

T.C.
DICLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DIYARBAKIR BÖLGESİNDE BETA-TALASEMİ TARAMASINDA
BELİRLENEMEYEN MUTASYON TİPLERİNİN DİZİ
ANALİZİ YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MURAT YURT

**DANIŞMAN
PROF.DR.M.SABRİ BATUN**

BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DIYARBAKIR 2009

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DİYARBAKIR BÖLGESİNDE BETA-TALASEMİ TARAMASINDA
BELİRLENEMEYEN MUTASYON TİPLERİNİN DİZİ
ANALİZİ YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

MURAT YURT

**DANIŞMAN
PROF.DR.M.SABRİ BATUN**

BİYOKİMYA VE KLİNİK BİYOKİMYA ANABİLİM DALI


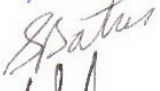

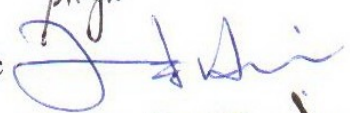

DİYARBAKIR 2009

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRLÜĞÜ

“Diyarbakır Bölgesinde Beta Talasemi Taramasında Belirlenemeyen Mutasyon Tiplerinin Dizi Analizi Yöntemiyle Araştırılması” isimli Yüksek Lisans Tezi 09.09.2009 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Tez Danışmanı : Prof.Dr.M.Sabri Batun
Tezi Teslim Eden : Murat Yurt

Jüri Üyesinin

	Ünvanı	Adı Soyadı	
Başkan	: Prof. Dr.	Nuriye Mete	
Üye	: Prof. Dr.	M.Sabri Batun	
Üye	: Prof. Dr.	F.Birgöl Işık	
Üye	: Prof. Dr.	Levent Erdiç	
Üye	: Prof. Dr.	Süleyman Daşdağ	

Yukarıdaki imzalar tasdik olunur.

15.09.2009



Prof. Dr. Yusuf NERGİZ
Dicle Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR SAYFASI

Bu alıŐma; T.C. Sağlık Bakanlığı Ana ocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel M¼d¼rl¼ė¼, Diyarbakır İl Sağlık M¼d¼rl¼ė¼ ve Dicle Üniversitesi Tıp Fak¼ltesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı işbirliği ile yapılmıştır. B¼ylesine b¼y¼k çaplı bir mutasyon taramasında, doğal olarak, ¼rneklerin toplanması yaklaşık 2 aylık bir s¼re boyunca s¼rd¼. Özellikle ilçelerde yaptığımız taramalar için haftaiçi her sabah erkenden yola çıkılıp akŐam geç saatlerde geri d¼n¼l¼yordu. Bu yorucu tempoda g¼n¼ll¼ olarak g¼rev alan t¼m hocalarıma,arkadaŐlarıma,Y¼ksek Lisans eğitimim s¼resince bilgi ve deneyimleriyle ¼rnek olan değerli hocalarıma, y¼ksek lisans tezimin hazırlanmasında ve eğitimim s¼resince bilgisi, ¼nerileri ve hosėorus¼yle her zaman katkıda bulunan tez danıŐmanım Prof. Dr. Sabri Batum'a, laboratuarda beraber çalıŐmaktan mutluluk duyduğum değerli arkadaŐlarıma, her zaman sevgisi ve desteğisiyle yanımda olan hayat arkadasım Azize'ye, neŐe kaynağımız biricik kızım Yaren'e ve emeklerini ¼deyemeyeėim aileme sonsuz teŐekk¼rlerimi sunuyorum.

Murat Yurt

İÇİNDEKİLER

Ön Sayfalar	Sayfa No
Kapak	
İç Kapak	
Onay Sayfası	
Teşekkür Sayfası	i
İçindekiler Dizini	ii
Şekiller Ve Tablolar Dizini	iii
Simgeler ve Kısaltmalar	iv
Özet Sayfaları	
Türkçe Özet.....	v
İngilizce Özet.....	vii
Tez Metni	
Giriş ve Amaç.....	1
Genel Bilgiler.....	3
Gereç ve Yöntem.....	31
Bulgular.....	45
Tartışma ve Sonuç.....	46
Kaynaklar	
Özgeçmiş	

ŞEKİLLER VE TABLOLAR DİZİNİ

Şekil 1: Hemoglobin Molekülünün Yapısı	4
Şekil 2: “Hem”in Yapısı.....	5
Şekil 3: Ökaryotik RNA İşlenmesinin Şematik Görünümü.....	7
Şekil4: α -Benzer globin genler.....	9
Şekil5: β - Benzer globin genler.....	11
Şekil6: Beta talasemi mutasyonlarının dünyadaki yayı.....	22
Şekil7: ABI Prism 310 Genetik Analizatörü.....	32
Şekil 8: 5 no lu örnek; ivs 110 homozigot.....	45
Tablo1: Türkiye’de en sık görülen β -talasemi mutasyon çeşitlerinin genel dağılımları ve sıklıklarına göre ilk on sırada yer alan mutasyonlar.....	23
Tablo2: Daha önce yapılmış bir çalışmaya göre Diyarbakır’da ve Türkiye’de en sık görülen β -talasemi mutasyon çeşitlerinin sıklıklarının karşılaştırılması.....	24
Tablo 3: Çalışmamızda elde edilen Mutasyon türleri ve Dağılımları.....	49

SİMGELER ve KISALTMALAR

β	Beta
Hb	Hemoglobin
γ	Gamma
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HbF	Fetal Hemoglobin
δ	Delta
α	Alfa
ζ	Zeta
ϵ	Epsilon
Al	Alanin
Gl	Glisin
CO ₂	Karbondioksit
UTR	Şifrelenmeyen Bölgeler (Untranslated Region)
Cd	Kodon
mRNA	Mesajcı RNA
tRNA	Tasıyıcı RNA
A	Adenin
T	Timin
G	Guanin
U	Urasil
C	Sitosin
LCR	Lokus Kontrol Bölgeleri (Locus control regions)
BP	Baz Çifti
MCV	Ortalama Hücre Volümü (Mean Corpuscular Volum)
DNA	Deoksiribonükleikasit
RNA	Ribonükleikasit
HS	Hipersensitif
IVS	İntervening Sequence (İntron)
FSC	Frameshift Codon

ÖZET

DIYARBAKIR BÖLGESİNDE β -TALASEMİ TARAMASINDA BELİRLENEMEYEN MUTASYON TİPLERİNİN DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİYLE ARAŞTIRILMASI

Beta talasemi, özellikle Akdeniz ülkelerinde ve Türkiye’de görülen, mikrositoz ve hemolitik anemi tablosu ortaya koyan en yaygın kalıtsal bozukluklardan bir tanesidir.Çesitli ülkelerde ve aynı ülkenin farklı bölgelerinde dağılım bakımından heterojenite göstermektedir. β -talasemide, gen üstünde veya etrafında meydana gelen mutasyonlar, beta globin zincir yapımının azalmasına ya da hiç sentez edilmemesine neden olur. Zincir yapımına göre β^0 ve β^+ olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. β^0 talasemide beta zinciri hiç yapılmamaktadır. β^+ -talasemi de ise az miktarda beta zinciri yapımı vardır.

β -talasemi Türkiye’de önemli bir sağlık sorunu oluşturur. Bu hastalığın henüz kesin tedavisi yoktur, dolayısı ile moleküler tanı ve doğum öncesi erken tanı riskli aileler için büyük önem taşır. β -talaseminin moleküler düzeyde çok heterojen olması, hastalık tanısı ve önlenmesinde Türkiye için çok önemli bir engel olarak nitelendirilmiştir. Bugün otomatizasyona yönelik, tek aşamalı ve kit yapısında yöntemlerin devreye girmesi ile, bu zorluk büyük oranda aşılmıştır. 21. yüzyılda moleküler biyoloji ve genetiğin tıpta eşi görülmemiş bir devrimin öncüsü olduğuna şahit olmaktayız. Tam teşekküllü ve DNA analizine dayalı bir talasemi tanı programı, diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi, artık Türkiye’de de kullanılmaya başlanmıştır. Ülke çapında, güvenilir, etkili ve sistemli bir moleküler ve doğum öncesi erken tanı programı ve stratejisinin belirlenmesinde hükümete büyük görev düşmektedir. Sağlık Bakanlığı’nın talasemiye ve hemoglobinin diğer kalıtsal bozukluklarını ülke sağlık politikaları çerçevesinde benimsemesi çok önemlidir.

Bu programların gerçekleşmesi için, halkın yoğun şekilde eğitilmesi ve bilinçlendirilmesinin yanında, az sayıdaki araştırma merkezlerindeki bilgi birikimi, teknik altyapı ve tecrübenin klinik laboratuvarlara özveri ile aktarılması kaçınılmazdır.

Bu aşamada, bu merkezlere, gerek tekniklerin aktarılması safhasında, gerekse de daha sonraki etaplarda danışman olarak önemli görevler düşmektedir.

DNA dizi analizi,DNA’nın birincil yapısının en yüksek çözünürlüğüdür. Diğer yöntemlerle tanımlanamayan mutasyonları incelemenin en etkin yoludur.Radyoaktiviteyle

çalışılan manuel şekli, son yıllarda yerini floresan markalı kimyasallarla çalışılan otomatik yönteme bırakmıştır.

Diyarbakır bölgesinde β -talasemi mutasyon tiplerinin sıklığını tespit etmenin prenatal teşhis açısından yararı açıktır. Diyarbakır kent merkezi ve Diyarbakır'a bağlı 13 (on) ilçede (ınar, Bismil, Hazro, Silvan, Kulp, Ergani, Eğil, Hani, Lice, Dicle, Çüngüş, ermik ve Kocaköy) ilköğretim çocuklarında tarama çalışması yapıldı. Bu çalışmada ilköğretim okullarının 3. sınıflarından (ortalama 9 yaş) , 8. sınıflarına kadarki (ortalama 14 yaş) yaş gruplarından 10038 (onbin otuzsekiz) ocukta Beta-talasemi taraması gerçekleştirildi. Bu çocuklardan alınan örneklerin rutin Tam Kan Sayımı sonucunda MCV değerlerinin 79 fL'nin altında olduğu belirlenen rnekler HPLC uygulandı. HPLC ile HbA₂ değerleri yüksek (≥ 3.5) bulunan rnekler Beta-talasemi taşıyıcısı olma ihtimali gözönüne alınarak; DNA mutasyonu açısından incelendiler. Bu amaçla, Diyarbakır bölgesinde yapılan talasemi taşıyıcılığı taramasında bilinmeyen mutasyon sıklığı %26.3 bulunmuştu. Bilinmeyen mutasyon grubuna giren 33 rnek DNA dizi analizi ile araştırıldı.

Yapılan bu çalışmada,moleküler yöntemlerle belirlenemeyen mutasyonlar DNA dizi analizi yöntemiyle araştırılmış ve ; iki hastada ivs 110 homozigot mutasyonu,bir hastada 221.TTAGGC-TTACGC ivs.1.130 mutasyonu,bir hastada ivs.110 heterozigot bulunmuş,diğer hastalar normal çıkmıştır.

Anahtar Kelimeler: Diyarbakır , β -Talasemi, PCR, Mutasyon,DNA Dizi Analizi,Sekans.

SUMMARY

β -THALASSEMIA SCREENING IN DIYARBAKIR WITH SERIES ANALYSIS METHOD UNSPECIFIED TYPES OF MUTATION DETERMINATION

β -thalassemia, especially in the Mediterranean Countries and Turkey, and hemolytic anemia microcytose table sets out is one of the most common inherited disorders. Various countries and different regions of the country in terms of distribution is heterogeneous. In β -thalassemia, gene mutations that occur on or around the beta globin chain of production to low or no reason not to be synthesized. Chain β^+ and β^0 to the construction according to the two types are available. β^0 beta chain in the thalassemia, ever is done here. β^+ -thalassemia in beta chain of the construction is only slightly.

β -thalassemia in Turkey is an important health problem. Yet there is no definitive treatment of this disease, because the molecular diagnosis and early prenatal diagnosis is very important for families at risk. Be very heterogeneous of the β -thalassemia molecular level, disease diagnosis and prevention is very important for Turkey as an obstacle. Today, the automation, single-stage structure and kit to take effect with the methods, these difficulties were largely overcome. 21. century molecular biology and genetics of the leader of a revolution in medicine is unprecedented to witness. Based on DNA analysis and a fully recognized thalassemia program, as well as in other Mediterranean countries, is now being used in Turkey. Country-wide, reliable, effective and systematic molecular and early prenatal diagnosis program and strategy to the government in determining the major task is dropped. Other inherited disorders of hemoglobin from the Ministry of Health and thalassemia health policy within the framework of the country is very important to adopt. For the fulfillment of this program, public education and awareness been intensified in addition, knowledge of the few research centers, technical infrastructure and transfer of experience with self-sacrifice is inevitable in the clinical laboratory. At this stage, these centers, both during the transfer of techniques, and more important role as a consultant for the next stage is.

DNA sequence analysis, the primary structure of DNA highest resolution. Radioactivity is working with the manual method, in recent years, working with the fluorescent chemical branded gave way to the automated methods. B-thalassemia mutations in Diyarbakir types of determining the frequency of prenatal diagnosis is clear benefits. Diyarbakir and Diyarbakir city center connected to the 13 (thirteen) in the county (Cinar, Bismil, Hazro, Silvan, Kulp, Ergani, Egil, Hani, Lice, Dicle, Cungus, Cermik and Kocakoy) screening study was done in primary school children. In this study, 3 of primary schools classes (average 9 years), 8 classes to date (average 14 years) age groups 10038 (ten thousand thirty-eight) in children with beta-thalassemia screening was performed. This routine of samples taken from children as a result of Full Blood Count MCV values that are determined to be under 79 fL'nin HPLC samples were performed. HPLC with HbA2 values high ($\geq 3.5\%$) contained examples of beta-thalassemia carriers taking into account the probability that DNA mutation analyzed. This end, the thalassemia carrier screening in Diyarbakir region of unknown %26.3 frequency of mutation was found. DNA sequence analysis of 33 samples of unknown mutations with the group entered was investigated.

This study can not be identified by molecular methods for mutation by DNA sequence analysis methods have been investigated and two ivs 110 in patients with homozygous mutations, in a patient 221.TTAGGC-TTACGC ivs.1.130 mutation, found in a patient has ivs.110 heterozigot other patients were normal.

Key Words:Diyarbakir, β -Thalassemia, PCR, mutations, DNA sequence analysis, sequence.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Talasemi ilk defa 1925'te yaşamın ilk yıllarında ileri düzeyde anemi ve splenomegali gelişen hastalarda Thomas Cooley ve Pearl Lee tarafından tanımlanmıştır(1-2).Daha sonra benzer vakaların görülmesi üzerine bu hereditör hemolitik anemiye Van Jaksch anemisi,splenik anemi,Akdeniz Anemisi gibi isimler verilmiştir.1936'da ise George Whipple ve Lesley Bradford inceledikleri vakaların Akdeniz civarı ülkelerde daha sık görülmesi nedeni ile hastalığa Yunanca deniz anlamına gelen talasemi adını vermişlerdir.Ancak daha sonra bu hastalığın yalnız Akdeniz ülkelerinde değil diğer toplumlarda da bulunduğu belirlenmiştir(2-3).

Beta-talasemi (β -talasemi), en sık görülen tek gen hastalıklarından biridir(4-5). β -globin zincirinin yeterli düzeyde sentez edilememesi ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır (6).

Dünya nüfusunun yaklaşık %4.5'i Beta-talasemi taşıyıcısıdır. Talasemi'nin yüksek bir sıklıkta görüldüğü talasemi kuşağı adı verilen bölgeler Türkiye'nin de üzerinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinden başlayarak; Kuzey Afrika, Ortadoğu, Hindistan ve Güneydoğu Asya'ya kadar uzanır (7, 8).

Beta talasemi taşıyıcı sıklığı Türkiye genelinde %2 olmakla birlikte bazı yörelerde %10'a kadar çıkmaktadır.Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye'de beklenenin de üzerinde β -talasemi' li çocuk doğmasının nedenidir.Hastalık,hafif klinikli β -talasemi intermedia ile transfüzyona bağımlı β -talasemi majör arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmekle birlikte Türkiye'de β -talasemi majör olguları ağır basmaktadır(9).

Günümüzde β -talasemi'ye yol açan moleküler defektler oldukça iyi bir şekilde incelenmiştir. Hastalığın en önemli nedenini, β -talasemi'de görülen büyük delesyonlar değil; gen içindeki nokta mutasyonlar oluşturmaktadır. Bu alanda tesbit edilen ilk mutasyonlar, DNA dizi analizi ile tanımlandıktan sonra, 1987 yılında rutin kullanıma giren PCR tekniği ve direkt DNA dizi analizi ile tesbit edilebilmişlerken; son 15 yılda. β -talasemi'ye yol açtıkları bilinen mutasyon sayıları büyük bir hızla artmış ve mutasyon çeşitlerinin sayısı günümüzde 200'ü geçmiştir. Bu geniş moleküler çeşitliliği basite indirgeyen bir faktör, tüm bu mutasyonların her toplumda görülmemesi ve mutasyonların etnik gruplara özgün olmasıdır. Genelde bir toplumda az sayıda mutasyon (6 -8 çeşit), o toplumdaki β -talasemi genlerinin

%90-95'ini oluşturmaktadır. Türkiye'de bu genel kural (6-8 çeşit mutasyonun talasemi mutasyonlarının %90-95'ini oluşturması) geçerli değildir. Türkiye'deki β -talasemi mutasyonlarının çeşitliliği diğer Akdeniz ülkelerine oranla daha karmaşıktır (10).

Klinik ve laboratuvar verileri ışığında kolayca tesbit edilebilen Talasemi hastalığının aksine; Talasemi taşıyıcılarının kesin olarak tesbit edilmesi için moleküler düzeyde beta Talasemi mutasyon analizlerinin yapılması gerekmektedir. Taşıyıcıların kesin tesbitindeki bu zorluk, toplum taramaları sonucunda bir bölgenin Talasemi mutasyon sıklığının ve çeşitliliğinin belirlenmesini amaçlayan çalışmaları daha anlamlı kıldığı gibi, o bölgeye yapılacak sağlık hizmetleri yatırımlarını da etkileyeceğinden bir sağlık stratejisi olarak da önemli bir konudur. Beta talasemi vakalarının sık görüldüğü Dünya talasemi kuşağında yer alan Türkiye'de taşıyıcı bireylerin saptanması ve bölgelere göre mutasyon tiplerinin belirlenmesi genetik danışmanlık hizmetlerini ve prenatal tanı uygulanmasını kolaylaştıracağı gibi doğacak hasta bireylerin sayısının artmasının önüne geçebilecek koruyucu bir uygulama olarak önem arz ediyor.

Kesin tedavisi bulunmayan bu genetik hastalığın, özellikle, akraba evliliklerinin sık gerçekleştiği Türkiye'de maddi ve manevi açıdan bir sorun oluşturduğu gerçekliği göz önüne alındığında Türkiye'deki mutasyon tiplerinin bölgesel görülme sıklıklarının tesbit edilmesi prenatal tanıya yönelik hizmetler veren laboratuvarlarda daha hızlı, daha kolay ve daha düşük maliyetle hizmet verilmesi sonucunu doğurur.

Bu tezin konusu olan çalışmada, Diyarbakır İl merkezi ve 13 ilçesinde gerçekleştirilen toplum taraması ile yaşları 9 ile 16 arasında değişen ilköğretim çağındaki 10038 (Onbinotuzsekiz) çocuktan alınan tam kan örneklerinin moleküler analizleri yapıldıktan sonra belirlenemeyen mutasyonlar grubuna alınan 33 örnek dizi analizi yöntemiyle araştırılmıştır.

