

**GLUKOZ-6-FOSFAT DEHİDROGENAZ
EKSİKLİĞİNİN MOLEKÜLER PATOLOJİSİNİN
DNA DİZİ ANALİZİ İLE SAPTANMASI**

**THE DETECTION OF MOLECULAR PATHOLOGY
OF GLUCOSE-6-PHOSPHATE DEHYDROGENASE
DEFICIENCY WITH DNA SEQUENCE
ANALYSIS**

97915

CEREN ACAR

Hacettepe Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin
Biyoloji Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

2000



Sevgili anneme ve babama...

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'nda BİLİM UZMANLIĞI TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan

.....
Prof. Dr. Ay ÖĞÜŞ

Üye (Danışman)

.....
Prof. Dr. Reyhan ÖNER

Üye

.....
Doç. Dr. Fatma GÜMRÜK

ONAY

Bu tez; .../.../2000 tarihinde, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen, yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

...../...../2000

.....

Prof. Dr. Seyfi KULAKSIZ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

ÖZET

Kalıtsal Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G₆PD; EC 1.1.1.49) eksikliği en yaygın eritrosit enzim bozukluklarından biridir ve dünyada 400 milyondan fazla insanı etkilemektedir.

G₆PD enzimi pentoz fosfat metabolik yolunun ilk basamağını katalizleyen ve kontrol noktasını oluşturan enzimdir. Bu enzimin ana görevi özellikle eritrositlerde indirgenmiş halde glutatyon sağlamak için gerekli olan antioksidan NADPH üretmektir.

G₆PD geni insanda X kromozomu üzerinde yerleşim gösteren (Xq28) 13 ekson ve 12 introndan oluşur. Çok sayıda varyantının bulunması sıklıkla karşılaşılan genetik bozukluklara yol açmaktadır. Varyantların her biri çeşitli şiddetlerdeki enzim eksikliğine neden olmaktadır. Gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda hücrelerde NADPH eksikliği baş göstermektedir. Bu durum NADPH bağımlı glutatyon redüktaz enziminin görevini yapmasını engelleyerek hücrelerde iç ve dış kaynaklı oksidan maddelerin birikimine neden olmaktadır. Böyle bireylerde G₆PD eksikliğinin en önemli belirtisi olan hemolitik anemi görülmektedir. Hemoliz; ilaç kullanımı, bakla yenmesi, enfeksiyon gibi çok çeşitli nedenlerden kaynaklanabilir.

G₆PD eksikliği ile ilgili çalışmalar 1950'li yıllarda enzim düzeyinde başlamıştır. Son yıllarda ise enzimi etkileyen mutasyonlar DNA düzeyinde araştırılmaya başlanmıştır. Günümüzde G₆PD genindeki mutasyonları araştırmak için PCR, Restriksiyon Fragment Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) Analizi, DNA Dizi Analizi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Sunulan bu çalışmada G₆PD genindeki mutasyonların saptanması için DNA dizi analizi yöntemi uygulanmıştır. G₆PD eksikliğine neden olan mutasyonları PCR'a dayalı enzim kesimi ile saptamak mümkündür. Ancak 13 tane eksonu olan G₆PD geninde, pek çok mutasyonun saptanabilmesi için DNA dizi analizi yapılması gerekmektedir. Laboratuvarımızda 59 aileden 98 birey üzerinde çalışılmış ve enzim kesimi ile 79 bireyde Akdeniz mutasyonu bulunmuş ve 5 bireyin de A⁺ olduğu saptanmıştır. Enzim kesimi ile mutasyonu bulunamayan bireyler bu tez çalışmasının konusunu oluşturmuştur. Dizi analizi tekniğinin oturtulabilmesi için ilk olarak mutasyonu bilinen bireylere ait DNA'larla, DNA dizi analizine başlanmıştır. Ekson 6'da bulunan Akdeniz tipi 563 C→T mutasyonu, ekson 5'te bulunan polimorfik 376 A→G dönüşümü DNA dizi analizi ile gösterilmiştir. Daha sonra mutasyonu bulunamayan 14 bireyin dizi analizleri mutasyonların en yoğun olduğu eksonlardan başlanarak yapılmıştır. Ekson 5'te bulunan polimorfik 376 A→G dönüşümü ile link olduğu düşünülen ekson 4'te bulunan 202 G→A mutasyonu dizi analizi ile gösterilmiştir. Ayrıca iki hastada ekson 9'da bulunan Chatam 1003 G→A mutasyonu da DNA dizi analizi ile gösterilmiştir.

ABSTRACT

Hereditary Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G₆PD; EC 1.1.1.49) deficiency is one of the most common erythrocyte enzyme defects with more than 400 millions of people affected worldwide.


G₆PD is the enzyme which catalyzes the first step of the pentose phosphate pathway and this step is the control point of that pathway. The main function of G₆PD, particularly in erythrocytes, is to produce potent antioxidant NADPH which is essential for maintaining glutathion in the reduced form.

The gene for G₆PD is localized on the X chromosome (Xq28) and it has 13 exons and 12 introns. It has many variants which causes enzyme deficiency with different severity. Due to the mutations in the G₆PD gene NADPH deficiency is seen in the cells. As a result, NADPH dependent glutathion reductase enzyme is blocked and oxidant substances accumulate in the cells. Hemolytic anemia, the most important symptom of G₆PD deficiency, is seen in the G₆PD deficient individuals. Hemolysis is originated from various reasons like ; using drugs, infections or eating fava beans.

The studies about G₆PD deficiency was started in 1950s in the protein level. But in recent years the mutations that affects the enzyme activity is studied on DNA level. The techniques such as Polymerase Chain Reaction (PCR), Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), DNA Sequence Analysis are being used to detect the mutaions in G₆PD gene.

In the presented study DNA sequence analysis technique is used in order to detect the mutations that are found in the G₆PD gene. It is possible to detect the common mutations with PCR based enzyme cleavage of DNA. But G₆PD gene is a large gene with 13 exons. So it is necessary to use DNA sequence analysis. In our laboratory 98 individuals from 59 families were studied and in 79 patients Mediterranean type mutation was found and 5 patients were found to be A⁺ with PCR based RFLP analysis. The 14 patients whose mutations could not be detected by this technique are the subject of this study. In order to optimize DNA Sequence Analysis technique we used the patients whose mutations were known. Mediterranean type 563 C→T mutation and polymorphic 376 A→G conversion are shown with DNA sequence analysis. The sequence analysis of the 14 patients, whose mutations are not known, was started from the exons in which the mutation frequency is high. The 202 G→A mutation which is thought to be linked with polymorphic 376 A→G conversion is shown with DNA sequence analysis. Also Chatam 1003 G→A mutation is detected in two of our patients.

**BU TEZ ÇALIŞMASININ TAMAMI TÜBİTAK SBAG 1807 VE
DPT 98K121680 NOLU PROJELER TARAFINDAN
DESTEKLENMİŞTİR.**



TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması süresince bana bilgi ve tecrübeleri ile yol gösteren ve yardımcı olan danışman hocam Prof.Dr. Sayın Reyhan ÖNER ve Prof. Dr. Sayın Cihan ÖNER'e ,

Tez çalışması süresince materyallerin toplanmasını ve maddi desteği sağlayan Hacettepe Üniversitesi Pediatrik Hematoloji A.B.D. Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sayın Çiğdem ALTAY'a, Prof.Dr. Sayın Aytemiz GÜRGEY'e ve Doç.Dr. Sayın Fatma GÜMRÜK'e ,

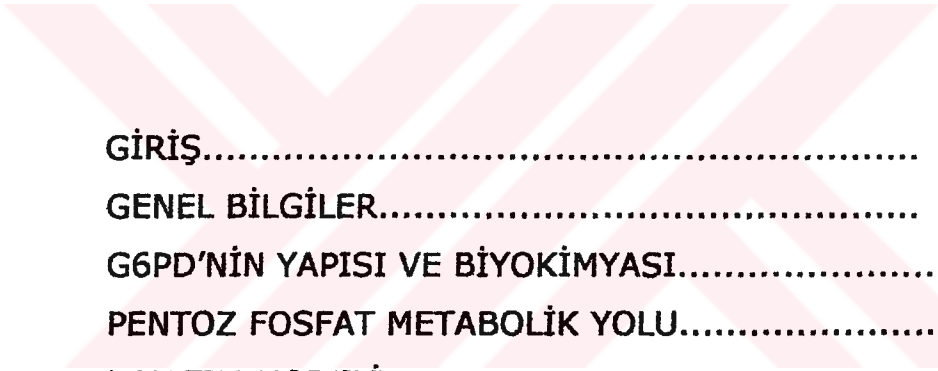
Deneysel çalışmalarım sırasında bana destek olan Arş. Grv. Sayın Hatice MERGEN, Arş. Grv. Sayın Esra BİR BEN, Arş. Grv. Sayın Mert SÖZEN ve Bilim Uzmanlığı Öğrencisi Çağatay KARAASLAN'a,

Tez çalışmam süresince bana maddi destek sağlayan TÜBİTAK Bilim Adamı Yetiştirme Grubuna,

Bu tez çalışmasına birlikte başladığım, sevgili dönem arkadaşım Yeşim DOĞAN'a,

Bana her konuda, her zaman destek olan sevgili anne ve babama en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
	
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 G6PD'NİN YAPISI VE BİYOKİMYASI.....	3
2.2 PENTOZ FOSFAT METABOLİK YOLU.....	5
2.3 KALITIM MODELİ.....	9
2.4 HEMOLİZ MEKANİZMASI.....	11
2.5 G6PD EKSİKLİĞİNİN KLİNİĞİ.....	14
2.5.1. Akut Hemolitik Anemi.....	14
2.5.2. Neonatal Sarılık.....	16
2.5.3. Kongenital Sferositik Olmayan Hemolitik Anemi.....	17
2.5.4. Favizm.....	18
2.5.5. Neonatal İkterus.....	19
2.5.6. G6PD ve Malarya.....	19
2.6 ERİTROSİTLER DIŞINDA DİĞER HÜCRELERE ETKİSİ..	20
2.7 G6PD VARYANTLARI.....	21
2.8 G6PD EKSİKLİĞİ.....	29

	<u>Sayfa</u>
2.8.1	Moleküler Biyolojisi..... 30
2.9	COĞRAFİ DAĞILIMI VE SIKLIĞI..... 33
3.	MATERYAL VE METOT..... 34
3.1	Örneklerin Toplandığı Gruplar..... 34
3.2	Kandan Genomik DNA İzolasyonu..... 34
3.3	Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle G6PD Eksonlarının Çoğaltılması..... 35
3.4	DNA Dizi Analizi ile G6PD Genindeki Mutasyonların Saptanması..... 38
3.4.1	Tek Zincirli DNA'dan Dizi Analizi..... 39
3.4.2	Çift Zincirli Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizi..... 41
3.5	Dizi Analizi Reaksiyonu..... 43
3.6	Sekans Jelinin Hazırlanması..... 44
3.7	DNA Dizi Analizi Elektroforezi..... 45
3.8	Otoradyografi..... 45
4.	BULGULAR..... 48
5.	TARTIŞMA..... 62
6.	KAYNAKLAR..... 69

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	adenin
AHA	Akut Hemolitik Anemi
C	sitozin
CNSHA	kronik nonspherocytic hemolytic anemia
ddNTP	diddeoksinükleotittrifosfat
dNTP	deoksinükleotittrifosfat
EDTA	etilen diamin tetra asetik asit
G	guanin
G6P	glukoz-6-fosfat
G6PD	Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
GR	Glutasyon redüktaz
GSH	Redükte glutasyon
GSHPX	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside glutasyon
Kb	kilobaz
Lys	lizin
Med	Mediterranean mutasyonu
NADP	nikotinamidadenin dinükleotit fosfat
NNJ	neonatal jaundice
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriksiyon Fragment Length Polymorphism
SAP	Shrimp alkalin fosfat
SDS	sodyum dodesil sülfat
T	timin
TBE	tris-borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
UTR	UntranSlated Region

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Pentoz fosfat yolu.....	7
2.2 G6PD ve Glutasyon Döngüsü.....	13
3.1 Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	46
4.1 Ekson 6'daki Akdeniz tipi mutasyonun dizi analizi ile gösterilmesi.....	50
4.2 Ekson 5'teki 376 A→G polimorfizminin dizi analizi ile gösterilmesi.....	51
4.3 Ekson 9'daki Chatam mutasyonunun dizi analizi ile gösterilmesi.....	52
4.4 G6PD genine ait primerlerin ve dizi analizi uygulanan bölgelerin dizisi.....	53
4.5 Hastalarımızdan K.B.'ye ait DNA dizi analizi uygulanmış bölgelerin dizisi.....	55
4.6 Hastalarımızdan Y.T'ye ait DNA dizi analizi uygulanmış bölgelerin dizisi.....	57
4.7 Ekson 4'teki 202 G→A mutasyonunun bulunduğu bölgenin dizi analizi ile gösterilmesi.....	59
4.8 Ekson 8'i normal olan bireye ait dizi analizi.....	60
4.9 Ekson 9'unda mutasyon bulunamamış bireye ait dizi analizi.....	61

TABLolar DİZİNİ

<u>Tablo</u>	<u>Sayfa</u>
2.1 Hemolitik anemiye neden olan ilaç ve kimyasallar....	15
2.2 Varyant tablosu.....	23
4.1 Çalışılan bireylerde bulunan mutasyonlar.....	49



1.GİRİŞ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G_6PD ; EC 1.1.1.49) enzimi, pentoz fosfat yolunun ilk basamağını katalizleyen ve kontrol noktasını oluşturan enzimdir. G_6PD 'nin ana fonksiyonu özellikle eritrositlerde indirgenmiş halde glutatyon sağlamak için gerekli olan antioksidan NADPH üretmektir.

Kalıtımsal G_6PD eksikliği dünyada 400 milyondan fazla insanı etkileyen en yaygın genetik bozukluklardan bir tanesidir. G_6PD eksikliğine anormal özelliklere sahip enzim varyantlarının üretilmesi neden olur. Varyantların her biri çeşitli şiddetlerdeki enzim eksikliğine neden olmaktadır. G_6PD varyantları; elektroforezde aldıkları yol, optimum pH değerleri, K_m değerleri, substrat analoglarını kullanma yetenekleri, sıcaklığa karşı dayanıklılıkları göz önünde bulundurularak normal enzimle karşılaştırılarak saptanabilirler. Günümüzde bu varyantlar genetik analizler yardımıyla saptanmaktadır.

G_6PD geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan G_6PD eksikliği NADPH eksikliğine yol açmaktadır. Eritrositler NADPH'ı pentoz fosfat metabolik yolundan sağlamaktadırlar. G_6PD eksikliğinde NADPH bağımlı glutatyon redüktaz (GR) okside glutatyonu (GSSG) indirgeyemediği için hücrede NADPH ve redükte glutatyon (GSH) miktarı azalır. Dolayısıyla hücrede dış ve iç kaynaklı oksidan maddeler hasara neden olurlar, Heinz cisimcikleri oluşumu hemolizle sonuçlanır ve böyle bireylerde anemi gözlenir.

Hemolitik anemi G_6PD eksikliğinin en önemli belirtisidir. Hemoliz, ilaç alımı, bakla yenmesi veya enfeksiyona bağlı olarak artış gösterebilir. Bunların yanısıra yüksek dozda C vitamini alınması ve

orak hücreli aneminin bulunmasına bağlı olarak da hemolizin oluşumu kolaylaştırır.

G₆PD eksikliği ilk olarak 1950'li yıllarda bulunmuştur. Bulunduktan sonraki ilk on yıl içinde bu eksikliğe ait klinik bilgiler toplanmaya başlanmıştır. İkinci on yıl içerisinde enzimin biyokimyasal varyantları arasındaki farklılıklar enzim konusunda ilgi odağını oluşturmuştur. Son zamanlarda ise enzimi etkileyen mutasyonlar DNA düzeyinde anlaşılmaya çalışılmaktadır. G₆PD mutasyonları üzerinde yapılan çalışmalar yapı-fonksiyon ilişkisini anlamamıza da yardımcı olmaktadır. Günümüzde gelişen teknikler sayesinde gen ürününün elektroforetik varyasyonuna bakılmaksızın varyantların tesbit edilmesi mümkün hale gelmiştir. Bugün, G₆PD geninde meydana gelmiş olan mutasyonları saptamak için RFLP analizi (Restriction Fragment Length Polymorphism), DNA dizi analizi gibi teknikler kullanılmaktadır.

