

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**TÜRK TOPLUMUNDA BETA TALASEMİNİN HIZLI, UCUZ, ETKİN VE
GÜVENİLİR YÖNTEMLE TARANMASI AMACIYLA TARAMA TESTİ
GELİŞTİRİLMESİ**

Derya Kan Karaer

**Danışman Öğretim Üyeleri
Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi
Prof. Dr. E. Ferda Perçin**

**ANKARA
2012**

Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi ve Prof. Dr. E. Ferda Perçin danışmanlığında, Derya Kan Karaer tarafından hazırlanan bu çalışma 09/11/2012 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Temel Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan : Prof. Dr. E. Ferda Perçin İmza :

Üye : Prof. Dr. Hatice Ruhi Ilgın İmza :

Üye : Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz İmza :

Üye : Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün İmza :

Üye : Yrd. Doç. Dr. Halil Karabulut İmza :

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

(imza)

Prof. Dr. Aykut Özkul

Enstitü Müdürü

Türk Toplumunda Beta Talaseminin Hızlı, Ucuz, Etkin Ve Güvenilir Yöntemle Taranması Amacıyla Tarama Testi Geliştirilmesi

ÖZET

Beta globin (HBB) genindeki mutasyonlar orak hücre anemisi, beta talasemi ve diğer anormal hemoglobine neden olur. β talasemi, β globin zincir sentezindeki azalmanın sonucunda oluşan mikrositozis ve hemolitik anemiyle karakterize olan otozomal resesif bir hastalıktır.

Türk populasyonunda beta talasemi taşıyan insanların sıklığı %2.1 olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte bazı bölgelerdeki frekansı %13'lere kadar çıkmaktadır. Türkiye'de yapılan moleküler çalışmalar β -talasemi ile ilişkili 35'den daha fazla farklı mutasyon olduğunu göstermiştir.

Bu çalışmada bizim amacımız, beta globin geninin Türk toplumunda en yaygın 5 β -talasemi mutasyonu olan IVS1-110(G>A), IVS1-6 (T>C), IVS2-1 (G>A), IVS2-745 (C>G), IVS1-1 (G>A) mutasyonları ve orak hücre anemisine neden olan Hb S mutasyonu kapsayan TaqMan prob yöntemi ile çalışan güvenilir ve hızlı tanı konulmasını sağlayan bir real-time kiti geliştirmektir. Çalışmaya, beta talasemi ya da orak hücreli anemi için taşıyıcı/hasta olan mutasyonu bilinmeyen 100 birey ile, çalışılan bölgelerle ilgili mutasyonları bilinen 21 kontrol örneği dahil edilmiştir. Çalışılan olguların 73 (%73)'ünde beta-globin geni mutasyonları gözlenmiştir. Bunlar arasında 16 hastanın beta-globin geni mutasyonları bakımından homozigot olduğu belirlenirken; 54 hastanın ise test kapsamındaki mutasyonlardan yalnızca birini, 3 hastanın ise birleşik heterozigot mutasyon taşıdığı bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçlarına göre; IVS1-110 (G>A) mutasyonu, Türkiye'nin diğer bölgelerinde olduğu gibi en yaygın mutasyon olarak belirlenmiştir.

Geliştirdiğimiz real-time PCR kiti ile elde ettiğimiz sonuçların bir kısmı DNA dizi analizi ile teyit edilmiş ve tüm sonuçlar tutarlı bulunmuştur.

Bu çalışma ile hemoglobin elektroforezi ya da HPLC ile taşıyıcı/ hasta olduğu saptanmış kişilerin moleküler genetik analizlerin yapılması ile kesin, basit, hızlı ve maliyeti düşük tanı konulmasını sağlayan ve beta globin genine ait mutasyonların %76'sını kapsayan hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir real time PCR tarama testi geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: Real-time PCR tarama testi, β -Talasemi, Orak hücreli anemi, Türkiye

Development of a rapid, cheap, effective and reliable screening method for detecting β -Thalassemia mutations in Turkish population

ABSTRACT

Beta globin (HBB) gene mutations cause sickle cell anemia, beta-thalassemia or other abnormal hemoglobin disorders. β -Thalassemia is an autosomal recessive disorder characterized by microcytosis and hemolytic anemia which is a result of the reduced synthesis of β -globin chains in hemoglobin.

The frequency of beta thalassemia in Turkish population is 2.1%. However, the frequency shows regional variations and in some areas it is as high as 13%. Molecular studies on HBB gene, indicated the presence of more than 35 different mutations associated with β -thalassemia.

In this study, our aim was to investigate the most common five mutations among Turkish population in beta-globin gene [IVS1-110 (G> A), IVS1-6 (T> C), IVS2-1 (G> A), IVS2-745 (C > G), IVS1-1 (G> A)] and Hb S mutations that causes sickle cell anemia for developing a kit that is using TaqMan® probe method in order to enable a reliable, fast and real-time diagnosis.

A hundred individual who is carrier/patient for beta thalassemia or sickle cell anemia with unknown mutations and 21 control samples with known mutations were included in this study. Of these cases, 73 (73%) were identified with beta globin gene mutation. Among those, 16 patients were homozygote for beta globin gene mutations; 54 patients were heterozygote and 3 patients were compound heterozygote. According to our results; the IVS1-110 (G>A) is the most frequent mutation in our province as in other geographical regions of Turkey.

We also plan to provide a rapid, simple, certain diagnosis with performing molecular genetic analysis on carrier individuals and develop a rapid, cost-effective and a reliable kit that contains 76% of the β -thalassemia mutations.

Key words: Real-time PCR screening test, β -Thalassemia, Sickle cell anemia, Turkey

Çalışma, “Türk Toplumunda Beta Talaseminin Hızlı, Ucuz, Etkin ve Güvenilir Yöntemle Taranması Amacıyla Tarama Testi Geliştirilmesi” adlı ve 01/2011-37 kodlu proje kapsamında Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, bu tezin oluşması ve sonuçlanması sırasında emeğini ve zamanını harcamaktan kaçınmayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Hatice Ilgın Ruhi'ye,

Doktora eğitimimin başlamasından sonuçlanmasına kadar her aşamasında koşulsuz yanımda olan, hem iş hayatındaki bilgi ve tecrübeleri ile hem de insani yönü ve duruşu ile her zaman örnek aldığım ve alacağım değerli hocam Sayın Prof. Dr. E. Ferda Perçin'e,

Gerek iş hayatımda gerekse eğitim hayatım süresince bilgi ve tecrübesi ile bana yol göstererek, karşılık beklemezsizin desteğini benden esirgemeyen, tezimin oluşması ve şekillenmesinde çok büyük emeği olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Mehmet Ali Ergün'e,

Bilgi ve tecrübeleri ile bana iş ve eğitim hayatımda uzun süredir yol gösteren, her ihtiyaç duyduğumda gülyüzlü tavrı ile yardım ve tecrübelerini paylaşmayı esirgemeyen değerli hocam Sayın Prof. Dr. Meral Yirmibeş Karaoğuz'a,

Birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Sayın Öğr. Gör. Dr. Esra Tuğ'a,

Bu çalışmanın yapılmasında bilgi ve tecrübesi ile bana yardımcı olan Sayın Prof. Dr. Ayhan Kubar'a,

Çalışmamıza verdikleri destekten dolayı Ankara İl Sağlık Müdür Yardımcısı Sayın Dr. Halil Kara'ya, Ankara İl Sağlık Müdür Yardımcısı Sayın Dr. Jale Öztürk'e, Ankara İl Sağlık Müdürlüğü AÇSAP Şube Müdürü Sayın Deniz Çakmak'a ve Ankara İl Sağlık Müdürlüğü Proje Ar-Ge Birim Sorumlusu Sayın Talihanur Aydoğmuş'a,

Çalışmaya olan katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Hülya Kayserili'ye,

Çalışmamıza olan desteğinden dolayı Sayın Prof. Dr. İbrahim Keser'e,

Tez çalışmam süresi boyunca bana verdiği destek ve gösterdiği anlayıştan dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Halil Gürhan Karabulut'a,

Her zaman yanımda olan çalışma arkadaşlarım, sevgili Sezen Güntekin Ergün'e, sevgili Işıl Küçük Kiraz'a, sevgili Ebru Aytekin'e, sevgili Selma Canyurt'a, sevgili Esra Küçük'e, ve sevgili Mehtap Tırpan'a,

Kendilerini tanımaktan ve aynı bölümde birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma,

Çalışmaya olan katkılarından dolayı Haldun Doğan'a ve Hüseyin Aslan'a,

Çalışmam sırasında yardımlarını esirgemeyen sevgili Abdullah Karaer'e,

Her zaman, her konuda desteğini aldığım, hayatımı kolaylaştıran güzel insan Neriman Karaer'e ve öncelikle baba daha sonra hoca kimliği ile kanatlarını hep üzerimde hissettiğim Prof. Dr. Zafer Karaer'e,

Uzun süren eğitim hayatım boyunca gösterdiği anlayış için canım kardeşim Ali Kan'a,

Doğru ve mutlu bir insan olmam için verdikleri emek, gösterdikleri anlayış ve sonsuz sevgileri için canım babam Fahrettin Kan'a ve var olma nedenim annem Hatice Kan'a,

Sonsuz sabrı ve sevgisi için, sevgilim, hayat ve yol arkadaşım, hayattaki en büyük desteğim Kadri Karaer'e,

Doktora eğitimimin tam ortasında dünyaya gelen, hayatımın en değerli varlığı, ışığım, canım kızım Deniz Karaer'e,

Tezimin son aşamalarını benimle birlikte yaşayan, sevinçlerime, endişelerime, yorgunluklarıma ortak olan hayatımın ikinci ışığı içimdeki bebeğime,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Derya Kan Karaer
Ankara, Kasım 2012

KIZLARIM
DENİZ ve YAĞMUR' A.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI.....	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
SEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Hemoglobin.....	4
2.1.1. Hemoglobin (Hb) Molekülünün Yapısı.....	4
2.1.2. Normal Hemoglobinler.....	4
2.2. Hemoglobinopatiler.....	5
2.2.1. Anormal Hemoglobinler.....	6
2.2.1.1. Anormal Hemoglobin Sendromları.....	6
2.2.1.1.1. Hemoglobin S (Hb S- Orak Hücre Anemisi).....	6
2.2.1.1.1.a. Genetiği.....	6
2.2.1.1.1.b. Hb S Beta zincirindeki Aminoasit Değişikliği.....	7
2.2.1.1.1.c. Doku Anoksisi.....	7
2.2.1.1.1.d. Oraklaşmayı arttıran faktörler.....	8
2.2.1.1.1.e. Heterozigotluğun selektif etkisi.....	8
2.2.1.1.1.f. Epidemiyoloji.....	8
2.2.1.1.1.g. Orak Hücre Anemisinde Klinik Bulgular.....	8
2.2.1.1.2. Hemoglobin C (Hb C).....	10
2.2.1.1.3. Hemoglobin SC Hastalığı (Hb SC).....	10
2.2.1.1.4. Hemoglobin D (Hb D).....	10
2.2.1.1.5. Hemoglobin E (Hb E).....	11
2.2.1.1.6. Hemoglobin O Arab.....	11
2.2.1.2. Türkiye’de Hemoglobinopati.....	11
2.2.2. Talasemiler (Polipeptid Zincirlerinin Az ya da Hiç Sentezlenmediği Varyantlar).....	12
2.2.2.1. Tarihçe.....	12
2.2.2.2. Beta Talasemi’nin Epidemiyolojisi.....	12
2.2.2.3. Türkiyede epidemiyoloji.....	13
2.2.2.4. Fiziopatolojisi.....	13
2.2.2.5. Beta Talasemi Kliniği ve Tipleri.....	15
2.2.2.5.a. Sessiz Beta Talasemiler.....	15
2.2.2.5.b. Beta Talasemi Taşıyıcıları (β Talasemi Minor).....	16
2.2.2.5.c. Beta Talasemi Major.....	16
2.2.2.5.d. Beta Talasemi İntermedia.....	17
2.2.2.5.e. Tedavi.....	18
2.2.2.5.f. Demir Şelasyonu.....	19
2.3. Beta Globin Geni.....	20
2.4. Beta Talasemi Mutasyon Tipleri.....	21
2.4.1. Promoter Mutasyonları.....	21
2.4.2. RNA splicing mutasyonları.....	21
2.4.2.1. Yapışma yerlerini tutan mutasyonlar.....	21
2.4.2.2. Yapışma yerlerine yakın dizilerdeki mutasyonlar.....	23

2.4.2.3. İtronlar İçindeki Mutasyonlar.....	23
2.4.2.4. Gizli Yapışma Yerlerini Ortaya Çıkaran Mutasyonlar.....	24
2.4.3. Başlatıcı Kodon Mutasyonları.....	25
2.4.4. Poli A Kuyruğu Mutasyonları.....	25
2.4.5. Nonsense Mutasyonlar (Anlamsız Kodon Oluşumu).....	26
2.4.6. Frameshift Mutasyonlar.....	27
2.5. Türkiye’ de Görülen Beta Talasemi’ nin Moleküler Temeli.....	30
2.6. Türkiye’ de Beta Talaseminin Önlenmesi.....	32
2.7. Beta Talasemide Tanı.....	33
2.8. Moleküler Yöntemler ile Beta Talasemi ve Hemoglobinopati Tanısı.....	35
2.8.1. RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi).....	37
2.8.2. ARMS (Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi).....	38
2.8.3. ASO (Allel Spesifik Oligonükleotid Hibridizasyon)/ RDBH (Reverse Dot- Blot Hibridizasyon).....	39
2.8.4. Gap- PCR.....	40
2.8.5. MLPA (Çoklu Ligasyon Prob Analizi).....	40
2.8.6. QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments).....	40
2.8.7. DNA Dizi Analizi.....	41
2.8.8. Real-Time PCR.....	41
2.8.8.1. Real- time PCR’da Görüntü	42
2.8.8.2. Real-time PCR’ın Temel Fazları.....	42
2.8.8.3. Real- time PCR ile DNA ve RNA belirlenmesi.....	44
2.8.8.3.1. Özgül Olmayan Belirleme Sistemleri.....	44
2.8.8.3.1.a. SYBR Green I.....	44
2.8.8.3.2. Özgül Belirleme Sistemi.....	44
2.8.8.3.2.a. Moleküler Beacons (Moleküler İşaret/ Fener).....	45
2.8.8.3.2.b. Scorpions Prob.....	45
2.8.8.3.2.c. Hibridizasyon Prob Yöntemi.....	45
2.8.8.3.2.d. TaqMan Prob Yöntemi.....	46
3. MATERYAL VE YÖNTEM	48
3.1 Materyal.....	48
3.1.1. Olguların Seçimi.....	48
3.2. Araç-Gereçler.....	48
3.2.1. Kullanılan Cihazlar.....	48
3.2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	49
3.2.3. Kullanılan Çözeltiler.....	50
3.3. Yöntem.....	51
3.3.1. Hasta Kanlarının Alınması.....	51
3.3.2. DNA İzolasyonu.....	51
3.3.3. HBB (Hemoglobin, Beta) Geninin Tüm Dizisine Erişilmesi	53
3.3.4. HBB Genini Dizilemek İçin Primer Tasarlanması.....	53
3.3.5. Sekans Primerlerinin Blast Sonuçları.....	55
3.3.6. HBB Geni Sekans Primerleri ile PCR Optimizasyonu.....	57
3.3.7. HBB Genine Ait Sekans Primerleri İle Çoğaltılmış PCR Ürünlerinin Kontrolü.....	58
3.3.8. HBB Genine Ait Sekans Primerleri İle Çoğaltılmış PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizi.....	59
3.3.9. Çalışma Kapsamına Alınan Mutasyon Bölgelerinin HBB Geni Üzerindeki Yerleri	59
3.3.10. Real- Time PCR Primer ve Prob Tasarımı.....	60

3.3.11. İnternal Kontrol Primerleri.....	62
3.3.12. Raportör ve Baskılayıcılar.....	63
3.3.13. Real- Time PCR Optimizasyonu ve PCR İçin Reaksiyon Koşulları.....	64
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	69
4.1. HBB Geni Sekans Primerleri PCR Optimizasyonu Görüntüleri.....	69
4.2. HBB Genine Ait Sekans Primerleri İle Çoğaltılmış Kontrol PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizi Sonuçları.....	71
4.3. Kontrol DNA' larının Real-Time PCR Çalışma Sonuçları.....	72
4.4. Hasta DNA' larının Real-Time PCR Çalışma Sonuçları.....	73
4.5. Real-Time PCR Sonuçlarını Teyit İçin Gönderilen Örneklerin DNA Dizi Analiz Sonuçları.....	84
5. TARTISMA VE SONUÇ.....	86
KAYNAKLAR.....	97
EKLER.....	103
EK 1: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu.....	103
EK 2: Çalışmanın Etik Kurul Kararı	111
EK 3: Projeye Ait Sözleşme Protokolü.....	114
ÖZGEÇMİŞ.....	117

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 A. Normal eritrositler B. Hb S taşıyan eritrositler	7
Şekil 2.2 Beta talaseminin fizyopatolojisi.....	14
Şekil 2.3 11.kromozomda yer alan β -globin gen kümesi.....	20
Şekil 2.4 PCR'ın fazları.....	43
Şekil 2.5 Taqman problemleri.....	47
Şekil 3.1 HBB hemoglobin, beta genin dizisi.....	53
Şekil 3.2 Sekans primerlerinin gen üzerindeki genel gösterimi.....	55
Şekil 3.3 HBB geni sekans primer 1 blast sonucu.....	56
Şekil 3.4 HBB geni sekans primer 2 blast sonucu.....	56
Şekil 3.5 HBB geni sekans primer 3 blast sonucu.....	57
Şekil 3.6 Çalışma kapsamına alınan mutasyon bölgelerinin gen üzerindeki gösterimi....	59
Şekil 3.7 IVS-I-110 (G>A) için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi.....	60
Şekil 3.8 IVSI-1(G>A) için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi.....	60
Şekil 3.9 IVSI-6 (T>C) için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi.....	61
Şekil 3.10 IVSII-745(C>G) için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi.....	61
Şekil 3.11 IVSII-1(G>A) için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi.....	62
Şekil 3.12 Hb S [Glu-Val, GAG-GTG] için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi	62
Şekil 3.13 İnternal kontrol prob ve primerlerinin dizi üzerinde gösterimi	63
Şekil 4.1 HBB sekans primer 1 PCR agaroz jel görüntüsü	69
Şekil 4.2 HBB sekans primer 2 PCR agaroz jel görüntüsü.....	70
Şekil 4.3 HBB sekans primer 3 PCR agaroz jel görüntüsü.....	70
Şekil 4.4 IVSI-1 G/A mutasyon bölgesi için; GA heterozigot örneğinin realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri.....	75
Şekil 4.5 IVSI-1 G/A mutasyon bölgesi için; AA homozigot mutant örneğinin realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri	75
Şekil 4.6 IVSI-1 G/A mutasyon bölgesi için; GG homozigot normal örneğinin realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri	76
Şekil 4.7 IVSI-110 G/A mutasyon bölgesi için; GA heterozigot örneğinin realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri.....	76
Şekil 4.8 IVSI-110 G/A mutasyon bölgesi için; AA homozigot mutant örneğinin realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri	77

Şekil 4.9 IVSI-110 G/A mutasyon bölgesi için; GG homozigot normal örneğinin realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri	77
Şekil 4.10 IVSI-6 T/C mutasyon bölgesi için; TC heterozigot örneğinin realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri.....	78
Şekil 4.11 IVSI-6 T/C mutasyon bölgesi için; CC homozigot mutant örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri	78
Şekil 4.12 IVSI-6 T/C mutasyon bölgesi için; TT homozigot normal örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri	79
Şekil 4.13 IVSII-1 G/A mutasyon bölgesi için; GA heterozigot örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri.....	79
Şekil 4.14 IVSII-1 G/A mutasyon bölgesi için; AA homozigot mutant örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri	80
Şekil 4.15 IVSII-1 G/A mutasyon bölgesi için; GG homozigot normal örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri	80
Şekil 4.16 IVSII-745 C/G mutasyon bölgesi için; CG heterozigot örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri.....	81
Şekil 4.17 IVSII-745 C/G mutasyon bölgesi için; GG homozigot mutant örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri.....	81
Şekil 4.18 IVSII-745 C/G mutasyon bölgesi için; CC homozigot normal örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri.....	82
Şekil 4.19 HbS GAG>GTG mutasyonu için; AT heterozigot örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri.....	82
Şekil 4.20 HbS GAG>GTG mutasyonu için; TT homozigot mutant örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri	83
Şekil 4.21 HbS GAG>GTG mutasyonu için; AA homozigot normal örneğinin real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri	83

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Beta talasemi major ve beta talasemi intermedia arasında ayırıcı özellikler..	18
Çizelge 2.2 Yapışma yerini tutan mutasyonlar.....	22
Çizelge 2.3 Yapışma yerlerine yakın dizilerdeki mutasyonlar.....	23
Çizelge 2.4 İntronlar içinde meydana gelen ve alternatif yapışma yerleri oluşturan mutasyonlar.....	24
Çizelge 2.5 Gizli yapışma yerlerini ortaya çıkaran değişimler.....	24
Çizelge 2.6 Başlatıcı Kodon Mutasyonları.....	25
Çizelge 2.7 Poli A Kuyruğu Mutasyonları.....	26
Çizelge 2.8 Nonsense Mutasyonlar.....	26
Çizelge 2.9 Frameshift mutasyonlar	27
Çizelge 2.10 Türkiye’ de görülen mutasyonların coğrafik bölgelere göre frekansı	30
Çizelge 2.11 Beta talasemi tanısında kullanılan birinci basamak testler.....	34
Çizelge 2.12 Beta talasemi tanısında kullanılan ikinci basamak testler.....	35
Çizelge 2.13 Restriksiyon enzimi ile tanımlanabilen bazı β talasemi mutasyonları.....	38
Çizelge 3.1 HBB sekans primerleri, PCR ürün uzunlukları ve bağlanma ısıları.....	54
Çizelge 3.2 HBB geni sekans primerleri PCR optimizasyonu reaksiyon koşulları.....	58
Çizelge 3.3 HBB geni sekans primerleri PCR optimizasyonu termal döngü koşulları.....	58
Çizelge 3.4 Problar için kullanılan raportör ve baskılayıcılar.....	63
Çizelge 3.5 Konvansiyonel PCR optimizasyonu reaksiyon koşulları.....	64
Çizelge 3.6 Konvansiyonel PCR optimizasyonu termal döngü koşulları	64
Çizelge 3.7 IVSI-1 mutasyon bölgesinin real-time PCR optimize reaksiyon koşulları	65
Çizelge 3.8 IVSII-1 mutasyon bölgesi real-time PCR optimize reaksiyon koşulları.....	66
Çizelge 3.9 Real-time PCR IVSI-110 mutasyon bölgesi optimize reaksiyon koşulları	66
Çizelge 3.10 Real-time PCR IVSII-745 mutasyon bölgesi optimize reaksiyon koşulları	67
Çizelge 3.11 IVSI-6 mutasyon bölgesi real-time PCR optimize reaksiyon koşulları.....	67
Çizelge 3.12 Hb S mutasyon bölgesi real-time PCR optimize reaksiyon koşulları.....	68
Çizelge 3.13 Real-time PCR optimizasyonu termal döngü koşulları.....	68
Çizelge 4.1 Kontrol DNA’ larının taşıdıkları mutasyonlar ve DNA kodları.....	72
Çizelge 4.2 Hastalara ait real-time PCR sonuçları	74
Çizelge 4.3 DNA dizi analizine gönderilen örneklerin real-time ve dizi analiz sonuçları.....	85

SİMGELER DİZİNİ

A	Adenin
α	Alfa
ARMS	Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (Amplification Refractory Mutation System)
ASO	Alel Spesifik Oligonükleotid
AS-APEX	Alel Spesifik Primer Uzaması (Allele Specific Arrayed Primer Extension)
β	Beta
bç	Baz Çifti
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
C	Sitozin
Cd	Kodon (Codon)
CO ₂	Karbondioksit
C _T	Eşik Döngü (Threshold Cycle)
γ	Gama
δ	Sigma
ϵ	Epsilon
Da	Dalton
DGGE	Denatürasyon Gradient Jel Elektroforezi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
DHPLC	Denatüre Edici Yüksek Performanslı Likit Kromatografi (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Trifosfat
ddNTP	Di Dioksi Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
dk	Dakika
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
FRET	Floresans Rezonans Enerji Transferi (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
Fsc	Framesift (Çerçeve Kayması)
g	Gram
G	Guanin
GAPDH	Gliseraldehit-3-Fosfat Dehidrogenaz (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)
Glu	Glutamik asit
Hb	Hemoglobin
HBB	Hemoglobin beta
HPLC	Yüksek basınçlı likit kromatografi
KCl	Potasyum Klorür
Lys	Lizin
μ l	Mikro Litre
MgCl	Magnezyum Klorür
mRNA	Messenger Ribo Nükleik Asit
MCV	Ortalama Eritrosit Hacmi (Mean Corpuscular Volume)

MCH	Ortalama Hemoglobin Hacmi (Mean Corpuscular Hemoglobin)
MLPA	Çoklu Ligasyon Prob Analizi (Multiplex Ligation –dependent Probe Amplification)
O ₂	Oksijen
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RDBH	Ters Dot-Blot Hibridizasyon (Reverse Dot-Blot Hybridization)
RFLP	Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ribo Nükleik Asit
T	Timin
TBE	Tris, borik asit, EDTA
T _m	Erime Sıcaklığı (Melting Temperature)
QMPSF	Kısa Fragment Kantitatif Multiplex PCR (Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments)
UV	Mor Ötesi (Ultra Violet)

1. GİRİŞ

Otozomal resesif geçişli bir hastalık olan talasemiler globin zincir yapımının azalmasına ya da yapılamamasına bağlı olarak ortaya çıkar ve oldukça geniş bir genetik yelpazeyi kapsar. Talasemiler sentezi bozulmuş olan globin zincirine göre alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), delta-beta ($\delta\beta$), epsilon-gama-delta-beta ($\epsilon\gamma\delta\beta$) talasemi olarak adlandırılırlar. En sık görülen tipleri α ve β talasemidir. Alfa talasemi daha ziyade Uzak Doğu'da görülürken, β talasemi Akdeniz ülkeleri ve Türkiye'de sık gözlenen tek gen hastalıklarından olup, hemolitik anemi ve mikrositoz ile karakterizedir. Tek tip bir mutasyonun neden olduğu orak hücreli anemi'nin aksine β talasemi moleküler düzeyde çok heterojendir.

11. kromozomun kısa kolunda 15.5 bölgesinde (11p15.5) yer alan β globin (HBB) geni 1600 bç (baz çifti) uzunluğunda, 146 aminoasidi kodlayan 3 ekzon ve 2 introndan oluşan bir gendir (Birgens and Ljung 2007). Bu gendeki mutasyonlar orak hücreli anemi (Hb S), β talasemi ya da diğer bir anormal hemoglobine neden olmaktadır (Gonca vd 2009).

Beta talasemide moleküler bozukluk β zincirinin hiç yapılmasına veya az yapılmasına neden olur. Bu esnada α zincir yapımı normal hızda devam eder ve α ve β globin zincir yapımındaki dengesizliğe bağlı olarak aşırı α zinciri eritrositlerde çöker. Bu durum eritrosit zarında hasara ve kemik iliğinde yıkıma yol açar. Bu şekilde inefektif eritropoez ile birlikte periferel dokuda ortaya çıkan hemoliz, Hemoglobin (Hb) sentezinde azalmaya yol açar (Kutlu vd 2006).

Günümüzde β globin geninde 200 civarında mutasyonun bulunduğu belirtilmektedir. Beta talasemi mutasyonları oldukça çeşitlidir ve genin farklı bölgelerine dağılmıştır. Bu mutasyonlar; promotor bölge mutasyonları, splicing mutasyonları, mRNA'nın 5' ucuna "cap" ve 3' ucuna "poli A" kuyruğunun eklenmesi ile ilişkili mutasyonlar, dur kodonuna neden olan mutasyonlar ya da çerçeve kayması mutasyonları olarak sınıflandırılabilir. Beta talasemi'de genin büyük bir kısmının kaybına neden olan mutasyonlar nadirdir.

Dünyadaki en yaygın tek gen hastalığı olan beta talasemi hastalığı için Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) anormal hemoglobin sıklığını %5.1 olarak bildirmiştir (World Health Organization 1994). Tüm dünyada klinik olarak bulgu veren 15 milyon talasemik bozukluk taşıyan kişi olduğu tahmin edilmektedir ve Akdeniz ülkeleri (en sık Yunanistan, İtalya, İspanya), Afrika ve Güney Doğu Asya'da sık görülmektedir.

Türkiye’de β talasemi taşıyıcılığı Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde sık görülmektedir. Sağlık Bakanlığı ve Ulusal Türk Hemoglobinopati Konseyi verilerine göre β talasemi taşıyıcı sıklığının % 0,6-13 arasında değiştiği bildirilmiştir. Türkiye’de yaklaşık 1.300.00 kişi taşıyıcı ve 4000 civarında hasta olduğu belirtilmektedir. Ülkemizde akraba evliliğinin (ortalama %20,9) (TÜİK Aile Yapısı Araştırması 2006) ve doğurganlığın yüksek oranda olması, etkilenen birey sayısının artışıyla önemli etkenlerden biridir.

Türkiye’de en yaygın olarak görülen β gen mutasyonları ve sıklıkları şu şekildedir;

1	%40,88 sıklıkta	IVSI-110	(G>A)
2	%10,3 sıklıkta	IVSI-6	(T>C)
3	%8,1 sıklıkta	IVSII-1	(G>A)
4	%6,2 sıklıkta	IVSII-745	(C>G)
5	%5,7 sıklıkta	IVSI-1	(G>A)
6	%4,9 sıklıkla	Hb S	

Tüm bu 5 β talasemi mutasyonu toplam β globin gen mutasyonlarının %71,18’ni Hb S mutasyonu ile birlikte ise toplamda %76’sını oluşturmaktadır. (Tadmouri vd 1998, Altay 2002). Türkiye’de yapılan moleküler çalışmalar β talasemi ile ilişkili 35’den daha fazla farklı mutasyon olduğunu göstermiştir.

Talasemi mutasyonları, prenatal, natal ve erişkin dönemde taranabilir. Günümüz konvansiyonel tanı metodlarından; eritrosit indeksi ve morfolojisi, Hb elektroforezi, Hb A2 belirlenmesi ve eritrositler içinde Hb H inklüzyon cisimlerinin saptanması gibi yöntemler doğru tanı sağlasa da gen düzeyindeki mutasyonu belirleyemez.

Beta talasemide tanı şunları içerir: Öncelikle Hb elektroforezi veya HPLC (Yüksek basınçlı likit kromatografi) gibi standart yöntemler uygulanır. Bu yöntemlerle risk içeren çiftler büyük bir ölçüde saptanabilir. Ancak, sessiz taşıyıcı ya da diğer beta talasemiler gibi benzer durumların ayırıcı tanısında güçlükler olabilir. Bu nedenle moleküler yöntemler uygulanarak risk altında olan çiftlerin kesin tanısı konabilir ve prenatal tanı sağlanabilir. Talasemi mutasyonlarının belirlenmesinde halen kullanılan moleküler yöntemler oligonükleotid hibridizasyonu, restriksiyon endonükleaz analizi, allele özgü primer

analizleri (ARMS) tekniği, StripAssay, Light-Cycler teknolojisi ve beta globin geninin DNA dizi analizi gibi tekniklerdir.

DNA dizi analizi dışındaki moleküler yöntemler Hb elektroforezi gibi yöntemlere göre güvenilir ve kesin tanı imkanı sağlamaları yanında DNA dizi analizi yöntemine göre de daha ekonomiktir.

Taşıyıcılığın ve gebelik oranının bu kadar yüksek olduğu úlkemizde talasemi eradikasyonu için yeni yöntemler uygulanması zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda, Türkiye'deki β globin geni mutasyon çalışmalarında elde edilen verilerden yola çıkarak beta talasemide en sık gözlenen mutasyonlardan; IVSI-110 (G>A), IVSI-6 (T>C), IVSII-1(G>A), IVSII-745(C>G), IVSI-1(G>A) ve orak hücreli anemiye neden olan Hb S mutasyonu test kapsamına alındı. Bu mutasyonların saptanması aynı anda birçok mutasyonu tarayabilmesi, kolay, güvenilir ve mutasyon saptama problemleri konusunda esnek olması, elektroforez gibi PCR sonrası işlemlere gerek duyulmaması gibi nedenlerden dolayı oldukça avantajlı bir yöntem olan real-time PCR (Taqman) uygulamasına uyarlanarak, bir mutasyon tarama testi oluşturulması amaçlandı.

Sonuç olarak, sunulan bu tez çalışmasında; taşıyıcı/ hasta olduğu saptanmış olan kişilerde moleküler genetik analizlerin yapılması ile kesin, basit, hızlı ve maliyeti düşük tanı konulmasını sağlamak ve toplam β globin gen mutasyonlarının %76'sını kapsayacak hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir kit geliştirilmesi amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Hemoglobin

Eritrositlerde bulunan Hemoglobin (Hb) molekülü akciğerlerden dokulara oksijen (O₂) ve dokulardan akciğerlere karbondioksit (CO₂) taşır. Hb'nin görevi organ ve dokuların fonksiyonlarını yapabilmeleri için hayati öneme sahiptir (Murray vd 1988).

Sferik yapıda olan Hb, yaklaşık 6,4 nm çapında ve 64,500 Da molekül ağırlığına sahip konjuge bir proteindir. Hücre kuru ağırlığının %60'ını oluşturan Hb molekülü, kan proteinlerinin de 2/3'ünü oluşturmaktadır. Erkeklerde 100 ml kanda, ortalama 15 g, kadınlarda 13 g, yenidoğanlarda ise yaklaşık 20 g kadar Hb bulunmaktadır (Huisman 1995, Altan 2000).

2.1.1. Hemoglobin (Hb) Molekülünün Yapısı

Tetramer yapıda olan Hb molekülü "globin" adı verilen protein kısım ile "hem" adı verilen prostetik gruptan oluşmaktadır. Molekülün globin kısmında 4 adet polipeptid zinciri bulunur. Ortasında Fe⁺² bulunan, yan zincirlere sahip, metil köprüleriyle birbirine bağlanmış 4 pirok halkasından oluşan hem grubu tüm hemoglobinlerde aynı yapıdadır. Buna karşılık globin zincirleri, aminositlerin cinsi, sırası ve sayısı açısından farklılık gösterir (Huisman 1993). İnsanda Hb molekülünün globin kısmında alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), epsilon (ε), ve zeta (ζ) olmak üzere 6 farklı polipeptid zinciri tanımlanmıştır. Bunlardan α, 141 diğeri 146 aminoasitten oluşmaktadır (Huisman 1993, Huisman 1995, Clarke and Higgins 2000).

2.1.2. Normal Hemoglobinler

Normal hemoglobinler 4 hem halkası ve 2 farklı globin zincirinden oluşur. İnsandaki normal hemoglobinler, Hb A, Hb A₂, Hb F, Hb Gower II ve Hb Portland'dır. Bu hemoglobinlerde hem halkası aynı olup, globin yapısı farklıdır (Murray vd 1988, Clarke and Higgins 2000, Altan 2000).

Hemoglobin A (Hb A): Yetişkinlerde bulunan hemoglobindir, 2 α , 2 β polipeptid zincirinden oluşmaktadır. Sağlıklı yetişkinlerde bulunan hemoglobinin %97'si Hb A'dan oluşur.

Hemoglobin A2 (Hb A2) : Doğumdan yaklaşık 12 hafta sonra sentezlenir. Hb A2, 2 α ve 2 δ polipeptid zinciri içerir. Sağlıklı erişkinlerde ki hemoglobinin %2'sini oluşturur.

Hemoglobin F (Hb F): Fetusta ve yenidoğanda sentezlenen başlıca hemoglobindir. İki α ve 2 γ polipeptid zinciri içerir. Gebelik ilerledikçe fetusta Hb F düzeyi azalırken, Hb A düzeyi artış gösterir. Yenidoğandaki hemoglobinin yaklaşık %80'nini Hb F, %20'sini Hb A oluşturur. Hb F, 6 aylık bebekte %5'in, 3 ila 4 yaşlarındaki çocuklarda da %1'lerin altına düşerek erişkinlerdeki düzeye gelir.

Hb Gower I, Hb Gower II, Hb Portland: Bu hemoglobinler embriyonik hemoglobinlerdir ve gebeliğin ilk 3 aylık döneminde fetusta bulunurlar. Gebelik 13. haftaya geldiğinde fetusta kaybolur ve yerini Hb F'e bırakırlar. **Hb Gower I**, 2 ζ ve 2 ϵ polipeptid zincirinden, **Hb Gower II**, 2 α ve 2 ϵ ve son olarak **Hb Portland**, 2 ζ ve 2 γ polipeptid zincirinden oluşur (Dönbak 2005, Birgens and Ljung 2007).

2.2. Hemoglobinopatiler

Hemoglobinopatiler dünyada en yaygın görülen kalıtsal hastalıklardan biridir. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünyada hemoglobinopati taşıyıcı sıklığını % 5,1, hasta kişi sayısını 266 milyon olarak açıklamıştır . Her yıl yaklaşık 300.000 hasta çocuğun dünyaya geldiği bildirilmiştir (WHO 1996). Çoğunlukla Asya, Akdeniz ve Afrika ülkelerinde görülen bu kalıtsal hastalık, göçler nedeniyle Amerika, Avrupa ve Avustralya'ya da yayılmıştır (Cavalli vd. 1996).

Hemoglobinopatiler genel anlamda iki gruba ayırmak mümkündür (Dönbak 2005).

- 1- Anormal Hemoglobinler (Polipeptid zincirinde yapısal değişiklikler içeren varyantlar)
- 2- Talasemiler (Polipeptid zincirlerinin az ya da hiç sentezlenmediği varyantlar)

2.2.1. Anormal Hemoglobinler

Hemoglobin varyantları, polipeptid zincirlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Bu mutasyonlar genlerin ekzon bölgelerinde ya da ekzon bölgelerinin dışında ve nokta mutasyonu, insersiyon, delesyon gibi değişik şekillerde görülebilir. Mutasyonların büyük kısmını nokta mutasyonları oluşturmaktadır (Huisman 1993, Huisman 1995).

Günümüzde 938 hemoglobin varyantı tanımlanmıştır (Giardine vd 2007). Bu varyantlar; α , β , γ , δ zincir varyantları, füzyon gen varyantları, hibrit zincir varyantları, delesyon ve insersiyon içeren varyantlar olabilir. Bu varyantlardan bazıları klinik öneme sahip değil iken, bazıları yüksek veya düşük oksijen afinitesi ya da instabil hemoglobine neden olarak klinik önem taşır (Dönbak 2005, Giardine vd 2007).

