

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİMDALI
İMMÜNOLOJİ BİLİM DALI

DİYARBAKIR BÖLGESİNDE BETA TALASEMİ MUTASYONLARININ
MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

111760

HAZIRLAYAN
ARŞ.GÖR.H.HAKAN İNCE

111760

TEZ DANIŞMANI
PROF.DR.EKREM MÜFTÜOĞLU

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DİYARBAKIR 2000

ÖNSÖZ

Beta talasemi dünyada sıkça gözlenen genetik hastalıklardan biridir. Dünya talasemi kuşağı üzerinde bulunan Türkiye'de beta talasemi önemli bir sağlık sorunudur. Ülkenin güneyinde yer alan Çukurova bölgesinde % 3.9 olarak bulunmuştur. Türkiye'de yapılan çalışmalarda bizim bulunduğumuz bölgede bu konu ile ilgili hiçbir çalışmanın yapılmamış olması, bizi bu bölgede bulunan mutasyonları tespit etmeye sevk etmiştir.

Yaptığımız bu çalışmayla tespit ettiğimiz mutasyonların Türkiye ve Dünya Beta talasemi haritasının tamamlanmasında önemli bir yer tutacağına inanmaktayız. Yapılan mutasyon tespitlerinden sonra bölgemizde prenatal tanının daha rahat yapılabileceğine ve dolayısıyla sağlıklı bireylerin dünyaya getirilebileceğine inanıyoruz.

Bu çalışmamı büyük bir sabır ve titizlikle yöneten ve yönlendiren sayın hocam Prof.Dr.Ekrem MÜFTÜOĞLU' na , çalışmalarımda hocamla beraber tüm desteklerini sağlayan hocalarım sayın Doç.Dr.Sabri BATUN ve Doç.Dr.Orhan AYYILDIZ' a, kan örneklerini toplamamda yardımlarını esirgemeyen Arş.Gör.Dr.Mehmet Nuri ÖZBEK ve Arş.Gör.Dr.Hakan ONUR'a ve çalışmamın tamamlanmasında büyük bir destek veren sayın hocam Yrd.Doç.Dr. M. Akif ÇÜRÜK' e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin hazırlanmasında ve laboratuvar çalışmalarımda desteğini esirgemeyen hematoloji laboratuvar çalışanlarına ve çalışmalarımda desteğini esirgemeyen eşime ayrıca teşekkür ederim.

Arş.Gör.H.Hakan İNCE

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
1-TARİHÇE	4
2-BETA TALASEMİNİN DÜNYADAKİ DAĞILIMI	5
3-HEMOGLOBİNİN YAPISI	6
4HEMOGLOBİN SENTEZİ	8
5-PROTEİN SENTEZİ	9
6-BETA TALASEMİDE BELİRLENEN MOL.BOZUKLUKLAR	16
7-BETA TALASEMİ MUTASYONLARI	17
A-Transkripsiyon Mutasyonları	17
B-UTR Bölgesi Mutasyonları	18
C-Başlatıcı Kodon Mutasyonları	19
D-RNA Mutasyonları	20
a-Yapışma Yerlerini Tutan Mutasyonlar	20
b-Yapışma Yerlerine Yakın Diziler	21
c-Intronlar (IVS) İçindeki Değişiklikler	21
d-Gizli Yapışma Yerlerinin Aktivasyonu	23
E-Anlamsız Kodon Oluşumu ve Dizi Kayması	24
1-Anlamsız Kodon Oluşumu	24
2-Dizi Kayması	24
F-Dayanıksız Globinler	25
G-Talasemik Hemoglobinler	25
H-Poli A Mutasyonları	26
I- Delesyona Bağlı Beta Talasemiler	26
8-BETA TALASEMİNİN KLİNİK FORMLARI	29
A-Beta Talasemi Taşıyıcıları	29
B-Beta Talasemi Major	29
C-Beta Talasemi İntermedia	30
D-Sessiz Beta Talasemiler	31
E-İnklüzyon Cisimli Beta Talasemi	31
9-BETA TALASEMİNİN PATOGENEZİ	32
10-BETA TALASEMİ MUTASYON. POPULASYON ÖZELLİĞİ	33
A-Beta Talasemi Mutasyonlarının Dünyadaki Dağılımı	33
B-Akdeniz Populasyonlarında Mutasyonların Dağılımı	35
C-Doğu Populasyonlarında Mutasyonların Dağılımı	35
D-Ender Bazı Mutasyonlar	36
E-Türkiyede'ki Beta talasemi Mutasyonlarının Dağılımı	36

MATERYAL VE METOD	40
A-CİHAZLAR	40
B-KİMYASAL MADDELER	40
1-Katı Maddeler	40
2-Sıvı Maddeler	41
C-MATERYAL TOPLANMASI	41
D-ANALİZ YÖNTEMLERİ	42
1-Coulter	42
2-Lökositten DNA İzolasyonu	42
a-Prensip	42
b-Fenol Kloroform-İzoamil Alkol Yöntemi	42
c-Yöntem	44
d-Hesaplama	46
3-Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	46
a-PCR' in Prensibi	46
b-ARMS' in Prensibi	48
c-Protokol	51
d-PCR Programı	51
e-Yöntem	52
4-ARMS Yöntemi İle Mutasyonların Saptanması	52
5-Agaroz Jel Elektroforezi	57
a-Prensip	57
b-Kullanılan Çözeltiler	57
c-Yöntem	58
BULGULAR	59
TARTIŞMA	71
ÖZET	75
SUMMARY	76
KAYNAKLAR	77

GİRİŞ VE AMAÇ

Talasemi , hemoglobin (Hb) molekülünün yapısında yer alan globin zincirlerin den birisinin veya birden fazlasının sentezindeki azalma yada yokluğu ile karakterize olan genetik bir hastalıktır. Yunanca (thallas) anlamına gelen bu isim ilk kez Akdeniz ülkelerinde yaşayan insanlarda görülmesinden dolayı verilmiştir. Akdeniz, Ortadoğu ve Güneydoğu Asya ülkeleriyle Pasifik adaları ve Afrika'da talasemi insidansı yüksektir. (18, 21,31).

11 nolu kromozomun kısa kolu üzerinde bulunan bu gen Beta globin zincir sentezini kontrol eder. Beta geninin DNA dizisi üzerindeki değişikliklerle meydana gelen beta talasemi sendromları, otozomal resessif olarak geçiş göstererek hipokromik mikrositer anemiye neden olmaktadır (18).

Yüksek oranda talasemi geni taşıyan toplumlar, Akdeniz'den başlayıp Ortadoğu üzerinden Güneydoğu Asya ülkelerine uzanan bölgede yer almaktadır.

Dünya nüfusunun yaklaşık % 3'ü beta talasemi geni taşımaktadır. Ayrıca ülkemizde de Beta-talasemi oldukça yaygındır. Hastalığın ülkemizde fazla olarak bulunmasından dolayı bu konu ile ilgili çalışmalara ağırlık verilmesine neden olmuştur. Hastaların klinik tabloları ve hematolojik verilerinin incelenmesi ile hastalık kolaylıkla tespit edilmektedir. Ancak taşıyıcı hastaların tam tespiti moleküler düzeydeki çalışmalarla yapılabilmektedir.

En çok İtalyan ve Yunanlı toplumlarda kendini gösteren Beta talasemi Sardinia (%11-30), Sicilya (% 10) ve Kıbrıs'ta (% 14) yüksek oranlar da görülmeye başlamıştır. Türkiye'de ise yaklaşık % 2 olarak tespit edilen talasemi ülkenin güneyinde % 3.9 olarak rapor edilmiştir.(11,18)

Genel olarak ülkemizin güneyinde yarleşen bu hastalık önemli bir toplumsal sorun hâline gelmiştir. Hastalığın tanısında büyük ilerlemeler kaydedilmiş ve ülkemizde de bu konudaki çalışmalara ağırlık verilmiştir. Etrafımızdaki komşu ülkelerde ise yüksek oranlarda bulunmuş olması bizim bölgemiz inde ne derece etkilendiğinin belirlenmesi ihtiyacını doğurmuştur.

Hastaların klinik tablosunun ve hematolojik verilerinin incelenmesi ile hastalar kolayca tanımlanabilmektedir. Ancak taşıyıcı hastaların tam tespiti moleküler düzeydeki çalışmalara yapılabilmektedir.