G₆PD eksikliği dünyada ve ülkemizde en sık rastlanılan eritrosit enzim eksikliğidir. Pek çok ülke kendi toplumundaki G₆PD enzim eksikliğinin moleküler temelini saptamıştır. Tüm dünyada DNA dizi analizi ile G₆PD genine ait 122'den fazla moleküler defekt saptanmıştır. (Vulliamy ve ark. 1997)

Bu tez çalışması da ülkemizde yaygın olan Mediterranean (Med) mutasyonunun dışında kalan G₆PD genindeki moleküler defektlerin profilinin çıkarılmasını ve bu mutasyonların saptanması için DNA dizi analizi tekniğinin geliştirilmesini amaçlamaktadır. Hasta bireylerden ve ailelerinden elde edilen DNA örnekleri PCR yöntemi ile çoğaltılmış ve DNA dizi analizi uygulanarak mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 G₆PD'NİN YAPISI VE BİYOKİMYASI

G₆PD, mayalardan, protozoaya, bitkilerden, hayvanlara kadar tüm organizmalarda bulunan evrimsel bakımdan eski bir enzimdir. Memelilerde G₆PD bazı istisnalar dışında sitoplazmik bir enzimdir. Bazı durumlarda böbrek ve karaciğer hücrelerindeki peroksizomlarla bağlantılı G₆PD aktivitesi de görülmektedir. Bu organellerin erken ökaryotlarda oksijene karşı savunma mekanizması olarak evrimleştiği düşünülmektedir, bugün bu görev G₆PD'ye aittir.

G₆PD'nin enzimatik olarak aktif formu yaklaşık 59 kd ağırlığındaki tek bir polipeptit altünitesinden oluşan bir dimer veya bir tetramerdir. Amino asit dizisi sıçan karaciğer G₆PD'si ile %94 homoloji göstermektedir. Enzim 515 amino asitten oluşmaktadır. G₆PD'nin dimer, tetramer ve hekzamer formunda bulunmasını pH, ortamın Mg⁺² iyonu derişimi, protein derişimi ve iyonik kuvvet etkilemektedir.

Çeşitli türlerden saflaştırılan G₆PD enzimlerinin amino asit bileşimleri incelendiğinde aspartik asit ve glutamik asit toplamının lizin, arjinin ve histidin toplamından daha fazla olduğu bulunmuştur. Bu da izoelektrik noktasının düşük olduğunu göstermektedir.

G₆PD'nin optimum pH'sı senil kataraktlı, diabetik kataraktlı hastalardan ve normal insan lensinden saflaştırılan enzim için, insan eritositi, sıçan karaciğeri koyun lensi ve kobay lensinden elde

edilen enzim için 8 olarak bulunmuştur. Fakat yine bu değer çeşitli türlerde 7 ile 9 arasında farklılık göstermektedir ve ortamın $MgCl_2$ konsantrasyonu bu değer üzerinde etkili olmaktadır.

G_6PD 'nin doğal substratı G_6P 'dir. Enzimin substrat özgüllüğü çok yüksektir. Diğer heksoz fosfatlarla olan aktivitesi ihmal edilebilir. Aynı durum koenzim özgüllüğü için de söz konusudur. Buna karşılık desamino-NADP ve 2-deoksi glukoz 6 fosfat gibi substrat analogları üzerinde belirgin aktivite göstermektedir. (Ulus ve ark. 1997)

Enzimin G_6P bağlanma bölgesinin Lys^{205} yanında olduğu düşünülmektedir, çünkü bu rezidü pridoksal 5- fosfat ile etiketlenebilmektedir ve bu reaksiyon G_6P ile önlenmektedir. Dahası *E. coli*'de üretilmiş rekombinant insan G_6PD 'si ile yapılan çalışmalar Lys^{205} 'nin G_6P bağlanmasından çok elektron transferi için gerekli olduğunu göstermiştir. (Nathan ve Orkin, 1998)

NADP bağlama bölgesi hala kesin olarak belirlenememiştir. İnsan G_6PD dimeri modeli bir mikroorganizma olan *Leuconostoc mesenteroides*'in saptanmış olan kristal yapısı temel alınarak oluşturulmuştur. Bu analiz sonucu NADP bağlama bölgesi ekson 3'te bulunan 38-43.amino asitlere karşılık gelen kritik G-X-X-G-X-X peptid motifinin bulunduğu β tabakalı yapının olduğu bölgeye yerleştirilmiştir. (Nathan ve Orkin, 1998)

G_6PD pentoz fosfat ve diğer metabolik yolların denetlenmesinde büyük role sahiptir ve aktivitesi fizyolojik koşullar ile düzenlenmektedir. NADPH enzimi kompetitif olarak inhibe etmektedir, $NADP^+$ 'nin bağlanmasını engellemektedir, G_6P 'nin bağlanmasını ise nonkompetitif olarak engellemektedir.

ATP de diğ er bir G₆PD inhibitörüdür. L. mesenteroides'ten elde edilen enzim ile yapılan çalışmalar bu inhibisyonun fizyolojik Mg⁺² derişiminde geri çevrildiğini göstermiştir. Enzim aynı zamanda Asetil Co-A ve Koenzim A ile de inhibe olmaktadır. 17- ve 20-ketosteroidler de enzime NADP⁺ ve G₆P bağlanmasını unkompetitif olarak inhibe etmektedir. (Ulusı ve ark.,1997)

Normal G₆PD (G6PD B) aktivitesinin yarı ömrü 60 gün kadardır. G₆PD A⁻ aktivitesindeki düşüş ise daha hızlıdır (13 gün) ve G₆PD Mediterranean 'ın yarı ömrü saatlerle ölçülecek kadar kısadır. G₆PD A⁻ gibi G₆PD eksikliğinin yaygın türlerinde kırmızı hücrelerin hayatta kalış süreleri erken yaşlanma ile kısaltılmıştır ve membran yapısı farkedilebilir bir şekilde bozulmuştur. G₆PD eksikliğinin bir çok formu kırmızı hücreler enfeksiyon veya oksidasyon gibi stres koşulları ile karşılaşmadıkları sürece zararsız bozukluklar olarak görölmektedir. (J. H. Jandl, 1987)

2.2 PENTOZ FOSFAT METABOLİK YOLU

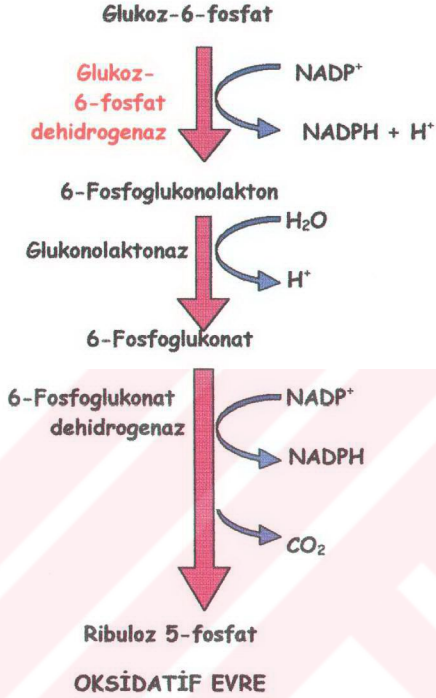
Pentoz fosfat yolu fosfoglukonat yolu veya heksoz mono fosfat yolu olarak da bilinmektedir. Bu yolun asıl amacı enerji elde etmek değildir. Buna karşılık 4 ana aktiviteyi yürütmek üzere özelleşmiş çok fonksiyonlu bir yoldur. Ana amacı birçok hücrede sitoplazmada NADPH şeklinde indirgeyici güç üretmektir. Bir piridin nükleotit koenzim olan NADPH redükleyici biyosentezde kullanılır. İkinci fonksiyonu heksozları pentozlara özellikle nükleik asit sentezinde gerekli D-riboz 5-fosfat'a dönüştürmektir. Riboz-5-fosfat DNA ve RNA'ya ve bazı koenzimlerin yapısına katılan ribonükleotit ve türevlerinin biyosentezinde kullanılır. Üçüncü fonksiyonu glikolitik yola girebilecek şekilde pentozları oksidatif degradasyon ile

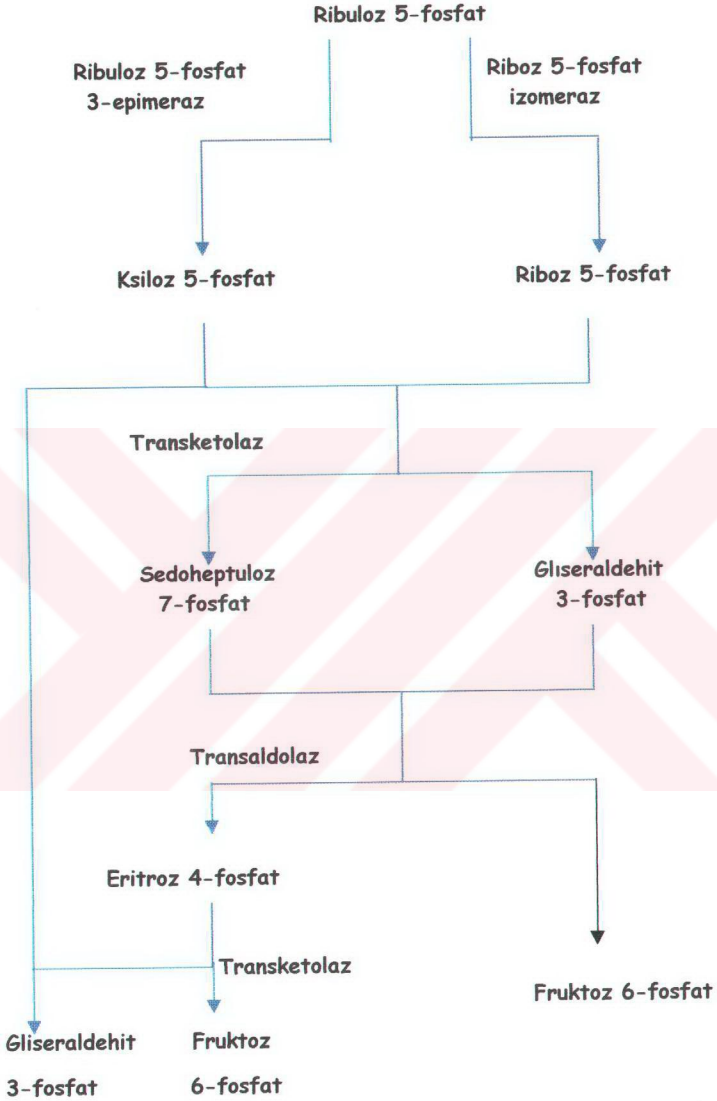
heksozlara dönüştürmektir. Son olarak da fotosentezin karanlık reaksiyonlarında CO₂'ten glukoz oluşumunda görev almak üzere fosfoglukonat yolu modifiye olur. Pentoz fosfat metabolik yolu hücre sitoplazmasındaki enzimler tarafından gerçekleştirilmektedir. Bu yolda bulunan reaksiyonları katalizleyen tüm enzimler sitozolde yer almaktadırlar.

Bu yolda kullanılan enzimlerin hepsi B.L. Horecker ve E. Racker ve ark. tarafından çalışılmıştır. G₆PD bu yolun ilk enzimidir ve glukoz 6-fosfattan 6-fosfoglukonat oluşumundan sorumludur. G₆PD aynı zamanda "Zwischenferment" olarak da bilinmektedir. (Horton ve ark. , 1996)

Pentoz fosfat yolu oksidatif evre ve oksidatif olmayan evre olmak üzere ikiye ayrılabilir. Oksidatif evrede glukoz-6 fosfat 5 karbonlu bileşik ribuloz-5-fosfata dönüşürken NADPH oluşur. Eğer az miktarda NADPH ve nükleotide ihtiyaç varsa ribuloz-5-fosfatın hepsi riboz-5-fosfata izomerize olur ve yol bu evrede sonlanır. Genellikle NADPH'a riboz-5-fosfattan daha fazla ihtiyaç duyulur ve pentoz fosfatların çoğu glikolitik ana ürünlere dönüştürülür.

Pentoz fosfat yolunun oksidatif olmayan evresi oksidatif evrede oluşmuş pentoz fosfatı kullanır. Oksidatif olmayan evrede ribuloz-5-fosfat glikolitik ara ürünler olan fruktoz-6-fosfat ve gliseraldehit 3 fosfata dönüştürülür.

Şekil 2.1.Pentoz-fosfat yolu



3 Ribuloz 5-fosfat \Rightarrow 2 Fruktoz 6-fosfat + Gliseraldehit 3-fosfat

oksidatif evrenin ilk basamağı G₆PD tarafından katalizlenir. Bu basamak tüm pentoz fosfat yolunun ana düzenleyici bölümüdür. G₆PD, NADPH tarafından allosterik olarak inhibe edilir. Bu basit düzenleme özelliği pentoz fosfat yolu tarafından NADPH üretiminin kendini sınırlayıcı olmasını sağlar.

Pentoz fosfat yolunun oksidatif evresinde yola giren her glukoz molekülüne karşılık iki molekül NADPH üretilir.

Oksidatif olmayan evre ise biyosentez için 5 karbonlu şeker sağlamakla görevlidir ve glikoliz ve glioneogenez'e şeker fosfat sunumundan sorumludur.

3 glukoz 6-fosfat + 6NADP⁺ + 3H₂O \Rightarrow 2 fruktoz 6-fosfat + gliseraldehit 3-fosfat + 6NADPH + 3 CO₂ + 6 H⁺

Birçok hücrede gliseraldehit 3-fosfat ve fruktoz 6-fosfat G6P sentezi için kullanılır. Bu durumda 1 molekül glukozun tamamen CO₂'e okside olabilmesi için yol boyunca 6 döngü yapması gerekmektedir. Dolayısıyla pentoz fosfat yoluna giren G₆P'nin çoğu geri dönüşümlüdür ve 1/6'sı CO₂'e ve P_i' a dönüşür. Bu nedenle bu metabolik yolun alternatif ismi pentoz fosfat döngüsüdür. (R. Horton ve ark., 1996)

2.3 KALITİM MODELİ

G₆PD eksikliğinin kalıtımı eşeye bağlıdır. Bu nedenle bu özelliği taşıyan erkeklerde tamamen ifade olur ve asla babadan oğula geçmez, sadece anneden oğula geçer. Dişilerde ise durum farklıdır.

Çünkü her hücrede bir X kromozomu aktiftir. Bunun sonucunda G₆PD eksikliği bakımından heterozigot olan dişiler iki kırmızı hücre popülasyonuna sahiptir; normal hücreler ve hasarlı hücreler. Hasarlı hücrelerin normal olanlara oranı büyük değişiklik gösterebilir. Heterozigotlardaki G₆PD eksikliğinin ifadesindeki bu belirgin çeşitlilik X-inaktivasyonu işleminin doğal bir sonucudur. İnaktivasyon işlemi rastgele olduğu için bazı durumlarda maternal kökenli bazı durumlarda ise paternal kökenli X kromozomları inaktivasyondan kaçabilirler. Heterozigotlarda G₆PD eksikliği olan hücrelerin normal hücrelere oranının belirgin çeşitliliği böyle bireylerdeki ifadenin belirgin farklılığı nedeniyledir. (Beutler, 1990)

Kadınlar iki X kromozomuna sahip olduklarından X ile bağlantılı genlerin iki katına sahiptirler. Dolayısıyla bu durum bu genlerin ürünlerine erkeklerdekenden 2 kat daha fazla sahip olacakları düşüncesini ortaya çıkarır. Ama her iki cinsiyette de seviye hemen hemen aynıdır. Bu olgu ile bağlantılı mekanizma "dosage compensation" etkisi olarak isimlendirilir.

Normal dişilerdeki "dosage compensation" (dozaj ayarlaması) mekanizması G₆PD heterozigotu kadınların çalışılması ile açığa çıkarılmıştır. Örneğin bir erkek çocuğu normal, diğer erkek çocuğu hasta olan bir kadının heterozigot olması kesindir. Böyle bir kadında G₆PD aktivitesi ölçüldüğünde normal aktivitenin ortalama %50'si bulunmuştur. Bununla birlikte bu gruptaki bazı bireyler normal veya eksik enzim aktivitesine sahip olabilmektedir. Dolayısıyla bazı kadınlar fenotipik ifade ve bilinen genotip arasında bir ayrım sergilemektedir.