2.2.1.1. Anormal Hemoglobin Sendromları

Hemoglobin S (Orak Hücre Anemisi)

Hemoglobin C (Hb C)

Hemoglobin SC Hastalığı (Hb SC)

Hemoglobin D (Hb D)

Hemoglobin E (Hb E)

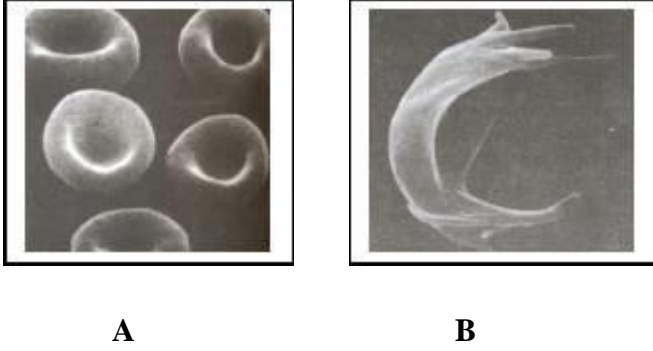
Hemoglobin O Arab (Hb O Arab) (Lukens and Lee 1993) .

2.2.1.1.1. Hemoglobin S (Hb S- Orak Hücre Anemisi)

2.2.1.1.1.a. Genetiği

Hb S, hemoglobin molekülünün ilk keşfedilen varyantıdır. β -globin geninin 6. kodonundaki bir nokta mutasyonu ile ortaya çıkan Hb S'nin nedeni, GAG'nin GTG' ye dönüşmesi sonucunda glutamik asit yerine valin aminoasitinin kodlanmasıdır (Apak 2001, Dönbak 2005, www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/nazlibasak.pdf, 2012). Bu tek aminoasit değişimi ile Hb S taşıyan eritrositler deoksijenasyonla orak şeklini alarak kristalize olur ve

eritrositlerin parçalanması ile çeşitli klinik problemlere yol açarlar (Apak 2001, Öner 2002). Şekil2.1



Şekil 2.1: A. Normal eritrositler, B. Hb S taşıyan eritrositler (Öner 2002)

2.2.1.1.1.b. Hb S Beta zincirindeki Aminoasit Değişikliği

Hb S'deki aminoasit değişikliği, alkali pH'daki elektroforez sırasında Hb S molekülünün pozitif elektroda (anoda) Hb A'dan daha yavaş göç etmesine neden olur. Hb S'nin mobilitesindeki bu farklılık iki β zincirinde negatif yüklü glutamat kalıntılarının olmaması ve bu nedenle Hb S'nin Hb A'ya göre daha az negatif olmasından kaynaklanır. Hemogloblin elektroforezi orak hücre taşıyıcılığı ve hastalığını tespit etmek için rutin olarak kullanılır (Champa vd 2007).

2.2.1.1.1.c. Doku Anoksisi

Nonpolar valinin, glutamik asit yerine geçmesi ile Hb S'nin deoksijene formunun çözünürlüğünde belirgin bir azalma meydana gelir. Bu şekilde Hb S'ler uzun mikrotübüler taktoid adı verilen yapılar oluştururlar. Eritrositler bu taktoidler nedeniyle deforme olurlar ve hafifçe bükülerek orak şeklini alırlar. Böyle oraklaşmış hücreler sıklıkla küçük çaplı damarlarda kan akımını bloke ederler. Oksijen sağlanmasındaki bu kesinti hücre ölümlerine neden olan lokalize anoksilere (oksijen sızlığı) neden olur (Apak 2001, Champa vd 2007).

2.2.1.1.1.d. Oraklaşmayı artıran faktörler

Oraklaşmanın derecesi dolayısıyla hastalığın ciddiyeti, deoksi haldeki Hb S oranını arttıran (Hb S'nin oksijene ilgisini azaltan) bazı nedenler ile artar. Asidoz, dehidratasyon, hipotermi, ve kan viskozitesindeki değişiklikler oraklaşmayı arttırır. Bunlara da yüksek irtifa, artmış CO₂ konsantrasyonu ve azalmış pH gibi faktörler neden olur (Champa vd 2007, www.talasemifederasyonu.org.tr/pdf/tani/cansinTedavi-9pdf.pdf, 2012).

2.2.1.1.1.e. Heterozigotluğun Selektif Etkisi

Afrikalı zenciler arasında görülen Hb S genini heterozigot taşıyan bireylerde selektif bir avantajın bulunduğu, Hb S heterozigot bireylerin *Plasmodium falciparum* malarya parazitiine karşı, Hb A taşıyanlardan daha dirençli olduğu ve bireylerde hastalığın daha hafif seyrettiği saptanmıştır. Yaşam döngüsünün büyük kısmını eritrositler içinde geçiren *Plasmodium falciparum*, Hb S için heterozigot ve homozigot olan kişilerde alyuvar hücrelerinin ömrünün normal hücrelere göre daha kısa (16 gün) olması nedeniyle gelişim basamağını tamamlayamaz. Bu durum malaryanın başlıca ölüm nedeni olduğu yerlerde, bir avantaj sağlayarak biyolojik direnç-çevre arasındaki ilişkiye güzel bir örnek oluşturur (Flint vd 1998, Champa vd 2007).

2.2.1.1.1.f. Epidemiyoloji

Türkiye de en sık görülen anormal hemoglobinin olan Hb S Tropikal Afrika' da %20, bazı Afrika kabilelerine %40 oranında görülmektedir. Hb S ayrıca Yunanistan, Güney İtalya, İspanya gibi Akdeniz ülkelerinde, Orta Asya'daki Arap ülkelerinde, Kuzey ve Güney Amerika zencilerinde ve Doğu Hindistan'da görülmektedir (Apak 2001, Dönbak 2005).

2.2.1.1.1.g. Orak Hücre Anemisinde Klinik Bulgular

Hb S heterozigot bireyler, orak hücre taşıyıcısıdırlar. Eritrositlerde Hb A ve Hb S birlikte bulunur. Hb S heterozigot bireylerin fiziksel gelişimleri, aktiviteleri ve yaşam süreleri genellikle normal sınırlar içindedir. (Lukens and Lee 1993). Hb S homozigot bireylerde otozomal resesif hastalık olan "orak hücre anemisi" görülür. Hastalık önemli klinik

bulgulara sahiptir. Hastalar genellikle yaşamlarının ilk yıllarında kaybedilmektedir. Bu bireylerin eritrositlerinde Hb S ve Hb F bulunmaktadır. (Lukens and Lee 1993, Huisman 1995). Her iki ebeveynin de Hb S taşıyıcısı olduğu durumlarda, doğacak çocuğun Hb S taşıyıcısı olma olasılığı %50 iken hasta olma olasılığı %25 ve normal olma olasılığı %25'dir. Bu oranlar her hamilelik için aynıdır (Dönbak 2005).

Hastalığın klinik bulguları iki genel başlık altında toplanır (Apak 2001).

1-Kronik Hemoliz ile İlgili Bulgular

Anemi

Sarılık

Kolelityaz

Aplastik kriz

Hemolitik kriz (Apak 2001).

2-Vazo-okluzif Hastalık ile İlgili Bulgular

Daktilit: Homozigot hastalarda el ve ayak parmaklarında infarkt ve iskemi nedeni ile 6 ay civarında ortaya çıkan ilk belirtilerdendir.

Otosplenektomi: Çocukluk çağının başlarında orak şeklindeki hücrelerin dolaşımdan temizlenmesi nedeniyle dalak büyüklüğü vardır. Sonraları infarktlar nedeniyle fibrotikleşir.

Priapizm: Sürekli ve ağrılı penil ereksiyona denir. Corpora cavernosa' daki tıkanma nedeniyle görülür. Cerrahi müdahale gerekebilir.

Renal papiller nekroz: Renal papillanın tıkanması sonucunda idrar konsantare edilemez. Hematüriye neden olan bu durum taşıyıcılarda bile görülebilir.

Sekestrasyon krizi: Küçük yaş grubunda en önemli ölüm sebebi olan sekestrasyon krizi, özellikle süt çocuklarında, oraklaşmış alyuvarların retiküloendotelial sistemde ve vasküler kompartmanda ani göllenmesi ve buna bağlı olarak ani hematokrit düşmesiyle karakterizedir.

Ayak ülserleri: Hastalığı ağır seyreden homozigotlarda deride iyileşmeyen ülserler olur. Bu ülserler bazen hastalığın tek belirtisi olabilir. (Apak 2001).

2.2.1.1.2. Hemoglobin C (Hb C)

Orak hücreden daha az görülen bir hemoglobinopatidir. Hemoglobin C varyantı, β -globin zincirinin 6. aminoasiti olan glutamik asit yerine lizin aminoasitinin (β^6 Glu \rightarrow Lys) geçmesiyle oluşur. Bunun sonucunda alyuvarlar dikdörtgen şekil alarak deforme olur ve kristalleşerek çökerler (Huisman 1993, Lukens and Lee 1993). Hemoliz orak hücreli anemideki kadar ağır değildir. Hb S de olduğu gibi Hb C varyantı da malaraya karşı direnç sağlar (Agarwal vd 2000).

Türkiye, İtalya, Hollanda, Yunanistan ve Orta Asya' da da görülen bu varyant daha çok Afrika kökenli siyah popülasyonda görülmektedir. Özellikle batı Afrika kıyılarında yaşayan siyah halkta % 26 oranında bulunmaktadır. Cezayir, Liberya ve Amerika zencilerinde ise % 2 oranındadır.

Hb C/A heterozigot bireyler genellikle asemptomatiktir. Hb C/C homozigot bireylerde splenomegali ve kronik hemolitik anemi görülür (Lukens and Lee 1993, Apak 2001).

2.2.1.1.3. Hemoglobin SC Hastalığı (Hb SC)

Bazı durumlarda hasta, bir ebeveyninden Hb S genini diğerinden Hb C genini almış olabilir. Bu durumda “hemoglobin SC hastalığı” görülür. Bu hastalar homozigot orak hücreli anemideki klinik tabloyu göstermekle birlikte bulgular daha hafif seyirlidir. Hb SC hastalığında hemoglobin düzeyindeki düşüklük orak hücre anemisinden daha ılımlıdır. (Apak 2001, Dönbak 2005, Champa vd 2007)

2.2.1.1.4. Hemoglobin D (Hb D)

Elektroforetik göçlerine bağlı olarak birden fazla Hb D varyantı bulunmaktadır. En yaygın görülen formu sıklıkla Hindistan'ın Punjab bölgesinde ve Pakistan'da görülen Hb D-

Punjab'dır. Hb D-Punjab'da β -globin zincirinin 121. aminoasiti olan glutamik asit yerine glutamin geçmiştir (Huisman 1993).

Hb D-Punjab varyantı İspanya, Yunanistan, İngiltere, Avusturya, Almanya, Portekiz, İran ve Türkiye'de gözlenmektedir (Lukens and Lee 1993, Flint vd 1998).

Hb A/Hb D ve Hb D/Hb D homozigot bireyler asemptomatikken Hb S/ HbD genotipli bireyler de orak hücreli anemi görülmektedir (Lukens and Lee 1993, Flint vd 1998).

2.2.1.1.5. Hemoglobin E (Hb E)

Hemoglobin E varyantı β -globin polipeptid zincirinde 26. pozisyondaki mutasyon (GAG→AAG) sonucu oluşur. Bu değişim, pre-mRNA'nın fonksiyonel mRNA'ya dönüşümü sırasında anormalliğe neden olur ve Hb E olması gerekenden daha az miktarda sentezlenir (Huisman 1993). Bu hastalık güneydoğu Asya'da sık görülür. Heterozigot hastalar asemptomatiktir. Bunlarda anemi olmaksızın mikrositoz ve hipokromi görülür (H Apak 2001). Hb E/E homozigot bireylerinde, orta derecede anemi görülmekte olup eritrositlerin ömrü biraz kısalmıştır (Dönbak 2005).

2.2.1.1.6. Hemoglobin O Arab (Hb O Arab)

Beta zincirinin 121. kodonunda Glutamik asit yerine Lizin gelmesi ile oluşan Hb O Arab; Amerikan zencileri, Araplar, Sudanlılar, Bulgarlar gibi farklı etnik gruplarda ve Türk halkı ile Kıbrıs Türklerinde bildirilmiştir (www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap6.asp).

2.2.1.2. Türkiye'de Hemoglobinopati

Hemoglobinopati ülkemizde en sık görülen kalıtsal hastalıklar arasında sayılmaktadır. Ülkemizin özellikle güneyinde ve batısında önemli bir sağlık problemidir. Hb S Türkiye'de en yaygın olarak görülen hemoglobin varyantıdır. Çalışmalar yapıldığı bölgeye göre değişmekle birlikte, Hb S frekansının % 0,5 ila % 44,2 arasında olduğunu göstermektedir (Dönbak 2005). Hb S varyantının Türkiye'de en sık görüldüğü bölge Akdeniz bölgesidir.

Ayrıca Türkiye’de görülen diğer hemoglobin varyantları da azalan sıklık sırasıyla, Hb C ve Hb O (%3,9), Hb E (% 0,16- 2,4), Hb D (% 0,2) şeklindedir (Dönbak 2005).

2.2.2. Talasemiler (Polipeptid Zincirlerinin Az ya da Hiç Sentezlenmediği Varyantlar)

2.2.2.1. Tarihçe

Talasemi ilk kez 1925 yılında Dr. Thomas Cooley tarafından derin anemi ve splenomegali gelişen bebekleri tarif etmek için tanımlanmıştır (Apak 2001, Günçağ vd 2003, Kutlu vd 2006).

Benzer vakaların daha sonrada görülmesi üzerine bu kalıtsal anemiye “Van Jaksch anemisi”, “splenik anemi”, “eritroblastozis”, “Akdeniz anemisi” gibi adlar verilmiştir (Apak 2001, Günçağ vd 2003, Kutlu vd 2006).

Daha çok Akdeniz bölgesinden köken alan hastalarda görüldüğü için 1936 yılında George Whipple ve Lesley Bradford hastalığa eski Yunanca’da deniz anlamına gelen thalassa’dan esinlenerek “thalassemia” adını vermişlerdir. Sonraları bu hastalığın sadece Akdeniz ülkelerinin toplumlarıyla sınırlı olmadığı, diğer toplumlarda da görüldüğü tespit edilmiştir (Günçağ vd 2003).

Talasemiler, bir ya da daha fazla hemoglobin zincir sentezindeki bozukluğa bağlı olarak ortaya çıkan, otozomal resesif kalıtım gösteren bir grup hematolojik hastalıktır. Alfa talasemi α globin zincir sentez yokluğunda veya azalması durumunda görülürken, β talasemi beta globin zincir sentez yokluğunda veya azalması durumunda görülür. Globin desteğinin azalması hemoglobin tetramerlerinin yapımını azaltır, hipokromi ve mikrositoza neden olur. Tutulmayan globinlerin yapımı normal olarak devam ettiğinden, α ve β subünitlerinin dengesiz birikimi oluşur. Dengesiz globin zincir yapımı, hemolize ve bozuk eritropoezise neden olur (Kutlu vd 2006, Muncie and Campbell 2009).

2.2.2.2. Beta Talasemi’nin Epidemiyolojisi

Talasemi’nin dünyada en sık görülen genetik hastalık olduğu öngörülmektedir (Kutlu vd 2006, Canatan 2010). Dünya popülasyonunun yaklaşık olarak %5’i globin varyantı taşır,

bunların da %1,7'si talasemi hastasıdır. Yaklaşık olarak her 10.000 canlı doğumdan 4,4'ü cinsiyet farkı gözetmeksizin talasemiden etkilenmiş olarak doğar (Muncie and Campbell 2009). Alfa talasemi sıklıkla güneydoğu Asya ve kökeni Afrika'nın batı kıyısına dayanan populasyonlarda gözlenirken, β talasemi yaygın olarak Akdeniz, Afrika, güneydoğu Asya'da görülür (Kutlu vd 2006, Muncie and Campbell 2009).

Dünya populasyonunun yaklaşık %3 kadarı (150 milyon) β talasemi taşıyıcısıdır. Bu genler özellikle İtalya ve Yunanistan'da yaşayanlarda daha sıktır. Beta talasemiye kuzey ve batı Afrika, Suriye, İran ve Türkiye'de, İtalya ve Yunanistan'a oranla daha az rastlanır. Kürt ve Hindistan Yahudilerinde, özellikle Suudi Arabistan'da yaşayan Araplar'da β talasemi tarif edilmiştir. Güney Asya'da β talasemi, α talasemiye oranla çok daha az görülmektedir. Kuzey Amerika'da talasemi çoğunlukla İtalyan ve Yunan kökenli olanlarda ve zencilerde bildirilmiştir. Göç, değişken etnik gruplarla evlilikler ve populasyonun rölatif büyüme dağılımı talasemi prevalansını değiştirebilmektedir (Kutlu vd 2006).

2.2.2.3. Türkiye'de Epidemiyoloji

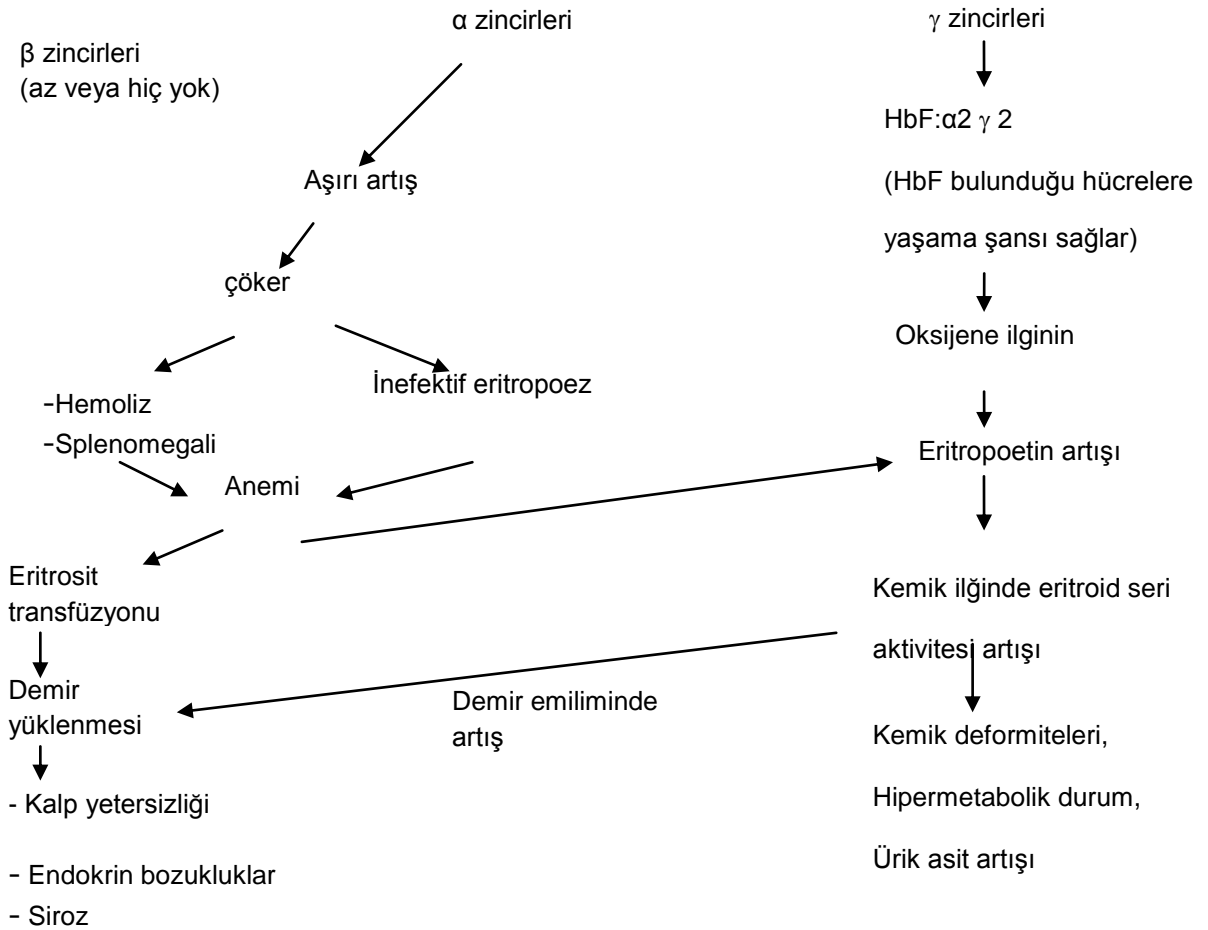
Türkiye' de en sık görülen talasemi tipi β talasemidir (Dönbak 2005). Dünya talasemi kuşağı üzerinde bulunan Türkiye'de β talasemi sıklığını belirlemek üzere tarama çalışmaları yapılmıştır (<http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp>). Taşıyıcı sıklığının bölgelere göre % 0,6 ila 13 arasında olduğu saptanmıştır. En yüksek oranda saptandığı yer de Antalya yöresi (frekans %10) olarak belirlenmiştir (Dönbak 2005). Mutasyonların çeşitliliğindeki ve frekansındaki bölgesel farklılıklar göç paterninden ve etnik kökenden kaynaklanmaktadır. Türkiye'de yaklaşık 1.300.000 talasemi taşıyıcısı ve yaklaşık 4000 hasta bireyin bulunduğu bildirilmiştir (Altay 2002).

2.2.2.4. Fizyopatolojisi

1. Beta talasemideki moleküler bozukluk, beta zincirinin az yapılmasına ya da hiç yapılamamasına neden olur. Alfa zincir yapımı normal hızda devam ettiğinden α zincir lehine zincir dengesizliği oluşur.
2. Hemoglobin sentezinde kullanılmayan α zincirleri, intrasellüler inklüzyonlar oluşturarak kemik iliğininde olgunlaşmakta olan kırmızı serinin genç hücrelerinde çöker.

3. Bu hücrelerin bir kısmı kemik iliğinde olgunlaşmadan parçalanır (inefektif eritropoiez)
4. Dolaşıma geçen alfa zincir inklüzyonlarını içeren olgunlaşmış eritrositler yaşam sürelerini tamamlayamadan parçalanır.
5. Böylece hem inektif eritropoiez hem de eritrositlerin yaşam sürelerinin kısa olmasından dolayı anemi oluşur.
6. Talasemi majörlü hastalarda hemoglobinin büyük kısmını oluşturan Hb F'in oksijene ilgisi fazla olduğundan, doku anoksisine yol açarak eritropoietin artışına sebep olur.
7. Eritropoietin etkisiyle kemik iliğindeki aşırı yapım sonucunda kemik iliğinin kapladığı alan artar ve iskelet değişiklikleri oluşur.
8. Bir diğer sonuç da anormal eritrosit hücrelerini dolaşımdan kaldıran dalağın büyümesidir (Dinçol 2003).

Aşağıdaki Şekil 2,2' de β talaseminin fizyopatolojisi anlatılmıştır.



Şekil 2.2: Beta talaseminin fizyopatolojisi

2.2.2.5. Beta Talasemi Kliniği ve Tipleri

Beta talasemi, gösterdiği klinik tabloya göre dört farklı başlık altında toplanabilir; Sessiz beta talasemiler, beta talasemi taşıyıcıları, beta talasemi intermedia, beta talasemi major (Birgens and Ljung 2007, nal 2010, <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp> 2012). Sessiz taşıyıcı ve β talasemi taşıyıcılarında β geninde heterozigot mutasyon söz konusuysen, β talasemi intermedia ve β talasemi majorlu hastalarda her iki allelde de mutasyon vardır. Mutasyon eşitliliği β talasemide klinik heterojeniteye neden olmaktadır. Bazı β geni mutasyonlarında gen hiç eksprese olmazken (β^0), bazılarında genin azalmış ekspresyonu söz konusudur (β^+). Diğer taraftan hastalığın klinik şiddetini belirleyen neden tek başına mutlak β globin miktarı değil, globin zincirlerinin sentezindeki dengesizliktir. Örneğin beraberinde α talasemi mutasyonu bulunan homozigot, birleşik heterozigot ya da heterozigot beta talasemili bireylerde zincirler arasındaki dengesizliğin azalmasına bağlı olarak hastalığın klinik seyri hafifleyebilir (Birgens and Ljung 2007, nal 2010).

2.2.2.5.a. Sessiz Beta Talasemiler

Tipik olarak β talasemi sessiz taşıyıcılarında MCV, MCH, Hb A₂ (%2-3,5), Hb F gibi hematolojik veriler normaldir. Bu nedenle HPLC ya da elektroforez gibi tarama yöntemleri ile belirlenemezler. Bu hastalardaki mutasyonlar β globin zincir sentezinde hafif bir azalmaya neden olur. Sonuç olarak erişkin taşıyıcılarda hafif şekilde globin zincir dengesizliği olur. Sessiz taşıyıcılar söz edilen tarama yöntemleri ile ayırt edilemedikleri için, bu bireylerin β talasemi taşıyıcısı bir bireyle evliliği sonucu talasemi intermedia'lı ocuk sahibi olma riski mevcuttur. Sessiz beta talasemili hastaların olduğa küçük bir kısmında homozigot mutasyon bildirilmiştir. Bu hastalarda genellikle transfüzyon gerektirmeyen orta şiddette anemi, hepatosplenomegali, %10-15 arasında Hb F ve beta talasemi taşıyıcısında görülen Hb A₂ düzeyleri görülmektedir (nal 2010, <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp> 2012).

2.2.2.5.b. Beta Talasemi Taşıyıcıları (β Talasemi Minor)

Beta talasemi mutasyonuna heterozigot olarak sahip olan bireyler “beta talasemi taşıyıcısı” ya da “talasemi minor” olarak adlandırılır. Bu bireyler klinik olarak normal olmakla birlikte bazı taşıyıcı erişkinlerde hafif anemi görülebilir (Dönbak 2005, Ünal 2010, <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp> 2012). Periferik kan yaymalarında, hipokromik, mikrositik eritrositler, bazofilik noktalanmalar ve “target” hücreleri görülebilir (Ünal 2010, <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp> 2012) Hemoglobin değerleri genellikle 9-11g/dl’dir. Beta talasemi heterozigot bireylerde elektroforezde Hb A₂ düzeyleri normale göre yaklaşık iki kat yükselir (%3,5-8) (Ünal 2010, <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp> 2012). Mutasyona bağlı olarak değişmekle birlikte %50 vakada Hb F düzeyleri yüksek bulunabilir (%1-5) (Dinçol vd 2003). Yapılan çalışmalar beta talasemi taşıyıcı bireylerde α / β globin sentez oranının 1,5 ila 2 arasında olduğunu göstermektedir. Bu tip heterozigotların kesin tanısı DNA analizleri ile genetik mutasyonları göstermeye dayanır (Dinçol vd 2003, <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp> 2012).

2.2.2.5.c. Beta Talasemi Major

Talaseminin bu grup hastalarında β globin geninde homozigot ya da birleşik heterozigot mutasyon bulunur. Buna bağlı olarak da beta globin zinciri hiç sentezlenemez ya da çok az sentezlenir (Ünal 2010). Yenidoğan talasemi majorlu hastalar asemptomatiktir, yaşamlarının 4-6 aylarında anemi ve buna bağlı semptomlar ortaya çıkar. Çocuklarda genellikle şiddetli anemiyle birlikte halsizlik, iştahsızlık, beslenme güçlüğü, solukluk, büyüme gelişme geriliği, karaciğer ve dalak büyümesine bağlı karın şişliği ve enfeksiyon görülür (Birgens and Ljung 2007). Bu grup hastalarda eritrositlerde α globin zincir fazlalığına bağlı olarak eritrosit membranında hasarlanma ile birlikte eritrositlerde hemoliz ve kemik iliğinde inefektif eritropoez oluşur ve tüm bunların sonucunda da anemi gelişir (Ünal 2010). Anemi eritropoetin üretimini artırır, ekstramedüller hematopoez gelişir. Hastalarda hepatosplenomegali ve kemiklerde incelmeye bağlı deformite gibi “talasemi yüzü” denilen ve maksilla ile frontal kemiklerin genişlemesi sonucunda iskelet-yüz değişiklikleri ortaya çıkar (Birgens and Ljung 2007). Beta talasemi majorlü vakalarda %10’dan daha az Hb A₂ ve %90’dan daha fazla Hb F bulunur. Hasta β^0 talasemi genini

homozigot bulunduruyorsa Hb A'ya sahip değildir ve var olan hemoglobin Hb F ve Hb A₂'den oluşur. Hastalık β^+ talaseminin homozigot formu veya β^+ talasemi ve β^0 talaseminin kombinasyonu ile oluşmuşsa değişen miktarlarda Hb A yapımı olabilir. Hb A₂ seviyesi toplam hemoglobinin yüzdesi olarak ifade edildiği zaman normal ve yüksek değerlerde bulunabilir. Hb F'nin eritrositlerdeki dağılımı heterojendir (Dinçol vd 2003).

2.2.2.5.d. Beta Talasemi İntermedia

Beta talasemi minörden daha ağır, beta talasemi majordan daha hafif klinik bulgu gösteren globin gen mutasyonu ya da mutasyon kombinasyonlarını içeren vakaların dahil olduğu gruptur (Dinçol vd 2003). Talasemi intermedialı hastaların yaşam süreleri talasemi majorlü hastalara kıyasla daha uzundur; 20 yaşı aşabilen nispeten ileri yaşlara ulaşan bir yaşam süresine sahiptirler (Dinçol vd 2003). Talasemi majorlü hastalardaki gibi düzenli transfüzyona gereksinim duymazlar, transfüzyon ihtiyaçları daha azdır. Hafif olgular erişkin yaşlara kadar tanı ve dolayısıyla transfüzyon almadan gelebilmektedir (Ünal 2010). Hemoglobin değerleri 7.0-10.0 g/dl arasında bulunur (Hoffbrand and Pettit 1985).

Çizelge 2.1: Beta talasemi major ve beta talasemi intermedia arasındaki ayırıcı özellikler (Ünal 2010).

	Talasemi intermedia	Talasemi major
Tanı (yıl)	>2	<2
Hb (g/dl)	8-10	<7
Hepatomegali/ splenomegali	Hafif-orta	Ağır
HbF (%)	10-50	>50
HbA2 (%)	>4	<4
Ebeveynler	Biri veya her ikisinde atipik taşıyıcı Yüksek HbF β -talasemi Sınırdan yüksek HbA2	β -talasemi HbA2 yüksek
Mutasyon tipi	Hafif/ sessiz	Ağır

2.2.2.5.e. Tedavi

Talasemi minörlü hastaların çoğunda herhangi bir yakınma yoktur, ancak folik asit desteği önerilebilir. Demir ise, ancak kesin demir eksikliği bulguları tespit edilirse verilmelidir. Taşıyıcıların özellikle evlilik öncesi genetik danışma alması önemlidir (Apak 2001, Dinçol vd 2003).

Talasemi majorda, kan transfüzyonu ve kemik iliği nakli gibi rutinde kullanılan tedavi yöntemleri ve henüz rutine girmemiş γ globin zincir sentezi artırılması ve gen tedavisi gibi deneysel aşamadaki tedavi yaklaşımları bulunmaktadır (Apak 2001, Kutlu vd 2006, Birgens and Ljung 2007, Muncie and Campbell 2009, Ünal 2010, www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/9_MSEK_12pdf, 2012). En uygulanabilir tedavi kan transfüzyonudur. Her iki haftada ya da ayda bir düzenli olarak yapılan eritrosit

süspansiyonu transfüzyonları ile hemoglobin seviyesi 10g/dl'nin üzerinde tutulmaya çalışılır (Apak 2001, Kutlu vd 2006). Transfüzyonun primer amacı eritropoezi baskılayarak ve gastrointestinal sistemde demir alınımını azaltarak anemiyi önlemek ve aneminin neden olduğu komplikasyonları ortadan kaldırmaktır (Birgens and Ljung 2007). Hemoglobin değerinin 10 g/dl civarında tutulması ile normal büyüme ve gelişme sağlandığı görülmüştür (Dinçol vd 2003).

Kemik iliği nakli, ilk kez 1980 yılında yapılmaya başlanan, ülkemizde 1988'li yıllardan sonra hızla devreye giren bir tedavi yöntemidir (www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/9_MSEK_12pdf, 2012). Kemik iliği nakli uygun donör bulunursa ve erken yaşta yapılırsa başarılı sonuçlar bildirilmektedir. Bunun dışında bu tedavinin şansı düşüktür (Apak 2001, Dinçol vd 2003).

Hastaların çoğunda fazla sayıda transfüzyon yapılmış olduğundan reddetme problemi bulunmaktadır ve bu yüzden transplantasyon risklidir.

Diğer bir tedavi şekli ise "Hidroksiüre" verilerek fetal hemoglobin sentezinin uyarılmaya çalışılmasıdır. Bu tedavinin, uygulandığı vakalarda fetal hemoglobin sentezinin geçici olarak arttığı görülmüştür (Dinçol vd 2003).

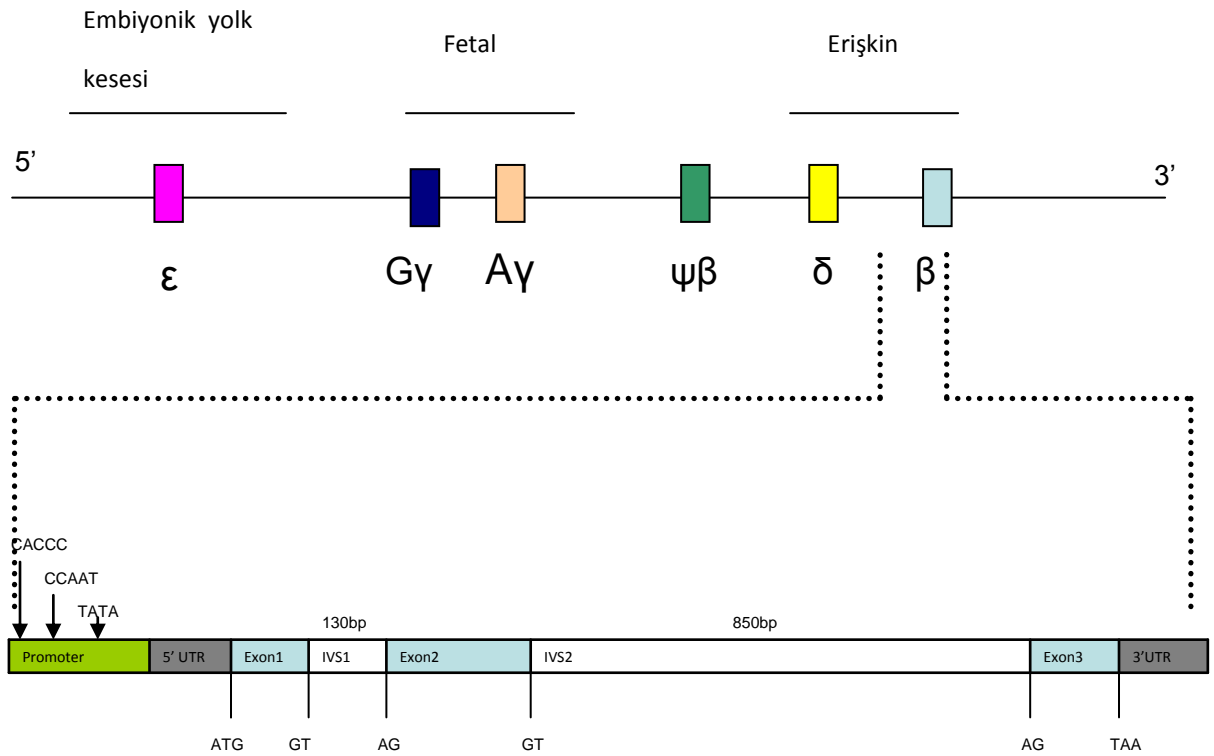
Gama globin zincir sentezinin artırılması ve gen tedavileri ile ilgili çalışmalar ise henüz deneysel aşamadır ve rutin uygulamaya girmemiştir (Apak 2001, www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/9_MSEK_12pdf, 2012).

2.2.2.5.f. Demir Şelasyonu

Transfüzyon tedavisinde her transfüzyonla birlikte hastaya fazladan demir yüklenir ve dolayısıyla hastalarda demir birikimi söz konusudur. Şayet bu hastalardaki demir birikimi önlenmezse özellikle dalak, kalp, karaciğer, endokrin bezler ve pankreas gibi organlarda fonksiyon bozuklukları gözlenir. Tüm bunları önlemek için transfüzyon programına başladıktan yaklaşık bir yıl sonra desferrioksaminin kullanıldığı demir şelasyon tedavisi verilir. Etkin şelasyon tedavisinin düzenlenmediği durumlarda hastalar genellikle 20'li yaşlarda aritmiler ve kalp yetmezliği nedeniyle kaybedilirler (Apak 2001, Muncie and Campbell 2009, Ünal 2010).

2.3. Beta Globin Geni

11. kromozomun kısa kolu üzerinde 15.5 bölgesinde yer alan (11p15.5) β globin (HBB) geni, 1.8 kb (kilobaz) uzunluğunda, 146 aminoasiti kodlayan, 3 ekzon ve 2 intron ile 5' ve 3' düzenleyici bölgelerden oluşan, küçük ve yapısal olarak basit bir genidir (Başak 2005, Birgens and Ljung 2007, Gülbay vd 2009). Bu gendeki mutasyonlar, β talasemiye, orak hücreli anemiye ya da diğer bir anormal hemoglobine neden olmaktadır (Başak 2005, Gülbay vd 2009). Beta globin geni β globin gen kümesi içinde yer alır. Beta globin gen kümesi DNA'nın yaklaşık 60 kb'lık bölümünü kapsar. Bu gen kümesi içinde sadece 136. kodonunda aminoasit farklılığı bulunan $A\gamma$, $G\gamma$ genleri ile bir psödogen ($\psi\beta$) bulunur. $\psi\beta$ geni β genine çok benzemekle birlikte, sahip olduğu mutasyonlar nedeni ile işlevsel bir protein kodlayamaz (Birgens and Ljung 2007) (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: 11.kromozomda yer alan β -globin gen kümesi

2.4. Beta Talasemi Mutasyon Tipleri

β -globin gen kompleksinin mutasyonları farklı fenotip oluşturan iki büyük gruba ayrılır. Bunlardan birincisi β -globin üretimini bozan, basit talasemiye neden olan ve hastaların büyük çoğunluğunun içine girdiği gruptur. İkinci grup ise kompleks talasemilere neden olan β -globin demetinde ya da lokus kontrol bölgesinde bir ya da daha fazla geni ortadan kaldıran büyük delesyonlardır (Nussbaum vd 2001).

β -talasemide promoter mutasyonları, RNA *splicing* mutasyonları (en sık), mRNA *capping* ve *tailing* mutasyonları en sık görülen mutasyon tipleridir. Kısa ve stabil olmayan β -globin polipeptid zincirine neden olan anlamsız ya da çerçeve kayması mutasyonları daha az sıklıkla görülür (Nussbaum vd 2001).

Beta talasemi mutasyonlarını başlıklar halinde sınıflandıracak olursak;

2.4.1. Promoter Mutasyonları

Beta globin geni üzerindeki cap bölgesinin 5' tarafında yer alan promoter bölgesinin transkripsiyon üzerinde ki önemi bilinmektedir. Promoter bölgesinde meydana gelen nükleotid değişimleri ile oluşan mutasyonlar transkripsiyonu azaltarak β^+ talasemiye neden olmaktadır (www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp, 2012).

2.4.2. RNA Splicing Mutasyonları

Splicing'de defekt oluşturan mutasyonlar 4 gruba ayrılır.

