleri ortaya konmuş ve etkilenmiş çocuk sahibi olma oranı azaltılabilmektedir [5].

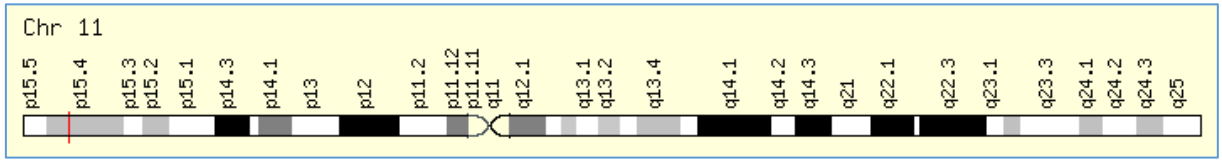
Beta talasemi hastalığının önlenmesi taşıyıcıların belirlenmesine, genetik danışmaya ve prenatal (doğum öncesi) tanı veya preimplantasyon (gebelik öncesi) genetik tanıya dayanır. Genetik danışma ile taşıyıcı kişilere hastalığın seyri, kalıtımı, mevcut ve araştırılan tedavi yöntemleri hakkında bilgi verilir. Hasta çocuk sahibi olma riskinde artış tespit edildiğinde prenatal genetik tanı gebeliğin 15- 18. haftalarında elde edilen amniyotik sıvıdan alınan fetal hücrelerden veya gebeliğin 11-12. haftasındaki koryonik villus örneklerinden elde edilen DNA’nın moleküler analiziyle yapılmaktadır. Son yıllarda, anne kanından elde edilen fetüse ait hücrelerde genetik analiz yöntemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır [3, 53, 63, 67].

2.4.1.2.2 Delta Globin Gen Değişiklikleri ve Önemi

İki yaş üstü bireylerde HbA₂ fraksiyonu normal değeri %2,5 ile %3,4 arasındadır [68]. Biyokimyasal önemi net olarak bilinmemekle birlikte beta talasemi taşıyıcılarında klasik bir parametre olarak mikrositer anemi ile birlikte HbA₂ seviyesinde artış gözlenir (%3,5-8) [8, 69]. Bazı yayınlara göre 2 yaşın üstünde HbA₂ üst sınırı %3,2 olarak da kabul edilmektedir [70]. Bazı durumlarda bireyin beta talasemi taşıyıcısı olmasına rağmen HbA₂ seviyesinin artmadığı bilinmektedir. Bunlar; sessiz beta talasemi

taşıyıcılığı, alfa talasemi taşıyıcılığı, HbH hastalığı, demir eksikliği anemisi ve delta globin gen varyantlarının bulunması, eritroid lösemi, sideroblastik anemi gibi durumlardır [8, 9].

HbA₂, daha önce belirtildiği gibi iki alfa ve iki delta zincirinden meydana gelmektedir. Delta globin proteinini kodlayan *HBD* geni (MIM# 142000), 11.kromozom kısa kolu üzerinde (11p15.4), beta globin gen ailesi içinde bulunur (Şekil 2.11) [71].



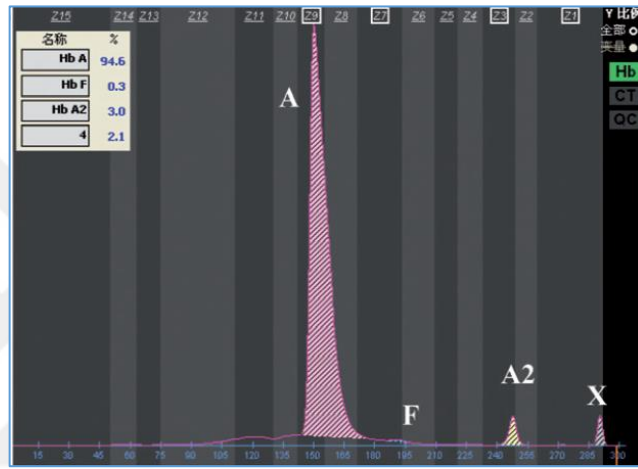
Şekil 2.11: *HBD* geni lokalizasyonu [72]

Beta globin genine benzer şekilde, *HBD* geni değişiklikleri de delta globin zincir sentezi azalmasına (delta talasemi) ya da hemoglobin varyantları oluşmasına neden olur [10]. Günümüze kadar *HBD* geninde 117 varyant tariflenmiştir (<http://globin.cse.psu.edu/hbvar/menu.html>). Hemoglobin varyantı oluşturan delta globin geni değişiklikleri sayısı 79 olarak bilinmektedir. Kırk üç değişiklik globin sentezinde azalmaya yol açarak talasemiye neden olur. Beş değişiklik ise hem globin varyantı oluşmasına hem de talasemiye neden olmaktadır. Bu 5 değişiklik HbVar veritabanında HbA₂-Yialousa, HbA₂-Wrens, Hb Lepore-Hollandia, Hb Lepore-Baltimore, Hb Lepore-Boston-Washington olarak belirtilmektedir [73]. *HBD* geni varyantları beta globin geni ya da alfa globin geni mutasyonları ile birliktelik gösterebilir [74, 75].

Bazı delta globin değişikliklerinin oluşturduğu hemoglobin varyantları HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)'de saptanabilir (Şekil 2.12). Bunlar gibi HbA₂ pikinin önünde ya da arkasında görünebilen varyantlar olduğu gibi, HPLC analizinde görünür varyant pik oluşturmeyen hemoglobin varyantları da bulunmaktadır [8, 76].

Her ne kadar delta globin geni (*HBD* MIM # 142000) mutasyonları klinik bir etkiye sahip değilse de delta ve beta talasemi taşıyıcılığını, *cis* ya da *trans* pozisyonda, birlikte bulunduran bireylerde yanlış tanıya neden olabilir. Çünkü HbA₂ seviyesi, düşük

delta zinciri üretimi nedeniyle normal veya düşük saptanır (< %2). [77, 78]. Bu nedenle, talasemi önleme programını uygulayan ülkelerde, talasemi taşıyıcılarının görülme sıklığının yüksek olması nedeniyle, delta globin allellerinin saptanması önemlidir [9, 79, 80]. Düşük MCV değeri ve normal HbA₂ değerine sahip bireylerde, özellikle eşinde beta talasemi taşıyıcılığı tespit edilmişse, demir eksikliği ve alfa talasemi taşıyıcılığının araştırılması yanında delta globin varyantlarının da göz önünde bulundurulması önerilmektedir [11]. Etkilenmiş çocuk sahibi olma riski taşıyan bireylerde, tarama sonrası yanlış negatif sonuçla karşılaşmamak için delta globin gen değişiklikleri ortaya konmalıdır [10].



Şekil 2.12: Hemoglobin varyantı oluşturan *HBD* değişikliği taşıyan bir bireyde HPLC örneği [77]

Beta talaseminin yaygın olduğu bölgelerde ve birden fazla etnik kökene sahip popülasyonlarda delta gen mutasyonları nadir değildir [81]. Örneğin delta globin geni varyantı taşıyıcı frekansı Kıbrıs Rum nüfusunda % 1,26 olarak bulunmuştur ve HbA₂ düzeyi %1,7 ve altında ise *HBD* varyantı taşıma ihtimalinin yaklaşık olarak %90 olduğu belirtilmektedir [82]. Sicilya’da ise delta globin gen varyantı taşıma oranı % 2,5, Güney Çin’de %0,4 olarak saptanmıştır [11, 83]. Umman Sultanlığı’nda yapılan bir çalışmaya göre, HbA₂ değeri düşük (< %2,3) olan bireylerde bu oran %51,3 olarak bulunmuştur [74]. Türkiye’deki kesin insidans bilinmemektedir.

Delta globin gen değişiklikleri günümüze kadar ağırlıklı olarak Akdeniz ülkelerinde tariflenmiştir. HbA₂-Yialousa (c.82G>T) Sardunya, Kıbrıs ve Yunanistan’da en sık saptanan değişikliktir [78].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 OLGU SEÇİMİ

Bu çalışma 2015-2017 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na alfa talasemi veya beta talasemi mutasyon analizi için başvurmuş, talasemi taşıyıcılığı ön tanısı alan hastalar ile yapıldı. Çalışmaya, HPLC sonucuna göre HbA₂ seviyesi %2 ve altında, MCV değeri 80 fL'nin ve MCH değeri 27 pg'nin altında olan veya HbA₂ fraksiyonunda ikinci pik bulunan, 2 yaşın üstünde olan 50 olgu alındı. HbA₂ seviyesi %2 ve altında, MCV değeri 80 fL'nin ve MCH değeri 27 pg'nin altında olan olgu sayısı 40 (Grup 1), HbA₂ fraksiyonunda ikinci pik olan olgu sayısı 10'du (Grup 2).

Hastalar muayene edilerek ve medikal kayıtları taranarak elde edilen bilgiler, standart bir forma kaydedildi. Bu formlar hastaların fizik muayene bulguları, laboratuvar bulguları, özgeçmiş bilgilerini içermekteydi.

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Genel Müdürlüğü tarafından desteklenen çalışmanın Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma Etik Kurulu onayı (Karar no: 16-11/6) alındı. Çalışmaya dahil edilen tüm olgulara ve 18 yaş altında olan olguların ebeveynlerine çalışma hakkında bilgi verilerek gönüllü olur formu imzalatıldıktan sonra hasta grubundan 2 ml EDTA'lı tüpe kan örnekleri alındı. Örnekler, örnek toplama işlemi sonlanıncaya kadar -20°C derecede saklandı. Toplanan örneklerden delta globin varyasyonlarından sorumlu olan *HBD* geninde dizi analizi yapıldı.

Çalışmaya alınma kriterleri	Çalışmaya alınmama kriterleri
<ol style="list-style-type: none"> 1. HPLC sonucuna göre HbA₂ seviyesinin %2 ve altında olan, 2. Tam kan sayımında MCV değeri 80 fL ve MCH değeri 27 pg'nin altında olan, 3. HbA₂ ve diğer hematolojik parametrelerden bağımsız olarak HPLC sonucuna göre HbA₂ frekansında ikinci pik tespit edilen, 4. 2 yaşın üstünde olan, 5. Çalışmaya katılmayı kabul eden, hastalar çalışmaya dahil edilmişlerdir. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. HbA₂ seviyesi %2'den yüksek olan, 2. Tam kan sayımında MCV değeri 80 fL ve üstünde ile MCH değeri 27 pg ve üstünde olan, 3. HbA₂ değeri %2 veya altında olup, tanımlı anormal yapısal hemoglobin varyantına sahip, 4. 2 yaş altında olan, 5. Çalışmaya katılmayı kabul etmeyen hastalar çalışmaya dahil edilmemişlerdir.

Tablo 3.1: Çalışmaya alınma ve alınmama kriterleri

3.2 OLGULARDA MOLEKÜLER GENETİK ÇALIŞMA

Örnek toplama işlemi tamamlandıktan sonra DNA izolasyon işlemine geçildi. DNA izolasyonunu takiben uygun primerler yardımıyla aranan bölgelerin PCR amplifikasyonları yapıldı. Amplifiye edilen ürünler ABI PRISM[®] 3100 genetik analizör (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) cihazıyla dizi analizine tabi tutularak incelendi. DNA izolasyonu, PCR amplifikasyonu ve dizi analizi basamakları aşağıda açıklandığı gibi yapıldı.

3.2.1 ÖRNEKLERİN TOPLANMASI VE DNA İZOLASYONU

Olgulardan EDTA'lı tüpe 2ml venöz kan örneği alındı. Kan lenfosit hücrelerinden protokole uygun olarak, aşağıda yazılı adımlar izlenerek QIAcube

AllPrep DNA/RNA FFPE kit (Product No:80234; QIAGEN, Germany) kiti kullanılarak QIAcube Robotik DNA izolasyon cihazı ile DNA izolasyonu yapıldı.

1. 200 µl kan örnek kartuşu içine aktarıldı.
2. Örnek QIAcube Robotik DNA İzolasyon Cihazındaki örnek kartuşu bölgesine yerleştirildi.
3. Kaç adet DNA izolasyonu yapılacağına bağlı olarak diğer süspansiyonlardan ne kadar ekleneceği sistem tarafından belirlenerek tavsiye edilen miktarda Magnetic Glass Particles (MGPs) Süspansiyonu, Proteinaz K, Elution Buffer, Wash Buffer 1 ve Wash Buffer 2 solüsyonları programda gösterildiği gibi uygun reagent kartuşlarına yüklenerek uygun yerlere yerleştirildi.
4. Örnekler ve kullanılan diğer kimyasallar yerleştirildikten sonra sistemin kullanacağı steril pipet uçları programda belirtilen yerine yerleştirildi.
5. Program çalıştırıldı. Tüm işlemler cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirildi.
6. Elde edilen 100 µl DNA'lar DNA saklama kutularına konularak -20° C ' de saklandı.

3.2.2 GENOMİK DNA'LARIN SPEKTROFOTOMETRİK ÖLÇÜMLERİ

İzolasyon sonrası her örnekten 100 mikrolitre, NanoDrop (2000c, Thermo Scientific) ile ölçüldüğünde ortalama konsantrasyonları 30 ng/µl, saflıkları (A260/280 değeri) ortalama 1,8'in üzerinde olan DNA'lar elde edilerek çalışmaya alındı.

3.2.3 REAKSİYON KARIŞIMLARININ HAZIRLANMASI VE PCR AMPLİFİKASYONU

Liyofilize durumdaki primerlere kullanma talimatında belirtilen miktarda ddH₂O eklenerek, 100 pikomol (pmol) / mikrolitrelik (µl) stok çözeltiler hazırlandı. PCR işleminde kullanılmak üzere stoktan 10 pmol / µl konsantrasyonlu 100 µl'lik sulandırılmış primerler hazırlandı. Elde edilen DNA'lardan çalışılan gen bölgeleri PCR yöntemi ile uygun primerler (Tablo 3.2) kullanılarak çoğaltıldı. PCR işlemi için

kullandığımız malzemeler ise; PCR Master Mix (Thermo Scientific 0.05 U/ μ L), ddH₂O, DMSO (dimetil sülfoksit), MgCl₂, dNTP, Taq polimeraz, örnek DNA'sı ve varyasyonun olduğu bölgeyi çoğaltan primerlerdir.

Primer	Dizi	Bağlanma Derecesi (°C)
HBD_5' delta amp	CAGGGCAAGTTAAGGGAATAGTGG	64,1
HBD_3'delta amp	CAGGCAAAGGAAGGAGGAAGAA	60,0
HBD_F1	TTCTCACAACTAATGAAACCCT	57,0
HBD_F2	ACTGCTGTCAATGCCCTGTG	62,3
HBD_F3	ATGCTGATGGGAATAACCTG	57,5
HBD_R1	ATCTGTAGAGCCTCAGGAAC	53,5
HBD_R2	GGA GAA GAG CAG GTA GGT	51,6

Tablo 3.2: *HBD* geni dizi analizi için kullanılan primerler

PCR reaksiyonu için örnek sayısına göre PCR Master Mix (Thermo Scientific 0.05 U/ μ L), ddH₂O, DMSO (dimetil sülfoksit), MgCl₂, dNTP, Taq polimeraz (Tablo 3.3) karışımı hazırlandı. Her bir örnek için 0,2 ml'lik PCR tüplerine dağıtılarak, üzerlerine hastaya ait DNA örneklerinden 4 μ l eklendi. ABI 2720 termal cycler ile uygun programlarda (Tablo 3.4) tüm genin amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Master Mix	12,5 μ l
ddH ₂ O	2,5 μ l
HBD_5' delta amp	1,5 μ l
HBD_3'delta amp	1,5 μ l
DMSO	2,5 μ l
MgCl ₂	1 μ l
dNTP	0,5 μ l
Taq polimeraz	0,5 μ l
DNA	4 μ l
Toplam	26,5 μ l

Tablo 3.3: Amplifikasyon için PCR karışımı hazırlanışı

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	94	2'	
Denatürasyon	94	10''	11
Bağlanma	54	15''	
Uzama	68	2'30''	
Denatürasyon	94	15''	21
Bağlanma	54	30''	
Uzama	68	2'30+20''	
Son Uzama	78	7	
Bekleme	4	∞	