Diyarbakır'da ilk defa bu denli büyük bir genişlikte yapılan β -talasemi toplum taraması sonucu elde edilen veriler hem Diyarbakır bölgesinin talasemi mutasyon çeşitliliği hakkında bilgi verecek hem de Türkiye ve Dünya'daki benzer çalışmalara bir katkı sunacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

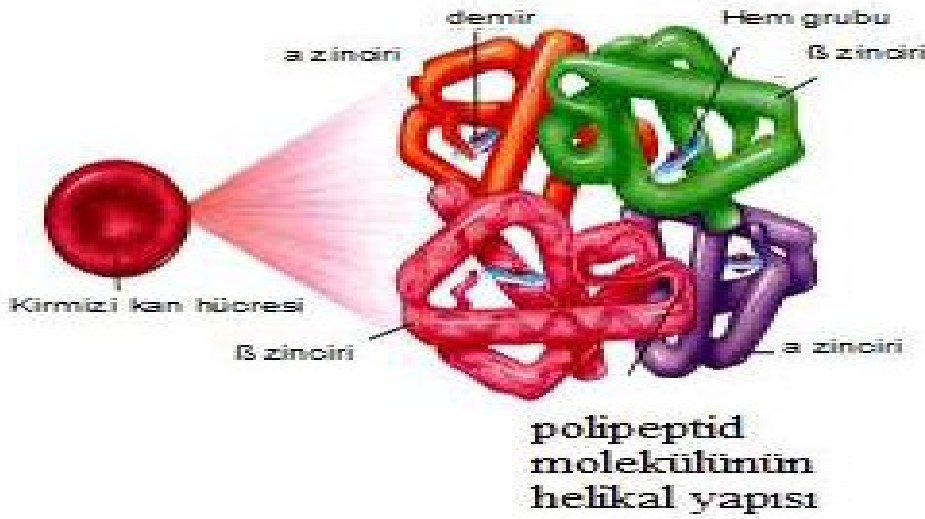
Kalıtsal hemoglobin hastalıkları, insanlarda en yaygın olarak görülen tek gen bozukluklarıdır(11). Bunlar arasında oldukça geniş bir genetik yelpazeyi kapsayan talasemiler, hemoglobin tetramerini oluşturan globin zincirlerinin bir ya da daha fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğuna bağlı olarak ortaya çıkarlar. Talasemiler sentezi bozulmuş globin zincirine göre α , β , γ , δ , $\delta\beta$, ϵ $\gamma\delta\beta$ talasemi olarak adlandırılır. En sık görülen tipleri α ve β -talasemidir(12). β -talasemi otozomal resesif geçiş gösteren genetik hastalıklar arasında dünyada en sık görülenidir. Akdeniz, Orta Asya, Afrika'nın bazı bölgeleri, Hindistan ve Asya başta olmak üzere dünyanın her yerinde yaygın olarak görülen hastalığa, karakteristik talasemi kuşağında bulunan ülkemizde de her bölgede rastlanabilmektedir(13,14,15). Dünya üzerinde 80 milyonu β -talasemi taşıyıcısı olmak üzere yaklaşık 270 milyon (dünya nüfusunun %4.5'i) talasemi taşıyıcısı mevcuttur (8,16,17,18). Türkiye'de ise β -talasemi taşıyıcılığı oranı ortalama %2 iken, bu sayı Türkiye'nin bazı yörelerinde %10'a kadar çıkmaktadır (9).

Bütün talasemi formlarında ortak olan; hemoglobindeki globin zincirlerinin üretiminde bir dengesizliğin söz konusu olmasıdır. β -talasemide α globin zincirlerinin, α -talasemide ise β -globin zincirlerinin dengesiz üretimi söz konusudur. Alfa ve Beta zincirlerinin azalmış olması veya hiç olmaması ile sonuçlanan yüzlerce değişik mutasyon α ve β -globin gen lokuslarında tanımlanmışlardır. Alfa talasemi daha ziyade Uzak Doğu'da görülürken, β -talasemi, Akdeniz ülkelerinde siktir. β -Talasemi, β -globin geninde 200'ün üzerinde değişik mutasyonlar sonucu β -globin zincirlerinin; yokluğu (β^0 -thal) veya sentezinin azalması (β^+ -thal) ile sonuçlanan yaygın görülen bir otozomal-resesif bozukluktur. β -Talasemi'den sorumlu genetik defektlerin %95'inden fazlası β -globin geninin moleküler işlevlerini etkileyen nokta mutasyonlardırlar. Mutasyonların az bir kısmı ise gen delesyonları sonucu meydana gelirler (16,19,20,21).

2.1. Hemoglobinin Yapısı Ve Özellikleri

Hemoglobin, akciğerlerden çevre dokulara oksijen taşımaya ek olarak CO₂'nin dışarı atılmaya üzere dokulardan akciğerlere taşınmasını da sağlayan bir proteindir(22). En yüksek oranda akciğerden doku kapillerine oksijen taşınması fonksiyonu gördüğü eritrositlerde bulunur(23). Hemoglobin(Hb) molekülünün moleküler ağırlığı 64.500 dalton, maksimum çapı

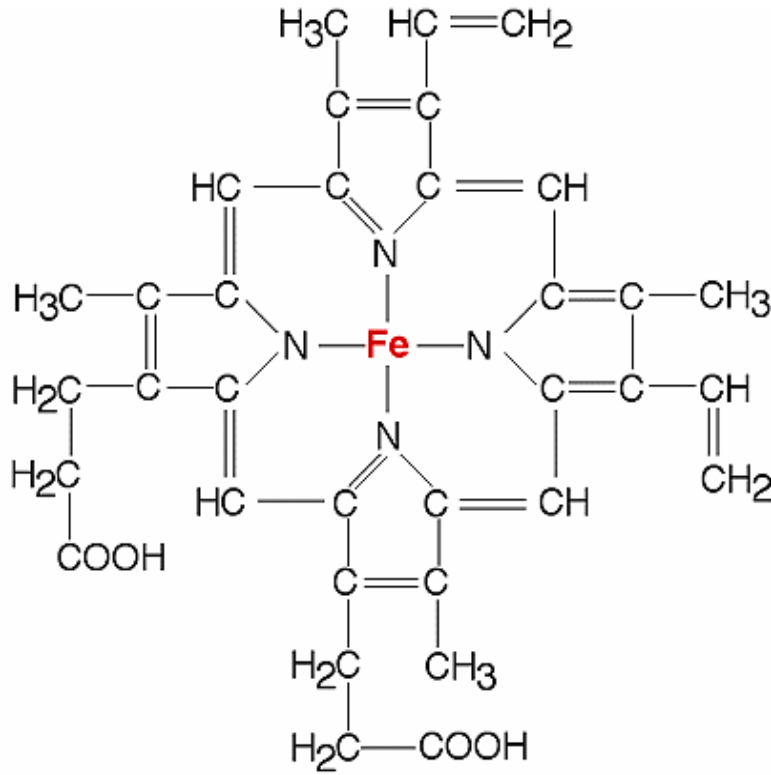
6.4nm dir.Tetramer yapıda olan hemoglobin molekülünün ‘globin’ adı verilen protein parçası ile ‘hem’ halkasından oluşmaktadır.Hemoglobin molekülünde bulunan hem halkası bütün hemoglobinlerde aynıdır.Buna karşılık globin zincirleri,aminoasitlerin cins,sıra ve sayısı açısından farklılık gösterir(24).(şekil 1)



Şekil 1. Hemoglobin molekülünün yapısı

2.1.1 ‘Hem’in yapısı

Hem grubu 4 pirol halkasından meydana gelen protoporfirin IX halka sistemi ile bir demir atomundan oluşmaktadır.Metenil köprüleri ile birbirine bağlanan dört pirol halkasından meydana gelen tetrapirel halkasına yan zincir olarak iki vinil,iki propiyonat ve dört metil bağlanmıştır(25).Fe atomu porfirin halkasının dört N’i ile bağlanarak hem halkasının ortasında tutunur.Hem’in Fe^{+2} i her biri düzlemsel porfirin halkasının ayrı tarafında olan iki bağ daha yapar.Bunlardan biri globin molekülünün bir histidin kalıntısının yan zincirine bağlanırken diğeri ise oksijen bağlamaya uygundur.Böylelikle hemoglobin oksijen taşıma pozisyonuna sahip olur(26).(şekil 2)



Sekil 2. Hem'in yapısı(27)

2.1.2 Gen Ekspresyonunun Temeli

Yapısal bir gen, polipeptid gen ürünü kodlayan bir gendir. Transkripsiyon ve düzenleyici diziler olarak bölgelere ayrılabilir. Düzenleyici bölgeler, genin hem 5' hem de 3' bölgelerinde yer alırlar. Bunlara ek olarak, intronlarda da iç düzenleyici bölgeler bulunabilir. Bazı düzenleyici bölgeler, genin çok uzağında da yer alabilirler.

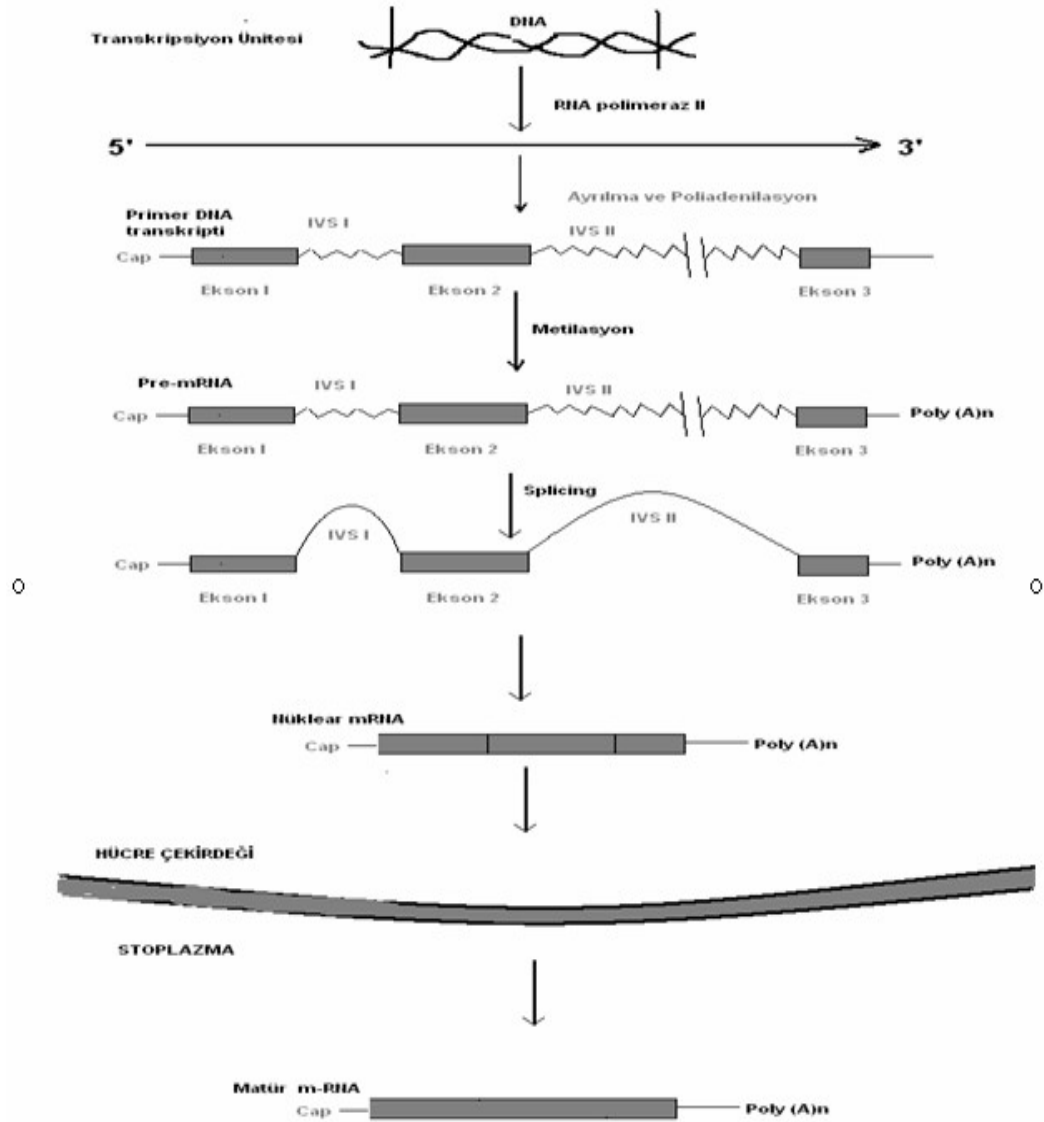
Gen ekspresyonundaki ilk adım; bir DNA iplikçisindeki nükleotid baz dizisinin, RNA'ya karşıt gelen (komplementer) diziye dönüşümü yani; "Transkripsiyondur". RNA, 5'→3' yönünde sentezlenir (28,29). (Şekil 3)

Başlangıçta RNA polimeraz DNA çift sarmalına bağlanır. Bu noktada DNA açılmaya başlar ve RNA sentezi uzama ile başlar. Polimeraz, DNA boyunca hareket ettikçe mRNA oluşur. Polimerazın hemen ardından, DNA tekrar kapanmaya başlar. Sonunda, RNA polimeraz, DNA'dan uzaklaştırılır. Bu noktada, durağan olmayan öncül transkriptin oluşması tamamlanır; durağan olmadığından da hemen modifikasyona uğrar (29).

Transkripsiyon, DNA'nın spesifik bir bölgesinden başlar. Bu pozisyon bir genin hemen başlangıcında (5' ucunda)dır. Bu transkripsiyon başlangıç noktası "**Promoter**" olarak adlandırılır. Promoter, kodlanmayan kısa bir DNA nükleotid dizisi olup; RNA-polimeraza bağlanarak, transkripsiyonun başlamasını düzenlemektedir. Transkripsiyon başlama noktasının hemen üzerinde iki belirgin promoter bölgesi tanımlanabilir. Bu diziler, evrim boyunca çok iyi korunmuşlardır ve bunlara (consensus sequences) konsensus sekansları (dizileri) adı verilir. Bu sekanslar, RNA polimerazın bağlanarak mRNA sentezinin başlangıç sinyallerinin verildiği özel dizilerdirler ve mRNA transkripsiyonunun hangi sıklık ve miktarda gerçekleşeceğini belirler. Prokaryotlarda altı bazlık (TATAAT) ve (TTGACA) şeklinde diziler, genin başlangıcından 10 ve 35 bazlık mesafelerde yer alırlar. Bunlar, "box" kutu olarak tanımlanırlar. Eukaryotlarda, bu promoter dizilerde farklılık bulunmaktadır. Transkripsiyonda kullanılan DNA dizilerinin tümüne **Transkripsiyon üniti** veya Operon denir (Şekil 3). Transkripsiyon üniti, Promoter'de başlar ve Terminatörde sonlanır. Diğer bir deyişle, 7-metil guanosa içerir 5' Cap bölgesinden başlar. (Guanosin-7-metiltransferaz etkisiyle, Guanosa, öncül mRNA'nın birinci ve ikinci riboz gruplarına trifosfat köprüsü ile bağlanır. 7 nolu pozisyondaki guanosa ve RNA zincirinin başlangıcındaki iki başlangıç riboz metile olur). Bu bölge protein sentezinin başlatılmasında görev alır. Daha sonra, aminoasit kodlayan ekson bölgeleri ve aminoasit kodlamayan intron bölgeleri üzerinden poli(A) sinyalini içeren 3'UTR bölgesiyle sonlanır. Promoter bölgesinde 5' ucu için proximal, terminatör bölgede 3' ucu için de distal terimleri kullanılır (29,30,31).

DNA'da çeşitli düzenleyici diziler bulunur, bunlar, oldukça kısa DNA dizilerinden oluşurlar. Her dizi, bir spesifik protein için olup bu proteinlere **transkripsiyon faktörleri** denir. Bir transkripsiyon kompleksi oluşturan bu transkripsiyon faktörleri adı verilen proteinler bir kompleks olarak DNA'ya bağlanırlar ve bir bağlanma noktası oluştururlar (29).

Her globin geninde 3 adet ekson ve 2 adet intron (intervening sequence: IVS) bulunur. Globin zinciri kodlayan dizilerin olduğu gen bölgelerine **ekson** denilirken; protein kodlamayan (untranslated) diziler içeren bölgelere de **intron** adı verilir (Şekil 3).



Şekil 3. Ökaryotik RNA işlenmesinin şematik görünümü. (32)

Translasyona uğramadıkları halde globin genlerinin 5' ve 3' bölgelerindeki diziler gen ekspresyonunda rol aldıklarından çok önemlidirler. Promoter bölge, genin 5' ucunda bulunup transkripsiyonun başladığı bölgenin önündeki 100 baz çiftlik alanı kapsar ve transkripsiyonun başlaması için gerekli hazırlıklardan sorumlu baz dizilerini içerir(33,34,35).

Eukaryotlarda bir gen tek bir polipeptidi kodlar ve öncül transkript, olgun haberci mRNA'ya dönüştürülür. Geni oluşturan DNA dizisinden nükleer RNA'nın enzimatik yolla kopyalanmasına "**Transkripsiyon**" denir. Transkripsiyon sonucu meydana gelen RNA'ya ise heterojen nükleer RNA (hnRNA) denir. İntron ve Eksonları olan heterojen nükleer RNA'nın olgun mRNA'ya dönüşmesi için intronların kesilip diziden uzaklaştırılmalarına "**Processing**" denir. Bu işlem, öncül mRNA'nın 5' ucuna 5' cap ve 3' ucuna da sayısız

adenin nükleotidlerinin eklenmesiyle oluşturulur. Öncül mRNA'ların 3' ucu , AAAUAA kısa dizisinden hemen sonra spesifik bir endonükleaz ile koparılır. Ardından, bu transkripte 100-250 adenin nükleotidi poli-A-polimeraz aracılığıyla bağlanır (poliadenilasyon) (**Şekil 3**). Bunun ardından, eksonların birbirine yapıştırılması (**Splicing**) gerekir. Eksonların 5' kısmına verici (donör); 3' kısmına da alıcı (acceptor) adı verilir. Intronlar enzimatik yolla kesilip çıkartıldıktan hemen sonra; verici ve alıcı yerler yapışarak matür mRNA oluşmaktadır. Eksonda verici kısmın içinde; G(Guanin) ve T(Timin) yani GT dizisi bulunmaktadır. Alıcı kısmında ise; A(Adenin) ve G(Guanin) kısaca AG dizisi bulunmaktadır. Bunlar korunmuş dizilerdirler. Olgun eukaryotik mRNA, öncül RNA'dan intronların çıkarılması ile meydana gelir. Kodlanmayan bir dizi, çevrim başlangıç işaretinin (AUG) hemen öncesinde yer alır. 3' ucunda ise çevrim dur işaretinin (UAA) hemen ardında kodlanmayan bir dizi bulunur. 5' cap eklenmesi ve poliadenilasyon, enzimatik reaksiyonların kapsamındadır (20,28,29).

Eukaryotik hücrede, transkripsiyon hücre çekirdeğinde, translasyon ise stoplazmada olur. Çekirdekte birtakım değişikliklere uğradıktan sonra sitoplazmaya geçen mRNA ribozomlara bağlanarak protein sentezini başlatır. mRNA üzerinde protein sentezini başlatan ve bitiren kodonlar vardır. mRNA'daki kodonları oluşturan nükleotid dizileri translasyon sırasında amino asitlere karşılık gelen diziye dönüştürülür. **Translasyon**, "başlangıç kodonunda başlar". Amino asitler, transfer RNA ile sıralanarak, dizi tamamlanır. Her amino asidin, kendi tRNA'sı vardır. Bu mRNA'daki kodona komplementerdir (anti-kodon). Örneğin; Glysin için anti-kodon CCG olan tRNA, mRNA kodonda GGC ile karşılaşılır. Bu noktada, sadece Glysin yapışabilir. mRNA'daki 1, 2, 3, 4'üncü kodonlar amino asit dizileri olarak sıralanırlar. Kodon1, her zaman AUG'dir (başlangıç kodonu). **Translasyon** (protein sentezi) hücre çekirdeği dışındaki, sitoplazmada ribozomlarda oluşur. Ribozomlar, protein ve RNA moleküllerinden (rRNA) oluşur. Translasyon başlangıcında mRNA, ribozom ve tRNA kompleksi oluşur. Bu olay IF1, IF2, IF3 gibi başlatıcı faktörlere ihtiyaç duyar.