2.4.2.1. Yapışma Yerlerini Tutan Mutasyonlar

Beta globin genindeki iki intron heterojen RNA'dan (hnRNA) olgun messenger RNA (mRNA) oluşurken ekzonlar arasından kesip çıkarılır. İntronların çıkartılmasından sonra ekzonların bağlanacağı bölgelerde (splice junction) oluşan mutasyonlar kesip çıkarma işleminde hataya neden olmaktadır. Yapışma yerleri ikişer nükleotitten oluşan donör ve akseptör bölgelerden oluşur. Donör bölge intronun başında bulunur ve GT nükleotidini içerirken, akseptör bölge intronun son iki nükleotidi olan AG nükleotidini içerir. Bu

bölgelerdeki nükleotidlerde mutasyon meydana gelmesi ile ekzonların yapışması gerçekleşemez ve olgun mRNA oluşamaz. Bu durumda protein sentezi gerçekleşmez ve β^0 talasemi görülür. Yapışma yerini tutan mutasyonlar aşağıdaki Çizelge 2.2’de gösterilmiştir (<http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp>, 2012).

Çizelge 2.2:Yapışma yerini tutan mutasyonlar

Mutasyon adı	Tipi	Görüldüğü etnik grup
IVS1.1 (G>A)	β^0	Akdenizliler, Hindistanlılar
(G>T)	β^0	Hindistanlılar
IVS2.1 (G>A)	β^0	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
(G>C)	β^0	İranlılar
IVS1.2 (T>G)	β^0	Tunuslular
(T>C)	β^0	Amerikalı zenciler
(T>A)	β^0	Cezayirliler
IVS1.130 (G>C)	β^0	Türkler, Japonlar
(G>A)	β^0	Mısırlılar
IVS2.849 (A>G)	β^0	Amerikalı zenciler
(A>C)	β^0	
IVS2.850 (G>A)	β^0	Yugoslavlar, İrlandalılar
(G>T)	β^0	Japonlar
(-G)	β^0	İtalyanlar
Cod 30 (G>C)	β^0	Ortadoğulular

2.4.2.2. Yapışma Yerlerine Yakın Dizilerdeki Mutasyonlar

Olgun mRNA oluşumunu azaltarak β^+ talasemiye neden olan bu grup mutasyonlar ekzon ve intronların yapışma yerlerine yakın nükleotidlerde meydana gelirler. Bu mutasyonlar sıklıkla 1. ekzonun son iki kodonu ile her iki intronun başlangıç ve bitiş yerlerine yakın nükleotidlerde görülür. Yapışma yerlerine yakın dizilerdeki mutasyonlar aşağıdaki Çizelge 2.3’de gösterilmiştir (www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp, 2012).

Çizelge 2.3: Yapışma yerlerine yakın dizilerdeki mutasyonlar

Mutasyon adı	Tipi	Görüldüğü etnik grup
IVS1.5 (G>C)	β^+	Hintliler, Çinliler, Malezyalılar
(G>T)	β^+	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
(G>A)	β^+	Akdenizliler Cezayirliler
IVS1.6 (T>C)	β^+	Akdenizliler
IVS1.128 (T>G)	β^+	Araplar
IVS2.837 (T>G)	β^+	Hintliler
IVS2.843 (T>G)	β^+	Cezayirliler
IVS2.844 (C>G)	β^+	İtalyanlar
IVS2.848 (C>A)	β^+	Amerikalı zenciler
(C>G)	β^+	Japonlar

2.4.2.3. İtronlar İçindeki Mutasyonlar

İtronlar içinde meydana gelen bazı nükleotid değişimleri alternatif yapışma yerleri oluşturur. Bu grup mutasyonlar genellikle β^+ neden olur (IVS1.116 ve IVS2.654’deki mutasyonlar hariç). Aşağıdaki Çizelge 2.4’de intronlar içinde meydana gelen ve alternatif

yapışma yerleri oluşturan mutasyonlar gösterilmiştir
(www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp, 2012).

Çizelge 2.4: İtronlar içinde meydana gelen ve alternatif yapışma yerleri oluşturan mutasyonlar

Mutasyon adı	Tipi	Görüldüğü etnik grup
IVS1.110 (G>A)	β^+	Akdenizliler
IVS1.116 (T>G)	β^0	Akdenizliler
IVS2.654 (C>T)	β^0	Çinliler
IVS2.705 (T>C)	β^+	Akdenizliler
IVS2.745 (C>G)	β^+	Akdenizliler

2.4.2.4. Gizli Yapışma Yerlerini Ortaya Çıkaran Mutasyonlar

Bu mutasyonlar ile ekzon içinde gizli bulunan yapışma yerleri aktive olur ve yanlış yerden kesip-çıkarma işlemi olur. Sonuç olarak yanlış yerden kesilen intronlar nedeniyle anormal mRNA yanında bir miktar da normal mRNA meydana gelir ve β^+ talasemiye neden olur. Gizli yapışma yerlerini ortaya çıkaran değişimler aşağıdaki çizelge 2.5’de verilmiştir (www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp, 2012).

Çizelge 2.5: Gizli yapışma yerlerini ortaya çıkaran değişimler

Mutasyon adı	Tipi	Görüldüğü etnik grup
Cd10 (C>A)	β^+	Hintliler
Cd19 (A>G) (Asn→Ser, Hb Malay)	β^+	Malezyalılar
Cd24 (T>A)	β^+	Japonlar, Amerikalı zenciler

Cd26 (G>A)	β^+	Güney Doğu Asyalılar
(Glu→Lys, Hb E)		
Cd27 (G>T)	β^+	Akdenizliler
(Ala→Ser, Hb Knossos)		

2.4.3. Başlatıcı Kodon Mutasyonları

Başlangıç kodonu olan metiyonindeki mutasyonlardır. Beta talasemiye neden olan şu ana kadar bilinen 6 mutasyon vardır ve mutasyonların tümü β^0 talasemi ile sonuçlanır. Aşağıdaki Çizelge 2.6'da bu mutasyonlar yer almaktadır (www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp, 2012).

Çizelge 2.6: Başlatıcı Kodon Mutasyonları

Mutasyon adı	Tipi	Görüldüğü etnik grup
ATG→ACG	β^0	Yugoslavlular
→AGG	β^0	Çinliler, Japonlar, Koreliler
→GTG	β^0	Japonlar,
→ATA	β^0	İlyanlar, İsveçliler
→ATC	β^0	Japonlar
→ATT	β^0	İranlılar

2.4.4. Poli A Kuyruğu Mutasyonları

Poli A mutasyonu bulunan β globin geni normale göre daha uzun mRNA sentezlenmesine neden olur, oluşan uzun mRNA dayanıksız bir yapıya sahiptir. Poli A mutasyonu taşıyan mRNA'ların ribozomlara bağlanma şansı azalır. Bu mutasyonlar sonucu oluşan mRNA'dan az miktarda da olsa bir β globin sentezi olduğu için β^+ talasemiye neden olur.

Aşğıdaki Çizelge 2.7'de poli A mutasyonları görölmektedir (www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp, 2012).

Çizelge 2.7: Poli A Kuyruğu Mutasyonları

Mutasyon adı	Tipi	Göröldüğü etnik grup
AATAAA→AACAAA	β^+	Amerikalı zenciler
AATAAA→AATAAG	β^+	Kürtler
AATAAA→AATGAA	β^+	Akdenizliler
AATAAA→AATAGA	β^+	Malezyalılar
AATAAA→A(-AATAA)	β^+	Araplar

2.4.5. Nonsense Mutasyonlar (Anlamsız Kodon Oluşumu)

Ekzonlar üzerindeki nükleotid değişimi ile aminoasit şifreleyen kodon stop kodonuna dönüşürse oluşan mutasyon nonsense mutasyon olarak adlandırılır. Nonsense mutasyon ile protein sentezi durur. Literatürde 13 mutasyon bildirilmiştir Anlamsız kodon mutasyonuna ve dolayısıyla β^0 talasemiye neden olan bu mutasyonlar aşğıdaki Çizelge 2.8'de gösterilmektedir (www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp, 2012).

Çizelge 2.8: Nonsense Mutasyonlar

Mutasyon adı	Tipi	Göröldüğü etnik grup
Cd15 (TGG→TAG)	β^0	Hintliler
(TGG→TGA)	β^0	Portekizliler
Cd17 (A>T)	β^0	Çinliler
Cd22 (G>T)	β^0	Reunion adaları
Cd26 (G>T)	β^0	Taylandlılar
Cd35 (C>A)	β^0	Taylandlılar

Cd37 (G>A)	β^0	Araplar
Cd39 (C>T)	β^0	Akdenizliler
Cd43 (G>T)	β^0	Çinliler
Cd61 (A>T)	β^0	Zenciler
Cd90 (G>T)	β^0	Japonlar
Cd112 (T>A)	β^0	Slovaklar
Cd121 (G>T)	β^0	Polonyalılar, Fransızlar
Cd127(C>T)	β^0	İngilizler

2.4.6. Frameshift Mutasyonlar

Frameshift mutasyonlar, ekzonlar içinde herhangi bir noktaya bir ya da birkaç (3 tane dışında) nükleotidin girmesi (insersiyon) veya kaybedilmesiyle (delesyon) üçlü baz dizilimlerini dolayısı ile okuma çerçevesini değiştiren mutasyonlardır. Beta talasemide çok sık olmasa da bu tür mutasyonlar görülebilir (Öner 2002) . Aşağıdaki Çizelge 2.9’da β talasemiye neden olan frameshift mutasyonlar gösterilmiştir (www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp, 2012).

Çizelge 2.9: Frameshift mutasyonlar

Mutasyonun adı	Tipi	Görüldüğü etnik grup
Cd1(-G)	β^0	Akdenizliler
Cd2/3/4 (-9bp, +31)	β^0	Cezayirliler
Cd5 (-CT)	β^0	Akdenizliler
Cd6 (-A)	β^0	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
Cd8 (-AA)	β^0	Akdenizliler
Cds8/9 (+G)	β^0	Hintliler

Cds9/10 (+T)	β^0	Yunanlılar
Cd11(-T)	β^0	Meksikalılar
Cds14/15(+G)	β^0	Çinliler
Cd15 (-T)	β^0	Malezyalılar
Cd16 (-C)	β^0	Hintliler
Cd22/23/24 (-AAGTTGG)	β^0	Türkler
Cd24 (-G, +CAC)	β^0	Mısırlılar
Cd25/26 (+T)	β^0	Tunuslular
Cd26 (+T)	β^0	Japonlar
Cd27/28 (+C)	β^0	Çinliler
Cd28 (-C)	β^0	Mısırlılar
Cd28/29 (-G)	β^0	Japonlar, Mısırlılar
Cd31 (-C)	β^0	Çinliler
Cd35 (-C)	β^0	Malezyalılar
Cd36/37 (-T)	β^0	İranlılar, Kürtler
Cd37/38/39(-GACCCAG)	β^0	Türkler
Cd38/39 (-CC)	β^0	Belçikalılar
Cd40 (-G)	β^0	Japonlar
Cd40/41 (+T)	β^0	Çinliler
Cd41 (-C)	β^0	Taylandlılar
Cd41/42 (-TTCT)	β^0	Çinliler
Cd42/43 (+GT)	β^0	Japonlar

Cd42/43 (+T)	β^0	Japonlar
Cd44 (-C)	β^0	Kürtler
Cd51 (-C)	β^0	Macarlar
Cd53/54 (+G)	β^0	Japonlar
Cd54 (-T)	β^0	Cezayirliler, İsveçliler
Cd54/55 (+A)	β^0	Hintliler
Cd56-60 +14bp	β^0	Hintliler
Cd59 (-A)	β^0	İtalyanlar
Cd64 (-G)	β^0	İsviçreliler
Cd67 (-TG)	β^0	Filipinliler
Cd71/72 (+T)	β^0	Çinliler
Cds 71/72 (+A)	β^0	Çinliler
Cds 72/73 (-AGTGA, +T)	β^0	İngilizler
Cds74/75 (-C)	β^0	Türkler
Cd76 (-C)	β^0	İtalyanlar
Cds 82/83 (-G)	β^0	Azeriler, Çekler
Cd84/85	β^0	Japonlar
Cd84/85/86 (+T)	β^0	Japonlar
Cd88 (+T)	β^0	Hintliler
Cd89/90 (-GT)	β^0	Koreliler
Cd95 (+A)	β^0	Taylandlılar
Cds 106/107 (+G)	β^0	Amerikalı zenciler

2.5. Türkiye’de Görülen Beta Talasemi’nin Moleküler Temeli

Türkiye’de β talaseminin moleküler temeli ile ilgili araştırmalar ilk kez Prof. Dr. Muzaffer Aksoy tarafından yapılmıştır (Tadmouri vd 2001, Yıldız vd 2005). 1987’den beri β talaseminin moleküler temeli aydınlatılmaya çalışılmaktadır (Tadmouri vd 2001).

Türkiye’de moleküler temele dayalı çalışmalarla β talasemi araştırmalarında büyük ilerlemeler sağlanmıştır. 1987’de Akdeniz toplumlarında yaygın olan üç beta talasemi mutasyonu kodon 39 (C>T) , IVS1-6 (T>C) ve IVS1-110 (G>A) olarak tanımlanmıştır. Bunlardan IVS1-110 (G>A) mutasyonunun Akar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarla Türk hastalarında en sık rastlanan β talasemi mutasyonu olduğu bildirilmiştir (Başak 2005). Moleküler temele dayalı çalışmalar göstermiştir ki çoğu diğer popülasyonların aksine β talasemi, Türk toplumunda oldukça heterojendir, 35’den fazla farklı mutasyonun varlığı gösterilmiştir. En yaygın görülen 6 mutasyon, Türk popülasyonunda toplam β talasemi alellerinin yaklaşık %72’sini oluşturmaktadır (IVS1-110, IVS1-6, IVS2-1, kodon 8, IVS1-1, IVS2-745) (Tadmouri and Başak 2001).

Aşağıdaki Çizelge 2.10 Altay’ın 2002’de yaptığı çalışma sonuçlarını ve Türkiye’de görülen mutasyonların coğrafik bölgelere göre frekansını göstermektedir.

Çizelge 2.10: Altay’ın çalışma sonuçları ve Türkiye’ de görülen mutasyonların coğrafik bölgelere göre frekansı (Altay 2002)

Mutasyon	Toplam kromozom sayısı	% Altay ve ark.	Doğu Anadolu	Güneydoğu Anadolu	İç Anadolu	Karadeniz	Akdeniz Ege	Marmara
IVSI. 110 (G>A)	435	40.88	30.0	43.42	30.76	47.17	43.47	27.5
IVSI. 6 (T>C)	110	10.33	-	9.71	20	12.82	6.08	22.5
IVSII. 1 (G>A)	86	8.08	6.66	3.42	10.0	7.69	4.34	7.5
IVSII.745 (C>G)	66	6.20	-	9.71	7.5	10.25	6.52	2.5
IVSI.1 (G>A)	61	5.73	3.3	5.14	5.0	2.56	13.47	10.0
FCS8 (-AA)	50	4.69	16.6	8.0	2.5	2.56	2.17	2.5
-30 (T>A)	45	4.22	13.3	4.57	-	1.53	1.30	-
Cd 39 (C>T)	31	2.91	-	5.71	2.5	1.53	4.34	2.5

<i>FSC8,9 (+G)</i>	28	2.63	13.3	3.42	-	1.02	4.78	2.5
<i>Cd44 (-C)</i>	19	1.78	10.0	1.14	5.0	2.05	1.30	-
<i>FSC5 (-CT)</i>	13	1.22	-	1.14	5.0	1.53	0.43	5.0
<i>IVSI. 130 (G>C)</i>	9	0.84	-	-	-	1.53	0.86	-
<i>FSC6 (-AA)</i>	7	0.64	-	1.71	-	0.51	0.43	-
<i>IVSI. 116 (T>G)</i>	6	0.56	-	0.57	-	-	0.86	2.5
<i>PolyA</i>	6	0.56	-	-	5.0	-	-	2.5
<i>IVSI. 5 (G>C)</i>	6	0.56	-	-	-	0.51	2.17	5.0
<i>+22 (G>A)</i>	5	0.46	-	-	-	-	0.43	2.5
<i>IVSII.848 (C>A)</i>	5	0.46	-	-	-	-	0.43	-
<i>FSC36-37</i>	4	0.37	-	-	-	-	0.86	-
<i>IVSI. 5 (G>T)</i>	3	0.28	-	-	-	-	-	-
<i>-87 (C>T)</i>	2	0.18	-	-	-	-	-	-
<i>IVSI. 1 (G>T)</i>	2	0.18	-	-	-	-	-	-
<i>-28 (A>C)</i>	2	0.18	-	-	-	-	-	-
<i>FSC15</i>	2	0.18	-	1.14	-	-	-	-
<i>FSC74-75 (-C)</i>	2	0.18	-	-	-	-	-	-
<i>-101 (C>T)</i>	1	0.09	-	-	-	-	-	2.5
<i>IVSI. 5 (G>A)</i>	1	0.09	-	-	-	-	0.43	-
<i>IVSI. 130 (G>A)</i>	1	0.09	3.3	-	-	-	-	-
<i>Cd37 (G>A)</i>	1	0.09	-	-	-	-	-	2.5
<i>Hb Knossos</i>	2.0	0.18	-	-	-	0.51	0.43	-
<i>Delta beta</i>	22	2.06	-	4.57	5.0	1.02	1.30	-
<i>Delta-N-Del</i>	2	0.18	6.6	-	-	-	-	-
<i>Bilinmeyen</i>	29	2.72	-	1.14	-	5.12	3.47	-
<i>Toplam</i>	1064	100	100	100	100	100	100	100

2.6. Türkiye’ de Beta Talaseminin Önlenmesi

Türkiye’de β talaseminin önlenmesi ile ilgili ilk yapılan çalışmalardan biri 1983 yılında Ankara’da Hacettepe Üniversitesine bağlı “Prenatal Tanı Ünitesi”nin kurulmasıdır. Bu merkezde fetal kan örneklerinde in vitro Hb sentezine bakılmıştır. İlerleyen yıllarda DNA tekniklerinin gelişmesi ile talasemiler için de prenatal tanı hız kazanmıştır. 1990’lı yıllarda belirlenen prenatal tanı merkezlerinde koryonik villus örneklerinden, birbirini izleyen sırayla ASO (Alel Spesifik Oligonükleotid), ARMS (Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi), RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi) ve DNA dizi analizi gibi yöntemlerle prenatal tanı yapılmaya başlanmıştır (Tadmouri and Başak 2001). Türk toplumunda tanımlanmış 35’i aşkın mutasyonun varlığının neden olduğu moleküler çeşitlilik, hastalığa tanı koyma ve önlem alma stratejileri ile programlarını önemli ölçüde güçleştirmektedir (Başak 2005).

Ülkemizde 30.12.1993 tarihinde 3960 sayılı “Kalıtsal Kan Hastalıkları ile Mücadele Kanunu” çıkmıştır. Bu çerçevede Bakanlığa bağlı olarak Antalya, Antakya, Mersin ve Muğla’da 1994 yılında talasemi merkezleri kurulmuştur (Üstündağ 2004). Yine β talaseminin prenatal tanısı için Türkiye’deki merkezler arasında Ankara’da Hacettepe Üniversitesi ve Ankara Üniversitesi, Adana ilinde Çukurova Üniversitesi, İstanbul’da Boğaziçi Üniversitesi bulunmaktadır (Tadmouri and Başak 2001).

Türkiye’de çok sayıda hemoglobin varyantının görülmesi, Anadolu’da yıllar boyunca çok çeşitli ırk ve kültürlerin yaşamasından ve akraba evliliklerinden kaynaklanmaktadır. Akraba evliliği (ortalama %20,9) (TÜİK Aile Yapısı Araştırması 2006) ve doğurganlığın yüksek olduğu ülkemizde talasemi eradikasyonu için yeni yöntemler uygulanması zorunluluğu ortaya çıkmaktadır. Evlilik öncesi tarama testleri ile yeni hasta doğumunun engellenebilmesi ve koruyucu hekimliğin başlatılabilmesi amacıyla 2002 yılında Hemoglobinopati Kontrol Programı başlatılmıştır (www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/9_MSEK_12pdf, 2012). 2005 yılında hemoglobinopatilerin önlenmesi, hastaların tedavileri, yeni tedavi yaklaşımları konularında çalışma yapmak üzere talasemi derneklerinin bir araya gelmesiyle “Talasemi Dernekleri Federasyonu” kurulmuştur.

2.7. Beta Talasemide Tanı

Beta talasemili hastaların fenotiplerinin belirlenebilmesi için hematolojik ve biyokimyasal parametrelerin ölçümlerinin yapılması gerekir. Bu konuda yapılan hematolojik incelemeler, RBC (red blood cell) verilerini, Hb konsantrasyon ölçümlerini, hematokrit, RBC sayısı, MCH (Ortalama Hemoglobin Hacmi), MCV (Ortalama Eritrosit Hacmi), RDW (Eritrosit Hacim Dağılımı) ölçümlerini içerir. Kırmızı kan hücrelerinin sayısındaki düşüş (MCH<28 pg, MCV<81fl) talasemi hastalığının güçlü göstergesidir. Rutinde yapılan biyokimyasal parametreler içinde de Hb fraksiyonlarının ve globin zincirlerinin elektroforetik ve/veya kromatografik analizleri bulunur. Selüloz asetat elektroforezi, agaroz jel ve sitrat agar elektroforezi elektroforetik yolda kullanılan yöntemlerken, HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) yöntemi beta talasemi ve diğer hemoglobinopatilerin tanısında çoğu merkez tarafından tercih edilen kromatografik yöntemdir (Keser 2007, Ünal 2010, www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/9_MSEK_12pdf, 2012).

Aşağıdaki çizelgelerde (2.11, 2.12) beta talasemi tanısında kullanılan birinci ve ikinci basamak testler verilmiştir. Üçüncü basamak testler ise mutasyonun belirlenmesinde kullanılan moleküler testleri içerir.

Çizelge 2.11: Beta talasemi tanısında kullanılan birinci basamak testler

	Demir eksikliği anemisi	β talasemi taşıyıcısı	Alfa talasemi taşıyıcısı (iki alfa geninde delesyon)	α/β talasemi taşıyıcısı
Kırmızı hücre sayısı	Normal veya düşük	Normal veya yüksek	Normal veya yüksek	Normal veya düşük
Hipokromi	+	+	+	+
Mikrositoz	+	+	+	+
Anizositoz	++/+++	Nadir	+	+
RDW değeri	Yüksek	Normal (% 12-14) Çocuklarda yüksek olabilir.	Yüksek	Yüksek
Hb seviyesi	Düşük	Normal veya 1-2 g/dl düşük	Normal veya 1-2 g/dl düşük	
MCV	Düşük	Çok düşük	Düşük	
MCH		Düşük (>27)	Düşük (>27)	
Serum demir	Azalmış	Normal	Normal	
Ferritin	Azalmış/ Normal	Normal	Normal	

Çizelge 2.12: Beta talasemi tanısında kullanılan ikinci basamak testler

	Demir eksikliği	β talasemi taşıyıcısı	A talasemi taşıyıcısı (iki alfa geninde delesyon)	α/β talasemi taşıyıcısı
Anemisi				
HbA2 seviyesi	Normal (3,5 ' dan az)	Yüksek (3,5 ve üstü) %95 yüksek %5 normal	Düşük	Normal veya düşük
HbF	Normal	Normal veya yüksek	Normal veya yüksek	Yüksek

2.8. Moleküler Yöntemler ile Beta Talasemi ve Hemoglobinopati Tanısı

Talasemilerde ve hemoglobinopatilerde DNA düzeyindeki mutasyon taramaları, tanı koymada önemli yer tutmaktadır. Mutasyonun bilinmesi hastalara ve taşıyıcılara genetik danışma verilmesi açısından oldukça önemlidir (Clarke and Higgins 2000).

Çağımızda moleküler genetik alanında kaydedilen gelişmeler kalıtsal olan bir çok hastalığın gen düzeyinde tanımlanmasını ve dolayısı ile de DNA düzeyinde tanı konulmasını sağlamıştır. Hemoglobinopatiler ve talasemiler moleküler mekanizmalarının ve mutasyonlarının en iyi şekilde anlaşıldığı hastalık grubuna girmektedir (Başak 2005).

Mutasyon taramaları için kullanılan DNA erişkin bireylerde periferik venöz kandan, fetüslerde koryonik villus örneğinden (9-12 gebelik haftası), amniyon sıvısından (15-16 gebelik haftası), kordon kanından (20-22 gebelik haftası), yine fetüse ait DNA'yı elde etmek için anne kanı plazmasından ve serumundan elde edilebilir. Preimplantasyon genetik tanıda (PGT) ise DNA kaynağı olarak embriyonun blastomerleri kullanılabilir (Keser 2007).

Hasta ve taşıyıcı bireylerde DNA'daki mutasyonları belirleyebilmek için daha basit, tekrarlanabilen, hızlı, ucuz, kolay uygulanabilir moleküler yöntemler geliştirilmiştir (Başak 2005, Keser 2007). Moleküler tekniklerle yapılan DNA analizleri hastalığın tanısı için

klirik ve biyokimyasal testleri tamamlayıcı niteliktedir, oldukça hassastır ve yüksek oranda doğru sonuç verir. Hemoglobinopati ve talasemi gibi hastalıkların sık görüldüğü toplumlarda bu teknikler oldukça büyük önem taşımaktadır (Başak 2005).

Moleküler genetik tekniklerin gelişmesinde ve çeşitlenmesinde en büyük pay PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniğinin keşfidir (Saiki vd 1985). İlk kez 1985 yılında Kary Mullis, Henry A. Erlich ve Randall K. Saiki tarafından bulunan, basitçe in vitro ortamda nükleik asitlerin uygun koşullarda çoğaltılması esasına dayanan bu teknik çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PCR tekniği kullanılarak laboratuvar tanısında çok büyük hız ve kesinlik kazanılmıştır (Akar 1999).

Hemoglobinopatiler ve talasemi grubunda hastalığın moleküler tanısı; tanıyı kesinleştirmede, hastayı takip etmede, hastalığın prognozunu tahminde, aileye verilecek genetik danışmanlıkta ve prenatal tanıda oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Özkınay 2010).

Hemoglobinopati veya talasemili hasta ve/veya ailelerinde kullanılacak moleküler genetik tekniklerin seçiminde iki temel yaklaşım uygulanmaktadır. Bu yaklaşımlar hemoglobinopati veya talasemiye neden olan mutasyonların bilinen ya da bilinmeyen mutasyonlar olmasına göre değişmektedir (Tüzmen and Schechter 2001, Başak 2005, Keser 2007, Özkınay 2010).

Bilinmeyen mutasyonların tespitinde kullanılan yöntemler indirekt yöntemler olarak adlandırılır. Belirli bir gen veya gen bölgesinde bir dizi değişikliği olup olmadığının anlaşılması için kullanılan yöntemlerdir. DGGE (Denatüre Edici Jel Elektrofrezisi), DHPLC (Denatüre Edici Yüksek Performanslı Likit Kromatografi) gibi yöntemler bu amaçla kullanılabilen yöntemlerdir. Bu gibi yöntemler ile mutasyonun yeri saptandıktan sonra mutasyonun dizi analizi gibi bir başka yöntemle belirlenmesi gerekir (Tüzmen and Schechter 2001, Başak 2005, Keser 2007, Hartevelde vd 2009, Özkınay 2010).

Bilinen mutasyonların belirlenmesinde kullanılan yöntemler ise direkt yöntemlerdir. Bunlar mutasyonun olup olmadığını doğrudan gösteren yöntemlerdir.

- RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi)
- ARMS (Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi)
- ASO (Alel Spesifik Oligonükleotid)
- RDBH (Reverse Dot-Blot Hibridizasyon)

- Gap- PCR
- DNA dizi analizi
- Real-Time PCR (Tüzmen and Schechter 2001, Başak 2005, Keser 2007, Özkınay 2010, www.talasemifederasyonu.org.tr/pdf/tani/cansinTedavi-9pdf.pdf,2012). Bu yöntemler arasında sayılabilir. Bunlardan DNA dizi analizi bilinmeyen mutasyonların belirlenmesinde de kullanılabilir.

Ayrıca son zamanlarda geliştirilen ve rutin tanıda aktif olarak yer almaya aday yöntemler de mevcuttur. Bunlardan biri AS-APEX (Allele Specific Arrayed Primer Extension) olup, alel spesifik primerleri içeren ve bunların uzamasına izin veren bir çip düzenidir (Pastinen vd 2000, Keser 2007). En son geliştirilen tekniklerden biri de pirosekanslamadır (pyrosequencing). Bu tekniğin temeli bir hastadaki normal ve mutasyon bulunan mRNA'nın miktarsal düzeylerinin belirlenmesi esasına dayanmaktadır (Ronaghi 2001, Keser 2007). Yöntem seçiminde hastanın fenotipik özellikleri, toplumda sık görülen mutasyonlar, laboratuvarın koşulları göz önünde tutulurken, yöntemin hassasiyeti, çalışma süresi ve ucuz olması da önemli ölçütlerdir (Keser 2007, Özkınay 2010).

2.8.1. RFLP (Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi)

İnsan genomu boyunca (özellikle kodlayıcı olmayan bölgelerde), her 200 nükleotitte bir dizi farklılığı görülür. Bu özel bölgelerdeki nükleotit değişiklikleri, tek bir nükleotit çiftinde değişiklik veya bir ya da birden fazla nükleotit çiftinin çıkarılması (delesyonu) veya araya sokulması (insersiyonu) şeklinde görülür ve bir restriksiyon enziminin kesim noktasını ortadan kaldırabilir ya da yeni bir kesim noktası yaratabilir.

Restriksiyon enzim kesimleri ile oluşturulan bu parça uzunluklarındaki farklılıklar, restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri olarak adlandırılır (Başaran 1999, Klug and Cummings 2002).

Tek tip nokta mutasyonunun neden olduğu Hb S'nin DNA analizi en etkin ve ekonomik şekilde restriksiyon enzimi ile yapılır. Bunun için β -globin geninin 5' ucunda, 1. ekzonunda yer alan mutasyonu kapsayan bölge özgün primer çifti ile çoğaltılır; elde edilen PCR ürünü restriksiyon enzimi ile kesilir. Agaroz jelde: sağlıklı birey, taşıyıcı birey ve orak hücreli anemi tanılı hasta birey olmak üzere üç farklı migrasyon şeması elde edilir (Başak 2005).

Beta talasemide ise β -globin geninin mutasyon taşıyan bölgesi uygun primer çifti kullanılarak çoğaltılır; PCR ürünü mutasyona özgü restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra agaroz jelde incelenir. Aşağıdaki Çizelge 2.13’de β talasemi için restriksiyon enzimi analizi ile incelenmesi mümkün olan bazı mutasyonlar, bu mutasyonlara özgü restriksiyon enzimleri ve tanı bölgesinin ne şekilde etkilendiği gösterilmektedir (Başak, 2005).

Çizelge 2.13: Restriksiyon enzimi ile tanımlanabilen bazı β talasemi mutasyonları (+ tanı bölgesi oluşuyor; - tanı bölgesi kalkıyor)

Mutasyon	Enzim	Tanı Bölgesi
Cd39	RmaI	+
Cd74/75	HaeIII	-
IVSI-1	BspMI	-
IVSII-1	HphI	-
IVSI-6	SfaNI	+
FSC-5	DdeI/TaqI	-/+
FSC-6	DdeI	-
13 bp del	Hinfl	-
IVSII-745	RsaI	+

2.8.2. ARMS (Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi)

ARMS, alel-spesifik primerler kullanan PCR’a dayalı, nokta mutasyonlarının ve küçük delesyon veya insersiyonların doğrudan belirlenmesini sağlayan bir yöntemdir (Najmabadi vd 2001).

İki tamamlayıcı tepkimeden oluşur. Birinci tepkime, normal DNA dizisine özgül ARMS primeri içerir ve belirli bir yerdeki mutant DNA’yı amplifiye edemez. Benzer olarak ikinci tepkime, mutanta özgül primer içerir ve normal DNA’yı amplifiye edemez (Kayrın vd 2003).

ARMS yöntemi PCR’a dayalı diğer yöntemlerden farklı olarak birçok avantaja sahiptir. Yöntem hızlı ve güvenilir olup radyoaktif madde içermez. İnternal kontrollü iki tepkimenin kullanımı yalancı pozitif sonuçların elde edilmesini önlemektedir. Yöntem genelde

herhangi bir mutasyon için geliştirilebilmesinin yanında, mevcut olan çeşitli genetik polimorfizmlerin saptanmasında da kullanılabilir. Bilinen mutasyonların tanısında hızlı ve pratik bir test olmasına karşın her primer için ayrı standardizasyon gerektirir (Kayrın vd 2003).

2.8.3. ASO (Allel Spesifik Oligonükleotid Hibridizasyon)/ RDBH (Reverse Dot-Blot Hibridizasyon)

Allel spesifik oligonükleotid hibridizasyon, biri normal diğeri mutant dizi için hazırlanmış iki oligonükleotid probun hedef dizi ile hibridizasyonu esasına dayanır. Tanıda ilk kullanılan metodlardandır (Özkınay 2010). Yöntemde “dot blot” veya “reverse dot blot” uygulamaları kullanılır. Reverse dot blot tek bir hibridizasyon reaksiyonunda bilinen birden fazla mutasyonun taranmasını sağlayan bir uygulamadır (Sutcharitchan vd 1995). Özellikle belirli mutasyonların sık görüldüğü toplumlarda uygulaması kolaydır. Son yıllarda geliştirilen ve ticari olarak bulunabilen kitler “reverse dot blot” yöntemi ile sınırlı sayıda mutasyonun sık olduğu toplumlarda bu mutasyonları bir arada saptamayı mümkün kılmıştır. Reverse dot-blot da sınırlı sayıda normal ve mutant prob strip membran üzerine emdirilmiştir. Genomik DNA ile hibridizasyon sonucunda normal ve mutant paralel bantlar değerlendirilerek tanı konur.

Ülkemizde rastlanılan alfa globin ve beta globin mutasyonlarının büyük kısmını (%90-95 oranında) kapsayan ticari kitler bulunmaktadır (Vienna lab-Strip Assay) (Özkınay 2010).

StripAssay kitinin kullanıldığı yöntem beş aşamadan oluşur. Bu aşamalar; kan örneklerinden DNA eldesi, in vitro multiplex amplifikasyonu (multiplex PCR), PCR ürünlerinin %2 lik agaroz jelde yürütülüp kontrol edilmesi, 12 tane wild-type (normal) ve 22 tane de mutant-spesifik immobilize oligonükleotid problemlerini taşıyan bir test şeridine amplifikasyon ürünlerinin hibridizasyonu ve hibridizasyon sonrasında streptavidin alkalin fosfataz kullanılarak ilgili gen dizilerine ait bantların renk gelişiminin gözlenmesi ile sonuçların analizini içerir.

2.8.4. Gap- PCR

Kırık noktalarının lokalizasyonlarının bilindiği delesyon şeklindeki mutasyonların saptanmasında kullanılır. Gap-PCR tekniğinin temeli, hedef gen bölgesinin delesyona uğramış kısmının tespitine dayanmaktadır. Kısaca teknik, hedef DNA bölgesine spesifik bir ileri primer ve delesyon olan bölgenin bir önüne bir de arkasına gelecek şekilde düzenlenmiş iki ayrı ters primer çifti ile çoğaltılması ve kontrole karşı değerlendirilmesinden ibarettir.

Beta talasemiye neden olabilen nadir görülen β geni delesyonları, α talasemiye neden olan α genlerindeki delesyonlar, γ - δ - β talasemiler, Hb Lepore tanısında kullanımı kolay bir yöntemdir. Allel drop-out oluşmasına yatkın olan bu yöntemle elde edilen sonuçların son yıllarda geliştirilen MLPA (Çoklu Ligasyon Prob Analizi), QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments) gibi yöntemlerle doğrulanması önerilmektedir (Harteveld vd 2009).

2.8.5. MLPA (Çoklu Ligasyon Prob Analizi)

MLPA, α , β ve γ - β talasemilerde bilinen ve bilinmeyen mutasyonların araştırılmasında kullanılan, hedef bölgedeki kopya sayısı değişikliklerini saptama esasına dayanan Southern blot, FISH ve gap-PCR gibi zor yöntemlere alternatif olabilecek son yıllarda hızla kullanıma girmekte olan bir yöntemdir. Hedef bölgeye çok sayıda probun hibridize edildikten sonra, bu hibridize edilen problemlerin universal-tagPCR problemleri kullanılarak kantitatif PCR ile çoğaltılmasına ve elde edilen fragmanların özel bilgisayar programları kullanılarak analiz edilmesine dayanır (Schouten vd 2002). Alfa ve beta geni içindeki delesyon şeklindeki mutasyonları saptamada oldukça etkin olan bu tekniği kullanan alfa ve beta gen bölgelerini kapsayan MLPA ticari kitleri üretilmiştir (MRC Holland and ServiceXS) (Harteveld vd 2009).

2.8.6. QMPSF (Quantitative Multiplex PCR of Short Fragments)

QMPSF, Charbonnier ve arkadaşları tarafından geliştirilen, kısa ekzonik dizilerin multipleks PCR ile çoğaltılması esasına dayanan yarı kantitatif bir yöntemdir. Delesyon ve duplikasyonların saptanmasını sağlar (Charbonnier vd 2000). 5' uçta spesifik tagların

kullanımı, fragmanlar arasındaki amplifikasyon verimlilik farklılıklarını azaltır. QMPSF, hızlı ve nispeten ucuz bir yöntemdir (Gouas vd 2008).

2.8.7. DNA Dizi Analizi

Mutasyon belirleme işleminde günümüzde altın standart olan yöntemdir. Di-deoksi sonlanma metodu geliştirilmesi ile hızla kullanıma giren sekanslama işlemi, bilinmeyen mutasyonların taranmasında hızlı ve güvenli bir yöntem haline gelmiştir. dNTP ve DNA uzamasında gerekli 3'-OH grubu olmayan ddNTP karışımı içeren farklı floresan renkli ddNTP ile sonlanmış farklı uzunluktaki PCR ürünleri, otomatize dizi analizi cihazlarında analiz edilmektedir. Non-radyoaktif, tek tüpte gerçekleşen, hızlı, kesin ve güvenilir bir yöntem olarak belirtilmektedir (Kotler vd 1994).

2.8.8. Real-Time PCR

1988 yılında "Thermus aquaticus" bakterisinden saflaştırılan, ısıya dayanıklı bir polimeraz olan "Taq polimeraz"ın kullanıma girmesi ile polimeraz zincir reaksiyonları için otomatize ısı döğüsü cihazları geliştirilmeye başlanmıştır. Buna ilaveten floresan ışımaya tekniklerinin de kullanıma girmesi ile "Real Time" (eş zamanlı) PCR reaksiyon cihazları geliştirilmiştir (www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/mugeaydinsayitoğlu.pdf, 2012). Real time PCR, DNA'nın çoğaltımını ve ürünleri tek bir tüpte belirlemeyi mümkün kılan yeni ve popüler bir yöntemdir (Gibson vd 1996). Bu yöntem geleneksel PCR yöntemi ile gen analizini birleştirerek gen analizinde kolaylık sağlamıştır. Floresan işaretli prob ve boyaların kullanıldığı bu yöntemde floresan ışımaya, çoğalan DNA ile doğru orantılı olarak artar ve bu sayede PCR çoğaltımı görünür hale getirilip, monitorize edebilir (Günel 2007). Bir çok isim verilen bu teknoloji, yabancı yayınlarda "kinetik PCR", "homojen PCR", "kantitatif real-time PCR" gibi isimlerle de adlandırılmaktadır (Bustin 2000, www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/mugeaydinsayitoğlu.pdf, 2012). Geleneksel PCR'dan farklı olarak Real-time kimyası reaksiyonun erken aşamaları sırasında bile PCR amplifikasyonunun belirlenebilmesine olanak sağlar. Yine PCR 'ın erken fazlarında reaksiyonun kinetik olarak ölçümünü mümkün kılar (www.appliedbiosystems.com). Real-time PCR bizi klasik PCR sonrası yapılması zorunlu diğer değerlendirme çalışmalarından da kurtarır (jel elektroforez gibi) (www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/mugeaydinsayitoğlu.pdf,2012). Bu, doğruluğu arttırdığı gibi

kontaminasyon riskini de azaltır. Geniş bir uygulama alanı, özgünlük ve doğru kantifikasyon imkanı sunar (www.genetiklab.com 2012).