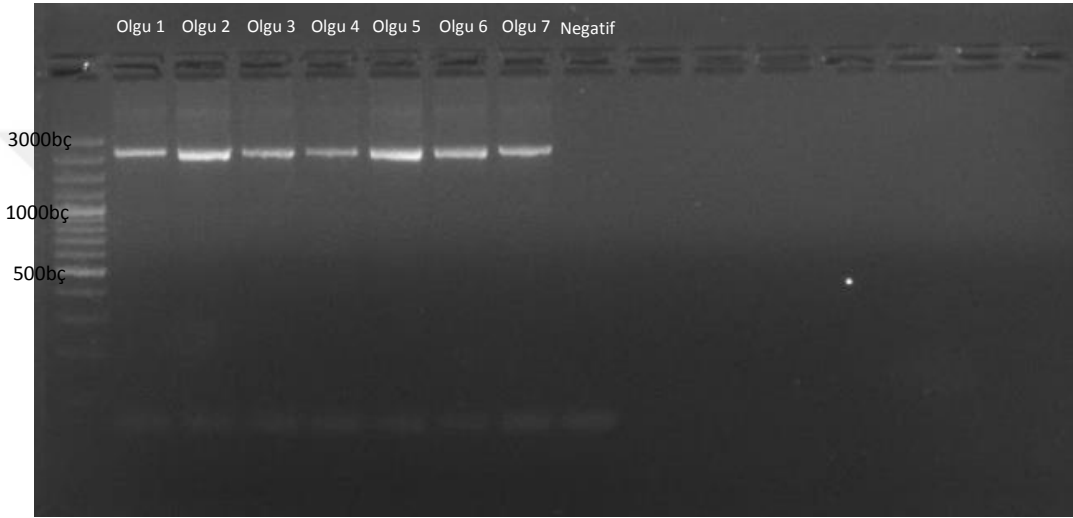
Tablo 3.4: Amplifikasyon için PCR koşulları

3.2.4 AMPLİFİYE EDİLEN BÖLGENİN DEĞERLENDİRİLMESİ

HBD geninin 5' UTR (*untranslated region* - kodlanmayan bölge) ve 3' UTR kısımlarının da dahil olduğu 2164 bp (baz çifti) boyutundaki tüm geni kapsayan PCR ürünlerinin amplifiye olup olmadığını anlamak için örneklerin yürütüleceği % 2'lik agaroz jel hazırlandı. Agaroz jelin hazırlanmasında 0,5X TBE tamponu kullanıldı. Jelde yürütülen örnekler kontrol PCR ürününe göre değerlendirildi ve uygun amplifikasyon bandı görülen örnekler pürifiye edildi. Amplifiye ürünün agaroz jelde yürütme prensibi aşağıda özetlenmiştir:

1. 100 ml'lik erlen içine, 2 gr agaroz ve 100 ml 0.5X TBE konulup mikrodalga fırında ısıtılarak agarozun çözülmesi sağlandı.
2. Çözelti berrak bir görünüm alınca, üzerine 16 µl etidyum bromür eklenerek karıştırıldı.
3. Ürünlerin yükleneceği kuyucukları oluşturmak için içine uygun tarak yerleştirilmiş jel kabına döküldü.
4. Donması için oda sıcaklığında yaklaşık 30 dakika bekletildi.
5. Jel donduktan sonra taraklar dikkatlice çıkarıldı ve jel, elektroforez tankına yerleştirildi.
6. Elektroforez tankına jelin üst kısmını da içine alacak şekilde 0,5X TBE tamponu dolduruldu.
7. Parafilm üzerinde 5 µl Orange G ve 5 µl PCR ürünleri karıştırıldı.

8. Jeldeki kuyucuklara yüklendi. Amplifiye olan ürünlerin uzunluklarını değerlendirmek için örneklerin başı ve sonundaki kuyucuklara DNA ladder yüklendi.
9. Örnekler 140 Volt akımda 30 dakika yürütüldükten sonra jel görüntüleme sistemi ile görüntüleri alındı (Şekil 3.1).
10. Uygun bant görünen ürünler ile çalışmaya devam edildi. Görünmeyen ürünler için yeniden PCR yapıldı.



Şekil 3.1: Yedi olgu DNA'sının amplifiye edilmiş *HBD* geni (2164bç) PCR ürünü jel görüntüsü

3.2.5 PCR ÜRÜNLERİNİN BİRİNCİ PÜRİFİKASYON İŞLEMİ

Amplifiye olmuş ürünlere fazla PCR ürünlerinin ayrıştırılması için Fermentas Gene Jet PCR Purification Kit (*Product No: K0701; Fermentas, USA*) kiti ile aşağıdaki basamaklar izlenerek pürifikasyon işlemi yapıldı.

1. 1,5 ml'lik eppendorf ve mor renkli filtreli tüpler numaralandırıldı.
2. PCR ürününün üzerine 20 µl binding buffer eklendi.
3. Bu işlem sonrasında PCR ürününün renginin sarıya dönmesi beklenmektedir. Rengi sarıya dönmeyen ürünlere 10 µl 3M Sodyum Asetat eklendi.

4. PCR ürününün üzerine 20 µl İzopropanol eklendi.
5. Pipet ile karıştırıldıktan sonra önceden hazırlanmış filtreleri içerisine yerleştirilmiş receiver tüplere aktarıldı.
6. 13.000 rpm de 30 saniye santrifüj edildi.
7. Örneğin üzerine 700 µl Wash Buffer eklendi.
8. 13.000 rpm de 30 saniye santrifüj edildi.
9. Receiver tüplerinin altı boşaltıldı.
10. Filtreler tüplere tekrar konuldu ve 13.000 rpm de 1 dakika kuru santrifüj yapıldı.
11. Filtreler 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine alındı.
12. Üzerine 50 µl Elution Buffer eklendi.
13. 13.000 rpm de 1 dakika santrifüj edildi ve sonrasında filtreler atıldı.
14. Tüplerde kalan örnekler Cycle Sequencing işlemine kadar 4 °C'de saklandı.

3.2.6 PÜRİFİKASYON ÜRÜNLERİNİN CYCLE SEQUENCİNG İŞLEMİ

Pürifiye edilen PCR ürünleri dideoksi veya zincir sonlanma metodu denilen yöntemle dizi analizi yapılmak üzere cycle sequencing işlemine tabi tutuldu. ABI Prism V3.1 Big-Dye Terminator Kiti (Applied Biosystems,USA), 5X Buffer (Applied Biosystems,USA), sekans primerleri ve distile su ile hazırlanan karışıma, pürifiye edilmiş ürünler eklenerek (Tablo 3.5) vortekslendi ve uygun PCR programında (Tablo 3.6) cycle sequencing yapıldı. Sekans PCR hazırlama protokolü her bir primer için ayrı ayrı hazırlandı.

	Miktar
dd H2O	10.5 µl
5X Buffer	4 µl
Big Dye	2 µl
Primer	0.5 µl
Ürün	3 µl
TOPLAM	20 µl

Tablo 3.5: Cycle Sequencing İçin Hazırlanan Karışım

	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Denatürasyon	96	10''	25
Bağlanma	50	5''	
Uzama	60	4'	
Bekleme	4	∞	

Tablo 3.6: Cycle Sequencing İçin PCR Koşulları

Bu işlemin ardından ikinci pürifikasyon işlemi yapıldı.

3.2.7 ÜRÜNLERİN İKİNCİ PÜRİFİKASYON İŞLEMLERİ

Cycle sequencing ürünlerine, içerisindeki florasan işaretli ddNTP'leri ve diğer PCR bileşenlerini ortamdan uzaklaştırmak için ticari bir pürifikasyon kiti olan Zymo Research DNA Sequencing Clean-Up Kiti (Product No: D4050; Zymo, USA) ile aşağıdaki basamaklar uygulanarak pürifikasyon işlemi yapıldı.

1. 1,5 ml'lik eppendorf ve siyah renkli kapaksız filtreli tüpler numaralandırıldı.
2. PCR cihazından çıkarılan örneklerin üzerine 240 µl Binding buffer eklendi.
3. Pipet ile karıştırıldıktan sonra filtreleri içerisine yerleştirilmiş receiver tüplerin içerisine örnekler aktarıldı.
4. 13.000 rpmde 30 saniye santrifüj edildi.
5. Örneğin üzerine 300 µl Wash buffer eklendi.
6. 13.000 rpm de 30 saniye santrifüj edildi.

7. Filtreler receiver tüplerden alınarak 1,5 ml eppendorf tüplerine yerleştirildi.
8. 20 µl formalin karışımı eklendi.
9. 13.000 rpm de 30 saniye santrifüj edildi.
10. Santrifüj sonrası filtreler atıldı.
11. Tüplerde kalan örnekler sekans cihazında yürütmek üzere platalere yüklendi.

Formalin karışımı, Formamid/su oranı ¼ olacak şekilde hazırlandı.

3.2.8 ÖRNEKLERİN SEKANS CİHAZINA YÜKLENMESİ

Pürifiye edilmiş sekans ürünü, dizi analizi yapmak için uygun platalere aktarıldı. Platalere yüklenen örnekler, 94°C'de 2 dakika süreyle denatüre edilip buzda bekletildikten sonra dizi analizi (ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, USA) cihazına yüklendi. Örnekler CLC Genomics Workbench programında, <http://www.ensembl.org/index.html> sitesindeki *HBD* geni dizilimi referans alınarak değerlendirildi.

3.2.9 SAPTANAN VARYANTLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

Çalışmada bulunan varyasyonlar değerlendirilirken HGMG, HbVar, Exac Browser, 1000 Genomes, Pubmed veritabanları ve HOPE protein modelleme programlarından faydalanıldı. Varyasyonların patojenitesi *in silico* analizler kullanılarak değerlendirildi. Nonsinonim varyasyonlar PolyPhen2, SIFT ve Mutation Taster, intronik ve splice site bölge varyasyonları Mutation Taster programlarıyla değerlendirildi. Yeni bulunan yapısal hemoglobin varyantı HOPE protrin modelleme programı ile değerlendirildi. Bulunan varyantlar ACMG (*The American College of Medical Genetics and Genomics*) kriterlerine göre isimlendirildi [84, 85].

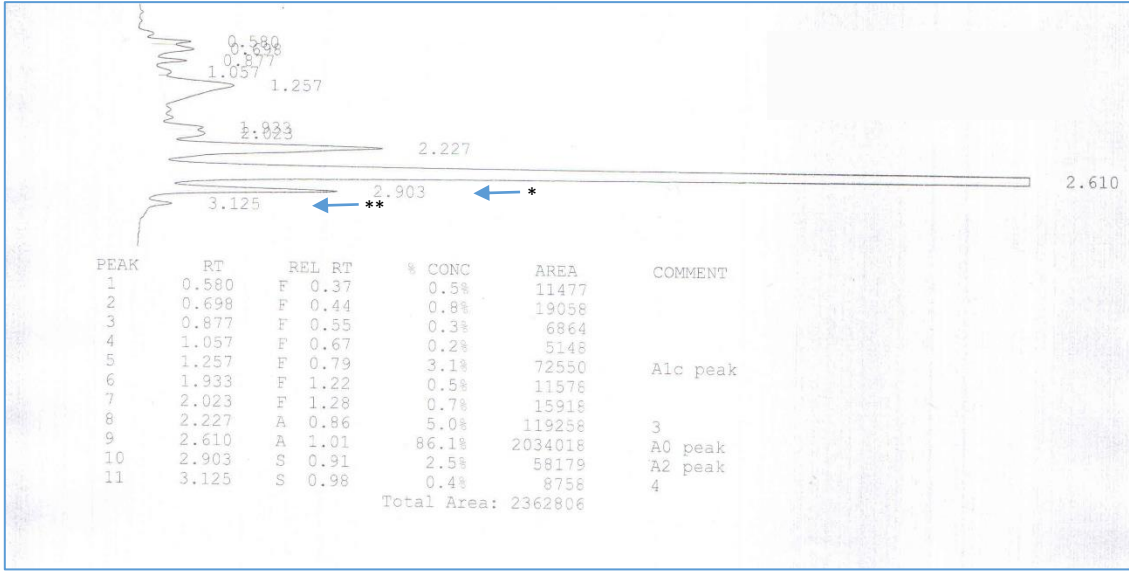
4. BULGULAR

Çalışmaya alınan HbA₂ değeri %2 ve altında, MCV değeri 80 fL'nin ve MCH değeri 27 pg'nin altında olan 40 olgu (Grup 1), HbA₂ fraksiyonunda ikinci pik olan 10 olgu (Grup 2) olmak üzere toplam 50 olgunun 20'si (%40) erkek, 30'u (%60) kadındı. Bunlardan HbA₂ değeri %2'nin, MCV değeri 80 fL'nin ve MCH değeri 27 pg'nin altında olan olguların 26'sı kadın, 14'ü erkekti. HbA₂ fraksiyonunda ikinci pik olan olguların 4'ü (%8) kadın, 6'sı (%12) erkekti (Tablo 4.1). Olguların birbirleriyle akrabalıkları yoktu.

<u>Cinsiyet</u>	<u>Sayı</u>		<u>Toplam</u> <u>(%)</u>
	<u>Grup 1</u> (HbA ₂ 'si %2 ve altında, MCV değeri 80 fL'nin ve MCH değeri 27 pg'nin altında olan olgular)	<u>Grup 2</u> (HbA ₂ fraksiyonunda ikinci pik olan olgular)	
Kadın	26	4	60
Erkek	14	6	40
Toplam	40	10	100

Tablo 4.1: Çalışmaya alınan olguların cinsiyet dağılımı

Çalışmaya katılan olguların yaşları 2-80 yaş arasındaydı. Grup 1'de yaş dağılımı ortalama 28,95±19,05, Grup 2'de yaş dağılımı 20,20±15,60 olarak saptandı (Tablo 4.4). Grup 1 ve Grup 2'nin hematolojik parametreleri sırasıyla Tablo 4.2 ve Tablo 4.3'te sunulmuştur. Grup 2'ye ait 3 olgu (Olgu 10, 12, 17) normokromik ve normositerdi. Varyant hemoglobin araştırmak için seçilen Grup 2'ye ait olgulardan Olgu 10'nun HPLC analizi görüntüsü Şekil 4.1'de verilmiştir.



Şekil 4.1: HbA₂ fraksiyonunda ikinci piki olan Olgu 10'nun HPLC analizi görüntüsü

(*: HbA₂ piki, **: HbA₂ ikinci piki)

OLGU NO	YAŞ	CİNSİYET	HbA ₂ (%)	HbF(%)	RBC (3,9-5,7 10 ⁶ /µL)	Hb (11,7-16 g/dL)	RDW (% 11,5 - 14,5)	MCHC (31-37 g/dL)	MCV (81-101 fL)	MCH (25-34 pg)	FE (9-158 µg/dL)	TDBK (228-428 µg/dL)	FERRITIN (30-400 ng/mL)	HbA Mutasyon Analizi	HbB Mutasyon Analizi
1	80	E	2	0,5	4,43	7,9	29	31,6	53,8	18,7	390	417	513	Het -3.7 single gene del	N
2	25	E	1,4	0,3	6,27	9,8	18,3	29,5	53	15,6	34	443	8,93	-	N
3	44	K	1,6	0,3	5,14	11,8	15	30,7	60,9	17,5	39	389	40	-	N
4	39	K	1,6	0,8	5,31	12,2	14,7	30,9	64	18,2	47	488	8,75	-	N
5	44	K	1,5	0,2	4,64	8,77	15,7	18,9	59,5	18,9	21	419	5,22	-	N
6	35	K	1,7	0,2	5,59	10,8	15,7	30,8	62,8	19,3	87	260	2,5	Het -20.5 double gene del	N
7	32	K	1,5	0,2	4,61	10,6	15,9	30,06	70,5	21,8	17	406	4,81	N	-
8	28	K	1,1	0,8	5,5	9,1	20,4	28,3	56,3	16,5	19	370	5,42	Het -20.5 double gene del	-
19	29	K	1,9	0,2	5,18	12	14,3	32,4	75,1	24,3	-	-	-	N	-
20	5	K	1,6	0,8	5,19	8,4	23	26,8	60	16,2	12	432	2,5	N	-
21	80	E	1,8	0,2	4,59	10,5	25,1	22,9	76	24,7	21	329	39,68	N	-
22	3	K	1,9	0	4,81	11,7	14	33,7	72,3	24,3	11	456	14	N	-
23	34	E	1,8	0,2	5,91	15,5	13	33,5	78,3	26,2	-	-	-	Het -3.7 single gene del	-
24	34	K	1,7	0	4,5	11,2	16,4	32,1	78,7	25,2	-	-	-	N	-
25	6	E	1,2	0,2	5	11,4	13,7	32,5	71	24	100	300	40	Het -3.7 single gene del	N
26	29	K	2	0,2	5,07	11,4	19,3	31,2	71,5	22,4	36	376	52	Het -3.7 single gene del	-
27	14	E	1,5	0,3	4,9	10,5	22,2	32	74,3	23,2	12	462	4	N	-
28	30	K	1,8	0,2	4,67	12,1	14,5	25,9	77,7	25,9	22	404	11,6	N	N
29	29	E	1,9	0	6,39	13,4	16,1	33,2	63,1	21	123	328	48,3	Het -20.5 double gene del	N
30	10	K	1,6	0	4,79	10,6	11,6	32,3	62,7	18,9	15,7	401	44,63	-	N

Tablo 4.2: HbA₂'si %2 ve altında, MCV değeri 80 fL'nin ve MCH değeri 27 pg'nin altında olan olguların (Grup 1) yaş, cinsiyet, hematolojik parametreleri, demir parametreleri ve bilinen alfa-beta mutasyon analizi sonuçları (E: Erkek, K: Kadın, N: Normal, -: analiz edilmedi)