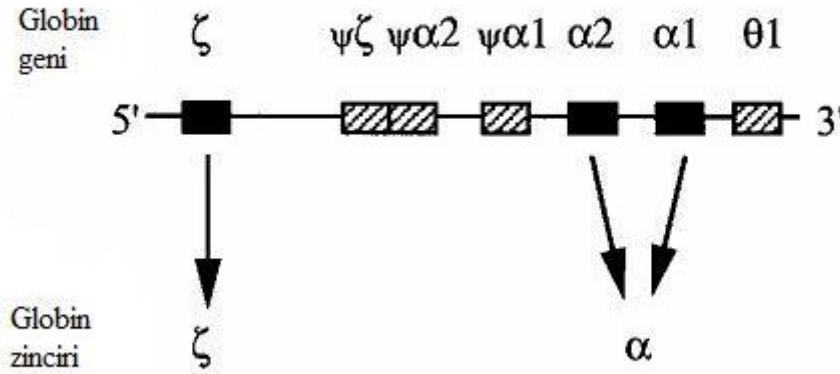
Translasyonun ikinci basamağı elongasyon (uzama) evresidir. Bir sonraki kodon tarafından belirlenen amino asit diziye eklenir. Üç fazlı bir uzama siklusu gelişir. Siklus bileşenleri; kodon tanınması, bir sonraki amino asite peptid bağlanması ve 3' yönünde nükleotidlerin hareketidir. mRNA, DUR kodonlarından (UAA, UGA ve UAG) birisine ulaşıldığında, translasyon, sona erer. Oluşan polipeptid zinciri, ribozomu terk eder (29,32,36).

2.1.3 GLOBİN GEN KÜMELERİ

Alfa globin zinciri, 16. kromozom üzerinde yerleşmiş olan iki α -globin geni (α_2 ve α_1) tarafından kodlanırken; γ, δ ve β zincirlerinin genleri (sırasıyla $\gamma^G, \gamma^A, \delta$ ve β) 11. kromozom üzerinde bulunan kendilerine ait genler tarafından β -gen kümesi içerisinde kodlanırlar. Globin genleri her iki kümede de gelişim süresi boyunca eksprese edildikleri sıraya göre düzenlenmişlerdir. İki yetişkin α -benzeri globin geni vardır, α_1 ve α_2 . Bunlardan ikincisi predominant olarak eksprese edilir. Normal yetişkinde β -globin geni, eksprese edilen major β -benzeri globin genidir. Delta ve gamma genlerinin ekspresyonları ise minimaldir (37,38).

2.1.3.1 Alfa Gen Kümesi

Alfa gen kümesi genellikle fonksiyonel bir Zeta (ζ) geni ve iki alfa (α) geni içerir. Bu alfa genleri α_1 ve α_2 olarak gösterilirler. Bu kümede ayrıca dört adet psödojen bulunur: $\psi\zeta, \psi\alpha_2, \psi\alpha_1$ ve θ_1 . Bu psödo genlerin fonksiyonları bilinmiyor ancak varlığını sürdürebilen bir globin zinciri sentez ettirdikleri söylenemez, fetal yaşamın erken dönemlerinde bu genler ifade ediliyor gibi görünüyor (12,16).(Şekil 4)



Şekil 4. α -Benzer globin genler.

2.1.3.2 β -Gen Kümesi

Beta-globin geni, 11. kromozomun kısa kolu (11p15.4) üzerinde diğer β -benzeri genlerle birlikte bir küme şeklinde bulunur. (**Şekil 5**). Bu küme beş fonksiyonel gen içerir: **5' ϵ , γ^G - γ^A - $\psi\beta$, δ - $\beta3$ '**. Bunlar gelişimsel ekspresyonlarına göre dizilmişlerdir

β globin gen kümesi β -locus control region (β -LCR) kontrolü altındadır. Bu kontrol gölgesi, ϵ geninden 5' yönünden yaklaşık 5 ile 20 kilobazlık bir aralıkta yerleşmiş major bir düzenleyici eleman olup; Gen kompleksi içerisinde bulunan bütün genlerin ekspresyonunda önemlidir. β -LCR, β gen kümesini saran aktif bir kromatin sahası oluşturmaktan ve β -benzeri globin genlerinin yüksek derecede ekspresyonundan sorumludur. Eritroid hücrelerdeki globin genlerinde olduğu gibi transkripsiyonel açıdan aktif genler, açık bir kromatin yapısı (eukromatin) gösterirler. Bu transkripsiyonel açıdan sessiz bir gen lokusundaki heterokromatinin kapalı yapısının tersidir. Bu açık yapı, nükleazlar tarafından işlenmeye duyarlı olmakla karakterizedir. β -LCR, 15 kb'lık bir bölgede dağılmış DNaz I'e duyarlı (DNaz I hipersensitif) beş adet hipersensitif (HS) kararlı yapı içerir. (HS1-5 ile gösterilirler). Bu yapılardan dört tanesi (HS1-4) eritroid spesifik iken; HS5 vücutta yaygın olarak bulunur. β -geninin 3' kısmına yaklaşık 20 Kb lık uzaklıkta diğer bir hipersensitif bölge (HS1) bulunur. β -kompleksinin her iki yanında iki uç kısımda yer alan HS bölgeleri β -gen gölgesinin sınırlarını belirler. **β -globin geninin genomik sekansı 1600 baz çiftinden (bp) oluşur ve 146 aminoasidi kodlar.** Transkript edilen bölge, **iki intron** veya intervening sequence (IVS) tarafından birbirlerinden ayrılmış kodlayıcı **üç ekson** içerir. (**Şekil 5 (b).**)

Ekson1: 1 den 29'a kadar olan amino asitlerle beraber kodon 30 için ilk iki bazı içerir.

Intron I (Intervening sequence I, IVS I) 128 baz çifti (bp) uzunluğunda olup 5' kısmında donör bölge olarak adlandırılan GT ve 3' kısmında akseptör bölge olarak adlandırılan AG dinükleotidleri arasında kalır

Ekson 2: Kodon 30'un kalan kısmı ile birlikte **31'den 104'e** kadar olan amino asitleri kodlar.

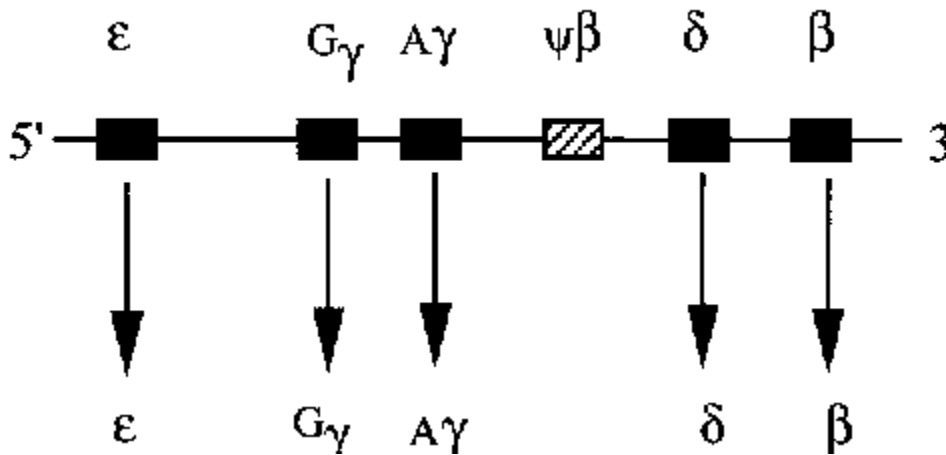
Intron II (IVS II) 850 bp'lık bir uzunluğa sahip olup yine donör ile başlayıp akseptör ile sonlanır.

Ekson 3: 105'den 146'ya kadar olan **amino asitleri kodlar**

Ekson 2, "Hem" bağlayan ve $\alpha\beta$ dimer formasyonunda rol oynayan aminoasitleri kodlarken **ekson 1** ve **ekson 3** , β -globin zincirinin hem bağlamayan kısımlarını kodlar

Gen fonksiyonu için önemli olan konsensus sekanslar (korunmuş diziler), **5' promoter** bölgede, **ekson-intron** bağlantısında, ve translasyonu yapılmayan 3'-untranslated region (**3'-UTR**)'da bulunurlar.

β globin gen promoteri, 3 önemli konsensus dizisini içerir. Bunlar, β -globin geninin hangi sıklık ve miktarda üretileceğini tayin ederler. Bunlardan en önemlisi RNA polimeraz II'nin bağlandığı **TATA** kutusu (-28 ile -31 arasındaki pozisyonda) denilen bölge olup; diğerleri, **CCAAT** kutusu (-72 ile-76 pozisyonlar arasında) ve **duplike CACCC** motifleri (distalde -86 dan -90'a kadarki kısımlarda ve proximalde -101'den -105'e kadarki pozisyonlarda). **CCAAT** ve **TATA** unsurları birçok **ökaryotik promoterlerde** bulunurlarken; **CACCC** sekansı predominant olarak **eritroid hücre-spesifik promoterlerde** bulunurlar. Bu 5' ucunda yer alan sekansların normal gen ekspresyonu açısından önemi; -80 ile -100 bölgeleri arasındaki CACCC motifleri ve özellikle TATA kutusu içerisinde ve çevresindeki sekanslardaki nokta mutasyonlardan kaynaklanan β -talasemiler nedeniyledir. 3' UTR'de bulunan konsensus sekansı, β -globin genine has olup; "downstream enhancer" adını alır ve poli(A) kuyruğunun 3' yönünde yaklaşık 600 ile 900 bp'lik bir alanda yer alan bölgeyi kapsar. β -globin geninin 3' ucuna doğru zincir sonlandırma kodonundan sonra yaklaşık 200 bp uzunluğunda **AATAAAA** olarak uzayan **poli A** sinyal dizisi de yine 3' UTR bölgesinde bulunur. Bütün globin genleri benzer yapıya sahiptirler. Her gen 5' promoter dizilerin yanında 5' ve 3' protein kodlanmayan (untranslated) gölgelere sahiptir (17,38,39,40,41,42).



Şekil 5. β -Benzer globin genler.

Hemoglobinin yapısı, fonksiyonu veya üretimi ile ilgili hastalıklar hemoglobinopatiler olarak adlandırılır(43). Genetik hastalıklar içinde önemli bir yere sahip olan hemoglobinopatilerin pek çok ülkede önemli bir sağlık sorunu oluşturduğu bilinmektedir. Bunlardan orak hücre anemisi ve talasemiler hemoglobin hastalıklarının büyük bir kısmını oluşturmaktadır. Her iki hastalık da resesif olarak seyretmekte olup, 11. kromozomun kısa kolu üzerinde yer alan β -globin gen mutasyonları sonucu ortaya çıkmaktadır(1,44,45).

2.2 TALASEMİLER

Talasemi sendromları oldukça geniş bir genetik yelpazeyi kapsar. En sık görüleni α ve β talasemidir. α -talasemi daha ziyade UzakDoğu'da görülürken, β talasemi Akdeniz Ülkeleri, dolayısıyla ile Türkiye'de sıktır.

2.2.1 β -Talasemiler

β -talaseminin nedeni, sadece delesyonlar değil aynı zamanda gen içindeki nokta mutasyonlarıdır(46,47,48). β globin sentezinin azalması (β^+) talasemi, yokluğu ise (β^0) talasemi olarak adlandırılır.(49,50). Son yıllarda rutin kullanıma giren polimeraz zincir reaksiyonu(PCR) yöntemi ve DNA dizi analizi β -talasemiye yol açtığı bilinen mutasyonların sayısı artmıştır. Tüm mutasyonların her toplumda görülmemesi ve mutasyonların etnik gruplara özgü olması, bu geniş moleküler çeşitliliği biraz basite indirgeyen bir faktör olmuştur(46,48). Bir toplumda belirlenen az sayıdaki mutasyon o toplumdaki β -talasemi genlerinin %90-95'ni tanımlamaktadır(48). Son yıllarda β -talasemiye yol açtığı bilinen mutasyonların sayısı büyük bir hızla artmış ve 200'ü geçmiştir(12).

2.2.1.1 β -Talasemiye Neden Olan Mutasyonlar

β – talasemi, β –globin genindeki mutasyonlar sonucu oluşur. Bu mutasyonların büyük bir kısmını nokta mutasyonları oluştururken daha az kısmını delesyonlar oluşturmaktadır. α -talasemilerin tersine β talasemiler, nadiren, delesyonlar sonucu meydana gelirler.

β -Talasemi'den sorumlu genetik defektlerin %95'inden fazlası β -globin geninin moleküler işlevlerini etkileyen nokta mutasyonlardır. Mutasyonların sadece az bir kısmı gen delesyonları sonucudurlar. Beta globin genindeki mutasyonları sınıflandırırken; mutasyonların gen ekspresyonundaki çeşitli kademelere etkilerine göre sınıflandırma

yapılabilir çünkü bu mutasyonlar gen ekspresyonundaki çeşitli kademeleri etkileyerek β -globin zincir sentezinin bozulmasına neden olurlar (10,19,51,52,53,54).

2.2.1.2 Gen Delesyonları

Sadece beta genlerini etkileyen en az 17 değişik delesyon tanımlanmıştır. Bunlardan biri hariç diğerleri nadir görülür. Beta geninin 3' ucundaki 619-bp delesyon en yaygın görülen delesyonel β -globin geni mutasyonudur. Bu mutasyon Intron II'den başlayıp β -globin geninin 3' sonuna kadar gider. Ancak, bu mutasyon Pakistan ve Hindistanın Sind ve Gujarati popülasyonlarında sınırlı olup; buradaki beta-talasemi allellerinin yaklaşık %50'sini teşkil eder. Hint 619-bp delesyonu beta geninin 3' ucunu ortadan kaldırır ama 5' ucu korunmuş olarak kalır. Halbuki diğer birçok delesyon, 5' ucunu ortadan kaldırıp δ -genini korunmuş olarak bırakır. Bu delesyon için homozigot olanlar β^0 - talasemilidirler. Hint delesyonu için heterozigot olanların, diğer beta-talasemilerin heterozigot formlarında olduğu gibi yükselmiş HbA₂ HbF düzeyleri vardır. Delesyonel mutasyonlar için heterozigot olan formların hepsinde yüksek HbA₂ düzeyleri sözkonusudur. Artmış δ -zincir üretimi, delesyonun yanında artmış δ -gen transkripsiyonu sonucudur ve bu da muhtemelen delesyona uğramış beta-geninin transkripsiyon faktörleri için yarışmasının azalmış olmasıdır (16,55,56).

Kalan β -talasemilerin çoğu genin içerisinde veya hemen komşuluğundaki sekanslardaki nokta mutasyonlar tarafından meydana getirilir. Bunlar tek baz değişimi, birkaç bazın minör insersiyon veya delesyonlarıdır, gen regulasyonunu etkiledikleri mekanizmalara göre sınıflandırılırlar (17).

2.2.1.3 Transkripsiyonel Mutasyonlar

β -globin genindeki promotör bölgesinde birçok değişik baz yer değiştirmeleri tanımlanmıştır. Bu konsensus dizilerindeki mutasyonlar, RNA polimerazın β -genindeki promoter bölgelere bağlanmasını önleyerek, transkripsiyonu başlatma kabiliyetinde azalmaya neden olur. Bu kategoriye giren değişik mutasyon tipleri ile ilişkili olarak, klinik şiddetlerinde önemli değişikliklerin olmasına rağmen bütün bu olgularda fenotip β^+ talasemidir. Upstream (5'ucu doğrusu) bölgesindeki düzenleyici elemanlarla ilişkili bu mutasyonlar, bu bölgedeki korunmuş dizilerin beta-globin genlerinin transkripsiyonlarının düzenleyici rollerinin önemini teyid eder ve Ortadoğuda, özellikle Afrika popülasyonlarındaki en hafif talasemi formları ile ilgili bir temel veri sunar. Bu olgularda, β -globin zincir sentezi hem

homozigot formlarda hem de çift heterozigot formlarda talasemi major'u önlemeye yeterli olup; sadece %20-30 arasında β -globin mRNA sentezi düşüklüğüne neden olurlar ve klinik olarak hafif seyirli talasemia intermedia fenotipi meydana getirirler. Bu mutasyonlardan bazıları, mRNA CAP bölgesine göre -88 ve -87 pozisyonlarında olduğu gibi **CCAAT** kutusuna yakın iken; diğer bazı mutasyonlar Cap bölgesinden 30 nükleotid uzaklıktaki **TATA** kutusu içerisinde, genellikle tek nükleotid değişimi ile meydana gelirler. Beta globin geninin 5' ucu doğrultusunda (upstream) yer alan bazı mutasyonlar, fenotipte daha az farkedilebilir bazı değişikliklerle ilişkilidirler. Örneğin:

-101 pozisyonunda C→T yerdeğiştirmesi, bahsedilen upstream bir promoter elemanla ilgili olarak "sessiz" **β -talasemi** ili ilişkilidir ki bu; tamamen normal fenotipte olup sadece çift heterozigotlardaki β -talaseminin daha ciddi formları ile etkileşimi ile saptanabilir. CAP (+1) bölgesinde bir A→C yerdeğiştirmesi bulunan sadece bir örnek, Hintlilerde saptanmıştır. Bu vaka mutasyon açısından homozigot olmasına rağmen; fenotipik olarak β -talasemi trait fenotipine sahipti (16,39,57,58).

2.2.1.4 RNA-İşlemlenme Mutasyonları

mRNA'nın çekirdeğe girmesini engelleyen tek baz mutasyonudur.mRNA'nın sürecini engelleyen tek-baz mutasyonlarının olağanüstü çeşitliliğidir (16).

Ekson ve intronların sınırları sabit-değişmez dinükleotidler tarafından meydana getirilmişlerdir: 5' ucunda (donor) GT ve 3' ucunda (akseptör) AG dinükleotidleri gibi... Bu bağlantı bölgelerinin (splice junction) herhangi birinde meydana gelen tek-baz değişiklikleri normal "RNA splicing" olayını tamamen ortadan kaldırır ve olay β^0 fenotipi ile sonuçlanır(61) .

2.2.1.4.1 Splice Kavşağındaki Mutasyonlar

Bu sekanstaki mutasyonlar splicingi farklı oranlarda etkiler ve kriptik bölge çevresinde alternatif bir splicing oluşturur.

Splice Junction (kavşak) bölgelerinde değişmeyen-sabit dinükleotidleri çevreleyen yüksek derecede korunmuş (konsensus) diziler mevcut olup; bunlar da mRNA processing işlevinde görev alırlar. Bu konsensus dizileri, donör bölgede: Intronun ilk 6 nükleotidi ve eksonun son 3 nükleotidi iken; akseptör bölgede: Eksonun ilk nükleotidi ile intronun son 10

nükleotidinden oluşur. Bu bölgelerdeki mutasyonlar, β^+ fenotipinde talasemiler ile sonuçlanır (62).

IVS-I donör bölgesinin dizilimi içerisinde tek baz değişimi ile ilgili çeşitli β -talasemiler biliniyor. Bu mutasyonlar, ilişkili oldukları fenotiplerdeki çeşitlilikten dolayı, özel bir ilgi alanı oluştururlar. Örneğin: IVS-I 'in 5. pozisyonundaki G'nin C veya T ile değişimi şiddetli β^+ talasemi formu ile sonuçlanır. Diğer taraftan IVS-I 6. pozisyonda T→C yerdeğiştirmesi Akdeniz bölgelerinde sık rastlanan ve çok hafif bir β^+ talasemi formu ile sonuçlanır (16).

RNA processing olayı, ayrıca, intronlar veya eksonlar içerisinde yeni splice (bağlanma) bölgeleri oluşturan mutasyonlardan da etkilenir. β -globin geni içerisinde splice kavşağı dışında da GT ve AG dinükleotidleri içeren başka bölgeler de bulunur. "Kriptik bölge"(Cryptic Site) olarak adlandırılan bu bölgeler normal splicing işlemi donör ve akseptör olarak kullanılmazlar. Ancak, yeni mutasyonlarla aktif hale geçen bu bölgeler yeni splice bölgeleri oluştururlar. Bu olaya *kriptik bölgenin aktivasyonu* adı verilir. Bu lezyonlar, normal splice bölgesi ile karşılaştırıldığında yeni bölgenin ne denli işlevsel olup olmadığına göre fenotipik etkileri açısından oldukça belirgin çeşitlilikler gösterirler. Örneğin, IVS-I'in 110. pozisyonunda G→A yerdeğiştirmesi, Akdeniz bölgesinde ve Ülkemizde en sık rastlanan β -talasemi mutasyon formlarından biridir. Mutasyon nedeniyle kriptik bölgenin aktivasyonu sonucu oluşan yeni bölge, normalde bulunan akseptör bölge ile yarışmaya girer ve yeni akseptör bölge, donör bölge tarafından daha fazla tercih edildiğinden normalde splicing sonucu atılması gereken 18 nükleotidlik bir parça β mRNA içerisinde kalarak kararsız bir β globin zinciri oluşumuna neden olur. Bu yeni bölge yarışma sonucu normal bölgede sadece %10 kadar splicing bıraktığı için de; fenotipik olarak şiddetli β^+ talasemi formu ortaya çıkar. Benzer şekilde, IVS-I'de 116. pozisyonda T→G değişimi sonucu yeni bir akseptör bölge oluşturan bir mutasyon, çok az veya hiç bulunmayan β -globin mRNA üretimi ile sonuçlandığından β^0 talasemi fenotipi ortaya çıkar. Beta-globin geninin IVS-2 intronu içerisinde yeni donör bölgeleri oluşumuna neden olan çeşitli mutasyonlar da tesbit edilmiştir (16,21,56,62,63).