Haberci RNA düzeyini sayısal olarak belirleyebilme ve biyolojik örneklerden elde edilen DNA'nın kopya sayısını sayısal değerlere dönüştürme, tek nokta mutasyonlarını belirleme en çok kullanılan alanlarını oluşturmaktadır (Kubista vd 2006).

2.8.8.1. Real-time PCR'da Görüntü

Real-time PCR'da ürün oluşumunun miktarı ile doğru orantılı olarak floresan sinyal alınır. Başlangıç siklusları sırasında sinyaller zayıftır, ürün miktarı artıp biriktikçe sinyaller katlanarak artar. Primerler, dNTP, prob gibi önemli reaksiyon içeriklerinin tükenmesi ile de reaksiyon, dolayısı ile de sinyaller sonlanır (Kubista vd 2006).

2.8.8.2. Real-time PCR'ın Temel Fazları

Real-time PCR'da fazlar temel PCR fazları ile aynıdır ve 4 ana fazdan oluşur.

- 1- Lineer Faz
- 2- Erken üssel faz
- 3- Üssel faz
- 4- Plato fazı

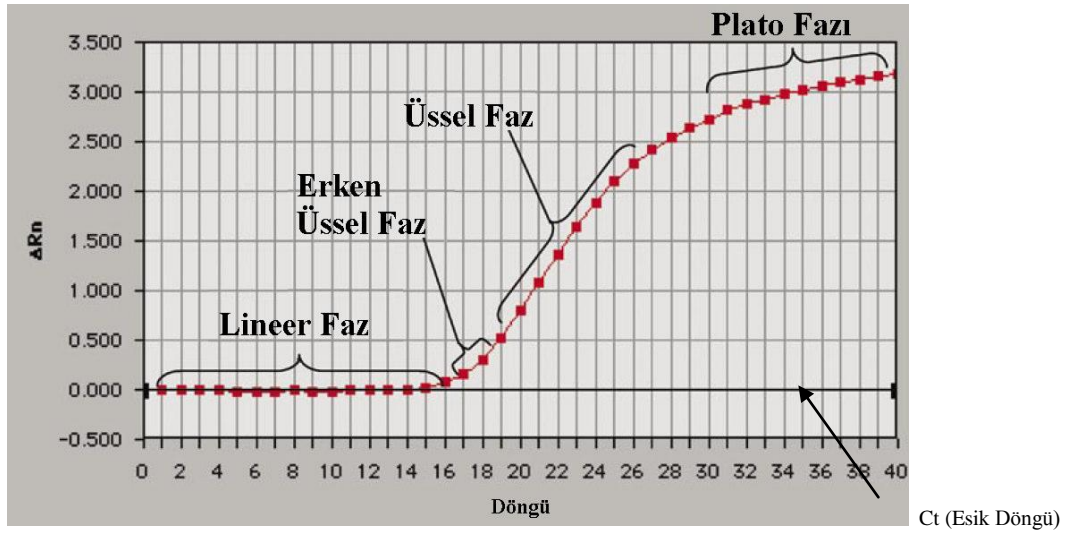
Lineer Faz: Bu PCR'ın başlangıç aşamasıdır ve yaklaşık 10-15 döngü sürer. Bu bölümde her ne kadar reaksiyon çok hızlı bir şekilde ilerlese de, çoğalma miktarı tespit sınırlarının altında olduğundan herhangi bir artış gözlenmez.

Erken Üssel Faz: Bu bölüm artış miktarının tespit sınırları içine girdiği bölümdür. Artış miktarı belirli bir eşik seviyeye ulaşır. Bu düzeye ulaşılan döngüye Ct (Threshold Cycle- Esik Döngü) (ABI Prism® literature - Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) veya CP (Crossing Point- Kesime Noktası) (LightCycler® literature - Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA) denir. Bu değer reaksiyona eklenen kalıp kopya sayısının hesaplanmasında kullanıldığı için önemlidir (Wong and Medrano 2005). Ölçülebilir ışın

real-time PCR cihazında 3-15 döngüde oluşur.Önemli artışı işaret eden eşik değeri kullanıcı tarafından ayarlanabilir (Kubista vd 2006, www.genetiklab.com 2012).

Üssel Faz: Bu bölümde reaksiyon içindeki DNA miktarı hızla artar.

Plato Fazı: Bu bölümde, üssel bölümdeki artış miktarı azalır ve reaksiyon durma noktasına yaklaşır (Wong ve Medrano 2005). Bunun sebebi reaksiyon reaktiflerinin azalması ve daha da önemlisi artan kalıp yoğunluğu sonucunda primer-kalıp bağlanması yerine kalıp-kalıp bağlanmasının artmasıdır (Syvänen vd 1988). Şekil 2.4



Şekil 2.4: PCR'in fazları (Wong ve Medrano 2005).

Günümüzde araştırma ve tanı laboratuvarlarında kullanılan ve birbirlerinden reaksiyon sayısı kapasiteleri, hızları, eksitasyon-emisyon dalga boyu farklılıkları, kanal sayıları gibi özellikleri ile ayrılan birçok real-time PCR cihazı bulunmaktadır. Ticari olarak satılan ve piyasada en fazla kullanılan cihazlar ; "Stratagene Mx3000p, Mx3005 ve Mx4000", "Applied Biosystems 7300 ve 7500", "Chromo4", "Smart Cycler", "Rotor-Gene" ve "LightCycler"dır (Günel 2007).

2.8.8.3. Real-time PCR ile DNA ve RNA belirlenmesi

2.8.8.3.1. Özgül Olmayan Belirleme Sistemleri

2.8.8.3.1.a. SYBR Green I

LightCycler sisteminin bir uygulamasında spesifik olmayan yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (SYBR Green I) kullanılır. Çoğalan DNA miktarındaki artışa paralel olarak floresanın miktarı da eş zamanlı olarak artar. Primerin bağlanmasını takiben gerçekleşen uzama aşamasında hedef DNA'nın çift zincir hale gelmesiyle DNA'ya bağlanan "SYBR Green" miktarı artmakta ve buna bağlı olarak yayılan floresan miktarında artış gözlenmektedir (Kubista 2006).

Bu yöntem iyi dizayn edilmiş primerler ve iyi optimize edilmiş PCR şartları ile hedef genin çoğaltılmasında başarılıdır. Bu sistemde floresan işaretli problemlere ihtiyaç olmaması bir avantaj sağlayarak maliyeti düşürür. Bunun yanı sıra yöntemin dezavantajları da vardır. Sistem her zaman spesifik amplifikasyonu göstermeyebilir. Çünkü çift sarmal diziyeye bağlanan "SYBR Green" ortamda hedef moleküller olmadığında, primerlerin birbirleri ile bağlanmaları (primer dimerleri) sonucunda da yapıya katılarak floresan oluşumuna sebep olabilmektedir. Bu olumsuz durumu ortadan kaldırmak için amplifikasyon ürünlerinin "melting curve" (erime eğrisi) analizi yapılmaktadır. Melting curve analizinde cihaz PCR tüplerini yavaşça ısıtmaya başlar, çift zincirli DNA birbirinden ayrılmaya başladığında (T_m: melting temperature= çift sarmal DNA'nın %50'sinin tek sarmal hale geçmesi için gerekli sıcaklık) floresan boya serbest kalır ve okunan floresan miktarı düşer. Erime sıcaklığı çoğalan DNA parçalarının uzunluğuna ve içerdiği GC/AT oranına bağlıdır. Dolayısı ile spesifik olmayan ürünlerin (primer dimerleri) ve çoğaltılmak istenen bölgenin T_m'leri arasında farklılık olacaktır. Çoğaltılmak istenen örneğe ait T_m derecesi, aynı koşullarda işleme alınan pozitif kontrolün T_m derecesi ile karşılaştırılarak PCR sonucunun doğruluğuna karar verilir (Günel 2007- <http://web.inonu.edu.tr./rdurmaz> 2012).

2.8.8.3.2. Özgül Belirleme Sistemi

Floresan işaretli problemlerin kullanıldığı yöntemlerdir. Bunların başında "Moleküler boncuk", "Scorpion", "hibridizasyon prob", "TaqMan" prob gibi problemlerin kullanıldığı teknikler gelir (Kubista 2006, Günel 2007, www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/mugeaydinsayitoğlu.pdf, 2012).

2.8.8.3.2.a. Moleküler Beacons (Moleküler İşaret/ Fener)

Bu yöntem, saç tokası şeklindeki uç kısmı çoğaltılacak DNA ile komplementer tek zincirli bir DNA dizisi içerir. Saç tokası şeklindeki bu yapının düz olan uç kısımlarında iki adet florokrom boya bulunur. Bunlardan florofor adı verilen baskılayıcı boya diğer boyanın floresansını engeller. Moleküler boncuk probu serbest halde iken ışığa yapmaz. PCR başladığında prob komplementeri olan hedef DNA dizisi ile karşılaştığında konformasyonu değişerek daha kararlı olduğu düz zincirli hale geçer. Moleküler boncuk yapısındaki bu şekil değişikliği saç tokası yapısının bozulmasına dolayısı ile yapının iki ucundaki boyaların birbirinden uzaklaşarak etkileşimlerinin ortadan kalkmasına neden olur. Böylece floresan miktarı artar. Bu yöntemde de analizler floresan ölçümüne dayanmaktadır (Tyagi and Kramer 1996).

Bu yöntemin en çok kullanıldığı alanlar SNP çalışmaları ve farmakogenetik araştırmalardır. Bu yöntemde prob dizaynı kilit noktadır. Optimal şartlar sağlanmadığında özellikle uygun sıcaklık koşulları sağlanmamışsa saç tokası değişmeyebilir ve ortamda hedef DNA dizisi bulursa bile floresan ışığa olmayabilir. (Tyagi and Kramer 1996, Bustin 2000).

2.8.8.3.2.b. Scorpions Prob

Bir diğer prob sistemi stem-loop yapısı taşıyan spesifik prob sekanslarından oluşan scorpions problardır (Thelwell vd 2000). Probu stem-loop konfigürasyonunda 5' ucuna bağlı floroforun sinyal üretimi 3' ucuna bağlı molekül tarafından baskılanır. Stem-loop yapısı primerin 5' ucuna bağlıdır. Amplifikasyonun başlaması ile spesifik prob DNA ipliği üzerinde kendi tamamlayıcı dizisine bağlanır ve bağlanma ile loop yapısı çözülür. Bunun sonucunda florofor üzerindeki baskı ortadan kalkar ve sinyal değeri artar (Gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/.../bolum10.pdf).

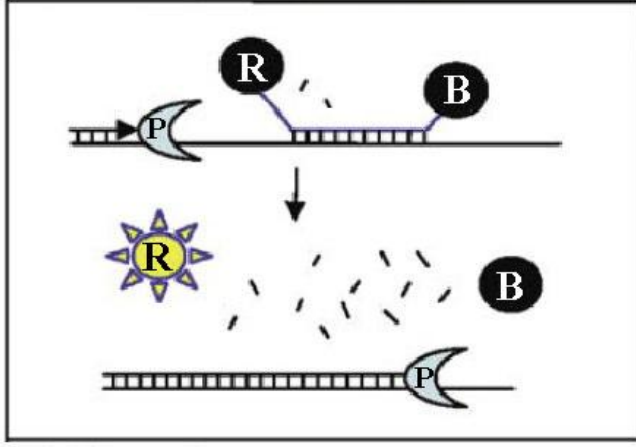
2.8.8.3.2.c. Hibridizasyon Prob Yöntemi

“LightCycler” in bir diğer uygulama şekli Roche tarafından geliştirilen hibridizasyon prob yöntemidir (Chaplin vd 1999). Burada biri 3' ucundan floresan boya ile işaretli (donör boya), diğeri 5' ucundan alıcı boya (acceptor dye) işaretli iki farklı prob dizayn edilmiştir. PCR reaksiyonu sırasında bu iki prob hedef nükleik asit dizisine birbirine yakın (1-5

nükleotid uzaklıkta) yere bağlanmakta ve işaretli uçlar yan yana gelmektedir. İki boyanın yan yana gelmesi ile açığa çıkan enerji ikinci prob üzerindeki alıcı boyayı etkileyerek floresan oluşumuna neden olur. “FRET” (Fluorescence Resonance Energy Transfer) olarak adlandırılan bu enerji transferi sonucunda oluşan floresan miktarı PCR süresince oluşan ürün miktarı ile doğru orantılıdır (Chaplin vd 1999, <http://web.inonu.edu.tr/rdurmaz> 2012).

2.8.8.3.2.d TaqMan Prob Yöntemi

TaqMan prob yöntemi “Doble-Dye Oligonucleotide”, “Dual Labeled Probe” veya “5’ nuclease probe” gibi isimlerle de adlandırılmaktadır (Günel 2007). TaqMan probu genellikle 20-30 baz uzunluğunda çoğaltılmak istenen DNA’ya komplementer olan floresan işaretli tek zincirli bir oligonükleotittir. Tm’leri genellikle primerlerin Tm’lerinden 10°C yüksektir. Probun, 5’ ucunda reporter (haberci) floresan boya, 3’ ucunda quencher (baskılayıcı) boya bulunur. 3’ uçtaki baskılayıcı boya 5’ uçtaki haberci boyanın sinyal oluşturmasını engellemektedir (Günel 2007, Gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/.../bolum10.pdf). Problar, PCR reaksiyonu sırasında sağ ve sol primerin bağlanma bölgeleri arasında hedef nükleik asit dizisine bağlanır. Primerlerin hedef nükleik asite bağlanmasını takiben başlatılan primer uzaması probun bağlı olduğu bölgeye geldiğinde sentezin devam edebilmesi için *Taq* DNA polimeraz enzimi 5’→3’ nükleaz aktivitesini kullanarak probu 5’ uçtan yıkmaya başlar. Böylece reporter boya serbest kalır ve sinyal oluşturur. PCR devam edip her bir döngüde üretilen ampikon miktarı arttıkça ona bağlı olarak floresan sinyal şiddeti de artmaktadır (Holland vd 1991, Cacherilli and Uhl 2001, Wong ve Medrano 2005). TaqMan prob mutasyon tespiti ile birlikte sayısal değerler de elde edilebildiğinden avantaj sağlanmış olur (Şekil 2.5). Bu yöntem nispeten kolay dizayn ve az optimizasyonla gerçekleştiği için hem ekspresyon profilinin çıkarılmasında hem de allelik diskriminasyonda kolaylıkla kullanılır (Gut vd 1999).



Şekil 2.5: TaqMan problemleri (Wong ve Medrano 2005). R: Raportör, B: Baskılayıcı, P: DNA Polimeraz

TaqMan problemleri için kullanılan primerlerin tasarımında dikkat edilmesi gereken hususlar şu şekildedir;

Primerler 20-24 baz uzunluğunda olmalı,

GC yüzdesi 20-80 arasında olmalı (% 40-60 daha iyi),

Aynı nükleotidin uzun tekrarlarından kaçınılmalı (özellikle guaninin tekrarlarından kaçınılmalı),

Erime sıcaklığı 55-60°C olmalı.

Forward ve reverse primerler probun üzerine gelmemek koşuluyla mümkün olduğunca proba yakın olmalı (Anonim 2008).

TaqMan problemlerinin tasarımında dikkat edilmesi gereken hususlar ise şu şekildedir;

Problar 20-30 baz çifti uzunluğunda olmalı.

Aynı nükleotidin uzun tekrarlarından kaçınılmalı (özellikle guaninin tekrarlarından kaçınılmalı).

Probun 5' ucu Guanin olmamalı; florofora bitişik guanin, degradesyondan sonra bile floresan sinyalin bir miktarını bloke edebilir (Anonim 2008).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Olguların Seçimi

Araştırmaya, hemoglobin elektroforez veya HPLC yöntemi ile beta talasemi taşıyıcısı/hastası veya orak hücre anemisi için taşıyıcı/hasta olduğu belirlenmiş, mutasyonları bilinmeyen 100 birey dahil edilmiştir.

Ayrıca çalışmayı planladığımız 6 mutasyon bölgesi açısından mutasyonları bilinen 18 örnek ve sağlıklı olduğu bilinen 3 örnek olmak üzere toplam 21 kontrol örneği çalışma kapsamına alınmıştır.

Kontrol olarak kullanılmak üzere 6 mutasyon bölgesi için (IVSI-110 (G>A), IVSI-6 (T>C), IVSII-1 (G>A), IVSII-745 (C>G), IVSI-1 (G>A) ve Hb S) hasta/taşıyıcı ve sağlıklı kontrol DNA' ları aşağıda adı geçen laboratuvarlardan temin edilmiştir;

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Antalya

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı, İstanbul

İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı, Malatya

Hemoglobin elektroforez ve/veya HPLC (High-performance liquid chromatography) ile talasemi taşıyıcısı/hastası veya orak hücre anemi taşıyıcısı/hastası olduğu belirlenmiş, mutasyonları bilinmeyen 100 birey ise aşağıdaki merkezler tarafından sağlanmıştır;

Ankara İl Sağlık Müdürlüğü “Ankara Talasemi Tanı Merkezi”

İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Laboratuvarı, İstanbul

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Ankara

Adana Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Genetik Bölümü, Adana

Çalışmaya katılanlar “Gönüllü Olur Formunu”nu imzalayarak çalışmaya katılmayı kabul etmişlerdir. Gönüllü olur formu örneği EK.1’de verilmiştir.

Çalışmanın etik kurul izni “Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu”nun 23 Mart 2011 tarihinde yapmış olduğu toplantının “3657” sayılı kararı ile alınmıştır. Ekonomik desteği ise 01/2011-37 kodlu proje kapsamında “Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi” tarafından sağlanmıştır. Çalışmanın Etik kurul kararı Ek.2’de, Proje’ye ait sözleşme protokolü Ek.3’de verilmiştir.

3.2. Araç-Gereçler

3.2.1. Kullanılan Cihazlar

- Yatay elektroforez tankı (Apollo,75,1214, ABD)
- Güç kaynağı (Labnet, Power Station 3000, ABD)
- Real-time PCR cihazı(Applied Biosystems, 7500, ABD)
- DNA termal döngü PCR cihazı (Applied Biosystems, GeneAmp PCR System 9700,ABD)
- Jel görüntüleme sistemi (Syngene,)
- Fotoğraf Makinası (Canon, Japonya)
- Spektrofotometre (Nanodrop ND-1000,ABD)
- Mikrofüj (Boeco, FVL-2400N, Almanya)
- Hassas terazi (Boeco, Almanya)
- Mikrodalga fırın (Arçelik, Türkiye)
- Otomatik pipetler (1–10 µl, 10–100 µl ve 100-1000 µl Gilson, France- Thermo-Finnpipette, Finland)
- Reaksiyon tüpleri:
Mikrotüpler (1,5 ml) (Greiner Bio-one, Almanya)
Mikrotüpler (0,2 ml) (Axygen Scientific, ABD)
- Santrifüj (Hettich Micro 22 R, Almanya)
- Sıcak su banyosu (Nuve nb5, Türkiye)
- Ultraviyole (U.V) transiluminatör (Synegene InGeniusLHR, İngiltere)
- Vorteks (Combi-SpinBoeco, Almanya)
- 0,2ml Optik Kapaklı 8li PCR strip tüp (Axygen Scientific, ABD)
- Eppendorf tüp taşıyıcıları
- DNA saklama kutuları (Atlas, ABD)
- Pudrasız eldiven (Mevamed, Türkiye)

3.2.2. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

- 50 bç DNA ladder (Fermentas,ABD)
- 100 bç DNA ladder (Fermentas,ABD)
- Agaroz (Prona, İspanya)
- Süper Hot Taq DNA Polimeraz (Dr.Zeydanlı, Türkiye)
- PCR tamponu (10XPCR Buffer) (Bioron,)
- dNTP (Dr.Zeydanlı, Türkiye)

- MgCl₂ (Fermantas, ABD)
- Steril dH₂O (Biochrom, Almanya)
- Etanol (Merck, Almanya)
- Etidyum bromür (AppliChem, Almanya)
- Orange Loading Dye (Fermantas, ABD)
- HBB sekans primerleri (Alfa DNA, Kanada)
- Real-time PCR primerler ve probları (Alfa DNA, Kanada)
- 10X TBE Çözeltisi (Tris, borik asit, EDTA çözeltisi) (Gibco)
- DNA İzolasyon Kiti (Axygen,AxyPrep Blood Genomic DNA Kit, ABD)
- 2 ml mikrofüj tüpleri
- Miniprep column tüpler
- RNAase
- Proteinaz K
- Lysis buffer A
- Buffer AP1
- Buffer AP2
- Wash buffer W1A- W2
- Elution buffer TE

3.2.3. Kullanılan Çözeltiler

1X TBE Çözeltisi

100 ml 10X TBE

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

%2 Agoroz Jel

2 g agaroz

100 ml 1X TBE

Agaroz Jel Hazırlanışı

% 2'lik Agoroz jel hazırlamak için 2 g agaroz hassas terazide tartıldı. Üzerine 100 ml 1X TBE çözeltisi konulup kaynatıldı. Etidyum bromür eklendi, yatay jel elektroforez tankına döküldü. Jel donduktan sonra jelin üzerini örtecek şekilde 1X TBE tamponundan eklendi.

3.3. Yöntem

3.3.1. Hasta Kanlarının Alınması

Her bir olgunun ön kolundan vacutainer sistemi ile 3-5ml venöz kan örneği etilendiamin tetraasetikasit (EDTA) içeren tüplere alındı ve DNA izolasyonu yapılmaya kadar + 4°C’de muhafaza edildi.

3.3.2. DNA İzolasyonu

Kan örneklerinden DNA izolasyon işlemi “Axygen DNA İzolasyon ” kiti kullanılarak aşağıda yazılı protokole göre yapıldı.

Axygen DNA İzolasyon Yöntemi

- 1- 1.5 ml’ lik mikrofüj tüpüne 500 µl Buffer AP1 konulmuştur.
 - 2- Üzerine 200-250 µl kan örneği eklenmiştir. Mikrofüj tüpünün kapağı kapatılmış ve maksimum hızda 10 saniye vortekslenmiştir.
 - 3- Üzerine 100 µl Buffer AP2 ilave edilmiş ve maksimum hızda 10 saniye daha vortekslenmiştir.
 - 4- 12 000 x g’de 10 dakika ortam sıcaklığında santrifüj edilerek hücresel artıkların pellet oluşturması sağlanmıştır.
 - 5- 2 ml mikrofüj tüpü içerisine Miniprep kolon yerleştirilmiş, 4. adımdaki işlemden sonra belginleşen supernatant Miniprep kolona aktarılmış ve 12 000 x g ‘de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
 - 6- 2 ml microfüj tüpünün altındaki süzölmüş sıvı boşaltılmış ve miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yeleştirilmiştir. 700 µl Buffer W1A Miniprep kolonun üzerine eklenmiş ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 12 000 x g ‘de 1 dakika santrifüj edilmiştir.
- Not: W1A konsantre buffer’a ilk kullanımdan önce etanol eklenmiştir.
- Not: Santirüfüjden sonra miniprep kolonda süzölmeyen sıvı kaldığında santrifüj süresi ya da gücü arttırılmıştır.
- 7- Mikrofüj tüpünün altına süzölen sıvı boşaltılmıştır. Miniprep kolon 2 ml Mikrofüj tüpüne tekrar yeleştirilmiştir. 800 µl Buffer W2 Miniprep kolonun üzerine eklenmiş ve 12000 x g’de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Not: W2 konsantre buffer’a ilk kullanımdan önce etanol eklenmiştir.

8- Opsiyonel Adım: Mikrofüj tüpünün altına s z len sıvı boşaltılmıştır. Miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirilmiştir. 500  l Buffer W2 eklenmiş ve 12 000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

Not: Buffer W2 ile iki kez yıkayarak tuzların daha iyi uzaklaştırılması sağlanmıştır. Böylece enzimatik reaksiyonlar sırasında bu nedenle oluşabilecek problemler elemine edilmiştir.

9- Mikrofüj tüpünün altına s z len sıvı boşaltılmıştır. Miniprep kolon 2 ml mikrofüj tüpüne tekrar yerleştirilmiş ve 12 000 x g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir.

10- Miniprep kolon 1.5 ml'lik mikrofüj tüpü içerisine yerleştirilmiştir. 80-200  l Buffer TE eklenmiş, 1 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. 12 000 x g'de 1 dakika santrifüj edilerek genomik DNA ayrılmıştır.

Not: TE Buffer daha önceden 65 C'ye ısıtılmıştır.

Elde edilen genomik DNA'lar kullanıma kadar -20  C'de muhafaza edilmiştir.

3.3.3. HBB (Hemoglobin, Beta) Geninin Tüm Dizisine Erişilmesi

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ve <http://www.ensembl.org/> adreslerinden HBB (Hemoglobin, Beta) geninin tüm dizisine ulaşılmıştır. Aşağıda ki şekilde (Şekil3.1) genin dizisi verilmiştir.

```
ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTC
CTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGG
CCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCATGTG
GAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCC
ACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCC
ACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTT
AGTGATGGCCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGCTGCACTGT
GACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACCTCAGGTTGAGTCTATGGGACGCTTGATGTTTTCTTTCC
CCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTGATAGGAAGGGGATAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATG
GGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTG
TTCATAACAATTGTTTTCTTTTGTAAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTAC
TATTATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAAC
TTAAAAAAAACCTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGC
ATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCATTATACATATTT
ATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATTT
GTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTCTTTTAAATATACTTTTTTGTATTATCTTATTTCTAATACTTTCC
CTAATCTCTTTCTTTTCCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCTCTTTGCACCATTTCTAAAGAA
TAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATCTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAA
ATTGTAACCTGATGTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTT
TATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTT
CATACCTCTTATCTTCCCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTT
TGGCAAAGAATTCACCCACCAGTGCAGGCTGCCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGC
CCTGGCCCAAGTATCACATAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCTTTGTT
CCCTAAGTCCAACCTACTAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCTAAT
AAAAAACATTTATTTTCATTGCA
```

Şekil 3.1: HBB hemoglobin, beta gen dizisi [Homo sapiens]Gene ID: 3043, updated on 27-Nov-2011.Genin ekzonları beyaz, intronları koyu pembe, başlangıç ve sonlanma kodonları sarı renk ile gösterilmiştir.

3.3.4. HBB Genini Dizilemek İçin Primer Tasarlanması

Sekansta iyi kalitede sonuç elde edebilmek için, geni 3 bölge içinde çoğaltacak şekilde, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> adresindeki program ile 3 primer çifti tasarlandı ve primerler Alfa DNA firmasına sentezletirildi.

Tasarlanan primerler HBB geninin dizilenmesi için kullanıldı. Böylece test kapsamında çalışılması planlanan HBB genindeki toplam 6 mutasyon bölgesi (IVSI-110(G>A), IVSI-6 (T>C), IVSII-1 (G>A), IVSII-745 (C>G), IVSI-1 (G>A) ve Hb S mutasyonu) için ilgili kontrol DNA'larının teyidinde ve geliştirdiğimiz test ile real-time PCR'da mutasyon

belirlediğimiz ve belirleyemediğimiz hastalardan rastgele seçilmiş birkaçının sonuçlarının teyit edilmesinde kullanıldı. Çizelge 3.1’de HBB sekans primerleri, PCR ürün uzunlukları ve bağlanma ısıları verilirken; Şekil 3.2’de primerlerin gen üzerindeki gösterimi verilmiştir.

Çizelge 3.1: HBB sekans primerleri, PCR ürün uzunlukları ve bağlanma ısıları

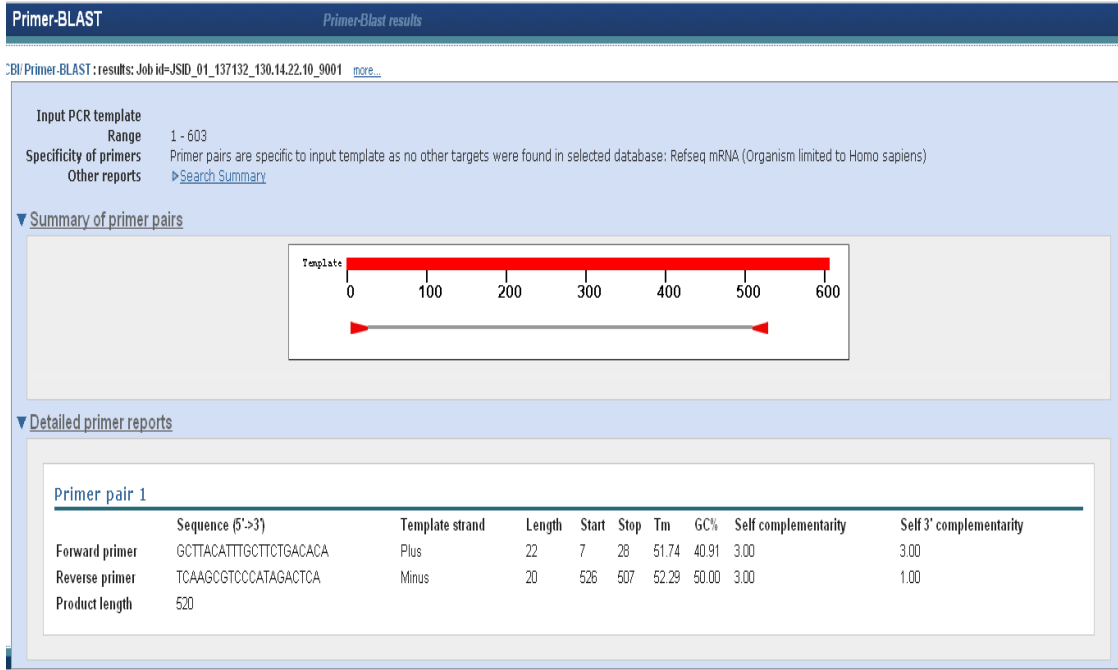
HBB Geni Sekans Primerleri	PCR Ürün Uzunluğu	Bağlanma Sıcaklığı
Primer1 Forward Primer 5’-GCTTACATTTGCTTCTGACACA-3’ Reverse Primer 5’-TCAAGCGTCCCATAGACTCA-3’	522 bç	59°C
Primer 2 Forward Primer 5’-GCTCGGTGCCTTTAGTGATG-3’ Reverse Primer 5’-GCAAAATTACCCTGATTTGGTC-3’	603 bç	60 °C
Primer3 Forward Primer 5’-TTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTT-3’ Reverse Primer 5’-GGACTTAGGGAACAAAGGAACC-3’	675 bç	60 °C

AGGGCTGGGCATAAAAAGTCAGGGCAGAGCCATCTATTGCTTACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAG
CAACCTCAAACAGACACCatgGTGCATCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGG
TGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAGGCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGAC
CAATAGAAAAGTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATT
GGTCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGAT
CTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAAGGCTCATGGCAAGAAAGTCTCGGTGCCTTTA
GTGATGCGCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACACTGAGTGAGCTGCCTGTGACAAGCT
GCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACGCTTGA TGTTTTCTTTCCCCTTCTTTTCTATGG
TTAAGTTCATGTATAGGAAGGGATAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCAT
CAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTTCTTTTATTTGCTGTTTCATAACAATTGTTTTCTTTTGTAAAT
TCTTGCTTTCTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACATTGTGTATAACAAA
AGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACTTAAAAAAAAAACTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATTT
GGAATATATGTGTGCTTAFTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTTCTTTATTTTTAATTGATACATA
ATCATTATACATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAAT
TTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTCTTCTTTTAAATATACTTTTTTTGTTTATCTTATTTCTAATACTTT
CCCTAATCTCTTCTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCCTCTTTCACCATTCTAAAGAATAACA
GTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATCTCTGCATATAAAATATTTCTGCATATAAAATGTAAGTAT
GTAAGAGGTTTCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTTATTTTATGGTTGGGATAA
GGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCCCTCCACAGC
TCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCATCACTTTGGCAAAGAATTCACCCACCAGTGCAGGCTGC
CTATCAGAAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTGGCCACAAGTATCACtaagCTCGCTTTCTTGCTGTC
CAATTTCTATTAAGGTTCCCTTTGTTCCCTAAGTCCAACTACTAAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAG
CATCTGGATTCTGCCTAATAAAAAACATTTATTTTCATTGCAA TGATGTATTTAAATTATTTCTGAATATTTT

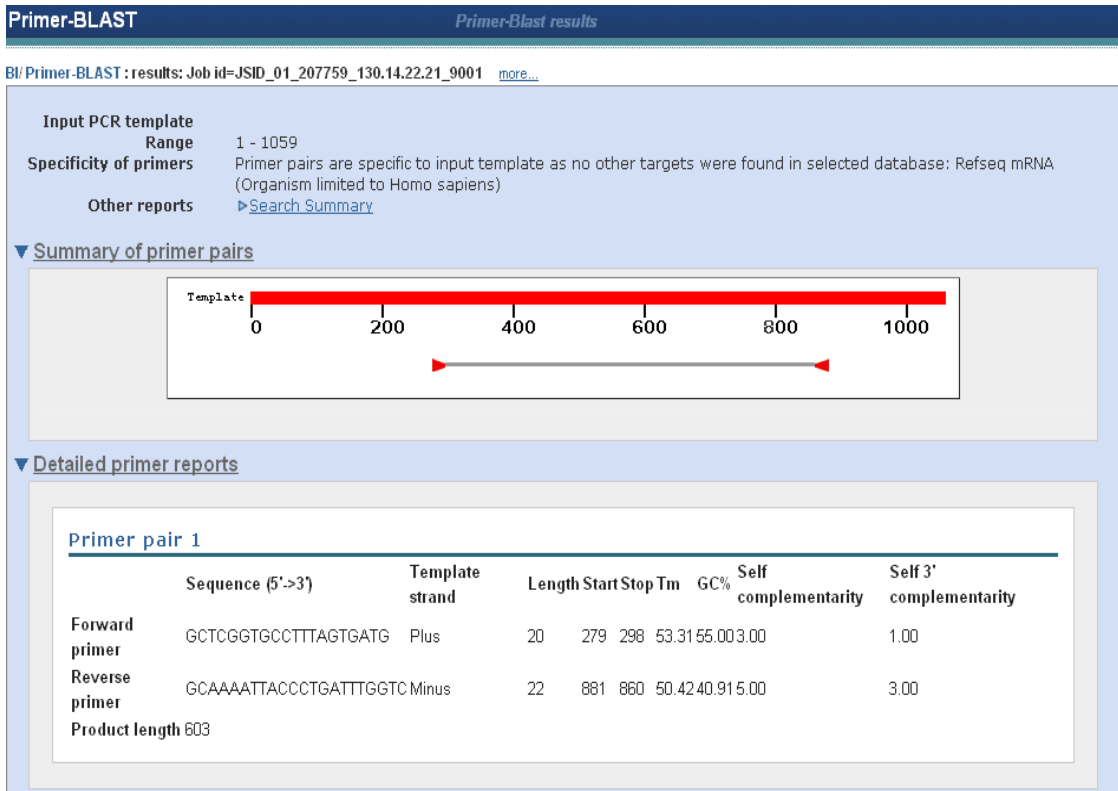
Şekil 3.2: Sekans primerlerinin gen üzerindeki genel gösterimi; primer1 çifti; yeşil, primer2 çifti; pembe ve primer3 çifti; kahverengi ile gösterilmiştir.

3.3.5. Sekans Primerlerinin Blast Sonuçları

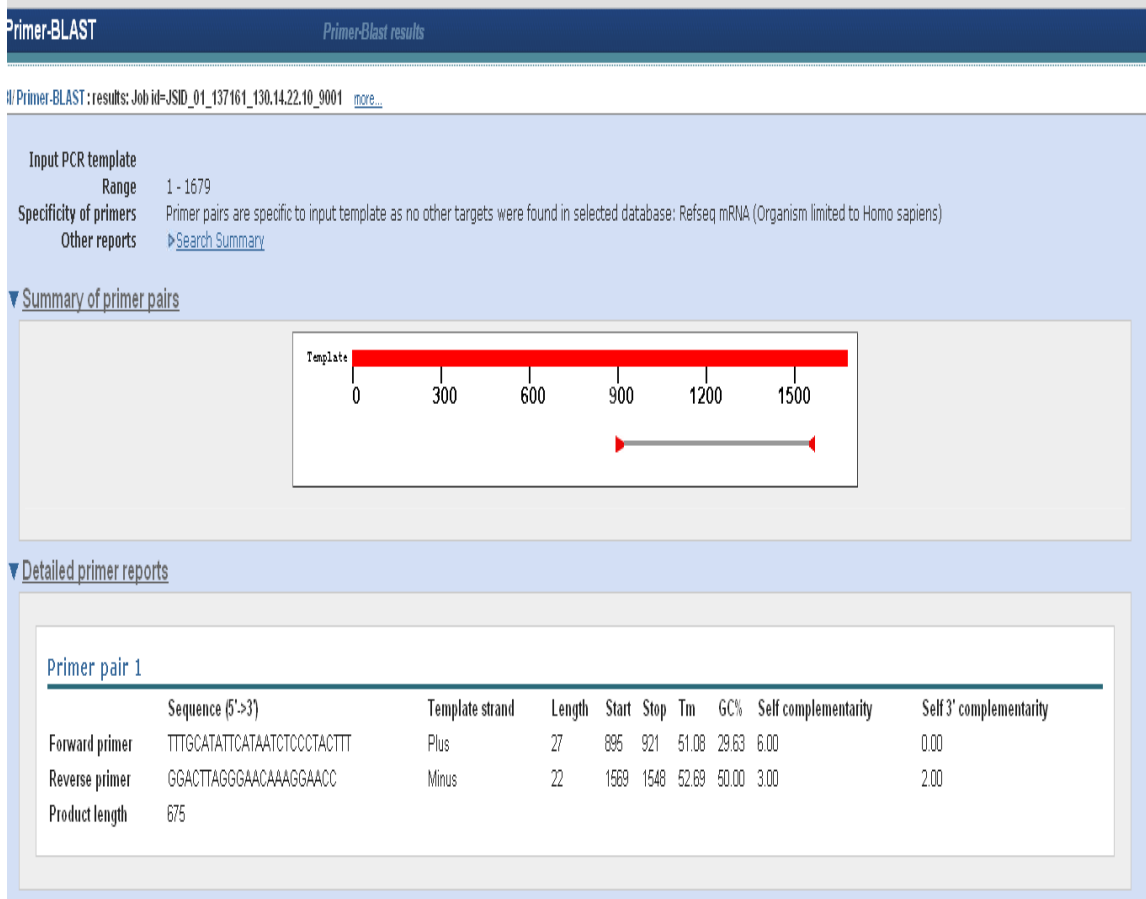
Seçilen primer dizileri www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/primertool adresindeki program kullanılarak BLAST'lanıp (Basic Local Alignment Search Tool) homoloji sonuçları yorumlanarak özgünlükleri belirlendi. Aşağıda ki Şekil 3.3, Şekil 3.4 ve Şekil 3.5'de primerlerin BLAST sonuçları verilmiştir.