OLGU NO	YAŞ	CİNSİYET	HbA ₂ (%)	HbF (%)	RBC (3,9-5,7 10 ⁶ /µL)	Hb (11,7-16 g/dL)	RDW (% 11,5 - 14,5)	MCHC (31-37 g/dL)	MCV (81-101 fL)	MCH (25-34 pg)	FE (59-158 µg/dL)	TDBK (228-428 µg/dL)	FERRITİN (30-400 ng/mL)	HBA Mutasyon Analizi	HBB Mutasyon Analizi
31	26	E	2	0,2	6,26	12,8	15,3	30,5	67,1	20,4	81	349	109,9	-	N
32	36	K	1,9	0,7	4,67	9,6	22,1	31,4	66,1	20,8	10	408	5,55	N	-
33	29	E	1,5	0,2	4,73	9,97	17,3	31,5	69,2	21,8	32	434	11	N	-
34	55	E	1,5	1,5	5,83	14,25	16	28,6	85,3	22,4	-	-	-	Het -20,5 double gene del	-
35	2	E	1	0,6	5,27	8,6	17,1	31,5	55	15	38	436	42	N	N
36	8	K	2	0	6	14,2	17,8	31,8	74,2	23,6	-	-	-	Het - 3,7 single gene del	-
37	39	K	1,8	2	4,91	12,1	14,8	33,4	79,1	26	57	263	905	Het alfa2 IVS 1 -5nt	-
38	29	K	1,6	0,2	5,1	9,8	27,2	30,2	68,9	22,5	-	-	-	N	-
39	6	K	1,7	0	5,18	9,7	17,4	32	57,3	17,2	-	-	-	Het -20,5 double gene del	-
40	5	E	1,4	0	5,35	12,3	15,9	32	69	20	53	275	52	Het - 3,7 single gene del	-
41	28	K	2	0,2	5,03	11	16,5	31,2	70,2	21,9	46	399	60	Het alfa2 IVS 1 -5nt	-
42	5	E	1,6	0	5,19	12,7	16,7	33,3	73,4	24,4	43	297	65	N	N
43	42	K	1,8	0,2	6,21	12,5	14,6	31,2	64,6	20,2	-	-	-	Het α2 poly A-2 [AATAAA>AATGAA]	N
44	31	K	1,9	0,2	5,08	12,8	13	33,2	78,9	26,2	-	-	-	Het - 3,7 single gene del	-
45	45	K	1,9	0	6,3	10,8	15,7	29,5	68,8	20,3	-	-	-	Het -MED double gene del	-
46	52	K	1,9	0,2	4,69	12,6	14	34	79,1	26,9	-	-	-	Het - 3,7 single gene del	-
47	45	K	1,6	0,8	4,95	13,4	20,3	34,7	78,4	27	73	373	22	-	-
48	2	K	1,9	0,5	5,5	10,2	15,9	30,6	60,6	18,5	-	-	-	Het -MED double gene del	N
49	12	K	1,6	0	5,3	11,1	16,5	31,8	65,7	20,9	92	343	24,8	Het c.328delC (p.2110WfsX24)	-
50	31	E	1,5	0	6,42	12,9	16	30,6	65,7	20,1	106	323	21,5	Het -MED double gene del	-

Tablo 4.2(devamı): HbA₂'si %2 ve altında, MCV değeri 80 fL'nin ve MCH değeri 27 pg'nin altında olan olguların (Grup 1) yaş, cinsiyet, hematolojik parametreleri, demir parametreleri ve bilinen alfa-beta mutasyon analizi sonuçları (E: Erkek, K: Kadın, N: Normal, -: analiz edilmedi)

OLGU NO	YAŞ	CİNSİYET	HbA2 (%)	HbF(%)	RBC (3,9-5,7 10 ⁶ /µL)	Hb (11,7-16 g/dL)	RDW (% 11,5 - 14,5)	MCHC (31-37 g/dL)	MCV (81-101 fL)	MCH (25-34 pg)	FE (59-158 µg/dL)	TDBK (228-428 µg/dL)	FERRİTİN (30-400 ng/mL)	HbA Mutasyon Analizi	HbB Mutasyon Analizi
9	3	K	1,8	1	5,68	9,62	13,06	28,42	59,63	16,94	109	277	60	-	-
10	24	E	2,5	0,5	4,59	15,4	14,4	32,2	100	33	80	238	60	-	-
11	3	K	1,7	2,8	5,46	10,5	11,6	29,7	64,8	19,2	50	387	11,6	-	-
12	51	E	2,2	0,2	5,23	17,6	13,7	35,1	96	37,7	132	299	642	-	N
13	11	E	2,2	0,3	4,44	9,8	19,6	33,2	71,3	23,7	32	266	78,61	-	-
14	31	K	1,5	1,7	5,17	10	21,2	32,4	78,3	24,9	58	287	24	Het - 3,7 single gene del	-
15	19	E	1,9	0,2	5,52	9,12	16,7	29,5	61,7	18,2	55	394	19	-	-
16	29	E	4,5	0,4	6,05	11,6	18,2	31,2	61,5	19,2	-	-	-	-	-
17	28	E	1,2	0,3	3,79	10,3	16,6	29,9	90,9	27,2	127	286	401	-	-
18	3	K	1,8	0,8	4,6	10,6	12	32	68	20	-	-	-	N	N

Tablo 4.3 HbA₂ fraksiyonunda ikinci pik olan olguların (Grup 2) yaş, cinsiyet, hematolojik parametreleri, demir parametreleri ve bilinen alfa-beta mutasyon analizi sonuçları (E: Erkek, K: Kadın, N: Normal, -: analiz edilmedi)

Çalışmaya katılan Grup 1 ve Grup 2 olgularının hematolojik parametrelerinin minimum, maksimum, ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 4.4'te verilmiştir.

		Sayı	Ort. ± SS	Min.	Max.
Yaş	Grup 1	40	28,95±19,05	2	80
	Grup 2	10	20,20±15,60	3	51
HbA₂	Grup 1	40	1,68±0,24	1,1	2
	Grup 2	10	2,13±0,91	1,2	4,5
HbF	Grup 1	40	0,32±0,41	0	2
	Grup 2	10	0,82±0,83	0,2	2,8
RBC	Grup 1	40	5,24±0,57	4,43	6,42
	Grup 2	10	4,59±1,74	3,79	6,05
Hb	Grup 1	40	11,31±1,72	7,9	15,5
	Grup 2	10	10,63±4,62	9,2	17,6
RDW	Grup 1	40	17,22±3,79	11,6	29
	Grup 2	10	19,00±16,10	11,6	21,2
MCHC	Grup 1	40	30,80±2,96	18,9	37,7
	Grup 2	10	28,1±10,09	28,42	35,1
MCV	Grup 1	40	68,45±8,11	53	85,3
	Grup 2	10	68,41±28,30	59,63	100
MCH	Grup 1	40	21,47±3,31	15	27
	Grup 2	10	22,00±10,24	17,2	37,7

Tablo 4.4: Olguların hematolojik parametrelerinin ortalama, standart sapma, minimum ve maksimum değerleri

Olguların 21'inde (%42) alfa talasemi mutasyon taşıyıcılığı saptanmıştır. On dört (%28) olgunun da alfa talasemi mutasyon analizi normal bulunmuştur. Olgulardan 17'sinin (%34) beta talasemi mutasyon analizi yapılmış ve normal bulunmuştur. On (%20) olgunun hem beta hem de alfa talasemi mutasyon analizi yapılmıştır (Olgu 1, 6, 18, 25, 28, 29, 35, 42, 43, 48). Sekiz (%16) olgunun ise alfa ve beta talasemi mutasyon analizi yapılmamıştır (Tablo 4.2, Tablo 4.3).

Olguların %72'sinde (36) demir parametrelerine bakılmıştır. On sekiz (%36) olgunun demir, total demir bağlama kapasitesi ve ferritin değerleri demir eksikliği ile uyumlu saptanmış, 18 (%36) olguda demir eksikliği saptanmamıştır. Alfa talasemi mutasyon analizi sonucu normal olan 14 olgunun 10 tanesinin demir parametreleri bakılmıştır ve bunlardan 7 tanesinin değerleri demir eksikliği ile uyumlu bulunmuştur. Alfa talasemi mutasyon taşıyıcısı olan 12 olgunun demir parametrelerine bakılmıştır ve bunlardan 5 olgunun değerleri demir eksikliği ile uyumlu bulunmuştur. Yedi olgunun ise demir parametreleri normal saptanmıştır. Beta talasemi mutasyon analizi normal olan 17 olgunun 14 tanesinin demir parametrelerine bakılmıştır ve bunlardan 5 olgunun demir değerleri demir eksikliği ile uyumlu bulunmuştur (Tablo 4.2, Tablo4.3).

Çalışmamızda 50 olguya yapılan *HBD* geni dizi analizi sonucunda Grup 1'e ait iki hastada (Olgu 1 ve 25) daha önce tanımlanmış iki farklı delta talasemi mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyonlar c.-115 A>G ve c.14 C>T olup sırasıyla 5'UTR bölgesi ve ekzon 1'de yer almaktadırlar [71, 86]. Grup 1'de bulunan bir hastada (Olgu 35) daha önce tanımlanmamış, benign olduğu düşünülen yeni bir varyant hemoglobin oluşturan *HBD* geni c.350 G>C (p.Arg117Pro) varyantı saptanmıştır. Ekzon 3'te yer alan bu varyasyona HbA₂-Bornova ismi verilmesi düşünülmüştür. c.14 C>T varyasyonu saptanan olguda (Olgu 25) biri ekzon 2, diğeri intron 2'de olmak üzere iki farklı tanımlanmış varyasyon (c.294 C>T, c.316-174_316-173delAT) bulunmuştur. Ayrıca Grup 1'de bulunan 3 olgu (Olgu 31, 39, 44), Grup 2'de bulunan 2 olgu (Olgu 10 ve 14,) olmak üzere toplam 5 olguda iki farklı polimorfizm (c.-172 A>T, c.315+429 T>C) saptanmıştır. Bu iki polimorfizmden biri 5'UTR bölgesinde diğeri ise intron 2'de bulunmaktadır. Bu değişiklikler Tablo 4.5'te gösterilmiştir.

Olgu No	Varyasyon	Bölge	rs Numarası	Varyasyonun tanımlı olup olmadığı
1	Het c.-115 A>G	5'UTR	rs35781729	Tanımlı
10	Het c.315+429 T>C	İntron 2	rs111671911	Tanımlı
14	Het c.315+429 T>C	İntron 2	rs111671911	Tanımlı
25	Het c.14 C>T (p.Thr4Ile)	Ekzon 1	rs35406175	Tanımlı
	Het c.294 C>T (p.His98His)	Ekzon 2	rs61746501	Tanımlı
	Het c.316-174_316-173delAT	İntron 2	rs113846417	Tanımlı
31	Het c.315+429 T>C	İntron 2	rs111671911	Tanımlı
35	Het c.350 G>C (p.Arg117Pro)	Ekzon 3	-	Bu çalışmada tanımlanmıştır
39	Het c.-172 A>T	5'UTR	-	Bu çalışmada tanımlanmıştır
44	Het c.-172 A>T	5'UTR	-	Bu çalışmada tanımlanmıştır

Tablo 4.5: *HBD* analizi sonucu saptanan değişiklikler

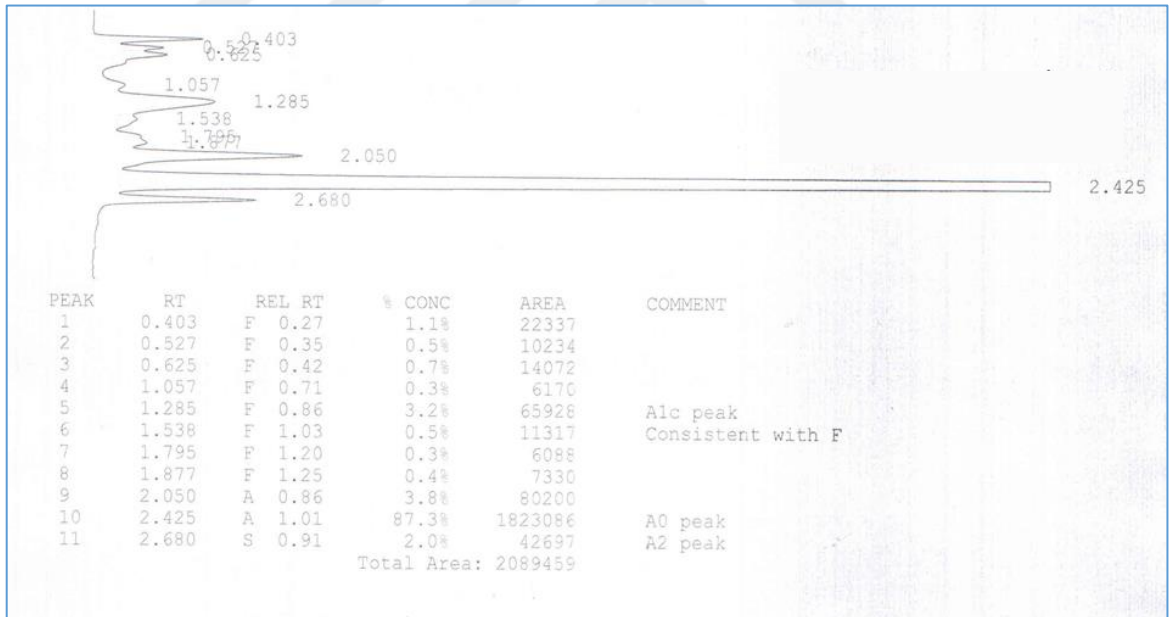
OLGU NO	YAŞ	CİNS	HbA2 (%)	HbF(%)	RBC (3,9-5,7 10 ⁶ /µL)	Hb (11,7-16 g/dL)	RDW (% 11,5 - 14,5)	MCHC (31-37 g/dL)	MCV (81-101 fL)	MCH (25-34 pg)	FE (59-158 µg/dL)	TDBK (228-428 µg/dL)	FERRİTİN (30-400 ng/mL)	HBA MUTASYON ANALİZİ	HBB MUTASYON ANALİZİ	HBD MUTASYON ANALİZİ
1	80	E	2	0,5	4,43	7,9	29	31,6	53,8	18,7	390	417	513	Het -3,7 single gene del	N	Het c.-115 A>G
10	24	E	2,5	0,5	4,59	15,4	14,4	32,2	100	33	80	238	60	-	-	Het c.315+429 T>C
14	31	K	1,5	1,7	5,17	12,4	21,2	32,4	78,3	24,9	58	287	24	Het -3,7 single gene del	-	Het c.315+429 T>C
25	6	E	1,2	0,2	5	11,4	13,7	32,5	71	24	100	300	40	Het -3,7 single gene del	N	Het c.14 C>T, Het c.294 C>T, Het c.316-174_316-173del/AT
31	26	E	2	0,2	6,26	12,8	15,3	30,5	67,1	20,4	81	349	110	-	N	Het c.315+429 T>C
35	2	E	1	0,6	5,27	8,6	17,1	31,5	55	15	38	436	42	N	N	Het c.350 G>C
39	6	K	1,7	0	5,18	9,3	17,4	32	57,3	17,2	-	-	-	Het -20,5 double gene del.	-	Het c.-172 A>T
44	31	K	1,9	0,2	5,08	12,8	13	33,2	78,9	26,2	-	-	-	Het -3,7 single gene del	-	Het c.-172 A>T

Tablo 4.6: HBD geni dizi analizinde varyasyon saptanan olguların hematolojik parametreleri ile bilinen alfa ve beta talasemi mutasyon analizi sonuçları (*: Grup 2, E: Erkek, K:Kadın)

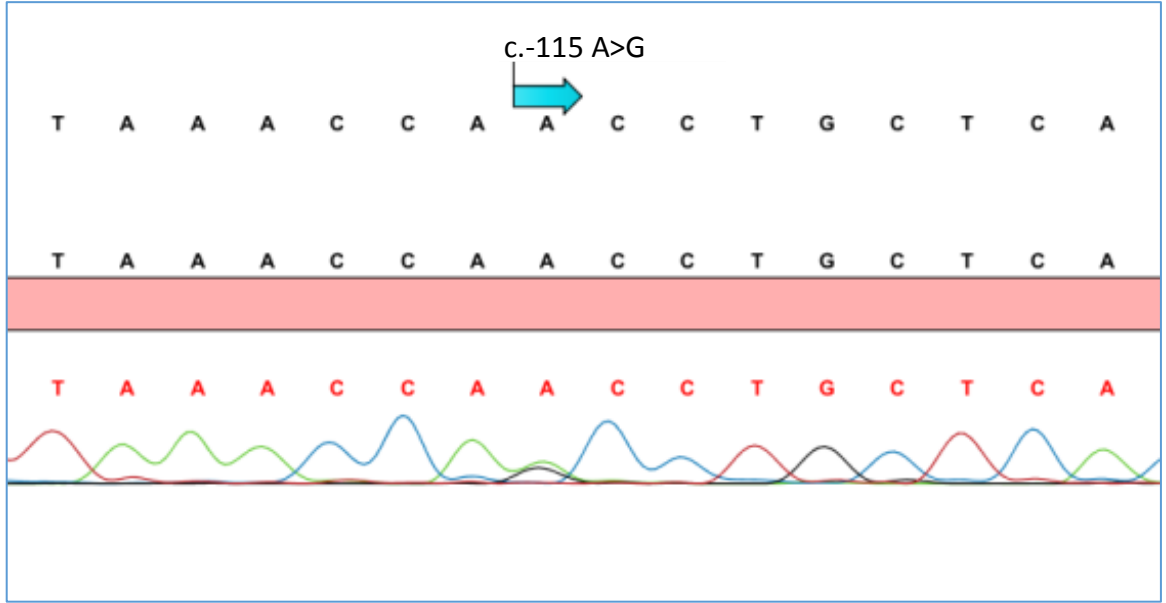
Varyasyon Saptanan Olgularla İlgili Ayrıntılı Bilgi:

Olgu 1

Anne babası arasında üçüncü dereceden akrabalık olan Olgu 1’de hipokrom mikrositer anemi bulunmaktaydı ve demir eksikliği anemisi yoktu. Seksen yaşındaki erkek olgunun aile öyküsünde bilinen talasemi hastası olan birey bulunmamaktaydı. Olgunun HPLC analizinde varyant hemoglobin görülmedi (Şekil 4.2). Olgunun beta talasemi mutasyon analizi sonucu normaldi. Alfa talasemi mutasyon analizi sonucunda Het -3,7 single gene delesyonu saptanmıştı. Olgunun, *HBD* geni Sanger dizi analizi sonucunda, daha önceden tanımlanan mutasyonlardan biri olan c.-115 A>G (g.823 A>G, rs35781729) değişikliğini 5’ UTR bölgesinde heterozigot olarak taşıdığı saptanmıştır (Şekil 4.3). Segregasyon analizi yapılamamıştır. Olgunun hematolojik parametreleri, alfa ve beta talasemi mutasyon analizi sonuçları, *HBD* geni dizi analizinde saptanan değişiklik ile birlikte Tablo 4.6’da özetlenmiştir.