Anormal splicing için diğer bir ilginç mekanizma eksonlar içerisindeki kriptik donör bölgelerinin aktivasyonudur.

2.2.1.4.2 Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar

β globin geninin ekson 1'deki kodon 24-27 IVS 1 donör bölgesinde gizli mutasyon bölgesi vardır. Bu bölge bir GT dinükleotidi içerir; buna komşu bölgelerde meydana gelen değişimler bunu değiştirerek konsensus donör splice bölgesine daha fazla benzemesini ve sonuç olarak aktivasyonunu sağlar ve bu olay normal splicing bölgesinin aktif olması halinde bile meydana gelebilir. Bu bölgedeki çeşitli mutasyonlar bu bölgeyi aktifleştirip RNA processing işlemi esnasında kullanıma girmesini sağlar ki; bunun sonucu anormal mRNA üretimidir. Bu mutasyonlardan en iyi bilinen üç tanesi: 19. , 26. ve 27. kodonlardaki baz değişimleri ile ilişkilidir.

19. kodonda A→G (HbMalay)

26. kodonda G→A (HbE)

27. kodonda G→T (HbKnossos)

Bu baz değişikliklerinin sonucunda bir taraftan β -globin mRNAsının azalması öte taraftan bir aminoasit yerine başka bir aminoasidin sentezi söz konusudur çünkü anormal olarak splice edilen mRNA da proteine çevrilir. Oluşan anormal hemoglobinlerin, izah edilen kodonlardaki baz değişikliklerine izafeten karşılıkları yukarıda verilmiştir. Bu Hb varyantlarının hepsi muhtemelen normal mRNA'nın toplam üretimindeki azlığa bağlı, genelde orta şiddette, bir β^+ talasemi fenotipi ile ilişkilidirler. Eksonlar içerisindeki diğer bazı splice mutasyonlar da tanımlanmışlardır (16,62).

Diğer bir processing mutasyon sınıfı; β -globin mRNAsının translasyona uğramayan poliadenilasyon sinyal bölgesi olan 3' ucundaki AAUAAA dizisi ile ilişkili olanlardır. 3' UTR bölgesinde bulunan (-AATAAAA-) konsensus dizisi bir sinyal gibi davranarak büyüyen mRNA'nın enzimatik bir yolla uygun noktadan kesilerek (RNA cleavage) genden ayrılmasını sağlar. Bu bölgede meydana gelen bir mutasyon sonucu poliadenilasyon sinyalinin yapısı bozularak mRNA'nın ayrılması 900 nükleotid sonra gelen bir başka sinyale kadar ertelenir. Böylece oluşan pre-mRNA yaklaşık iki kat daha uzun olup; hemoglobinin kararlı yapısının bozulmasına neden olacak şekildedir. Örneğin, bu bölgedeki bir T→C yerdeğiştirmesi, β -globin mRNA'sının normalde sentez edilmesi gerekenin sadece onda birinin transkript edilmesi dolayısıyla şiddetli β^+ talasemi fenotipi ile sonuçlanacaktır (16,53,62).

2.2.1.5 RNA Translasyon Mutasyonları

β -talasemi allelerinin yaklaşık yarısı RNA translasyonun değişik evrelerini etkiler ve bütün bu olgularda, β globinin üretilmediği β^0 talasemi ile sonuçlanırlar. Bu defektlerin çoğu, **frameshift** veya **nonsense** mutasyonlara bağlı premature terminasyon kodonlarının meydana gelmesinden dolayı olup; hemen hepsi exon1 ve 2 içerisinde sonlanırlar (59,60).

2.2.1.5.1 Anlamsız Mutasyonlar

Bir aminoasit kodonunu, sonlandırma kodonuna (Stop codon: UAA, UAG veya UGA) çeviren tek baz yer değiştirmeleri, yani "nonsense" mutasyonlar, mRNA'nın translasyonunu durdurur ve β^0 -talasemi ile sonuçlanırlar. Bu şekilde etkide bulunan birçok baz yer değiştirmesi tipi saptanmıştır. Örneğin; kodon 17 mutasyonu Güneydoğu Asya'da, kodon 39 C→T (CAG→TAG) mutasyonu ise Akdeniz bölgesinde yüksek bir sıklıkta görülen bu tip mutasyonlardırlar. β -globin zincir sentezinin bu tür mutasyonlarda olduğu gibi premature bir şekilde durdurulması, β^0 -talasemilerin en sık nedenleri arasında yer alır (32,64,65).

2.2.1.5.2 Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonlar

Bir veya birden fazla nükleotidin delesyonu veya insersiyonu sonucu öne veya arkaya doğru (5'→3' veya 3'→5 yönünde) oluşan nükleotid kayması ile mutasyon bölgesinden sonraki kodonların şifreleri değişerek ortaya çıkar. Bu mRNA β^0 fenotipine neden olur (66).

Farklı aminoasit dizilimli ve normalden kısa olarak oluşan mRNA'lar normal globin zinciri oluşturamazlar ve β^0 -talasemi fenotipinde olgulara sebep olurlar. Bu şekilde çeşitli "frameshift"(çerçeve kayması) mutasyonları tanımlanmıştır. Hintlilerde yaygın olan 8. ve 9. kodonlar arasında bir nükleotidin girmesi sonucu meydana gelen frameshift mutasyon (Codon 8/9 (+G)) ile yine Hintliler ve Güneydoğu Asyallarda yaygın olan 41. ve 42. kodonlarda dört nükleotidin delesyona uğraması sonucu görülen (CDs 41/42 -TTCT) frameshift mutasyonlar bunlardan ikisidir (59,67).

2.2.1.5.3 Başlık Bölgesi (Cap Site) Mutasyonları

Başlık bölgesindeki +1 nükleotid transkripsiyonun başlangıç bölgesidir. Bu pozisyonda A→C nükleotid yer değiştirmesi sonucunda "capping" yavaşlaması ve mRNA kararlılığının bozulması sonucu transkripsiyon azalır. Homozigot olgularda bile heterozigot gibi bulgu

veren bir fenotip söz konusudur.Heterozigot bireyler ise normal sayılabilecek MCV ve sınırdaki HbA₂ düzeylerine sahip sessiz taşıyıcılarıdır (59,67,68).

2.2.1.6 Dominant Geçen β talasemi ve stabil olmayan β globin varyantları

Son 20 yılda ağır β talasemiden ayrılamayan sporadik vakalar tanımlanmıştır.Bu tip vakalarda eritrosit prekürsörlerinde inklüzyon cisimcikleri çokça gözlenmektedir.Dizi analizleri moleküler düzeyde heterojenite göstermektedir.Fakat çoğu β globin geninde ekson 3' de mutasyon içermektedir.Çerçeve kayması veya prematür zincir sonlanması gözlenir.Bu düzensizlik uzamış stabil β globin gen ürünlerini oluşturur.En sık görülen mutasyon ise kodon 121'de GAA→TAA değişikliğidir (69,70).

2.2.1.7 Diğer Mutasyonlar

Translasyonu yapılmayan 3' UTR bölgesindeki +1565'den +1577'ye kadarki nükleotid dizilerini içeren bölgenin delesyonu β^+ fenotipinde talasemiye neden olur. Başlangıç kodonu olan birinci eksonun ilk kodonu ATG dizisindeki nükleotidlerin mutasyonları sonucu transkripsiyonun başlatılamaması ise β^0 talasemi fenotipinde olguların ortaya çıkmasına neden olur.Bu kodondaki her bir nükleotidi etkileyen farklı mutasyonlar bulunmuştur.Bunların hepsi de şiddetli klinik gösteren mutasyonlarıdır (32,62,67).

2.2.2 β -Talasemilerde Fizyopatogenez Ve Moleküler Patogenez

Talasemilerin patofizyolojik özelliklerinin hemen hepsinin kökeninde yatan olgu; globin zincirinin dengesiz üretimi ve bunun sonucunda ortaya çıkan anemidir. Beta talasemilerdeki aneminin üç komponenti vardır. İlk ve en önemlisi; eritrosit öncül hücrelerin kemik iliğinde değişik oranlarda yıkılması ile birlikte inefektif eritropoez'dir. İkincisi, α -zincir inklüzyonlarını içeren olgun kırmızı hücre elemanlarının yıkımına bağlı oluşan hemoliz. Üçüncüsü ise; hemoglobın sentezindeki azalmaya bağlı hipokromi ve mikrositoz'dur (16,78).

Homozigot β -talasemili olgularda, β -globin sentezi, yoktur (β^0) veya farkedilebilir ölçüde azalmıştır (β^+). Bunun sonucunda fazladan α -globin zincirlerin üretimi söz konusudur. Alfa-globin zincirleri tek başlarına fonksiyon görebilecek hemoglobın tetramerleri oluşturma yeteneğinde olmadıklarından ve ayrıca çözünür olmadıklarından, kırmızı hücre prekürsörleri içerisinde çökerler. Meydana gelen inklüzyon cisimcikleri elektron mikroskobu veya ışık

mikroskobunda gösterilebilir. Bu inklüzyonlar hücre membranını zedeler, esnekliğini azaltır ve eritrositlerin mononükleer fagositik sistem hücreleri tarafından fagositozuna yol açarlar. Böylece, olgun eritrositler erken parçalanmaya uğrarken; eritroblastlar da içlerindeki inklüzyonlar nedeniyle kemik iliği içindeyken parçalanırlar ve etkisiz eritrosit yapımına neden olurlar (inefektif eritropoezis) (16,78,79).

2.2.2.1 β -Talasemilerde Fenotipler ve Klinik formlar

β -talasemilerin klinik şiddeti zincir dengesizliğinin derecesi ile orantılı olup;bu bakımdan iki sınıfa ayrılabilir; hiç β -globinin üretilmediği β^0 talasemiler ve bir miktar β globinin üretilmediği ama normalden az üretildiği β^+ talasemi.Daha az ciddi formlar bazen β^{++} olarak gösterilirler ve β zincir üretiminde minimal yetersizliği anlatırlar (80,81,82).

2.2.2.2 Heterozigot β -Talasemi Fenotipi (β -talasemi taşıyıcılığı)

β -talasemi taşıyıcıları, sadece bir tek etkilenmiş globin lokusu olan ve hayat boyu sağlıklı kalan; ancak hastalığı kendi nesillerine aktarabilme riskini taşıyan bireylerdirler. Bunlar, o bozukluk için homozigot ve çift heterozigot olgulardan ayırt edilmelidirler (83).

Talasemi formlarının ortak özellikleri, heterozigotlarda, Hemogloblin A_2 (HbA_2) düzeylerinin artmış olmasıdır. Ancak, bazı β -talasemili olgularda HbA_2 düzeyleri normaldir. Bu olgular,iki kısımda incelenebilirler:Tip1-'de anormal hematolojik bulgular bulunmadığından bunlara "sessiz" heterozigotlar denir.Tip-2'de ise hematolojik değişiklikler, yüksek HbA_2 değerleri bulunan β -talasemi taşıyıcılarından ayırt edilemeyecek durumdadır. Sessiz β -talasemiler hematolojik veriler normal olduğundan tarama yöntemleri ile saptanamazlar. Ancak hafif derecede bir globin zincir dengesizliği (α/β globin zincir oranı birden büyük) söz konusudur. Sessiz talasemi'ye neden olan mutasyonlardan biri olan (-101 C→T) mutasyonunun, transkripsiyonu negatif kontrol eden proteinlerden birini normale göre dokuz kat daha güçlü bağlayarak, β -globin gen ürününü azalttığı gösterilmiştir (16,60,84,85).

β -talasemi taşıyıcılarındaki hematolojik parametreler şu şekildedir: Eritrosit sayısı (RBC) artmış, MCV (ortalama eritrosit volümü) 60-75 fl kadar düşmüş. HbA_2 konsantrasyonu %3.5-%7 kadar artmış, HbF düzeyinde ise sınırlı bir artış (%1.5-%8) vardır. Periferik kan yaymalarında hipokrom mikrositer eritrositler saptanır. Bu bireylerin globinlerinin α/β sentez oranları 1.5-2.0 oranındadır. Bir β -talasemi ailesine sahip bu bireylerde yaşam süreleri normal olup; sağlıklı bireylerdirler (32,86,87).

2.2.2.3 β -Talasemi Major

İki adet aynı çeşit mutasyona sahip mutant β -talasemi geni taşıyan "homozigot" veya birbirinden farklı iki adet mutasyona sahip mutant β -talasemi genini bir arada taşıyan çifte heterozigot (veya birleşik heterozigot) olgular olup; şiddetli talasemi kliniğine sahip bireylerdirler. Doğumu takip eden aylarda başlayan sarılık ve hepato-splenomegali mevcuttur. HbF ve HbA₂ düzeyleri altta yatan moleküler patolojiye göre oldukça değişkenlik gösterir. HbF artmıştır (%30-99), HbA₂ düzeyi %1-9 arasında değişir. HbF düzeyi çok yüksek olan olgularda eğer HbA yoksa β^0 düşünülür. β^0 -talasemide HbA₂ düzeyi çok yüksek olan olgularda β -gen promoter bölgesini de içine alan büyük gen delesyonları düşünülmelidir (88,89,90).

2.2.2.4 β -Talasemi İntermedia

Asemptomatik β -talasemi heterozigot olgular ile ağır beta talasemi homozigot (major) arasında bir klinik şiddet sergiler. Hastaların çoğu transfüzyon almadan normal Hb değerlerine sahiptir. Talasemi intermedia'ya neden olan IVS-1-6 (T→C) homozigot mutasyonu daha çok Akdeniz ülkelerinde görülür. Talasemi Intermedia'da, genelde , her iki β -geni de talasemiktir. Bu durumda:

i-Mutasyonların her ikisi de hafiftir (homozigot veya birleşik heterozigot)

ii-Mutasyonlardan biri ağır; diğeri hafiftir (birleşik heterozigot)

iii- β -talasemi heterozigotluğu ve alfa gen triplikasyonu ($\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$) vardır.

Periferik yayma özellikleri β -talasemi major'e benzer. Bir yaşından sonra talasemi tanısı konulan ve kan transfüzyonuna bir yaşından sonra başlanan olgularda talasemi intermedia olasılığı akla gelmelidir. Tanı genellikle 2-5 yaşları arasında konulur veya tanı yaşı 2. dekada kadar uzamış da olabilir. Hemogloblin değerleri daha yüksek olup orta düzeyde kemik değişiklikleri olur. Aneminin daha az şiddetli görülmesinin nedeni serbest α -zincirlerinin genetik faktörler tarafından azaltılması ve α /non- α globin zincir imbalansının daha az olmasıdır. Bu imbalansı düşüren faktörler; orta düzeyde β -talasemi alelleri, birlikte bulunan α -talasemi ve birlikte bulunan $\delta\beta$ veya HPFH sendromudur (32,60,90,91).

2.2.2.5 İnküzyon Cisimcikli Beta Talasemi

Aşırı dayanıksız globin zincirleri nedeniyle meydana gelen talasemilerdirler. Talasemi intermedia gibi fenotipik özellik gösterirler ve şiddetli heterozigot beta talasemi şeklinde

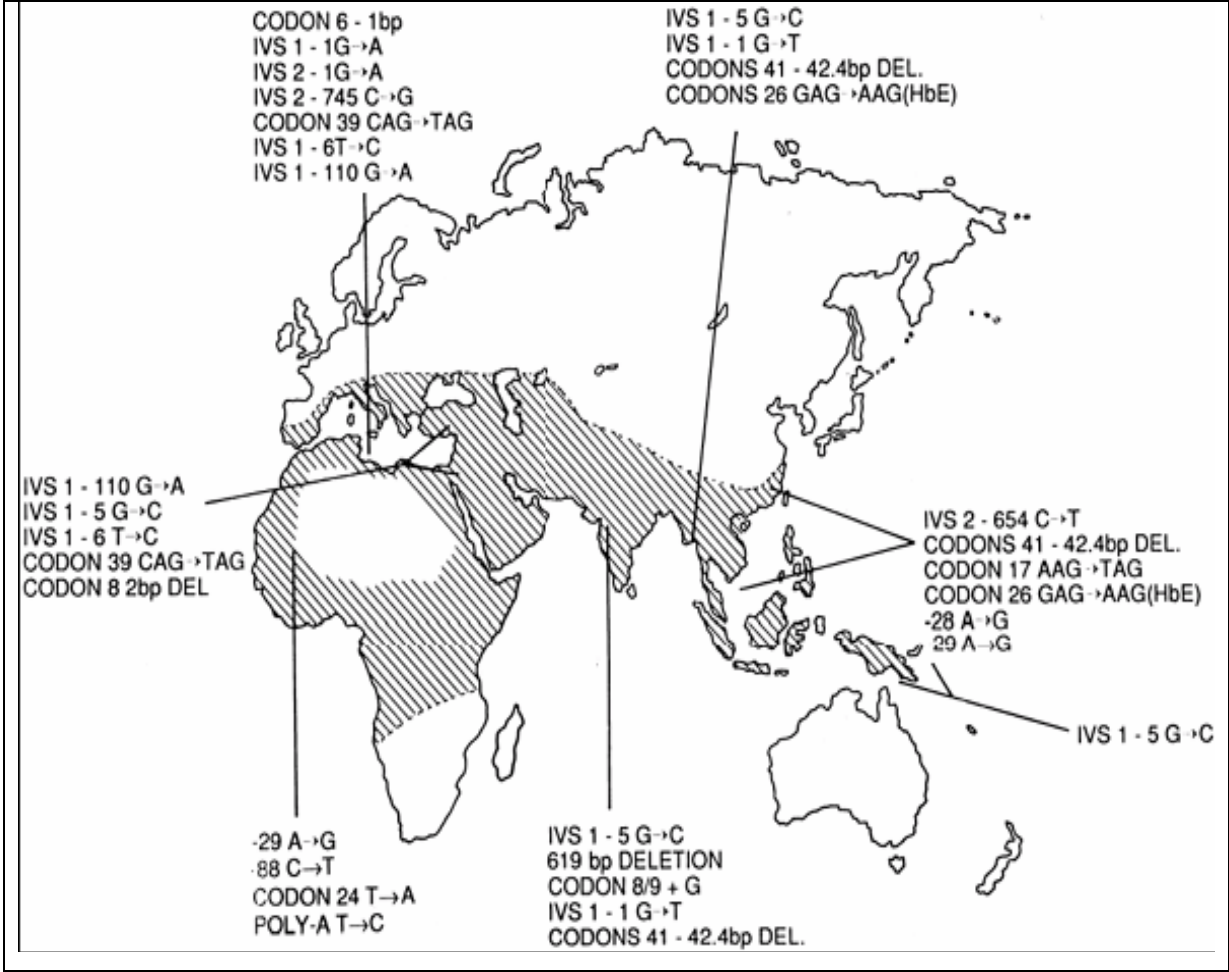
dirler. Belirgin hemoliz ve eritrositlerde inklüzyon cisimcikleri ile karakterize edilirler. Bu tip talasemilere neden olan mutasyonlar: İtalyanlarda Codon 94(+GT), Litvanyalılarda Codon 123 (-A), Japonlarda Codon 128/129 (GCTG) şeklinde görülür. Bunlar seyrek görülen β -talasemi alelleri olup malaraya karşı seçici bir özellik göstermezler ve dağılımları da β -talaseminin nadir görüldüğü toplumlardadır (Kuzey Amerika, Japonya vs.). Inklüzyon cisimcikli talasemilerin çoğu exon 3'deki mutasyonlarda gözlenirler. Normal globin zincirindeki H heliksinin yokluğu globinin dayanaksız olmasını sağlar. Proteolitik sindirim sonucu globin zinciri hücre içinde çabucak çökeler ve çökelen alfa zincirleri de hücre zarına zarar verir (60,92).