Bu olgu X'in inaktivasyonu hipotezi ile açıklanabilir. Bu hipoteze göre;

1. dişilerdeki iki X kromozomundan sadece biri aktif diğeri inaktiftir.
2. X kromozomlarından birinin inaktif olduğu hücrelerin bağılı oranı, erken gelişim evrelerinde rastgele belirlenir.
3. Her hücrenin progenisinde aynı X kromozomu inaktif olarak kalır.

Dolayısıyla G₆PD heterozigotu dişilerde her hücredeki azalmış enzim aktivitesi aynı değildir. Aynı bireydeki iki farklı hücre popülasyonu -normal ve eksikliği taşıyanlar- birarada bulunur. Her bireyde normal hücrelerin enzim eksikliğini taşıyan hücelere oranı rastgele belirlendiği için heterozigot kadınların kırmızı hücrelerindeki enzim aktivitesi seviyesi çeşitlilik gösterir. Ortalama olarak %50'si normal, %50'si enzim eksikliğini taşıyan hücreler bulunur fakat bazı bireylerde normal hücreler bazılarında da eksikliği taşıyan hücreler fazladır. (Nathan ve Oski,1981)

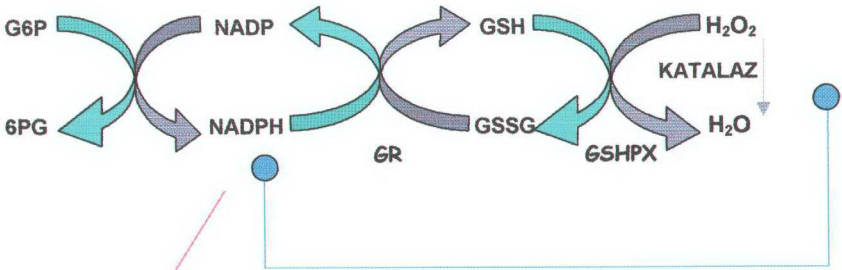
2.4 HEMOLİZ MEKANİZMASI

Kırmızı hücreler antioksidatif enzimler ile silahlanmışlardır. Bu detoksifiye edici sistemler GSH redüktaz (GR) , GSH peroksidaz, süperoksit dismutaz ve katalazı içermektedir. Bu enzimler sayesinde hücre, hidroksil radikali (-OH) ve singlet oksijen gibi zararlı serbest radikallerden korunur.

G₆PD eksikliği olan kırmızı hücrelerin ömürleri ilaç kullanımı, enfeksiyon ve neonatal dönem gibi durumlarda kısalmaktadır. Bunun nedeni tam olarak bilinmemektedir. G₆PD eksikliği olan hücrelerde ilaçla indüklenen hemoliz genellikle sadece oksijen varlığında oluşan denatüre hemoglobin ve stromal protein partiküllerinin meydana getirdiği Heinz cisimcikleri ile birlikte

görülmektedir. Kırmızı hücreler belirli ilaçlara maruz kaldıklarında ilaç hemoglobin ile etkileştiğinde ortamda düşük düzeylerde hidrojen peroksit oluşur. Buna ek olarak bazı ilaçlar ara ürün olarak peroksit oluşturmadan GSH'ı oksitleyen serbest radikaller oluştururlar. Bu durum GSH'ın disülfid formuna (GSSG) dönüşmesi veya karışık disülfid oluşturmak üzere glutatyonun hemoglobin ile kompleks oluşturması ile sonuçlanır. Bu karışık disülfitlerin hemoglobinin β 93. pozisyonundaki sülfidril grubu ile oluştuğu düşünülmektedir. GSH ve hemoglobinin bu şekilde bağlanması büyük bir olasılıkla stabil değildir ve molekül içi sülfidril gruplarının oksidasyona uğraması ile konformasyonel değişiklikler geçirerek karışık disülfitler oluştururlar. Ayrıca zincir ayrılmaları ile serbest α ve β zincirleri ortaya çıkar. Normal hücreler GSSG'yi GSH'a ve GSH ve hemoglobinin karışık disülfitlerini glutatyon redüktaz reaksiyonu ile indirgerler. Bununla birlikte bu disülfid bağlarının indirgenmesi için NADPH'a ihtiyaç vardır. G₆PD eksikliği olan hücreler NADP⁺'yı NADPH'a normal oranda indirgeyemedikleri için hidrojen peroksidi ve GSH-hemoglobin disülfitlerini indirgeyemezler. Böyle hücreler bazı ilaçlarla karşılaştıklarında Heinz cisimcikleri oluşur ve bu hücreler dolaşımdan hızla uzaklaştırılırlar.

G₆PD eksikliğinde görülen İcterus neonatorum ise büyük bir olasılıkla kırmızı hücre ömrünün kısalması ve G₆PD eksikliği olan bebeklerde olgunlaşmamış karaciğer tarafından bilirubin yeterli işlenememesine bağlıdır. Böyle bebeklerde anemi yok gibi gözükmektedir. Bu durum karaciğer fonksiyon bozukluğunun daha büyük bir rol oynadığını düşünülmeye yol açmaktadır.



İNDİRGEYİCİ BİYOSENTETİK REAKSİYONLAR

Şekil 2.2. G₆PD ve glutasyon döngüsü

G₆PD eksikliğinde enfeksiyonla veya kendiliğinden oluşan hemolizin mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu tip hemolitik reaksiyonlarda fagosit edici lökositlerin oluşturduğu hidrojen peroksidin rol oynayabileceği düşünülmektedir.

Bakıldan da kırmızı hücre GSH'ına zarar verebilen maddeler izole edilmiştir. Favizme sadece G₆PD eksikliği görülen bireylerde rastlanılmaktadır. Bununla birlikte böyle kişilerin aile bireylerinde de hassasiyet görülmesi ek genetik faktörlerin de rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Glukarik asit salınımında bir artışın gözlenmesi glukoronid oluşumunda bir bozukluğun olabileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır. Favizme immunolojik faktörler rol almamaktadır. (Beutler, 1990)

2.5 G₆PD EKSİKLİĞİNİN KLİNİĞİ

G₆PD eksikliğini taşıyan birçok birey bu genetik bozukluğun klinik belirlenmesini göstermez. G₆PD eksikliğinin ana klinik sonucu hemolitik anemidir. Genellikle anemi dönem dönem oluşur ama bazı nadir varyantlar kronik sferositik olmayan anemiye neden olabilirler ve bu ömür boyu süren hemolitik bir süreçtir. Genellikle hemoliz ilaç kullanımı, enfeksiyon ve bazı bireylerde bakla yenmesi gibi stres koşulları ile bağlantılıdır. Bununla birlikte klinik öneme sahip ve halk sağlığı bakımından önemli olan diğer bir sendromda neonatal sarılıktır. (Beutler, 1990)

2.5.1 Akut Hemolitik Anemi (AHA)

G₆PD eksikliğinin yaygın formlarında (G₆PD A⁻ ve G₆PD Mediterranean) enzim eksikliği genellikle pentoz fosfat yolunun aktivitesi stres altında olmadığı sürece zararsızdır. Tablo 2.1'de verilen ilaçlar alınması stres koşullarını oluşturur.

Akut ve subakut enfeksiyonlar da G₆PD A⁻li bireylerde hemolize neden olur. Salmonella, koliform , β hemolitik streptokok, riketsia, influenza ve viral hepatit enfeksiyonları hemolizden sorumludur. Viral hepatit metabolize edilmemiş oksidanların birikimine neden olarak hemolize yol açar.

Diabetik ketoasidozis de G₆PD eksikliğinde şiddetli hemolize neden olabilir. pHdaki azalma, pirüvatın birikmesi hiperglisemi glikolizi hızlandırarak pentoz fosfat yolunda stres koşulları yaratır. Hemolizin moleküler temeli bilinmemektedir fakat asidozis tedavi edildiğinde sonlanmaktadır. (Handl, 1987)

Tablo 2.1. Hemolitik anemiye neden olan ilaç ve kimyasallar

<u>Kategoriler</u>	<u>Örnek Bileşikler</u>
Antimalaryaller.....	Primaquine
Pamaquine	
Pentaquine	
Sülfonamidler	Sülfanilamide
Sülfapiridin	
Sülfasetamid	
Sülfamethoksazole	
Sülfonlar	
Thiazolsülfon	
Diafenilsülfon	
Analjezikler	Asetanilid
Antipiretikler	Fenilhidrazin
Nitrofuranlar.....	Nitrofurantoin
Misellanöz.....	Metilen mavisi
Toluidin mavisi	
Trinitrotoulen	
Nalidiksik asit	
Niridazol	

Hasta bireyde stres koşulları oluştuktan birkaç saat sonra birtakım rahatsızlıklar baş gösterir. 24-48 saat içinde ateşte artma (38°C'ye kadar) olur. Sersemlik, kann ağrısı , diyare ve nadiren kusma görülür. 6-24 saat içinde idrar renginde değişme gözlenir. Renk kırmızı, kahverengi veya siyah olabilir. Aynı zamanda sarılık belirgin hale gelir. Hasta solgun ve taşikardiktir, şiddetli durumlarda hipovolemik şok ve çok nadiren de kalp krizi görülebilir. Dalak ve karaciğerde büyüme olabilir. (Nathan ve Orkin, 1998)

2.5.2 Neonatal Sarılık (NNJ)

Yeni doğanlarda hemolitik hastalık mekanizması rhesus alloimmünizasyonuna bağlı olarak açıklanmaktadır. Bununla birlikte G₆PD eksikliğinin yaygın olduğu birçok popülasyonda rhesus uyumsuzluğu olan hamileliklerin oranı düşüktür.

G₆PD eksikliği ile bağlantılı neonatal sarılık (Neonatal Sarılık- NNJ) klasik rhesus bağlantılı NNJ'den iki ana konuda farklılık göstermektedir:

- 1- doğum sırasında çok nadir olarak bulunur ve insidans pikini 2. ve 3. günlerde verir.
- 2- Sarılık anemiden daha fazladır ve anemi nadiren şiddetli olmaktadır.

Bu nedenle HDN (hemolytic disease of newborn-yeni doğanlardaki hemolitik hastalık) ve NNJ terimleri en azından G₆PD eksikliği konusunda birbirlerinin yerine kullanılamaz.

NNJ'nin şiddeti klinik bakımdan önemsiz olabileceği gibi bazı durumlarda eğer tedavi edilmezse kernikterus tehdidi söz konusu olabilir. Bu nedenle hasar verebilecek nörolojik sonuçların önlenmesi bakımından problemin tanınması önemlidir.

Neden G₆PD eksikliği olan yeni doğanların bazılarında NNJ'nin geliştiği bilinmemektedir. Bununla birlikte, NNJ'nin her G₆PD eksikliği olanda görülmemesi ek bir faktörün varlığı şüphesini kuvvetlendirmektedir. Bu konuda çalışmalar yürütülmektedir. Bir olasılık G₆PD eksikliğinin genetik heterojenliğidir. NNJ bazı varyantlara ayrıcalık tanıyor olabilir. Diğer bir olasılık da NNJ'nin rezidüel G₆PD aktivitesinin nicel düzeyi ile bağlantılı olması olabilir, ama bu da kanıtlanamamıştır.

İki tipte NNJ ile bağlantılı G₆PD eksikliğinin olduğu düşünülebilir.

- 1- Daha yaygın olan fizyolojik sarılığın belirgin bir şekilde gözleendiği tip
- 2- Daha nadir karşılaşılan hemolitik tip ki ; bu durum yeni doğanlarda oluşan AHA gibi gözlenebilir. Çünkü bir ergin bireyde AHA oluşturabilecek bir ajana maruz kalınması sonucu oluşmuş gibi gözlenmektedir. Ajan bir ilaç, enfeksiyon veya naftalin kullanımı gibi yerel bir alışkanlık olabilir. (Nathan ve Orkin, 1998)

2.5.3 Kongenital Sferositik Olmayan Hemolitik Anemi (CNSHA)

Hayat boyu süren hemolitik anemi genellikle yeni doğanlarda eritroblastozis fetalisi taklit eder görünümde başlar ve erkeklerde G₆PD 1. Sınıf varyantlardan birini taşıyan X'e bağlı kalıtım sonucu ortaya çıkabilir. Aykırı bir sarılık görülebilir, splenomegali olabilir veya olmayabilir. Daha önce söz edildiği gibi G₆PD eksikliği olan bireylerde kırmızı hücre ömründe bir azalma vardır.

I. sınıf G_6PD eksikliği olan ve CNSHA olan bireylerin kırmızı hücre membranları, büyük molekül ağırlıklı protein agregatları içerirler. Kırmızı hücre membranı thiollerinin yaklaşık %80'i oksidasyona açıktır ve NADPH redüklemesi sisteminin yokluğu CNSHA'lı hücrelerde oksidatif çapraz bağların oluşumu ile sonuçlanır. Okside membranlar deformasyona karşı koyar, transmembran proteinlerin lateral hareketi kısıtlanmıştır, hücre şekli sabitlenmiştir. Hücre şeklinin sabitliği mekanik hemolize neden olur. (Handl, 1987)

2.5.4 Favizm

Favizm, G_6PD eksikliğinin en ciddi sonuçlarından biridir. Erginlerden daha çok çocuklarda yaygındır. Bakla sonucu oluşan tüm hemolitik krizlerin %70'i özellikle 2-10 yaş arası çocuklarda oluşmaktadır. Hemolizin başlaması ani olabilir. Örneğin bakla yendikten 1 saat sonra oluşabilir. Daha yaygın olarak ise 1-2 gün içinde başlayabilir. Hemolizin ara sıra da kabuğu soyulmamış şeftali gibi diğer yiyecekler alındıktan sonra başladığı rapor edilmiştir. İdrar kırmızı veya koyu bir renk alır ve şiddetli durumlarda böyle bireylerde kısa zaman içinde şok gelişebilir. Bu durum enzim eksikliği görülen bireylerin az bir kısmında görülmektedir. Favizmden en çok etkilenen bireyler G_6PD Akdeniz mutasyonunu taşıyanlardır. Sonuç olarak Sardunya, Sicilya, Kalabria, Yunanistan ve Sephardic Yahudilerde yaygın olarak görülmektedir. Ama G_6PD eksikliği olan zencilerde bu duruma duyarlılık yoktur.

Baklada hemolize neden olan ajanların divicine ve isouramil pirimidinlerinin O- β -glukozidi olan vicine ve convicine olduğu düşünülmektedir. Divicine ve isouramil glutatyon varlığında O_2 'yi aktive ederek serbest radikaller oluşturan güçlü redükleyici

ajanlardır. Bu reaksiyonda O_2 'den 1:1 oranında H_2O_2 oluşur. Bu pürimidinler, baklagillerden sadece *V. fava* türünde bulunmaktadır.

Vicia fava (bakla) dünya genelinde yaygınca yetiştirilen bir bitkidir. Özellikle Akdeniz kökenli kültürlerde çok yaygın olan bir ürün olması favizmi etnik bir sorun haline getirmiştir. Favizm özellikle baharda bitkinin hasadı sırasında ve polinasyon mevsiminde yaygın hale gelmektedir. Akut favizm ataklarının yaklaşık %90'ı taze veya pişmiş bakla yenmesinden, %2-3'ü enfeksiyon veya ilaç alımı nedeniyle, geri kalan kısım ise özellikle G_6PD Mediterranean sıklığının %35'e ulaştığı Sardunya gibi bölgelerde polenlere maruz kalınması sonucu tetiklenmektedir. Bunun sonucunda bu sorun ile başa çıkmak için İtalya'da özel "favismo" hastaneleri kurulmuştur. (Handl, 1987)

2.5.5 Neonatal ikterus

G_6PD eksikliği olan bazı yeni doğmuş bebeklerde neonatal ikterus oluşur. Sarılık şiddetli olabilir ve tedavi edilmezse kernikterus ile sonuçlanabilir. Bu açıdan bu bozukluk toplum sağlığı açısından önemlidir. Neonatal ikterustaki yüksek görülme sıklığı G_6PD eksikliği olan Med bebeklerde ve Çinliler arasında gözlenmektedir. A^- tiptekilerde nadiren karşılaşılmaktadır. Bu farklılığın nedeni bilinmemektedir. Çevresel faktörler -E vitamini alımı gibi -etkin olabilirler. (Beutler, 1990)

2.5.6 G_6PD ve Malarya

G_6PD eksikliği tropik ve subtropik bölgelerde, malaryanın bir zamanlar endemik olduğu populasyonlarda yüksek frekansta

bulunmaktadır. Bu durum falciparum malaryasına karşı bağıl bir avantajın varlığını düşündürmektedir.