Diyarbakır bölgesinde ise bugüne kadar Beta talasemi hastalarının mutasyonlarının moleküler düzeyde incelenmemiş olması ve bu konu hakkında herhangi bir bilginin olmaması bizim bu hastalığın bölgemizdeki dağılımını belirlemeye yönlendirmiştir. Toplumsal bir etkiye sahip olan beta talaseminin mutasyonlarının belirlenmesi amacıyla yaptığımız bu çalışmanın, bölgemizdeki mutasyonların tespiti ile mutasyon haritasının çıkarılmasına, dünya talasemi mutasyon haritasının tamamlanmasına ve bununla beraber yöredeki prenatal tanı çalışmalarını kolaylaştıracağı ve sonuç olarak sağlıklı bireylerin dünyaya getirilmesi için yapılacak çalışmalara ışık tutacağına inanmaktayız.

Bu amaçtan hareket ederek Talasemi hastalarının mutasyon tipleri moleküler yöntemlerden ARMS (Amplification Refractory Mutation System) tekniği ile saptanmaya çalışılmıştır.ARMS yöntemini kullanılma amacı; Amplifikasyon sonrası diğer deneylere ve radyoaktif madde kullanımına ihtiyaç olunmamasıdır. Talasemi mutasyon tiplerinin saptanmasında kullanılan diğer yöntemlerde (Dot-blot hibridizasyon) radyoaktif madde kullanılması, ARMS yönteminde ise radyoaktif maddenin kullanılmaması hem zaman hem de maliyet açısından önemli avantajlar sağlamaktadır.(28,35)

GENEL BİLGİLER

β -Talasemi Hb molekülünün yapısında bulunan beta globin zincirlerinin sentezindeki bozukluğa bağlı olarak meydana gelen hipokromik, mikrositer ve hemolitik anemi ile karakterize otozomal resessif bir hastalıktır. Bozukluğun türüne bağlı olarak globin sentezi azalır veya tamamen engellenir. Buna bağlı olarak eritrosit içindeki hemoglobin miktarının azalmasıyla hipokromi görülür. Normal olarak sentezlenen zincirin fazlası ise hücre içinde eşleşmeden birikir. Bu kısım proteolize olurken eritrosit içinde çökelen atıklar hücre zarını etkileyerek kemik iliğinde ve periferel dolaşımda hücrenin erken yıkımına neden olur (11, 21,31).

β -Talasemili hastalar kan transfüzyonuna bağımlı kalarak yaşamlarını sürdürmek zorundadırlar. β -Talasemi de, demir depolarını azaltmak için yapılan şelasyon terapisi bile yaşam sürelerini en fazla 25-30 yıl uzatabilmektedir. Malarya enfeksiyonuna karşı normal bireylere nazaran daha dayanıklıdırlar. (11, 12)

Beta globin sentezindeki azalma veya yokluğundan meydana gelen β -Talasemi sendromlarının çoğu , beta geni üzerindeki nükleotid değişimi, ilavesi veya çıkması ile oluşur. Delesyon sonucu ortaya çıkan sendromlar alfa talasemi ile kıyaslandığında sayısal olarak daha az olduğu tespit edilmiştir (2,21,31)

Hastalığın yaygın olduğu toplumları Akdenizliler, Kuzey Afrikalılar, Orta Doğulular, Asya Hintlileri, Çinliler, Güneydoğu Asyalılar ve Siyah Afrikalılar olarak sıralayabiliriz. Dünya popülasyonunun yaklaşık % 3'ü β -talasemi hastalığına maruz kalmıştır. β -Talasemi geni taşıyanlar normal görünümde olup MCV ve MCH değerleri düşük ve genelde HbA₂ değerleri ile HbF değerleri normalden yüksektir. Günümüzde β -Talasemi mutasyonlarının % 99'u bilinmektedir. (13,16,17).

1- TARİHÇE

Homozigot β -Talasemi vakası ilk kez 1925 yılında Thomas B.Cooley tarif edilmiştir. 1932 yılında Hiple ve Bradford tarafından Talasemi ismi kullanılmıştır. 1940-1950 yılları arasında değişik formlarının olduğu ortaya çıkarılmıştır. 1944-1948 yılları arasında Valentine ve Neel talasemi majörü belirlemişlerdir. 1949 yılında Neel ve Beet'in ve 1950' de ise Pauling' in çalışmaları insan hemoglobinlerinin bir çift gen tarafından kontrol edildiğini ortaya koymuştur. İnsan Hemoglobini üzerindeki çalışmalar sonunda bu peptidler α ve β olarak Rehinesmith (1957) ve Braunitizer (1958) tarafından isimlendirilmiştir. (11,42).

1960 lı yıllarda tekniğin ilerlemesi ile α , β ve γ zincirlerinin protein analizi yapılmış ve HbA₂ keşfedilerek delta zincirinin yapısı incelenmiştir.1963 yıllarında Fessas, β -Talasemili hastaların kırmızı hücrelerinde inklüzyon cisimciklerini göstererek bunların çökelen alfa zincirlerinin olduğunu ve bunların eritrositlerin olgunlaşmasını engellediğini ortaya atmıştır.1970'li yıllarda mRNA 'dan cDNA'nın sentezi reverse transkriptaz enziminin keşfiyle gerçekleştirilmiştir. hibridizasyonuna ise Restriksiyon enzimlerinin keşfi ile genomik DNA'nın kesilmesi, kesilen parçaların jel elektroforezi ile ayrıştırılarak başlanmıştır.(42)

Günümüzde Taq polimeraz ve nükleotid trifosfatlar kullanılarak genomik DNA'nın istenilen kısmı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile çoğaltılmaya başlanmıştır. (Saiki 1987) (28,44,)

Bugüne kadar β -Talasemi ye neden olan 150 mutasyon bu yolla belirlenmiştir. Moleküler yapının belirlenmesi talasemi sendromlarındaki klinik farklılığı açıklanmış ve prenatal tanının da kolayca yapılabilir hale gelmesini sağlamıştır.(11,21,27,49,50)

2- BETA TALASEMİNİN DÜNYADAKİ DAĞILIMI

Bêta talasemi Atlas Okyanusundan, Cebelitarık boğazına, oradan Akdeniz Ülkeleri, Ortadoğu, Hindistan ile Güneydoğu Asya Ülkeleri ve Pasifik adalarını içine alan geniş bir alana yayılmıştır. (11,21)

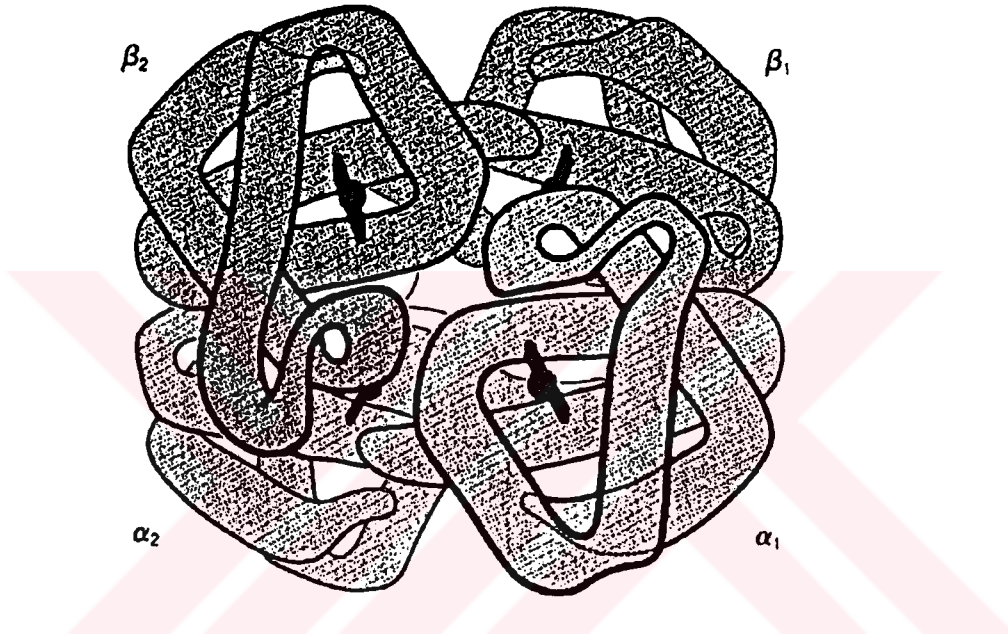
Dünyadaki dağılımı büyük farklılıklar gösteren Beta Talasemi, en sık olarak Akdeniz ülkelerinde(% 0.5 – 14) Afrika ve Amerikalı siyahlarda (% 1.5) Güneydoğu Asya ülkelerinde (% 5) görülmektedir. Akdeniz Ülkelerinde de dağılımı oldukça farklılık gösteren Beta talasemi insidansı Kıbrıs'ta %14.7, Yunanistan'da % 8 Arnavutluk'ta %7.1, İtalya'da %3.7, Sardinya'da %12.6, Sicilya'da %5.9, Libya'da %4.6 ve Tunus'ta %4.4 olarak gösterilmiştir. Türkiye, Lübnan, İsrail, Malta, Cezayir, Fas ve Korsika'da ise % 2-3 arasında saptanmıştır. (9,11,21,23,31)

Dünya Talasemi kuşağı üzerinde bulunan Türkiye'de beta talasemi mutasyonlarını belirlemek amacıyla tarama çalışmaları yapılmış ve değişik yörelerde yapılan araştırmalar taşıyıcı sıklığının % 2-4 arasında olduğunu göstermiştir.(2,4,31)

3- HEMOGLOBİNİN YAPISI

Hemoglobin; Kırmızı kan hücreleri içinde bulunan ve dokulara oksijen taşıyan tetramer yapıda bir metaloproteindir. İki alfa ve ikide beta zinciri içerir. Yetişkinlerde % 95-98 arasında bulunur. Hb' nin molekül ağırlığı 64.500 dalton, çapı ise 64⁰ A'dur.