Şekil 3.3: HBB geni sekans primer 1 blast sonucu



Şekil 3.4: HBB geni sekans primer 2 blast sonucu



Şekil 3.5: HBB geni sekans primer 3 blast sonucu

3.3.6. HBB Geni Sekans Primerleri ile PCR Optimizasyonu

PCR koşullarının optimizasyonu için primerler 58-61 °C sıcaklıkta denenmiştir. Bu amaç için, hastalardan elde edilen DNA'lar kullanılmıştır.

3 primer çifti için de Çizelge 3.2'deki reaksiyon koşullarında ve Çizelge 3.3'deki termal döngü koşullarında, Applied Biosystems, (GeneAmp PCR System 9700) termal döngü cihazı kullanılarak optimizasyon yapılmıştır.

Çizelge 3.2: HBB geni sekans primerleri PCR optimizasyonu reaksiyon koşulları

Reaktif	Miktar(μ l)
Steril distile su	14,2
10Xtampon buffer	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2,5
dNTP Karışımı (her biri için 10 mM)	0,5
Forward Primer (10pmol)	1
Reverse Primer (10pmol)	1
Taq DNA Polimeraz (5 ünite / μ l) (HotStartTaq®)	0,3
DNA	3
Toplam Hacim	25

Çizelge 3.3: HBB geni sekans primerleri PCR optimizasyonu termal döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk:sn)	Döngü Sayısı
95	12:00	1
95	00:15	
60	01:00	35
72	00:30	
72	05:00	1
4	Süresiz	1

3.3.7. HBB Genine Ait Sekans Primerleri ile Çoğaltılmış PCR Ürünlerinin Kontrolü

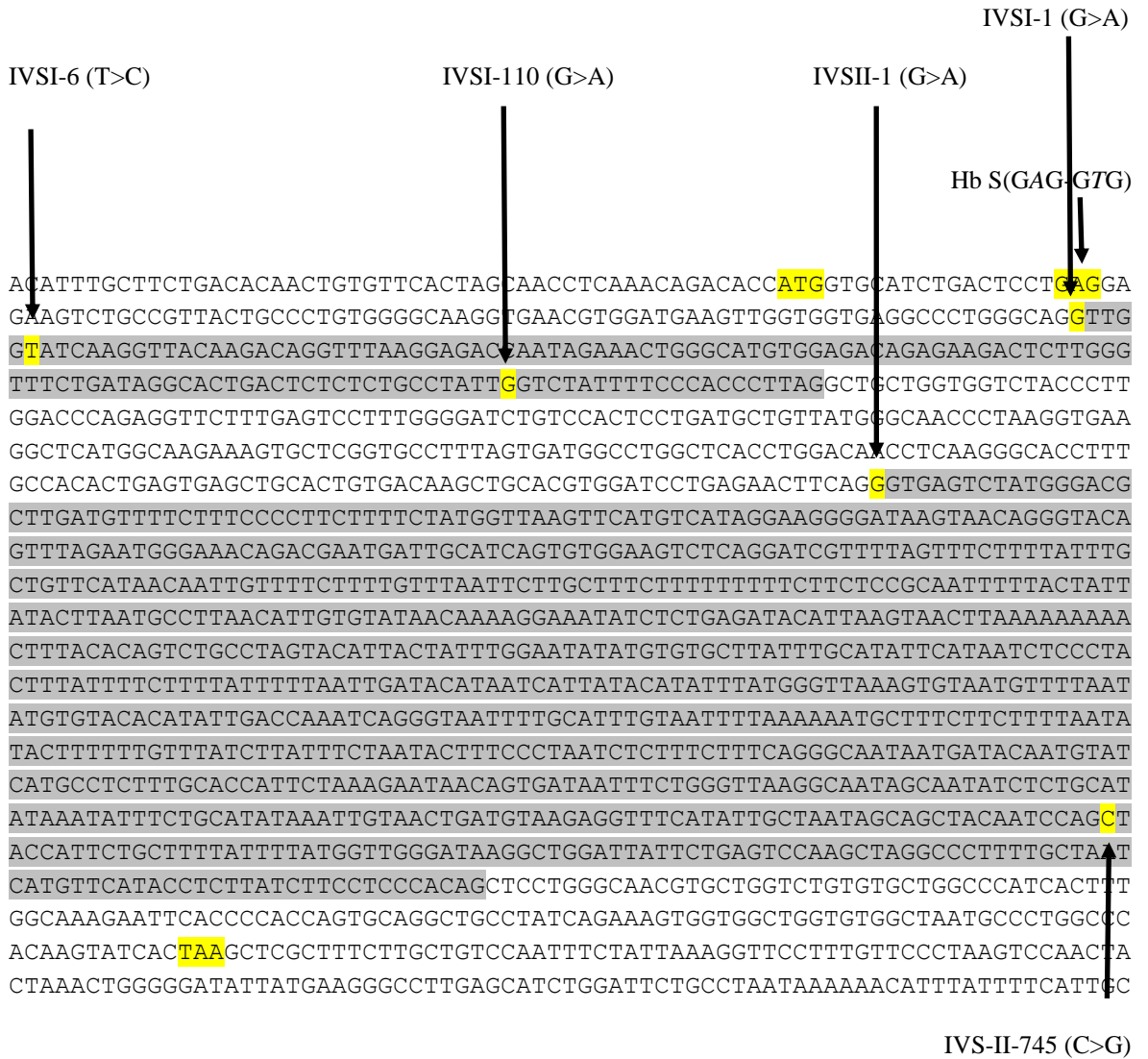
PCR reaksiyonunun sonucunda elde edilen ürünler % 0,1 etidyum bromür içeren % 2'lik agaroz jelde yürütülerek reaksiyonun başarılı olup olmadığı kontrol edildi. Çoğaltılmış DNA ürününden 5 μ l alınarak, 3 μ l Orange G jel yükleme boyası ile karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklendikten sonra moleküler ağırlık belirteci eşliğinde 30 dakika 90 Volt sabit akımda yürütüldü. Jel, ultraviyole (UV) transliminatör altında jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.3.8. HBB Genine Ait Sekans Primerleri ile Çoğaltılmış PCR Ürünlerinin DNA Dizi Analizi

HBB genine ait sekans primerleri ile çoğaltılmış PCR ürünlerinin DNA dizi analizi Dr.Zeydanlı firması aracılığı ile MacroGen firmasında yaptırılmıştır.

3.3.9. Çalışma Kapsamına Alınan Mutasyon Bölgelerinin HBB Geni Üzerindeki Yerleri

Kit kapsamında çalışmayı düşündüğümüz mutasyon bölgelerinin gen üzerindeki yerleri bulunmuştur. Şekil 3.6’da mutasyon bölgeleri oklarla gösterilmiştir.



Şekil 3.6: Çalışma kapsamına alınan mutasyon bölgelerinin gen üzerindeki gösterimi

3.3.10. Real-Time PCR Primer ve Prob Tasarımı

Primerler Alfa DNA'ya sentezlettirilmiştir. Real-time PCR için TaqMan probları kullanılmıştır ve yine Alfa DNA firmasına sentezlettirilmiştir. Tasarlanan primer ve prob ile gen üzerindeki gösterimleri aşağıdaki Şekil 3.7, Şekil 3.8, Şekil 3.9, Şekil 3.10, Şekil 3.11, Şekil 3.12'de verilmiştir.

Forward primer normal **CACTGACTCTCTCTGCCTATAG**
Forward primer mutant CACTGACTCTCTCTGCCTATGA
Reverse primer ACAGCATCAGGAGTGGACAGAT
Prob **TTCCACCCCTTAGGCTGCTGGTG**

ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACC**ATG**GTGCATCTGACTCCTGAGGA
GAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGGAGGCCCTGGGCAG**GTTG**
GTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGG
TTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATT**TTCCACCCCTTAGGCTGCTGGTG**GTCTACCCTT
GGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGG**ATCTGTCCACTCCTGATGCTGTT**TATGGGCAACCCTAAGGTGAA
GGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGG

Şekil 3.7: IVSI-110 (G>A) için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi; forward primer kırmızı renkte, reverse primerin bağlandığı yer mavi renkte, prob yeşil renkte, mutasyon bölgesi sarı renkte gösterilmiştir.

Forward primer normal **AGGCCCTGGGCAGGTTAG**
Forward primer mutant TGAGGCCCTGGGCAGATTTA
Reverse primer CCAAGGGTAGACCACCAGCA
Prob **TCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCC**

ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACC**ATG**GTGCATCTGACTCCTGAGGA
GAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGT**AGGCCCTGGGCAGGTTG**
GTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGG
TTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTCCACCCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTT
GGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAA
GGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGT

Şekil 3.8: IVSI-1(G>A) için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi; forward primer kırmızı renkte, reverse primerin bağlandığı yer mavi renkte, prob yeşil renkte, mutasyon bölgesi sarı renkte gösterilmiştir.

Forward primer **CCATGGTGCATCTGACTCCT**
Reverse primer normal CTTAAACCTGTCTTGTAACCTTGAGA
Reverse primer mutant CTTAAACCTGTCTTGTAACCTTGAAG
Prob **TCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGG**

ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACC**ATG**GTGCATCTGACTCCTGAGGA
GAAG**TCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGG**CAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGGAGGCCCTGGGCAG**GTTG**
GTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGG
TTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTT
GGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAA
GGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGG

Şekil 3.9: IVSI-6 (T>C) için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi; forward primer kırmızı renkte, reverse primerin bağlandığı yer mavi renkte, prob yeşil renkte, mutasyon bölgesi sarı renkte gösterilmiştir.

Forward primer normal **GCTAATAGCAGCTACAATCCATC**
Forward primer mutant GCTAATAGCAGCTACAATCCAAG
Reverse primer TGTGGGAGGAAGATAAGAGGT
Prob **TGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTA**

ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACC**ATG**GTGCATCTGACTCCTGAGGA
GAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGGAGGCCCTGGGCAG**GTTG**
GTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGG
TTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTT
GGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAA
GGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAGTGATGGCCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACCTCAGGGTGAGTCTATGGGACG
CTTGATGTTTTCTTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTTCATAGGAAGGGGATAAGTAACAGGGTACA
GTTTAGAATGGGAAACAGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTTCTTTATTTG
CTGTTTATAACAATTTGTTTTCTTTTGTAAATTTCTGCTTTCTTTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTTACTATT
ATACTTAATGCCTTAACATTTGTGTATAACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACCTAAAAA
CTTTACACAGTCTGCCTAGTACATTTACTATTTGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTA
CTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCATTATACATATTTATGGGTTAAAGTGAATGTTTTAAT
ATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTGCATTTGTAATTTTAAAAAATGCTTTCTTTTAAATA
TACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTTTCTTTTCCAGGGCAATAATGATACAATGTAT
CATGCCCTCTTTGCACCATTCTAAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATCTCTGCAT
ATAAATATTTCTGCATATAAATTTGTAACCTGATGTAAGAGGTTTCATATT**GCTAATAGCAGCTACAATCCAGCT**
ACCATTCTGCTTTTATTTTATGGTTGGGATAAGGCTGGATTATTC**TGAGTCCAAGCTAGGCCCTTTTGCTA**AT
CATGTTTAT**ACCTCTTATCTTCCCTCCACA**GCCTCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCCCATCACTTT
GGCAAAGAATTCACCCACCAGTGCAGG

Şekil 3.10: IVSII-745(C>G) için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi; forward primer kırmızı renkte, reverse primerin bağlandığı yer mavi renkte, prob yeşil renkte, mutasyon bölgesi sarı renkte gösterilmiştir.

Forward primer CAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTA

Reverse primer normal CTCTCAGATACCCTGCGAAC

Reverse primer mutant TCCTCAGATACCCTGCGAAC

Prob ACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAA

ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGA
GAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGGAGGCCCTGGGCAGGTTG
GTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGG
TTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTT
GGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAA
GGCTCATGGCAAGAAAGTGCTCGGTGCCTTTAAGTATGGCCTGGCTCACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTT
GCCACACTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACG
CTTGATGTTTTCTTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGATAAGTAACAGGGTACA
GTTTAGAATGGGAAAC

Şekil 3.11: IVSII-1(G>A) için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi; forward primer kırmızı renkte, reverse primerin bağlandığı yer mavi renkte, prob yeşil renkte, mutasyon bölgesi sarı renkte gösterilmiştir.

Forward primer normal CATGGTGCATCTGACTCCTTA

Forward primer mutant CATGGTGCATCTGACTCCTAT

Reverse primer GTCTCCACATGCCAGTTTCTA

Prob ATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGA

ACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGAGGA
GAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGGAGGCCCTGGGCAGGTTG
GTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAGACTCTTGGG
TTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTACCCTT
GGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCCTAAGGTGAA
GGCTCATGGC

Şekil 3.12: Hb S [Glu-Val, GAG-GTG] için prob ve primerlerin dizi üzerinde gösterimi; forward primer kırmızı renkte, reverse primerin bağlandığı yer mavi renkte, prob yeşil renkte, mutasyon bölgesi sarı renkte gösterilmiştir.

3.3.11. İnternal Kontrol Primerleri

İnternal kontrol olarak GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) genine ait primerler kullanılmıştır. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> ve <http://www.ensembl.org/> adreslerinden GAPDH geninin tüm dizisine ulaşılmıştır. İnternal kontrol bölgesine ait prob ve primerler ile prob ve primerlerin GAPDH geni üzerindeki gösterimi Şekil 3.13'de verilmiştir.

Forward primer TCCTGCACCACCAACTGCTTAG
Reverse primer CATCACGCCACAGTTTCCC
Prob AGGTCATCCATGACAACTTTGGYATCG

CCTCTTTCTTTGCAGCAATGCCTCCTGCACCACCAACTGCTTAGCACCCCTGGCCAAGGTC
ATCCATGACAACTTTGGTATCGTGGAAAGGACTCATGGTATGAGAGCTGGGGAATGGGACT
GAGGCTCCACCTTCTCATCCAAGACTGGCTCCTCCCTGCCGGGGCTGCGTGCAACCCT
GGGGTTGGGGTTCTGGGGACTGGCTTTCCATAATTTCTTTCAAGGTGGGGAGGGAGG
TAGAGGGGTGATGTGGGGAGTACGCTGCAGGGCCTCACTCCTTTTGCAGACCACAGTCCA
TGCCATCACTGCCACCCAGAAGACTGTGGATGGCCCCTCCGGGAAACTGTGGCGTGATGG
CCGC

Şekil 3.13: İnternal kontrol prob ve primerlerinin dizi üzerinde gösterimi; forward primer kırmızı renkte, reverse primerin bağlandığı yer mavi renkte, prob yeşil renkte gösterilmiştir.

3.3.12. Raportör ve Baskılayıcılar

Mutasyon bölgelerine ve internal kontrol bölgesine özel olarak tasarlanan problemler için Çizelge 3.4’de gösterilen raportör ve baskılayıcılar kullanılmıştır.

Çizelge 3.4: Problemler için kullanılan raportör ve baskılayıcılar

	5' Raportör	Prob Dizisi	3' Baskılayıcı
IVSI-110 (G>A)	FAM	5'-TTC CCA CCC TTA GGC TGC TGG TG-3'	BHQ
IVSI-1 (G>A)	FAM	5'-TCT GAT AGG CAC TGA CTC TCT CTG CC-3'	BHQ
IVSI-6 (T>C)	FAM	5'-TCT GCC GTT ACT GCC CTG TGG GG-3'	BHQ
IVSII-745 (C>G)	FAM	5'-TGA GTC CAA GCT AGG CCC TTT TGC TA-3'	BHQ
IVSII-1 (G>A)	FAM	5'-ACA AGC TGC ACG TGG ATC CTG AGA A-3'	BHQ
Hb S [Glu-Val, GAG-GTG]	FAM	5'-ATC AAG GTT ACA AGA CAG GTT TAA GGA-3'	BHQ
İnternal Kontrol	JOE	5'-AGG TCA TCC ATG ACA ACT TTG GYA TCG-3'	TAMRA

3.3.13. Real- Time PCR Optimizasyonu ve PCR için Reaksiyon Koşulları

PCR koşullarının optimizasyonundaki kolaylık ve primerlerin çalıştığını göstermek için primerler öncelikle konvansiyonel PCR koşullarında denenmiştir. Bu amaç için, hastalardan elde edilen DNA'lar kullanılmıştır. 6 mutasyon bölgesi için aşağıda Çizelge 3.5'de verilen reaksiyon koşulları ve çizelge 3.6'da verilen termal döngü koşullarında konvansiyonel PCR'da optimizasyon sağlanmıştır.

Çizelge 3.5: Konvansiyonel PCR optimizasyonu reaksiyon koşulları

Reaktif	Miktar(μ l)	Miktar(μ l)
	(IVSI-110(G>A), IVSI-6 (T>C), IVSII-745 (C>G), IVSI-1 (G>A) ve Hb S	IVSII-1(G>A)
Steril distile su	14,2	13,2
10Xtampon buffer (KCl)	2,5	2,5
MgCl ₂ (25mM)	3	4
dNTP Karışımı (her biri için 10 mM/ μ l)	0,5	0,5
Primer1 Normal (10pmol/ μ l)	0,5	-
Primer1Mutant (10pmol/ μ l)	-	0,5
Primer2 (10pmol/ μ l)	0,5	0,5
Taq DNA Polimeraz (5 ünite/ μ l) (HotStartTaq®)	0,3	0,3
DNA	3	3
Toplam Hacim	25	25

Çizelge 3.6: Konvansiyonel PCR optimizasyonu termal döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk:sn)	Döngü Sayısı
95	12:00	1
95	00:15	
62	01:00	35
72	00:30	
72	05:00	1
4	Süresiz	1

Çizelge 3.8: IVSII-1 mutasyon bölgesi real-time PCR optimize reaksiyon koşulları

Reaktif	Normal Miks Miktar(μ l)	Mutant Miks Miktar(μ l)
Steril distile su	4,6	4,6
10Xtampon buffer (KCl)	2,5	2,5
MgCl ₂ (25mM)	6	6
dNTP Karışımı (her biri için 25 mM)	0,2	0,2
Reverse Primer Normal (10pmol/ μ l)	1,5	-
Mutant (10pmol/ μ l)	-	1,5
Forward Primer (10pmol/ μ l)	1,5	1,5
Prob (10pmol/ μ l)	1,5	1,5
İnternal kontrol primeri forward (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
İnternal kontrol primeri reverse (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
İnternal kontrol prob (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
Taq DNA Polimeraz (5 ünite/ μ l) (HotStartTaq®)	0,3	0,3
DNA	4,5	4,5
Toplam Hacim	25	25

Çizelge 3.9: Real-time PCR IVSI-110 mutasyon bölgesi optimize reaksiyon koşulları

Reaktif	Normal Miks Miktar(μ l)	Mutant Miks Miktar(μ l)
Steril distile su	9,8	9,6
10Xtampon buffer (KCl)	2,5	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2,5	2,5
dNTP Karışımı (her biri için 25 mM)	0,2	0,2
Forward Primer Normal (10pmol/ μ l)	0,9	-
Mutant (10pmol/ μ l)	-	1
Reverse Primer (10pmol/ μ l)	0,9	1
Prob (10pmol/ μ l)	1	1
İnternal kontrol primeri forward (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
İnternal kontrol primeri reverse (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
İnternal kontrol prob (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
Taq DNA Polimeraz (5 ünite / μ l) (HotStartTaq®)	0,3	0,3
DNA	4,5	4,5
Toplam Hacim	25	25

Çizelge 3.10: Real-time PCR IVSII-745 mutasyon bölgesi optimize reaksiyon koşulları

Reaktif	Normal Miks Miktar(μ l)	Mutant Miks Miktar(μ l)
Steril distile su	9,8	9,6
10Xtampon buffer (KCl)	2,5	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2,5	2,5
dNTP Karışımı (her biri için 25 mM)	0,2	0,2
Forward Primer Normal (10pmol/ μ l)	0,9	-
Mutant (10pmol/ μ l)	-	1
Reverse Primer (10pmol/ μ l)	0,9	1
Prob (10pmol/ μ l)	1	1
İnternal kontrol primeri forward (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
İnternal kontrol primeri reverse (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
İnternal kontrol prob (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
Taq DNA Polimeraz (5 ünite / μ l) (HotStartTaq®)	0,3	0,3
DNA	4,5	4,5
Toplam Hacim	25	25

Çizelge 3.11: IVSI-6 mutasyon bölgesi real-time PCR optimize reaksiyon koşulları

Reaktif	Normal Miks Miktar(μ l)	Mutant Miks Miktar(μ l)
Steril distile su	11,6	11,4
10Xtampon buffer (KCl)	2,5	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2,5	2,5
dNTP Karışımı (her biri için 25 mM)	0,2	0,2
Reverse Primer Normal (10pmol/ μ l)	0,3	-
Mutant (10pmol/ μ l)	-	0,4
Forward Primer (10pmol/ μ l)	0,3	0,4
Prob (10pmol/ μ l)	0,4	0,4
İnternal kontrol primeri forward (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
İnternal kontrol primeri reverse (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
İnternal kontrol prob (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
Taq DNA Polimeraz (5 ünite / μ l) (HotStartTaq®)	0,3	0,3
DNA	4,5	4,5
Toplam Hacim	25	25

Çizelge 3.12: Hb S mutasyon bölgesi real-time PCR optimize reaksiyon koşulları

Reaktif	Normal Miks Miktar(μ l)	Mutant Miks Miktar(μ l)
Steril distile su	9,8	9,6
10Xtampon buffer (KCl)	2,5	2,5
MgCl ₂ (25mM)	2,5	2,5
dNTP Karışımı (her biri için 25 mM)	0,2	0,2
Forward Primer Normal (10pmol/ μ l)	0,8	-
Mutant (10pmol/ μ l)	-	0,9
Reverse Primer (10pmol/ μ l)	0,8	0,9
Prob (10pmol/ μ l)	1,2	1,2
İnternal kontrol primeri forward (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
İnternal kontrol primeri reverse (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
İnternal kontrol prob (10pmol/ μ l)	0,8	0,8
Taq DNA Polimeraz (5 ünite / μ l) (HotStartTaq®)	0,3	0,3
DNA	4,5	4,5
Toplam Hacim	25	25

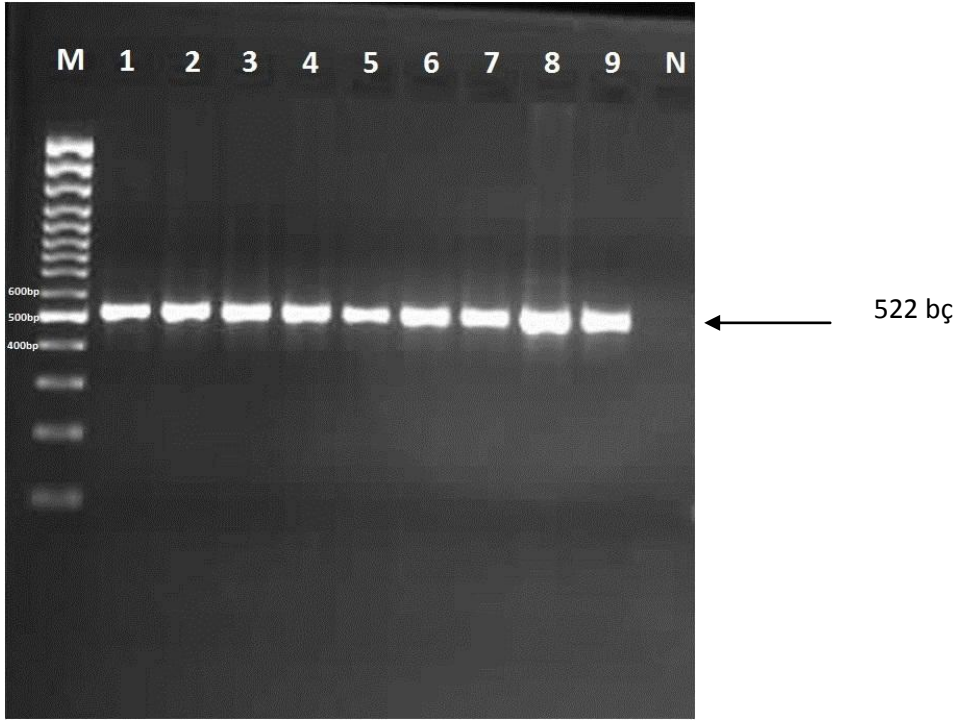
Çizelge 3.13: Real-time PCR optimizasyonu termal döngü koşulları

Sıcaklık (°C)	Süre (dk:sn)	Döngü Sayısı
95	10:00	1
95	00:15	
62	01:00	35

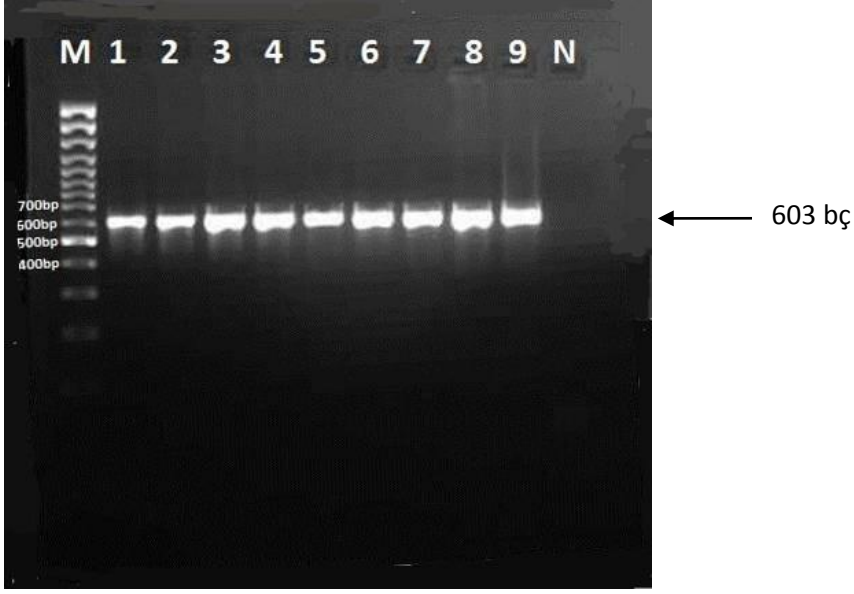
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. HBB Geni Sekans Primerleri PCR Optimizasyonu Görüntüleri

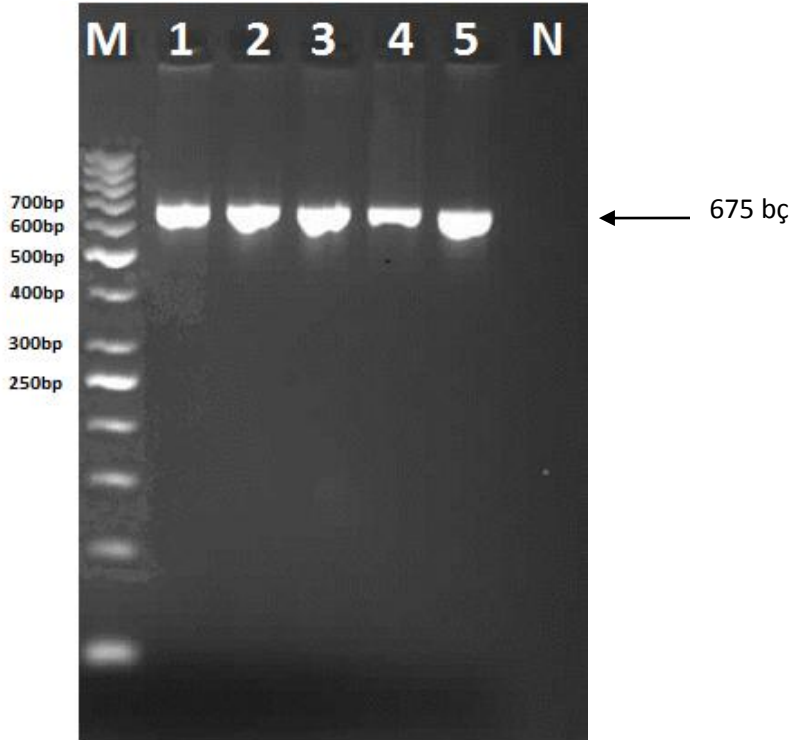
Sekans primerleri ile yapılan PCR sonucunda belirtilen koşullarda ve 60°C bağlanma sıcaklığında 3 çift primerin (Primer 1, Primer 2, Primer 3) optimize olduğu tespit edilmiştir. PCR'ı yapılan hasta ve kontrollere ait ürünler %2'lik agaroz jelde yürütülmüş, primer 1 için 522 baz çifti, primer 2 için 603 baz çifti, primer 3 için 675 baz çifti uzunluğuna karşılık gelen bantlar moleküler ağırlık belirteci ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir. Agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.1: HBB sekans primer 1 PCR agaroz jel görüntüsü: 1.kuyu; 100 bç moleküler ağırlık belirteci 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 kuyular 522 bç PCR ürünü 10. kuyu negatif kontrol



Şekil 4.2: HBB sekans primer 2 PCR agaroz jel görüntüsü: 1. kuyu; 100 bç moleküler ağırlık belirteci, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ve 9 kuyular 603 bç PCR ürünü, 10. kuyu negatif kontrol



Şekil 4.3: HBB sekans primer 3 PCR agaroz jel görüntüsü: 1.kuyu; 50 bç moleküler ağırlık belirteci, 2, 3, 4 ve 5. kuyular 675 bç PCR ürünü 6. kuyu negatif kontrol

4.2. HBB Genine Ait Sekans Primerleri ile oğaltılmış Kontrol PCR rnlerinin DNA Dizi Analizi Sonuçları

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> adresindeki program ile HBB genini dizilemek için belirlenen 3 adet primer çifti ile DNA dizi analizine gönderilen kontrol DNA'larının sonuçlarının analizi yapıldı.

HBB genini dizilemek için belirlenen 3 çift primerin; ilk aşamada kontrol DNA'larının sekanslanması ve test kapsamında çalışmayı planladığımız HBB genindeki IVSI-110(G>A), IVSI-6 (T>C), IVSII-1 (G>A), IVSII-745 (C>G), IVSI-1 (G>A) ve Hb S (A>T) olmak üzere toplam 6 mutasyon bölgesi için ilgili kontrol DNA'larının teyidinde kullanılması amaçlandı.

Bu bağlamda test kapsamında çalışmayı planladığımız her bir mutasyon bölgesi [IVSI-110(G>A), IVSI-6 (T>C), IVSII-1 (G>A), IVSII-745 (C>G), IVSI-1 (G>A) ve Hb S (A>T)] için 3'er kontrol ve yaban tip olduğu bilinen 3 kontrol DNA'sı olmak üzere toplam 21 kontrol DNA rneği DNA dizi analizine gönderildi ve gelen sonuçlar analiz edildi. Kontrol DNA'larının mutasyonları ve yaban tip oldukları DNA dizi analizi sonuçları ile doğrulandı.

Çizelge 4.1'de 21 kontrol DNA'sının numaraları ile birlikte taşıdıkları mutasyonlar verilmiştir.

Çizelge 4.1: Kontrol (K) DNA'larının taşıdıkları mutasyonlar ve DNA kodları

No	Taşıdığı Mutasyon Gen Bölgesi	Genotipi	Kontrol DNA Kodu
1	IVSI-1 (G>A)	GA heterozigot taşıyıcı	K-1
2	IVSI-1 (G>A)	GA heterozigot taşıyıcı	K-6
3	IVSI-1 (G>A)/ IVSII-1 (G>A)	GA – GA birleşik heterozigot	K-22
4	IVSI-110 (G>A)	GA heterozigot taşıyıcı	K-3
5	IVSI-110 (G>A)	GA heterozigot taşıyıcı	K-7
6	IVSI-110 (G>A)	AA homozigot mutant	K-18
7	IVSI-6 (T>C)	TC heterozigot taşıyıcı	K-11
8	IVSI-6 (T>C)''	TC heterozigot taşıyıcı	K-12
9	IVSI-6 (T>C)	CC homozigot mutant	K-15
10	IVSII-1 (G>A)	GA heterozigot taşıyıcı	K-4
11	IVSII-1 (G>A)	AA homozigot mutant	K-5
12	IVSII-1 (G>A)/IVSI-1 (G>A)	GA – GA birleşik heterozigot	K-22
13	IVSII-745 (C>G)	CG heterozigot taşıyıcı	K-13
14	IVSII-745 (C>G)	GG homozigot mutant	K-14
15	IVSII-745 (C>G)	CG heterozigot taşıyıcı	K-29
16	Hb S (A>T)	AT heterozigot taşıyıcı	
17	Hb S (A>T)	TT homozigot mutant	K-16
18	Hb S (A>T)	TT homozigot mutant	K-17
19	Normal Kontrol	-	K-23
20	Normal Kontrol	-	K-24
21	Normal Kontrol	-	K-25

4.3. Kontrol DNA'larının Real-Time PCR Çalışma Sonuçları

Mutasyonlarını ve yaban tip olduğunu bildiğimiz, sonuçları DNA dizi analizi ile de teyit edilen kontrol DNA'sı olarak kullanılacak olan DNA'ların tümü geliştirdiğimiz real-time PCR kiti ile çalışmış ve hepsinde tutarlı sonuçlar elde edilmiştir.

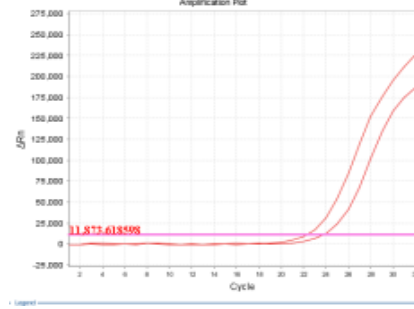
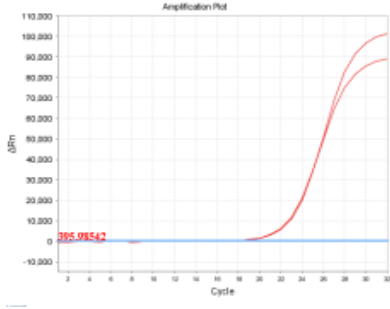
4.4. Hasta DNA'larının Real-Time PCR Çalışma Sonuçları

Çalışma için özel olarak tasarlanan primer ve problemlerin kullanıldığı real-time PCR kiti ile materyal ve yöntemde belirtilen koşullarda ve bağlanma sıcaklığında 100 hastanın DNA'ları çalışılmış ve sonuçlar analiz edilmiştir.

Çalışma kapsamına aldığımız beta talasemiye neden olan 5 [IVSI-110(G>A), IVSI-6 (T>C), IVSII-1 (G>A), IVSII-745 (C>G), IVSI-1 (G>A)] ve orak hücre anemisine neden olan 1 mutasyonun [Hb S (A>T)] tümü geliştirdiğimiz kit ile hastalarımızda gösterilebilmiştir. Elde edilen sonuçlar şu şekildedir; 23 hasta IVSI-110 (G>A) heterozigot taşıyıcı, 6 hasta HbS heterozigot taşıyıcı, 4 hasta IVSII-745 (C>G) heterozigot taşıyıcı, 8 hasta IVSII-1 (G>A) heterozigot taşıyıcı, 6 hasta IVSI-1 (G>A) heterozigot taşıyıcı, 7 hasta IVSI-6 (T>C) heterozigot taşıyıcı, 9 hasta IVSI-110 (G>A) homozigot mutant, 1 hasta IVSI-1 (G>A) homozigot mutant, 1 hasta IVSI-6 (T>C) homozigot mutant, 2 hasta IVSII-1 (G>A) homozigot mutant, 1 hasta IVSII-745 (C>G) homozigot mutant 2 hasta HbS homozigot mutant, 2 hasta IVSI-1 (G>A) + HbS birleşik heterozigot, 1 hasta IVSI-110 (G>A) + IVSII-1 (G>A) birleşik heterozigot olarak bulunurken, 27 hastada incelenen mutasyonlar saptanmamıştır. Hastaların real-time PCR sonuçları Çizelge 4.2'de verilirken; geliştirdiğimiz kit ile çalışılan her bir bölgeye ait mutasyon ve normal real-time PCR pik görüntüleri ile DNA dizi analiz görüntüleri ise Şekil 4.4 - Şekil 4.21 arasında verilmiştir.