Sıtma etkeni olan *Plasmodium falciparum* şizogeni formunu eritrositlerde geçirir. Enzim eksikliği görülen bireylerde ortamda yeterli miktarda GSH ve riboz-5-fosfat (R-5-P) bulunmayacağı için parazitin üremesi de azalacaktır. G₆PD eksikliğinin bu durum nedeniyle sıtmaya karşı koruyucu bir rolü olduğu düşünülse de , belirli bir süre sonunda parazitin kendi enzimini sentezleyerek gelişimini sürdürmesi bu düşüncenin yanlış olduğunu göstermiştir.

2.6 ERİTROSİTLER DIŞINDA DİĞER HÜCRELER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

G₆PD A⁻ ve Med gibi G₆PD'nin yaygın varyantlarında ve hatta en şiddetli eksikliğin görüldüğü varyantlarda bile lökosit sayı ve fonksiyonunda bir bozukluk gösterilmemiştir. G₆PD eksikliği olan hastalarda kanama eğilimi yoktur ve trombosit fonksiyonu ile yapılan tartışmalı sonuçlar vermiştir.

G₆PD eksikliğinin çeşitli türleri ve kanser arasında bir bağlantının varlığına dair fikirler ortaya atılmasına rağmen elde edilen bilgiler tatmin edici değildir ve G₆PD Mediterranean taşıyan hastalardaki detaylı hematolojik malignansi çalışmaları bir bilgi vermemiştir. (Beutler, 1990)

Nükleuslu somatik hücreler G₆PD'yi konstitütif olarak sentezleyebilme yeteneğine sahip oldukları için kırmızı hücrelerden daha az etkilenirler. Örneğin G₆PD Mediterranean taşıyanlarda kırmızı hücrelerde G₆PD aktivitesi %5'ten az iken aynı bireylerin granülositlerinde normalin %30'u kadardır, G₆PD A⁻ li bireylerde

kırmızı hücrelerde G₆PD aktivitesi %12 iken granülositlerde normale yakındır. Diğer yandan eğer eksiklik katalitik verimlilikteki bir değişme veya substrat aktivitesindeki bir değişme nedeniyle oluşmuşsa, durum daha etkili olabilmektedir.

Eritrositler vücuttaki tek çekirdeksiz hücre tipi değildir. Diğer bir örnekte göz lensidir ve G₆PD eksikliği olan bireylerde juvenil katarakt rapor edilmiştir. Sferositik olmayan hemolitik anemi görülen G₆PD varyantı taşıyan bireylerin bazılarında katarakt gözlenmektedir. (OMIM, 1999)

G₆PD aktivitesinin düşük olduğu bireylerde katarakt riski de artmaktadır. Bu durum GSH düzeyinin düşük olması ile açıklanabilir. Lenste yüksek derişimde bulunan GSH (2-17 mmol / g), proteinlerin -SH gruplarını indirgenmiş halde tutarak ışık kırılmasına ve lensin opak hale gelmesine neden olan yüksek molekül ağırlıklı protein agregatlarının oluşmasını engelleyerek katarakt riskini arttırır.

2.7 G₆PD VARYANLARI

G₆PD varyantları enzim aktivitesi seviyesine göre 5 sınıfa ayrılır. Bunlar; kronik sferositik olmayan hemolitik aneminin görüldüğü sınıf I enzim eksikliği; şiddetli enzim eksikliğinin görüldüğü sınıf II enzim eksikliği (%10'dan az); orta- hafif enzim eksikliğinin görüldüğü sınıf III (%10-60); çok hafif enzim eksikliğinin görüldüğü veya enzim eksikliğinin olmadığı sınıf IV (%60) ve artmış enzim aktivitesinin görüldüğü sınıf V'tir. (Tablo 2.2)

Sferositik olmayan hemolitik anemiye neden olan mutasyonlar 362-446.amino asitler arasındaki bölgede enzimin karboksi ucunda

kümelenmişlerdir. Klinik olarak hafif olan mutasyonlar ise molekülün amino ucunda yer almışlardır. Gen içi bozukluklar tanımlandıkça, tek olduğu düşünülen bir çok varyantın sekans analizinin benzer olduğu ortaya çıkmıştır. Bu bulgu şaşırtıcı değildir; çünkü stabil olmayan mutant enzimlerle çalışılırken biyokimyasal karakterizasyon yeterli olmamaktadır. Örneğin G₆PD Marion, G₆PD Gastonia ve G₆PD Minnesota aynı val213-leu değişimini; G₆PD Nashville ve G₆PD Anaheim aynı arg393-his değişimini taşımaktadır. (OMIM, 1999)

I.Sınıf varyantlar son derece düşük G₆PD aktivitesine sahiptir ve ömür boyu süren CNSHA ile bağlantılıdır. Bu varyantlardaki hemoliz mekanizması bilinmemektedir. Bu sınıftaki varyantların bazılarında enzim çok dayanıksızdır ve membrana ve substrata bağlanma bozuklukları vardır.

Kronik hemoliz krizlerine neden olan G₆PD varyantları çok sayıda kinetik ve fiziksel hatalara sahiptirler;örneğin termal olarak stabil değildirler. Bu stabil olmayan varyantların 1/7'si o kadar çabuk denatüre olur ki enzimin kinetik veya diğer özelliklerini saptamak mümkün değildir.

2.ve 3. Sınıf varyantlar G₆PD eksikliği evrelerinin %90'ını temsil eder. Bu varyantlar kronik hemoliz ile bağlantılı değildirler ama çeşitli ilaçlara karşı olan duyarlılıkları dikkati çeker.(Tablo 2.2)

Tablo 2.2.G₆PD mutasyonları (Beutler et al, 1998, OMIM)

Varyant adı	cDNA'daki nükleotit değişimi	Genomik nükleotit değişimi	Amino asit değişimi
Gaohe Gaozhou	95 A→G	95 G	32His→Arg
Honiara	99 A→G 1360 C→T	99 G 13763 T	33 Ile→Met
Sunderland	105-107 del	105-107 del	105-107 del
Orissa	131 C→G	9988 G	44 Ala→Gly
Aures	143 T→C	10000 C	48 Ile→Thr
Kozukata	159 G→C	10111 C	53 Trp→Cys
Kamogawa	169 C→T	10121 T	57 Arg→Trp
Metaponto	172 G→A	10124 A	58 Asp→Asn
A- - DistritoFederal Matera Castilla Alabama Betica Tepic Ferrara Laghout Kabyle	202 G→A	10154 A	68 Val→Met
Namoru	376 A→G	10877 G	126 Asn→Asp
Murcia	208 T→C	10160 C	70 Tyr→His
Swansea	209 A→G	10161 G	70 Tyr→Cys
Ube Konan	224 T→C	10176 C	75 Leu→Pro
Lagosanto	241 C→T	10193 T	81 Arg→Cys
	242 G→A	10194 A	81 Arg→His

Varyant adı	cDNA'daki nükleotit değişimi	Genomik nükleotit değişimi	Amino asit değişimi
Urayasu	281-283 AGA del	10782-10784	94 Lys del
Vancouver	317 C→G 544 C→T 592 C→T	10818 G	106 Ser→Cys 182 Arg→Trp 198 Arg→Cys
Sao Borja	337 G→A	10838 A	113 Asp→Asn
A	376 A→G	10877 G	126 Asn→Asp
Vanua Lava	383 T→C	10884 C	128 Leu→Pro
Chinese-4	392 G→T	10893 T	131 Gly→Val
Cairo	404 A→C	10905 C	135 Asn→Thr
Ilesha	466 G→A	10967 A	156 Glu→Lys
Mahidol	487 G→A	11658 A	163 Gly→Ser
Plymouth	488 G→A	11659 A	163 Gly→Asp
Chinese-3	493 A→G	11664 G	165 Asn→Asp
Naone	497 G→A	11668 A	166 Arg→His
Volendam	514 C→T	11684 T	172 Pro→Ser
Nankang	517 T→C	11687 C	173 Phe→Leu
Shinshu	527 A→G	11698 G	176 Asp→Gly
Chikugo	535 A→T	11706 T	179 Ser→Cys
Malaga	542 A→T	11713 T	181 Asp→Val
Santamaria	542 A→T 376 A→G	11713 T 10877 G	181 Asp→Val 126 Asn→Asp
Tsukui	561-563 del	11732-11734 del	188 veya 189 Ser del

Varyant Adı	cDNA'daki nükleotit değişimi	Genomik nükleotit değişimi	Amino asit değişimi
Akdeniz Dallas Birmingham Sassari Cagliari Panama	563 C→T	11734 T	188 Ser→Phe
Coimbra Shunde	592 C→T	11763 T	198 Arg→Cys
Santiago	593 G→C	11764 C	198 Arg→Pro
Sibari	634 A→G	11805 G	212 Met→Val
Minnesota Marion Gastonia LeJeune	637 G→T	11808 T	213 Val→Leu
Harilaou	648T→G	11996 G	216 Phe→Leu
Mexico City	680 G→A	12028 A	227 Arg→Gln
A-	680 G→T 376 A→G	12028 A 10877 G	227 Arg→Leu 126 Asn→Asp
Asahikawa	695 G→A	12043 A	232 Cys→Tyr
Durham	713 A→G	12061 G	238 Lys→Arg
Stonybrook	724-729 GGCACT del	12072-12077	242- 243 Gly ve Thr del
Wayne	769 G→C	12117 C	257 Arg→Gly
Cleveland Çorum	820 G→A	12533 A	274 Glu→Lys
Wexham	833 C→T	12546 T	278 Ser→Phe
Chinese-1	835 A→T	12548 T	279 Thr→Ser

Varyant adı	cDNA'daki nükleotit değişimi	Genomik nükleotit değişimi	Amino asit değişimi
Seattle Lodi Modena Ferrara II Athens-like	844 G→C	12557 C	282 Asp→His
Osaka	853 C→T	12566 T	285 Arg→Cys
Montalbano	854 G→A	12567 A	285 Arg→His
Viangchan Jarnmu	871 G→A	13031 A	291 Val→Met
West Virginia	910 G→T	13070 T	303 Val→Phe
Seoul	916 G→A	13076 A	306 Gly→Ser
Kalyan Kerala	949 G→A	13109 A	317 Glu→Lys
A- Betica Selma Guantanamo	968 T→C 376 A→G	13128 C 10877 G	323 Leu→Pro 126 Asn→Asp
Nara	953-976 del	13113-13136 del	319-326del
Chatam	1003 G→A	13163 A	335 Ala→Asp
Fushan	1004 C→A	13164 A	335 Ala→Asp
Chinese-5	1024 C→T	13184 T	342 Leu→Phe
Partenope	1052 G→T	13351 T	351 Gly→Val
Ierapetra	1057 C→T	13356 T	353 Pro→Ser
Loma Linda	1089 C→A	13388 A	363 Asn→Lys

Varyant adı	cDNA'daki nükleotit değişimi	Genomik nükleotit değişimi	Amino asit değişimi
Calvo Mackenna	1138 A→G	13437 G	380 Ile→Val
Riley	1139 T→C	13438 C	380 Ile→Thr
Olomouc	1141 T→C	13440 C	381 Phe→Leu
Tomah	1153 T→C	13452 C	385 Cys→Arg
Iowa Walter Reed Iowa City Springfield	1156 A→G	13455 G	386 Lys→Glu
Guadalajara	1159 C→T	13458 T	387 Arg→Cys
Mt. Sinai	1159 C→T 376 A →G	13458 T 10877 G	387 Arg→Cys 126 Asn→Asp
Beverly Hills Genova Worcester	1160 G→A	13459 A	387 Arg→His
Praba	1166 A→G	13465 G	389 Glu→Gly
Wisconsin	1177 C→G	13476 G	393 Arg→Gly
Nashville Anaheim Calgary Portici	1178 G→A	13447 A	393 Arg→His
Alhambra	1180 G→C	13479 C	394 Val→Leu
Bari	1187 C→T	13486 T	396 Pro→Leu
Puerto Limon	1192 G→A	13491 A	398 Glu→Lys
Anadia	1193 A→G	13492 G	398 Glu→Gly

Varyant adı	cDNA'daki nükleotit değişimi	Genomik nükleotit değişimi	Amino asit değişimi
Clinic	1215 G→A	13514 A	405 Met→Ile
Riverside	1228 G→T	13527 T	410 Gly→Cys
Japan Shinagawa	1229 G→A	13529 A	410 Gly→Asp
Tokyo	1246 G→A	13545 A	416 Glu→Lys
Georgia	1284 C→A	13560 A	428 Tyr→Dur
Vansdorf	İntron 10'un 3' ucundaki splice bölgesi del	13689-13690 del	-
Pawnee	1316 G→C	13719 C	439 Arg→Pro
Telti Kobe	1318 C→T	13721 T	440 Leu→Phe
Santiago de Cuba	1339 G→A	13742 A	447 Gly→Arg
S. Antioco	1342 A→G	13745 G	448 Ser→Gly
Cassano	1347 G→C	13750 C	449 Gln→His
Union Maewo	1360 C→T	13763 T	454 Arg→His
Andalus	1361 G→A	13764 A	454 Arg→Cys
Cosenza	1376 G→C	13884 C	459 Arg→Pro
Canton Taiwan-Hakka Gifu-like Agrigento-like	1376 G→T	13884 T	459 Arg→Leu
Kamiube	1387 C→T	13895 T	463 Arg→Cys
Kaiping Anant Dhon	1388 G→A	13896 A	463 Arg→His

Petrich Sapporo	1388 G→A	13896 A	463 Arg→His
Fukaya	1462 G→A	14067 A	488 Gly→Ser
Campinas	1463 G→T	14068 T	488 Gly→Val

Mediterranean varyantı 2.sınıf varyantlar içinde en yaygın olanıdır ve Sardunyalılarda, Yunanlılarda ve Sephardik Yahudilerde ortaya çıkma olasılığı %3-50 arasında değişmektedir. G₆PD Mediterranean'da G₆PD çalışılan doku ve hücrelerde stabil olmamakla kalmayıp aynı zamanda düşük miktarlarda sentezlenmektedir ve enzim molekülünün katalitik aktivitesi düşüktür. (Handl, 1987)

2.8. G₆PD EKSİKLİĞİ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G₆PD) eksikliği, eritrosit enzimi olan G₆PD'nin aktivitesinin belirgin bir şekilde azaldığı kalıtsal bir hastalıktır ve dünyada 400 milyondan fazla insanı etkilemektedir. Bu tip bir eksiklik özellikle ilaç alımı sonrası, enfeksiyonlar sırasında, muhtemelen diabetik ketoasidosis sırasında ve neonatal dönemde hemolitik anemi ile sonuçlanabilir.

G₆PD eksikliğinin tanımlanması, 1950'li yılların başında yürütülen antimalaryal ilaç primaquine'in hemolitik etkisinin araştırılması sırasında yapılmıştır. Bu çalışmalar ile G₆PD eksikliğinin eşeye bağlı kalıtsal bir eksiklik olduğu ve primer olarak eritrositleri etkilediği ortaya çıkarılmıştır. Enzimin eksikliği yaşlı eritrositleri genç eritrositlerden daha şiddetli etkilemektedir. Daha sonra bu enzim eksikliğinin sıklıkla Afrikalı, Akdenizli, Doğu etnik kökenli bireyleri

etkilediği ama diğer populasyonlarda da olabileceği gösterilmiştir. G₆PD eksikliğinin en yaygın (polimorfik) formu sadece stres koşulları altında anemi ile bağlantılıdır. Daha şiddetli formlar ise seyrek olarak ortaya çıkar ve sferositik olmayan hemolitik anemi (nonspherocytic hemolytic anemia - NSCHA) ile bağlantılıdır. (Beutler, 1990)

G₆PD geni insanda X kromozomu üzerinde Xq28 bölgesinde yerleşim göstermektedir. 13 ekson ve 12 introndan oluşmaktadır. Enzimin çok sayıda varyantının bulunması, sıklıkla karşılaşılan genetik hastalıklara yol açmaktadır.