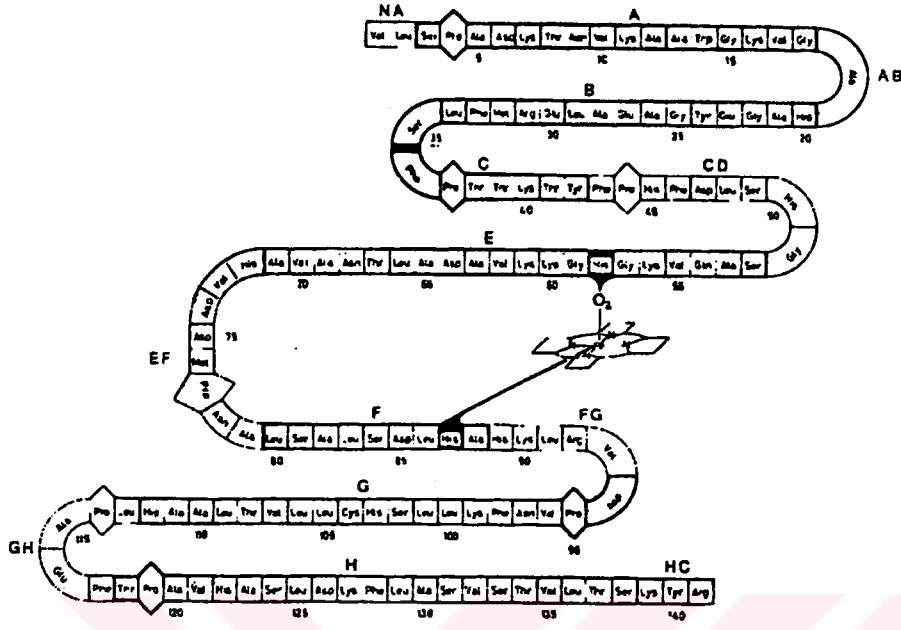
Hemoglobinin yapısı:(51)



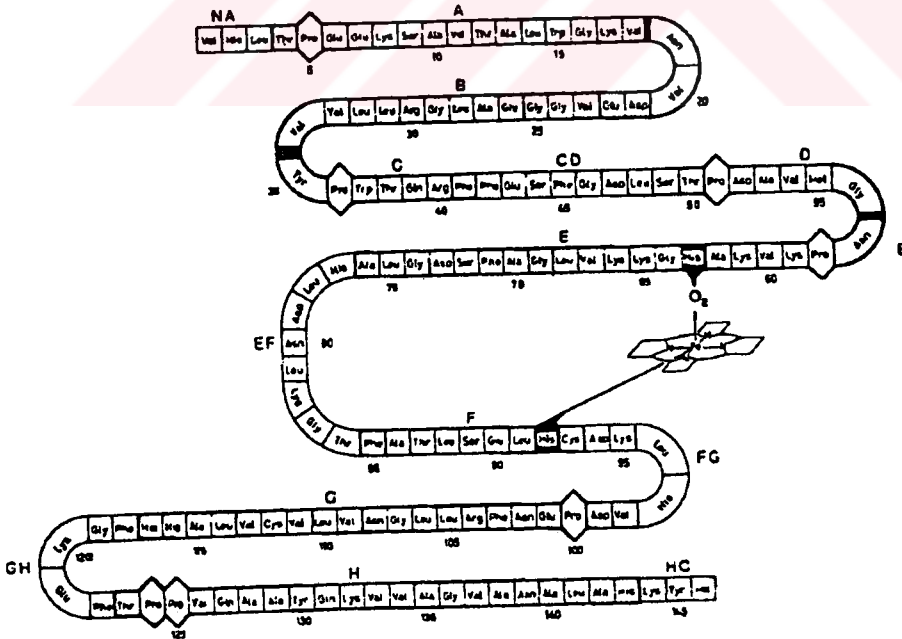
Hemoglobin

Hemoglobin molekülünün alfa ve beta zincirleri arasında iki önemli bağ bulunmaktadır { $\alpha_1\beta_1$ ($\alpha_2\beta_2$) ile $\alpha_1\beta_2$ ($\alpha_2\beta_1$) }. Alfa zincirinin 40. amino asidi lizin ile betanın 146. amino asidi olan histidin arasındaki ($\alpha_1\beta_2$ ve $\alpha_2\beta_1$) bağ oksijenasyonla koparak, beta zincirinin 94. amino asidi olan aspartik asitle alfa zincirinin lizini arasında bağ kurulmaktadır. Buna karşılık $\alpha_1\beta_1$ veya $\alpha_2\beta_2$ dimeri arasında 15⁰' lik bir dönüş ile Hb gergin durumdan (T) gevşemiş (R) hale geçmektedir. (11,51)

Alfa ve beta zincirlerinin bağlanma yerleri ile amino asit sırası şekil 1 ve 2 de gösterilmiştir.(51)



Şekil 1: Hem bağlanmış alfa globin zinciri.

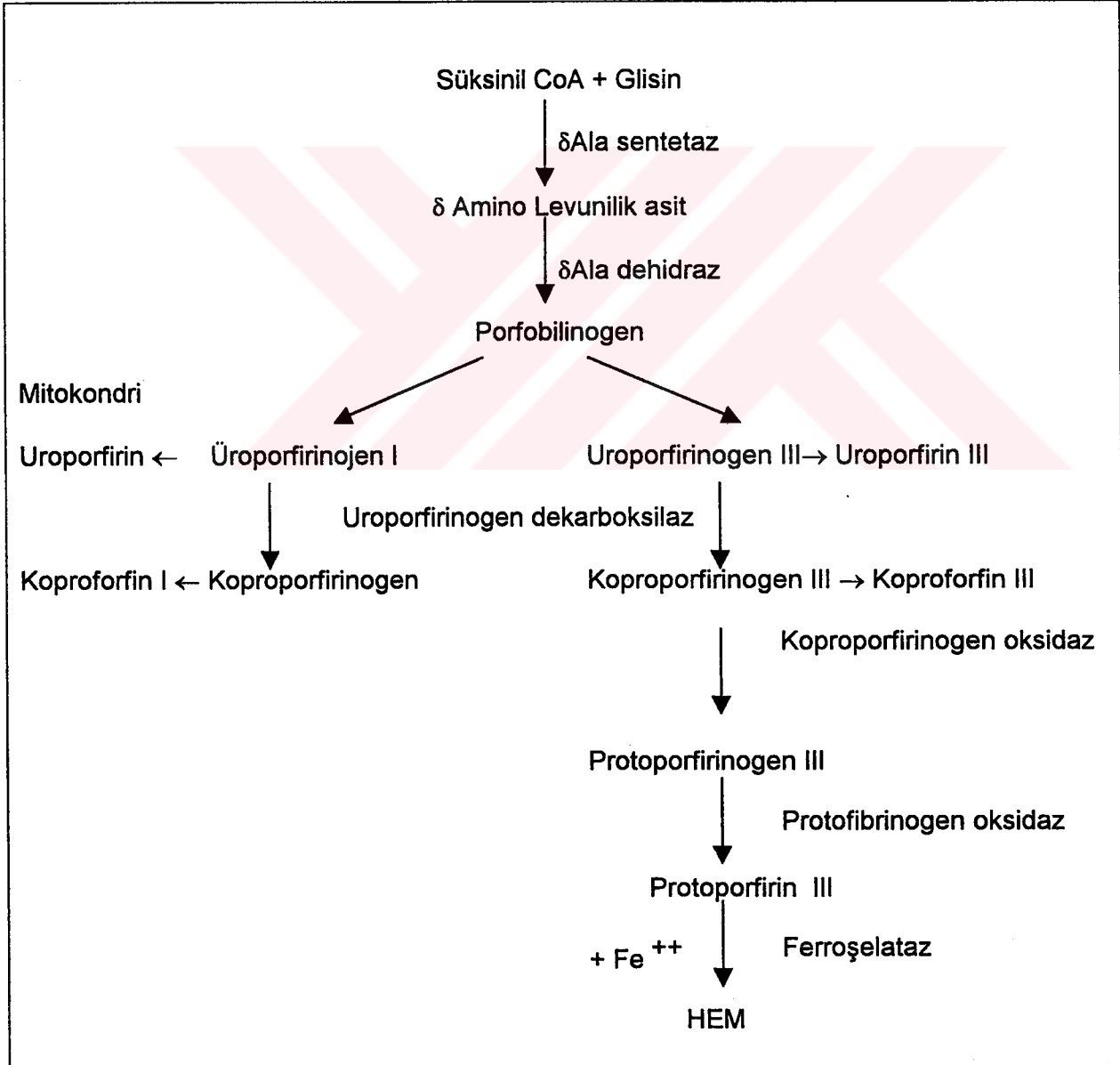


Şekil 2: Hem bağlanmış beta globin zinciri.