Şekil 4.2: Olgu 1’in HPLC görüntüsü

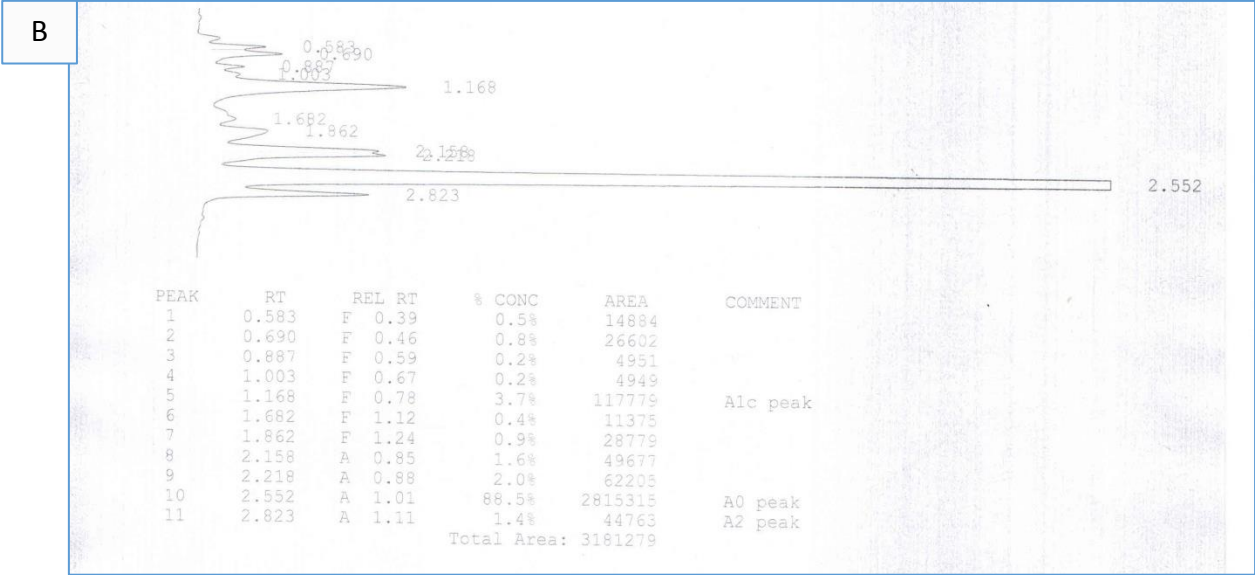
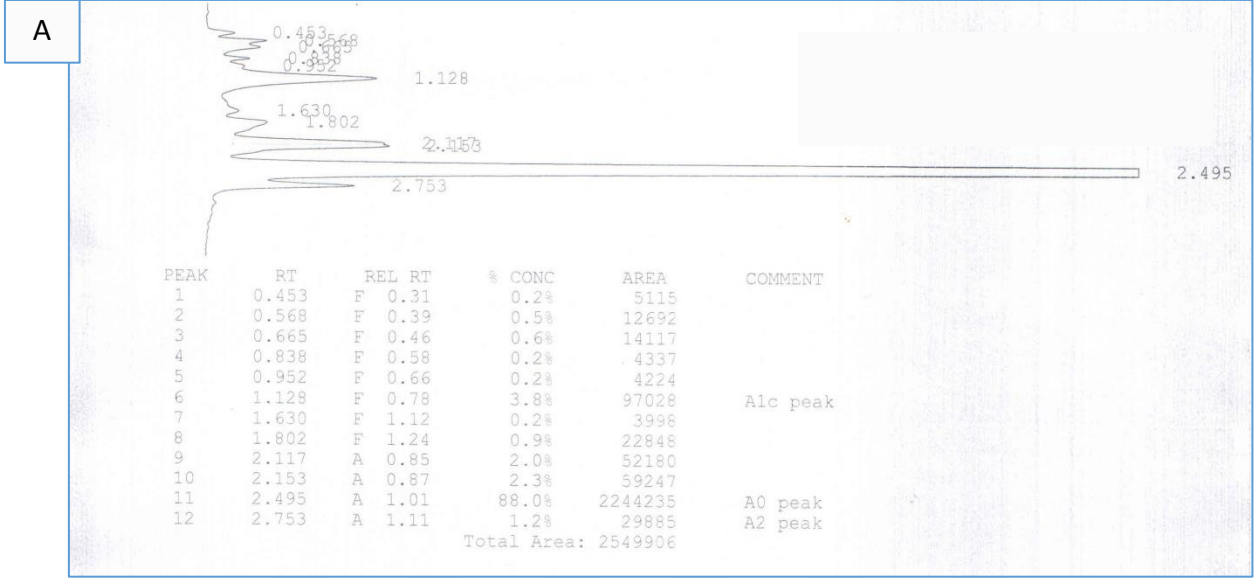


Şekil 4.3: Olgu 1'in Sanger dizi analizi elektroferogram görüntüsü

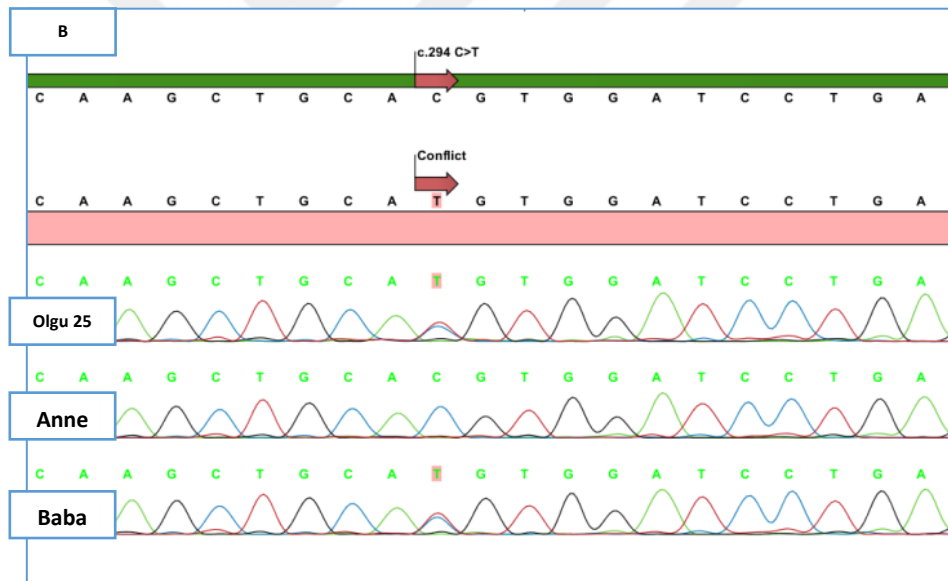
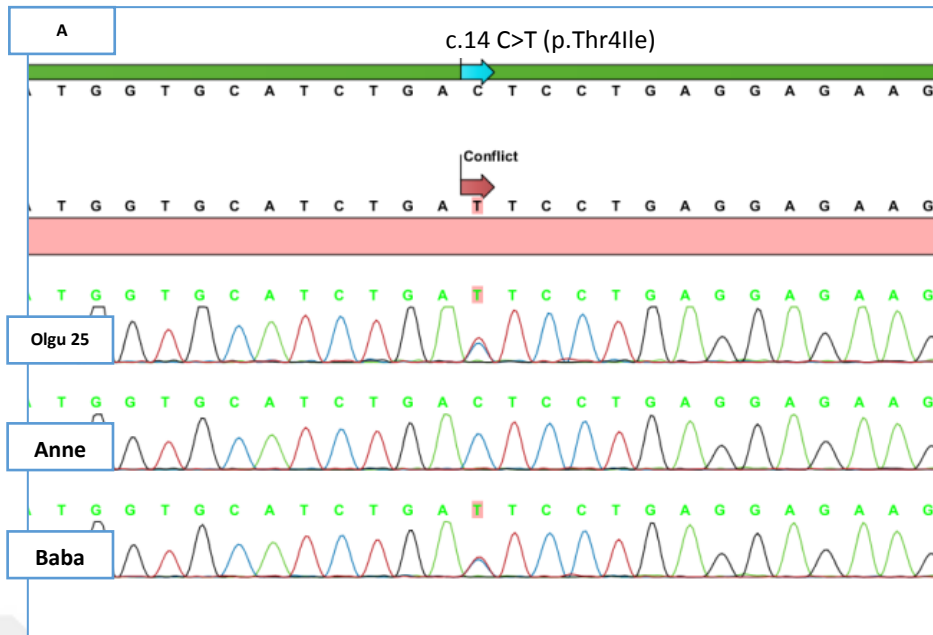
Olgu 25

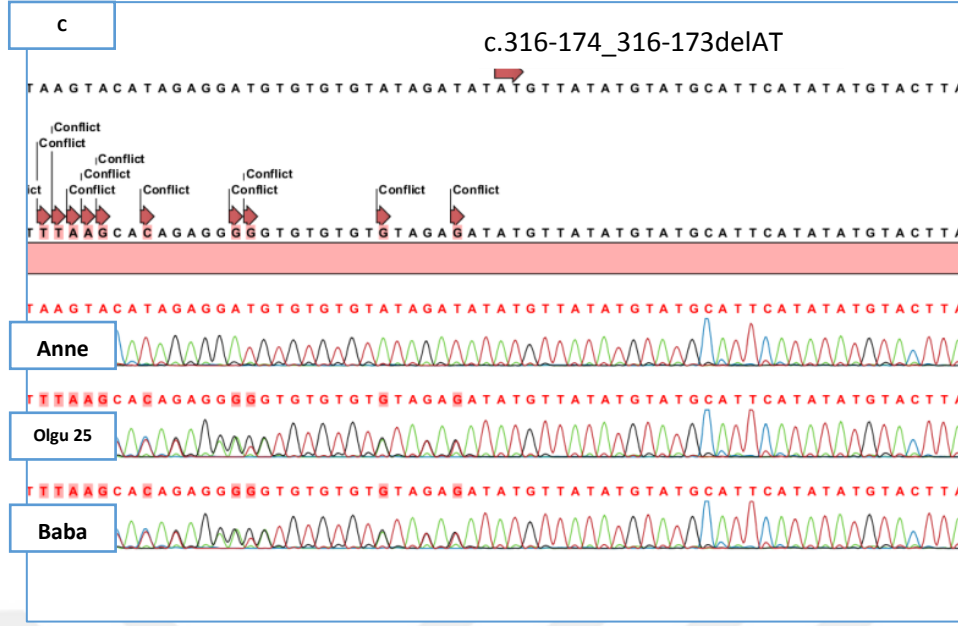
Anne-babası arasında birinci derece kuzen evliliği olan Olgu 25'in hipokromik mikrositer anemisi mevcuttu ve demir eksikliği bulunmamaktaydı. Altı yaşındaki erkek olgunun aile öyküsünde anemisi olan başka olgu yoktu. Olgunun alfa talasemi taşıyıcılığı mevcuttu ve daha önce yapılan mutasyon analizi sonucunda *HBA* geninde heterozigot -3.7 single gene delesyonu bulunmuştu. HPLC sonucunda varyant hemoglobin görülmedi (Şekil 4.4). Olgunun *HBD* geni için yapılan Sanger dizi analizi sonucunda ekzon 1'de, tanımlı bir mutasyon olan c.14 C>T (p.Thr4Ile, rs35406175) varyasyonu saptanmıştır. Bu varyasyonun yanında polimorfizm olarak değerlendirilen iki heterozigot değişiklik daha saptanmıştır. Bunlardan biri ekzon 2'de yer alan c.294 C>T (p.His98His, rs61746501) varyasyonu, diğeri ise intron 2'de yer alan c.316-174_316-173delAT (g.2105_2106delAT, rs113846417) varyasyonudur. Olguda heterozigot olarak bulunan c.14 C>T, c.294 C>T, c.316-174_316-173delAT değişikliklerinin, yapılan segregasyon analizi sonucunda, paternal olarak kalıtıldığı gözlenmiştir. Olgunun babasının da bu üç değişikliği heterozigot olarak taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Olgunun 39 yaşındaki annesinin yapılan *HBD* geni dizi analizi ve hematolojik parametreleri normal olarak saptanmıştır. Olgunun 42 yaşında olan babasının HbA₂ değeri % 1,4, HbF değeri % 0,9 olarak saptanmıştır. Olgu ve babasının HPLC analiz görüntüleri Şekil 4.7'de verilmiştir. Olgunun babasının hematolojik parametrelerinden RBC değeri 5,79 10⁶/μL (4,3 - 5,7), Hb değeri 15 gr/dL (13,2 – 17,3),

MCV değeri 76,3 fL (80 - 99), MCH değeri 25,9 pg (27 - 34), MCHC değeri 33,9 gr/dL (32 - 37), RDW değeri %13,9 (11,5 - 14,5) olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.7). Olgunun hematolojik parametreleri ve alfa talasemi mutasyon analizi sonuçları, *HBD* geni dizi analizinde saptanan değişiklikler ile birlikte Tablo 4.6’da özetlenmiştir.