2.8.1. MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz geni X kromozomu üzerinde yerleşim gösteren 13 ekson ve 12 introndan oluşur. Protein kodlayan bölge boyutları 12-236 bç arasında değişen 12 segmente ayrılmıştır. (OMIM,1999) Bu gen X kromozomunun uzun kolunun telomerik bölgesinde (Xq28 bandı) yerleşim göstermektedir. G₆PD geni, Gd, faktör VIII ve retinal pigmentleri kodlayan (renk körlüğünden sorumlu mutasyonlara sahip) genler ile genetik ve fiziksel olarak bağlantılıdır. X kromozomunun bu bölgesi insan genomu içinde en çok çalışılan bölgelerden bir tanesidir. Genin 5' ucunda uzun kodlayıcı görevi olmayan bir bölge (UTR) bulunmaktadır. Olgun G₆PD mRNA'sının ana 5' ucu birçok hücre hattında translasyon başlama kodonunun 177 bç yukarısında yerleşim göstermektedir (OMIM,1999). 3' ucunda ise bazı sitidinler metillenmiş durumdadır. Bunun düzenleyici bir görevi olduğu düşünülmektedir. 17. Kromozom üzerinde büyük bir olasılıkla pseudogen olan G₆PD benzeri bir lokus tanımlanmıştır.

Dizisi tamamen çıkarılmış olan genin toplam uzunluğu yaklaşık 18.5 kb kadardır ki bunun çoğunu intron II kaplamaktadır (yaklaşık 12 kb). Promotor bölgesi, bu güne kadar analiz edilmiş housekeeping genlerdeki gibi karakteristik olarak fazla sayıda guanin ve sitozin rezidüleri içermektedir. Yapılan delesyon analizleri göstermiştir ki promotorun "gerekli " kısmı sadece yaklaşık 150 bp uzunluğundadır. Büyük intronun önemi bilinmemektedir.

G₆PD geni klonlandıktan ve özellikle PCR ile ekson veya ekson gruplarının çoğaltılması mümkün hale geldikten sonra G₆PD mutasyonlarının analizi daha kolay bir hal almıştır. Bu konuda yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar ile G₆PD eksikliğinin moleküler temelleri konusunda bilgi sahibi olmak kolaylaşmıştır.

Hemen hemen tüm G₆PD varyantlarında, tek bir yanlış anlamlı nokta mutasyonun neden olduğu tek bir amino asit değişimi sözkonusudur. Birkaç durumda ise (A⁻ varyantının üç tipi, G₆PD Santamaria ve G₆PD Mount Sinai) iki amino asit değişimi bulunmaktadır ve bunların hepsinde değişimlerinden birini G₆PD A⁻ değişimi oluşturmaktadır. Afrika'da bu varyant polimorfik olduğu için, bu durumun açıklanması; Gd^A geninde bir nokta mutasyonunun meydana gelmesi şeklinde olabilir. Başka bir durumda ise 3 ayrı amino asit değişimi rapor edilmiştir(G₆PD Vancouver); bu değişimlerden bir tanesi Akdeniz alanında polimorfik olan G₆PD Coimbra ile aynıdır. Splicing'i etkileyen sadece bir mutasyon bulunmuştur ve sırasıyla tek bir amino asidin (G₆PD Sunderland), yanyana iki amino asidin (G₆PD Stonybrook) ve sekiz amino asidin delesyona uğradığı mutasyonlar bulunmuştur. (OMIM,1999)

Ülkemizde ve dünyada özellikle Akdeniz tipi mutasyon çok yaygın olarak bulunmaktadır. Bu mutasyon 2. Sınıf varyantlara dahildir. Bu mutasyon tek bir nükleotit değişimi sonucu oluşmaktadır. Ekson 6'da bulunan bu mutasyonla birlikte bazı bireylerde ekson 11'de de sessiz tipte bir mutasyon da bulunmaktadır. Beutler ve Kuhl 1311. pozisyondaki bu polimorfizmin değişik populasyonlarda gösterdiği frekans değişimini çalışmışlardır. Özellikle Hintli erkek bireyler G₆PD Akdeniz ile bu polimorfizmi bir arada taşımaktadırlar.

Kaplan ve arkadaşları 1997'de yaptıkları bir çalışma ile UGT1A1 geninin promotorundaki AT insersiyonu ile birlikte görülen Mediterranean tipteki G₆PD eksikliğinin erginlerde Gilbert sendromu ile bağlantılı olduğunu ve neonatal hiperbiluribineminin gelişiminden sorumlu olduğunu ileri sürmüşlerdir. Bu durum çok şiddetli olup kernikterus ile ve hatta ölüm ile sonuçlanabilmektedir. G₆PD eksikliği veya UDP glukoronoziltransferaz polimorfizmi tek başlarına neonatal hiperbiluribinemi insidansını arttırmak için yeterli olmadıkları halde ikisinin oluşturduğu kombinasyon bu insidansı arttırmaktadır. Dolayısıyla Kaplan ve arkadaşları bu durumdan yola çıkarak iyi huylu genetik polimorfizmlerin etkileşimleri sonucu hastalığa neden olabileceklerini öne sürmektedirler.

Diğer birçok kalıtsal bozuklukta (talasemi, hemofili, musküler distrofi) olan büyük delesyonların aksine G₆PD eksikliğinde bunların yokluğu dikkat çekicidir. Diğer hastalıklar ile G₆PD eksikliği arasındaki fonksiyonel farklılık diğerlerinin dokuya özgü genler oluşu, G₆PD geninin ise housekeeping gen oluşunun bir sonucudur. Eğer dokuya özgü bir gen bir mutasyon ile tamamen inaktive edilirse embriyonik gelişimi etkileyebilir, bireyin hayatının ilerleyen dönemlerinde şiddetli hastalıklara neden olabilir. Buna

karşılık hücrelerin büyük çoğunluğu için düşük G₆PD aktivitesi bile çok gerekli olabilmektedir. Dolayısıyla bu genin büyük bir delesyon ile tamamen inaktive edilmesi embriyonik dönemin erken evrelerinde öldürücü olabilir. (Nathan ve Orkin, 1998)

2.9. COĞRAFİ DAĞILIMI VE SIKLIĞI

G₆PD eksikliğinin beyaz populasyonlarındaki yaygınlığı kuzey Avrupa populasyonlarında 1000de 1lerde seyrederken Yahudi Kürtlerin erkeklerinde %50ye kadar çıkmaktadır. G₆PD eksikliğı güneydoğu Asya'daki Çinli populasyonlarında da görülmektedir. Asya populasyonlarında birçok varyant yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır. A⁻ tipteki G₆PD eksikliğı batı Afrika'da çok yaygındır ve ABD'deki zenci erkeklerde görülme sıklığı yaklaşık %11'dir. Amerika'daki zenci erkeklerin yaklaşık %16'sı eksiklik göstermeyen G₆PD A⁺ genini taşımaktadır.

Birçok populasyondaki G₆PD eksikliğı genlerinin yüksek frekansı G₆PD eksikliğinin bir şekilde seçici bir avantaja sahip olduğunu düşündürmektedir. G₆PD eksikliğı sıtmanın endemik olduğu tropikal ve subtropikal bölgelerde yüksek sıklıkta görülmesi bu duruma örnek gösterilebilir. İn vitro koşullarda da G₆PD eksikliğı sıtma parazitinin gelişimini engellemektedir. Fakat bu avantajın sadece heterozigot bireylere ait olduğu düşünülmektedir. Parazit G₆PD eksikliğı olan hücrelerde birçok döngü geçirdikten sonra kendi G₆PD'si indüklenmektedir.

Genellikle zenci populasyonları içinde orak hücreli anemisi bulunan bireylerde G₆PD eksikliğı yüksek sıklıkta görülmektedir. Bu bireylerde yüksek sıklıkta görülen eksiklik Amerikan zencilerinin heterojen genetik kompozisyonundan kaynaklanıyor olabilir. Yani

Afrika genlerini daha çok taşıyanların hem orak hemoglobini hem de G₆PD A⁺yı taşıma eğilimi daha fazladır. Benzer faktörler Arap populasyonlarında gözlenen orak hücreli anemi ve G₆PD eksiklikleri için de geçerlidir. (Beutler, 1990)

G₆PD enzim eksikliğinin ülkemizdeki sıklığı %0.9'dur Fakat bu oran bölgelere göre yer yer %0.5-%10 arasında değişmektedir. (Say ve ark. ,1965)

3.MATERYAL VE METOT

3.1 Örneklerin Toplandığı Gruplar

Bu tez çalışmasında materyal olarak Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bölümünde Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz enzim eksikliği saptanmış olan hastalardan ve allelerinden alınan periferik kan örnekleri kullanıldı.

3.2 Kandan Genomik DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu için, Yen ve ark tarafından geliştirilen DNA izolasyon yöntemi değiştirilerek kullanıldı. EDTA'lı tüplerde bulunan 4-5 ml kan örneklerine aşağıda belirtilen DNA izolasyon yöntemi uygulandı.

- 1- 400 µl kan 1.5 ml'lik ependorf tüpü içine alındı.
- 2- Tris- EDTA (TE) tamponu ile 1ml'ye tamamlandı.

TE Tamponu

10 mM Tris-HCl

1 mM EDTA

TC. YATIRIM BANKASI
DOKÜMAN EKİ
1983/08/01

- 3- Tüpler 12000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- 4- Üstteki süpernatant atıldı ve üzerine tekrar TE Tamponu ilave edildi. Bu işlem 3 kere tekrar edildi.
- 5- Üstteki süpernatant atıldıktan sonra üzerine lizis tamponu ilave edildi. Son hacmi 500 µl'ye tamamlamak için üzerine TE Tamponu ilave edildi.

Lizis Tamponu

%10 Sodyum dodesil sülfat	80 µl
1M NaCl	90 µl
10mg/ml Proteinaz K	5 µl

- 6- Tüpler 56°C de 1.5 saat inkübasyona bırakıldı.
- 7- Tüplerin üzerine eşit hacimde fenol-kloroform (1:1) ilave edildi.
- 8- Tüpler 2500 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi.
- 9- Üstteki berrak kısım temiz bir ependorfa aktarıldı.
- 10- Üzerine DNA'nın çökmesi için saf etil alkol ilave edildi.
- 11- Saf etil alkol uzaklaştırıldıktan sonra tüplere %70'lik etil alkol ilave edildi.
- 12- Tüplerdeki alkol uzaklaştırıldıktan sonra DNA 200 µl steril distile suda çözüldü.

3.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile G₆PD Eksonlarının Çoğaltılması

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), dizisi bilinen bir DNA bölgesinin in vitro olarak uygun primerler yardımıyla çoğaltılmasını sağlayan tekniktir. Bu teknikte ısıya dayanıklı bir bakteri olan *Thermus aquaticus*'tan elde edilen Taq polimeraz enzimi kullanılır. Bu enzim çok yüksek sıcaklıklarda aktivite gösterebilmektedir. Bu sayede çok

küçük miktardaki genomik DNA'nın yaklaşık olarak 10^6 kere çoğaltılması sağlanır.

PCR tekniğinin temelinde 3 basamak bulunmaktadır:

- 1- Yüksek sıcaklık ile DNA zicirinin denatüre edilmesi
- 2- Primerlerin kalıp DNA üzerinde bulunan kendilerine komplementer bölgeler ile birleşmesi
- 3- Isıya dayanıklı Taq polimeraz varlığında DNA'nın polimerizasyonu

Birbirini takibeden bu 3 basamağın 25-30 döngü devam etmesi ile istenilen bölgeye ait çok sayıda kopya elde edilir.

Bu çalışmada G₆PD geninin eksonları PCR tekniği ile aşağıdaki şekilde çoğaltılarak dizi analizi için hazırlanmıştır.

1 Kişilik Reaksiyon Karşımı (Toplam Hacim 100µl)

10 x reaksiyon tamponu	10 µl
25 mM dNTP karşımı	1 µl
primer D	0.5 µl (100 pmol)
primer R	0.5 µl (100 pmol)
sd H ₂ O	88 µl
Taq DNA polimeraz	0.5 µl (2.5 u)

10x reaksiyon tamponu*

Tris HCl	10 mM pH 9.0
KCl	50 mM
MgCl ₂	1.5 mM
Tritonx100	% 0.1

BSA veya jelatin 0.2 mg/ml

*Bu tampon Taq polimerazın alındığı firma tarafından enzim ile birlikte getirilmektedir.

Örnekler DNA çift zincirinin ağırlması, olası proteaz kontaminasyonun önlenmesi ve eksonükleaz aktivitesinin durdurulması için ilk olarak 95°C'de 4 dakika ısıtıldı. Daha sonra sıcaklık enzimin ilave edilebileceği 85°C'ye düşürüldü ve her tüpe 0.5 µl Taq polimeraz (5u/µl) ilave edildi. Polimerizasyon işlemi Techne PCR aletinde gerçekleştirildi.

Program ;

94°C 1'

56°C 1'

72°C 1' 30" olmak üzere 30 döngüden

oluşmaktadır. Son döngüden sonra yarım kalan reaksiyonların tamamlanması için 72°C'de 7 dakika tutuldu.

Reaksiyon sonucunda amplifikasyon ürünleri 1 x TBE (Tris -Borat EDTA) tamponu içinde bulunan %1'lik agaroz jelde yürütüldü ve etidyum bromür ile boyanarak UV lambası altında oluşan PCR fragmentleri incelendi.

10x TBE TAMPONU

10 mM Tris

1 mM Borik asit

20 mM EDTA

Bu tez çalışmasında G₆PD geninin diğer eksonları da benzer şekilde amplifiye edilmiştir.

Kullanılan Primer Çiftleri

Ekson 3-4	Ci1D	5'- CCAGTAGTGATCCTGAGTAG -3'	Tm=60°C
	Ci5R	5' -TGCTCTCGTACTTCTTGAGA -3'	Tm=58°C
Ekson 5	G10	5' -ACACACGGACTCAAAGAGAG-3'	Tm=60°C
	G6	5' -CTCTATGAGCGTGTCCGGG - 3'	Tm=62°C
Ekson 6-7	G11	5' -AGGAGGTTCTGGCCTCTACT -3'	Tm=62°C
	Ci6R	5' -GGCTACTCTTCCCTATCTTG -3'	Tm=60°C
Ekson 8	G12	5' -GGCCCATCTGTGACGAGGCA -3'	Tm=66°C
	G17	5' -TTGGGGTCCCCATGCCCTTGA- 3'	Tm=68°C
Ekson 9-10-11	Ci4D	5'-TGCACATCTGTGGCCACAGT-3'	Tm=73°C
	G27	5'-CCTGCATACCTGTGGGCTAT-3'	Tm=73°C

Bu şekilde amplifiye edilen G₆PD geninin eksonları en çok mutasyonların bulunduğu eksonlardan başlanarak DNA dizi analizine tabi tutularak mutasyon taraması yapıldı.

3.4 DNA Dizi Analizi ile G₆PD Genindeki Mutasyonların Saptanması

1970'lerin ortalarında moleküler biyoloji ve teknolojiye ilerlemeler sayesinde DNA baz dizisini belirleyebilecek yöntemler geliştirmek mümkün hale gelmiştir. Bu yöntemler ile bir çok sayıda genin yapısı ve fonksiyonu hakkında bilgi edinilmiştir ve halen de bu konudaki çalışmalar sürmektedir. Günümüzde kullanılmakta olan iki yöntemden birisi; Sanger'in enzimatik yöntemidir, diğeri ise Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılım prensibine dayalı yöntemidir. Bu tez

çalışmasında G₆PD mutasyonlarının saptanması amacıyla Sanger'in metodundan yararlanılmıştır.

Baz dizisi belirlenecek olan DNA bölgesinin analizi için bu bölgeye ait kalıp DNA'ya, bu bölgeye özgül olan ve serbest OH grubu taşıyan bir primere, dNTP'lere ve DNA polimeraz enzimine ihtiyaç vardır. Kullanılan primer DNA'nın hangi bölgesinin analiz edileceğini belirler.

G₆PD geninin DNA dizi analizi yoluyla incelenmesi amacıyla kalıp olarak ya tek zincirli amplifikasyon ürünleri kullanılmış ya da çift zincirli amplifikasyon ürünlerinden yararlanılmıştır. Bu amaçla United Biochemical Cooperation firmasının Version 2.0 Sequencing reaksiyon kiti kullanılmıştır.