HEMOGLOBİN SENTEZİ

Hemoglobin molekülü; Hem ve globinlerin hücre içerisinde ayrı ayrı sentezlenmesi ise bir araya gelen ve oluşan bir moleküldür.

Hem , Fe ⁺² atomu içeren protoporfirin yapısında bir moleküldür. Sentez mitokondride süksinil CoA ve glisin ile başlar. Porfobilinojen basamağında sonra sitoplazmada devam eder. Koproporfirinojen III, mitokondriye geçer ve burada hem sentezi tamamlanır. (Şekil 3) (51)



Şekil 3: Hem Sentezi

5- PROTEİN SENTEZİ

Moleküler biyolojide santral doğma anlamına gelen bu olay Protein sentezi için DNA da şifrelenen genetik bilgi mRNA üzerinden proteine doğru geçiş yapmasıdır.



Transkripsiyon: Proteini kodlayan DNA 'daki bilginin RNA' ya aktarılmasıdır. DNA 'nın 5' → 3' yönünde bir kopyası olan ve haberci RNA olarak bilinen bu dizi RNA polimeraz enzimi yardımıyla gerçekleştirilir. Çekirdekte birtakım değişikliklere uğradıktan sonra sitoplazmaya geçen mRNA ribozomlara bağlanarak protein sentezini başlatır. MRNA üzerinde protein sentezini başlatan kodon (AUG) ile bitiren kodon bulunur. Başlama kodonunu takip eden her üç baz ile bir aminoasidi şifreler ve protein sentezi gerçekleşir. Bitiş kodonuna gelindiğinde protein sentezi tamamlanır. Buna da Translasyon denir (52).

5' ... agccacaccctagggttgc **ccaat** ctactcccaggagcagggagggcaggagccagggtgggc **ataaaa** ***
gtcagggcagagccatctattgcttACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATG

Exon 1
Val His Leu Thr Pro Glu Ile Val Ser Ala Val Thr Ala Ile Thr Glu Val Ser Val Asn Val Asp Glu Val Gly Tyr Gly
CTGCCTGACTGCTCAGGAGAAGTCTGCCGTACTGCCCTGTGGCCAGGTTGAACGTGGAATGAGTTGGTGGTGGAG
Ala Leu Gly Val -
GCCCTGGGCAGG ttggtatcaaggttacaagacaggtttaaggagaccaatagaactgggcatgtggagacagagaag

Intron 1
- **Glu Leu Val Val Tyr**
actcttgggtttctgataggcactgactctctctgctatttggtctattttcccaccctt **aggTGCCTGGTGGTCTAC**

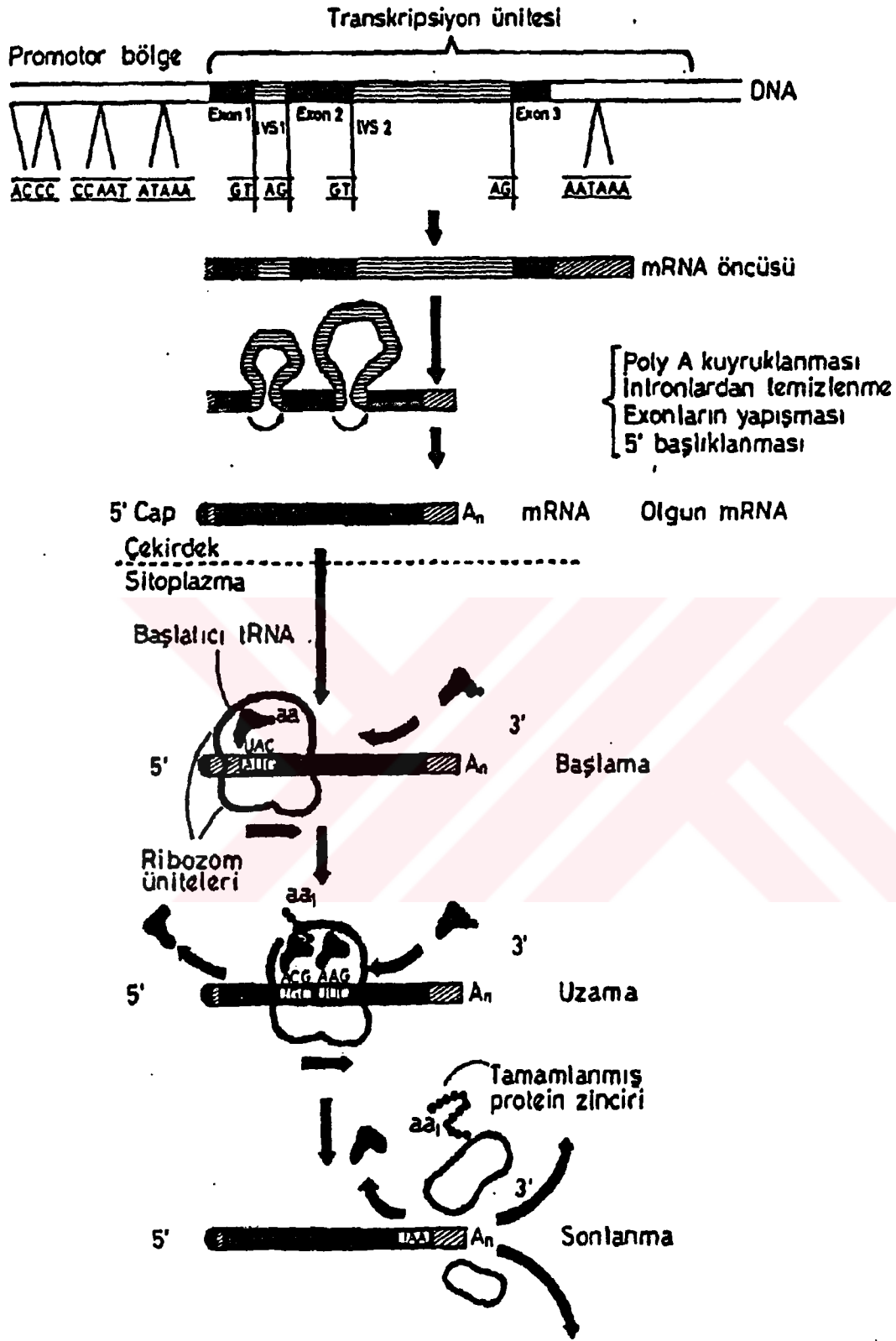
Exon 2
Phe Leu Thr Ala Arg Phe Phe Glu Ser Phe Leu Val Asp Asn Thr Pro Asn Ala Val Met Gly Asn Pro Val Val Lys
GGTGGACCAAGAGCTGCTTAGTCTTGGGGATCTGTTCAATCTGATGGTGTGTTGGCCAGCCTAAGGTGAAG
Ala Val Gly Val Val Val Leu Val Ala Phe Ser Asp Lys Leu Ala His Leu Asn Leu Val Gly Thr Phe Ala Thr
GGTATGGCAAGAAGTACTCGGTGGCTTAGTCAAGCCCTGACTGACCTGGACAACTCAAGGGCACCTTGGCCACA
Leu Ser Glu Ile Leu Phe Cys Asp Lys Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg
CTAGTCAAGTGCAGTCTACACAGCTGCAGTACATCCAGCAATCTCAGG ttagtctatgggacccttgatgtttt
ctttccccttcttttctatggttaagttcatgtcataggaaggggagaagtaacagggtacagtttagaatgggaaac
agacgaatgattgcatcagtggtgaagctcaggatcggttttagtttcttttatttgctgttcataacaattgtttt
ttttgttaattcttgctttcttttttttcttctccgaatttttactattacttaatgccttaacattgtgat
aacaaaaggaatatctctgagatacattaagtaacttaaaaaaactttacacagctctgcttagtacattactatt
Intron 2
tggaatataatggtgcttatttgcataatcataatgtccctactttattttcttttatttttaattgatacataatca
ttatacatattttagggttaaagtgtaatgttttaatatgtgtacacatttgaccaatcagggttaatttgcatt
tgtaattttaaanaatgctttcttcttttaataactttttgtttatcttatttctaactttccctaactctctt
ctttcagggcaataatgatacaatgtatcatgctctttgcaccattctaaagaatacagtgataatttctgggta
aggcaatagcaatatttctgcataataatatttctgcataataatgtaactgatgtaagaggttcatattgctaa
tagcagctacaatccagctaccattctgcttttattttatggttgggataaggctggattattctgagccaagctag
Leu Glu Gly Asn Val Leu Val Cys Val Leu Ala
gcccttttgtaatcatgttcataacctttatcttctcccacag **TGGTGGCAACCTGGTGGTCTGGTGGCTGGCC**