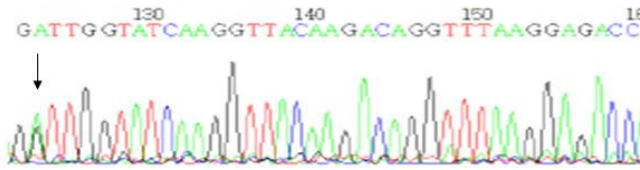
Çizelge 4.2: Hastalara ait real-time PCR sonuçları

	Belirlenen Mutasyon	Hasta DNA Kodu	Hasta Sayısı
IVSI MUTASYONLARI	IVSI-1 (G-A) G/A heterozigot taşıyıcı	H9, H40, H50, H51,H97,H98	6
	IVSI-1 (G-A) A/A homozigot mutant	H62	1
	IVSI-6 (T>C) T/C heterozigot taşıyıcı	H52, H55, H67, H71, H73, H90, H91	7
	IVSI-6 (T>C) C/C homozigot mutant	H89	1
	IVSI-110 (G>A) G/A heterozigot taşıyıcı	H1, H5, H6, H7, H8, H11, H12, H13, H19, H20, H26, H29, H41, H44, H45, H63, H66, H70 , H76, H77, H79, H87, H88	23
	IVSI-110 (G>A) homozigot mutant	H36, H49, H53, H57, H58, H60, H61, H78, H86	9
IVSII MUTASYONLARI	IVSII-1 (G>A) G/A heterozigot taşıyıcı	H18, H37, H38, H47, H48, H56, H92, H93	8
	IVSII-1 (G>A) G/A homozigot mutant	H46, H94	2
	IVSII-745 (C>G) C/G heterozigot taşıyıcı	H16, H31, H65, H95	4
	IVSII-745 (C>G) G/G homozigot mutant	H96	1
HbS MUTASYONLARI	HbS (CAG-GTG) heterozigot taşıyıcı,	H10, H24, H25, H68, H69, H100	6
	HbS (CAG-GTG) homozigot mutant	H64, H99	2
BİRLEŞİK MUTASYONLAR	IVSI-1 (G>A) + HbS birleşik heterozigot	H39, H54	2
	IVSI-110 (G>A) + IVSII-1 (G>A) birleşik heterozigot	H59	1
MUTASYON SAPTANMAYANLAR	Mutasyon saptanmayan	H2, H3, H4, H14, H15, H17, H21, H22, H23, H27, H28, H30, H32, H33, H34, H35, H42, H43, H72, H74, H75,H80, H81, H82, H83, H84, H85	27
TOPLAM HASTA SAYISI			100



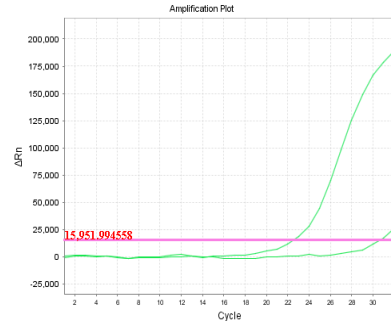
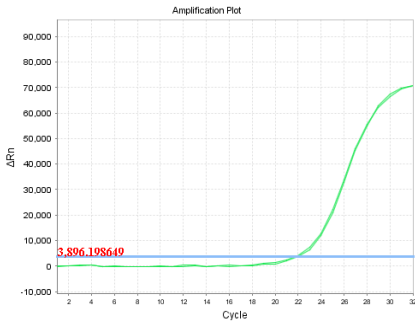
a- K 1 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

b- K 1 (IVSI-1GA heterozigot) mutasyon real-time PCR görüntüsü



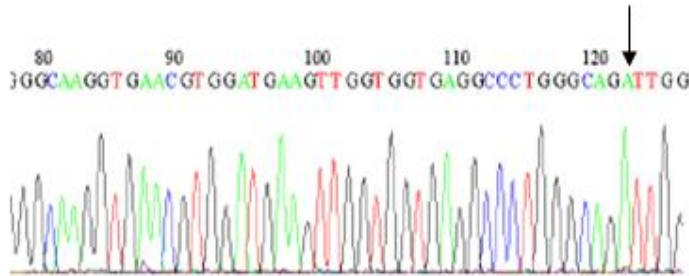
c- K 1 (IVSI-1GA heterozigot) DNA dizi analiz görüntüsü

Şekil 4.4: IVSI-1 (G>A) mutasyon bölgesi için; GA heterozigot örneğinin (K1) realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) K 1 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b)- K 1 (IVSI-1GA heterozigot) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) K 1 (IVSI-1GA heterozigot) DNA dizi analiz görüntüsü



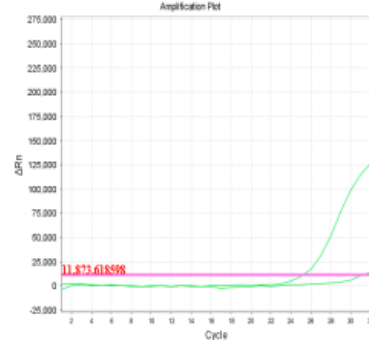
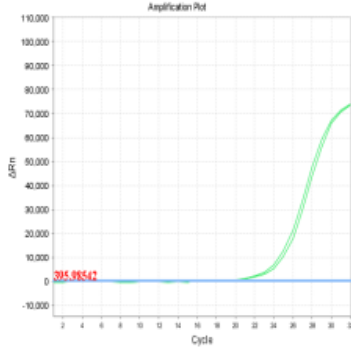
a- H62 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

b- H 62 (IVSI-1AA homozigot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü



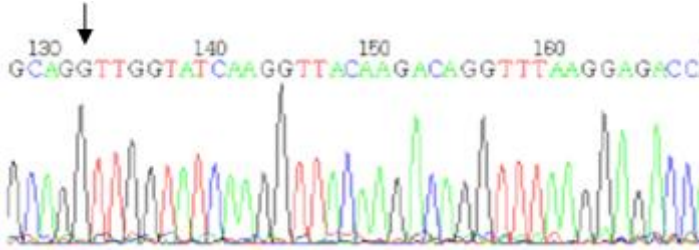
c- H62 (IVSI-1AA homozigot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü

Şekil 4.5: IVSI-1 (G>A) mutasyon bölgesi için; AA homozigot mutant örneğinin (H62) realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) H62 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b)- H62 (IVSI-1 AA homozigot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) H62 (IVSI-1AA homozigot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü



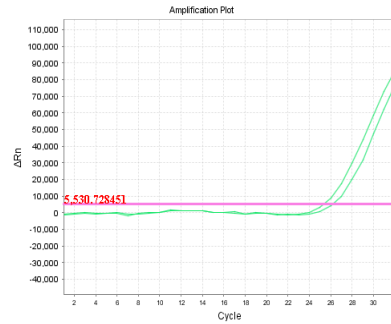
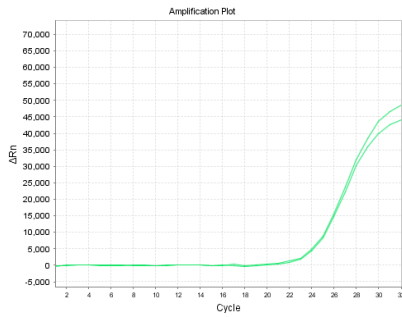
a- K 23 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

b- K 23 (IVSI-1GG homozygot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü



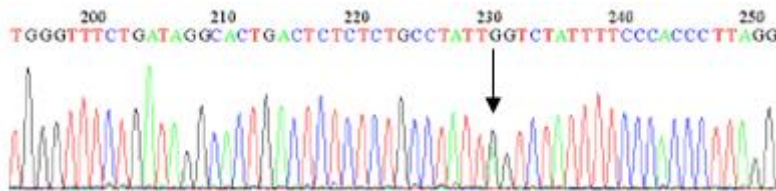
c-K 23 (IVSI-1 GG homozygot normal) DNA dizi analiz görüntüsü

Şekil 4.6: IVSI-1 (G>A) mutasyon bölgesi için; GG homozygot normal örneğinin (K23) realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a)- K23 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b)- K23 (IVSI-1 GG homozygot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c)- K23 (IVSI-1 GG homozygot normal) DNA dizi analiz görüntüsü



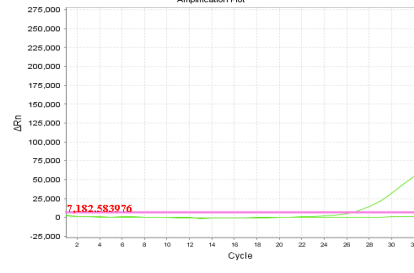
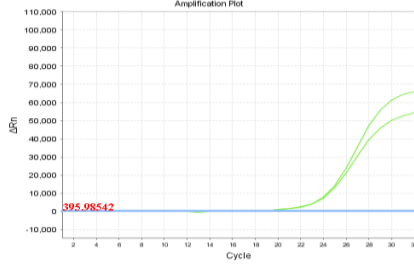
a- H 29 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

b- H 29 (IVSI-110 GA heterozygot) mutasyon real-time PCR görüntüsü



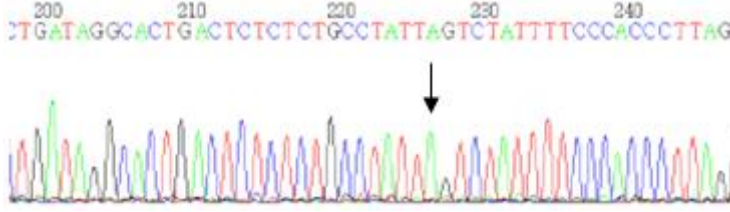
c- H29 (IVSI-110 GA heterozygot) DNA dizi analiz görüntüsü

Şekil 4.7: IVSI-110 (G>A) mutasyon bölgesi için; GA heterozygot örneğinin (H29) realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) H29 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) H29 (IVSI-110 GA heterozygot) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) H29 (IVSI-110 GA heterozygot) DNA dizi analiz görüntüsü



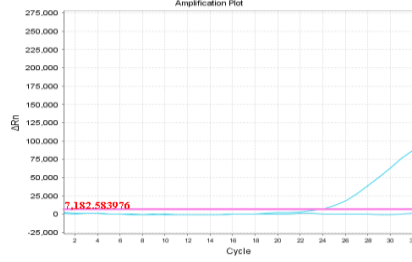
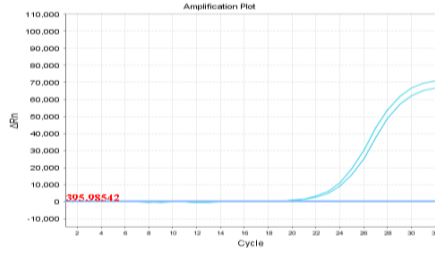
a- K 18 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

b-K18 (IVSI-110 AA homozygot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü



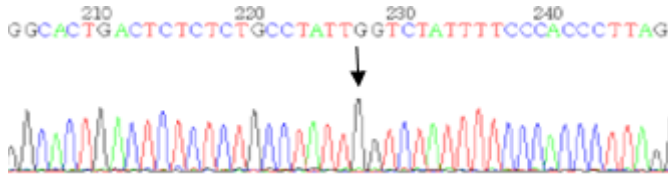
c- K 18 (IVSI-110 AA homozygot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü

Şekil 4.8: IVSI-110 (G>A) mutasyon bölgesi için; AA homozygot mutant örneğinin (K18) realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) K18 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) K18 (IVSI-110 AA homozygot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) K18 (IVSI-110 AA homozygot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü



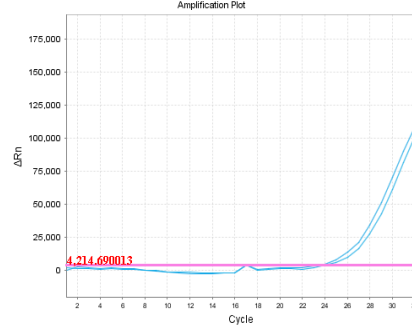
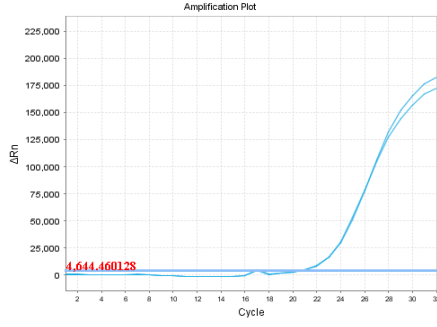
a- K 24 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

b- K 24 (IVSI-110 GG homozygot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü



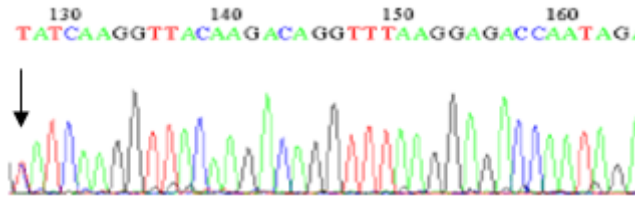
c- K 24 (IVSI-110 GG homozygot normal) DNA dizi analiz görüntüsü

Şekil 4.9: IVSI-110 (G>A) mutasyon bölgesi için; GG homozygot normal örneğinin (K24) realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) K24 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) K24 (IVSI-110 GG homozygot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) K24 (IVSI-110 GG homozygot normal) DNA dizi analiz görüntüsü



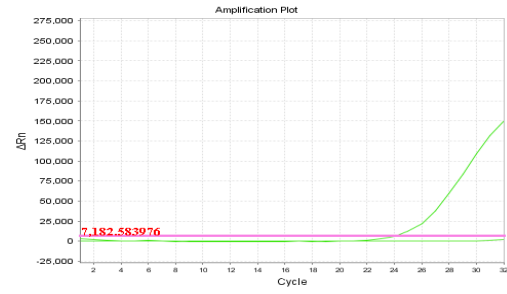
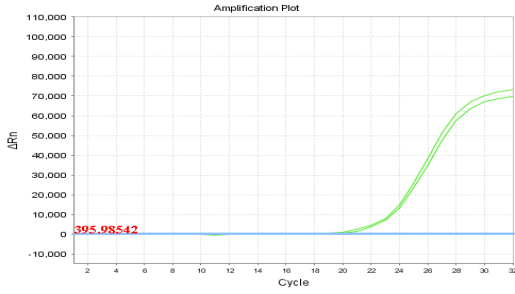
a- H 71 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

b- H 71 (IVSI-6 TC heterozigot) mutasyon real-time PCR görüntüsü



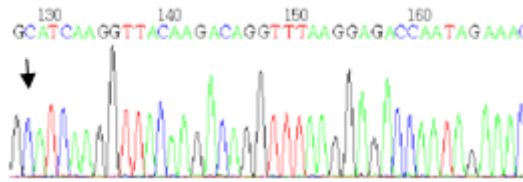
c- H71 (IVSI-6 TC heterozigot) DNA dizi analiz görüntüsü

Şekil 4.10: IVSI-6 (T>C) mutasyon bölgesi için; TC heterozigot örneğinin (H71) realtime PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) H71 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) H71 (IVSI-6 TC heterozigot) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) H71 (IVSI-6 TC heterozigot) DNA dizi analiz görüntüsü



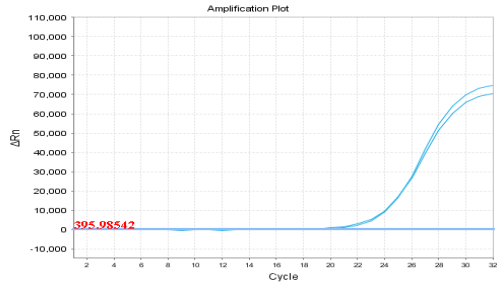
a- K 15 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

b- K 15 (IVSI-6 CC homozigot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü

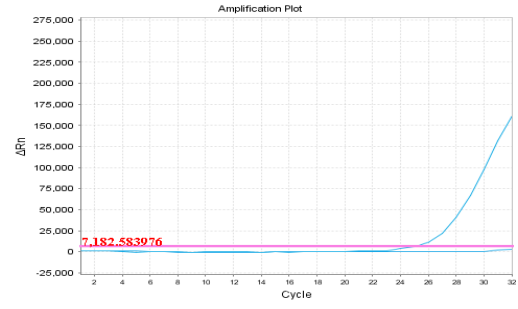


c- K 15 (IVSI-6 CC homozigot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü

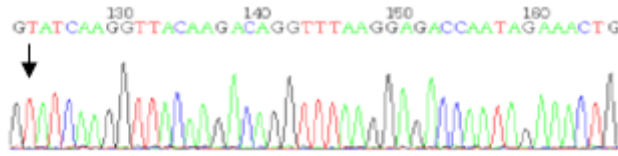
Şekil 4.11: IVSI-6 (T>C) mutasyon bölgesi için; CC homozigot mutant örneğinin (K15) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) K15 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) K15 (IVSI-6 CC homozigot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) K15 (IVSI-6 CC homozigot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü



a- K 24 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

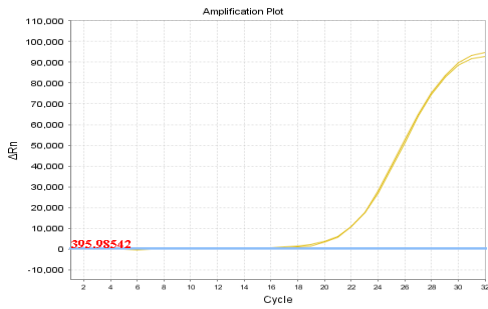


b- K 24 (IVSI-6 TT homozygot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü

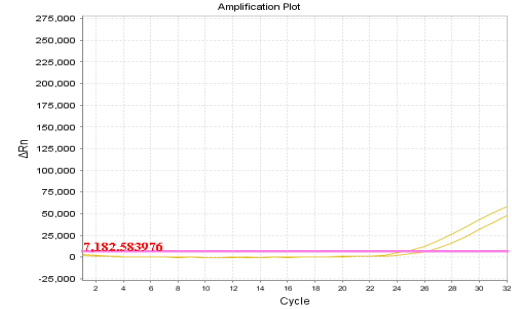


c- K 24 (IVSI-6 TT homozygot normal) DNA dizi analiz görüntüsü

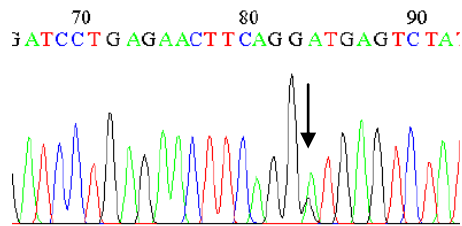
Şekil 4.12: IVSI-6 (T>C) mutasyon bölgesi için; TT homozygot normal örneğinin (K24) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) K24 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) K24 (IVSI-6 TT homozygot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) K24 (IVSI-6 TT homozygot normal) DNA dizi analiz görüntüsü



a- K 22 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

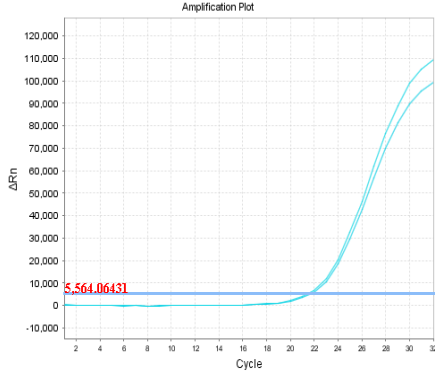


b- K 22 (IVSII-1 GA heterozygot) mutasyon real-time PCR görüntüsü

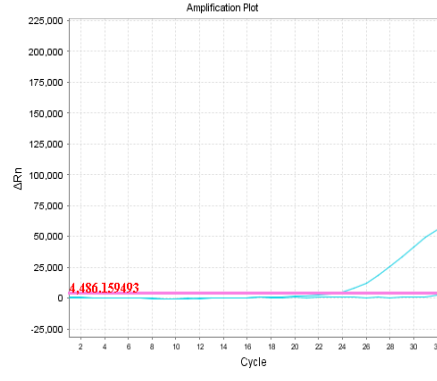


c.3- K 22 (IVSII-1 GA heterozygot) DNA dizi analiz görüntüsü

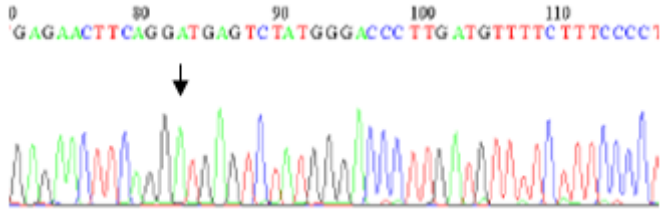
Şekil 4.13: IVSII-1 (G/A) mutasyon bölgesi için; GA heterozygot örneğinin (K22) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) K22 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) K22 (IVSII-1 GA heterozygot) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) K22 (IVSII-1 GA heterozygot) DNA dizi analiz görüntüsü



a- H46 internal control real-time PCR görüntüsü

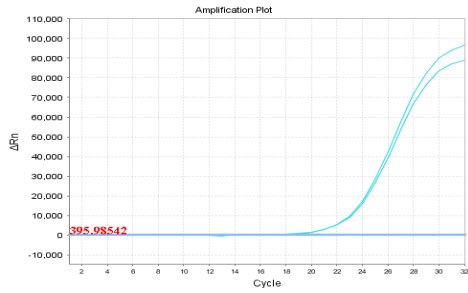


b- H46 (IVSII-1 AA homozigot mutant) real-time PCR görüntüsü

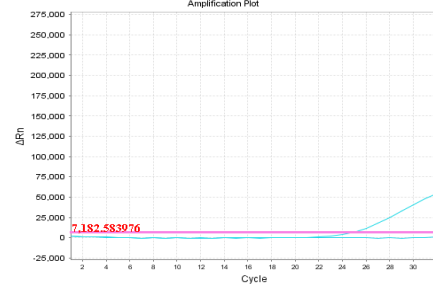


c- H46 (IVSII-1 AA homozigot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü

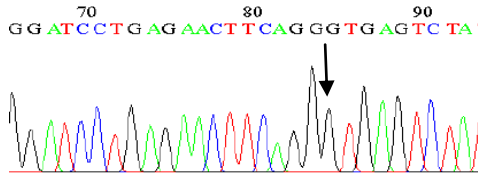
Şekil 4.14: IVSII-1 (G>A) mutasyon bölgesi için; AA homozigot mutant örneğinin (H46) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) H46 internal control real-time PCR görüntüsü (b) H46 (IVSII-1 AA homozigot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) H46 (IVSII-1 AA homozigot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü



a- K 24 internal control real-time PCR görüntüsü

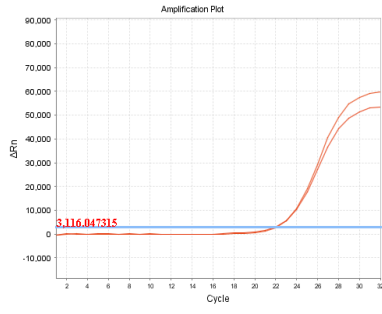


b- K 24 (IVSII-1 GG homozigot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü

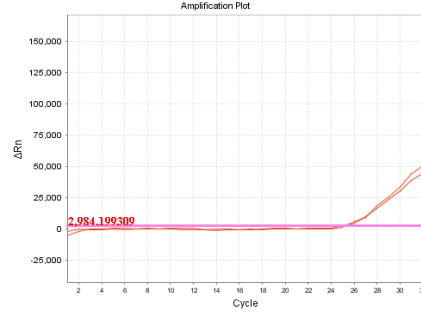


c- K 24 (IVSII-1 GG homozigot normal) mutasyon DNA dizi analizi görüntüsü

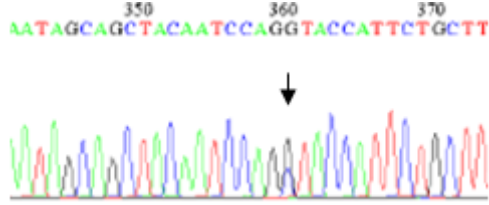
Şekil 4.15: IVSII-1 (G>A) mutasyon bölgesi için; GG homozigot normal örneğinin (K24) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) K24 internal control real-time PCR görüntüsü (b) K24 (IVSII-1 GG homozigot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) K24 (IVSII-1 GG homozigot normal) DNA dizi analiz görüntüsü



a- H65 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

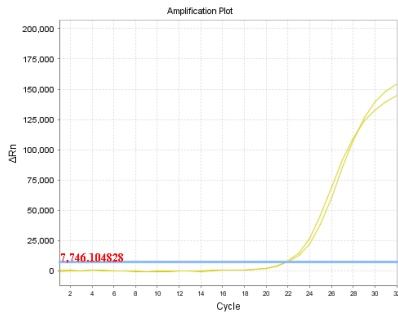


b- H65 (IVSII-745 CG heterozigot) mutasyon real-time PCR görüntüsü

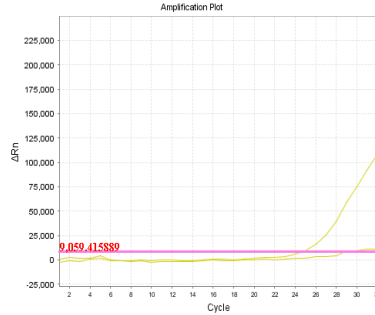


c- H65 (IVSII-745 CG heterozigot) DNA dizi analizi görüntüsü

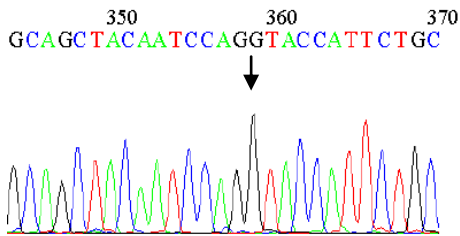
Şekil 4.16: IVSII-745 (C>G) mutasyon bölgesi için; CG heterozigot örneğinin (H65) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) H65 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) H65 (IVSII-745 CG heterozigot) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) H65 (IVSII-745 CG heterozigot) DNA dizi analiz görüntüsü



a- H96 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

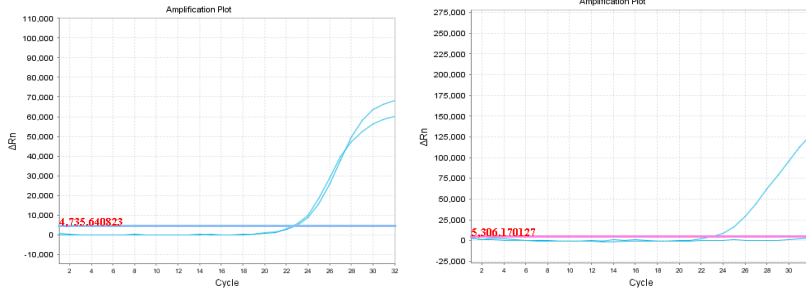


b. H96 (IVSII-745 GG homozigot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü

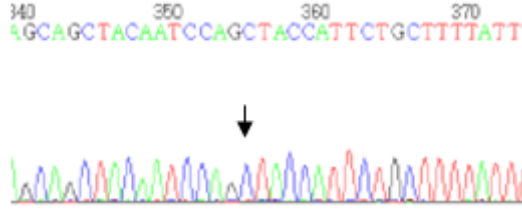


c- H96 (IVSII-745 GG homozigot mutant) DNA dizi analizi görüntüsü

Şekil 4.17: IVSII-745 (C>G) mutasyon bölgesi için; GG homozigot mutant örneğinin (H96) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) H96 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) H96 (IVSII-745 CG homozigot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) H96 (IVSII-745 CG homozigot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü

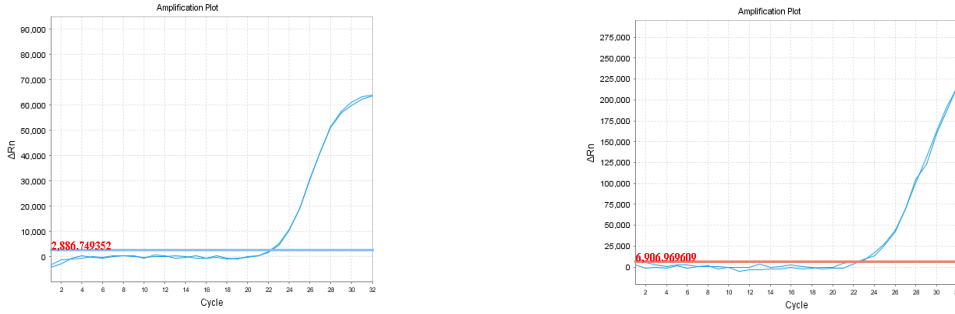


a- K24 internal kontrol real-time PCR görüntüsü b- K24 (IVSII-745 CC homozigot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü

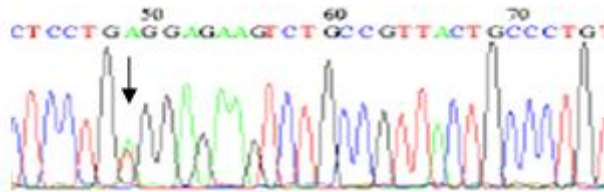


c- K24 (IVSII-745 CC homozigot normal) DNA dizi analizi görüntüsü

Şekil 4.18: IVSII-745 (C>G) mutasyon bölgesi için; CC homozigot normal örneğinin (K24) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) K24 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) K24 (IVSII-745 CC homozigot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) K24 (IVSII-745 CC homozigot normal) DNA dizi analiz görüntüsü

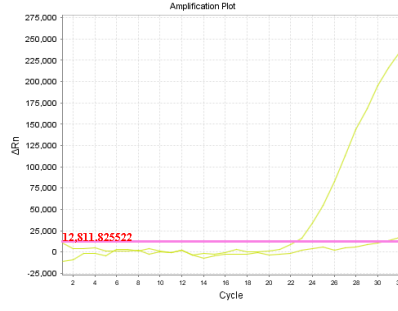
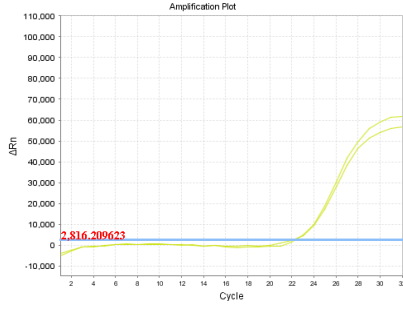


(a) H24 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b)H24 (HbS GAG>GTG AT heterozigot) mutasyon real-time PCR görüntüsü



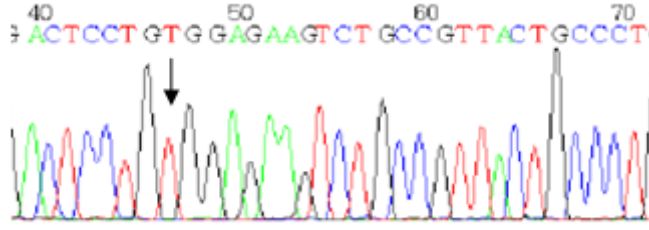
(c) 24 (HbS GAG>GTG AT heterozigot) DNA dizi analiz görüntüsü

Şekil 4.19: HbS GAG>GTG mutasyonu için; AT heterozigot örneğinin (H24) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) H24 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) H24 (HbS GAG>GTG AT heterozigot) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) 24 (HbS GAG>GTG AT heterozigot) DNA dizi analiz görüntüsü



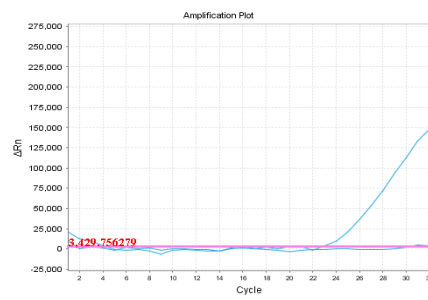
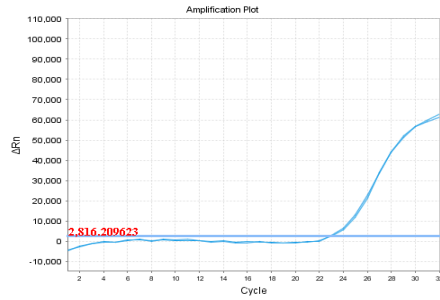
(a) K16 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

(b) K16 (HbS GAG>GTG TT homozygot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü



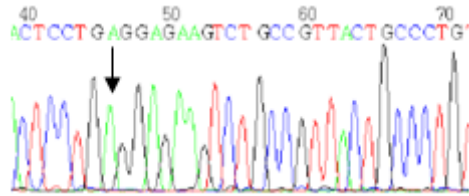
(c) K16 (HbS GAG>GTG TT homozygot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü

Şekil 4.20: HbS GAG>GTG mutasyonu için; TT homozygot mutant örneğinin (K16) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) K16 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) K16 (HbS GAG>GTG TT homozygot mutant) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) K16 (HbS GAG>GTG TT homozygot mutant) DNA dizi analiz görüntüsü



(a) K24 internal kontrol real-time PCR görüntüsü

(b) K24(HbS GAG>GTG AA homozygot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü



(c) K24 (HbS GAG>GTG AA homozygot normal) DNA dizi analiz görüntüsü

Şekil 4.21: HbS GAG>GTG mutasyonu için; AA homozygot normal örneğinin (K24) real-time PCR ve DNA dizi analiz görüntüleri (a) K24 internal kontrol real-time PCR görüntüsü (b) K24 (HbS GAG>GTG AA homozygot normal) mutasyon real-time PCR görüntüsü (c) K24 (HbS GAG>GTG AA homozygot normal) DNA dizi analiz görüntüsü

4.5. Real-Time PCR Sonuçlarını Teyit İçin Gönderilen rneklerin DNA Dizi Analiz Sonuçları

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> adresindeki program ile HBB genini dizilemek için belirlenen 3 adet primer çifti ikinci aşamada geliştirdiğimiz test ile real-time PCR'da mutasyon belirlediğimiz ve belirleyemediğimiz hastalardan rastgele seçilmiş birkaç örneğin teyit edilmesi amaçlanmıştı.

Bunun için örneklere DNA dizi analizi yaptırılmış ve sonuçlar analiz edilmiştir. Sonuçlar real-time PCR sonuçları ile tutarlı bulunmuştur. Çizelge 4.3'de DNA dizi analizine gönderilen örneklere real-time ve dizi analiz sonuçları birlikte verilmiştir.

Çizelge 4.3: DNA dizi analizine gönderilen örneklerin real-time ve dizi analiz sonuçları

	Hasta No	Real-Time PCR Sonuçları	DNA Dizi Analiz Sonuçları
IVSI-1 C>A	H39	IVSI-1 (G>A) + HbS birleşik heterozigot	IVSI-1 (G>A) + HbS birleşik heterozigot
	H54	IVSI-1 (G>A) + HbS birleşik heterozigot	IVSI-1 (G>A) + HbS birleşik heterozigot
	H9	GA heterozigot taşıyıcı	GA heterozigot taşıyıcı
	H50	GA heterozigot taşıyıcı	GA heterozigot taşıyıcı
	H62	AA homozigot mutant	AA homozigot mutant
	IVSI-110 C>A	H11	GA heterozigot taşıyıcı
H20		GA heterozigot taşıyıcı	GA heterozigot taşıyıcı
H26		GA heterozigot taşıyıcı	GA heterozigot taşıyıcı
H29		GA heterozigot taşıyıcı	GA heterozigot taşıyıcı
H36		AA homozigot mutant	AA homozigot mutant
H78		AA homozigot mutant	AA homozigot mutant
IVSI-6 T>C	H52	TC heterozigot taşıyıcı	TC heterozigot taşıyıcı
	H67	T/C heterozigot taşıyıcı	TC heterozigot taşıyıcı
	H71	TC heterozigot taşıyıcı	TC heterozigot taşıyıcı
	H73	TC heterozigot taşıyıcı	TC heterozigot taşıyıcı
	H89	CC homozigot mutant	CC homozigot mutant
IVSII-1 G>A	H18	GA heterozigot taşıyıcı	GA heterozigot taşıyıcı
	H37	GA heterozigot taşıyıcı	GA heterozigot taşıyıcı
	H38	GA heterozigot taşıyıcı	GA heterozigot taşıyıcı
	H46	AA homozigot mutant	AA homozigot mutant
	H48	GA heterozigot taşıyıcı	GA heterozigot taşıyıcı
IVSII-745 C>G	H16	CG heterozigot taşıyıcı	CG heterozigot taşıyıcı
	H31	CG heterozigot taşıyıcı	CG heterozigot taşıyıcı
	H65	CG heterozigot taşıyıcı	CG heterozigot taşıyıcı
	H95	CG heterozigot taşıyıcı	CG heterozigot taşıyıcı
	H96	GG homozigot mutant	GG homozigot mutant
HbS (GAG-GTG)	H24	AT heterozigot taşıyıcı	AT heterozigot taşıyıcı
	H25	AT heterozigot taşıyıcı	AT heterozigot taşıyıcı
	H10	AT heterozigot taşıyıcı	AT heterozigot taşıyıcı
	H64	TT homozigot mutant	TT homozigot mutant
MUTASYON SAPTANMAYAN HASTALAR	H4	Mutasyon saptanmadı	Codon 15 GA heterozigot taşıyıcı
	H14	Mutasyon saptanmadı	Codon 39 CT heterozigot taşıyıcı
	H15	Mutasyon saptanmadı	Codon 39 CT heterozigot taşıyıcı
	H34	Mutasyon saptanmadı	IVSII-848 CA heterozigot taşıyıcı
	H35	Mutasyon saptanmadı	HbD (Punjab) (Glu121Gln) heterozigot taşıyıcı
	H85	Mutasyon saptanmadı	IVSII-848 AA homozigot mutant

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hemoglobinopatiler dünyada temel sağlık sorunu olarak devam eden ve en sık görülen otozomal resesif geçişli tek gen hastalıklarıdır. Hemoglobin bozuklukları dünyadaki 229 ülkenin %71'inde önemli sağlık sorunudur. Gebe kadınların %7'si, çiftlerin %1'i hemoglobin hastalıkları yönünden risk altındadır (Canatan 2010).

Hemoglobin molekülünün yapısal anormalliklerini içeren anormal hemoglobinler ve normal globin zincirlerinin sayısal anormalliklerini içeren talasemiler olmak üzere hemoglobinopatileri genel anlamda iki gruba ayırmak mümkündür (Dönbak 2005, Mümüşoğlu 2010).

Anormal hemoglobinlerin en yaygın görüleni 1949 yılında Pauling ve arkadaşları tarafından keşfedilen Hb S'dir. Hb S ülkemizde de ilk kez 1957 yılında Aksoy tarafından bildirilmiştir (Altay 2002). alışmalar, Türkiye'deki Hb S frekansının % 0.5–44.2 arasında olduğunu göstermiştir (Altay 1986).

Dünyada en sık gözlenen tek gen hastalığı olan β talasemi, ilk kez 1925 yılında Dr. Thomas Cooley tarafından tarif edilmiştir (Apak 2001, Günçağ vd 2003, Kutlu vd 2006). Globin gen ekspresyonunu azaltan ya da tamamen ortadan kaldıran mutasyonlar sonucu oluşmaktadır (May and Sadelain 2001).

Beta talasemi, gösterdiği klinik tabloya göre gruplara ayrılır (Birgens and Ljung 2007, Ünal 2010, <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp> 2012). Bunlardan beta talasemi minorlu hastalar hafif anemik bulgular vermekle birlikte hastalık belirtileri göstermezken, talasemi major hastaları erken yaşlarda şiddetli anemi, splenomegali ve tekrarlayan enfeksiyonlarla karşı karşıyadırlar (Birgens and Ljung 2007, Ünal 2010, <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp> 2012). Talasemi major hastaları, yaşam boyu düzenli aralıklarla kan transfüzyonuna gereksinim duyan hastalardır. Hastalığın tedavisine bebek yaşta başlanıp yaşam boyu devam edilir. Hem hastalığın kendisi, hem de düzenli kan transfüzyonu gibi tedavi yöntemleri yaşamsal organlarda demir birikimi sonucu ciddi sorunlara neden olmaktadır. Bu organlar başta kalp olmak üzere karaciğer ve endokrin organlar gibi bozuklukları yaşam süresi ve kalitesini etkileyecek önemdedirler. Aşırı demir yükü tedavi edilmediği takdirde, yaşamın ikinci ve üçüncü dekadı genellikle fatal olmaktadır (Yazman 2010). Tüm bunlar talasemi major hastalarının yaşamı boyunca sürekli uğraş vermesini gerektirir. Sorunlarla yaşam boyu

mücadele erişkin talasemi major hastalarının ve ailelerinin sosyal yaşamları üzerinde zihinsel, fiziksel ve ekonomik açıdan olumsuz bir etki yaratmaktadır (Yazman 2010). Talasemi, tedavi maliyeti oldukça yüksek bir hastalık olup bir talasemi hastasının yıllık maliyetinin 10.000 \$ civarında olduğu tahmin edilmektedir (Chern and Chen 2000).

Talasemi hakkında yeterince eğitim verilmemesi ve bilgi yetersizliği hastalığın dünya çapında yayılmasına neden olmuştur. Bu nedenle günümüzde birçok ülkede çiftlere gebelik öncesinde ya da başlangıcında talasemi açısından sağlık kontrolünden geçmeleri önerilmektedir. Talaseminin izlenmesinde ve tanısında etkili ve ekonomik yöntemlerin geliştirilmesi amacı ile yapılan girişimler özellikle hastalığın yaygın görüldüğü ülkelerde önem taşımaktadır (Hartwell vd 2005).