Şekil 4.4: Olgu 25 (A) ve babasının (B) HPLC görüntüleri





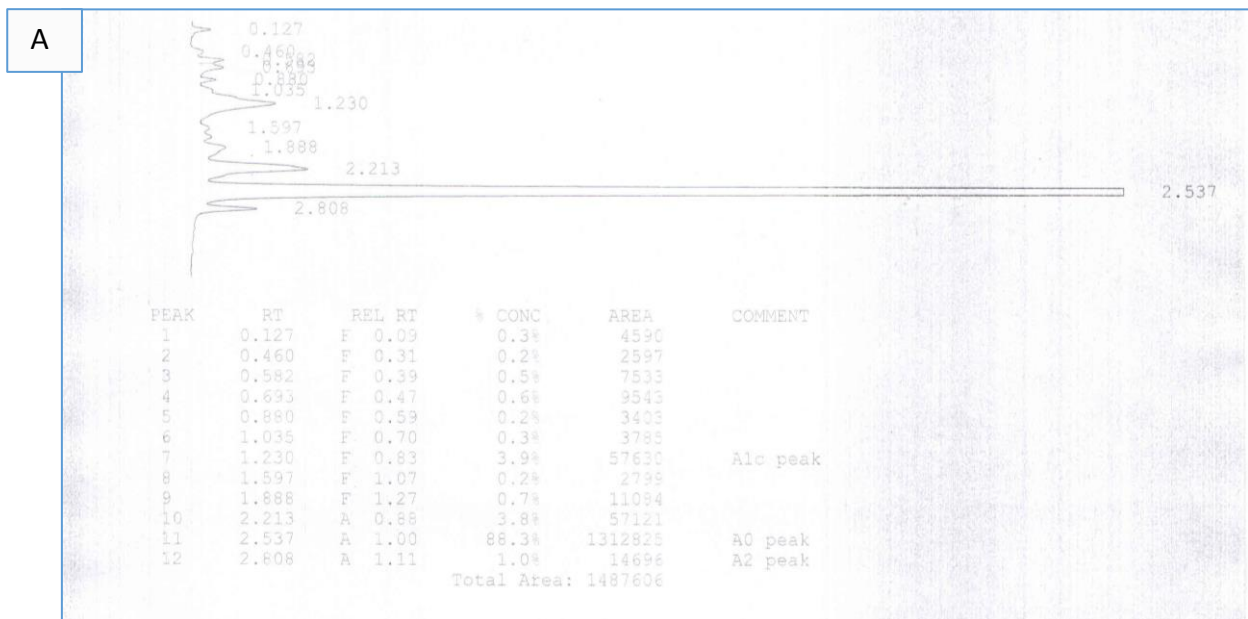
Şekil 4.5: Olgu 25, anne ve babasının c.14 C>T (A), c.294 C>T (B) ve c.316-174_316-173delAT (C) değişiklikleri için Sanger dizi analizi elektroferogram görüntüsü

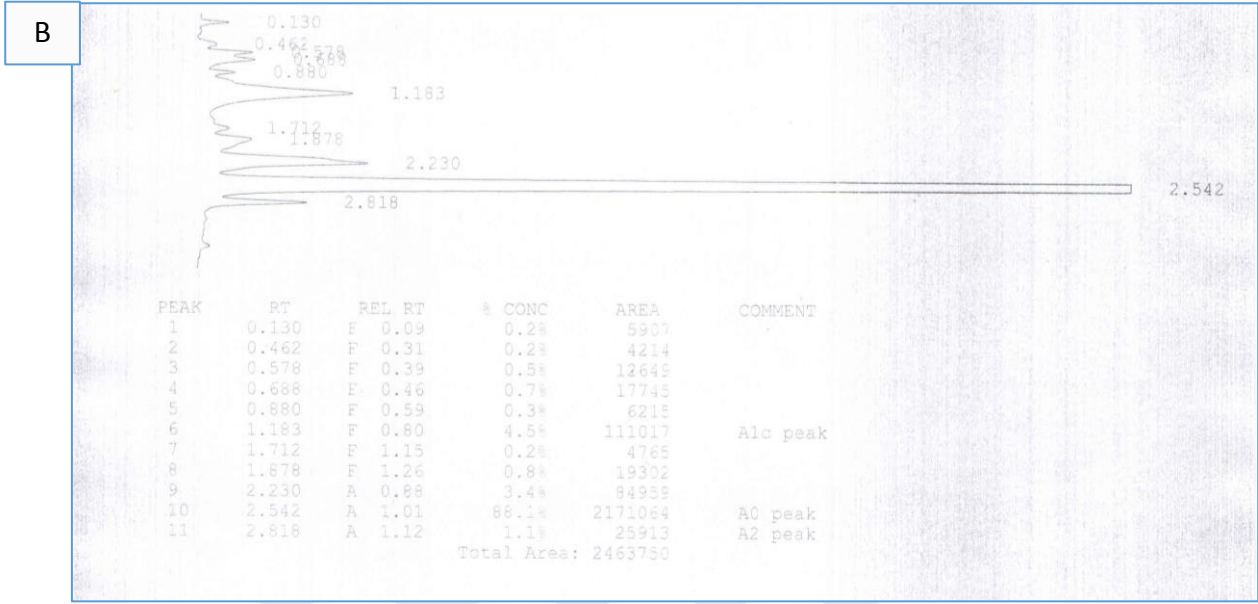
	YAŞ	HbA ₂ (%)	HbF (%)	RBC (3,9-5,7 10 ⁶ /µL)	Hb (11,7-16 g/dL)	RDW (% 11,5 - 14,5)	MCHC (31-37 g/dL)	MCV (81-101 fL)	MCH (25-34 pg)
Olgu 25'in annesi	39	2	0,3	4,78	13,1	12,7	33,8	81,2	27,4
Olgu 25'in babası	42	1,4	0,9	5,79	15	13,9	33,9	76,3	25,9

Tablo 4.7: Olgu 25'in anne ve babasının hematolojik parametreleri

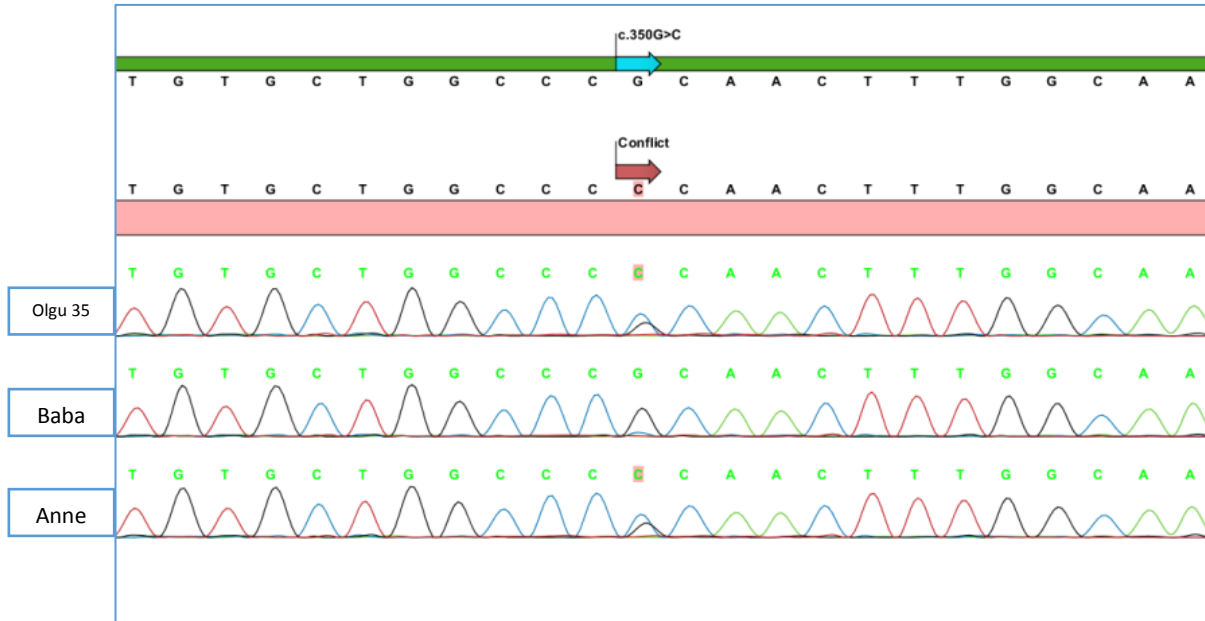
Olgu 35

Anne-babası arasında akrabalık olmayan Olgu 35'in hipokromik mikrositer anemisi mevcuttu. Demir değeri düşük, total demir bağlama kapasitesi yüksek, ferritin değeri normaldi. 2 yaşındaki erkek olgunun aile bireylerinden anemi öyküsü olan birey yoktu. Olgunun daha önceden yapılan alfa ve beta talasemi mutasyon analizi sonuçları normaldi. Demir dirençli demir eksikliği için yapılan *TMPRSS6* geni mutasyon analizinde mutasyon saptanmamıştı. HPLC sonucunda varyant hemoglobin görülmedi (Şekil 4.6). Olgunun *HBD* geni için yapılan Sanger dizi analizi sonucunda ekzon 3'te heterozigot olarak bu çalışmada HbA₂-Bornova olarak isimlendirilen c.350 G>C (p.Arg117Pro) değişikliğini taşıdığı saptanmıştır. Yapılan segregasyon analizi sonucunda bu değişikliğin maternal olarak kalıtıldığı gözlenmiştir. Olgunun annesinin de bu değişikliği heterozigot olarak taşıdığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7). Olgunun 31 yaşındaki babasının yapılan *HBD* geni dizi analizi ve hematolojik parametreleri normal olarak saptanmıştır. Olgunun 24 yaşında olan annesinin HbA₂ değeri % 1,1, HbF değeri %0,8 olarak saptanmıştır. Olgunun ve annesinin HPLC analizi görüntüsü Şekil 4.6'da verilmiştir. Hematolojik parametrelerinden RBC değeri 4,85 10⁶/μL (4,3 - 5,7), Hb değeri 13,5 gr/dL (11,5 – 15,5), MCV değeri 84,7 fL (80 - 99), MCH değeri 27,8 pg (27 – 34), MCHC değeri 32,8 gr/dL (32 – 37), RDW değeri %13,7 (11,5 – 14,5) olarak tespit edilmiştir (Tablo 4.8). Olgunun hematolojik parametreleri ile alfa ve beta talasemi mutasyon analizi sonuçları, *HBD* geni dizi analizinde saptanan değişiklik ile birlikte Tablo 4.6'da özetlenmiştir.





Şekil 4.6: Olgu 35 (A) ve annesinin (B) HPLC görüntüsü



Şekil 4.7: Olgu 35, anne ve babasının Sanger dizi analizi elektroferogram görüntüsü

	YAŞ	HbA ₂ (%)	HbF (%)	RBC (3,9-5,7 10 ⁶ /µL)	Hb (11,7-16 g/dL)	RDW (% 11,5 - 14,5)	MCHC (31-37 g/dL)	MCV (81-101 fL)	MCH (25-34 pg)
Olgu 35'in annesi	24	1,1	0,8	4,85	13,5	13,7	32,8	84,7	27,8
Olgu 35'in babası	31	3	0,2	5,59	16,6	13,2	34,9	85	29,2

Tablo 4.8: Olgu 35'in anne ve babasının hematolojik parametreleri

Olgu 10, Olgu 14 ve Olgu 31

Anne ve babaları arasında akrabalık olmayan 24 yaşındaki Olgu 10, 31 yaşındaki Olgu 14 ve 26 yaşındaki Olgu 31'in yapılan *HBD* dizi analizi sonucunda, intron 2'de polimorfizm olarak tanımlanan c.315+429 T>C (g.1809 T>C, rs111671911) değişikliği heterozigot halde saptanmıştır. Olgu 10 ve 14, HPLC analizinde HbA₂ fraksiyonunda ikinci pik görülen Grup 2 olgularındandı (Tablo 4.3). Olgu 31 ise HbA₂ değeri %2 ve altında, MCV değeri 80 fL'nin ve MCH değeri 27pg'nin altında olan Grup 1'e ait olgularındandı (Tablo 4.2). Olgu 10'nun HbA₂ fraksiyonunda ikinci piki dışında HPLC analizi normal bulunmuştur. Hemogram değerleri de referans değerler arasında saptanmıştır. Demir eksikliği bulunmamıştır. Olgu 14'ün de HbA₂ fraksiyonunda ikinci piki saptanmıştır. HbA₂ değeri %1,5 olan olgunun, hemogram sonucuna göre mikrositoz ve hipokromisi bulunmuştur. Bu olguda demir eksikliğinin yanında alfa talasemi mutasyon taşıyıcılığı saptanmıştır. Olgu 31'in HbA₂ değeri %2 saptanmıştır ve hipokromik mikrositer anemisi bulunmuştur. Demir parametreleri normal olan olguda beta talasemi mutasyonu saptanmamıştır.

Olgu 39 ve Olgu 44

Anne ve babaları arasında akrabalık olmayan 6 yaşındaki Olgu 39 ve 31 yaşındaki Olgu 44 de Grup 1 olgularındandı. Bu iki olgunun yapılan *HBD* geni dizi analizi sonucunda intron 2’de, *in silico* analizlerle polimorfizm olarak değerlendirilen c.-172 A>T (g.766 A>T) değişikliği heterozigot olarak tespit edilmiştir. Olgu 39’un HbA₂ değeri %1,7 olarak bulunmuştur ve hipokromik mikrositer anemisi saptanmıştır. Demir parametreleri bilinmeyen olgunun ayrıca alfa talasemi mutasyon taşıyıcılığı bulunmuştur. Olgu 44’ün HbA₂ değeri %1,9 olarak tespit edilmiştir. Hipokromi ve mikrositozu olan olgunun demir parametreleri bilinmemekle beraber alfa talasemi taşıyıcılığı saptanmıştır.

Bu 5 olguda saptanan c.315+429 T>C ve c.-172 A>T değişiklikleri ACMG kriterlerine göre benign olarak değerlendirilmişlerdir. Olguların hematolojik parametreleri ile alfa ve beta talasemi mutasyon analizi sonuçları, *HBD* geni dizi analizinde saptanan değişiklik ile birlikte Tablo 4.6’da özetlenmiştir.

5.TARTIŞMA

Kalıtsal hemoglobin hastalıkları (hemoglobinopatiler) hemoglobin varyantları ve talasemiler şeklinde 2 gruba ayrılır. Talasemiler globin zincir sentezindeki bozukluklardan kaynaklanan, en yaygın tek gen hastalıklarıdır. Hemoglobini oluşturan tetramer yapısındaki α ve β -benzeri globin zincirlerinin sentezi ve yapısındaki bozukluklar kalıtsal anemilerin en sık görülen formlarını oluşturmakta ve talasemi hastalarında bu globin zincirlerinin üretiminde bir problem olduğu bildirilmektedir [36]. α -globin sentezinin eksikliğinde Alfa talasemi, β - globin sentezinin eksikliğinde ise Beta talasemi meydana gelmektedir. Günümüzde α - ve β - globin zincirlerinin sentezini veya yapısını etkileyen 1700'e yakın gen değişikliği bildirilmektedir. Beta globin zincirini etkileyen 1000'den fazla değişiklik olduğu bilinmektedir. Bunların yaklaşık 900 tanesi *HBB* geninde bulunmaktadır ve yaklaşık 300 tanesi hastalıkla ilişkilendirilmiştir. *HBD* geninde yaklaşık 120 değişiklik bildirilmiştir [16, 87, 88]

Talasemiler Afrika, Akdeniz'e kıyısı olan ülkeler, Orta Doğu, Hindistan yarımadası, Güney Çin ve Güneydoğu Asya'ya kadar dünyada geniş şekilde yayılım göstermektedirler [15]. Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre dünyada 300 milyon hemoglobinopati taşıyıcısı ve 80 milyon beta talasemi taşıyıcısı olduğu bilinmektedir. Dünya nüfusunun %1-5'inin beta talasemi taşıyıcısı olduğuna dikkat çekilmektedir [89]. Dünya genelinde her yıl yaklaşık 60.000 hasta bebek doğduğu bilinmektedir [36, 90]. Türkiye'de beta talasemi önemli bir halk sağlığı problemidir. Türkiye'de beta talasemi insidansı genel olarak %2,1'dir. Ancak bu sıklığın %13 olduğu bölgeler de vardır. Bu oranın yüksek olduğu bölgeler Türkiye'de akraba evliliğinin de yüksek olduğu doğu bölgeleridir. Türkiye'de akraba evliliği sıklığı %25 olarak bildirilmektedir. Bunun yanında bu oranın güney bölgelerde %35'e, doğu bölgelerinde ise %60'ın üzerine çıktığı da bilinmektedir [54, 56, 90, 91].

Beta talasemi taşıyıcılarının belirlenmesi ile hasta çocuk doğumları önlenabilir. Taşıyıcıların belirlenmesi sonrasında hastalığa neden olan mutasyonların moleküler yöntemlerle tespit edilmesi ve genetik danışmanlık hizmeti ile hasta çocuk doğumlarının önüne geçilebilir. Beta talasemi taşıyıcılarının belirlenmesinde hemotolojik parametrelerin önemi büyüktür. Bu bireylerde anemi olsun veya olmasın, MCV ve/veya MCH değeri düşük ve RBC değeri rölatif yüksek saptanır. HbA₂ değeri taşıyıcılar için en önemli belirteçtir. Beta talasemi taşıyıcılarında HbA₂ değeri bazı

yayınlarına göre %3,2, bazı yayınlarına göre %3,5'un üstünde saptanmıştır [53, 70]. HbA₂ değerini düşüren nedenlerden biri de klinik olarak önemsiz kabul edilen *HBD* geni varyasyonlarıdır [74, 92]. Türkiye'de *HBD* gen varyasyonlarının çeşitliliği ve sıklığı ile ilgili yapılmış kapsamlı çalışma bulunmamaktadır.

Bu çalışmada yaşları 2-80 arasında değişen, HbA₂ değeri %2 ve altında, MCV değeri 80 fL'nin ve MCH değeri 27 pg'nin altında olan 40 olgu (Grup 1) ile diğer hematolojik parametrelerden bağımsız olarak varyant hemoglobin taşıyıcısı olabileceğini düşündüğümüz HbA₂ fraksiyonunda ikinci pik saptanan 10 olguya (Grup 2) *HBD* geni Sanger dizi analizi yapılmıştır. Olguların önceden bilinen alfa ve beta talasemi mutasyonları ile demir parametreleri de değerlendirilmiştir.