Exon 3
His Val Phe Gly Val Gly Leu Phe Thr Pro Pro Val His Ala Ala Tyr Gly Val Val Val Ala Val Gly Val Ala Asn Ala Leu
GATCACCTTGGCAAGAATTCACCCACCACTGCAAGCTGGCTATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGGTAAATGCCCTG
Ala His Lys Tyr His Ter
GCCACAAGTATCAG TAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCCCTTGTTCCTAAGTCCAACCTAC
TAAACTGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCC **AATAAAA** AACATTTATTTTCATTGCaatgat
gtatttaaattatttctgaatattttactaaaagggatgtgggaggtcagtgatttaaacaataagaaatgatg
agtgttcaaaccttgggaaaatacactatattttaaactccatgaaagaaggtgaggctgaaccagetaatgcaca
ttggcaacagcccctgatgcctatgccttattcatccctcagaaaaggattctttagagggcttga... 3'

Şekil 4A: İnsan Beta globin baz dizisi (52)

-568 gtatatgtat gtgtgtatat atacacatat atatatatat tttttttott ttottaccag
 -508 aaggttttaa tccaaataag gagaagatat gottagaoot gaggttagagt ttcatccat
 -448 tctgtcctgt aagtattttg catattotgg agacgcagga agagatcoat ctacatatoo
 -388 caaagctgaa ttatggtaga caaagotcct ccacttttag tgcatcaatt tottatttgt
 -328 gtaantaagaa aattgggaaa acgatottoa atatgottac caagotgtga ttocaaatat
 -268 tacgtaanta cacttgcaaa ggaggatgtt tttagtagca atttgtactg atggtagggg
 -208 gccaaagagat atatcttaga gggaggctg aggtttgaa gtcooaotoo taagccagtg
 -148 ccagaagago caaggacagg tacggctgtc atcacttaga cctcaccotg tggagccaca
 -88 cctagggtt ggcoaatcta ctcccaggag caggaggggc agggagooagg gotgggoata
 -28 aaagtcaggg cagagccatc tattgcttAc atttgottot gacacaaactg tgttactag
 +24 caacctcaaa cagacacc
EX-1 *ATG-GTG-CAC-CTG-ACT-OCT-GAG-GAG-AAG-TCT-GCC-GTT-ACT-GCC-CTG-TGG
1-30 GGC-AAG-GTG-AAC-GTG-GAT-GAA-GTT-GGT-GGT-GAG-GCC-CTG-GGC-AG
IVS-1 gttggtatca aggttaacaag acaggtttaa ggagaccaat agaaaotggg catgtggaga
cagagaagac tcttgggttt ctgataggoa ctgactotot ctgootattg gtctatttto
 121 ccaccottag
 31 G-CTG-CTG-GTG-GTC-TAC-OCT-TGG-ACC-CAG-AGG-TTC-TTT-GAG-TOC-TTT-GGG
 GAT-CTG-TOC-ACT-OCT-GAT-GCT-GTT-ATG-GGC-AAC-OCT-AAG-GTG-AAG-GCT
EX-2 CAT-GGC-AAG-AAA-GTG-CTC-GGT-GCC-TTT-AGT-GAT-GGC-CTG-GCT-CAC-CTG
GAC-AAC-CTC-AAG-GGC-ACC-TTT-GCC-ACA-CTG-AGT-GAG-CTG-CAC-TGT-CAC
 95 AAG-CTG-CAC-GTG-GAT-OCT-GAG-AAC-TTC-AGG
 1 gtgagtctat gggacccttg atgttttctt toocottott ttctatgggt aagttcatgt
 61 cataggaagg ggagaagtaa cagggtaoag tttagaatgg gaaacagacg aatgattgca
 121 ccagtgtgga agtctcagga tctgtttagt ttottttatt tgctgttcat acaattgtt
 181 ttottttgtt taattottgo tttotttttt tttottotcc gcaattttta ctattatact
 241 taatgcotta acattgtgta taacaaaaag aaatatotot gagatacatt aagtaactta
 301 aaaaaaaact ttacacagtc tgoctagtao attactattt ggaatataag tgtgcttatt
 361 tgcatattca taatctccct actttatttt ottttatttt taattgatac ataactatta
IVS-2 tacatattta tgggttaaag tgtaatgtt taatatgtgt acacatattg accaaatcag
 481 ggtaattttg catttgtaat tttaaaaat gotttcttct tttaatatac ttttttgtt
 541 atottatttc taatacttcc cetaatctot ttotttcagg gcaataatga tacaatgtat
 601 catgectctt tgcaccatto taagaataa cagtgataat ttctgggtta aggcaatagc
 661 aatatttctg catataaata tttctgcaata taaattgtaa ctgatgtaag aggttcata
 721 ttgctaatag cagctacaat ccagctacca ttotgctttt attttatggg tgggataagg
 781 ctggattatt ctgagtcaa gctaggccot tttgctaact atgttcatac ctottatott
 841 cccccacag
 105 CTC-CTG-GGC-AAC-GTG-CTG-GTC-TGT-GTG-CTG-GCC-CAT-CAC-TTT-GGC-AAA
EX-3 GAA-TTC-ACC-OCA-OCA-GTG-CAG-GCT-GCC-TAT-CAG-AAA-GTG-GTG-GCT-GGT
 137 GTG-GCT-AAT-GCC-CTG-GCC-CAC-AAG-TAT-CAC-TAA*
 gctcgtttc ttgtgtcoa atttotatta aaggttctt ttttcoctaa gtccaactac
 taaactggg gatattatga agggccttga gcatotggat tctgcctAAT AAAAaacatt
 tattttcatt gcaatgatgt atttaaatta tttctgaata ttttactaaa aagggaaatgt
 gggaggctcag tgcatttaaa acataaagaa atgaagagct agttcaaac tgggaaaat

Şekil 4B: İnsan Beta Gen Haritası (52)

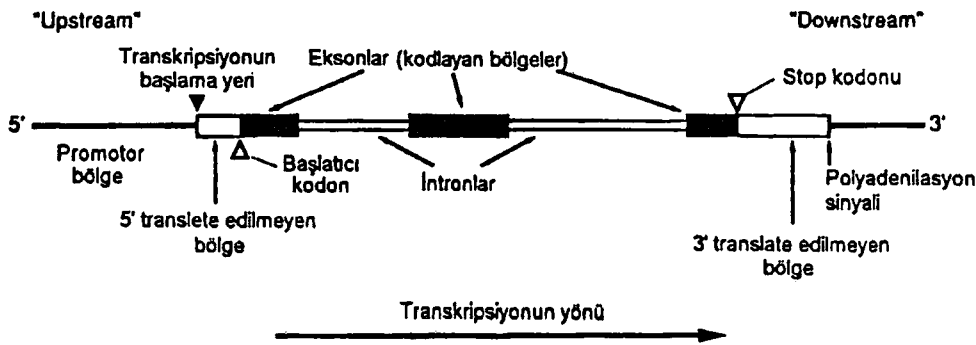


Şekil 5: Transkripsiyon ve translayon şematik olarak görülmektedir. (53)

Gen Yapısı ve organizasyonu:

Gen; Fonksiyonel bir ürünün yapımından sorumlu olan DNA parçası olarak ifade edilen bir polipeptid yada fonksiyonel bir RNA' dır. Genlerde kodlanabilen ve kodlanamayan olarak bilinen iki bölge bulunmaktadır. İntron veya intervening squence olarak isimlendirilen bölge kodlanamayan bölgedir. İntronlar mRNA'nın transkripsiyonunun başlangıcında bulunmalarına rağmen sitoplazmadaki olgun mRNA'da bulunmazlar bu nedenle protein ürününü şifreleyemezler. İntronlar exonlarla ardarda dizilirler. Exonlar ise aminoasit dizilerinin kodlarını içerirler (Şekil 6). İnsan genomunda intron içermeyen birkaç gen olmasına rağmen çoğu gen en az bir intron içermektedir(54).