Beta talasemi ve orak hücre anemisi taşıyıcılığı bulunan bir çiftin gebelik başına %25 oranında hasta çocuk dünyaya getirme riski bulunmaktadır. Prenatal tanı yöntemleri ile hasta çocuk doğurma oranları önemli oranda azaltılsa da sonlandırılan bir hamilelikte karşılaşılabilecek fizyolojik ve psikolojik sıkıntılar çiftler için kabul edilemez bir durumdur. Bu nedenle hemoglobopatilerin önlenmesinde henüz bebek sahibi olmadan taşıyıcıların taranması ve genetik danışma verilmesi çok önemlidir. Günümüzde “preimplantasyon genetik tanı” (PGT) talasemi gibi genetik hastalıklar için hasta çocuk doğurma riski bulunan çiftlere alternatif sunmaktadır. PGT, bu çiftlerde etkilenmiş bir hamileliğin sonlandırılmasından kaçınmayı, etkilenmemiş embriyoların transferi ile mümkün kılmaktadır (Kahraman ve Ekmekci 2010).

En sık görülen kalıtsal hastalıklar arasında yer alan hemoglobopatiler ülkemiz için de önemli bir sağlık sorunudur. Türkiye’deki hemoglobopatilerin büyük kısmını orak hücre anemisi ve beta talasemi oluşturmaktadır. Sağlık Bakanlığı ve UHK tarafından 1995-2000 yılları arasında Marmara, Ege ve Akdeniz bölgelerindeki 16 merkezin yaptığı tarama çalışmaları toplanmış ve değerlendirilmiştir. Bu çalışma sonuçlarına göre toplam 377.399 sağlıklı kişi taranmış, ortalama talasemi ve anormal hemoglobin sıklığı %4,3 olarak bulunmuştur. Beta talasemi en sık Antalya’ da (%13), orak hücre anemisi ise en sık Mersin (13,6) sonra Hatay (%10,6) ve Adana’da (%10) bulunmuştur. Ülkede 4513 talasemi ve anormal hemoglobin hasta kaydı olduğu yayınlanmıştır (Sağlık Bakanlığı AÇSAP Genel Müdürlüğü, Ankara, 2010). Talasemi prevalansı ve talasemi mutasyonlarının dağılımının farklı bölgelere göre çeşitlilik göstermesi, ülkemizin çeşitli etnik grupları bir arada içermesinden dolayıdır (Altay 2002).

Taşıyıcılığın ve gebelik oranının yüksek olduğu ülkemizde talasemi ile mücadeleye çok önem verilmesi gerekir. Bu amaç doğrultusunda 30.12.1993 tarihinde 3960 sayılı kanunla “Kalıtsal Kan Hastalıkları Kanunu” çıkmıştır. Bu çerçevede Sağlık Bakanlığına bağlı olarak Antalya, Antakya, Mersin ve Muğla’da 1994 yılında talasemi merkezleri kurulmuştur. 2000 yılında talasemi ve hemoglobinopati konusunda çalışan tüm merkezler “Ana Çocuk Sağlığı- Aile Planlaması ve Tedavi Hizmetleri Genel Müdürlüğü” koordinatörlüğünde “Ulusal Hemoglobinopati Konseyi”ni (UHK) kurmuşlardır. Yine 2003 yılında başlatılan programlardan biri de kan hastalıkları görülme sıklığı açısından riskli görülen 33 ilde sürdürülmekte olan “Hemoglobinopati Kontrol Programı”dır. (Sağlık Bakanlığı AÇSAP Genel Müdürlüğü, Ankara, 2010). Özellikle Akdeniz kıyı şeridinde, Çukurova, Marmara ve Ege bölgelerinde talasemi taşıyıcılığının sık görüldüğü, akraba evliliğinin oldukça sık olduğu (ortalama %20,9) (TÜİK Aile Yapısı Araştırması, 2006) ve akraba evliliklerinin %70’nin 1. derece kuzenler arasında olduğu ülkemizde programın genel amacı, evlilik öncesi tarama testleri ile hasta doğumunun engellenebilmesi ve koruyucu sağlık hizmetlerinin sağlanabilmesidir. Sağlık Bakanlığı, Ulusal Hemoglobinopati Önleme Projesinde, 2005 yılından buyana Ulusal Hemoglobinopati Konseyi yerine kurulan Talasemi Federasyonu ile iş birliği yapmaktadır. (Sağlık Bakanlığı AÇSAP Genel Müdürlüğü, Ankara, 2010).

Yaptığımız çalışmanın bir ayağı da “İl Sağlık Müdürlüğü”nün “Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması” (AÇSAP) şubesi kanalı ile yürütülmüştür. Ankara “AÇSAP” şube müdürlüğünde HPLC ile beta talasemi ve/veya orak hücre anemi taşıyıcısı olarak belirlenen bireyler bölümümüze yönlendirilmiştir. Geliştirdiğimiz kitin rutin uygulamada kullanımı ile yukarıda belirtilen programın amacına da hizmet edeceği düşünülmektedir.

Hemoglobinopatiler ve talasemi grubunda hastalığın moleküler tanısı; tanıyı kesinleştirmede, hastayı takip etmede, hastalığın prognozunu tahminde, aileye verilecek genetik danışmanlıkta ve prenatal tanıda oldukça önemli bir yer tutmaktadır (Özkinay 2010).

Günümüzde, PCR temeline dayalı olan birçok klasik moleküler yöntem talasemilerin tanısında kullanılmaktadır (Tüzmen ve Schechter 2001, Başak 2005, Keser 2007, Özkinay 2010). Gendeki mutasyonlar hakkında detaylı bilgi edinmemizi sağlayan DNA teknolojisini kullanan bu yöntemleri iki gruba ayırmak mümkündür; bilinen mutasyonların analizinde kullanılan yöntemler ve bilinen/bilinmeyen mutasyonların analizinde kullanılan

yöntemler (Hartwell vd 2005). Bilinen mutasyonların tespitinde kullanılan yöntemler; RFLP, ARMS, ASO, reverse dot-blot analizi, dot-blot analizi, real-time PCR, DNA dizi analizi gibi yöntemler sayılabilir. Diğer grup ise denatüre edici jel elektroforezi, denatüre edici yüksek performanslı likit kromatografi gibi yöntemlerle yapılan heteroduplex analizi ve otomatik dizi analizi yöntemlerini içerir (Tüzmen ve Schechter 2001, Başak 2005, Keser 2007, Özkınay 2010, Hartevelde vd 2009).

Ülkemizde, 1980'li yılların sonlarından itibaren hemoglobinopatilerin moleküler tanısı çeşitli yöntemlerle yapılmaya başlanmıştır. Günümüze kadar, talasemi sendromları moleküler düzeyde tanımlanmış, tanıda kullanılan yöntemler gelişmiş ve otomatize sistemler devreye girmiştir (www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/9_MSEK_12pdf, 2012). Talasemilerin tanısında ilk kullanılan yöntemler dot-blot hibridizasyonu, ARMS ve RFLP analizleridir (Başak 2005).

Dot-blot hibridizasyonu, ARMS ve RFLP yöntemleri güvenilir olmakla beraber özellikle doğum öncesi tanıda Türk toplumu gibi, mutasyon çeşitliliği çok olan toplumlarda uygulanması hızlı ve kolay değildir. Özellikle sınırlı sayıda mutasyon için kullanılan RFLP yöntemi, mutasyonların çok çeşitli olmasından dolayı β talasemi mutasyonlarının analizi için etkin ve ekonomik değildir (Başak 2005, www.talasemifederasyonu.org.tr/pdf/tani/cansinTedavi-9pdf.pdf, 2012).

Çalışmada yöntem olarak kullandığımız real-time PCR yönteminin bir çok mutasyonu aynı anda çalışmaya olanak vermesi nedeniyle, her bir mutasyon bölgesinde ayrı PCR ve farklı enzimlerle ayrı kesim işlemi gerektiren RFLP'ye göre oldukça avantajlı olduğunu düşünmekteyiz.

Türkiye'deki beta globin gen mutasyonlarının tanısında sıklıkla kullanılan kitlerden biri de beta-globin StripAssay kiti (ViennaLab)'dir. StripAssay ters hibridizasyon yöntemini temel alan bir kitledir (Yıldız vd 2005, Keser vd 2005, Gülbay vd 2009). Beta globin StripAssay (Vienna Lab) kiti Türkiye'de talasemi tanısını büyük oranda kolaylaştırmıştır (Bilenoğlu 1996). Kit, -87 (C>G), -30 (T>A), Cd 5 (-CT), hemoglobin C (Hb C), hemoglobin S (Hb S), Cd 6 (-A), Cd 8 (-AA), Cd 8/9 (+G), Cd 22 (7bp del), Cd 30 (G>C), IVS 1.1 (G>A), IVS 1.2 (T>A), IVS 1.5 (G>C), IVS 1.6 (T>C), IVS1.110 (G>A), IVS 1.116 (T>G), IVS 1-25 (25bp del), Cd 36/37 (-T), Cd 39 (C>T), Cd 44 (-C), IVS 2.1 (G>A), IVS2.745 (C>G) olmak üzere toplam 22 mutasyonu tarayabilir (Başak 2005).

StripAssay kitinin kullanıldığı beş aşamalı ters hibridizasyon yönteminin çok sayıda mutasyon tarayabilmesi gibi avantajlarının bulunması yanında zaman alıcı olması ve agaroz jel elektroforezi işlemine ihtiyaç duyması gibi dezavantajları da bulunmaktadır.

Tadmouri ve Altay'ın StripAssay kiti kullanarak yaptıkları, Türk toplumundaki beta talasemi mutasyonlarının frekansını araştıran geniş kapsamlı çalışmalarına göre; StripAssay kiti kapsamındaki mutasyonlar toplumumuzdaki beta globin mutasyonlarının yaklaşık %84'ünü içermektedir (Tadmouri 1998, Altay 2002).

StripAssay kitinin 22 beta globin mutasyonunu taradığını düşünürsek, 6 mutasyon bölgesini tarayabilen bizim geliştirdiğimiz kitten 18 mutasyon fazlasını taradığı görülmektedir. 22 mutasyon tarayarak Türk toplumunda görülen mutasyonların %84'ünü tarayabilen bu kit Türk toplumunda görülen mutasyonların %76'sını kapsayan bizim kitimize göre sadece %8'lik bir avantaj sağlamaktadır. Çünkü StripAssay kitindeki fazla olan 18 mutasyon içinde toplumumuzda nadir görülen ya da hiç rastlanılmayan mutasyonlar da söz konusudur. Ayrıca birçok yöntemle göre pratik olan StripAssay kiti (Gülbay 2009) PCR sonrası işlemlere gerek duyması, çalışmanın daha uzun sürmesi gibi nedenler ile bir real-time uygulmasına göre pratik görünmemektedir.

Floresan işaretleme yöntemleri kullanılmaya başlandıktan sonra, mutasyon tanımlanmasında DNA dizi analizi geliştirilmiştir (Kotler vd 1994). DNA dizi analizi diğer ucuz ve pratik tanı yöntemleri ile mutasyonu bulunamayan fakat hemoglobin mutasyonu taşıdığı düşünülenlere uygulanmaktadır. Daha çok nokta mutasyonlarının sık görüldüğü beta globin geni analizi için bazı laboratuvarlarda ilk yöntem olarak da kullanılmaktadır. Örneklerin hazırlanması ve sonuçların okunması tecrübe gerektirir. Dizi analizinde dikkatli bir gözle analiz yapılmalıdır. Büyük delesyonların neden olduğu hemoglobin bozuklukları için uygun değildir (Özkınay 2010). DNA dizi analizi, beta globin gen mutasyonlarının tanımlanmasında altın standart olmasının yanında zaman ve emek gerektiren, maliyeti yüksek bir yöntemdir. Mutasyonun araştırılmasında, genel olarak en sık gözlenen mutasyondan başlanarak, daha az görülen mutasyonlara doğru bir inceleme başlatılmalı ve ailelerin geldikleri bölgedeki mutasyon dağılımı da göz önünde bulundurulmalıdır. Bütün bunlar ele alınırsa talasemi mutasyonlarının ön taramasında DNA dizi analizi uygun bir yöntem gibi görünmemektedir. Bunun için daha hızlı, kolay uygulanabilir, kolay analiz edilebilir, nispeten düşük maliyetli, güvenilir yöntemlerin ön

taramada kullanımı tercih edilmelidir. Bunu yaparken de yöntemin taradığı mutasyonların uygulandığı toplumda sık görülen mutasyonları kapsamasına dikkat edilmelidir.

Çalışmamızı planlarken geliştirdiğimiz kitin kolay uygulanabilir bir ön tarama testi olması ve toplumumuzdaki sık rastlanan beta globin mutasyonlarını taraması göz önünde bulundurulmuştur. Test rutin uygulamaya konulduğunda da real-time ile mutasyonu saptanmayan hasta DNA'larının DNA dizi analizine gönderilip mutasyonunun belirlenmesi düşünülmüştür. Böylece real-time gibi bir yöntemin kullanıldığı ön tarama testi ile zamandan ve maliyetten tasarruf edilmesi DNA dizi analizinin bir üst basamak işlem olması planlanmıştır.

Özetle dot-blot hibridizasyonu, ARMS, RFLP, DNA dizi analizi gibi tüm bu yöntemler tanının tamamlanması için saatler hatta bazen günler alır. Klinik tanı laboratuvarları için hızlı, doğru ve güvenilir bir genotiplendirme yapmak oldukça önemlidir. Bu amaçla geliştirilen real-time PCR yöntemi, talasemi mutasyonlarının tanımlanmasında da kullanılmaktadır. Aynı anda birçok mutasyonu tarayabilmesi, kolay, güvenilir ve hızlı olması nedeniyle tercih edilen bir yöntemdir (Vrettou 2003). Genotiplendirme sırasında tüpler açılmadan tanıya gidildiğinden dolayı kontaminasyon riskinin oldukça düşük olması da real-time PCR yönteminin bir diğer avantajıdır (Reuter vd 2005).

Geliştirdiğimiz real-time PCR kiti ile Türk toplumunda beta globin geninin sık görülen 6 mutasyon bölgesini aynı anda ve 1-1,5 saat gibi kısa bir süre içerisinde çalışabilmekteyiz. Hızlı sonuç alabilme özellikle prenatal tanı işlemi öncesinde riskli çiftlerin mutasyonlarının tanımlanmasında önem kazanmaktadır. Dolayısı ile riskli çift grubuna giren hastalarda yapılacak ön tarama testleri için real-time PCR oldukça uygun bir yöntemdir. DNA izolasyonu, PCR koyma aşaması ve örneklerin cihazda kalma süresi de dahil olmak üzere aynı gün içerisinde hatta birkaç saatte sonuca gidilebilmesi yöntemi ön plana çıkartmaktadır. Ayrıca kontaminasyonu ekarte edebilmek için kit çalışmalarımızın tümünde DNA içermeyen negatif kontroller kullanılmıştır ve çalışmalarımızın hiçbir aşamasında kontaminasyon ile karşılaşılmamıştır. Bu durum kontaminasyonsuz güvenilir sonuçların alındığının göstergesidir.

Mutasyonların tanımlanmasında kullanılan diğer geleneksel metodlarla karşılaştırıldığında real-time PCR yönteminin diğer bir avantajı da akrilamid ya da etidyum bromid gibi oldukça mutajen kimyasallar kullanılmadan sonuçların alınmasıdır (Vrettou vd 2003).

Geliştirdiğimiz real-time PCR kiti bu anlamda laboratuvar çalışanları için de fayda sağlayacaktır.

Piyasada beta talasemi mutasyonlarının tanısında kullanılan real-time PCR cihazlarından biri de LightCycler sistemidir. LightCycler, real-time PCR teknolojisini kullanan beta talaseminin prenatal tanı uygulamaları için oldukça uygun bir cihazdır. LightCycler, 3 saat gibi kısa bir sürede sonuç alınan diğer güncel metodlarla karşılaştırıldığında oldukça hızlı ve fiyat etkin bir real-time PCR uygulama cihazıdır (Vrettou 2003). LightCycler sisteminin bir uygulamasında spesifik olmayan yalnızca çift zincirli DNA'ya bağlandıklarında floresans veren boyalar (SYBER Green I boyaları) kullanılır. Amplifikasyon ürünlerinin analizi “melting curve” (erime eğrisi) analizi ile yapılmaktadır.

Bizim testimizde TaqMan problemleri kullanılmaktadır. TaqMan prob yöntemi nispeten kolay dizayn ve optimizasyonla gerçekleştirildiği için hem ekspresyon profilinin çıkarılmasında hem de allelik diskriminasyonda kolaylıkla kullanılır (Gut vd 1999).

Altay, Türk toplumundaki beta talasemi mutasyonlarını belirlemek amacıyla yaptığı bir çalışmada; 206 beta talasemi major, 111 beta talasemi intermedia ve 430 heterozigot taşıyıcı bireyi incelemiştir. Yöntem olarak ARMS ve DNA dizi analizi yöntemlerini kullanmıştır. Sonuç olarak; Türk toplumunda en yaygın mutasyon olarak IVSI-110 (G>A) (%41) bulunmuştur. Bunu izleyen beta talasemi mutasyon frekanslarını ise sırasıyla IVSI-6 (T>C) (%10,3), IVSII-1 (G>A) (%8,1), IVSII-745 (C>G) (%6,2) ve IVSII-1 (G>A) (%5,7) olarak belirlemiştir. Çalışmada belirlenen bu 5 mutasyonun Türk toplumunda görülen toplam beta talasemi mutasyonlarının %71,18'ni oluşturduğu tespit edilmiştir.

Tadmouri ve arkadaşları, çalışmalarında Ankara, İzmir, Adana ve Antalya illerindeki farklı hastanelerin katılımıyla beta talasemi ve Hb S taşıyıcısı olan toplam 795 kromozom çalışmışlardır. Çalıştıkları bölgelerde en yaygın görülen mutasyonların tespit edilmesi için oligonükleotid problemleri birlikte ARMS ve DGGE yöntemlerini de kullanarak 31 farklı mutasyon tespit edebilmişlerdir. Bu çalışmada en yaygın mutasyon olarak IVSI- 110 (%39,3) bulunurken, bunu izleyen mutasyonlar sık görülme frekansına göre IVSI-6 (T>C) (%10,1), FSC-8 (-AA) (%5,5), IVSI-1 (G>A) (%5,0), IVSII- 745 (C>G) (%5,0), IVSII- 1 (G>A) (%4,7), Cd39 (C>T) (%3,8), -30 (T>A) (%3,1), FSC-5 (-CT) (%2,2) olarak sıralanmıştır. Geriye kalan diğer beta talasemi mutasyonlarının toplam frekansını ise %2

olarak tespit etmişlerdir. Hb S mutasyonunun görülme sıklığını ise %4,9 olarak belirlemişlerdir (Tadmori vd 1998).

Gülbay ve arkadaşları Malatya bölgesinde yaptıkları çalışmalarında beta-talasemi tanısı ile refere edilen 38 olgunun beta globin geninde StripAssay kiti kullanarak yaygın mutasyonlar olan (-87 (C>G), -30 (T>A), Cd 5 (-CT), hemoglobin C (Hb C), hemoglobin S (Hb S), Cd 6 (-A), Cd 8 (-AA), Cd 8/9 (+G), Cd 22 (7bp del), Cd 30 (G>C), IVS1-1 (G>A), IVS1-2 (T>A), IVS1-5 (G>C), IVS1-6 (T>C), IVS1-110 (G>A), IVS1-116 (T>G), IVS1-25 (25bp del), Cd 36/37 (-T), Cd 39 (C>T), Cd 44 (-C), IVS2-1 (G>A), IVS2-745 (C>G)) mutasyonlarını araştırmışlardır. Çalışılan olguların 32 (%84,2)'sinde beta-globin geni mutasyonlarını saptamışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre; IVS1-110 (G>A) mutasyonu, Türkiye'nin diğer bölgelerinde olduğu gibi en yaygın mutasyon olarak belirlenmiştir. Homozigot veya heterozigot hastalarda IVS1-110 (G>A), IVS1-1 (G>A), IVS2-1 (G>A), Cd 8 (-AA) ve Cd 8/9 (+G) mutasyonlarının frekansları sırası ile %47,4, %15,8 ve %7,9'dur. Cd 44 (-C) mutasyonu %5,3 olarak belirlenirken Cd 5 (-CT), Cd 22 (7bp del) ve Cd44 (-C) mutasyonları nadir rastlanan mutasyonlar olarak tanımlanmıştır (Gülbay vd 2009).

Yılmaz ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada 35 talasemili olguda ARMS yöntemi ile yapılan mutasyon analizleri sonucunda IVSI-110 mutasyonu en yüksek oranda (%32,85) gözlenmiştir. Bunu izleyen mutasyonlar ise IVSI-6 (%7,14), IVSI-1 (%7,14) ve IVSII-745 (%4,28) olarak rapor edilmiştir (Yılmaz vd 2000).

Öner ve arkadaşlarının Türkiye genelinde yaptıkları bir çalışmada yaygın olarak görülen mutasyon tipleri sıklıklarını şu şekilde rapor etmişlerdir; IVS1-110 (% 42,5), IVS1-6 (% 18), IVS2-1 (% 11,5), Cd 8 (%7,14), Cd 39 (% 6), IVS2-745 (% 4,4), IVS1-1 (% 2,5), -30 (% 2,2) ve Cd 5 (% 1,1) dir (Öner vd 2000).

Türkiye'de yapılan tüm bu çalışmalar göz önünde bulundurularak geliştireceğimiz kitin kapsayacağı beta globin mutasyonlarına karar verilmiştir. Bunun için beta talasemi mutasyonlarından IVSI-110 (G>A), IVSI-6 (T>C), IVSII-1(G>A), IVSII-745(C>G), IVSI-1(G>A) 5 mutasyon ve orak hücreli anemiye neden olan Hb S mutasyonu olmak üzere toplam 6 mutasyon test kapsamına alınmıştır. Test içeriğinde bulunan bu 6 mutasyon

Türk toplumundaki beta globin geni mutasyonlarının toplamda %76'sını oluşturmaktadır (Altay 2002).

Çalışma 13.888₺'lik bir bütçe ile desteklenmiştir. Bunun yaklaşık 2000 ₺'si DNA dizi analizi için ayrılmıştır. Geriye kalan 11.888 ₺'nin 4510₺'si real-time PCR için özel olarak tasarlanan primer ve prob siparişinde kullanılırken, 637 ₺'si DNA izolasyon kiti için, 6740 ₺'side sarf malzeme için kullanılmıştır. 21 kontrol ve 100 hasta örneğini içeren çalışmamız optimizasyon aşamalarında düşünülerek en az 200 örnek üzerinden çalışma yapılacak şekilde planlanmıştır. Dolayısı ile burada verilen fiyatlar 200 örnek içindir. Real time PCR yönteminin temel aşamanın primer ve prob olduğunu düşünürsek en az 200 örneği çalışacak primer ve prob maliyetide oldukça uygun görünmektedir.

Geliştirdiğimiz kit kapsamına öncelikle 6 mutasyon bölgesi dahil edilmiştir. Çalışmada kullanılan 96 (12x8) kuyucuktan oluşan real-time PCR cihazı (Applied Biosystems, 7500) tek bir yatay sırada bir hasta çalışmaya olanak vermektedir. Çünkü her bir mutasyon bölgesi için normal ve mutant bölgeyi saptayacak iki miks oluşturulmakta ve dolayısı ile her bir hasta için bir mutasyon bölgesi iki kuyucukta çalışılmaktadır. Sonuç olarak bir hastanın 6 mutasyonunu çalışabilmek için 12 kuyucuğa ihtiyaç duyulmaktadır, bu da bir yatay sırayı kapsamaktadır. Bu durum çalışmayı pratikleştirse de ileriki zamanlarda kit içerisinde bakılan mutasyon sayısı arttırılabilir.

Geliştirdiğimiz kit içinde house-keeping bir gen olan GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) genine ait primerlerin bulunduğu internal kontrol kullanılmıştır. Dolayısı ile her bir mutasyon bölgesi için multipleks PCR şeklinde çalışma yapılmıştır. Sonuçlar analiz edilirken öncelikle internal kontrollerin çalışıp çalışmadığı değerlendirilmiş daha sonra ilgili mutasyon bölgelerinin pikleri analiz edilmiştir. Tüm çalışmalarda internal kontroller gayet başarılı çalışmış ve bu durum sonuçların güvenilirliğini arttırmıştır.

Kitin validasyonları ve örneklerin çalışılması sırasında pozitif kontrol olarak kullanılacak olan önceden sonuçları bilinen ve sekans ile teyit edilen 21 kontrol DNA örneği geliştirdiğimiz kit ile çalışıldığında tümünün sonuçları %100 doğrulukla bulunmuştur.

Kitin validasyon çalışmaları tamamlandıktan ve kitin çalıştığından emin olunduktan sonra 100 DNA örneğinin (taşıyıcı ya da hasta bireylere ait) çalışması yapılmıştır. Çalışmalar planlanırken her bir mutasyon bölgesi için bir pozitif bir negatif kontrol ile internal kontroller kullanılmıştır. Böylelikle hem kitin çalıştığından hem de kontaminasyonun ekarte edildiğinden emin olunarak güvenilir çalışmalar yapılmıştır.

Çalışmalar sonucunda 100 örneğin 73'ünde mutasyon belirlenirken, 27 hastada kit kapsamındaki mutasyonlar belirlenememiştir. Çalıştığımız mutasyon bölgelerinin Türk toplumunda görülen beta globin geni mutasyonlarının %76'sını (Tadmouri vd 1998, Altay 2002) kapsadığını düşünürsek %73'lük sonuçla amacımıza yaklaşmış oluyoruz. Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi (Tadmouri vd 1998, Yılmaz vd 2000, Öner vd 2000, Altay 2002, Gülbay vd 2009) bizim çalışmamızda da en yüksek oranda gözlenen mutasyonun IVSI-110 (G>A) olduğu belirlenmiştir. Diğer mutasyonlar ise sıklık sırasına göre şu şekildedir; IVSII-1 (G>A), Hb S, IVSI-1 (G>A), IVSI-6 (T>C), IVSII-745 (C>G). IVSI-110 (G>A) mutasyonu dışındaki mutasyonların görülme sıklıklarının ise bölgelere göre farklılıklar gösterdiği görülmektedir.

Geliştirdiğimiz test ile real-time PCR'da mutasyon belirlediğimiz ve belirleyemediğimiz örneklerden rastgele seçilmiş örneklerin mutasyon sonuçlarının teyit edilmesi amacı ile IVSI-1 (G>A), IVSI-110 (G>A), IVSI-6 (T>C), IVSII-1 (G>A), IVSII-745 (C>G), Hb S mutasyonlarını taşıyan örnekler ve mutasyon saptanmayan DNA örnekleri DNA dizi analizine gönderilmiştir. Gelen sonuçlar analiz edilmiş ve tümü geliştirdiğimiz kitin real-time PCR sonuçları ile tutarlı bulunmuştur. Böylece sonuçların doğruluğu kanıtlanmış ve testin güvenilirliği gösterilmiştir.

SONUÇ

Beta globin geninin Türk toplumunda en sık görülen mutasyonları geliştirdiğimiz kit kapsamı içine alınmıştır.

Real-time PCR'ın klasik moleküler yöntemlere göre pek çok avantajı bulunmaktadır. Real-time PCR ile kısa sürede sonuç alınabilmesi sistemin en önemli avantajlarından biridir. Bizim çalışmamızda real-time PCR yöntemi ile zaman tasarrufu sağlanmış, kontaminasyon riski de en az seviyeye indirilmiştir. Bütün çalışma tek tüp içerisinde yapılabildiği için PCR sonrası jel elektroforezi gibi işlemlere de gerek kalmamıştır.

Topluma ve hastaya olan maliyeti azaltması, %100 güvenilirlikle çalışması ve tekrarlanabilirliğinin yüksek oluşu açısından büyük bir avantaj sağlayacağı ve rutin kullanımda uygulanabilir bir kit olacağı düşünülmektedir. Ayrıca ileride yeni primer ve prob tasarımları ile çalışılan mutasyon sayısı arttırılıp kitin daha kapsamlı hale getirilmesi amaçlanmaktadır.

Toplam β globin gen mutasyonların %76'sını kapsayan bir kit geliştirmeyi planladığımız çalışma sonucunda örneklerin %73'ünde mutasyon belirleyerek iyi bir sonuca ulaşılmıştır.

Sunulan bu tez çalışması ile hemoglobin elektroforezi ya da HPLC ile taşıyıcı/ hasta olduğu saptanmış kişilerin mutasyonlarını moleküler düzeyde belirleyen, kesin, basit, hızlı ve düşük maliyetli tanı konulmasını sağlayan güvenilir bir kit geliştirdiğimizi düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Agarwal, A., Guindo, A., Cissoko, Y., Taylor, J.G., Coulibaly, D., Kone, A., Kayentao, K., Djimde, A., Christopher, V.P., Doumbo, O., Wellems, T.E., Diallo, D. 2000. Hemoglobin C Associated With Protection From Severe Malaria in The Dogon of Mali, A West African Population With a Low Prevalance of Hemoglobin S. *Blood*, 96:2358-2363.
- Akar, N. 1999. Moleküler Patolojiye Giriş, ANTIP A.Ş., Ankara. 1. Baskı 154, 189-190.
- Altan, N. 2000. Biyokimya. Olgu Sunumlu Yaklaşım, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Altay, Ç. 2002. The Frequency and Distribution Pattern of β -Thalassemia Mutations in Turkey. *Türk J Haematol*, 19(2):309-315.
- Altay, Ç. 2002. Anormal hemoglobins in Turkey. *Turk J Hea*;19(1): 63-74.
- Altay Ç, Gürgey A. 1986 Distribution of hemoglobinopathies in Turkey. *Turk J Pediatr*;8:219.
- Anonim 2008. ABgene®, Guide QPCR probe design. www.abgene.com/downloads/Guide_QPCR-probedesign.pdf
- Apak, H. 2001. Hemoglobinopatiler ve Talasemiler. Anemiler Sempozyumu. S149-162
- Basak AN. 2005. Talasemi Moleküler Genetiği. Türk Hematoloji Derneği Temel Moleküler Hematoloji Kursu 12-13 Mart, 99-106.
- Başaran, N. 1999. Tıbbi Genetik, 7. Baskı, 292-293, Nobel-Tıp Yayınevi, Bursa.
- Bilenoğlu, O. 1996. Molecular Analysis of β -thalassemia and Hemoglobins by the β Globin Strip Assay: A novel diagnostic approach, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi
- Birgens, H., Ljung, R. 2007. The Thalassemia Syndromes. *Scand J Clin Lab Invest*, 67:11-26
- Bustin, S.A. 2000. Absolute Quantification of mRNA Using Real-time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays. *J Mol. Endocrinol.* 25:169-93
- Cacherill, F.R., Uhl, J.R. 2001. Applications and Challenges Of Real-Time PCR For The Clinical Microbiology Laboratory. In: Reischl, U., Wittwer, C., Cockerill, F.R., Rapid Cycle real-Time PCR. Methods and Applications. 1sted. Germany: Heidelberg. p.11
- Canatan, D. 2010. Talasemi ve Hemoglobinopatilerin Dünyada ve Türkiye’ de Durumu: Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics 3(1): 1-4.
- Cavalli SL, Menozzi P, Piazza A. 1996. The History and Geography of Human Genes. Princeton, University Press.
- Clarke, G.M., Higgins, T.N. 2000. Laboratory Investigation of Hemoglobinopathies and Thalassemias: Review and Update. *Clinical Chemistry* 46(8):1284-1290.
- Champa, P.C. Harvey, R.A., Ferrier, D.R. 2007. Lippincott Biyokimya, Nobel Tıp Kitabevi, 3. Baskı (Çeviri Editörü Doç. Dr. Engin Ulukaya).

Charbonnier, F., Raux, G., Wang, Q., Drouot, N., Cordier, F., Limacher, J.M. 2000. Dedection of Exon Deletion and Duplications of the Mismatch Repair Genes in Hereditary Nonpolyposis Colerectal Canser Families Using Multiplex Polymerase Chain Reaction of Short Fluorescent Fragment. *Canser Res.* 60:2760-2763.

Chaplin, B.E., Rasmussen, R.P., Bernard,P.S.,Wittwer, C.T. 1999. LightCycler Hybridization Probes The Most Direct Way To Monitor PCR Amplification And Mutation Detection. *Biochemica.* 1:5-8.

Chern SR, Chen CP. 2000. Molecular Prenatal Diagnosis of Thalassemia in Taiwan. *Int J Gynaecol Obstet.*; 69:103-106.

Dinçol G., Pekçelen Y., Atamer T., Sargin D., Nalçaçı M., Aktan M., Beşışık S. 2003. Hemolitik Anemiler, Edidet by: Nobel Tıp Kitapevleri Klinik Hematoloji: Türkiye: İstanbul Üniversitesi, 87-152.

Dönbak, L. 2005. İnsan Hemoglobin Varyantları. *KSU.Journal of Science and Engineering*, 8(2): 13-22.

Flint, J., Har ding, R.M., Boyce, A.J., Cleg, J.B. 1998. The Population Genetics of The Haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol.*,11:1-51.

Gibson, U.E., Heid, C.A., Wlliams, P.M. 1996. A Novel Method for Real-Time Quantitavive RT-PCR. *Genome Res.* 6:995-1001.

Giardine, B., Baal, S., Kaimakis P., Riemer, C., Miller, W., Samara, M., Kollia, P., Anagnou, N.P., Chui D.H.K., Wajeman, H., Hardison, R.C, Patrinos, G.P. 2007. HbVar Database of Human Hemoglobin Variants and Thalassemia Mutations: 2007 Update. *Human Mutation Database in Brief* 950.

gmo-crl.jrc.ec.europa.eu/capacitybuilding/manuals/.../bolum10.pdf

Guidelines for The Control of Haemoglobin Disorders. 1996. WHO/HDP/HB/GL/94.1. Control of Hereditary Diseases., Genova WHO

Gut, M., Leutenegger, C.M., Huder, J.B., Pedersen, N.C., Lutz., H. 1999. One-tube Florogenic Reverse Transcription-polymerase Chain Reaction For The Quantification Of Feline Coronaviruses. *J Virol Methods.* 77:37-46.

Gülbay, G., Yeşilada, E., Aydoğdu, İ., Özgen, Ü., Otlu, G. 2009. Malatya’ da Beta-Talasemi Mutasyonları: İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 16(4) 209-212.

Günçağ, D., Pekçelen, Y., Atamer, T. 2003. Klinik Hematoloji, İstanbul; Nobel Matbaacılık: s 137-147

Günel, T. 2007. Gen Anlatımının Kantitatif Analizi “Real-Time PCR” : Türkiye Klinikleri *J Med Sci* 27:763-767

Gümrük, F. Hemoglobinopatilerin Tanı ve Tedavisinde Yenilikler. 9. Mezuniyet Sonrası Eğitim Kursu

Gouas, L., Goumy, C., Veronese, L., Tchirkov, A., Vago, P., 2008. Gene Dosage Methods as Diagnostic Tools For The İdentification Of Chromosome Abnormalities. *Pathol Biol.* 56: 345-353

Hartwell SK, Srisawang B, Kongtawelert P, Christian D, Grudpan K. 2005. Review on Screening and Analysis Techniques for Hemoglobin Variants and Thalassemia. *Talanta*, 65: 1149-1161.

Harteveld, C.L., Kleanthous, M., Traeger, J. 2009. Prenatal Diagnosis of Hemoglobin Disorders: Present and Future Strategies. *Clinical Biochemistry*.42: 1767-1779.

Hoffbrand A.V., Pettit J.E.: Genetic Defects of Haemoglobin. Edited By: Oxford Blackwell Scientific Publications: Essential Haematology. London: 94-120, 1985.

Holland, P.M., Abramson., R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. 1991. Dedection of Specific Polymerase Chain Reaction Product by Utilizing The 5'→3' Exonuclease Activitiy Of *Thermus Aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88:7276-80.

<http://web.inonu.edu.tr/rdurmaz>

Huisman THJ. 1993. The Structure and Function of Normal and Abnormal Hemoglobins. *Br ClinHaematol* ; 6:1.

Huisman, T.H.J. 1995. Human Hemoglobin. *Blood Disease of Infancy and Childhood*. 7.th ed., Mosby-Year Book. Inc., St Louis: Ed. Miller, D.R.,Baehner, R.L.

Kahraman, S., Ekmekci, C.G. 2010. Talasemi ve Hemoglobinopatilerde Preimplantasyon Genetik Tanı Yöntemleri: *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 3(1): 44-49.

Kayrın L, Aksoy K, Tuli A, Çürük MA, Attila G. 2003. Tanıda DNA Teknikleri VI. *Biyokimya Yaz Okulu Kitapçığı, Çukurova Üniversitesi, Adana*.

Keser İ, Manguoglu E, Kayışlı Ö.G. 2005. Prenatal diagnosis of β -thalassemia in the Antalya Province. *Turk J Med Sci*. 35:251–253.

Keser, İ., 2007. Hemoglobinopatilerde Moleküler Çalışmalar: *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 3(10):5-10.

Klug, W.S., Cummings, M.R, 2002. *Genetik Kavramlar*, 6. Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.

Kotler, L., Sobolev, I., Ulanovsky, L. 1994. DNA Sequencing: Modular Primers for Automated Walking, *Biotechniques*, 17(3):554-559.

Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., Sindelka, R., Sjöback, R., Sjögreen, B., Strömbom, L., Stahlberg, A., Zoric, N. 2006. The Real-time Polymerase Chain Reaction: *Molecular Aspects of Medicine* 27:95-125.

Kutlu M., Çekmiş H., Başak M., Osman N., Açıkgöz Ö., Sevindir İ., Özcan Z. 2006. *Talasemiler, Bakırköy Tıp Dergisi*, 2(2): 33-40.

Lukens JN, Lee GR. 1993. The Abnormal Hemoglobins. In: *Wintrobe's Clinical Hematology*, Eds Lee GR,Bithell CT, Foester J,Athens JW, Lukens JN. Lea and Febiger Com, Pennsylvania

Najmabadi H, Teimourian S, Khatibi T, Neishabury M, Pourfarzad F, Jalil-Nejad S, Azad M. 2001. Amplification Refractory Mutation System (ARMS) and Reverse Hybridization in the Detection of Beta-Thalassemia Mutations. *Arch Irn Med*,; 4 (4): 165–170.