Yaş açısından olguların değerlendirilmesi

Alkindi ve arkadaşlarının, 2014'te Umman'da yaptıkları ve sonucunda delta globin değişikliği ve demir eksikliği olan olgularda HbA₂ seviyesinin düşüklüğünden ötürü beta talasemi taşıyıcılığı tanısının zorlaştığını belirttikleri çalışmada, olguların yaşları 1-54 arasında değişmektedir ve ortalama değer 19,2±11,2 olarak verilmiştir [74].

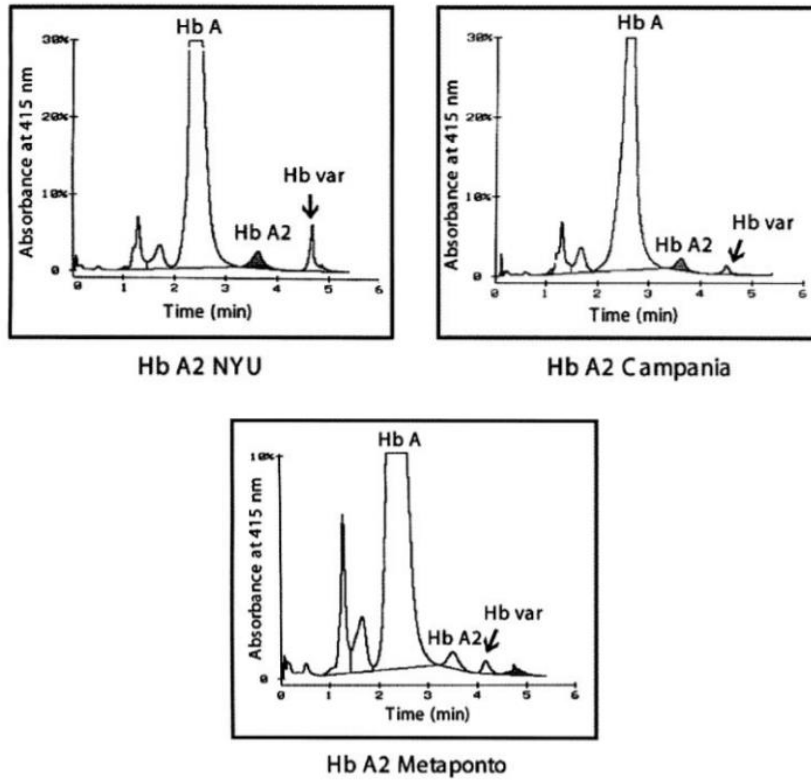
Hassan ve arkadaşlarının aynı yıl yine Umman'da delta globin gen değişikliklerini araştırdıkları çalışmaya alınan olguların yaş ortalaması 31'dir. Bu çalışmada olguların hangi yaşlar olduğu belirtilmemiştir [93]. Literatürdeki çoğu çalışmada olguların yaşı belirtilmemiştir [8, 69, 76, 78].

Bizim çalışmamıza katılan olgular 2-80 yaş arasında olup ve yaş ortalaması Grup 1 için 28,95±19,05, Grup 2 için 20,2±15,6 olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda 2 yaş üstü bireyleri seçmemizin nedeni HPLC analizinde erişkin hemoglobin değerlerine ulaşma yaşının 2 olmasıdır.

HbA₂ değeri açısından olguların değerlendirilmesi

De Angioletti ve arkadaşlarının 2002 yılında İtalya'da demir eksikliğini dışladıkları olgularda delta globin değişikliklerini araştırdıkları çalışmaya göre, HbA₂ değeri %2'nin altında olan veya HbA₂ değeri sınırda (%3,2 - %3,7) ya da normal olup beta talasemi taşıyıcısı olan Basilicata bölgesinde 10,000 olgunun 53 tanesinde delta

globin gen değişikliği taşıyıcılığı saptamışlardır. Daha sonra çalışmaya Campania bölgesinden 50 taşıyıcı eklemişlerdir. alışmalarında delta globin değişikliği saptadıkları toplam 103 olguda 3 farklı nadir HbA₂ varyantı bulunduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmanın sonucunda Basilicata bölgesinde %60, Campania bölgesinde %80 oranında en sık HbA₂-Yialousa değişikliğini saptamışlardır. HbA₂ varyant pikine sahip olgularda saptanan hemoglobinler Hb A₂-NYU, Hb A₂- Campania ve Hb A₂-Metaponto'dur (şekil 4.11). Aynı çalışmada delta globin gen değişikliği sıklığını, Sardunya'da saptanan HbA₂-Yialousa sıklığı (%1,2) ile karşılaştırmışlar ve bu değişikliğin Sardunya'da Basilicata'ya göre sık olmasının sebebini adanın genetik olarak izole olmasından kaynaklandığını belirtmişlerdir [78]. Bizim alışmamızda bu 4 değişikliğe de rastlanmamıştır.



şekil 5.1: De Angioletti ve ark.'larının çalışmasında HPLC analizi sonucu HbA₂ fraksiyonunda ikinci pik olan rnekler [78]

Alkindi ve arkadaşlarının yukarıda bahsedilen çalışmasında HbA₂ değeri %2,3'n altında olan 78 olguda %51,3 oranında delta globin gen değişikliği

saptanmıştır. Bu çalışmada da en sık saptanan değişiklik yine HbA₂-Yialousa (%66) olmuştur [74]. Guiso ve arkadaşları Sardunya'da random HbA₂-Yialousa taşıyıcılığı sıklığını %1,2 olarak belirtmişlerdir [94].

Phylipsen ve arkadaşları 2010'da yaptıkları çalışmada HbA₂ değeri %1,8'in altında olan ya da HbA₂ fraksiyonunda ikinci pik olan bireylerde 43 olgunun %77'sinde delta globin gen değişikliği saptamışlardır. En sık saptanan mutasyon HbB₂ (c.49G>C) (%30) olarak bildirilmiştir. Afrika kökenli Amerika vatandaşları olan bu bireylerdeki yüksek oranın sebebinin kurucu mutasyon olduğu düşünülmektedir. Genel olarak Amerika Birleşik Devletleri'nde HbB₂ taşıyıcılık sıklığı %0,5 olarak belirtilmektedir. [81].

Pavlou ve arkadaşları 2009'da Kıbrıs Rum kesiminde delta talasemi sıklığını araştırdıkları çalışmada HbA₂ değeri %1,6'nın altında olan normositer ve normokromik olan olguların hepsinin delta globin gen değişikliği taşıyıcısı olduğunu belirtmişlerdir. Yine bu çalışmada en sık saptanan değişikliğin HbA₂-Yialousa (%60) olduğunu belirtilmiştir. Aynı çalışmada HbA₂ değeri %2,2'nin altında olup MCH ve MCV değeri normal olan 2,375 olgudan 30 kişide delta globin değişikliğini saptamış ve Kıbrıs Rum popülasyonunda delta globin gen değişikliği taşıyıcılık oranını %1,26 olarak belirtmişlerdir [82].

HbA₂ değeri %2'nin altında olan veya HbA₂ fraksiyonunda ikinci pik olan bireylerin olduğu bizim çalışmamızda 50 olgunun 3 (%6) tanesinde fonksiyonel delta globin varyantı saptanmıştır.

Alfa ve beta talasemi mutasyonu açısından olguların değerlendirilmesi

De Angioletti ve arkadaşları çalışmalarında HbA₂ düşüklüğü ile birlikte mikrositoz olmasını alfa ve beta globin gen mutasyon taşıyıcılığı ile ilişkilendirmişlerdir. Delta ve beta globin gen değişikliği bulunan olgularda HbA₂ değerinin normal sınırlarda olabileceği belirtilmiştir. Bu da beta talasemi mutasyonunun yol açtığı fenotiple ilişkili bulunmuştur. Beta talasemi mutasyonunun fenotip şiddeti ile HbA₂ değeri doğru orantılı olarak artmakta ve normal sınırlara gelmektedir. Beta talasemi mutasyonlarından Codon 39 ve IVS1.6 taşıyıcılığı bulunduran delta globin değişikliği taşıyıcılarının HbA₂ değeri %2,3-%3 arasında iken daha ağır beta talasemi

mutasyon birlikteliği olan olguların HbA₂ değerinin %3,2-%3,7 olduğu bildirilmiştir. Alfa talasemi taşıyıcılığı ile delta globin varyasyonu birlikteliğinde ise HbA₂ değeri daha düşük (%1-%1,6) saptanmıştır [78].

Kordafshari ve arkadaşlarının 2016 yılında İran'da delta globin değişikliklerini araştırdıkları çalışmada MCV ve MCH değerleri normalden düşük, sırasıyla <80 fL ve <27pg, HbA₂ değeri %2'nin altında olan 43 olgunun 21'inde (%48) delta globin gen değişikliği saptanmışlardır. Bu 21 bireyin 7 (%17) tanesinde, en sık değişiklik heterozigot -3.7 single gene delesyonu olmak üzere, alfa globin gen değişikliği tespit edilmiş, 3 tanesinde ise heterozigot beta globin gen değişikliği saptanmıştır [95].

Villegas ve arkadaşları 2016 yılında İspanya'da yaptıkları çalışmada hipokromik mikrositer anemi şartı aranmaksızın HbA₂ değeri %2,5'tan düşük olgularda alfa ve delta globin geni değişikliği araştırmışlardır. Bu çalışmanın sonucunda 209 olgunun 18 (%8) tanesinde delta globin değişikliği saptanmıştır. Bu 18 olgunun hepsinde HbA₂ düzeyinin %2 ve altında olduğu belirtilmiş ve 10 tanesinde delta globin değişikliğine alfa globin gen değişikliğinin eşlik ettiğini bildirmişlerdir [8].

Bu çalışmalar hemogram ve HPLC analizlerinin birlikte değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Çünkü sadece HPLC değeri ile taşıyıcılık kararı verilmesi, HbA₂ değeri normal olup mikrositozu ve hipokromisi olan beta talasemi taşıyıcılarının atlanma ihtimaline karşı, kaçınılması gereken bir durumdur.

Bizim çalışmamızda HbA₂ düşüklüğü ile birlikte mikrositozu olan 17 olgunun beta talasemi mutasyon analizi sonucu bilinmektedir ve hepsi normal saptanmıştır. Elli olgunun 35'inin alfa talasemi mutasyon analizi sonucu bilinmektedir ve 21 taşıyıcı olgunun 2 tanesinde delta talasemi gen değişikliği bulunmuştur. *HBD* geninde c.-115 A>G ve c.14 C>T değişikliklerini ayrı ayrı taşıyan 2 olguda heterozigot -3,7 single gene delesyonu saptanmıştır. Bu olguların HbA₂ değerleri sırasıyla %2 ve %1,2 bulunmuştur. HbA₂-Bornova saptanan olgunun ise alfa talasemi mutasyon analizi sonucu normal olarak bulunmuştur.

Demir parametreleri açısından olguların değerlendirilmesi

Literatürde delta globin gen değişikliği araştıran bazı yayınlarda demir eksikliği dışlanmış [83], bazı yayınlarda ise demir parametrelerine yer verilmemiştir [76, 82, 96].

Bouva ve arkadaşlarının 2006 yılında Hollanda'da delta globin değişikliklerinin önemini araştırdıkları, 13 olgunun delta globin sentezi defekti, 16 olgunun ise varyant hemoglobin şüphesi ile katıldığı toplam 29 olgu içeren çalışmada, delta globin değişikliği saptamadıkları 9 olgunun 3'ünde demir eksikliği bulunduğunu belirtmişlerdir. Demir eksikliğin de, HbA₂ seviyesinde düşüklüğe neden olarak delta globin gen değişikliğinin sonucuna benzer tablo çizdiğine dikkat çekmişlerdir [69].

Demir eksikliği sonucunda da HbA₂ değeri düştüğü için, demir eksikliği ile *HBA* ve *HBD* gen değişiklikleri benzer bulgu vermektedir. Toplum sağlığı açısından bakıldığında demir eksikliğin Türkiye'deki prevalansının bölgelere göre değişkenlik gösterdiği ve %6,5-%33 oranları arasında olduğu bildirilmektedir. Demir eksikliği anemisinin ise %3,2-%14,2 oranları arasında olduğunu belirtilmektedir [97]. Taşıyıcılık taramasında hem toplum sağlığı açısından hem de HPLC analizini sağlıklı değerlendirebilmek açısından demir parametrelerinin kontrol edilmesinin önemli olduğunu düşünmekteyiz.

Bizim çalışmamızda 36 olgunun 18'inde demir eksikliği bulunmuştur. Bu olguların 7'sinde alfa talasemi mutasyon analizi normal, 5'inde ise alfa talasemi mutasyon taşıyıcılığı saptanmıştır. Demir eksikliği olan 5 olgunun ise beta talasemi mutasyon analizi sonucunun normal olduğu bilinmektedir. c.-115 A>G ve c.14 C>T değişikliklerini taşıyan 2 ayrı olgu ve HbA₂-Bornova saptanan 1 olguda demir eksikliği saptanmamıştır.

Saptanan fonksiyonel varyasyonlar açısından olguların değerlendirilmesi

Olgu 1

Bizim çalışmamızda *HBD* geninde saptanan ilk değişiklik c.-115 A>G (g.823 A>G, rs35781729) değişikliğidir. Olgu 1'de heterozigot saptanan bu değişiklik ilk olarak Papadakis ve arkadaşları tarafından 1997 yılında Yunanistan'da tanımlanmıştır. 5'UTR bölgesinde yer alan bu değişiklik δ^+ talasemiye yol açmaktadır. ACMG kriterlerine göre patojenik bir değişikliktir. Papadakis ve arkadaşları, HbA₂ seviyesi düşük normal hematolojik parametrelere sahip ve beta talasemi taşıyıcılığı olan normal HbA₂ değerlerine sahip toplam 40 olgunun 10 tanesinde delta globin değişikliği saptamışlardır. Bu 10 olgunun 4'ünde c.-115 A>G değişikliği bulunmuştur. Bu 4

olgunun da *HBB* mutasyonu taşıyıcılığı vardır ve HbA₂ değerleri %3,1 - %3,4 olarak belirtilmiştir. Diğer hematolojik parametreleri ise normal olarak belirtilmiş, değerleri ayrıca verilmemiştir. HbA₂ değerindeki rölatif yüksekliğin, eşlik eden beta talasemi mutasyonundan kaynaklandığı belirtilmiştir.

c.-115 A>G değişikliğinin AACCAAC dizisi içinde yer aldığı aynı çalışmada ortaya konmuş ve bu dizinin *HBB* geni promotör bölgesindeki negatif düzenleyici element olan AACCAAT dizisine benzerliği dikkate alınmıştır. *HBD* geninde saptanan AACCAAGC değişikliğinin geni negatif olarak düzenlemede rolü olabileceği belirtilmiştir [71, 73, 84].

Bizim çalışmamızda c.-115 A>G değişikliğine sahip olan Olgu 1'in HbA₂ değeri beklendiği gibi normalin altında bulunmuştur. Eşlik eden beta talasemi mutasyonu ve demir eksikliği bulunmamakla birlikte, alfa talasemi taşıyıcılığı ve hipokromik mikrositer anemisi mevcuttur. Beta talasemi taşıyıcılığının olmaması ve alfa talasemi taşıyıcılığının olması sebebiyle HbA₂ değerinin %2 olduğunu düşündük.

Olgu 25

Olgu 25'te üç değişiklik saptanmıştır. Bunlar c.14 C>T (p.Thr4Ile, rs35406175), c.294 C>T (p.His98His, rs61746501), c.316-174_316-173delAT (g.2105_2106delAT, rs113846417) değişiklikleridir ve üçü de heterozigot olarak saptanmışlardır. c.294 C>T değişikliği aminoasit değişikliğine neden olmamaktadır ve yapılan *in silico* analizler sonucu benign varyant olarak değerlendirilmiştir [84].

c.14 C>T değişikliği ilk olarak Trifillis ve arkadaşları tarafından 1993 yılında Kıbrıs Rum kesiminde tanımlanmıştır. Bu çalışmada akraba olmayan 4 olguda c.14 C>T ile c.316-174_316-173delAT değişiklikleri birlikte saptanmıştır. Bu olgulardan 3'ünün normositer normokromik olup HbA₂ değerlerinin %1,4-1,6 arasında değiştiği belirtilmiştir. Bir olgunun ise beta talasemi mutasyonu taşıdığı ortaya konarak hipokromi ve mikrositozu olduğu ifade edilmiş, HbA₂ değeri %3,6 olarak belirtilmiştir. Segregasyon analizi sonucunda 4 olguda da, c.14 C>T ile c.316-174_316-173delAT değişikliklerinin *cis* konumda olduğu gösterilmiştir. Aynı çalışmada HbA₂ değerini düşüren değişikliğin c.14 C>T değişikliği olabileceğini belirtmişlerdir. Ancak c.316-174_316-173delAT değişikliğinin, intronda olmasına rağmen, *HBB* geninde aynı

bölgede bulunup β^+ talasemi ile ilişkili IVS2.745 C>G mutasyonuna benzer şekilde, splicing defekti yapabileceğine ve bu sebeple HbA₂ seviyesini düşürebileceğine dikkat çekmişlerdir. Ardından 1996 yılında yayınladıkları ekspresyon çalışması ile c.316-174_316-173delAT değişikliğinin nötral polimorfizm olduğunu ifade etmişlerdir. HbA₂ seviyesini düşüren değişikliğin ise c.14 C>T değişikliği olduğunu belirtmişlerdir. Ortaya çıkan hemoglobinde izolösün aminoasidinin, yerine geçtiği treonin aminoasidine göre daha hidrofobik olmasından yola çıkarak, bu değişikliğe sahip hemoglobinin stabilitesinin azaldığını göstermişlerdir [86, 98]. Villegas ve arkadaşları da yaptıkları çalışmalarında, bu varyasyonun molekül polaritesini değiştirerek hemoglobinin yapısal stabilitesini bozduğunu belirtmişlerdir [8].