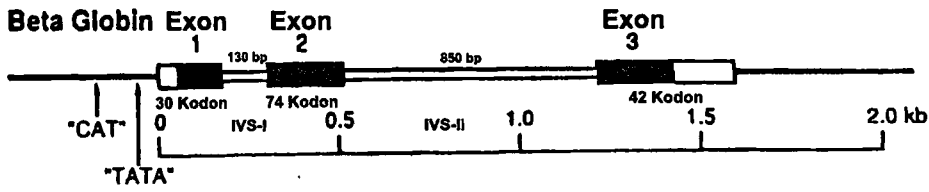
Bir gen yalnızca kodlanan bölgeleri içermez, çünkü genlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde komşu nükleotid dizilerine de gereksinim vardır. Bu komşu diziler transkribe olmuş mRNA' nın sentezi için başlama ve bitiş sinyallerini taşımaktadırlar. Genin 5' ucunda bulunan promotor bölgesi transkripsiyonun başlamasının hazırlanmasından sorumlu baz dizilerini içermektedir (Şekil 6).



Şekil 6 : Normal bir gen yapısı (54)

Genin 3' ucunda ise, downstream flanking olarak adlandırılan bölge, mRNA'nın ucuna poliadenozin residüsünün eklenmesi için sinyal fonksiyonunu üstlenmiştir. Bu bölge translasyona uğramaz.

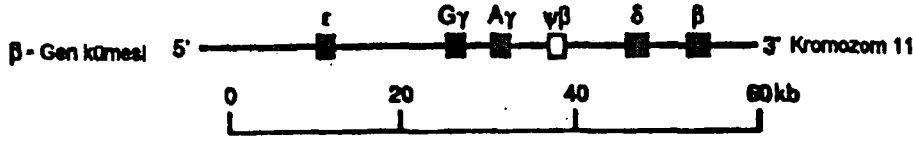
Genin 5' ucunda bir promotör bölgesi vardır , 3' ucunda ise bir poliadenifasyon bölgesi bulunmaktadır. Her iki uçta da translasyona uğramayan bölgeler bulunur. Beta geni iki adet intron ve üç adet exon içermektedir. Intron 1'in (IVS-I) baz uzunluğu 130 bp, Intron 2'nin (IVS-II) baz uzunluğu ise 850 bp dir. Exon 1; 30 Kodon, Exon 2; 74 Kodon, ve Exon 3; 42 kodon içermektedir (Şekil 7)(54).



Şekil 7 : Beta gen yapısı (54)

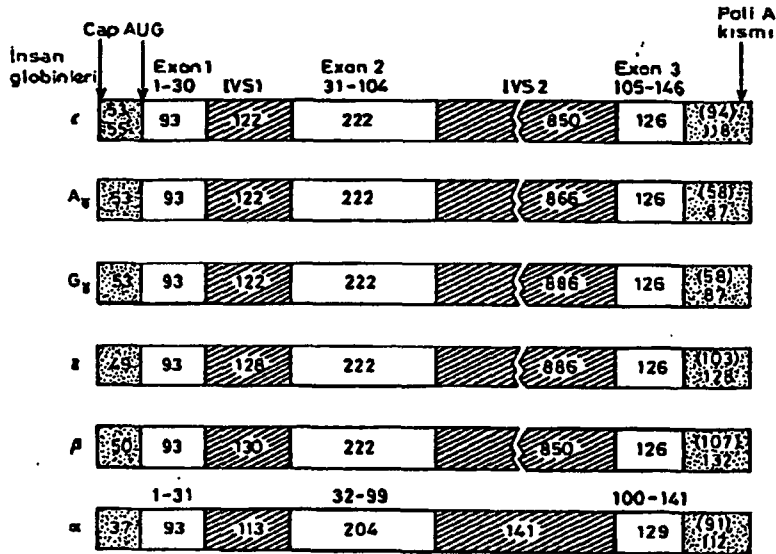
Gen Kümeleri

Genlerin birçoğu, birbirleriyle sıkı ilişkide bulunan DNA dizilerini içerirler. Polipeptid şifrelerinin aminoasit dizilerindeki benzerlikten dolayı bu tip genler küme veya aile olarak adlandırılırlar. Örneğin α Globin ve β Globin gen kümesi gibi. β gen kümesi β benzer genler 11. kromozomun kısa kolu üzerinde yaklaşık olarak 60 kb'lik yer tutarlar. Bu küme ϵ , γ , δ ve β genlerini içerir. ϵ geni embriyonik hemoglobinlerden Hb Gower I ve Gower II'yi , γ geni Hb Portland I ve Hb F'in kodlanmasından sorumludur. δ ve β geni ise yetişkin hemoglobinlerden Hb A ile, Hb A₂'yi kodlarlar. Genlerin protein kodlayan bölgeleri (Exon) iki intron tarafından birbirlerinden ayrılmışlardır (Şekil 8-9) (54).



Şekil 8 : Beta gen kümesi (54)

Beta geni 11 nci kromozomun kısa kolunda yaklaşık olarak 2.0 kilobaz'lık bir alanı tutmaktadır. Şekil 4B' de insan beta globin geninin yapısal kısımları görülmektedir. Bunlar promotor dizisi, intron ve exon sınırları, RNA splice bölgeleri, poliadenilasyon sinyali, başlatıcı ve sonlandırıcı kodonlardır (54)



Şekil 9 : Alfa, beta, delta, G gama, A gama ve epsilon genleri (54)

6- BETA TALASEMİDE BELİRLENEN MOLEKÜLER BOZUKLUKLAR

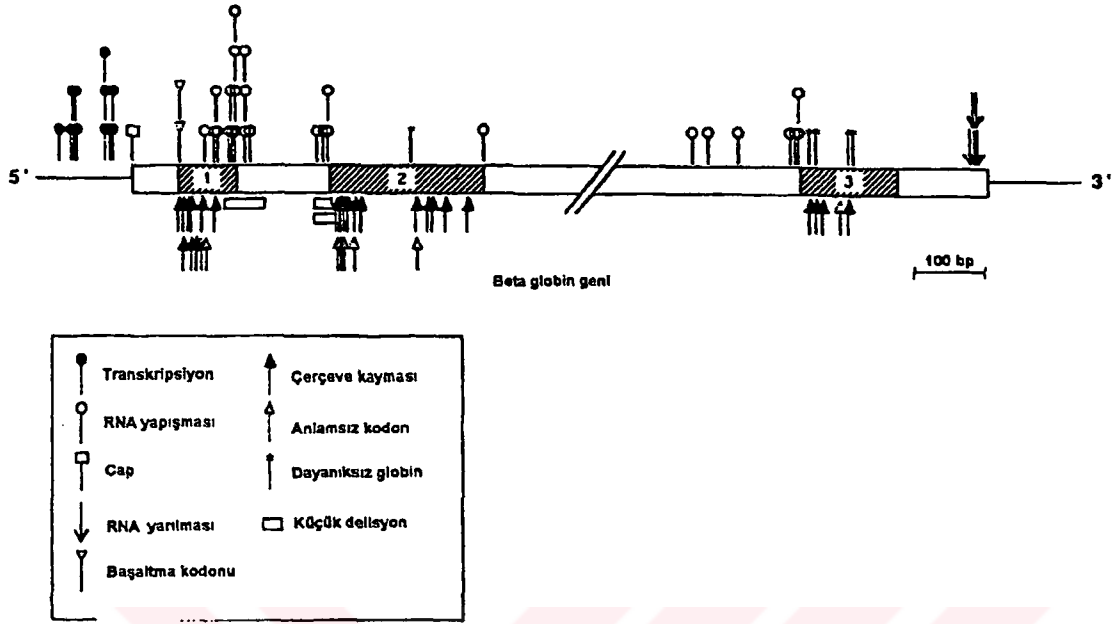
Beta talasemi ye neden olan mutasyonların karakterizasyonuna, klonlama ve dizi analiziyle başlanılmıştır (29). Son yıllarda PCR (Polimeraz Chain Reaction) yöntemiyle mutasyonların tanımlanması daha kolaylaşmıştır. Bu yolla ilk mutasyonun belirlenmesinden sonra her geçen gün sayı artmış ve 1992 de 138'e ulaşmıştır.(21,31)

Alfa talasemilerde ve kompleks beta talasemilerde ($\delta\beta$ -thal ve $\epsilon\gamma\delta$ -thal) gen delesyonu görülürken, beta talasemik genin etrafındaki veya içindeki nükleotid değişikliği ile belirlenen nokta mutasyonlarının sayısı daha fazladır (21,31).