3.4.1 Tek zincirli DNA'dan dizi analizi

Daha önce belirtilen şekilde çift zincirli olarak amplifiye edilmiş DNA örnekleri asimetrik amplifikasyon yöntemi ile tek zincirli hale getirildi.

Asimetrik amplifikasyon koşulları:

1 kişilik reaksiyon karışımı (toplam hacim 100µl):

Reaksiyon Tamponu	10µl
dNTP	1µl
Primer D	1µl
Primer R(1/100 sulandırılmış)	1µl
sdH ₂ O	87µl

5 μ l ds DNA üzerine ilave edilen bu karışım daha önce belirtilen koşullar ile amplifiye edildi. Amplifiye örnekler agaroz jel üzerinde kontrol edildi.

Asimetrik amplifikasyon örnekleri eşit hacim 2.5 M amonyum asetat ve ve iki hacim saf etanol ile 13000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Oluşan peletten üst kısım uzaklaştırıldıktan sonra, pellet üzerine %70'lik etanol ilave edilerek 10 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi. Etanol uzaklaştırıldıktan sonra pelet üzerine 7 μ l sdH₂O ilave edilerek çözüldü. Bu aşamadan sonra sekans reaksiyonlarına geçildi.

1. Çift zincirli kalıplar denatüre edildi.
2. Annealing karışımı ;

DNA (yaklaşık 1 μ g)	7 μ l
Reaksiyon tamponu	2 μ l
Primer (0.5 pmol)	1 μ l
Toplam	10 μ l

3. Bu karışım 68°C'de 3 dakika inkübe edildi ve daha sonra buzlu suya alınarak 5 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda buza alındı.
4. Soğuma sırasında dört adet 0.5ml'lik ependorf tüpler A, C, G, T olarak etiketlendi ve içlerine 2.5 μ l içerisinde dört tip dNTP ve bir adet ddNTP bulunan nükleotit karışımları ilave edildi. Tüpler 37°C'ye ayarlanmış ısıtıcı üzerine alındı.

5. İşaretleme reaksiyonu;

Sekans dilüsyon tamponu	1.6µl
DTT (dithiothrethiol),0.1 M	1 µl
Seyreltilmiş işaretleme karışımı	0.5µl
³⁵ S	0.5µl
T7 DNA polimeraz	0.25µl
Pirofosfataz	0.125µl

6. Bu karışım buz üzerinde bekletilen DNA ve primeri içeren tüplere 5.5µl ilave edildi. Tüpler oda sıcaklığında 4 dakika inkübe edildi.

7. Terminasyon reaksiyonu;

İnkübasyonu tamamlanan heat block üzerindeki her bir terminasyon tüpüne 3.5µl ilave edilerek 37°C'de terminasyon reaksiyonu için 5 dakika daha inkübe edildi.

8. Bu sürenin sonunda tüplere 4µl durdurma solüsyonu ilave edilerek reaksiyonlar durduruldu.

9. Reaksiyon tüpleri 80°C'de 3 dakika denatüre edilerek poliakrilamid jele yüklendi.

3.4.2 Çift Zincirli Amplifikasyon Ürünlerinin Dizi Analizi

Bu yöntemde kullanılan DNA polimeraz enziminin de eksonükleaz aktiviteleri ortadan kaldırılmıştır. Reaksiyon sonucunda oluşan fragmentleri görüntüleyebilmek amacıyla $\alpha^{35}\text{S}$ kullanılarak DNA internal olarak işaretlenmiştir. Uyguladığımız yöntemde kalıp olarak simetrik (çift zincirli) amplifikasyon ürünleri kullanılmaktadır. PCR tamamlandığında ortamda dNTP'ler ve primerler kalmakta ve bu da normal sekans reaksiyonunu etkilemektedir. Bu etkiyi ortadan kaldırmak amacıyla iki hidrolitik enzim kullanılmaktadır. Shrimp alkalin fosfataz (SAP) ve eksonükleaz I enzimleri bu

istenmeyen materyalleri etkisiz hale getirirler. Shrimp alkalen fosfataz, dNTP'lerin fosfat gruplarını kopartmakta, eksonükleaz I ise ortamdaki tek zincirli fragmentleri parçalamaktadır. Amplifikasyon ürünlerine bu enzimler ilave edildikten sonra 37°C'de 15 dakika inkübe edilir. Bu süre sonunda enzimlerin inaktif hale gelmesi için tüpler 80 °C'de 15 dakika bekletilir. Bu aşamadan sonra normal dizi analizi basamakları takibedilir. DNA ve primerin birleşebilmesi için termal cyclerda 100°C'de 2-3 dakika bekletilerek çift zincirli kalıbın denatüre olması sağlanır. Süre tamamlandığında tüpler buzlu suya alınarak 5 dakika bekletilip buza alınır. Bu şekilde DNA primer birleşmesi sağlanmış olur. Başka bir tüpte de reaksiyon için gerekli olan karışım hazırlanır. Bu karışım reaksiyon tamponu ve tuzlar ile birlikte dört tip dNTP'yi de içermektedir. Reaksiyon karışımına ilave edilmiş olan nükleotitlerden bir tanesi alfa pozisyonundan işaretlenmiş olan ³⁵S dNTP'dir (dATP). Ortama son olarak enzim ilave edilerek DNA zincirine işaretli nükleotidin katılması için oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir. İşaretleme bu şekilde tamamlandığında zincir sonlanması reaksiyonu gerçekleştirilir. Bu reaksiyon sentezin bir noktada durmasını sağlamak amacıyla kullanılan dideoksi nükleotitleri (serbest 3' OH grubu bulunmayan) içerir. Serbest 3' OH grubu bulunmadığı için zincir yapısına yeni nükleotit katılımı olmaz, reaksiyon durur. Bu reaksiyonun gerçekleşebilmesi için İşaretleme-reaksiyon karışımı ddATP-A, ddCTP-C, ddGTP-G, ddTTP-T tüplerine bölünür. Bu tüpler reaksiyon için gerekli tüm faktörler ile birlikte düşük derişimde ddNTP'lerden bir tanesini taşımaktadır. Tüpler 37°C'de inkübe edilerek reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanır. Tüp içinde gerçekleşen reaksiyonlar tesadüfe bağlı olarak çeşitli uzunluktaki fragmentler ile sonuçlanırlar. Reaksiyon durdurma solusyonu ilavesiyle durdurularak yaklaşık 80°C'de denatüre edilir. Ayrıştırma gücü yüksek olan denatüre edici ajan olarak üre içeren poliakrilamid jelle

yüklenir ve poliakrilamid jel elektroforezi uygulanır. Elektroforez sonunda jel kurutulur ve otoradyografisi alınır.

3.5 Dizi Analizi Reaksiyonu

PCR ve Dizi Analizi reaksiyonları 500 µl 'lik mikrosantrifüj tüplerinde gerçekleştirildi.

PCR ürünü reaksiyon başlangıcında aşağıda belirtilen şekilde enzimatik işlemden geçirildi.

PCR ürünü	5 µl
Eksonükleaz I	1 µl
Shrimp alkalin fosfat	1 µl
Toplam	7 µl

- 1- PCR aletinde 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- 2- Eksonükleaz ve SAP, 80°C'de 15 dakika inkübe edilerek inaktive edildi.
- 3- Bu işlem devam ederken terminasyon karışımı için tüpler hazırlanıp isimlendirildi, 2.5µl terminasyon karışımı (ddNTPler) ilave edildi.
- 4- Primer ve kalıbın birleşmesi ;

Enzimatik işlemden geçirilmiş PCR ürünü DNA	7 µl
Primer	1 µl
H ₂ O	2 µl
Toplam	10 µl

100°C'de 2-3 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tüpler buzlu suya alınarak burada 5 dakika tutuldu. Bu süre sonunda tüpler buza alındı.

5- İşaretleme Reaksiyonu

DNA- Primer karışımı	10 µl
T7 Sequenase reaksiyon tamponu	2 µl
0.1 M DTT	1 µl
1:5 seyreltilmiş işaretleme karışımı	2 µl
[³⁵ S] dATP	0.5 µl (5µCi)
T7 Sequenase v2.0 DNA polimeraz	2 µl
Toplam	17.5 µl

Karışım oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

6- Sonlandırma reaksiyonu;

Her terminasyon tüpüne işaretleme-reaksiyon karışımından 3.5µl ilave edildi, karıştırıldı ve 37°C'de 5-10 dakika terminasyon reaksiyonunun gerçekleşmesi için inkübasyona devam edildi.

7- Reaksiyon 4µl durdurma solusyonu ilave edilerek durduruldu.

8- Örnekler jele yüklenmeden önce 80°C'de 2-3 dakika denatüre edildi. Jelin kuyucuklarına sırasıyla A, C, G, T tüplerinden 4.5 µl örnek yüklenerek koşturuldu.

3.6 Sekans Jelinin Hazırlanması

Elektroforez için % 6'lık poliakrilamid jel kullanıldı.

100 ml toplam hacimde ;

üre	45 g
akrilamid	5.7 g
bisakrilamid	0.3 g
10 x TBE	10 ml olacak şekilde hazırlandı.

Manyetik karıştırıcıda iyice çözünmesi sağlandıktan sonra havası alındı. 600 µl %10'luk amonyum per sülfat ve 45 µl TEMED ilave

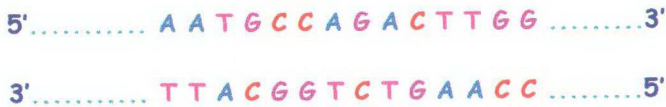
edilerek iki cam levha arasına 0.4mm kalınlığında döküldü. Jelin polimerize olabilmesi için oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

3.7 DNA Sekans Elektroforezi

Polimerizasyon işlemi tamamlandığında ortamdaki kristalleşmiş üre parçacıkları temizlenerek CONSORT DNA sekans elektroforezi aletine yerleştirildi. Elektroferez tamponu olarak 1 x TBE kullanıldı. Sisteme 70 watt, 1800 volt ve 50mA elektrik akımı verilerek 15-30 dakika ön elektroferez uygulandı. Bu uygulama tamamlandıktan sonra jele DNA sekans reaksiyonlarından 4.5 µl yüklenerek yukandaki elektrik akımı koşulları uygulanarak örnekler 2.5-3 saat koşturuldu.

3. 8 Otoradyografi

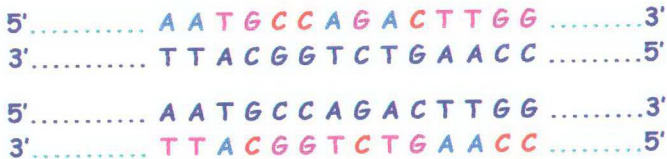
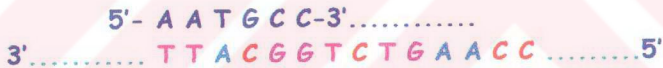
Elektroferez bitiminde jel, asetik asit-metanol karışımında 10 dakika bekletildi, Whatman 1MM kromatografi kağıdı üzerine alınarak jel kurutucuda 30-45dakika kurutuldu. Jel kuruduktan sonra X ışınına duyarlı KODAK X-OMAT filmle kaplandı. 1-2 gün boyu oda sıcaklığında karanlık odada tutularak otoradyografisi alındı.



DENATÜRASYON (1. BASAMAK)



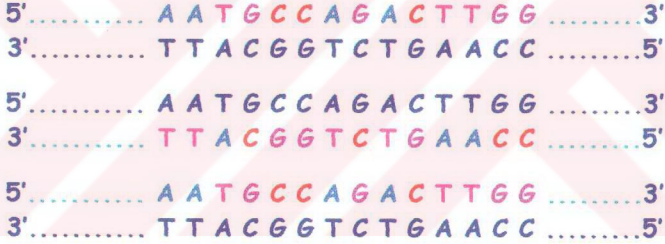
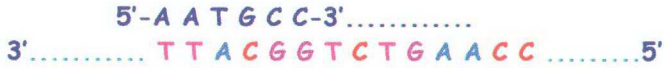
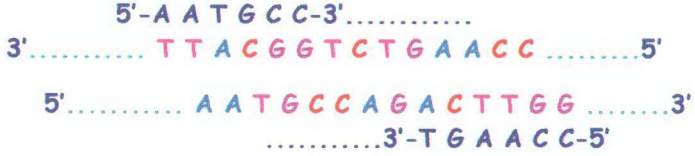
DNA-PRİMER BİRLEŞMESİ (2. BASAMAK)



ZİNCİR UZAMASI (3. BASAMAK)



2. DÖNGÜ



25-30 DÖNGÜ SONUNDA İSTENİLEN DNA BÖLGESİ
 YAKLAŞIK 10^6 KEZ ÇOĞALIR

Şekil 3.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında dizi analizi yaptığımız bireyler Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bölümüne başvurmuş olan 59 aileden 98 kişi arasından alınmıştır. Bu hastalar laboratuvarımızda ilk olarak en yaygın mutasyon olan Akdeniz tipi olarak adlandırılan 563 C→T dönüşümü ve ayrıca 376 A→G dönüşümü açısından PCR'a dayalı enzim kesimi ile taranmışlardır.(Tablo4.1)

DNA dizi analizine ilk önce en yaygın mutasyon olan Med mutasyonunun varlığı enzim kesimi ile saptanmış olan örneklerde bu mutasyonun bulunduğu ekson 6'dan ve 376 A→G polimorfik bölgesinin bulunduğu ekson 5'ten başlanmıştır. Akdeniz tipi mutasyon Mbo II restriksiyon enzimi için kesim noktası yaratırken, 376. nükleotitteki A→G dönüşümü Fok I enzimi için kesim noktası oluşturur. Laboratuvarımızda yapılan çalışma sonucunda 79 bireyin Akdeniz tipi (Mediterranean) mutasyonu, 5 bireyin ise A⁺ tipte kromozom taşıdığını saptadık. Biz de bu mutasyonları taşıdığını saptadığımız örnekleri kullanarak DNA dizi analizi yaptık ve sistemi oturtmaya çalıştık.

Bu iki enzim kesimi ile mutasyonu bulunamayan 14 bireye ait 20 kromozomdaki mutasyonların bulunması amacıyla diğer eksonlara DNA dizi analizi uygulanmıştır.

Şekil 4.1'de 563 C→T dönüşümünü taşıyan bireye ait dizi analizi sonucu verilmiştir. Şekil 4.2'de 376 A→G dönüşümünü taşıyan bireye ait dizi analizi sonucu görülmektedir

Çalışılan ailelerden ikisinde; biri erkek, bir diğeri kız çocuğa ait olmak üzere, iki kromozomda ekson 9'da Chatam mutasyonu olarak bilinen 1003 G→A dönüşümü ile sonuçlanan mutasyon bulunmuştur. Bu mutasyon sonucu 335. amino asit olan alanin, threonine dönüşmüştür. (Şekil 4.3)

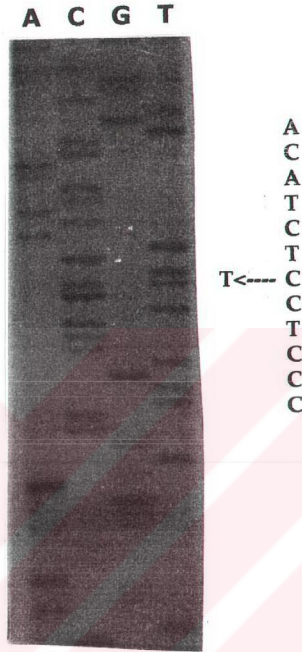
G6PD geninde DNA dizi analizi yaptığımız bölgelerin dizisi Şekil 4.4'de verilmiştir.

Çalışılan bireylerden birinde (K.B.) ekson 3,4,5,6,7,8,9, bir diğeri (Y.T.) ise ekson 3,4,5,6,7,8,9,10 okunmuştur (Şekil 4.5 ve 4.6). Ancak bu bireylerde genin büyük kısmı incelenmiş olmasına rağmen herhangi bir mutasyon ile karşılaşmamıştır. Bu hastalara ait dizi analizi uygulanmış bölgelerin dizisi ilişikte verilmiştir.