- May C, Sadelain M. 2001. A Promising genetic approach to the treatment of β -thalassemia. *Trends Cardiovasc Med*, 11(7): 276-280.
- Muncie LH., Campbell JS. 2009. Alpha and Beta Thalassemia. *American Family Physician*, 80(4):339-344.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Radwell, V.W. 1988. *Harper's Biochemistry*. 21.th ed., Long Medical Book, London.
- Mümüőöđlu, S., Sayal, B., Beksaç, S. 2010. Talasemi ve Hemoglobopatilerde Moleküler Tanı Yöntemleri: *Turkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 3(1): 40-43.
- Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F. 2001. *Principles of Molecular Disease Lessons from the Hemoglobinopathies*: Edited by: W.B.Saunders Company: Thompson & Thompson Genetics in Medicine. Philadelphia: 181-201.
- Öner R, Altay C, Gürgey A, Aksoy M, Kılınç Y, Stoming TA, Reese AL, Kutlar A, Kutlar F, Huisman THJ. 1990. Beta-talassemia in Turkey. *Hemoglobulin*,; 14: 1–13.
- Öner, C. (Çev. Ed.), 2002. *Genetik Kavramlar*. (Klug, S., Cummings, M.,R., 2000. *Concepts of Genetic*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Özkinay, F, 2010. Talasemi ve Hemoglobopatilerin Moleküler Tanı Yöntemleri: *Turkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 3(1): 35- 39.
- Pastinen T, Raitio M., Lindroos, K., Tainola, P., Peltonen, L., Syvanen, A.C., 2000. A System for Specific, High-Throughput Genotyping by Allele-Specific Primer Extension on Microarrays *Genome Res*: 10:1031-1042.
- Reuter, M., Küpper, Y., Schmitz, A. 2005. Detection of New Singlenucleotide Polymorphisms by Means of Real-time PCR, *Journal of Genetics*,84(3):341-345.
- Ronaghi, M. 2001. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res* .11:3-11.
- Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü, Ankara, 2010. Hemoglobopati Kontrol Programı: *Turkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 3(1): 5-8.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F. 1985. Enzymatic Amplification of Beta-Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis For Diagnosis Of Sickle Cell Anemia. *Science*. 30:1350-1354.
- Schouten, J.R., McElgunn C.J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F., Perls, G. 2002. Relative Quantification of 40 Nucleic Acid Sequences by Multiplex Ligation- Dependent Probe Amplification. *Nucleic Acids Res*. 30:57.
- Syvänen, AC. Bengtström, M. Tenhunen, J. Söderlund, H. 1988. Quantification of Polymerase Chain Reaction Products by Affinity-based Hybrid Collection. *Nucleic Acids Res*, Dec 9;16(23):11327-38.
- Sutcharitchan P., Saiki, R., Huisman T.H.J., Kutlar, A., McKie, V., Erlich, H., Embury, S.H. 1995. Reverse Dot-Blot Dedection of the African- American β - Thalassemia Mutations. *Blood*.Vol86(4),1580-1585.

Tadmouri G.O., Garguier N., Demont J., Perrin P., Başak A.N. 2001. History and Origin of β -Thalassemia in Turkey: Sequence haplotype Diversity of β -Globin Genes. *Human Biology*, 73,(5), 661-674.

Tadmouri, G.O., Tüzmen, Ş., Özçelik, H., Özer, A., Baig, S.M., Senga, E.B., Başak, A.N. 1998. Molecular and Population Genetic Analyses of β -Thalassemia in Turkey. *American Journal of Hematology*, 57:215-220.

Tadmouri G.O., Başak A.N. 2001. β -Thalassemia in Turkey: A Review of the Clinical, Epidemiological, Molecular and Evolutionary Aspects *Hemoglobin* 25,(2), 227-239.

Thelwell, N., Millington, S., Solinas, A., Booth, J., Brown, T. 2000. Mode Of Action And Application Of Scorpion Primers To Mutation Detection. *Nucleic Acids Research*. 28:3752-3761.

TÜİK Aile Yapısı Araştırması, 2006.

Tüzmen, Ş., Schechter, A.N. 2001. Genetic Diseases of Hemoglobin: Diagnostic Methods For Elucidating β -Thalassemia Mutations. *Blood Reviews*. 15.19-20.

Tyagi, S., Kramer, F.R. 1996. Molecular Beacons: Probes That Fluoresce Upon Hybridization. *Nat Biotechnol*. 14:303-308.

Ünal, Ş. 2010. Beta Talasemi Kliniği ve Tanısı. *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics*, 3(1):14-17.

Üstündağ M. 2004, Hemoglobinopati Kontrol Programı. Edited by: Canatan D., Aydınok Y., 3.Uluslararası Talasemi Yaz Okulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbı Okulu. İstanbul, 145-148.

Vrettou, C., Traeger-Synodinos, J., Tzetis, M. 2003. Rapid Screening of Multiple Beta-globin Gene Mutations by Real-time PCR (LightCyclerTM):Application to Carrier Screening and Prenatal Diagnosis for Thalassemia Syndromes, *Clin Chem*, 49:769–776.

Wong, ML. Medrano, JF. 2005. Real-time PCR for mRNA Quantitation. *Biotechniques*, Jul;39(1):75-85.

World Health Organization. 1994. Guidelines for the Control of Haemoglobin Disorders. Report of the VIth Annual Meeting of the WHO Working Group on Haemoglobinopathies, Cagliari, Sardinia.

www.genetiklab.com

www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp, 2012

www.talasemifederasyonu.org.tr/pdf/tani/cansinTedavi-9pdf.pdf, 2012

www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/9_MSEK_12pdf, 2012

www.thd.org.tr/doc/kurs_pdf/mugeaydinsayitoğlu.pdf, 2012

Yazman., D. 2010. Erişkin Talasemili Hastanın Sorunları: *Türkiye Klinikleri J Hem Onc-Special Topics* 3(1): 119-122.

Yıldız S, Atalay A, Bağcı H, Atalay EÖ. 2005. Beta-thalassemia mutations in Denizli province of Turkey. *Turk J Hematol*; 22: 19-23.

Yılmaz B, Balım Z, Özkınay F, Gündüz C, Altıntas N, Aydınok Y, Topçuoglu N. 2000. Beta talasemi mutasyon tiplerinin moleküler analizi. Ege Tıp Dergisi,; 39(3): 153-157.

EKLER

EK 1: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

GENETİK MATERYAL ÜZERİNDE YAPILACAK ARAŞTIRMALAR

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: Türk toplumunda Beta Talaseminin Hızlı, Ucuz, Etkin ve Güvenilir Yöntemle Taranması Amacıyla Tarama Testi Geliştirilmesi

Sorumlu Araştırmacının Adı: Prof. Dr. E. Ferda Perçin

Diğer Araştırmacıların Adı: Prof.Dr.Hatice Ilgın Ruhi

Dr. Halil Kara

Dr.Jale Öztürk

Dr. Deniz Reisoğlu Çakmak

Hem.Talihanur Aydoğmuş

Uzm. Bio Derya Karaer

Destekleyici (varsa): Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi

“Türk toplumunda Beta Talaseminin Hızlı, Ucuz, Etkin ve Güvenilir Yöntemle Taranması Amacıyla Tarama Testi Geliştirilmesi” isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışma, araştırma amacı ile yapılmaktadır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, sizinle ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam

olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir.

1. Genetik çalışmanın amacı ve dayanağı nelerdir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

a. *Neden özellikle bu kişi / hasta seçilmiştir?*

Bu çalışmaya davet edilmenizin nedeni sizde Hb (hemogloblin) elektroforezi / HPLC ile beta talasemi ve/veya orak hücreli anemi taşıyıcılığı/hastası tanısı konmasıdır. Katılımınız ile beta talasemi ve orak hücreli anemi için Türkiye’de sık görülen mutasyonları belirleyebilen güvenilir bir test geliştirmeyi hedefleyen bir araştırma gerçekleştirilecektir.

b. *Çalışmanın önemi ve gerekliliği nelerdir?*

Talasemilerin en sık görülen tipleri alfa ve beta talasemidir. Alfa talasemi daha ziyade Uzak Doğu’da görülürken, beta talasemi Akdeniz ülkeleri ve Türkiye’de sık gözlenen tek gen hastalıklarındandır. HBB (Beta globin) geni olarak adlandırılan gende ki tek tip bir mutasyonun (genetik değişiklik) neden olduğu orak hücreli anemi’nin aksine beta talasemi’ye çok sayıda mutasyon (genetik değişiklik) neden olmaktadır. Beta talasemideki bu genetik değişiklikler normalden küçük yapılı kırmızı kan hücrelerine ve hemolitik kansızlığa neden olur. Türkiye’de yaklaşık 1.300.000 kişinin talasemi taşıyıcısı ve 4000 civarında kişinin de talasemi hastası olduğu belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda gebeliklerin %22’sinde test ihtiyacı olacağı hesaplanmıştır. Ülkemizde akraba evliliği (ortalama %20.9) ve doğurganlığın yüksek oranda olması bu hastalıktan etkilenen birey sayısında ki artışta önemli etkenlerdir. Taşıyıcılığın ve gebelik oranının oldukça yüksek olduğu ülkemizde talasemi mutasyonlarının saptanması için yeni yöntemler uygulanması zorunluluğu ortaya çıkmaktadır.

Beta talasemi tanısı için izlenen yol aşağıdakileri içerir: Öncelikle basit ve geniş ölçüde Hb (hemogloblin) elektroforezi gibi standart yöntemler uygulanır. Bu yöntemlerle taşıyıcı çiftler büyük bir ölçüde saptanabilir fakat bu yöntem mutasyonla ilgili fikir

vermez. Taşıyıcı çiftlerde çocuk sahibi olmadan doğum öncesi tanı için mutasyonun belirlenmesi gerekir. Moleküler yöntemlerle taşıyıcı çiftlerin kesin tanısı konabilir.

Çalışmaya katılımınız ile beta talasemi ve orak hücreli anemi taşıyıcısı/hasta olduğu saptanmış olan kişilerde moleküler genetik analizlerin yapılması ile kesin, basit ve hızlı tanı konulmasını sağlayan ve HBB genindeki (genetik değişimleri beta talasemive orak hücreli anemiye neden olan gen) mutasyonların %76'ni kapsayacak hızlı, düşük maliyetli ve güvenilir bir tarama testi geliştirilmesini amaçlayan bir çalışma gerçekleştirilecektir .

c. *Çalışmaya toplam kaç kişinin katılımı planlanmaktadır?*

100 taşıyıcı/hasta kişinin, 21 kontrolün katılımı planlanmaktadır.

2. Bu genetik çalışmaya katılmalı mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Eğer katılmaya karar verirseniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Böyle bir karar vermeniz durumunda tıbbi bakımınız bu durumdan etkilenmeyecektir.

3. Genetik araştırma nasıl yapılacak?

a. Hangi örnek (ler) alınacak ve nasıl alınacak ?

Araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, kolunuzdan 1 tüp (5-ml) kan alınacaktır.. Genellikle bir tek örnekleme yeterlidir ancak bu aşamada başarısız olduğunda bir kez daha kan vermeniz istenebilir.

b. Örnekte neler araştırılacak ?

HBB genindeki (genetik değişimleri beta talasemi ve orak hücreli anemiye neden olan gen) mutasyonların %75'ni kapsayacak bir tarama testi oluşturulacaktır.

c. Örnekler nerede çalışılacak?

Toplanan kanlar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarında çalışılacaktır.

d. Genetik örneğin gelecekte nasıl imha edilmesi planlanıyor ?

Genetik örnekler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'nda saklanacaktır.

4.Tarafımdan alınan örnekler gelecekte de kullanılabilir mi?

Tarafınızdan alınan örneğin saklanması ve ileride yapılacak diğer çalışmalarda kullanımı ancak sizin izninize tabidir. Bu örnekler uzun yıllar isminiz (kimlik bilgileriniz) korunmak ya da yok edilmek kaydı ile saklanabilir. Lütfen aşağıdaki seçeneklerden size uygun olan bir tanesini işaretleyiniz.

1- Tarafımdan alınan kodlanmış* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.

2- Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileri çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

3- Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı diğer çalışmalarda kullanımını onaylıyorum, ancak farklı çalışmalar için tekrar bilgilendirilmek ve yeni onay vermek istiyorum.

4- Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum, ve gelecekte de her türlü genetik çalışmada anonim (kimliğim ile bağlantısız) olarak kullanılmasını onaylıyorum.

*Kodlanmış örnek: Sizden alınan örneğe bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerinize yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

5. Çalışmanın riskleri nelerdir?

- a. Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler: İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz ve kolda morarma olabilir. Düşük bir olasılık da olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması, veya enfeksiyon riski vardır.
- b. Yapılacak genetik teste bağlı oluşabilecek riskler: Yapılan testler sizin veya ailenizin bir ferдинin ileriki bir zamanda bu genetik hastalıktan etkilenebileceğini ortaya çıkarabilir. Bu bilginin kötüye kullanılması sizi ekonomik ve sosyal yönden etkileyebileceği gibi, böyle bir hastalığa sahip olduğunuzu öğrenmeniz sizi psikolojik yönden de olumsuz etkileyebilir.

6. Çalışmanın yararları nelerdir?

Çalışma sonunda herhangi bir genetik değişim bulunabilirse, çiftlere gebeliklerinde sağlıklı çocuk sahibi olmakla ilgili daha açık genetik danışmanlık verilebilecektir.

Çalışma sonunda geliştirilecek test ile Türk toplumundaki beta talasemi ve orak hücre anemisine neden olan mutasyonların tanısı kısa zamanda, etkin, düşük maliyetle ve güvenilir şekilde konacaktır.

7. Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak ?

Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Size ait bulgular üçüncü kişilere, onayınız dışında hiçbir şekilde açıklanmayacaktır. Çalışmanın sonunda, size ait tüm sonuçlar hakkında bilgi istemeye

hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Lütfen aşağıdaki kutucuklardan size uygun olanı işaretleyiniz:

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istiyorum

Bu çalışmada elde edilecek kendimle ilgili bilgileri öğrenmek istemiyorum.

Kendinizle ilgili genetik bilgiyi öğrenmeyi seçmeniz durumunda size (varsa) sağaltım ile ilgili bilgiler ve genetik danışmanlık hizmeti verilecektir.

Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

8. Bu çalışmaya katılmamın maliyeti nedir ?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

9. Çalışmanın ticari bir yönü var mıdır?

Gönüllülerden elde edilen bilgilerden, tıbbi testler ya da tedaviler geliştirilebilmesi gibi ticari bir fayda sağlanabilir. Böyle bir durum olursa, gönüllüler herhangi bir şekilde ticari gelir temin etmeyeceklerdir.

10. Göreceğim olası bir zarar durumunda ne yapılacak ?

Araştırmadan dolayı katılımcının göreceği olası bir zararda bunun sorumluluğunun ve giderilmesi için gerekli her türlü tıbbi müdahalenin yapılacağını; bu konudaki tüm harcamaların üstlenileceğini bilmelisiniz.

11. Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim ?

Araştırma ile ilgili bir sorunuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksinim duyduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Derya Karaer
GÖREVİ : Uzman Biyolog
TELEFON : 0 312 2024707

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

GÜTF Tıbbi Genetik Anabilim dalında, Uzm. Bio. Derya Karaer Tarafından genetik bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim).* Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi girişimin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi girişimlerle ilgili olarak parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Prof.Dr.E.Ferda Perçin’ i ‘Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı’nda bulabileceğimi ve 03122024636 numaralı telefonda arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu genetik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Ek 2: Çalışmanın Etik Kurul Kararı



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

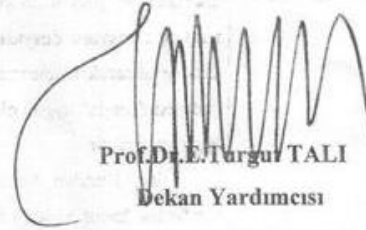


Sayı : B.30.2.GÜN.0.20 - 3637
Konu :

20.04.2011

Sayın *Prof. Dr. E. Ferda PERÇİN*
Proje Yürütücüsü

Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 23 Mart 2011 tarihinde yapmış olduğu toplantı kararları ekte sunulmuştur.
Bilgilerinizi rica ederim.


Prof. Dr. E. Turgut TALI
Dekan Yardımcısı



GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
DEĞERLENDİRME FORMU

DEĞERLENDİRME KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
TELEFON	0312 202 69 58
FAKS	0312 202 46 73
E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Türk toplumunda Beta Talaseminin Hızlı, Ucuz, Etkin ve Güvenilir Yöntemle Taranması Amacıyla Tarama Testi Geliştirilmesi		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.E.Ferda PERÇİN		
	UZMANLIK TEZİ/AKADEMİK AMAÇLI	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/>	AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>	
		DİĞER <input type="checkbox"/>	(Bireysel Araştırma Projesi)	
	İLAÇ DIŞI ARAŞTIRMA	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/> İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL: (B.3) genetik materyalle yapılacak araştırmalar <input type="checkbox"/> İLAÇ DIŞI GİRİŞİMSEL OLMAYAN:	
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Bege Adı	Tarihi	Versiyon No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
	BİL. GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Bege Adı			Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>		
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>		

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 20	Toplantı tarihi: 23.03.2011
	<p>Üniversitemiz Tıp Fakültesinde Prof.Dr.Ferda E. Perçin'in sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıdaki kütüneye kayıtlı başvuru bilgileri verilen, <i>Bireysel Araştırma Projesi</i> klinik araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına ve "bütçesi dışında" uygun olduğuna, G.Ü.T.F. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir</p> <p>Etik Kurulun kararı, projenin bütçesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (BAP) tarafından kabul edildiği takdirde yürürlüğe girecek olup, BAP kararının Kurulumuza bildirilmesi gerekmektedir.</p>	

ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesinin son versiyonu, İyi Klinik Uygulamaları (Uluslararası ICH-GCP.) İKU kılavuzu ve bununla ilgili 2001/20/EC ve 2005/28/EC sayılı Avrupa Birliği direktifleri, Biyoloji ve Tıbbın uygulanması bakımından İnsan Hakları ve İnsan haysiyetinin korunması sözleşmesi ve İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin onaylanmasının uygun bulunduğu dair kanun (9.12.2003 tarihli 25311 sayılı Resmi Gazete), 2547 sayılı Yükseköğretim Kanunu (06.11.1981 tarihli 17506 sayılı Resmi Gazete).					
ETİK KURUL BAŞKANI ÜNVANI/ADI/SOYADI: Prof.Dr.Canan ULUOĞLU						
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Canan ULUOĞLU BAŞKAN	Tıbbi Farmakoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Farmakoloji A.D	K	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

Doç.Dr.Arzu BAKIRTAŞ BAŞKAN-YRD.	Çocuk Sağ.ve Hast. Çocuk Allerji	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.D	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Gonca AKBULUT RAPORTÖR	Fizyoloji	G.Ü.T.F Fizyoloji A.D.	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Füsün BOZKIRLI ÜYE	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	G.Ü.T.F Anest. ve Rea. A.D	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Emin TÜRKÖZ ÜYE	Restoratif Diş Tedavisi ve Endodonti	G.Ü.D.F Restoratif Diş Ted. ve Endodonti A.D	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Seyhan ERSAN ÜYE	Farmasötik Kimya	G.Ü.E.F (Ecz.Mes.Bil) Farmasötik Kimya	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Sefer AYCAN ÜYE	Halk Sağlığı	G.Ü.T.F Halk Sağlığı A.D	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Prof.Dr.Mustafa KAVUTÇU ÜYE	Tıbbi Biyokimya	G.Ü.T.F Tıbbi Biyokimya A.D	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Öznur L.BOYUNAĞA ÜYE	Radyoloji	G.Ü.T.F Radyoloji A.D	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Galip GÜZ ÜYE	İç Hastalıkları Erişkin Nefroloji	G.Ü.T.F İç Hastalıkları A.D.	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Aylar POYRAZ ÜYE	Tıbbi Patoloji	G.Ü.T.F Tıbbi Patoloji A.D	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Etiği ve Tıp Tarihi	G.Ü.T.F Tıp Etiği ve Tıp Tarihi A.D	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Birol DEMİREL ÜYE	Adli Tıp	G.Ü.T.F Adli Tıp A.D.	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Doç.Dr.Metin YILMAZ ÜYE	Kulak-Burun-Boğaz Hast.	Kulak-Burun- Boğaz Hast. A.D	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Huk.Müş.Adem GELİR ÜYE	Hukuk Müşavirliği	Rektörlük Hukuk Müşavirliği	E	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	Katılmadı
Emine ŞEKER ÜYE	Sivil Temsilci	Sivil Temsilci	K	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

- * :Araştırma ile İlişki
- ** :Toplantıda Bulunma

Ek 3: Projeye Ait Sözleşme Protokolü

Form-3

GAZİ ÜNİVERSİTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ PROTOKOLU

Proje Kod No : 01/2011-37
Proje Yöneticisi : PROF.DR. FERDA EMRİYE PERÇİN
Proje Adı : Türk toplumunda Beta Talaseminin Hızlı, Ucuz, Etkin ve Güvenilir Yöntemle Taranması Amacıyla Tarama Testi Geliştirilmesi

TARAFLAR

1. Resmi Gazete'nin 10.04.2002 tarih ve 24722 sayılı nüshasında yayınlanan 2547 sayılı Kanun'unun 4684 sayılı Kanun'la değişik 58. maddesi gereğince kurulan Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) İta Amiri **Prof. Dr. Metin AKTAŞ** ile yukarıda Adı ve Soyadı yazılı Proje Yöneticisi **PROF.DR. FERDA EMRİYE PERÇİN** arasında aşağıdaki şartlarla bir araştırma projesi protokolü yapılmıştır.

SÖZLEŞMENİN KONUSU

2. Bu sözleşmenin konusu, ekli araştırma projesi başvuru formunda ayrıntıları verilmiş olan projenin Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmesidir.

PROJE YÖNETİCİSİNİN GÖREVLERİ

3. Projenin Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Hazırlama ve Değerlendirme Yönergesi'nde belirtilen esaslara bağlı kalarak protokole ekli araştırma projesi başvuru formunda belirtilen program içinde, protokoldeki süre, amaç ve şartlara uygun olarak yürütülmesi, geliştirilmesi ve sonuçlandırılmasından proje yöneticisi sorumludur.

Desteklenmesi kabul edilmiş projenin amaç, kapsam, süre, program, araştırmacılar ve bütçesinde Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nun yazılı izni alınmadan hiçbir değişiklik yapılamaz.

Proje Yöneticisinin emekli olması veya Üniversiteden herhangi bir sebeple ayrılması halinde, Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu proje yöneticilik görevini ilgili birimin (Bölüm, Yüksekokul veya Fakülte) önerisiyle proje personelinin birine veya bir başka öğretim üyesine verir.

ARAÇ, GEREÇ VE DONANIM

4. Yurt içinden veya yurt dışından temin edilerek projeye tahsis edilen sarf malzemesi dışındaki, demirbaş niteliğindeki her türlü teçhizat Gazi Üniversitesi'nin malı olup ayniyat kaydına müteakip ilgili birimin ayniyat mutemedine zimmetlenir.

RAPORLAR

5. Proje Yöneticisi projenin yürürlükte olduğu yılların **30 Haziran ve 31 Aralık** tarihlerine kadar proje çalışmalarının gidişi ve proje harcama durumlarıyla ilgili altı aylık dönemlerde birer gelişme raporunu ve ayrıca istenildiğinde projeye ilişkin ayrıntılı bilgileri ilgili birimin Uzmanlar Grubuna vermekle yükümlüdür.

6. BAP Komisyonunun gerekli görmesi halinde, BAP Komisyonu Başkanı projeye ilgili çalışmalarını yerinde inceleyebilir veya inceletebilir. Bu durumlarda proje yöneticisi projeye ilgili her türlü teknik, idari ve mali bilgileri ve belgeleri incelemeye hazır bulundurmak ve incelemeyi kolaylaştıracak bütün yardımları yapmakla yükümlüdür.

7. Proje yöneticisi projenin sona ermesini izleyen 4 ay içerisinde Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Hazırlama ve Değerlendirme Yönergesi'nin 13. maddesinde belirtilen esaslar dahilinde hazırlanacak, tüm araştırma sonuçlarını içeren Kesin Raporu, ayrıca araştırma devam ederken bilimsel toplantılara sunulan bildiri metinleri ile varsa ara yayınların birer örneğini de ilgili birimin Uzmanlar Grubuna vermekle yükümlüdür

Proje kapsamında yapılacak yayınlarda çalışmanın Gazi Üniversitesi tarafından desteklendiğinin açık bir şekilde belirtilmesi zorunludur.

GÜVENLİK ÖNLEMLERİ

8. Proje yöneticisi, proje yerinde kazaları önleme ve sağlık şartları bakımından gerekli her türlü güvenlik önlemlerinin alınmasından ve etik kurallarının uygulanmasından sorumludur.

Klinik veya canlı hayvan türleri üzerinde uygulanacak deneysel çalışmalarda ilgili Etik Kurul(lar)dan onay alınması zorunludur. Bu konuda tüm sorumluluk proje yöneticisine aittir.

GİZLİLİK

9. Proje yöneticisi, projeye ilgili olarak elde edilecek bilgilerin gizliliğinin korunması bakımından Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'na karşı sorumludur. Ulusal güvenlik, milli ekonomi ve ülke çıkarları aleyhine kullanılabilecek proje sonuçları üzerinde proje yöneticisi ve yardımcı araştırmacılar tarafından haber ya da beyanat verilemez ve yayın yapılamaz.

MUTEMET ELİ İLE HARCAMALAR

10. Harcamalar ilgili birimlerin (Fakülte/Y.Okul) avans ve kredi işlemleri için görevlendirilen mutemetler tarafından alınacak avansın kanıtlayıcı evrak karşılığı yapılır. Verilen bu avansın usulüne uygun olarak mahsubu yapılmadan yeniden avans verilmez.

PATENT HAKLARI

11. Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından desteklenmek suretiyle ele alınan bir projenin sonucunda 17.07.1963 tarih ve 278 sayılı Kanun'un 2/a maddesine göre bir ihtira meydana gelmesi halinde, bu ihtira aynı Kanun'un 21. maddesi uyarınca Gazi Üniversitesi'ne ait olacaktır. Ancak Gazi Üniversitesi bu ihtiradan dolayı usulüne uygun olarak istihsal edineceği patenti satma yahut kiralama yolu ile elde edeceği bedel veya kiranın %30'unu ihtirayı yapan veya yapanlara verecektir.

Bilgisayarlarla ilgili araştırmalarda yazılan programlar CD veya disketleri ile teslim edilir.

DESTEK MİKTARI

12. Projeye, ayrıntıları protokolde ekli, araştırma projesi öneri formunda belirtilen ve Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından kabul edilen toplam 13.888 TL destek sağlanacak olup, bu destek bütçenin serbest bırakıldığı oranda kullanılabilecektir.

ÖDEMENİN KESİLMESİ, HARCAMALARIN GERİ ALINMASI VE TAZMİNAT

13. Protokol gereğince yapılan ödemelerin, protokol şartlarına uygun olarak kullanılmadığının gelişme raporlarındaki ayrıntılı bilgilerden veya yapılan incelemelerden anlaşılması, proje gelişme raporlarının öngörülen tarihlerde verilmemesi veya proje yöneticisinin Gazi Üniversitesinden ayrılması hallerinde başkaca bir uyarıya gerek kalmadan

protokol gereğince yapılan ödemeler her zaman durdurulabilir. Başka talepler saklı kalmak üzere verilmiş araç, gereç ve donanım derhal geri alınır ve Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından gerekli görüldüğü takdirde, proje başka bir araştırmacıya veya araştırma grubuna verilebilir. Projenin bu yolla sonuçlanması ile sağlanacak yararlardan proje ile ilişkisi kesilenler hiçbir hak talep edemezler.

Projenin durdurulması veya yönetmelik ve yasal gereklerin yerine getirilmeden bırakılması halinde, proje yöneticisi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından proje kapsamında yapılan yolluk, hizmet alımı ve tüketim malzemesi harcamalarını, uygulamada bulunan yasal faizi ile birlikte Bilimsel Araştırma Projelerine geri ödemekle yükümlüdür. Bu durumda desteklenen proje iptal edilmiş ve protokol feshedilmiş sayılacaktır.

YÜRÜRLÜK SÜRESİ

14. Bu protokol 07.04.2011 tarihinden 06.04.2013 tarihine kadar yürürlüktedir.

PROTOKOL SÜRESİNİN UZATILMASI

15. Protokol süresinin uzatılması; proje yöneticisi tarafından protokol süresinin bitimi tarihinden en az 1 (bir) ay önce ilgili Uzmanlar Grubu'na teklif edilmesi ve Uzmanlar Grubu'ndan alınacak olumlu görüşün Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu'nca uygun görülmesine bağlıdır.

Ek süre 1 (bir) yılı, ek ödenek ise proje toplamı bütçesinin % 50'sini geçemez.

YETKİLİ MERCİ

16. Anlaşmazlık halinde yetkili merci, Ankara Mahkemeleri ve İcra Daireleridir.



GAZİ ÜNİVERSİTESİ

Adına

Prof. Dr. Metin AKTAŞ
Rektör Yardımcısı



PROJE YÖNETİCİSİ

PROF.DR. FERDA EMRİYE PERÇİN

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Derya Kan Karaer

Doğum Tarihi : 26/02/1977

Doğum Yeri : Bilecik

Medeni hali : Evli, bir çocuk annesi

Yabancı Dili : İngilizce

Adres : Gazi Üniversitesi
Tıp Fakültesi, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı
06500 Beşevler / ANKARA

Telefon (iş) : (312) 202 69 44

E-mail : kan_derya@yahoo.com

EĞİTİM

Yıl : 2001-2004

Kurum : Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bölüm : Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD (Yüksek Lisans)

Yıl : 1994-1998

Kurum : Uludağ Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi

Bölüm : Biyoloji Bölümü

İŞ TECRÜBESİ

2004- Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik ABD

2001-2004 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik ABD

2000 Başkent Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı

A- YAYINLAR

a) ULUSAL YAYINLAR

- 1- Ergün MA, Konac E, **Kan D**: Sitogenetik olarak 450 hastanın değerlendirilmesi. Kadın Doğum Dergisi, 1(1424). 2002

b) ULUSLARARASI YAYINLAR

- 1- Ergün MA, Balcı S, Konaç E, **Kan D**, Menevşe S, Bartsch O.: Trisomy of 8q22.3~q23-qter following an unbalanced 1;8 translocation in a boy with multiple anomalies. *The Turkish Journal of Pediatrics*. 2003
- 2- Engin, A.B., M.A. Ergün, E. Yurtcu, **D. Kan** ve G. Şahin, "Effect of Ionizing Radiation on Pteridine Pathway and Evaluation of its Cytotoxicity in Exposed Hospital Staff", *Mutat. Res.Gen. Tox. En.*, (2005).
- 3- Bartsch O, Ergun MA, Balci S, **Kan D**, Eggermann T, Kotzot D. Two complementary recombinant chromosomes 5 in a healthy woman. *Cytogenet Genome Res*. 2006;114(2):178-82.
- 4- Yirmibeş Karaoğuz M., Biri A., Pala E., **Kan D**., Poyraz A., Kurdoğlu M., Percin E.F.: A case with mosaic partial duplication of 1q: prenatal and postmortem clinical and cytogenetic evaluations. **Genetic Counseling** 2006; 17(2): 47-54.
- 5- Koç A., **Kan D**., Karaer K., Ergün M.A., Karaoğuz M, Gücüyener K., Hinreiner S.,Liar B., Perçin E.F.: An unexpected finding in a child with neurological problems: Mosaic ring chromosome 18. **European Journal of Pediatrics** Eur J Pediatr. 2007 Aug 1; [Epub ahead of print].
- 6- Koç A., Karaoğuz M., Pala E., **Kan D**., Karaer K., Gücüyener K., Perçin E.F. : A boy with small supernumerary marker chromosome X identified by FISH. **Genetic Counseling**, 18 (4): 393-399, 2007.
- 7- Karaoguz MY, Pala E, Kula S, Karaer K, **Kan D**, Nas T, Tunaoglu S. Transposition of great arteries in an infant born after prenatal diagnosis of trisomy 20 mosaicism. **Genet Couns.** 2007;18(4):437-43.
- 8- Koç A., Karaer K., Ergün MA., Karaoğuz MY., **Kan D**., Cansu A., Perçin F. : A case with a ring chromosome 22. **The Turkish Journal of Pediatrics**, 50: 193-196, 2008.
- 9- Alp E,Menevse S, Tulmac M, **Kan D**, Yalcin R, Erkan AF, Cengel A.Lack of association between matrix metalloproteinase-9 and endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms and coronary artery disease in Turkish population. **DNA Cell Biol.** 2009 Jul;28(7):343-50.
- 10- Yıldırım B, Tuncer C, **Kan D**, Tunc B, Demirag MD, Ferda Percin E, Haznedaroglu S, Alagozlu H. MEFV gene mutations and its impact on the clinical course in ulcerative colitis patients. **Rheumatol Int.** 2011 Jul;31(7):859-64. Epub 2010 Mar 12.

B- BİLDİRİLER

a) ULUSAL BİLDİRİLER

1- **Kan D**, Erkan A, Çengel A, Ergün MA, Menevşe S: Türk toplumundaki akut miyokard infarktüsülü hastatalarda İnterlökin-6 geninin -174G>C ve -572G>C polimorfizmlerinin araştırılması, 8. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 14-17 Ekim 2003, Adana. (Poster sunusu).

2- Ergün MA, Şahin Fİ, Tan E, Mercanoğlu E, **Kan D**, Menevşe A: Kromozomal anomalilerde atomik kuvvet mikroskobunun standart yöntemlere katkısı, 7. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 18-21 Eylül 2001, Eskişehir. (Poster sunusu).

3- Ergün MA, Konaç E, **Kan D**, Menevşe S: Sitogenetik olarak 450 hastanın değerlendirilmesi. 5. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi, 9-12 Ekim 2002, Konya. (Poster sunusu).

4- Pala, E., Yirmibeş Karaoğuz M, Ergün MA, **Kan D**, Asyalı Biri A: Amniyotik mayi renginin, kültür süresi ve anomali oranına etkisi: bir sitogenetik tanı laboratuvarının 10 yıllık deneyimi, Fetal Tıp; Prenatal Tanı 2005 Kongresi, Antalya, Türkiye, 30 Nisan- 2 Mayıs 2005 (Sözlü sunum).

5-Yirmibeş Karaoğuz M, Ergün MA, Pala E, **Kan D**, Asyalı Biri A, Menevşe S: Frequencies of chromosomal abnormalities at amniocentesis: 10 years experience of cytogenetic analyses in one laboratory. Fetal Tıp; Prenatal Tanı 2005 Kongresi, Antalya, Türkiye, 30 Nisan- 2 Mayıs 2005 (Poster sunusu).

6- Ergün M.A., Perçin F., Biri A., **Kan D**, Kurtoğlu M.: Investigation of factor V Leiden and Protrombin G20210A mutations in a mother and her ex-fetus. Fetal Tıp Prenatal Tanı 2005, 30 Nisan- 2 Mayıs 2005, Antalya, s 80.

7-Yirmibeş Karaoğuz M, Perçin EF, Asyalı Biri A, Pala E, **Kan D**, Poyraz A, Kurdoğlu M: A case with mosaic partial duplication of long arm of chromosome 1: prenatal and postmortem clinical and cytogenetic evaluation. Fetal Tıp; Prenatal Tanı 2005 Kongresi, Antalya, Türkiye, 30 Nisan- 2 Mayıs 2005 (Poster sunusu).

8- Meral Yirmibeş Karaoğuz, Elif Pala, **Derya Kan**, Aydan Biri, Ahmet Turp, **E Ferda Perçin**: 46/47,+mar.ish.der(15)(q11)[15Z1+,D15S10(PW/AS)-]: Prenatal ve Postnatal Tanı: Olgu Sunumu. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 134 (Poster sunusu).

9- Altuğ Koç, Meral Yirmibeş Karaoğuz, Elif Pala, **Derya Kan**, Kadri Karaer, Kıvılcım Gücüyener, **Ferda E. Perçin**: Markır Kromozom X Olgusu: Olgu Sunumu. VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 151 (Poster sunusu).

10- Altuğ Koç , Kadri Karaer, Mehmet Ali Ergün, Meral Yirmibeş Karaoğuz, **Derya Kan**, Ali Cansu, Ferda E. Perçin: Halka (Ring) Kromozom 22 Sendromu: VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 157 (Poster sunusu).

11- Derya Kan, Lütfi Tunç, Bülent Tıraş, Meral Yirmibeş Karaoğuz, E. Ferda Perçin :Azospermik Ve Oligospermik İnfertil Erkek Hastalarda Y Kromozom Mikrodelesyonunun Multipleks Polimeraz Zincir Tepkimesi (Pcr) Yöntemi İle Belirlenmesi: VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006.Kongre Bildiri Kitabı, s: 109 (Poster sunusu).

12- M.A. Ergün, O. Bartsch, S. Balcı, D.Kan, T. Eggermann, D. Kotzot: Tekrarlayan Düşük Nedeniyle Başvuran Fenotipik Olarak Normal Bir Kadında Saptanan İki Adet Rekombinant 5.Kromozom: VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006. Kongre Bildiri Kitabı, s: 104 (Poster sunusu).

13- D.Kan, B. Çolak, M.A. Ergün, T. Karakan. A. Görgül: İnterlökin6 (IL-6) gen -174G>C ve -572G>C Gen Polimorfizmlerinin, Akut Pankreatitli Hastalarda Prognoz Üzerindeki Etkisinin Araştırılması: VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006. Kongre Bildiri Kitabı, s: 110 (Poster sunusu).

14- E.Almayanlar, M.Tulmaç, D.Kan, A.Çengel, R. Yalçın, S. Menevşe: Türk Popülasyonunda Endotelyal Nitrik oksit Sentetaz Genindeki Başlıca Polimorfizmlerin Koroner Arter Hastalığıyla İlişkisi: VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006. Kongre Bildiri Kitabı, s: 114 (Poster sunusu).

15- M. Yirmibeş Karaoğuz, D.Kan, T.Nas: Prenatal Tanıda Mozaik Trizomi 20 Olgusu: VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006. Kongre Bildiri Kitabı, s: 131 (Poster sunusu).

16- E.Pala, M.Yirmibeş Karaoğuz, D.Kan, K.Karaer, A.Erdem: Spontan Abortusta Triploidi İle Birlikte Seyreden İki Ayrı Anöploidinin Oluşum Mekanizmaları: VII. Ulusal Prenatal Tanı ve Tıbbi Genetik Kongresi Kayseri-17-20 Mayıs 2006. Kongre Bildiri Kitabı, s: 71 (Sözlü sunum).

ULUSLARARASI BİLDİRİLER (Uluslar Arası Toplantılarda Sunulan Bildiriler)

1- Cengel A, Erkan AF, Ergun MA, Kan D, Menevse S, Relation of the -174 G/C and -572 G/C promoter polymorphisms of the interleukin-6 gene to interleukin-6 and highly sensitive C-reactive protein serum levels and to the extent of infarction in acute myocardial infarction, Journal of The American College of Cardiology, 43 (5): 296A-296A Suppl. A MAR 3 2004

2-Ozbey G., Yucel B., Kan D., Erdogan S., Eren N., Perçin F., Yuksel N., Uluoglu C.: Gastrointestinal side effects of citalopram related with MDR1 gene G2677T polymorphism. 8th congress of European Association for Clinical Pharmacology and Therapeutics 2007. August 29- September 1, Amsterdam, The Netherlands. BCPT, Vol. 101, Supp.1,p 88.

3- Yirmibes Karaoguz M, E. Percin EF, Pala E, Biri A, ***Kan D***, Koc A, Korucuoglu U, Ergun MA.: 46,XX karyotypes of abortion materials; due to pregnancy losses or maternal cell contamination? 6th European Cytogenetic Conference, July 7-10, İstanbul 2007 (32-P)

4- Ergun MA, Koc A, ***Kan D***, Karaer K, Gucuyener K, Percin EF.:A girl with a mosaic ring chromosome 18.6th European Cytogenetic Conference, July 7-10, İstanbul 2007 (97-P)

C- KATILDIĞI KONGRELER

1- 7. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 18-21 Eylül 2001, Eskişehir

2- 8. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 14-17 Ekim 2003, Adana

D-YÜKSEK LİSANS TEZ

“Akut Miyokard İnfarktüsü Hastalarının, İnterlökin-6 (IL-6) Gen -174 G>C ve -572 G>C Polimorfizmlerinin Araştırılması.”