Lacerra ve arkadaşları 2008’de yaptıkları çalışmada 3 olguda saptadıkları c.316-174_316-173delAT değişikliğinin yine c.14 C>T ile birlikte kalıtıldığını göstermişlerdir [99]. Bizim çalışmamızda da c.14 C>T (p.Thr4Ile, rs35406175), c.294 C>T (p.His98His, rs61746501) ve c.316-174_316-173delAT (g.2105_2106delAT, rs113846417) değişikliklerinin olguya paternal kalıtıldığı saptanmıştır. Bu da c.14 C>T ve c.316-174_316-173delAT değişikliklerinin ortak kalıtıldığını düşündürmektedir.

Bizim çalışmamızda bu değişikliğe sahip olan olgunun HbA₂ değeri beklendiği gibi normalin altındaydı. Eşlik eden beta talasemi mutasyonu ve demir eksikliği bulunmamakla birlikte, alfa talasemi taşıyıcılığı ve hipokromik mikrositer anemisi mevcuttu. Beta talasemi mutasyonu taşımaması ve alfa talasemi taşıyıcılığına eşlik eden delta talasemi değişikliği sebebiyle HbA₂ değeri % 1,2 olmuştur.

Olgu 35

Olgu 35’ te saptanan c.350 G>C (p.Arg117Pro) değişikliği daha önce literatürde yayınlanmamıştır. Ancak bu değişiklikle aynı bölgede tanımlanan varyantlar mevcuttur. Bunlar HbA₂-Coburg, Hb A₂-Troodos ve HbA₂-India varyantlarıdır.

Sharma ve arkadaşları 1975 yılında Sicilya’da yaptıkları çalışmada c.350 G>A (p.Arg117His, rs34536353) değişikliğini, aynı zamanda beta talasemi taşıyıcısı olan bir bireyde, heterozigot olarak saptamışlar ve HbA₂-Coburg olarak tariflemişlerdir [100]. Bu değişiklik HbVar veritabanında delta 116(G18) Arg>His olarak da isimlendirilmektedir [84]. Bu değişikliğin HPLC analizinde görünür varyant pik

oluşturmadığı, HbA ile birlikte yürüdüğü bilinmektedir. Bu değişikliğin Birleşik Krallıktaki sıklığı %1,6 olarak saptanmıştır [76, 83]. Aminoasit değişikliği yapan bu varyasyonu Lacerra ve arkadaşları Batı Sicilya kökenli 2 olguda daha saptamışlardır [99]. Hassan ve arkadaşları Sicilya'daki Arap popülasyonuna dikkat çekerek bu değişikliğin Afrika kökenli olabileceğini belirtmiştir [93]. Villegas ve arkadaşlarının çalışmasında bu varyanta sahip 4'ü İspanya ve 1'i Hindistan kökenli 5 bireyin HbA₂ düzeyi %0,7-1,9 arasında saptanmıştır. En düşük HbA₂ değerine sahip iki olgudan HbA₂ değeri %1,7 olanının alfa talasemi heterozigot mutasyonu, Hindistan kökenli olup HbA₂ değeri % 0,7 olanının ise *HBA1* geni varyantı olan Hb Q-India'yı taşıdığı gösterilmiştir [8]. Kordafshari ve arkadaşlarının çalışmasında alfa ve beta talasemi mutasyonu olmayan HbA₂-Coburg varyantına sahip normositer normokromik bir bireyde HbA₂ değeri %0,8 olarak belirtilmiştir [95].

Aynı kodonda tariflenen bir başka varyant c.349 C>T (p.Arg117Cys, Hb A₂-Troodos, rs33971270) değişikliğidir [84]. Bu değişikliği, Loudianos ve arkadaşları 1991'de İtalya'da yaptıkları çalışmada, beta talasemi taşıyıcılığı olup, hipokromik mikrositer anemisi olan ve HbA₂ değeri %2,4 olan bir olguda tariflemişlerdir. Olgunun beta talasemi mutasyon taşıyan allelinin paternal, Hb A₂-Troodos varyantını taşıyan allelinin ise maternal kalıtıldığı gösterilmiştir. Olgunun annesinin beta talasemi analizi ve hematolojik parametrelerinin normal, HbA₂ değerinin %1,3 olduğu belirtilmiştir. [101]. HbVar veritabanında, δ⁺ varyant olarak belirtilen değişikliğin ayrıca stabil olmayan bir varyant olduğu da ifade edilmiştir [84]. Trifillis ve arkadaşlarının 1991'de Kıbrıs Rum kesiminde yaptıkları çalışmada HbA₂-Troodos varyantını taşıyan normositer normokromik bir olguda HbA₂ düzeyinin %1,5 olduğunu ve %0,4 oranında da varyant hemoglobin bulunduğunu belirtmişlerdir. [102].

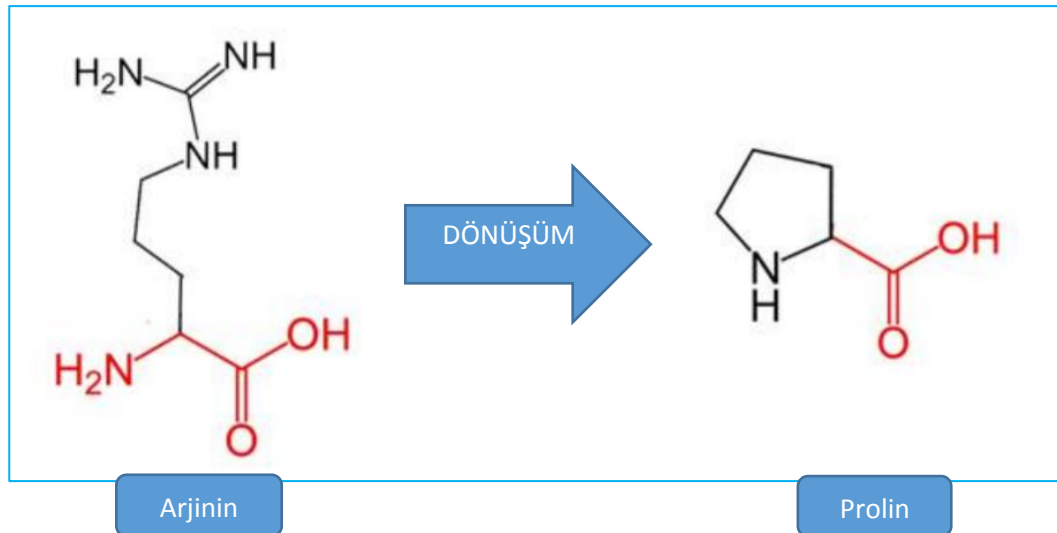
HbA₂-India (p.Arg117Leu) varyantı ilk defa 2003 yılında Wayne ve arkadaşları tarafından alfa ve beta talasemi mutasyon taşıyıcısı olup HbA₂ değeri %3 olan bir olguda tanımlanmıştır. Çalışmada hipokromi ve mikrositozu olan olguların *HBD* geni açısından değerlendirilmeleri önerilmiştir [103]. Bu hemoglobin varyantı HbVar veritabanında bulunmamaktadır.

Bu bilgiler ışığında kodon 117'nin mutasyona açık bir bölge olduğu kabul edilebilir. Ayrıca evrimsel açıdan korunan bir bölge olmadığı da bilinmektedir (Şekil 4.12).

species	match	gene	aa alignment
Human			117 LLGNVLCVLA R NFGKEFTPQMQA
mutated	not conserved		117 LLGNVLCVLA P NFG
Ptrogodytes	all identical	ENSPTRG0000003238	117 LLGNVLCVLA R NFG
Mmulatta	no homologue		
Fcatus	no homologue		
Mmusculus	not conserved	ENSMUSG00000052305	117 LLGNMIVIVLGHHLG
Ggallus	not conserved	ENSGALG00000017345	118 LLGDILIIIVLAAHFS
Trubripes	not conserved	ENSTRUG00000016923	119 LLSDCLTIVVATKMGSKFTPEIQ
Drerio	not conserved	ENSARG00000089087	117 LLADCITVCAAMKFG
Dmelanogaster	no homologue		
Celegans	no homologue		
Xtropicalis	all conserved	ENSXETG00000025667	117 RFC SCTIISMA Q TLQ

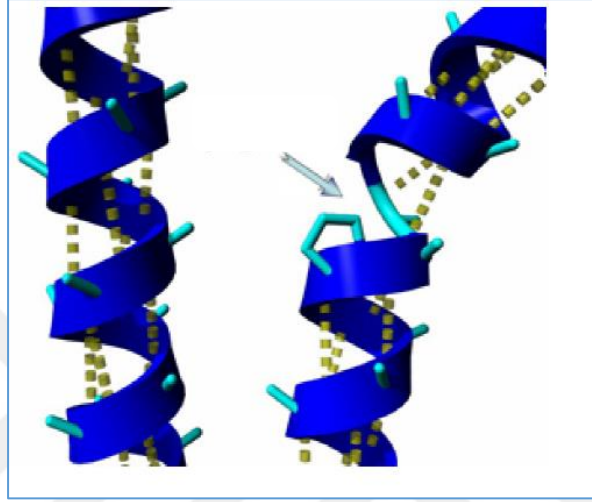
Şekil 5.2: Farklı türlerde 117. aminoasidin dizilimi

Olgu 35'te saptanan c.350 G>C değişikliği için yapılan *in silico* analizlerde PolyPhen-2 programı skoru 0.130, SIFT programı skoru 0 bulunmuştur. 3-boyutlu protein modelleme programları ile 117. aminoasidin arjinin aminoasidinden prolin aminoasidine dönüşmesi sonucu, hemoglobin yapısını değiştiren bir varyasyon olduğunu saptanmıştır. Şekil 4.13'te arjinin ve prolin aminoasitlerinin yapısı verilmiştir.



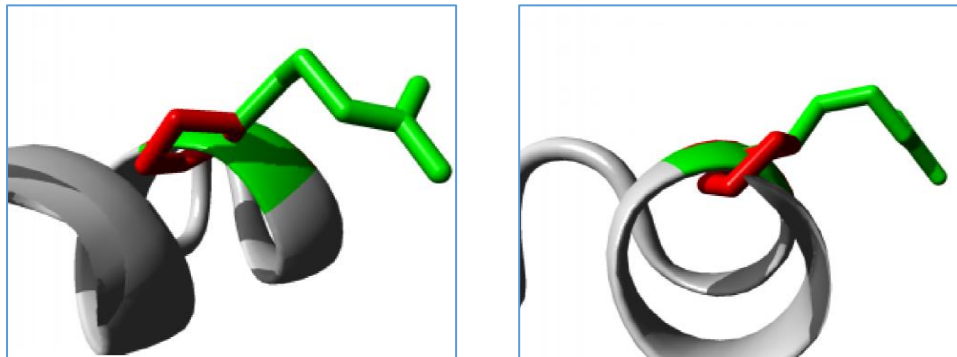
Şekil 5.3: Arjinin ve Prolin aminoasitlerinin şematik yapısı (kırmızı: her aminoasitte aynı olan temel yapı, siyah: her aminoasitte farklı olan yan zincir) [85]

Arjinin aminosidinin prolin aminoasidinden farkı yeni oluşan molekülün özelliklerini belirlemektedir. Yeni oluşan rezidü, wild-type'e göre daha küçüktür. Arjinin pozitif yüklü iken, prolin nötral aminoasittir. Arjinin proline göre daha hidrofobiktir. Boyut ve polarite farkı sonucu, normalde 27. pozisyondaki glutamik asit rezidüsü ile kurulan hidrojen bağı oluşumu etkilenmektedir (şekil 4.14).



Şekil 5.4: Arjinin aminoasidinin Prolin aminoasidine dönüşmesi sonucu Hidrojen bağının kurulmasının engellenmesinin şematik gösterimi [85]

Aminoasit dönüşümü sonucunda molekül boyutunun, yükünün ve polaritesinin değişmesinin diğer moleküllerle etkileşimi değiştirebileceği düşünülmüştür (Şekil 4.15). [85]



Şekil 5.5: Aminoasit değişimi ile molekülün yapısının şematik gösterimi (yeşil: arjinin, kırmızı: prolin)[85]

Bu sebeplerle biz bu değişikliğin daha önce tanımlanmamış bir hemoglobin varyantı olduğunu düşündük.

Bu çalışma Türkiye’de delta globin geni varyasyonları ile ilgili ilk çalışmadır. Bu çalışma ile HbA₂ değeri düşüklüğü nedenlerinden birinin HBD geni değişiklikleri olduğu gösterilmiştir. Varyasyon saptanan bireylerin hiçbirisinde beta talasemi mutasyonu bulunmamıştır. Çünkü beta talasemi taşıyıcılarında, delta globin varyantı bulunması halinde, HbA₂ değeri borderline değerlerde olmaktadır. Çalışmamızda HbA₂ değeri %2 ve altında olan olgular ele alınmış ve %6 oranında delta globin değişikliği taşıyıcılığı saptanmıştır. *HBD* geninde daha önce tespit edilmeyen varyant bir hemoglobin tanımlanmıştır (c.350 G>A, HbA₂-Bornova).

Ayrıca çalışma sonucunda Türkiye popülasyonundaki *HBD* varyasyonlarının belirlenmesi ve bu gendeki varyasyon sıklığı ile tipinin ortaya konmasına yardımcı olmasının literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Bu çalışmada HbA₂ değeri düşük ve HbA₂ fraksiyonunda varyant piki olan 50 olgunun *HBD* geni Sanger dizi analizi yapılmıştır. Çalışmada 8 olguda toplam 7 farklı değişiklik tespit edilmiştir. Saptanan 7 varyasyonun 5'i daha önce tanımlanmış değişikliklerdir. İki değişiklik ise ilk defa bu çalışmada saptanmıştır. Sonuç olarak;

1. Yeni bulunan 2 değişiklikten biri yeni hemoglobin varyantı HbA₂-Bornova olarak dünya literatürüne kazandırılmış, diğeri ise ACMG kriterlerine göre benign olarak değerlendirilmiştir.
2. Varyasyon saptanan olguların laboratuvar bulguları değerlendirilerek fenotip-genotip korelasyonuna katkı sağlanmıştır.
3. Benign varyasyon olarak değerlendirilmeyen varyasyonları taşıyan 3 olgunun 2'sinde alfa talasemi taşıyıcılığı olmasından dolayı, *HBD* geni değişikliklerinin alfa talasemi mutasyonları ile birlikte olabileceği gösterilmiştir.
4. Sadece HPLC analizi ile hipokromi ve mikrositozu olan beta talasemi taşıyıcılarının atlanma riskine karşı, hemogram ve HPLC analizinin birlikte değerlendirilmesinin önemi vurgulanmıştır.
5. Beta talasemi taşıyıcılık taramasında hem toplum sağlığı hem de HPLC'nin sağlıklı değerlendirilmesi açısından demir parametrelerinin bakılmasının önemi ortaya konmuştur.
6. Türkiye popülasyonundaki *HBD* geni varyasyon dağılımı ilk kez değerlendirilmiştir. HbA₂ değeri normal olmayan olgularda *HBD* varyasyon sıklığı %6 olarak bulunmuştur. Bizim ülkemiz gibi beta talasemi taşıyıcılığı sık olan ülkelerde *HBD* geni analizi, taşıyıcılığı maskeleymesi açısından önemlidir.