Beta talasemi mutasyon tipleri ve gen üzerindeki yerleri tablo 1 ve şekil 4B de gösterilmiştir.(31,52)

Tablo 3: Beta talasemiye neden olan mutasyon türleri. (31)

β^+ mutasyonları	n
Transkripsiyonel mutasyonlar	15
Consensus squence değişiklikleri	11
Cryptic splice site aktivasyonları	4
Poliadenilasyon mutasyonları	5
Hyperunstable globinler	10
Cap site mutasyonları	1
IVS' deki değişiklikler	4
β^0 mutasyonları	
Frameshift mutasyonlar	27
Nonsense mutasyonlar	11
Splice junction	12
IVS' deki değişiklikler	2
Başlatma kodonu mutasyonları	2
Delesyonlar	8



Şekil10: Beta globin geni üzerindeki nokta mutasyonları (29)

7- BETA TALASEMİ MUTASYONLARI

A- Transkripsiyon Mutasyonları:

Beta globin geni üzerindeki Cap bölgesinin 5' tarafındaki DNA dizisine promotor bölge denilir ve bu bölgenin transkripsiyon üzerinde önemli etkisi olduğu bilinmektedir. Promotor bölgesinde meydana gelen nükleotid değişikliği transkripsiyonu azaltarak β^+ Talasemi ye neden olmaktadır. Cap bölgesinden 30 nükleotid uzaklıktaki TATA kutusunda , -101 ile +40 arasında genellikle tek nükleotid değişimi ile meydana gelen ve hafif klinik belirtileri olan mutasyonlardır.(16, 17,21)

Tablo 2. Transkripsiyon Mutasyonları (21)

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
-101 (C-T)	β^+	Türkler, Bulgarlar, İtalyanlar
- 92 (C-T)	β^+	Akdenizliler
- 90 (C-T)	β^+	Portekizliler
- 88 (C-T)	β^+	Amerikan Zencileri, Asya Hintlileri
- 87 (C-G)	β^+	Akdenizliler
- 87 (C-T)	β^+	Almanlar, İtalyanlar
- 87 (C-A)	β^+	Yugoslavlular, Amerikan Zencileri
- 86 (C-G)	β^+	Lübnanlılar
- 86 (C-A)	β^+	İtalyanlar
- 32 (C-A)	β^+	Tayvanlılar
- 31 (A-G)	β^+	Japonlar
- 30 (T-A)	β^+	Türkler, Bulgarlar
- 30 (T-C)	β^+	Çinliler
- 29 (A-G)	β^+	Amerikan Zencileri, Çinliler
- 28 (A-G)	β^+	Çinliler
+22 (G-A)	β^+	Türkler, Bulgarlar, İtalyanlar
+43-+40 (-AAAC)	β^+	Çinliler

Hafif klinik belirti gösteren bu mutasyonların büyük bir kısmı proksimal CACACCC dizisinde meydana gelmektedir. CCAAT kutusundaki -70 nükleotidinde henüz hiçbir mutasyona rastlanmamıştır. (8,35). Bunlardan -101 C-T deki mutasyonu önemli bir klinik durum göstermeyip sessiz β -talasemiye neden olurken, diğerleri β^+ talasemiye neden olmaktadır.(16,17,21) (Tablo 2)

B- UTR Bölgesi Mutasyonları

Cap bölgesi ile başlatıcı kodon arasında iki tür mutasyonla belirlenmiştir.

Bunlardan Cap +22 ' de G→A ve Cap +40 'dan başlayan dört nükleotid (-AAAC) delesyonu sonucunda oluşan mutasyon β^+ talasemiye neden olmaktadır. Protein sentezinde görev almayan ancak translasyonu durduran diziler genin 3' ucunda bulunurlar. Bu bölgedeki 13 bp uzunluğundaki delesyona Türklerde rastlanmıştır. Diğer mutasyon ise durdurma kodonundan 6 nükleotid sonrası C→G değişimi ile β^+ talasemiye neden olmaktadır (21,25)(Tablo 3).

Tablo 3: UTR Bölgesi Mutasyonları (21)

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
+1 (A→C)	β^+	Hintliler
+22 (G→A)	β^+	Türkler, Bulgarlar
+40 /+43 – AAAC	β^+	Çinliler
3' UTR+6 C→G	β^+	Yunanlılar
3' UTR+1565' den 1577'e kadar (-GCATCTGGATTCT)	β^+	Türkler

C-Başlatıcı Kodon Mutasyonları.

Bu mutasyonlar Protein sentezini gerçekleştiren Beta globin geninin birinci exonundaki ilk kodonda tespit edilmiştir. Bu kodondaki her nükleotidin değişime uğradığı bir mutasyon bulunmuştur. Şimdiye kadar 3 farklı tür mutasyon tespit edilen bu mutasyonlar β^0 talasemi ye neden olmaktadır ve şiddetli klinik belirti göstermektedirler (21) (Tablo 4)

Tablo 4: Başlatıcı kodon mutasyonları(21)

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
<u>A</u> TG→ <u>A</u> CG	β^0	Yugoslavyalar
<u>A</u> TG→ <u>A</u> CG	β^0	Çinliler, Japonlar, Koreliler
<u>A</u> TG→ <u>G</u> TG	β^0	Japonlar

D- RNA Mutasyonları:

a- Yapışma yerlerini tutan mutasyonlar: Transkripsiyondan sonra heterojen nükleer RNA (hnRNA)' dan olgun mRNA meydana gelirken, amino asitleri kodlayan eksonlar arasında bulunan iki intron diziden çıkarılmaktadır. Intronların çıkıp , eksonların birbirine bağlanacağı nükleotidlerde (Splice junction) meydana gelen mutasyonlar bu işlemi engellemektedir. Yapışma yerlerinin her birinde iki olmak üzere toplam dört tane nükleotid vardır. IVS' nin donör bölgesi eksonun bitiminde başlar ve GT nükleotidlerini içerir, IVS' nin sonundaki iki nükleotid AG olup akseptör adını alır. Bu dört nükleotidten birinin değişime uğraması sonucu, eksonların yapışması gerçekleşmediği için olgun mRNA meydana gelemez. Bu durumda protein sentezlenmediği için β^0 talasemi gözlenmektedir(11,21) (Tablo 5)

Tablo 5: Yapışma yeri mutasyonları (21)

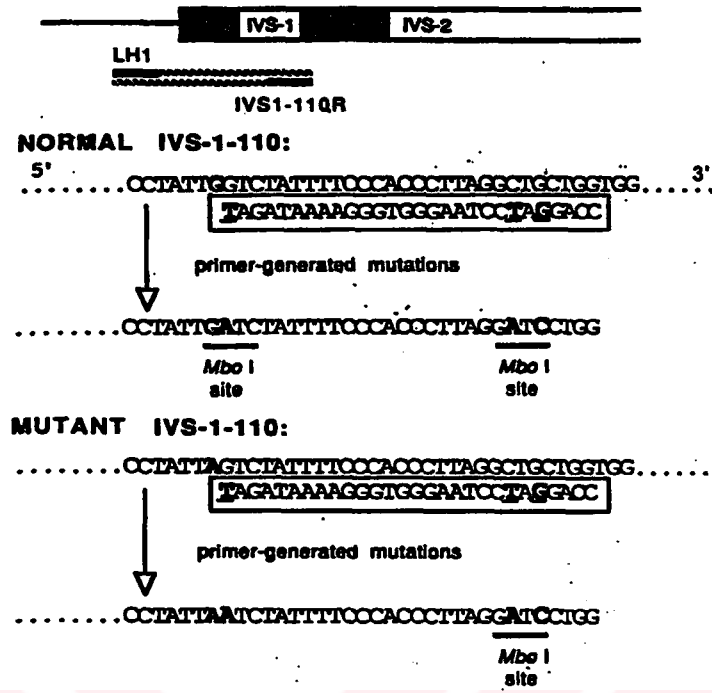
Mutasyon	Tip	Etnik Grup
IVS-I-1 (G→A)	β^0	Akdenizliler
IVS-I-1 (G→T)	β^0	Hindistanlılar,Çinliler
IVS-II-1 (G→A)	β^0	Akdenizliler,Tunuslular,Ame.Zenciler
IVS-I-2 (T→G)	β^0	Tunuslular
IVS-I-2 (T→C)	β^0	Amerikalı zenciler
IVS-I-2 (T→A)	β^0	Cezayirliiler
IVS-I,17 ntdel(3' end)	β^0	Kuveytliiler
IVS-I,25 ntdel(3' end)	β^0	Hintliler
IVS-I-130 (G→C)	β^0	Türkler, Japonlar
IVS-I-130 (G→A)	β^0	Mısırlılar
IVS-II-849 (A→G)	β^0	Amerikalı zenciler
IVS-II-849 (A→C)	β^0	Amerikalı zenciler
IVS-II-850 (G→A)	β^0	Yugoslavlular
IVS-II-850 (→G)	β^0	İtalyanlar
IVS-II-850 (G→A)	β^0	İrlandalılar

b- Yapışma yerlerine yakın diziler: Eksonların ve intronların yapışma yerlerine yakın olan nükleotidlerde meydana gelen değişiklikler olgun mRNA oluşumunu azaltarak β^+ talasemi ye neden olurlar. Bu tip mutasyonlar ekson I'in son iki kodonu üzerinde, IVS-I ve IVS-II' nin başlangıç ve bitim yerlerine yakın olan nükleotidlerde gözlenmektedir. (13,16,21) (Tablo 6)