Bunlar dışında dizi analizi uygulanarak normal oldukları tespit edilen eksonlara ait DNA dizi analizi şekilleri de ilişikte verilmiştir. (Şekil 4.7,4.8,4.9)

Tablo 4.1 Çalışılan bireylere göre mutasyonların dağılımı

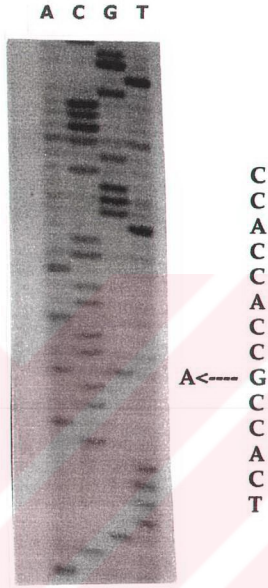
Bulunan mutasyon	Birey sayısı	Analiz yöntemi
Akdeniz tipi (Med) mutasyonu	79 birey	RFLP
A ⁺	5 birey	RFLP
202 G→A	6 birey	DNA Dizi Analizi
1003 G→A	2 birey	DNA Dizi Analizi



Şekil 4.1 : Ekson 6'da nükleotit 563'deki C→T Akdeniz tipi mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.



Şekil 4.2 : Ekson 5'te nükleotit 376'daki A→G polimorfizminin heterozigot durumda bulunduğu bölgenin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.



Şekil 4.3 : Ekson 9'da nükleotit 1003'deki G→A Chatam mutasyonunun DNA dizi analizi ile gösterilmesi.

Şekil 4.4.G6PD genine ait primerlerin ve dizi analizi uygulanan bölgelerin dizisi

.....
3241...ctggtgtgagaccgccagagga(G1D)actctcaagaaggggctaacttctcaa
(G4D)tgct
3301ctcctgttct tctgcttgt taacgagcct ttctccaac agacagcgtc atggcagagc
3361 aggtggccct gagccgacc caggtgtcg ggatcctcgg gaagagcttt
tccaggcg **EKSON 2**
3421 atgccttcca tcagtcggat acacacatat tcattcatat gggtagatcg gtgagatct
3481 cccaggcccc aatcttaaaa gccaggaag(G3R)t gcctgtcca
tgctcage(G2R)t.....
13201.....ggc ccaagtatga tctctgagtag(Ci1D) tgcccagatc accaagggtg
13261 gaggatgatg tatgtaggct(G5D) gtgtcccg ccactt(G9D)taa
ccacacacct gtctccctg
13321 ccacaggata acctggccaa gaagaagatc taccacca tgtgtaaagt
gtgtccacc **EKSON 3**
13381 actgccctg tgacctccg ccagggacag gctgtgtct gcctgccg
cactggtac
13441 agctgtgcc tgccctcagg tggctattc gggatggct tctgccgaa
aacacctta
13501 tcG→Atgggcta tgcccgttc cgctcacag tggctgacat ccgcaaacg
agtgagccct **EKSON 4**
13561 tttcaaggtC
13621 ccagcatggc caqctcac(G8R)g
14041..... gaacacacac ggactcaag aga(G10D)ggggctg acatctgtc
gtgtgtctg
14101 ctgtccgtgt ctcccaggcc acccagagg agaagctcaa gctggaggac
ttcttgccc
14161 gcaactccta tgtggctgac cagtacgat atgcagctc ctaccagcg
ctcaacagcc **EKSON 5**
14221 acatgA→Gatgc ctccacctg gggtcacagg ccaaccgct ctctacctg
gccttgccc
14281 cgaccgtcta cgaggccgtc accaagaaca ttacagatc ctgcatgagc
cagatgtaag
14341.....aggtggcgcaaggcagctcccacq(G7R)actc
14401 tatgagcgtg tccgga(G6R)gccg.....
14881ggggcgagga ggttctgccc tctact(G11D)cccc
14941.....
15001 cagcagaggc tgaaccgca tcattcatgga gaagccctc gggaggacc
tgacagctc **EKSON 6**
15061 tgaccggctg tcaaccaca tctC→Tctcct gttccgtgag gaccagatct
accgatcga
15121 ccactacctg ggcaaggaga tggtcagaa cctcatggtg ctgaggtggg....
15181.....ggtgtactcaggagcctca(G14R).....
15241.....gtgaccctc acatgtggcc ctgaccac(G16D)
15301.....ccctccctgc agatttgcca acagatctt
15361 cggccccatc tgaaccggg acaacatcg ctgcttacc ctaccctca
aggagccctt **EKSON 7**

15421 tggcactgag ggtcgcgggg gctatttcca tgaatttggg atcatccggt
gagagctctt

15481 cctctctctt gggaggctgg cacagggtgag cagagccaagt cac(G15R)cctgcag
gctactctt

15541 ccctatcttg(Ci6R) ggggag.....

15661.....

15721.....agcctgtttgaggatcccca tgccttga(G17D)a

15781ccagggtgaac agggcgggga gctaaggcga gctctggcct ctccgtccc
cagggagct

15841 atgcagaacc acctactgca gatgctgtgt ctggtggcca tggagaagcc
cgctccacc

EKSON 8

15901 aactcagatg acgtccgtga tgaagaagta.....c aggagcatgc

15961 ctctgcgca(G13R)ag gcccatctgt gacgagcca(G12R)c.....

16021.....

16261.....gggctgacatctgtggcca cagt(Ci4D)catccc

16321 tcaccccaaa ctaac(G18D)acctcagggtcaag

16381 gtgttgaat gcatctcaga ggtgcaggcc acaatgtgg tcttgggcca
gtacgtggg

16441 aaccccgatg gagagggcga ggcacaaa gggtaactgg acgacccacc
ggtgcaccgc

EKSON 9

16501 gggtcacca ccG→Accacttt tgcagccgtc gtcctctatg tggagaatga
gaggtgggat

16561.....gccttcgag cccagcaagg cagaactggg(G20) catg.....

16621.....tgagagagct ggtgctgag

16681c(G23D)....cgccaagtag ggggtgcctt catctcgcg tgcgccaagg
ccctgaacga

16741 gcgcaaggcc gaggtgaggc tgcagtcca tgatgtggcc ggcgacatct
tccaccagca

16801 gtgcaagcgc aacgagctgg tgatccgcgt gcagcccaac gaggccgtgt
acaccaagat

EKSON 10

16861 gatgaccaag aagccgggca tgttctcaa ccccaggag tccgagctgg
acctgacct

16921 cggcaacaga tacaaggtgc....ga aggagcagtg tgaggggt(G21R)gg
gcggcctggg

16981 cccgggggac(G19R).....

17041 aactggaagc tccctgacgc ctacgagcgc ctatcctgg acgtctctgt
cgggagccag

EKSON 11

17101 atgcactctg tacgcagtg a....cct gcatacctgt gggctat(G27R)ggg

17161.....tcg ctatgacca cggcct(G30D)ccc.....

17221 agcagcagc tccgtgaggc ctggcgtatt tcaaccac tgctgacca
gattgagctg

EKSON 12

17281 gagaagccca agcccatccc ctatattat ggcaggtgag.....

17341.....(G28R)ggatgagg atgagactac ctcat(G31D)....

17401.....agccgagcc ccacggaggc agacgagctg atgaagagag tgggtttcca
17461 gtatgaggcc acctacaagt ggggtgaacc ccacaagctc tgagccctgg
gcaccacct

EKSON 13

17521 ccacccccgc cacggccacc ctctctccg ccgcccagacc ccgagtcagg
aggactccgg(G26R)

17581 gaccattgac ctcagctgca catt(G25R)cctgg.....

 primerler  eksonlar  intronlar

Şekil 4.5. Hastalarımızdan K.B.'ye ait DNA dizi Analizi uygulanmış bölgelerin dizisi;

13261.....ccacacacct gttccctctg
13321ccacaggataacctggccaagaagaagatctacccaccatgtggtaaagt gtgtcccacc

EKSON 3

13381actgccctctgtgacctcccgccaggacaggcctggctcctgccctgccgactgtgttac
13441agctgtgccctgccctcagggtgctattccggatggcctctgcccgaacacctca
13501tcGtgggctatgccggtcccgctcacagtggctgacatccgcaaacagagtgaacctc

EKSON 4

13561tcttcaaggtgggtggtg.....
14101...ccgtgtctcccagccacccagaggagaagctcaagctggaggactctttgccc
14161gcaactcctatgtggctgaccagtagatgatgcagcctctaccagcgctcaacagcc

EKSON 5

14221acatgAatgccctccaactgtgggtcacaggccaaccgctcttactctgacctgcccc
14281cgaccgtctacgaggccgtc.....
14941.....
15001cagcagaggctggaaccgcatcatcatggagaagccttcggaggaggactgcagagctc

EKSON 6

15061tgaccggctgtccaaccacatctCctccctgttcctgaggaccagatctaccgcatcga
15121ccactacctgggcaaggagatggtgcagaacctcatggtgctgag.....
15301.....agattgccaacaggatctt
15361cgccccatctggaaccgggacaacatcgctcgttatcctcacctcaaggagccctt

EKSON 7

15421tggcactgagggctgcgggggctatttcgatgaatttgggatcatccggtgagagctctt
15481cctctctcctggagggtggcacagggtggcagagccagtcacctctcag ggctactctt
15541ccctatcttg.....
15781..... gctaaggcgagctctggcctctcctccccaggagct
15841atgcagaaccacctactgcagatgctgtgctggtggccatggagaagccccctccacc

EKSON 8

15901aactcagatgacgtccgtgatgagaagta.....c aggagcatgc
15961cctgtcgcagaggccatctgtgac.....
16261.....CCC
16321tgaccccaactcaacacctcaggtaag

16381gtgttgaaatgcatctcagagggtgcaggccaacaatgtgg tcctgggcca gtacgtgggg

16441aaccccgatggagagggcgaggccaccaaaagggtagctggacgacccacggtgccccg

C

EKSON 9

16501gggtccaccaccGccacttttgagccgtcgtcctctatgtggagaa.....



Şekil 4.6. Hastalarımızdan Y.T.'ye ait DNA Dizi Analizi uygulanmış bölgelerin dizisi;

13261.....tgtaggtcgtgtccccagccacttctaaccacacacctgtccctctg

13321ccacaggataacctggccaagaagaagtctacccccaccatgtggtaaagtgtgtccccacc

EKSON 3

13381actgccctctgtgacctcccgccaggacaggcctgtctgtccctgccgactggttac

13441agctgtgccctgccctcaggtggctattccgggatggccttctgccgaaaacacctta

13501tcGtgggctatgccgttcccgcctcagtggtgacatccgcaaacagagtgaccct

EKSON 4

13561tcttaaggtgggtgggtcagggcctccc

14101.....agaagctcaa gctggaggac tctttgcc

14161gcaactcctatgtggctgaccagtacgatgatgcagcctcctaccagcgctcaacagcc

EKSON 5

14221acatgAatgccctccacctgggtcacaggccaaccgcctcttctacctgacctgcccc

14281cgaccgtctacgaggccgtcaccaagaacattcagagtc.....

14941.....

15001cagcagaggctggaaccgcatcatcatgtgagaagcccttcggaggacctgcagagctc

EKSON 6

15061tgaccggctgtccaaccacatctCctccctgttccgtgaggaccagatctaccgcatcga

15121ccactacctg.....

15361.....ccccatctggaaccgggacaacatcgctggtatcctcacctcaaggagccctt

EKSON 7

15421tggcactgagggctgcggggctatttcgatgaattgggatcatccggtgagagctctt

15481cctctcctctggaggctgacaggggtggcagagccagtcaccctgcagggtactctt

15541ccctatctt.....

15781.....gctctggcctcttccgtcccaggaggact

15841atgcagaaccacctactgcagatgctgtctggtggccatggagaagcccgcctccacc

EKSON 8

15901aactcagatgacgtccgtgatgagaagg.....

16261.....catccc

16321tgaccccaa ctcaacacctcaggtaag

16381gtgtgaaatgatctcagaggtcaggccaacaatgtgtcctgggccagtacgtggg

16441aaccccgatggagagggcgaggccaccaaagggtacctggacgacccacggtgccccg

c

EKSON 9

16501gggtccaccaccGccacttttgagccgtcgtcctctatgtggag.....

16621.....tgagagagctggtgctgagg

16681c....cgccacgtaggggtgcccttcatctcgcg cgc tgcggcaagg ccctgaacga

16741gcgcaaggccgaggtgaggctgcagttccatgatgtggcc ggcgacatct tccaccagca

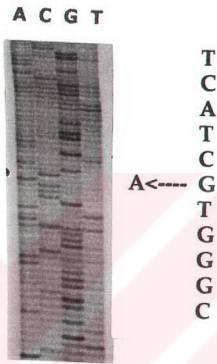
16801gtgcaagcgcaacgagctggtgatccgcgtgcagcccaacgaggccgtgt acaccaagat

EKSON 10

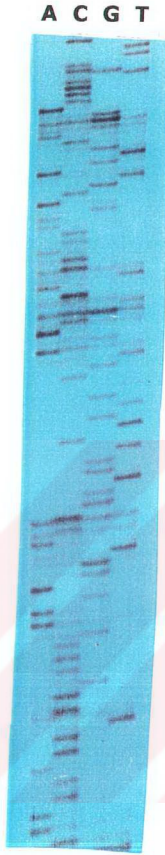
16861 gatgaccaagaagccgggcatgttcttcaaccccgaggagtcggagctgg acctgaccta

16921cggaacagatacaaggtgc.....gaaggagcagtgagggtggcgcgctggg

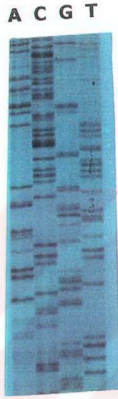
* noktalı kısımlar okunmayan nükleotitleri, kırmızı renkli kısımlar okunan nükleotitleri göstermektedir.



Şekil 4.7 : Ekson 4'te bulunan nükleotit 202'deki G→A mutasyonunun bulunduğu bölgenin DNA dizi analizi ile gösterilmesi.



Şekil 4.8 : Ekson 8' i normal olan bir bireye ait DNA dizi analizi.



Şekil 4.9 : Ekson 9'unda mutasyon bulunamamış bir bireye ait DNA dizi analizi

5. TARTIŞMA

Son yıllarda hızla gelişen teknolojik ilerlemeler etkilerini genetik alanına da yansıtmaktadır. Bu gelişmeler sayesinde nedenleri tam anlamıyla açıklanamayan kalıtsal birçok hastalığın kökenleri DNA düzeyinde incelenmeye ve bu konuda sonuçlar alınmaya başlanmıştır. Ülkemizde de, diğer ülke populasyonları için çalışılmış olan genetik bozukluklara ait çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Kendi populasyonumuz için bu bozuklukların sıklıkları ile ilgili ve bu bozuklukları taramak için en uygun olan teknikler ile ilgili bilgiler birikmeye başlamıştır. Sunulan bu çalışmada da G6PD eksikliğinin moleküler patolojisi DNA dizi analizi yöntemi ile incelenmiştir.

G6PD eksikliği ile ilgili ilk çalışmalar daha önce de değinildiği gibi 1950'li yıllarda başlamıştır. G6PD eksikliği, sıtmaya karşı kullanılan bir ilaç olan primaquine'in etkisiyle indüklenen hemolitik aneminin kökeni araştırılırken ortaya çıkmıştır. İlk dönemlerde yapılan çalışmalar G6PD eksikliğinin biyokimyasal karakterizasyonu üzerinedir. 1970'li, 80'li yıllara gelindiğinde farklı populasyonlarda yapılan aile çalışmaları ile 400'den fazla varyantın bulunduğu ortaya çıkarılmıştır (Beutler, 1993). Fakat bu varyantların özelliklerinin ve etki mekanizmalarının bulunması, 1980lerin sonunda G6PD cDNA'sının klonlanması ve devamında DNA teknolojisindeki ilerlemeler mutasyonların yerlerinin saptanmasıyla gerçekleştirilmiştir.