7. KAYNAKLAR

1. Kountouris, P., et al., *The molecular spectrum and distribution of haemoglobinopathies in Cyprus: a 20-year retrospective study*. Sci Rep, 2016. 6: p. 26371.
2. Weatherall, D.J. and J.B. Clegg, *Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem*. Bull World Health Organ, 2001. 79(8): p. 704-12.
3. Galanello, R. and R. Origa, *Beta-thalassemia*. Orphanet J Rare Dis, 2010. 5: p. 11.
4. Angastiniotis, M., et al., *The impact of migrations on the health services for rare diseases in Europe: the example of haemoglobin disorders*. ScientificWorldJournal, 2013. 2013: p. 727905.
5. Canatan, D., *Thalassemiyas and hemoglobinopathies in Turkey*. Hemoglobin, 2014. 38(5): p. 305-7.
6. Olivieri, N.F., *The beta-thalassemiyas*. N Engl J Med, 1999. 341(2): p. 99-109.
7. Weatherall, D., *2003 William Allan Award address. The Thalassemiyas: the role of molecular genetics in an evolving global health problem*. Am J Hum Genet, 2004. 74(3): p. 385-92.
8. Villegas, A., et al., *Haemoglobinopathies that occur with decreased HbA2 levels: a gene mutation set involving the δ gene at a Spanish centre*. J Clin Pathol, 2017. 70(1): p. 75-80.
9. Hariharan, P., et al., *Delta globin gene variations leading to reduction in HbA2 levels*. Int J Lab Hematol, 2016. 38(6): p. 610-615.
10. Li, J., et al., *Co-inheritance of β - and δ -thalassemia compromising prenatal screening in a Chinese couple seeking prevention*. Fetal Diagn Ther, 2011. 30(1): p. 73-6.
11. Liu, N., et al., *Analysis of δ -globin gene mutations in the Chinese population*. Hemoglobin, 2013. 37(1): p. 85-93.
12. Brittain, T., *Molecular aspects of embryonic hemoglobin function*. Mol Aspects Med, 2002. 23(4): p. 293-342.
13. PERUTZ, M.F., et al., *Structure of haemoglobin: a three-dimensional Fourier synthesis at 5.5-Å resolution, obtained by X-ray analysis*. Nature, 1960. 185(4711): p. 416-22.
14. Marengo-Rowe, A.J., *Structure-function relations of human hemoglobins*. Proc (Bayl Univ Med Cent), 2006. 19(3): p. 239-45.
15. Weatherall, D., *The inherited disorders of haemoglobin: an increasingly neglected global health burden*. Indian J Med Res, 2011. 134: p. 493-7.
16. Higgs, D.R., *Gene regulation in hematopoiesis: new lessons from thalassemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2004: p. 1-13.
17. Thom, C.S., et al., *Hemoglobin variants: biochemical properties and clinical correlates*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2013. 3(3): p. a011858.
18. *hemoglobinopatiler*. 20-05-2017]; Available from: http://www.hemoglobinopatiler.com/index.php?action=sayfa_goster&id=39.
19. Huisman, T.H., *The structure and function of normal and abnormal haemoglobins*. Baillieres Clin Haematol, 1993. 6(1): p. 1-30.
20. Schechter, A.N., *Hemoglobin research and the origins of molecular medicine*. Blood, 2008. 112(10): p. 3927-38.
21. Champe, P.C., R.A. Harvey, and D.R. Ferrier, *Biochemistry*. 4th ed. Lippincott's illustrated reviews. 2008, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. viii, 520 p.

22. Mettananda, S., R.J. Gibbons, and D.R. Higgs, *α -Globin as a molecular target in the treatment of β -thalassemia*. *Blood*, 2015. 125(24): p. 3694-701.
23. Clark, B.E. and S.L. Thein, *Molecular diagnosis of haemoglobin disorders*. *Clin Lab Haematol*, 2004. 26(3): p. 159-76.
24. Klug, W.S. and M.R. Cummings, *Essentials of genetics*. 5th ed. 2005, Upper Saddle River, NJ: Pearson Education. xviii, 568, 54 p.
25. Ribeiro, D.M. and M.F. Sonati, *Regulation of human alpha-globin gene expression and alpha-thalassemia*. *Genet Mol Res*, 2008. 7(4): p. 1045-53.
26. Voon, H.P. and J. Vadolas, *Controlling alpha-globin: a review of alpha-globin expression and its impact on beta-thalassemia*. *Haematologica*, 2008. 93(12): p. 1868-76.
27. Harju, S., K.J. McQueen, and K.R. Peterson, *Chromatin structure and control of beta-like globin gene switching*. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2002. 227(9): p. 683-700.
28. Bank, A., *Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities*. *Blood*, 2006. 107(2): p. 435-43.
29. Stamatoyannopoulos, G., *Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation*. *Exp Hematol*, 2005. 33(3): p. 259-71.
30. Thein, S.L., *Genetic modifiers of beta-thalassemia*. *Haematologica*, 2005. 90(5): p. 649-60.
31. Plant, K.E., S.J. Routledge, and N.J. Proudfoot, *Intergenic transcription in the human beta-globin gene cluster*. *Mol Cell Biol*, 2001. 21(19): p. 6507-14.
32. Ho, P.J. and S.L. Thein, *Gene regulation and deregulation: a beta globin perspective*. *Blood Rev*, 2000. 14(2): p. 78-93.
33. Razin, S.V., et al., *Domains of α - and β -globin genes in the context of the structural-functional organization of the eukaryotic genome*. *Biochemistry (Mosc)*, 2012. 77(13): p. 1409-23.
34. A, P., *Hemoglobinopathies and Thalassemia Syndromes*. 2014.
35. Cao, A. and R. Galanello, *Beta-thalassemia*. *Genet Med*, 2010. 12(2): p. 61-76.
36. Higgs, D.R., J.D. Engel, and G. Stamatoyannopoulos, *Thalassaemia*. *Lancet*, 2012. 379(9813): p. 373-83.
37. Patrinos, G.P., P. Kollia, and M.N. Papadakis, *Molecular diagnosis of inherited disorders: lessons from hemoglobinopathies*. *Hum Mutat*, 2005. 26(5): p. 399-412.
38. Wood, W.G., *Increased HbF in adult life*. *Baillieres Clin Haematol*, 1993. 6(1): p. 177-213.
39. Weatherall, D.J., *Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias*. *Nat Rev Genet*, 2001. 2(4): p. 245-55.
40. Nussbaum, R.L., et al., *Thompson & Thompson genetics in medicine*. 7th ed. 2007, Philadelphia: Saunders/Elsevier. xi, 585 p.
41. Rees, D.C., et al., *Why are hemoglobin F levels increased in HbE/beta thalassemia?* *Blood*, 1999. 94(9): p. 3199-204.
42. Stamatoyannopoulos, G., *The molecular basis of blood diseases*. 3rd ed. 2001, Philadelphia, Pa. London: W.B. Saunders. xv, 1028 p., 10 p. of plates.
43. Perumbeti, A., *Hemoglobinopathies and Thalassemia Syndromes*, in *Pathobiology of Human Disease* L. McManus and R.N.M. Itchell, Editors. 2014. p. 1506–1531.
44. *World Health Organization*. Iron Deficiency Anaemia: Assessment, Prevention and Control 2001 [20-05-2017]; Available from:

- http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/WHO_NHD_01.3/en/.
45. World Health Organization. Haemoglobin concentrations for the diagnosis of anaemia and assessment of severity 2011 20-05-2017]; Available from: <http://www.who.int/vmnis/indicators/haemoglobin.pdf>.
 46. van Wijk, R. and W.W. van Solinge, *The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis*. Blood, 2005. 106(13): p. 4034-42.
 47. Hoffbrand, A.V., P.A.H. Moss, and J.E. Pettit, *Essential haematology*. 6th ed. Essentials. 2011, Malden, Mass.: Wiley-Blackwell. xi, 454 p.
 48. Kountouris, P., et al., *IthaGenes: an interactive database for haemoglobin variations and epidemiology*. PLoS One, 2014. 9(7): p. e103020.
 49. Modell, B. and M. Darlison, *Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators*. Bull World Health Organ, 2008. 86(6): p. 480-7.
 50. Cappellini, M.-D. and A. Cohen. *Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia*. 2008 20-05-2017]; 2nd Revised edition:[Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK173968/>].
 51. Tuzmen, S. and A.N. Schechter, *Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating beta-thalassemia mutations*. Blood Rev, 2001. 15(1): p. 19-29.
 52. Angastiniotis, M. and B. Modell, *Global epidemiology of hemoglobin disorders*. Ann N Y Acad Sci, 1998. 850: p. 251-69.
 53. Kohne, E., *Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment*. Dtsch Arztebl Int, 2011. 108(31-32): p. 532-40.
 54. Canatan, D. and S. Delibas, *Report on Ten Years' Experience of Premarital Hemoglobinopathy Screening at a Center in Antalya, Southern Turkey*. Hemoglobin, 2016. 40(4): p. 273-6.
 55. De Sanctis, V., et al., *β -Thalassemia Distribution in the Old World: an Ancient Disease Seen from a Historical Standpoint*. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2017. 9(1): p. e2017018.
 56. Kılınç, Y., *Hemoglobinopathies in Turkey*. Turk J Haematol, 2006. 23(4): p. 214-6.
 57. Muncie, H.L. and J. Campbell, *Alpha and beta thalassemia*. Am Fam Physician, 2009. 80(4): p. 339-44.
 58. Ozkinay, F., et al., *Molecular Basis of β -Thalassemia in the Population of the Aegean Region of Turkey: Identification of A Novel Deletion Mutation*. Hemoglobin, 2015. 39(4): p. 230-4.
 59. Birgens, H. and R. Ljung, *The thalassaemia syndromes*. Scand J Clin Lab Invest, 2007. 67(1): p. 11-25.
 60. Hardison, R., et al., *Electronic access to sequence alignments, experimental results, and human mutations as an aid to studying globin gene regulation*. Genomics, 1998. 47(3): p. 429-37.
 61. Thein, S.L., *Pathophysiology of beta thalassemia--a guide to molecular therapies*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2005: p. 31-7.
 62. Aydinok, Y., *Thalassemia*. Hematology, 2012. 17 Suppl 1: p. S28-31.
 63. Borgna-Pignatti, C., et al., *Survival and complications in thalassemia*. Ann N Y Acad Sci, 2005. 1054: p. 40-7.
 64. Nair, S., et al., *Rare form of autosomal dominant thalassemia--hemoglobin Hakkari*. Pediatr Blood Cancer, 2014. 61(11): p. 2118-20.

65. Thein, S.L., *Dominant beta thalassaemia: molecular basis and pathophysiology*. Br J Haematol, 1992. 80(3): p. 273-7.
66. Croteau, S.E., et al., *Novel dominant β -thalassemia: Hb Boston-Kuwait [codon 139/140(+T)]*. Pediatr Blood Cancer, 2013. 60(10): p. E131-4.
67. Fernández, R.M., et al., *Novel one-step multiplex PCR-based method for HLA typing and preimplantational genetic diagnosis of β -Thalassemia*. Biomed Res Int, 2013. 2013: p. 585106.
68. Mosca, A., et al., *The role of haemoglobin A(2) testing in the diagnosis of thalassaemias and related haemoglobinopathies*. J Clin Pathol, 2009. 62(1): p. 13-7.
69. Bouva, M.J., et al., *Known and new delta globin gene mutations and their diagnostic significance*. Haematologica, 2006. 91(1): p. 129-32.
70. Brancaleoni, V., et al., *Laboratory diagnosis of thalassemia*. Int J Lab Hematol, 2016. 38 Suppl 1: p. 32-40.
71. Papadakis, M., E. Papapanagiotou, and A. Loutradi-Anagnostou, *Scanning method to identify the molecular heterogeneity of delta-globin gene especially in delta-thalassemsias: detection of three novel substitutions in the promoter region of the gene*. Hum Mutat, 1997. 9(5): p. 465-72.
72. *Gene Cards*. 20-05-2017]; Available from: <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HBD>.
73. Giardine, B., et al., *Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations*. Nucleic Acids Res, 2014. 42(Database issue): p. D1063-9.
74. Alkindi, S., et al., *First report of the spectrum of δ -globin gene mutations in Omani subjects - identification of novel mutations*. Int J Lab Hematol, 2015. 37(2): p. 238-43.
75. Giambona, A., et al., *Significance of borderline hemoglobin A2 values in an Italian population with a high prevalence of beta-thalassemia*. Haematologica, 2008. 93(9): p. 1380-4.
76. Khalil, M.S., et al., *A study of δ -globin gene mutations in the UK population: identification of three novel variants and development of a novel DNA test for Hb A'2*. Hemoglobin, 2014. 38(3): p. 201-6.
77. Yan, J.M., et al., *A New δ -Globin Gene Variant: Hb A2-Fengshun [δ 121(GH4)Glu \rightarrow Lys (HBD: c.364G > A)]*. Hemoglobin, 2016. 40(3): p. 213-4.
78. De Angioletti, M., et al., *Epidemiology of the delta globin alleles in southern Italy shows complex molecular, genetic, and phenotypic features*. Hum Mutat, 2002. 20(5): p. 358-67.
79. Amirian, A., et al., *First report on the co-inheritance of beta-globin IVS-I-5 (G-->C) thalassemia with delta globin CD12 {Asn-->Lys (AAT-->AAA)}HbA₂ -NYU in Iran*. Arch Iran Med, 2011. 14(1): p. 8-11.
80. Eram, S.M., et al., *The IVS-II-1 (G-->a) beta0-thalassemia mutation in cis with HbA2-Troodos [delta116(G18)Arg-->Cys (CGC-->TGC)] causes a complex prenatal diagnosis in an Iranian family*. Hemoglobin, 2005. 29(4): p. 289-92.
81. Phylipsen, M., et al., *Occurrence of common and rare δ -globin gene defects in two multiethnic populations: thirteen new mutations and the significance of δ -globin gene defects in β -thalassemia diagnostics*. Int J Lab Hematol, 2011. 33(1): p. 85-91.
82. Pavlou, E., et al., *Delta-thalassemia in Cyprus*. Hemoglobin, 2006. 30(4): p. 455-62.

83. Giambona, A., et al., *Analysis of delta-globin gene alleles in the Sicilian population: identification of five new mutations*. Haematologica, 2006. 91(12): p. 1681-4.
84. Richards, S., et al., *Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology*. Genet Med, 2015. 17(5): p. 405-24.
85. Venselaar, H., et al., *Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces*. BMC Bioinformatics, 2010. 11: p. 548.
86. Trifillis, P., et al., *Analysis of delta-globin gene mutations in Greek cypriots*. Blood, 1993. 82(5): p. 1647-51.
87. Patrinos, G.P., et al., *Improvements in the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations for population and sequence variation studies*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(Database issue): p. D537-41.
88. Kurtoğlu, A., et al., *β -Thalassemia gene mutations in Antalya, Turkey: results from a single centre study*. Hemoglobin, 2016. 40(6): p. 392-395.
89. Rund, D. and E. Rachmilewitz, *Beta-thalassemia*. N Engl J Med, 2005. 353(11): p. 1135-46.
90. Aldemir, O., M. Izmirli, and H. Kaya, *The spectrum of β -thalassemia mutations in Hatay, Turkey: reporting three new mutations*. Hemoglobin, 2014. 38(5): p. 325-8.
91. Basak, A.N., *The molecular pathology of beta-thalassemia in Turkey: the Boğaziçi university experience*. Hemoglobin, 2007. 31(2): p. 233-41.
92. Luo, H.Y. and D.H. Chui, *Diverse hematological phenotypes of β -thalassemia carriers*. Ann N Y Acad Sci, 2016. 1368(1): p. 49-55.
93. Hassan, S.M., et al., *Known and new δ -globin gene mutations and other factors influencing Hb A2 measurement in the Omani population*. Hemoglobin, 2014. 38(4): p. 299-302.
94. Guiso, L., et al., *Frequency of delta+ 27-thalassaemia in Sardinians*. Clin Lab Haematol, 1996. 18(4): p. 241-4.
95. Kordafshari, A., et al., *Molecular Characterization of δ -Thalassemia in Iran*. Hemoglobin, 2016. 40(1): p. 44-7.
96. Morgado, A., et al., *Mutational spectrum of delta-globin gene in the Portuguese population*. Eur J Haematol, 2007. 79(5): p. 422-8.
97. Keskin, Y., et al., *Prevalence of iron deficiency among schoolchildren of different socio-economic status in urban Turkey*. Eur J Clin Nutr, 2005. 59(1): p. 64-71.
98. Trifillis, P., et al., *Expression studies of delta-globin gene alleles associated with reduced hemoglobin A2 levels in Greek Cypriots*. J Biol Chem, 1996. 271(43): p. 26931-8.
99. Lacerra, G., et al., *Molecular evidences of single mutational events followed by recurrent crossing-overs in the common delta-globin alleles in the Mediterranean area*. Gene, 2008. 410(1): p. 129-38.
100. Sharma, R.S., et al., *Hemoglobin-A2-Coburg or alpha2delta2116Arg leads to His (G18)*. Biochim Biophys Acta, 1975. 393(2): p. 379-82.
101. Loudianos, G., et al., *A new delta chain variant hemoglobin A2-Corfu or alpha 2 delta 2 116 Arg----Cys (G18), detected by delta-globin gene analysis in a Greek family*. Hum Genet, 1991. 87(2): p. 237-8.

102. Trifillis, P., et al., *Identification of four novel delta-globin gene mutations in Greek Cypriots using polymerase chain reaction and automated fluorescence-based DNA sequence analysis*. *Blood*, 1991. 78(12): p. 3298-305.
103. Waye, J.S., et al., *Beta-thalassemia in association with a new delta-chain hemoglobin variant [δ 116(g18)Arg-->Leu]: implications for carrier screening and prenatal diagnosis*. *Am J Hematol*, 2003. 74(3): p. 179-81.