2.2.3 β - Talasemilerde Epidemiyoloji

β -Talasemi en yaygın tek hastalıklarından biridir.Dünya popülasyonunun yaklaşık %4.5'i globin zincirinde bir mutasyon taşıyıcısıdır (5,47,71).

β - Talasemi Akdeniz Ülkeleri,Kuzey ve Batı Afrika'dan Orta doğu ve Güneydoğu Asya ülkelerini içine alan bir kuşakta yayılma gösterir.(şekil 6) (3,72,73,74) Bugünlerde popülasyonun hızlı yayılışı yüzünden Avrupa Kıtası, Kuzey ve Güney Amerika'ya da yayılmaya başlamıştır(47). β -talasemi taşıyıcılığı oranı Türkiye genelinde %2 olmakla birlikte bu sayı Türkiye'nin bazı yörelerinde %10'a kadar çıkmaktadır.Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği,Türkiye'de beklenenin de üzerinde β -talasemili çocuk doğmasının nedenidir.Hastalık,hafif klinikli β - talasemi intermedia ile transfüzyona bağımlı β -talasemi majör arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmekle birlikte Türkiye'de β -talasemi majör olguları ağır basmaktadır(76). Halen Türkiye toplumunda 30'u aşkın mutasyon saptanmıştır(77). Bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde zorlaştırmaktadır.

Ülkemizde Çukurova,Akdeniz Kıyı şeridi,Ege ve Marmara Bölgelerinde talasemi taşıyıcılığı çok sıktır.İç Anadolu,Doğu ve Güneydoğu Anadolu'da yeterince araştırma merkezi olmadığından bu yörelerde kesin bir rakam bilinmemektedir.Türkiye popülasyonunda β -talasemi taşıyıcılığı sıklığı %2.1'dir (77).



Şekil 6. Beta talasemi mutasyonlarının dünyadaki yayılışı (1)

2.2.4. Türkiye’de β -Talasemi

Talasemilerin Türkiye’de en sık görülen tipi β -talasemidir. Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye’de beklenenin de üzerinde β -talasemili çocuk doğmasına neden olmaktadır.

β -talasemi taşıyıcılığı oranı Türkiye genelinde %2 olmakla birlikte, bu sayı Türkiye’nin bazı yörelerinde (Antalya ve Trakya gibi) %10’a kadar çıkmaktadır. En düşük β -talasemi sıklıkları Türkiye’nin kuzey ve doğu bölgelerinde gözlenmiştir. Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye’de beklenenin de üzerinde β -talasemili çocuk doğmasının nedenidir. Hastalık, hafif klinikli β -talasemi intermedia ile, tranfüzyona bağımlı β -talasemi majör arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmekle birlikte, Türkiye’de β -talasemi majör olguları ağır basmaktadır. Halen Türk toplumunda 30’u

aşkın mutasyon tanımlanmıştır; bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde güçleştirmektedir (93,94,95).

IVS-I-110 Türkiye’de en sıklıkla rastlanan β -talasemi mutasyonudur (**%40**); bunu sırasıyla:

IVS-I-6,

FSC-8,

IVS-I-1,

IVS-II-745,

IVS-II-1,

Cd39,

-30

FSC- 5 (Frameshift codon-5) mutasyonları takip etmektedir (**Tablo 1**). IVS-I-110’un Türkiye genelinde %40 olan sıklığı, Orta Anadolu’da %50’yi aşmakta, buna karşılık Doğu ve Güney Doğu Anadolu’da %25’lere düşmektedir. Türkiye’nin coğrafi bölgeleri, mutasyon sıklığı ve çeşitliliği açısından kıyaslandığında, ülke nüfusunun %50’sini barındıran Batı Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin, Türkiye genelindeki dağılımla uyumlu olduğu, ve Kuzey, Güney ve Doğu Anadolu bölgelerinin daha heterojen olduğu, ve kendilerine özgü mutasyonlar içerdiği görülmektedir (-30, -87, FSC8/9, IVS-II-745 gibi) (10,96).

Tablo 1. Türkiye’de en sık görülen β -talasemi mutasyon çeşitlerinin genel dağılımları ve sıklıklarına göre ilk on sırada yer alan mutasyonlar.

MUTASYON	Tipi	Türkiye’deki Genel Dağılımı (%)
IVS-I-110 (G→A)	$\beta+$	39.3
IVS-I-6 (T→C)	$\beta+$	10.1
Bilinmeyen Mutasyonlar		9.1
FSC-8 (-AA)	βo	5.5
IVS-I-1 (G→A)	βo	5.0
IVS-II-745 (C→G)	$\beta+$	5.0
IVS-II-1 (G→A)	βo	4.7
Cd 39 (C→T)	βo	3.8
- 30 (T→A)	$\beta+$	3.1
FSC-5 (-CT)	βo	2.2

2.2.5 Diyarbakır Bölgesinde β -Talasemi

Diyarbakır bölgesinde daha önce moleküler düzeyde β -talasemi mutasyon tiplendirmesi üzerine, sadece, bir çalışma yapılmıştır (Bu tezin de dahil olduğu Diyarbakır'daki tarama hariç). Bu çalışma daha önce β -talasemi major tanısı konmuş 36 örneğin mutasyon tiplerinin belirlenmesi adı altında yapılmıştır (60).

Söz konusu çalışmada Çukurova bölgesinde yaygın olarak görülen 8 adet mutasyonun Diyarbakır bölgesindeki sıklıkları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 36 hastadan 10 hastanın araştırılan 8 mutasyondan hiçbirisini taşımadığı; diğer 26 hastanın ise Çukurova bölgesinde sık görülen 8 mutasyondan herhangi birini taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre Diyarbakır bölgesinde tesbit edilen mutasyon tiplendirmesinin Türkiye'deki mutasyon tiplendirmesi ile karşılaştırmalı gösteren (Tablo 2) incelenebilir (60).

Tablo 2. Daha önce yapılmış bir çalışmaya göre Diyarbakır'da ve Türkiye'de en sık görülen β -talasemi mutasyon çeşitlerinin sıklıklarının karşılaştırılması

MUTASYON	Tipi	Diyarbakır Bölgesindeki Sıklığı (%)	Türkiye'deki Genel Dağılımı (%)
IVS-I-110 (G→A)	$\beta+$	27.8	39.3
IVS-I-6 (T→C)	$\beta+$	11.1	10.1
Bilinmeyen Mutasyonlar		27.8	9.1
FSC-8 (-AA)	β_0	11.1	5.5
IVS-I-1 (G→A)	β_0	2.8	5.0
IVS-II-745 (C→G)	$\beta+$	5.5	5.0
IVS-II-1 (G→A)	β_0	8.3	4.7
Cd 39 (C→T)	β_0	2.8	3.8
- 30 (T→A)	$\beta+$	2.8	3.1
FSC-5 (-CT)	β_0	Bakılmamış	2.2

2.2.6 DNA Dizi Analiz Yöntemleri ile β -Talasemi Tanısı

Son yıllarda moleküler genetik alanında kaydedilen gelişmeler birçok kalıtsal hastalığın gen düzeyinde tanımlanmasını sağlamış, bunun sonucunda da bu hastalıkların tanısı DNA düzeyinde yapılabilir hale gelmiştir. En önemli ve hızlı gelişme talasemi ve anormal hemoglobinlerde ve bu gruptaki hastalıkların, moleküler mekanizmalarının ve mutasyonlarının anlaşılmasında olmuş, kazanılan bilgi birikimi ile yeni DNA analiz ve tanı yöntemleri geliştirilmiş ve bunlar sadece çocuk ve erişkine değil, fetal DNA'ya da uygulanabilecek hale gelmiştir. DNA analiz ve tanısında gittikçe daha basit, kolay tekrarlanabilen, tek aşamalı, radyoaktivite gerektirmeyen, ekonomik ve tanı laboratuvar ortamında da uygulanabilen yöntemler tercih edilmelidir. DNA analiz ve tanısı klinik biyokimyasal yaklaşımları tamamlayıcı niteliktedir, çok hassastır ve %100'e yakın kesinlikte sonuç vermektedir (21).

2.2.6.1 DNA Dizi Analizi Ve Kullanılan Yöntemler

DNA dizi analizi, gen yapısı ve genetik kontrol mekanizmaları hakkında bir çok bilgi edinmemizi sağlamıştır. Herhangi bir organizmadan çok miktarda saf DNA elde edilmesini sağlayan rekombinant DNA tekniklerinin gelişmesine paralel olarak DNA dizi analizi yöntemleri de gelişme göstermiştir. 1960'lı yıllarda başlayan DNA dizi analizi ile ilgili araştırmalar başlıca şu şekilde gelişmiştir (97).

1965 yılında Robert HOLLEY tarafından 74 nükleotidlik bir tRNA molekülünün dizi analizi yapılmıştır. 1977 yılında Allan MAXAM- Walter GILBERT ve Frederick SANGER tarafından iki farklı DNA dizi analizi yöntemi bulunmuştur. 1982 yılında Akiyoshi WADA DNA dizi analizinin otomatik olarak yapılmasını önermiştir ve robotlar geliştirilmeye başlanmıştır. 1986 yılında California Teknoloji Enstitüsünden (Caltech) Leroy HOOD ve Llyod SMİTH tarafından DNA dizi analizinde kullanılacak tam otomatik bir makine bulunmuştur. 1990 yılında Edward UBERBACHER tarafından bir gen bulma programı olan GRAİL kullanılmaya başlanmıştır. 1992 yılında 21. kromozomun DNA Dizi Analizi tamamlanmıştır. 1995 yılında Craig VENTER, Claire FRASER ve Hamilton SMİTH tarafından Haemophilus influenzae' ya ait ilk DNA dizisi yayınlanmıştır. 1996 yılında ulusal bir konsorsiyum tarafından bir ekme mayası olan S.cerevisiae'nin DNAdizisi yayınlanmıştır. 1998 yılında Sanger Center ve Washington Üniversitesi bilimadamları tarafından Caenorhabditis elegans' ın DNA dizisi açıklanmıştır. 1999 yılında İngiltere, Japonya ve

ABD'den bilim adamları tarafından insanın 22. kromozomunun DNA dizisi tamamlanmıştır. 2000 yılında Celera ve işbirliği içinde olduğu üniversiteler tarafından *Drosophila melanogaster*' in DNA dizisi açıklanmıştır. 2000 yılı Haziran ayı içinde İnsan Genom Projesi katılımcıları ve Celera' nın insan gen haritası taslağını tamamladığı açıklanmıştır. *Arabidopsis thaliana* 2000 yılında DNA dizisi açıklanan ilk bitki olmuştur. 2003 yılında Whitehead Enstitüsünde görevli David PAGE ve arkadaşları Y kromozomunun dizi analizini tamamlamışlardır.

DNA Dizi Analizinde günümüzde birbirinden farklı iki yöntem kullanılmaktadır. Bu iki yöntem;

- 1- Maxam ve Gilbert'in kimyasal kırılma yöntemi (98).
- 2- Sanger-Coulson'un zincir sonlanma yöntemi (99).

Bu iki yöntemden, Sanger – Coulson'un yöntemi günümüzde daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Allan MAXAM ve Walter GİLBERT 'in geliştirdikleri yöntemin prensibi hidrazin, dimetil sülfat ya da formik asit'in, DNA'da bulunan bazları özgül olarak değiştirmesine ve daha sonra eklenen piperidinin değişikliğe uğramış nükleotitlerin bulunduğu noktalardan zinciri kırmasına dayanır (100). Bu yöntemde, nükleotit dizisi saptanacak olan DNA önce 5'- ucundan ³²P ile ya da floresan bir boya ile işaretlenir. DNA' nın iki iplikçiği birbirinden ayrılarak ya da DNA uygun bir restriksiyon enzimi ile kesilerek DNA' nın yalnızca bir ucundan işaretlenmesi sağlanır. İkinci adımda ise DNA molekülleri dört tüpe ayrılarak A, C, G ya da T nükleotitlerini değiştirmek ve kırmak için gerekli tepkimeler gerçekleştirilir. Reaksiyon için kısıtlı bir süre verilerek her tüpde farklı pozisyonlardaki hedef nükleotidlerden kırılmış DNA parçaları elde edilir. Sonuçta kırılmanın olduğu pozisyona göre hepsi 5'- pozisyonlarından işaretli ancak boyları birbirinden farklı bir dizi DNA fragmenti elde edilmiş olur. Elde edilen boyları gittikçe kısalan DNA dizileri, jel elektroforezi ile birbirlerinden büyüklüklerine göre ayrılır ve otoradyografi uygulanarak bantlar görüntülenir (101).

Maxam ve Gilbert Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Maxam ve Gilbert yönteminde özgül bazlar ile zincirlerin kırılmasında kullanılan kimyasallar aşağıda verilmiştir (100).

Kimyasal kırılma yönteminde kullanılan kimyasallar:

Özgül Baz	Baza özgül kimyasal	Baz ayırmada kullanılan kimyasal	Zincir kırmada Kullanılan Kimyasal
G	Dimetil sülfat	Piperidin	Piperidin
A+G	Asit	Asit	Piperidin
C+T	Hidrazin	Piperidin	Piperidin
C	Hidrazin+Baz	Piperidin	Piperidin
A>C	Baz	Piperidin	Piperidin

Pürinlerin kırılmasında dimetil sülfat kullanılır. Dimetil sülfat ile N7 no' lu pozisyonundan metillenen DNA' ya bazik ortamda piperidin uygulanırsa DNA guanin bazından kırılır. Bazik ortam yerine asidik ortam tercih edilirse bu sefer DNA guanin yerine adenin bazından kırılır. Pirimidin bazlarının kırılması ise hidrazin ile yapılır. Hidrazin DNA' yihem sitozin hem de timin bazından kırar. Bu iki reaksiyonu ayırmak için ise yüksek tuz derişimi (2M NaCl) ve bazik ortam kullanılır. Yüksek tuz derişimi ile bazik ortamda DNA sitozin bazından kırılır. Dört farklı bazı ayırmada kullanılan reaksiyonlardan elde edilen parçacıklara elektroforez uygulanarak jel üzerinde yan yana yürütölmeleri sağlanır. Uygulanan elektiriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere yol alırlar. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde saptanan parçacıklar kırılma pozisyonlarına göre okunurlar (101).

Sanger-Coulson Zincir Sonlanma Yöntemi

DNA dizi analizinde kullanılan diğör bir yöntem de Fred SANGER ve arkadaşlarının geliştirdiğı yöntem olan zincir sonlanma yöntemidir. Bu yöntem enzimatik DNA sentezine dayanır ve günümüzün en yaygın kullanılan DNA dizi analizi tekniğidir. Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliğı yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezini sağlamak için Klenov, Taq DNA polimeraz, terstranskriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli DNA polimerazın dNTP' lerin

(deoksiribonükleozit trifosfat) yanısıra deoksiribozun 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP' leri de (dideoksiribonükleozit trifosfat) substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Sentezlenen DNA' ya bir ddNTP' nin katılması 3' pozisyonunda OH grubu olmadığı için sentezi durdurur. Dizi analizi yapılırken dört ayrı reaksiyon karışımı hazırlanır. Her bir karışım kalıp DNA zinciri, bir primer, dNTP' lerin dördü ve az miktarda ddNTP' lerden birini içerir. Özgül zincir sonlanması için her bir reaksiyonda farklı bir ddNTP bulunur. Reaksiyonların her birinde çok az miktarda modifiye nükleotit kullanıldığı için yeni zincir sentezi rastgele sonlanarak bir dizi DNA fragmenti meydana gelir (101).

Reaksiyonlar sonucu elde edilen DNA parçalarına elektroforez uygulanarak jel üzerinde yanyana yürütülür. Uygulanan elektiriksel alanın etkisi ile DNA parçacıkları en kısası en önde olmak üzere jel üzerinde bir merdiven görüntüsü oluşturur. İşaretleme yöntemine göre jel üzerinde, tespit edilen parçacıklar reaksiyon karışımına konulan ddNTP' nin tipine göre okunur (101).

Sanger-Coulson Zincir Sonlanma Yönteminde Kullanılan Kimyasallar

Primerler

Sanger-Coulson zincir sonlanma yönteminde istenilen DNA kalıbının çoğaltılması ve dizi analizinin yapılabilmesi için özgül oligonükleotitlere yani primerlere ihtiyaç vardır. Primer çiftleri kullanılacak kalıp DNA'nın genomik DNA'dan eldesinde, çoğaltılmasında kullanılır. Ayrıca primerler yöntemin son aşaması olan sonlanma reaksiyonunda polimeraz enzimi için uygun 3' ucu sağlar. Her iki reaksiyondaki primer çifti aynı olabileceği gibi farklı primerler de kullanılabilir. Gen bölgesinin elde edilmesinde kullanılan primer çifti dizi analizi yapılacak bölgenin daha dışından seçilip dizi analizi reaksiyonunda kullanılan primer ise bu primerlerin arasında ve dizinin analizi yapılacak bölgesine daha yakın olmalıdır. Sekanslama reaksiyonunda tek bir primer kullanılır ve böylece reaksiyon yönü tayin edilmiş olur (100).

Kalıp DNA

Sanger-Coulson zincir sonlanma yönteminde hem çift, hem de tek zincirli DNA kullanılabilir. Yöntemin birinci aşamasında polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction, PCR) tekniği ile elde edilen ve çoğaltılan DNA parçası kalıp DNA olarak adlandırılır. PCR ürünü kalıp DNA, önce reaksiyon artıklarından arındırılmalıdır. Bu çok özen gösterilmesi gereken

bir aşamadır. Eğer kalıp DNA yeterince temizlenemezse bir sonraki sonlanma reaksiyonuna aktarılacak olan kimyasallar ile primer artıkları reaksiyonun hassasiyetini bozacaktır (101).

Enzimler

Sanger-Coulson zincir sonlanma yönteminde bir çok tipde DNA polimeraz enzimi kullanılabilir. Bu enzimlerin ortak özellikleri özgül ve hassas olmalarıdır. Aşağıda kullanılan enzimlere örnekler verilmiştir (100).

E.coli Klenow Fragmenti DNA Polimeraz I

İlk geliştirilen yöntemde kullanılan bu enzimin iki büyük dezavantajı vardır. Birincisi enzimin kontrolsüz olarak çoğaltma reaksiyonlarını yarıda kesmesidir. Özellikle uzun okumalarda bu problem iyice belirginleşmektedir. İkincisi enzimin homopolimerik bölgeler ile ikincil yapısı kuvvetli olan bölgelerde istenilen verimde çalışmamasıdır (100).

Ters Transkriptaz

Ters transkriptaz (Reverse transcriptase) enziminin her ne kadar çok yaygın bir kullanım alanı olmasa da özellikle homopolimerik bölgelerde etkin çözüm verir. Enzim özellikle bu tip bölgelerde Klenow fragmentinden daha etkin ve kullanışlıdır (100).

Sekuenaz Enzimleri

Sekuenaz (SequenasTM) enzimleri T7 bakteriofajın'dan elde edilirler. Enzimin 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi inhibe edilmiştir. İnhibe edilen bu özelliği sayesinde enzim tek yönlü ve hızlı çalışır. Kalıp DNA'nın uzun olduğu deneylerde yüksek özgül aktivitesi ve dayanıklılığı ile tercih edilir (100).

Taq DNA Polimeraz

Özellikle tek zincirli DNA dizisinin saptanmasında tercih edilir. Sıcağa dayanıklı olduğu için yaygın kullanılan enzim türüdür. Özellikle 95 C⁰, da aktif olması nedeni ile homopolimerik bölgelerde bile çok etkindir (100).

Elektroforez

DNA molekülleri fosfat grubu taşıdıkları için eksi (-) yüklüdür ve anoda doğru (+ kutba) hareket eder. Bu hareket DNA'nın yapısına ve uzunluğuna bağlıdır. Jel boyunca kısa DNA fragmentleri daha hızlı yol alırken uzunluk arttıkça DNA'nın hızı azalır. Her iki dizi analizi yöntemi ile elde edilen farklı uzunluklardaki fragmentlerin birbirlerinden ayrılması ve tanımlanmasında DNA'nın bu özelliği kullanılır. Birbirlerinden farklı sonlanmalara sahip reaksiyon ürünleri dört ayrı kulvarda söz konusu jel matrikse yüklenir. DNA fragmentleri oluşturulacak elektriksel alanda uzunluklarına göre sıralanırlar ve DNA dizisi jelden okunur.