G6PD geni X kromozomuna bağlı kalıtım göstermekte ve kadınlarda X'in inaktivasyonuna bağlı olarak farklı şiddetlerde enzim eksikliği görülmektedir. Enzim eksikliği sonucu bireylerde çeşitli klinik etkiler ortaya çıkmaktadır. Bu etkiler kendilerini neonatal sarılık ve hemolitik anemi olarak göstermektedir. Ayrıca eritrositler dışında

diğer dokularda çeşitli şekillerde etkileri gözlenmektedir. (OMIM,1999)

Farklı populasyonlarda farklı varyantların varlığı söz konusudur ve bu varyantlar o populasyon içerisinde yaygın olarak bulunmaktadır. Örneğin Mısır populasyonunda en yaygın varyantı G6PD Mediterranean oluşturmaktadır. Ayrıca coğrafi konum da G6PD eksikliğine neden olan mutasyonların ortaya çıkışında etkin olmaktadır. Özellikle sıtmanın yaygın olduğu bölgelerde G6PD eksikliği gösteren bireylere çok rastlanılmaktadır. G6PD eksikliği bulunan bireylerin aldığı bazı ilaçlar ve besinler de hemoliz üzerinde etkili olmaktadır. Özellikle bazı bireylerde baklaya karşı duyarlılık görülmektedir. Bakla polenlerinin solunması bile hemolizi indüklemektedir. Favizm olarak bilinen bu durum antik çağlardan beri bilinmektedir. Hatta Yunan filozof ve matematikçi Pitagoras'ın halkı baklaya karşı uyardığı söylenmektedir. Ayrıca viral, bakteriyel ve riketsiyal bir çok enfeksiyon da G6PD eksikliği olan bireylerde hemolizi indüklemektedir. (OMIM,1999, rialto.com/G6PD)

Dünya üzerinde 400 milyondan fazla bireyi etkileyen bu genetik bozukluğun ülkemizde de moleküler patolojisinin çalışılarak karakterizasyonunun yapılmasının önemi büyüktür.

G6PD mutasyonlarından bazılarını PCR'a dayalı RFLP analizi ile saptanabilmektedir. 202 G→A mutasyonu; Nla III, 376 A→G mutasyonu; Fok I ve 563 C→T Med mutasyonu; Mbo II enzimi için kesim noktası oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında ise Türk toplumunda RFLP analizi ile saptanamayan mutasyonların ortaya çıkarılması için DNA dizi analizi yöntemini uygulamayı amaçladık. Hem enzim kesimi hem de dizi analizi ile 376 A→G mutasyonu

taşıdığı saptanan dört bireyde ekson 4'de 202 G→A mutasyonu saptandı.

Vulliamy ve ark., 1988 yılında G6PD Mediterranean'ın (G6PD, Ser188 Phe) ekson 6'da 563. pozisyonadaki sitozin nükleotidinin timine dönüşümü ile 188. pozisyonadaki amino asidin serinden fenilalanine dönüşümü ile sonuçlanan mutasyon olduğunu bulmuşlardır. Bunu takibeden yılda De Vita ve ark G6PD Mediterranean, G6PD Sassari ve G6PD Cagliari'nin ekson 6'daki TCC→TTC mutasyonundan kaynaklanan aynı mutasyonal değişime sahip olduğunu bulmuşlardır. Ekson 6'da bulunan bu mutasyon ile birlikte ekson 11'de 1311.nükleotide, 437. kodonda TAC→TAT dönüşümü ile sonuçlanan sessiz bir mutasyon bulunmaktadır, her iki kodon da tirozin amino asidini kodlamaktadır. Bu mutasyon bir polimorfizm olup yeni bir Mbo II kesim noktası oluşturmaktadır. Beutler ve Kuhl 1990 yılında çeşitli populasyonlardaki C1311T polimorfizminin dağılımını çalışmışlardır. Akdeniz ülkelerinden C563T genotipinde olan 22 erkek bireyden sadece birinde 1311 polimorfizmine rastlanılmıştır ki bu bulgu bu grup içerisindeki frekansı en yüksek olan bulgudur. Buna karşılık Hindistan altkotasından olan bireylerle yapılan çalışmalar da 563 T'yi taşıyan erkeklerin hepsinin 1311'de C'yi taşıdığı bulunmuştur. Beutler ve Kuhl bu bulgulardan yola çıkarak 563. nükleotitteki bu mutasyonun Asya ve Avrupa'da birbirinden bağımsız olarak ortaya çıkmış olabileceğini ileri sürmüşlerdir. Yine çeşitli araştırmacıların orta doğu kökenli bireylerle yaptıkları çalışmalarda da çok düşük sıklıkta 1311'deki C→T değişimini taşıdığını bulmuşlardır (Kurdi- Haidar ve ark. 1990). Laboratuvarımızdaki Mbo II kesimi ile yapılan tarama Türk toplumunda da ekson 6'da bulunan 563 C→T mutasyonunun en yaygın mutasyon olduğunu göstermiştir. Ancak toplumda çalışılmış G6PD hastaları arasında %22 gibi önemli bir oranda ise

bu mutasyon yoktu. Bu mutasyonun bulunmadığı bireylere dizi analizi uygulanmıştır.

Çalışmamız sırasında Türk populasyonunda karşılaştığımız diğer bir mutasyon da G6PD A⁺ idi. Takizawa ve Yoshida bu mutasyonun 1987'de enzimin N terminalindeki asparajinin aspartik aside dönüşümü ile sonuçlanan A→G değişimi olduğunu buldular. 1988 yılında Hirono ve Beutler G6PD A⁻ fenotipinden sorumlu mutasyonu, enzim eksikliği görülen Batı Afrikalı ve Amerikalı zencilerde gösterdiler. G6PD A⁻ bireylerin beşte dördünde 202. nükleotitteki G→A (Val68Met) değişimi bulunmaktadır, bu değişim enzimin in vivo instabilitesi üzerinde etkili olmaktadır. 376. ve 202. nükleotitlerdeki bu iki değişim birarada bulunduğu G6PD eksikliği fenotipi ortaya çıkmaktadır. Tüm G6PD A⁻ bireylerde ekson 5'te 376.nükleotide adenin guanin dönüşümü görülmektedir. Dolayısıyla G6PD'nin A ve B formlarını birbirinden ayıran farklılık 126. rezidüdeki amino asittir. A⁻ bireylerde, 376. Nükleotitteki değişimin yanısıra 202., 680. ve 968. nükleotitlerde de sırasıyla G→A, G→T ve T→C dönüşümlerinden biri görülmektedir.

Hem A varyantına (normal enzim aktivitesi olan) hem de A⁻ varyantına (enzim eksikliği olan) birçok Afrikalı populasyonunda yaklaşık 0.2 sıklıkta rastlanılmaktadır. A varyantının altında yatan mutasyon en eski mutasyondur ve A⁻ varyantının altında yatan mutasyon ise en yeni mutasyondur. Bu nedenle A⁻ allelinin diğer alleler nötral iken sıtmaya karşı pozitif seçim göstermesi fikrini mantıklı kılmaktadır. Vulliamy ve arkadaşları (1991) insan populasyonlarında tek bir genetik lokus içindeki allel frekanslarının belirlenmesinde rastgele genetik sürüklenme ve seçilimin rolünün analizi için G6PD çalışmalarının ideal olacağını ileri sürmüşlerdir.

Yukarıda değinildiği gibi laboratuvarımızda yürütölen çalışma sonucunda Türk popölasyonunda en sık olarak Akdeniz tipi mutasyon bulunmuştur, bu mutasyonu gözlemediğimiz bireyler daha sonra 376. nükleotitteki A→G dönüşümü ağıısından analiz edilmiş, A⁺ olan bireylerde 202. nükleotitteki G→A dönüşümünün varlığı DNA dizi analizi ile gösterilmiştir. DNA dizi analizi sonucu iki erkek ve iki kadın hastada 202 G→A mutasyonu saptanmıştır. 202. nükleotitteki G→A mutasyonunu heterozigot olarak taşıyan iki kız hastanın diğer kromozomlarının Med mutasyonunu taşıdığı daha önceden bulunmuştur. Yani bu bireyler Med/202 genotipi için bileşik heterozigotturlar.

Bu mutasyonları saptayamadığımız bireyler tüm eksonları için en fazla mutasyonun bulunduğu eksonlardan başlanarak dizi analizine sokulmuşlardır. Halen elimizde çalışılmaya devam edilen örnekler bulunmaktadır.

İki ailede de ekson 9'da bulunan Chatam 1003 G→A mutasyonunu gözlemedik. Bu mutasyonu gözlemediğimiz bireylerden biri erkek diğeri ise kadındı. Çalışılan kadın hasta olduğu için diğer kromozomunda da muhtemelen başka bir mutasyonu taşımaktadır (chatam/...). Bu mutasyonun bulunabilmesi için bu bireyin diğer eksonlarına DNA dizi analizi uygulanmaya devam edilmektedir. Bu mutasyon sonucunda 335. Pozisyondaki amino asit olan alanin, treonin ile yer değiştirmektedir. Bu mutasyon ilk olarak bir Hintli ve bir Suriyeli erkekte Vulliamy ve ark. tarafından tespit edilmiştir (1988). 2. Sınıf varyantlara dahil olup bir kesim noktası yaratmamaktadır.

Çalışma sırasında dikkat çeken diğer bir nokta da kadın bireylerde X'e bağlı kalıtım nedeniyle bu bozukluğun çok nadir olarak

homozigot durumda taşıyor olmasıdır. Erkeklerde hemizigotluk söz konusudur. Ayrıca 5 bireyde ise birleşik heterozigotluk durumu bulunmaktadır. Böyle bireyler hem Akdeniz tipi mutasyonu hem de G6PD A⁻ bir arada taşımaktadırlar. Yani bir kromozomları 563 C→T dönüşümüne, diğer kromozomları 376 A→G dönüşümüne sahiptir (Med/202). Bu bireylerden ikisi hasta çocukların anneleri geri kalanlar ise hasta olan çocuklardır.

G6PD eksikliğinin genetik düzeyde araştırılması ile yapı-fonksiyon ilişkisi, X'e bağlı kalıtımın özellikleri ve populasyonların kökeni hakkındaki bilgilerimiz artacaktır. Bu güne kadar yapılmış olan çalışmalar ile enzimde olan mutasyonların enzim aktivitesini ne şekilde etkilediği, enzimin NADP bağlama bölgesi bulunmuştur. Ayrıca X'e bağlı olarak kalıtılan bu gendeki mutasyonların klinik şiddeti kadınlarda X'in inaktivasyonuna bağlı olarak değişim göstermektedir. Dolayısıyla G6PD geninin çalışması biyokimya ve populasyon genetiği çalışmalarında bilgi birikiminin olmasını sağlamaktadır.

Bu çalışmanın devamında sayı daha da artırılarak farklı bölgelerden bireylere ait bir profil çıkarılmalıdır. Ayrıca bulunan mutasyonların dışında farklı varyantların olup olmadığı gözden geçirilmelidir. G6PD 13 eksondan oluşan büyük bir gen dir ve içerisinde oldukça fazla mutasyonu taşımaktadır. Oluşan mutasyonlar her zaman bir enzim kesim noktası oluşturmamaktadır. Bu tez çalışması sırasında kullanılan DNA Dizi Analizi tekniği bu mutasyonların saptanmasında kullanılan en güvenilir yoldur ve rutin laboratuvar çalışmalarında kullanılmalıdır.

Ülkemizde de dünyada olduğu gibi sıklıkla rastlanılan bu genetik bozukluğun karakterizasyonun yapılarak, toplumun bu hastalık

tarafından taranması toplum sağlığı açısından önemlidir. Bu Şekilde doğum 6ncesi tanı konulması m6mk6n hale getirilerek mutant gen sıklığının arttırılması 6nlenebilir.




6. KAYNAKLAR

- Beutler E. Study of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: History and Molecular Biology. Am. J. Hemat.1993; 42:53-58
- Beutler E, Vulliamy T, Luzatto L. Hematologically Important Mutations: Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase. Blood Cells,Molecules, and Diseases 1997; 23:(15):302-313, <http://rialto.com/favism/mutat.htm> ,1998
- Beutler E,Kuhl W. Linkage between a Pvu II restriction length polymorphism and G6PD A- 202 A/376 G: evidence for a single origin of the common G6PD A- mutation. Am.J. Hum.Genet. 1990, 85(1):9-11. Pub Med ID 1972698
- Beutler E, Kuhl W.The NT 1311polymorphism of G6PD:G6PD Mediterranean mutation may have originated independently in Europe and Asia. Am. J. Hum.Genet. 1990; 47:1008-1012 (Pub Med ID 1978554
- Chen E.Y, Cheng A, Lee A, Kuang W. J, Hillier L, Green P, Schlessinger D, Ciccodicola A, D'Urso M.Sequence of human glucose-6-phosphate dehydrogenase cloned in plasmids and a yeast artificial chromosome. Genomics 1991;10: (3);792-800
- De Vita G, Alcalay M, Sampietro M, Cappelini M. D, Fiorelli G, Toniolo D. Two point mutations are responsible for G6PD polymorphism in Sardinia. Am. J. Hum. Genet 1989;44:233-240 Pub Med ID 2912069

- Horton H.R, Moran L.A, Ochs R.S, Rawn J.D, Scrimgeour K.G. Principles of Biochemistry 2nd Ed. Prentice Hall, Inc. 1996, pp.400-403
- Jandl J.H. Blood-Textbook of Hematology. 1987,pp.335-349
- Kaplan M, Renbaum P, Levy-Lahad E, Hammerman C, Lahad A, Beutler E. Gilbert Syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dose dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia. PNAS USA, 1997;94:(22):12128-12132
- Kurdi-Haidar B, Mason P. J, Berrebi A, Ankra-Badu G,Al-Ali A,Oppenheim A, Luzatto L. Origin and spread of the glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD Mediterranean) in the Middle East. Am. J. Hum. Genet. 1990; 47:1013
- Miwa S, Fujii H. Molecular Basis of Erythroenzymopathies Associated With Hemolytic Anemia: Tabulation of Mutant Enzymes. Am. J. Hemat. 1996; 51: 122-132
- Nathan D.G, Orkin S.H. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood. Vol.1 5th Ed. W.B. Saunders Co, Philedelphia. 1998, pp. 701-726
- Nathan D.G, Oski F. A. Hematology of infancy and Childhood. W.B. Saunders Co. Philedelphia, London, Tokyo. 1981,pp. 608-636
- Sanger F, Ninlen S, Coulson A.R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors.PNAS USA, 1977; 74: 5963-5969

- Say B, Özand P, Berkel İ, Çevik N. Erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Turkey. *Acta Paediatrica Scandinavica*, 1965, 54; 319-324
- Takizawa T, Yoshida A. Molecular abnormality of the common glucose-6-phosphate dehydrogenase variant, G6PD A(+) and restriction length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet.* 1987, 41:A241 (Abstract)
- Yoshida A, Takizawa T. The same extra Fok I cleavage site exists in glucose-6-phosphate dehydrogenase variants A(+) and A(-). *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1988, *Am. J. Hum. Genet.* 43:131-13
- Ulusu N. N, Kuş M.S, Tezcan E.F. Glukoz-6- Fosfat Dehidrogenaz: Moleküler ve Kinetik Özellikleri. *Turkish J Biochem* 1997; 2:25-33
- Vulliamy T. J, D'Urso M, Battistuzzi G, Estrada M, Faulken N.S, Martini G, Calabro V, Poggi V, Giordano R, Town M ve ark. diverse point mutations in the human glucose-6-phosphate dehydrogenase gene cause enzyme deficiency and mild or severe hemolytic anemia. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* .1988, 85(14):5171-5
- Vulliamy T. J, Othman A, Town M, Nathwani A, Falusi A.G, Mason P.J, Luzatto L. Polymorphic sites in the African population detected by sequence analysis of the glucose-6-phosphate dehydrogenase gene outline the evolution of the variants A and A⁻. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* . 1991, 88(09): 8568-71

- Vulliamy T, Luzatto L, Hirono A, Beutler E. hematologically important mutations: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. Blood Cells Molecules and Diseases 1997, 15:302-313
 - Williams W. J, Beutler E, Erslev A.J, Lichtman M.A. Hematology 4th Ed. 1990,pp. 591-605
 - Yen M.Y, Yen T.C, Pong C.Y, Liu J.H, Wei Y.H. Mitochondrial DNA Mutation In Leber's Hereditary Optic Neuropathy. Investigative Ophthalmology & Visual Science, 1992; 33:(8)
- 

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ceren ACAR

Doğum Yeri: ANKARA

Doğum Yılı: 19.01.1975

Medeni Hali: Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Lise : 1990-1993 Özel Yüce Fen Lisesi

Lisans : 1993-1997 Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji
Bölümü

Yabancı Dil : İngilizce

İş Tecrübesi : H.Ü. Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Araştırma Görevlisi