Poliakrilamid jeller her iki teknik için de kullanılır ve yüksek ayırım gücüne sahiptir. Poliakrilamid jeller uygun süre ve uygun voltajda tek bir nükleotit farkını bile ayırabilir. DNA dizi analizi reaksiyonu sonucu elde edilen fragmentler jel üzerinde gümüş boyama, radyoaktif veya floresan boylarla işaretlenerek tespit edilebilir. Otomatik DNA cihazlarının gelişmesi ile poliakrilamid jellerin yerini polikarbon bileşikler olan polimerler almıştır. Bu polimerler yoğunluklarına göre farklı ayırım gücüne sahiptirler. Kullanılan polimer otomatik cihazlarda çapları milimetreden küçük olan cam kapilerler içine yüklenirler. Böylece poliakrilamid jellerde meydana gelen problemler en aza indirilmiş olur (100).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Diyarbakır kent merkezi ve Diyarbakır'a bağlı 13 (onüç) ilçede (Çınar, Bismil, Hazro, Silvan, Kulp, Ergani, Eğil, Hani, Lice, Dicle, Çüngüş, Çermik ve Kocaköy) ilköğretim çocuklarında tarama çalışması yapıldı. Bu çalışmada ilköğretim okullarının 3. sınıflarından (ortalama 9 yaş) , 8. sınıflarına kadarki (ortalama 14 yaş) yaş gruplarından 10038 (onbin otuzsekiz) çocukta Beta-talasemi taraması gerçekleştirildi. Bu çocuklardan alınan örneklerin rutin Tam Kan Sayımı sonucunda MCV değerlerinin 79 fL'nin altında olduğu belirlenen örnekler HPLC uygulandı. HPLC ile HbA₂ değerleri yüksek (≥ 3.5) bulunan örnekler Beta-talasemi taşıyıcısı olma ihtimali gözönüne alınarak; DNA mutasyonu açısından incelendiler. Daha sonra bilinmeyen mutasyonlar olarak adlandırılan 33 örnek DNA dizi analizi yöntemiyle araştırıldı.

Bunun için her çocuktan iki adet EDTA'lı tam kan tüplerine; her birine 2 cc olacak şekilde kan örnekleri alındı. Bu kanlar soğuk zincir kuralına uyularak Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi (DÜTF) Biyokimya Anabilimdalı Laboratuvarına ulaştırıldı. Örneklerin kayıtları ve numaralanması işleminin ardından tam kan tüplerinden biri hematolojik parametrelerin çalışıldığı Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil laboratuvarına gönderildi. Diğer tam kan tüpü ise muhtemel mutasyon çalışılmak üzere (-80 °C'de) soğuk zincir kurallarına uygun bir şekilde saklandı. Örneklerin alındığı günün akşamı çalışılan tam kan örneklerine ait kanlardan MCV değerlerinin 79 fl'nin altında olanları seçilip HPLC'de HbA₂ çalışılmak üzere DÜTF Biyokimya ABD Moleküler Tanı laboratuvarına teslim edildi. Bütün örneklerin bu şekilde işleminden geçirilmesinden sonra derlenen veriler ışığında Talasemi taşıyıcısı olduğu muhtemel olan şahısların ($MCV < 79$ fl ve $HbA_2 \geq 3.5$) daha önce β -talasemi mutasyon analizi için (-80 °C'de) saklanmış örnekleri, soğuk zincir kuralları gözetilerek DÜTF Hematoloji Laboratuvarında DNA izolasyonları yapıldı ve örnekler (-20 °C'de) saklandı. İzolasyon işlemlerinden sonra aynı Hematoloji laboratuvarında DNA'ları izole edilmiş bütün örneklerin PCR yardımı ile DNA ürünleri çoğaltıldı ve ardından çoğaltılmış DNA ürünleri, " β -globulin Strip Testi" ile β -talasemi mutasyonları açısından incelendi. Elde edilen sonuçlara göre, 133 örnekten " β -globin StripAssay" kiti ile çalışılan 22 çeşit β -globulin mutasyonundan herhangi birini göstermeyen örneklerin sayısı 33 olarak bulundu. "Bilinmeyen Mutasyonlar" adı altında kategorize edilen bu örnekler; β -talasemi açısından herhangi bir mutasyon taşımayıp normal olabilecekleri gibi, β -globin strip assay

kitinin araştırdığı 22 β -talasemi mutasyonu dışında bilinen 200 kadar β -talasemi mutasyonundan herhangi birini veya şu ana kadar tesbit edilememiş yeni bir mutasyonu da taşıyabilme ihtimalleri nedeniyle bunları DNA dizi analizi yöntemiyle araştırdık.

3.2 ABI Prism 310 Genetik Analizatörü

Kendinden nceki sistemlerden farklı olarak ABI Prism 310 Genetik Analizatörü poliakrilamid jelmatriks sistemi yerine kapiler sistem içine doldurulan polimer jelmatriks sistemi içerir. Bu polimer jelmatriks çapı nanometre ölçütlerinde olan cam borular içerisine doldurulur. Cihaz iki ana parçadan oluşur. Birinci kısım veri ünitesidir. Veri nitesi bir bilgisayar sisteminden ibarettir. Bu bilgisayarda, ikinci kısım ile bağlantıyı kuran ve ikinci kısımı kontrol eden programlar yüklüdür. İkinci kısım analizin yapıldığı elektroforez kısmıdır (102).



şekil 7: ABI Prism 310 Genetik Analizatörü

ABI 310, kapiler elektroforeze dayalı DNA analizi cihazıdır. Bu cihaz, jel dökme ve örnek yükleme işlemlerini otomatikleştirmektedir. Florasan rengi algılama sistemi ile dizi analizi ve DNA parça analizi işlemleri oldukça kolaylaşmıştır.

61 cm'lik silis (silica) kapiler ile 650 baza kadar DNA dizisi okunabilir ve günde 10 örnek incelenebilir. 45 cm'lik kapiler ile 450-500 baza kadar DNA dizisi okunabilir ve 61 cm'lik kapilere göre işlem süresi örnek başına yaklaşık 1 saat kısalmaktadır.

Florasan Boya İşaretleme Stratejisi

DNA dizileme işlemi BigDye Dideoxy Terminators sistemi kullanılarak yapılır.

DNA parça analizi (mikrosatelit ve AFLP) için 5' floresan işaretli primerler kullanılmalıdır.

Çoklu Renk Algılama

ABI 310 Genetik Analiz Cihazı aynı kapilerin içinde 5 farklı florasan rengi aynı anda algılayabilir. Bu özelliği nedeniyle dizi analiz reaksiyonu tek bir reaksiyon tüpünde gerçekleştirilir. Genotip belirlemede çoklu renk algılama sistemi değişik renklerle işaretlenmiş çeşitli büyüklüklerdeki birden fazla PCR ürününü aynı anda inceleme imkanı sağlar. Kapilere yüklenen her bir örneğin hazırlanması esnasında içine eklenen florasan işaretli standard, PCR ürünlerinin uzunluklarını belirleme işleminin sonuçlarının tutarlı olmasını sağlamaktadır.

3.2.1 Kontrol Sistemi

Tipik bir masa üstü bilgisayar sistemidir. Bu sistemde iki ana program yüklüdür. İki programdan birinin görevi elektroforez cihazı ile bağlantıyı kurmak, elektroforez koşullarını sağlamak ve verileri toplamaktır. İkinci programın görevi ise toplanan verilerinin değerlendirilmesidir. ABI Prism 310 Genetik Analizatöründe "DATA Collection™" programı birinci tip bilgisayar programına örnektir. "Sequance Analyse™" programı ise cihazın ikinci tip programıdır

3.2.2 ABI Prism 310 Genetik Analizatörü Çalışma Programı

Örnek hazırlandıktan sonra cihazda bulunan örnek tepsisine yerleştirilir ve cihaza başlama komutu verilir. Başlama komutu ile cihazın gerçekleştirdiği işlemler şu şekilde sıralanır (103).

1-Cihaz başlama komutunu aldıktan sonra kapiler ünitesinin sıcaklığını elektroforez için uygun sıcaklık olan 50 C⁰ ye çıkarır.

2-Uygun sıcaklık sağlandıktan sonra kapilerin platin çubuğa bağlı serbest ucu örnek yükleme ünitesinde bulunan distile su tüpüne girer. Cihaz polimer blok sonunda bulunan ve anoda açılan kapağı kapatır. Polimer şırıngası üzerinde bulunan piston ile sıkıştırılır. Polimer, anot tarafı kapalı olduğu için hareket edebileceği tek yön olan kapiler içine yayılmaya başlar.

3- Kapiler, polimer ile doldurulduktan sonra serbest kapiler ucu örnek tepsi üzerinde hareket ederek örnek içerisine girer.

4-Anot kapağı açılan cihaz üzerinde elektriksel alan yaratılır. Yaratılan elektriksel alanda tüp içerisinde bulunan DNA parçaları kapiler boru içerisine doğru harekete geçerler. DNA parçalarının kapilere taşınması için gerekli sürenin dolması ile akım kesilir ve serbest kapiler ucu distile su içerisine döner.

5-Platin çubuk ile kapiler çevresine örnekten bulaşan kirlilikler temizlenir.

6-Kapiler serbest ucu temizleme sonrası tekrar hareket ederek örnek tepsi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi içerisine girer. Burası kapiler serbest ucu için son noktadır.

7-Anot kapağı açıldıktan sonra cihaz üzerine tekrar akım verilir. Örnek tepsi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi ile polimer blok sonunda bulunan yürütme çözeltisi arasında 14000 V' ye varan bir gerilim oluşur. DNA parçaları kapiler serbest ucundan kapiler boyunca, polimer bloğa doğru harekete geçerler. Bu yürütme sırasında lazer ünitesi içerisinden geçerler ve yaydıkları floresan ışık ile tespit edilirler. Elektroforez sonlandığında cihaz yeni deney için işlemleri tekrar eder.

3.2.3. ABI Prism Big Dye™ Terminatör Reaksiyon Kiti

“ABI Prism Big Dye™“ terminatör reaksiyon kiti içerisinde AmpliTaq DNA polimeraz içeren bir PCR kitidir. Kullanılan polimeraz enzimi Thermus aquaticus‘ dan elde edilir. Bu enzimin 5’-3’ nükleaz aktivitesi ile fosfataz aktivitesi inhibe edilmiştir. Kiti diğer kitlerden ayıran özellikler aşağıda sıralanmıştır (103).

1-PCR aşamasında pipetlenecek tek bir karışım vardır. Bu karışıma primer ve DNA eklenir. Dolayısı ile kişisel hatalar en az seviyededir.

2-Çift zincirli DNA' nın denaturasyonu için bazik ortama gerek yoktur.

3-Tek zincirli ve çift zincirli DNA için aynı protokol uygulanır.

4-Az miktarda kalıp DNA' ya ihtiyaç vardır.

5-Daha çok tekrarlanabilir sonuç verir.

“ABI Prism Big Dye™” terminatör reaksiyon kiti içerisinde bulunan karışım içerisinde PCR için gerekli tüm kimyasallar yanında her bir bazın eşit miktarda ddNTP’ leri de bulunur. Bu ddNTP’lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmiştir (Çizelge.2.2). Bu sayede tek bir reaksiyonla dizi analizi yapılabilir. Kit –15 ile –25 0C arasında saklanır. Kit tüm kalıp DNA’ lar için ortak bir PCR protokolü içerir ve PCR süresi ortalama 2,5 saattir (104).

“ABI Prism Big Dye™ terminatör reaksiyon kitinde ddNTP’ lerin işaretlendikleri floresan boya isimleri ile bunlara karşılık gelen renkler.

ddNTP	Florasın Boya	Renk
A	dR6G	Yeşil
T	Drox	Kırmızı
C	dR110	Mavi
G	DTAMRA	Siyah

3.2.4. Beta Talasemi Sekans Çalışma Protokolü

3.2.4.1. DNA İzolasyonu

Gelen hasta numunelerinin DNA izolasyonu yapılarak kullanılacak DNA örnekleri hazırlanır. EDTA’lı tam kan tüplerinde (-80 °C’de) saklanmış örnekler oda ısısında çözünmeye bırakılır. Bu arada 1.5 ml’lik kapaklı ependorff tüpleri içlerine bırakılacak örneklerin numaraları ile işaretlenir. Tam kan tüpleri içerisindeki örnekler, kendilerine ait ependorff tüplerine alınmadan önce birçok defa tersyüz edilerek karıştırılır.

”Lysis solution” (Lysis solüsyonu) ve ”GEN^xTRACT Resin” şişeleri tam kan tüpleri ile eş zamanlı olarak oda ısısına gelmek üzere soğutucudan çıkarılırlar.

- 100µl kan örneği 1.5 ml’lik kapaklı ependorff tüpüne bir pipet aracılığı ile aktarılır.

- 1 ml Lysis solüsyonu eklenir ve iyi bir karışım için vortekslenir.
- Ependorff'lar 15 dakika oda ısısında bekletilir.
- Mikrosantrifüj'de 3000 rpm devirde 5 dakika çevrilir.
- Bir pipet yardımıyla tüpün üst kısmındaki 1 ml'lik supernatan alınıp atılır.
- 1ml Lysis solüsyonu eklenir ve tekrar vortekslenir
- Mikrosantrifüj'de 12,000 rpm devirde 5 dakika çevrilir.
- Tüplerin alt kısmında birikmiş yaklaşık 50 µl'lik yumuşak çökeltiye dokunmadan üstteki sıvı (supernatan) bir pipet yardımıyla alınıp atılır.
- "GEN^xTRACT Resin" şişesi kuvvetli bir şekilde çalkalanıp içeriğinin karışması sağlanır
- 200 µl "GEN^xTRACT Resin" ependorff tüpünde kalmış çökeltinin üzerine bir pipet yardımıyla eklenir. Ependorff tüpünün kapağı kapatılır ve 10 saniye vortekslenir.
- 56 °C'de 20 dakika inkübe edilen örnekler sonra 10 saniye vortekslenir
- 98 °C'de 10 dakika inkübe edilen örnekler sonra 10 saniye vortekslenir.
- Örnekler 12,000 rpm devirde 5 dakika mikrosantrifüj'de çevrilir.
- PCR için kullanılacak olan DNA kalıpları (DNA template) santrifüj sonrasında ependorff tüpleri içerisindeki supernatan'da bulunur. Bu supernatan, bir pipet yardımıyla alınıp üzerlerine hastaların adı-soyadı ve örnek no'su yazılı başka ependorf tüplerinin içerisine aktarılıp PCR ile amplifikasyon yapılana kadar (-20 °C'de) saklanır.
(Bu işlemler yapılırken kullanılan pipet uçlarının ve ependorff tüplerinin steril olmasına dikkat edilmelidir. Bunun için hazır steril pipet uçlarının yanında kendi laboratuvarımızda sterilizasyonu yapılan ependorff tüpleri kullanıldı.)

Elde edilen DNA ürünlerinin verimini hesaplamak için örneklerden alınan 20 µl'lik DNA ürünü 580 µl saf su ile 600 µl'ye tamamlandı ve sırasıyla 260 ve 280 nanometre dalga boylarında spektrofotometrik olarak optik dansiteleri belirlendi.

Verim= OD_{260} / OD_{280} formülünden verim hakkında bilgi sahibi olundu. Bu formüle göre elde edilen değerler (1,4-1,6) arasında bulunduğundan izolasyonun verimli olduğu kabul edildi.

3.2.4.2. PCR Protokolü

Beta Talasemi için forward ve reverse olmak üzere tüm β -globin genini kapsayan 7 çift primer seti vardır. Tüm primer çiftlerinin pcr çalışma protokolleri aynıdır.

B-Globin Primer 1-2-3-4-5-6-7 Pcr Protokolleri

T1F : GCAATTTGTA CTGATGGTATGG
T1R : GCAAGGTGAACGTGGATGAAG

T2F : CACTAGCAACCTCAAACAGAC
T2R: CACCTTTGCCACACTGAGTG

T3F : TTTGAGTCCTTTGGGGATCTG
T3R : CGAATGATTGCATCAGTGTGG

T4F : CCCTTGATGTTTTCTTTCCCC
T4R : TGTGTACACATATTGACCAAATC

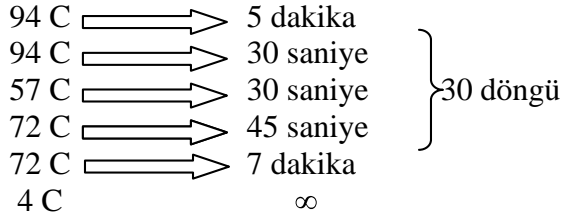
T5F : TTGCATATTCATAATCTCCCTAC
T5R : GGTTGGGATAAGGCTGGATTA

T6F : CGTTAAGGCAATAGCAATATTTCT
T6R : GCTCGCTTTCTTGCTGTCCA

T7F : CACTTTGGCAAAGAATTCACCC
T7R : GTGGGAGGTCAGTGCATTTAA

10 X Buffer	5 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	3 μ l.
dNTP (2,5 mM)	3 μ l
DMSO	5 μ l
Primer F (25 pmol)	2.5 μ l
Primer R (25 pmol)	2.5 μ l
ddH ₂ O	23.5 μ l
Taq DNA Polimeraz	0.5 μ l
Template	5 uL.

Her bir örnek için yukarıdaki pcr protokolüne göre pcr miski hazırlanır ve aşağıdaki pcr protokolüne göre amplifikasyon yapılır.



Pcr ürünleri % 2 lik agaroz jele yüklenir ve amplifikasyon bandı görülmüş örnekler pürifiye edilir.

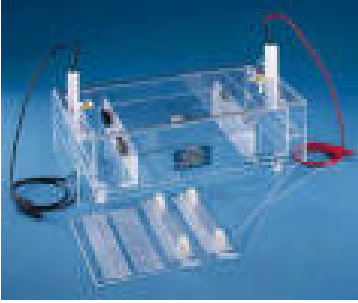
%2 lik Jel Hazırlanması



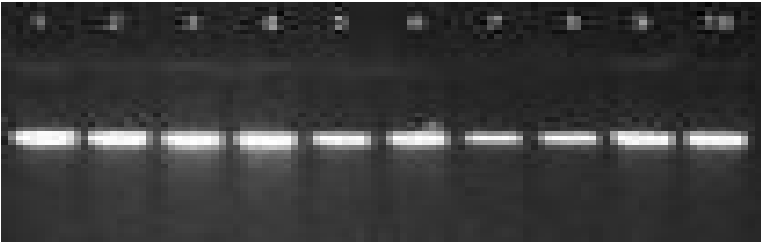
-2 gr agarose, 100 cc 1X TBE ile karıştırılıp iyice kaynatılır. Üzerine 3 uL. Etidium Bromide eklenir ve soğutulur.



-5 uL. PCR ürünü 1uL. Loading Dye ile karıştırılarak hazırlanan jele yüklenir.200 w'ta 15 dakika yürütülür ve transmülatörde bakılır.



Bant görünen ürünler ile çalışmaya devam edilir.Görünmeyen ürünler yeniden PCR yapılır.



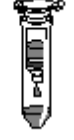
Pürifikasyon İşlemi

Pürifikasyon işlemi pcr ürünlerinin pcr sonunda arta kalan dNTP,enzim,MgCl₂,pcr buffer ı vb. safsızlıklardan arındırmak için yapılır.Invisorb Spin PCRapid Kiti ile pürifikasyon işleminde ;

1- PCR ürünü üzerine 130 uL Buffer P eklenerek tüp içeriği spin filter tüpüne aktarılır ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edilir.



2- 10.000 rpm.de 30 saniye santrifüj edilir.



30 saniye
10,000 x g

3- Kolonlar temiz alt tüplere aktarılır.Üzerine 700 uL Wash Buffer eklenir ve 10.000 rpm.de 30 saniye santrifüj edilir.



30 saniye
10,000 x g

4- Alt tüpler boşaltılarak kolanlar alt tüplere yerleştirilir ve 3 dakika maksimum hızda (12.000-14.000 rpm.) santrifüj edilir.



30 saniye
12,000-14,000 x g

5- En son olarak kolonlar steril 1,5 ml 'lik mikrosantrifüj tüplerine konulur ve üzerlerine Elution Buffer solüsyonundan 30 µl eklenir, oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edildikten sonra 10,000 rpm' de 1 dakika santrifüj edilir.



+ 30 µl EB

Oda sıcaklığında 3 dakika

1 dakika 10,000 x g

NOT: Pürifiye edilen ürünlerin aynı gün içinde Cycle Sequencing'e konulması tavsiye edilir. Ürünler bekletilecek ise en fazla bir hafta -20 C de saklanabilir.

Pürifikasyon sonrası ürünleri kontrol etmek amacıyla pürifiye edilmiş ürünlere %2 lik jel hazırlanarak görüntü alınır. Bant görünen ürünler ile çalışmaya devam edilir. Görünmeyen ürünler yeniden PCR yapılır.

NOT: Bazı durumlarda pcr ürünlerinde pürifikasyon işleminden sonra DNA kaybı gözlenebilmektedir. DNA nın hepsi kaybedildiyse ilk basamaktan tekrar pcr yapmak gerekmektedir. Bir miktar DNA kaybı gözlenen örneklerde işaretli sekans pcr ndan DNA miktarını arttırarak bu kayıp çoğu zaman telafi edilebilmektedir

Sekans PCR

Pürifikasyon işleminden sonra BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kiti ile floresan işaretli pcr yapılır.

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit İçeriği

- Ready Reaction Mix (floresan işaretli pcr bu miks ile yapılır)
- pGEM -3Zf(+) double stranded DNA (sekans kitinin kontrolü için gerektiğinde kullanılır)
- 21 M13 Control Primer(Forward) (sekans kitinin kontrolü için gerektiğinde kullanılır)



Pürifikasyon işlemi sonrası agaroz jelde amplifikasyon bantlarını gördüğümüz pürifiye ürünler aşağıdaki pcr protokolüne göre amplifiye edilir.

Ready Reaction Mix (pembe renk)	8 uL
*Primer	0.5 uL
***Pürifiye DNA	1-8 uL.
ddH2O	----

Total Volume	20 uL.

96 C	⇒	10 saniye	} 25 döngü
50 C	⇒	5 saniye	
60 C	⇒	4 dakika	
4 C	⇒	∞	

* Sekans pcr işleminde dizi analizi yapılacak bölge için ilk pcr işleminde kullanılan primerlerden yalnızca 1 tanesi kullanılabilir. Beta talasemi primerlerinden daima forward primerler kullanılmalı, gerektiğinde reverse primer ile dizi analizi yapılmalıdır. Her iki primerde kullanılacak ise Forward primeri ile ayrı mix, reverse primeri ile ayrı mix hazırlanır ve sekans pcr ına konur.

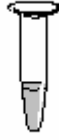
*** Pürifikasyon işleminden sonra agaroz jelde kontrol edilen amplifikasyon bantlarının parlaklığına göre sekans pcr ında pürifiye DNA kullanılır. Eğer ki pcr bantları kuvvetli ise 1-2 ul , orta kuvvette ise 3-4-5 ul , çok zayıf ise 6-7-8 ul pürifiye DNA kullanılır. Kullanılan pürifiye DNA miktarına göre toplam pcr hacmi 20 ul olacak şekilde distile su kullanılır.

Sodyum asetat pürifikasyonu

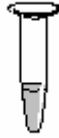
Sekans per 1 sonrası ürünü artıklardan temizlemek için yeniden pürifikasyon işlemine tabii tutulur. Bu aşama kit ile değil manual yöntemlerden biri olan sodyum asetat pürifikasyonu ile yapılır.

1- PCR ürünü üzerine 2 uL. 3 mM. Ph:4.6 olan NaAc dan eklenir.

2- Üzerine 50 uL. %95 lik ETOH den eklenir.



3- Karışım 1.5 luk ependorf tüpüne aktarılır, hafifçe elle vurularak karıştırılır. Pürifikasyonun hiçbir aşamasında vortex kullanılmaz.



4- Buz üzerinde 15 dakika inkübasyona bırakılır.

5- Süre sonunda hiç bekletilmeden 13.000 rpm. de 20 dakika santrifüj edilir.

6- Üst sıvı çekilir ve üzerine 250 uL. %70 lik ETOH eklenir ve yine elle hafifçe karıştırılır.



7- 13.000 rpm. de 5 dakika santrifüj edilir.

8- Üst sıvı tamamen atılır ve kurumaya bırakılır.Kurutma işleminin tüpün oda ısısında kurutulması tavsiye edilir.

9- Liyofilize hale gelen DNA'lar -20 C de 1 hafta süre ile saklanabilir.

10- İyice kuruyan örnekler üzerine 20 uL. formamide eklenerek vortexlenir.

11- 95 C de 5 dakika denatüre edilip hemen buza alınır.1-2 dakika bekletilir ve cihaza yüklenir.

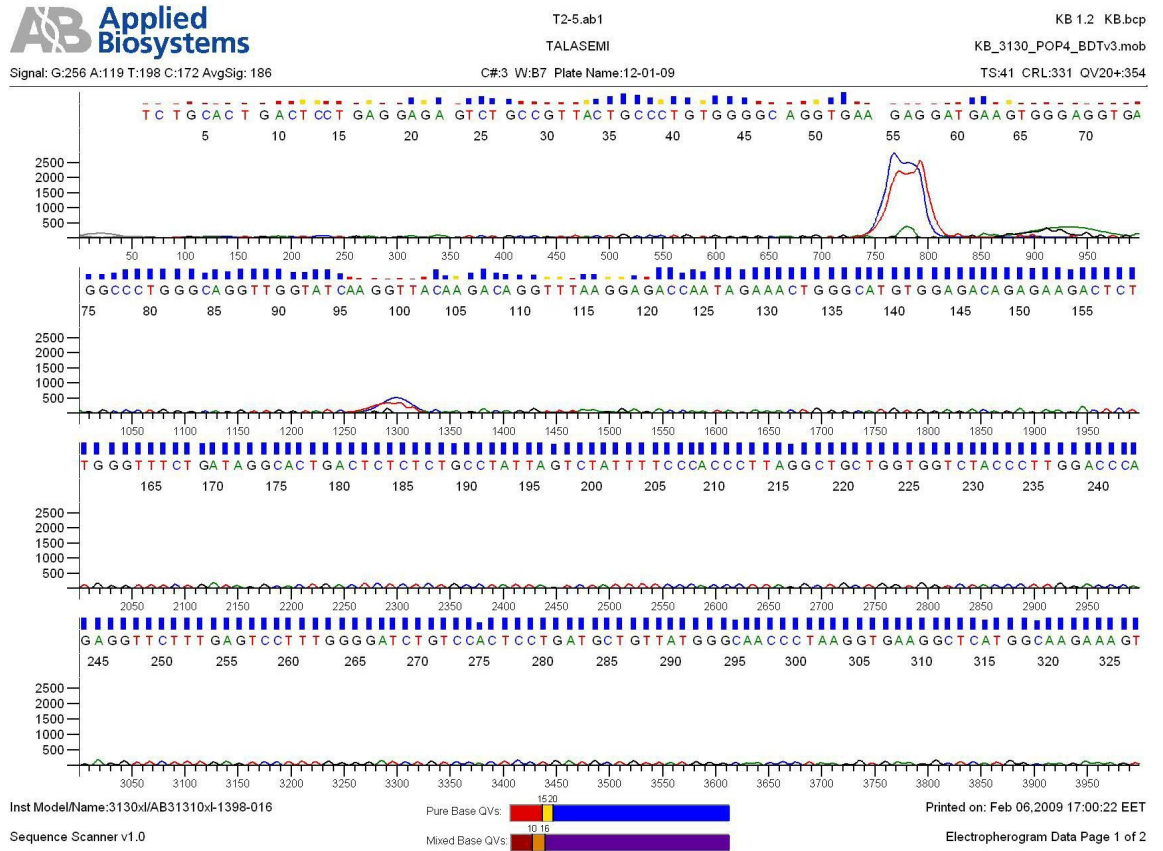
3.3. KULLANILAN ALETLER:

1- Mikrosantrifüj	Beckman GS-15 R model
2- IsıtıcıBlok (İnkübatör)	Wealtec Corp. B-1 model
3- Vorteks (Karıştırıcı)	Jencons/Julabo Miximatic
4- Derin Dondurucu (- 20 °C)	Arçelik 2031 D
5- Termal Döndürücü	Gene Amp PCR system 9700 Perkin Elmer Cetus
6- Su banyosu (Shaker water-bath)	İnnogenetics Auto LIPA 48
7- Otomatik Pipet	Mettler Toledo (10-100µl ve 100-1000 µl) Biohit Proline (0.5-10 µl)
8- Spektofotometre	Unicam 8625 UV/VIS
9-ABI Prism 310 Genetik Analizatör	(seri no;970611452)

3.4. BULGULAR

”Bilinmeyen Mutasyonlar” adı altında kategorize edilen 33 örnek; Beta –talasemi sekans çalışma protokolüne göre ABI Prism 310 cihazında çalışıldı. Dört örnekte mutasyon çıkarken,diğer örnekler herhangi bir mutasyon taşııyordu.

Tespit ettiğimiz mutasyonlar; bir örnekte ivs.1.130 ,iki örnekte ivs1.110 homozigot ve bir örnekte ivs1.110 heterozigot mutasyonlarıydı.



Şekil 8: 5 no lu örnek; ivs 110 homozigot

3.5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Sağlık şartlarının düzeldiği, beslenme bozuklukları ve infeksiyonlara bağlı çocuk ölümlerinin azaldığı gelişmekte olan ülkelerde, talasemili yaşayan çocuk sayısı artmakta ve tedavi gereksinimleri fazlalaşmaktadır. Sonuçta, talasemi her geçen gün daha acil ve büyük bir sağlık sorunu haline gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınlarına göre dünyada en az 70 milyon talasemi taşıyıcısı vardır ve her yıl en az 42 bin talasemi major çocuk dünyaya gelmektedir. Beta talasemi major tanısı almış hastaların tedavisinde karşılaşılan güçlükler ve hastalığın ciddi komplikasyonları bu genetik problemi tamamen eradike etmeye yönelik çalışmaların önemini arttırmıştır (88).

Bir β -talasemi allele sahip olan erişkin (β -talasemi minor) bireyler morfolojik olarak anormal eritrositlere sahip olmalarına rağmen klinik olarak sağlıklıdırlar. İki tane hasarlı kromozoma sahip olan homozigot veya çifte heterozigot talasemik bireylerde ise hemolitik bir anemi söz konusudur. Aneminin şiddeti ise taşınan mutasyonun tipinin yanı sıra; gama zincir sentezinin kompensasyon derecesi gibi faktörlere bağlıdır. Örneğin, β -talasemi geni taşıyan kromozomda γ promoterinin -158. pozisyonunda C→T mutasyonunun bulunması ile HbF üretiminin artması klinik şiddeti azaltan bir faktördür. Alfa globin genindeki delesyonlar alfa globin sentezini azaltacağından yine beta talasemi homozigotlarında alfa globin birikimini ve sonuçta beta talasemi kliniğini hafifletebilir bir etkidir. Artmış alfa globin ürününü varlığı ise beta talasemi taşıyıcısı olan bir bireyde klinik olarak asemptomatik durumu talasemi intermedia'ya çevirebilir. Zira, beta talasemide eritrosit öncüllerinde serbest alfa zincirlerinin tetramer oluşturamayıp inklüzyon cisimleri olarak birikmesi, eritrosit öncül hücrelerinde yıkıma neden olan temel etkidir. Gamma zincir sentezinin reaktif olması ise serbest alfa globin miktarını HbF oluşumuna kaydırarak serbest α -globinin zararlı etkilerini hafifletir. Bunlardan da anlaşılacağı gibi β -talasemi mutasyonları oldukça heterojen olduğu gibi klinik gidişi etkileyen faktörler de o denli çeşitlidir. Şiddetli anemi nedeni ile kan transfüzyonlarına bağımlı Talasemi Major fenotipine sahip bireyler sürekli transfüzyon programlarına alınmakta, vücutlarında biriken demir düzeyin azaltıcı ilaçlar kullanmakta, tedavinin bir parçası olarak dalak büyüklüğünün yarattığı komplikasyonları azaltmak için cerrahi olarak dalakları alınabilmekte, kemik iliği transplantasyonu veya sitotoksik ajanlarla (Hidroksiüre, Azatidin) gamma gen ekspresyonlarının artışı ve dolayısıyla HbF düzeylerinde

artış sağlama gibi diğer birçok riskli ve pahalı tedavi seçeneklerine maruz kalmaktadırlar (88, 32, 59).

Bir halk sağlığı problemi olan talasemide, prenatal tanı yöntemlerindeki gelişmeler ve taşıyıcıların taramalarla ortaya çıkarılışı koruyucu tedavi açısından çok etkili olmuş ve gelişmiş Avrupa Ülkeleri'ndeki talasemi sorunu büyük ölçüde çözülmüştür (88).

Türkiye, talaseminin yüksek oranda görüldüğü Akdeniz Ülkeleri'nden biridir ve farklı bölgelerde dağılım bakımından heterojenite gösterir. Türkiye genelinde %2 olarak gösterilen bu oran bazı bölgelerde %10'lara kadar çıkar. Batı Trakya, Ege ve Akdeniz Bölgeleri yüksek riskli yerlerdir. Akriba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye'de beklenenin üzerinde β -talasemili çocuk doğmasının nedenidir. Hastalık, hafif klinikli β -talasemi intermedia ile, transfüzyona bağımlı β -talasemi major arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmekle birlikte, Türkiye'de β -talasemi major olguları ağır basmaktadır. Türkiye'de 30'u aşkın mutasyon tanımlanmıştır. Bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde güçleştirmektedir (88).

Beta talasemi taşıyıcılarının belirlenmesi, hastalığa neden olan mutasyonların moleküler düzeyde saptanması, genetik danışmanlık ve bilinçlendirme çalışmalarının yapılması, riskli ailelere prenatal tanı uygulanması toplum sağlığı açısından çok büyük önem taşımaktadır. Bu şekilde hastalıktan etkilenmiş bireylerin doğumları önlenebilecek; riskli ailelerin kendi tercihlerine göre taşıyıcı ya da normal çocuk sahibi olabilmeleri sağlanabilecek ve hasta çocukların tedavileri için harcanan giderlerden de ekonomik anlamda tasarruf sağlanabilecektir (88, 32).

Bugüne kadar dünyadaki dağılımları farklı olan beta globin sentezini azaltan ya da ortadan kaldıran birkaç delesyon dışında çoğu nokta mutasyonu olan 200'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu geniş moleküler çeşitliliği biraz basite indirgeyen bir faktör, tüm 200 mutasyonun her toplumda görülmemesi ve mutasyonların etnik gruplara özgün olmasıdır. Genelde bir toplumda az sayıda mutasyon o toplumdaki β -talasemi genlerinin %90-95'ini tanımlamaktadır (16, 88).

Görülen mutasyonların çeşitliliği küçük izole etnik gruplarda daha da azalmaktadır. Örneğin; Sardunya Adası'nda sadece iki tip β -talasemi mutasyonu hastalık genlerinin %99'unu oluşturmaktadır (88, 32).

Akdeniz ülkeleri genelinde bakılacak olursa, yaklaşık 35 mutasyon Akdeniz Bölgesine özgü olarak nitelendirilmiş olmakla beraber, bu mutasyonların dağılımı ülkeler arasında

büyük farklılıklar göstermektedir. Türkiye'deki β -talasemi mutasyonlarının çeşitliliği, diğer Akdeniz ülkelerine oranla daha karmaşıktır (10).

Biz bu çalışmamızda, Diyarbakır bölgesinde yaptığımız taramada, β -talasemi taşıyıcılarında moleküler düzeyde belirlenemeyen β -talasemi mutasyonlarının tiplerini saptamayı amaçladık. Tespit ettiğimiz mutasyonlardan IVS-I-110 (G→A) mutasyonu, yaptığımız taramada başka bir tez çalışması olan ' β -talasemi mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi' isimli uzmanlık tezindeki bulgulara göre, Diyarbakır bölgesinde en sık karşılaşılan mutasyon olmuştur (% 27.1). Diyarbakır bölgesinde sıklık açısından birinci sırada tespit ettiğimiz bu mutasyon, aynı zamanda Türkiye'nin yanı sıra birçok Akdeniz ülkesinde de en sık görülen mutasyon tipidir. Bu mutasyonda, intron I'in 110. pozisyonunda G→A değişimi sonucu alternatif bir splice bölgesi meydana gelir. Doğu Akdeniz ülkelerinden Lübnan'da %62.0, Kuzey ve Güney Kıbrısta sırasıyla %74.1 ve %79.8, Lübnan'da %62, eski Yugoslavya'da %45.4, Arnavutluk'ta %43.2, Yunanistan'da %42.6 ve Türkiye'de %39,3 sıklığında görülür. Diyarbakır'ın da içerisinde yer aldığı Türkiye'nin Güneydoğu Anadolu Bölgesinde ise bu mutasyonun sıklığı daha önce %26.4 olarak bildirilmiştir (60). Fenotipik olarak β^+ özellikte olan IVS-I-110 mutasyonu için , taramamız esnasında Diyarbakır bölgesinde tespit ettiğimiz bütün vakalar, taşıyıcı olup Heterozigot Genotip taşımakta olmalarına rağmen dizi analizi çalışmamızda Homozigot Genotip mutasyonunu da tespit ettik.

Çalışmamızda bulduğumuz sonuçlara göre, bu çalışmanın öncesinde yapılan ' β -talasemi mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi' isimli çalışmadaki (Dr. Kemal Güneş-Uzmanlık tezi) sonuçlardan sadece İVS 1.110 oranı %29.3 e çıkmakta diğer mutasyon oranları aynı kalmaktadır. Yaptığımız tarama sonucunda, elde ettiğimiz veriler ışığında Diyarbakır bölgesindeki β -talasemi mutasyon dağılımı tablo 3 te gösterilmektedir. (Talasemi taramasında başka bir çalışma olan; Dr. Kemal Güneş-Uzmanlık Tezi çalışmasındaki sonuçlarla birlikte)

Tablo 3. Çalışmamızda elde edilen Mutasyon türleri ve Dağılımları

MUTASYON	Mutasyonu Taşıyan Kişi Sayısı	Diyarbakır Bölgesindeki Sıklığı (%)
IVS-I-110 (G→A)	39	28.3
IVS-II-1 (G→A)	14	10.5
Codon 44 (-C)	13	9.7
IVS-I-6 (T→C)	7	5.2
Codon 8 (-AA)	7	5.2
Codon 22 (7bp del)	7	5.2
Codon 5 (-CT)	5	3.7
- 30 (T→A)	2	1.5
HbS	2	1.5
IVS-I-1 (G→A)	1	0.7
IVS-I-2 (T→A)	1	0.7
Codon 8/9 (+G)	1	0.7
Codon 39 (C→T)	1	0.7
IVS-II-745 (C→G)	1	0.7
ivs1.130 (221.TTAGGC- TTACGC)	1	0.7

Bulduğumuz verilere göre Diyarbakır’da çok daha heterojen bir mutasyon dağılımı ile karşılaşabileceğimizi düşündürüyor.

Bu heterojen dağılım nedeniyle, tarama çalışmalarında daha sağlıklı sonuçlara ulaşmak için; öncelikle taramanın yapılacağı bölgelerde sık görülen tanımlanmış mutasyonların araştırılması gerekir. Bu maliyet hesapları bağlamında avantajlı bir durum yaratacaktır. Ancak bununla yetinmeyip, özellikle, bir bölgede mutasyon çeşitliliğinin fazla olduğu düşünülüyorsa; mutasyon tipleri belirlenemeyen ancak talasemi taşıyıcısı olması muhtemel örneklerde, mutasyonu açığa çıkarmak için bir adım daha ileriye gidilmelidir.

Türkiye'nin diğer bölgelerinde en fazla tespit edilen mutasyon tipi olan IVS1.110, Diyarbakır için de en sık görülen mutasyon tipi olmuştur. Türkiye genelinde görülen farklılıklara Diyarbakır içinde de rastlanılmıştır. Yaptığımız taramada toplam 15 farklı mutasyon tipi görülmüştür. Bölgemizin Akdeniz bölgesi ile olan yakın ilişkilerinden ötürü prenatal tanı merkezleri acil olarak olmasa bile kurulmalı ve bir halk sağlığı sorunu olan bu hastalığın tanı giderleri devlet tarafından karşılanmalıdır. Türkiye'de ciddi oranların olduğu bölgeler düşünülerek β - talasemi haritasının çıkarılması ve halk eğitimi ile taşıyıcı olan ailelerin arasındaki evliliklerin kontrollü olması ve akraba evliliğinin önüne geçilmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. **Weatherall D.J.** Disorders of Globin Synthesis: The Thalassemias. Edited by: Litchman M.A., Beutler E., Kipps T.J., Seligsohn U., Kaushansky K., Prchal J.T.:Williams Hematoloji. U.S.A: McGraw-Hill, 633-641, 2006
2. **Dinçol G., Pekçelen Y., Atamer T., Sargın D., Nalçacı M., Aktan M., Beşışık S.**Hemolitik Anemiler. Edited by: Nobel Tıp Kitabevleri Klinik Hematoloji: Türkiye:İstanbul Üniversitesi, 87-152, 2003.
3. **Vallance H., Ford J.** Carrier testing for autosomal-recessive disorders. Critical Reviews in Clinical Laboratory Science 40, (4), 473,2003
4. **İnce H.H., Ayyıldız O., Kalkanlı S., Batun S., Müftüoğlu E.** Molecular basis of beta-thalassemia mutations in Diyarbakır in the southeastern region of Turkey. Hemoglobin 27,(4), 275-278, 2003
5. **Tadmouri G.O., Başak AN.** β -Thalassemia in Turkey: A Review of the Clinical, Epidemiological, Molecular and Evolutionary Aspects Hemoglobin 25,(2), 227-239, 2001
6. **Liliana CR, Héctor MT, Viviana V.** The molecular basis of β - thalassemia in Argentina.Influence of the pattern of immigration from the Mediterranean Basin.Hematologica (2004): 88; 746-747.
7. **Lukens JN.** The thalassemia and the related disorders:quantitative disorders of hemoglobin synthesis, In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F , Greer JP and Rodgers GM, (Eds). Wintrobe's Clinical Hematology. 10th Ed.: Baltimore (1999): 1405-1448.
8. **Tüzmen Ş, Schechter AN.** Genetic diseases of hemoglobin:Diagnostic method for educidating β -thalassemia mutations. Blood Rev (2001): 15 (1); 19-29.
9. **Altay Ç.** The Frequency and DistributionPattern of β -Thalassemia Mutations in Turkey. Turk J Haematol (2002): 19(2); 309-315.
10. **Başak AN.** Türkiye’de β -Talasemi’nin Moleküler Temeli. Tanıda Moleküler Tıp Senpozyumu. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD: Diyarbakır (2003): 33-35.
11. **Sarnaik SA.** Thalassemia and related hemoglobinopathies. Indian J Pediatr, 2005; 72: 319-324.

- 12. Basak AN.** Talasemi Moleküler Genetigi. Temel Moleküler Hematoloji Kursu. Mersin, 2005: 99-106.
- 13. Lukens J.** The Thalassemia and Related Disorders: Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis.
Eds; Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. In. Wintrobe's Clinical Hematology , 10th Ed., Baltimore, WB Saunders Company, 1999:1410-1442
- 14. Tadmouri GO, Tüzmen S, Özçelik H, Özer A, Baig SM, Senga EB, Basak AN.** Molecular and population genetic analyses of β -thalassemia in Turkey. Am J Hematol, 1998; 57: 215–220.
- 15. Arcasoy A.** Türkiye’de Thalassemia Taşıyıcı Sıklığı ve Anormal Hemoglobinler. Ankara Talasemi Derneği, 1994.
- 16. Weatherall DJ.** The Thalassemias, In; Beutler E, Lichtman M, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, (Eds), Williams Hematology 6th Ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division (2001): 5; 547-580.
- 17. Thein SL.** Thalassemia syndrome, Molecular Basis of Disease. Genetic Modifiers of β -Thalassemia. Haematologica (2005): 90; 649-660.
- 18. Kazazian HHJr, Boehm CD.** Molecular Basis and Prenatal Diagnosis of β -Thalassemia. Blood (1988): 72; 1107-1113.
- 19. Perea FJ, Magan MT, Cobia’n JG, Sa’nchez-Lo’pez JY, ML Cha’vez, Zamudio G.** (Eds). Molecular spectrum of β -thalassemia in the Mexican population. F.J. Perea et al./ Blood Cells, Molecules and Diseases. (2004): 33;150.
- 20. Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR., WG Wood.** The hemoglobinopathies, In: Scriver Charles R, Beaudet AL, Williams S, (Eds). The Metabolic&Molecular Bases of Inherited Disease, 8th Edition; McGraw-Hill companies.(2001): Vol-III ; 4571-4636.
- 21. Başak AN.** Talasemi Moleküler Genetiği. Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu. Mersin. (2005): 99-106.
- 22. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** Harper Biyokimya. 25.Baskı, İstanbul; Nobel Matbaacılık, 2004.
- 23. Champe PC, Harvey RA.** Lippincott Biyokimya. 2. Baskı, İstanbul: Tayf Ofset, 1997.
- 24. Huisman THJ.** The structure and function of normal and abnormal hemoglobins.Br Clin Haematol 1993 ; 6:1.

25. **Şişli N.** İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık, Ankara 2002.
26. **Champe PC, Harvey RA.** Globuler ve Fibroz Proteinler. Lippincott Biyokimya: Nobel Kitabevleri, Ankara 1997.
27. **Erisim.** (<http://pharyngula.org/~pzmyers/MyersLab/teaching/Bi104/107/heme.html>). Erisim tarihi: 15.02.2009
28. **Higgs DR, Thein SL, Wood WG.** Human Hemoglobin, In: Gibbons R. Higgs DR. Old JM., Oliveri NF, Thein SL, Wood WG, (Eds.). The Thalassemia Syndromes 4th Ed. Blackwell Science Ltd. Oxford (2001): 65-120.
29. **Akar N.** Klinik Patolojiye Giriş, 2.Baskı, Antıp A.Ş. Ankara (1999).
30. **Zubay G.** RNA Synthesis and processing, In: Biochemistry, Zubay G. (Eds), 3rd Edition. Wm C. Brown Publishers, Iowa USA (1993): 791-829.
31. **Wong C, Dowling CE, Saiki RK, Higuchi GR, Erlich HA, Kazazian HHJ.** Characterization of β thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. Nature (1987): vol 330; 384-386.
32. **Topal K.** Antakya, Kayseri ve İzmir Örneklerinde β -talasemi Mutasyon Tiplerinin Saptanması. Uzmanlık Tezi; ÇÜ Tıp Fak Biyokimya ABD. Adana (1998).
33. **Gümrük F.** Hemoglobin ve Hemoglobinopatiler. İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalın HE, Süleymanlar G, (Eds.), Temel İç hastalıkları, 1.Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Ankara (1996): 1233-1243.
34. **Yüreğir GT.** Temel Biyokimya II, Kemal Matbaası. Adana (1983)
35. **Yüreğir GT.** Hemoglobin Yapı ve Özellikleri. Klinik Biyokimya I (1990): 132-143.
36. **Weatheral DJ.** The New Genetics and Clinical Practice. Oxford University Press, New York (1991)
37. **Clark BE, Thein SL.** Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. Clin. Lab. Haem. Blackwell Publishing Ltd. (2004): 26; 159–176.
38. **Joy Ho P.** The Regulation of β -Globin Gene Expression and β -Thalassemia. Pathology. Carfax Publishing (1999): 31; 315
39. **Maloni A, Rosatelli MC, Faa V, Sardu R, Saba L, Murru S, Sciratta GV et al.** Promoter Mutations producing mild β -thalassemia in the Italian population.Br J Haematol 1992;80:222-226)

- 40. Marini MG, Asunis I, Porcu L, Salgo MG, Loi MG, Brucchietti A, et al.** The distal β -globin CACCC box is required for maximal stimulation of the β -globin gene by EKLF. *Br J Haematol* 2004; 127:114-7.
- 41. Trudel M, Constantini F.** A 3' enhancer contributes to the stage specific expression of the human β -globin gene. *Genes Dev.* (1987): 1; 954-961.
- 42. Tuan D, Solomon W, Li Q, London IM.** The β -like Globin Gene Domain in Human Erytroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* (1985): 82; 6384-6388)
- 43. Atweh, G.F., Benz, E.J.** Hemoglobinopathies. Edited by: Humes H.D., Dupont H.L., Gardner L.B., Griffin J.W., Harris E.D., Hazzard W.R., King T.E., Loriaux D.L., Nabel E.G., Tood R.F., Traber P.G.: *Kelley's Texbook of Internal Medicine.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 1741-1746, 2000
- 44. Çürük M.A.** Hemoglobinopatilerde Tarama ve Tanı Yöntemleri Neler Olmalı? Edited by: Canatan D., Aydınok Y.: 3.Uluslar arası Talasemi Yaz Okulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbı Okulu. İstanbul: 157-168, 2004
- 45. Beudet A.L., Csriver C.R., Sly W.S., Valle D.** Genetics, biochemistry and molecular basis of variant human phenotypes. Edited by: Scriver C.R., Beudet A., William S.S., Valle D.: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Diseases.* New York: McGraw-Hill, 3-45, 2001
- 46.** <http://www.thd.org.transkripsiyon/sub/turk/doc/nazlibasak>
- 47. Tüzmen Ş., Schechter AN.** Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating β -Thalassemia mutations. *Blood* 15, 19-29, 2001
- 48. Başak AN.** Moleküler Tanı ve Yöntemleri. Edited by: Canatan D., Aydınok Y.: 3. Uluslararası Talasemi Yaz Okulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbı Okulu. İstanbul: 199-206, 2004
- 49. Kazazian HH, Boehm CD.** Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood*, 1998; 72(4): 1107-1116.
- 50. Tüzmen S, Schechter AN.** Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic method for elucidating β -thalassemia mutations. *Blood Rev*, 2001; 15(1): 21-32.
- 51. Stamatoyannopoulos G.** Hemoglobin switching, In: *The molecular Basis of Blood Diseases.* 2nd Ed. By Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW, Varmus H. Saunders. Philadelphia (1994): 107.

- 52. Forget BG.** Molecular Genetics of the Human Globin Genes, In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge, UK, Cambridge University Press (2001): 117-30.)
- 53. Lukens JN.** The Thalassemia and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis, In: Wintrobe's Clinical Hematology, (Eds.), Lee RG, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. 9th Ed, Lea & Febiger Philadelphia, London (1993): 1; 1102-1145.
- 54. Talmaci R, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Coriu D, Colita D, Gavrila L.** Scanning of β -globin gene for identification of β -thalassemia mutation in Romanian population. J. Cell. Mol. Med. (2004): 8; 2: 232-240.
- 55. Thein SL.** β -Thalassemia, In: Balliere's Clinical Hematology. International Practice and Research. Sickle Cell Disease and Thalassemia, Ed, GP Rodgers London (1998): 91.
- 56. Cao A, Galanello R, Rosatelli MC.** Genotype-Phenotype Correlations in β -Thalassemias. Blood Rev (1994): 8; 1: 1-12)
- 57. Athanassiadou A, Adamandia P, Zoumbos N, Maniatis GM, Gibbs R.** A novel β -thalassemia mutation in the 5' untranslated region of the β -globin gene. Br J Haem (1994): 88; 307-310)
- 58. Orkin SH, Sexton JP, Cheng TC, Goff SC, Giardina PJV, Lee JI, Kazazian HH Jr.** ATA box transcription mutation in β -thalassemia. Nucleic Acid Researchs (1983): 11; 14: 4727-4734.
- 59. Çürük MA.** Beta Talasemi Sendromları ve Mutasyonları. Uluslararası Katılımlı Tıtus HJ. Huisman Memorial Symposium II & Anormal Hemoglobinler ve Talasemiler Kursu. Hemoglobin Derneği, Adana (2006): 34-51.
- 60. İnce H.** Diyarbakır Bölgesinde β -Talasemi Mutasyonlarının Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi. Doktora Tezi; Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi. Diyarbakır (2000).
- 61. Orkin SH, Sexton JP, Goff SC, Kazazin HH.** Inactivation of an acceptor splice site by a short deletion in β -thalassemia. J Biol Chem (1983): 258; 7249)
- 62. Kazazian HH Jr.** The Thalassemia syndromes; Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. Sem. Hematol (1990): 27; 3: 209-228.
- 63. Basslinger M, Moschanas N, Flavell RA.** β^+ thalassemia: Aberrant splicing results from a single point mutation in an intron. Cell (1981): 27; 289.
- 64. Orkin SH, Goff SC.** Nonsense and Frameshift Mutations in β^0 -Thalassemia Detected in Cloned β -Globin Genes. The journal of biological chemistry (1981): 256; 19; 9782-9784.

- 65. Arpacı A.** Antakya yöresinde β -talasemik gen sıklığı ve mutasyonlarının gen amplifikasyonu yöntemi ile saptanması. Uzmanlık tezi; ÇÜ Tıp Fak.Biyokimya ABD. Adana (1991).
- 66. Nienhuis AW, Anagnou NP, Ley TJ.** Advances in thalassemia research. Blood, 1984; 63(4): 738-758.
- 67. Huisman THJ.** The β^+ and δ Thalassemia Repository. Hemoglobin (1992):16; 237-259.
- 68. Rosatelli MC, Pischedda A, Meloni A, Saba L, Pomo A, Travi M, et al.** Homozygous β - Thalassemia Resulting in The β - Thalassemia Carrier State Phenotype. Br. J. Haem (1994): 88; 562-565.
- 69. Rund D, Rachmilewitz E.** Pathophysiology of α - and β - thalassemia: Therapeutic implications. Sem Hematol, 2001; 38(4): 343-349.
- 70. Weatherall DJ.** The Thalassemias. Eds; Williams WJ, Beutler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. In. Williams Hematology, 5th Ed., New York: McGraw Hill Publishing Co, 1995; 581-615.
- 71. Moorsel C., Wijngaarden E., Fokkema I., Dunnen J., Roos D., Zwieten R., Giordano P., Hartevelde C.** β -Globin mutation detection by tagged single-base extension and hybridization to universal glass and flow-through microarrays. European Journal of Human Genetics 12,(7), 567-573, 2004
- 72. Kazazian H.H., Jr, Boehm D.C.** Molecular Basis and Prenatal Diagnosis of β -Thalassemia. Blood 72,(4), 1107-1116, 1988
- 73. Weatherall D.J., Provan A.B.** Red Cell I: Inherited anemias. The Lancet. 355, 1169-1175, 2000
- 74. Canatan D., Ratip S., Kaptan S., Coşan R.** Psychosocial burden of β -thalassemia major in Antalya, south Turkey. Social Science & Medicine 56,(4), 815-819, 2003
- 75. Cai S.P., Wall J., Kan Y.W., Chehab F.F.** Reverse dot blot probes for the screening of beta-thalassemia mutations in Asians and American blacks. Hum Mutat 3,(1), 59-63, 1994
- 76. Hardison R., Reimer C., Chui D.H., Huisman T.H., Miller W.** Electronic access to sequence alignments, experimental results and human mutation and aid to studying globin gene. Genomics 47,429-437, 1998

- 77. Üstündağ M.** Hemoglobinopati Kontrol Programı. Edited by: **Canatan D., Aydınok Y.** 3.Uluslararası Talasemi Yaz Okulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbı Okulu. İstanbul:145-148, 2004
- 78. Robbins SL, Kumar V.** Hematopoetik ve Lenfoid Sistemler In: Basic Pathology, 4th edition; WB. Saunders Company / Güneş Kitabevi: Ankara (1990):12; 453-524.
- 79. Nagel LR, Ranney HM.** Genetic Epidemiology of structural mutations of the β -globin gene. Sem Hematol (1990): 27; 4: 342-359.
- 80. Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB.** The population genetics of the haemoglobinopathies, In: Rodgers GP, ed. Baillière's Clinical Haematology. London: Bailliere Tindall (1998): 1-52.
- 81. Trecartin RF, Liebhaber SA, Chang JC, Lee KY, Kan YW.** β^0 Thalassemia in Sardinia Is Caused by a Nonsense Mutation: J. Clin Invest (1981): 68; 1012-1017.
- 82. Kutlar A.** The Thalassemia Repository. Hemoglobin (1987): 11; 93-109.
- 83. Davies S.C, Cronin E, Gill M, Greengross P, Hickman M, Norman C.** Screening for sickle cell disease and thalassemia: a systemic review with supplementary research. Health Technology Assessment (2000): vol.4; No.3.
- 84. Bianco I, Cappablanca MP, Foblietta E, Lerone M, Deidda G, Morlupi L, et al.** Silent Thalassemias: Genotype and Phenotypes: Haematologica (1997); 82:269-280.
- 85. Cappellini MD.** Silent Thalassemias: Journal of Hematology (1997): 82: 3: 257-258.
- 86. Rund D, Filon D, Strauss N, Rachmilewitz EA, Oppenheim A.** Mean Corpuscular Volume of Heterozygotes for β -Thalassemia Correlates with the Severity of Mutations. Blood (1992): 79; 238-243.
- 87. Pirastu M, Ristaldi MS, Loudianos G, Murru S, Sciarrata GV, Parodi MI, et al.** Molecular Analysis of Atypical β -thalassemia heterozygotes. Ann NY ACAD (1990): 2;90-97
- 88. Çavuşoğlu A.** Beta Talasemi ve Genetik Heterojenitesi. Uluslararası Katılımlı Tıtus HJ. Huisman Memorial Symposium II & Anormal Hemoglobinler ve Talasemiler Kursu. Adana (2006): 23-33.
- 89. Öner C, Öner R, Gurgey A, Altay Ç.** A New Turkish Type of beta-thalassemia major with homozygosity for two non-consecutive 7.6 kb deletions of the pseudo beta and beta genes and an intact delta gene. Br. J Haematol (1995): 89; 306-312.

- 90. Huisman THJ.** Frequencies of Common β thalassemia alleles among different populations: Variability in Clinical Severity. *Br. J Haematol* (1990): 75; 454-457.
- 91. Camascella C, Cappellini Maria D.** Thalassemia Intermedia. *Haematologica* (1995): 85; 58-68.
- 92. Thein SL, Winichagoon P, Hesketh C, Best S, Fucharoen S, Wasi P, Weatherall DJ.** The molecular Basis of β -Thalassemia in Thailand Application to Prenatal Diagnosis. *Am J Hum Genet* (1990): 47; 369-375.
- 93. Altay Ç.** Pattern of β -Thalassemia Mutations in Turkey. *Turk J Haematol* (2002): 19 (2); 309-315.
- 94. Altay Ç, Basak AN.** Molecular basis and prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Turkey. *Int J Pediatr Hematol Oncol* (1995): 2; 283-90
- 95. Öner R, Altay Ç, Gurgey A, Aksoy M, Kilinc Y, Stoming TA, et al.** β -thalassemia in Turkey. *Hemoglobin* (1990):14; 1-13.
- 96. Ghazi O Tadmouri, Başak AN.** β -thalassemia in Turkey; A review of the clinical epidemiological molecular and evolutionary aspects. *Hemoglobin* (2001): 25/2; 227-239.
- 97. Zülal, A.** 2001, İnsan Genomu, kalıtım şifresinin peşinde 136 yıl, TÜbitak Yayınları, Mart; 5-11
- 98. Maxam A., Gilbert, W. 1977,** A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 560-4
- 99. Sanger f., Nicklen S., Coulson, A.R.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74, 5463-7.
- 100. Sambrook J. Fritsch E.F., Maniatis T.** 1989 *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory Press New York.
- 101. Klug S.W., Cummings W.R.,** 2000 *Concept of Genetics*, Prentice Hall, New Jersey 745
- 102. Perkin Emler.** *ABI 310 Genetic Analyzer Manuel*, 2000.
- 103. PE Applied Biosystems.** *ABI Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit protocol*, 1998

ÖZGEÇMİŞ

08.11.1972 Ergani doğumluyum.1994 yılında Dicle Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümünden mezun oldum.Aynı yıl Milli Eğitim Bakanlığı'nda öğretmen olarak çalışmaya başladım.1998 yılında kurumlar arası naklen geçişle Dicle Üniversitesine Kimyager olarak geçiş yaptım. 2006 Yılında Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilimdalı'nda Yüksek Lisans Eğitimime başladım.