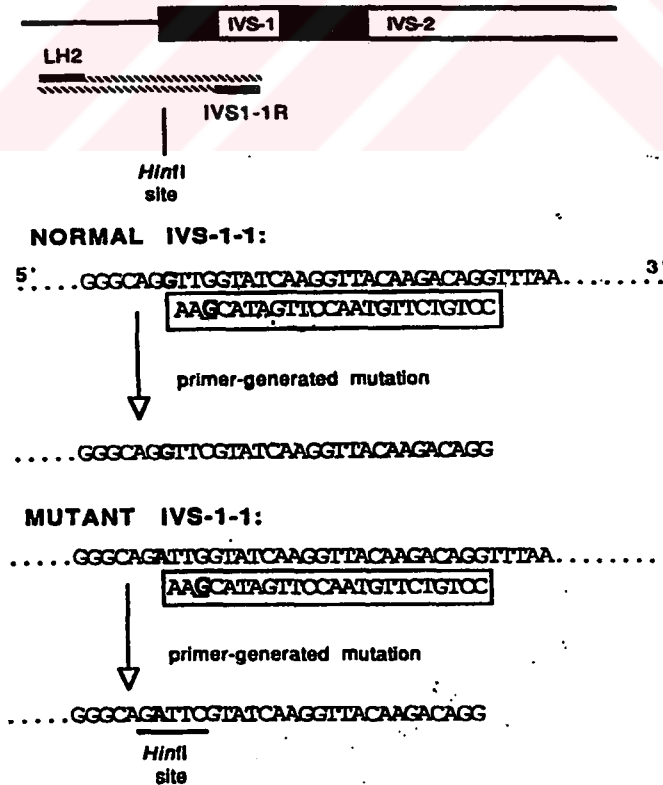
Tablo 6: Yapışma yerlerine yakın mutasyonlar (21).

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
IVS-I-5	(G→C) β^+	Hintliler, Çinliler, Malezyalılar
IVS-I-5	(G→T) β^+	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
IVS-I-5	(G→A) β^+	Cezayirliler, Akdenizliler
IVS-I-6	(T→C) β^+	Akdenizliler
IVS-I, -1(G→C)(CD 30) β^+		Tunuslular, Amerikalı zenciler
IVS-I, -1(G→A)(CD 30)?		Bulgarlar
IVS-I, -3(C→T)(CD 29)?		Lübnanlılar
IVS-I-128	(T→G) β^+	Suudi Arabistanlılar
IVS-II-837	(T→G) β^+	Hintliler
IVS-II-843	(T→G) β^+	Cezayirliler
IVS-II-844	(C→G) β^+	İtalyanlar
IVS-II-848	(C→A) β^+	Mısırlılar, İranlılar, Ame.Zenciler
IVS-II-848	(C→G) β^+	Japonlar

c- İtronlar (IVS) İçindeki değişiklikler: Bazı nükleotid değişimleri intronların içinde alternatif yapışma yerleri meydana getirirler. Genellikle β^+ talasemi ye neden olan bu gruplardan sadece ikisinin (IVS-I-116 ve IVS-II-654) β^0 talasemi ye neden olduğu gösterilmiştir (13,18,21) (Tablo 7)(Şekil 11-12)



Şekil 11: Normal ve Mutant IVS-I-110 DNA Dizileri ve Mutasyonlara Spesifik Primerler(33)



Şekil 12: Normal ve Mutant IVS-I-1 DNA Dizileri ve Mutasyonlara Spesifik Primerler(33)

d- Gizli yapışma yerlerinin aktivasyonu: Ekson I içerisindeki bazı kodonlar üzerinde meydana gelen nükleotid değişikliği sonucu saklı bulunan yapışma yerleri aktive olur. Yanlış yerden kesilen ve buralardan çıkan intronlar nedeniyle anormal mRNA yanında bir miktarda normal mRNA meydana gelirken bu mutasyonlar β^+ talasemiye neden olur. (18,21) (Tablo 8)

Tablo 7: IVS içinde meydana gelen değişiklikler:(21).

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
IVS-I-110 (G→A)	β^+	Akdenizliler
IVS-I-116 (T→G)	β^0	Akdenizliler
IVS-II-4,5 (→AG)	β^+	Portekizliler
IVS-II-654 (C→T)	β^0	Çinliler
IVS-II-705 (T→C))	β^+	Akdenizliler
IVS-II-745 (C→G)	β^+	Akdenizliler

Tablo 8: Gizli Yapışma yerleri: (21)

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
CD 19 (A→G) (Asn→Ser;Hb Malay)	β^+	Akdenizliler
CD 24 (T→A)	β^+	Japonlar, Amerikalı zenciler
CD 26 (G→A) (Glu→Lys ;Hb E)	β^+	Güney Doğu Asyalılar
CD 27 (G→T) (Ala→Ser ; Hb Knossos)	β^+	Akdenizliler

E. Anlamsız Kodon Oluşumu ve Dizi Kayması:

1. Anlamsız Kodon Oluşumu:

Eksonlar üzerinde meydana gelen nükleotid değişikliği sonucu amino asitlerden birini şifreleyen üçlü baz dizisi stop kodonuna dönüşerek protein sentezini durdurur. β^0 talasemiye neden olan şimdiye kadar tanımlanmış 13 tane mutasyon bulunmuştur. (21) (Tablo 9)

2. Dizi kayması:

Eksonlar üzerinde bir veya birkaç nükleotidin diziden çıkması veya girmesi sonucu bu noktadan itibaren şifre bozularak yeniden kodonların düzenlenmesiyle ilerde yeni ve erken durdurma kodonu oluşmaktadır. Daha ilerde oluşabilecek bir stop kodonu ile globin sentezi durdurulmaktadır (11, 21,23) (Tablo 10).

Tablo 9: Anlamsız (Stop) Kodon oluşturan mutasyonlar (21)

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
CD 15	(TGG→TAG) β^0	Hintliler
CD 15	(TGG→TGA) β^0	Portekizliler
CD 17	(A→T) β^0	Çinliler
CD 22	(G→T) β^0	Reunion Adaları
CD 26	(G→T) β^0	Taylandlılar
CD 35	(C→A) β^0	Taylandlılar
CD 37	(G→A) β^0	Suudi Arabistanlılar
CD 39	(C→T) β^0	Akdenizliler
CD 43	(G→T) β^0	Çinliler
CD 61	(A→T) β^0	Zenciler
CD 90	(G→T) β^0	Japonlar
CD 112	(T→A) β^0	Slovaklar
CD 121	(G→T) β^0	Polonyalılar, Fransızlar, Japonlar
CD 127	(C→T) β^0	İngilizler

F. Dayanıksız Globinler:

Béta globin zinciri üzerinde meydana gelen amino asit değişimi sonucu bazı globinler dayanıksız bir yapıya sahip olmaktadır. Ayrıca stop kodonu üzerinde meydana gelen nükleotid değişimi yada frameshift mutasyonları gibi globin zincir sentezinin uzamasına neden olmaktadır. Bunlara dayanıksız globinler denir. (21, 41) (Tablo 11)

G. Talasemik Hemoglobinler:

Beta globin geni üzerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan anormal hemoglobinlerden bazıları talasemik fenotip göstermektedir. Bir aminoasit değişimi sonucu hızla katabolize olan Hb Neopolis ve mRNA olgunlaşmasında alternatif yapışma yeri oluşturan Cd 30' daki G→C mutasyonu sonucu üretilen çok az miktardaki anormal β -globin zinciri (Hb Monroe) talasemik özellik göstermektedir. (1,15, 21, 29) (Tablo 12)

H. Poli A Mutasyonları

Poli A Mutasyonu taşıyan β^+ geni normalden daha uzun mRNA sentezlenmesine karşın normal mRNA' ya göre dayanıksız bir yapıya sahiptir. Poli A mutasyonu taşıyan mRNA' ların ribozomlara bağlanması azalır. Az da olsa beta globin sentezlendiği için β^+ talasemi ye neden olmaktadır (21, 25, 42) (Tablo 13).

I. Delesyona Bağlı Beta Talasemiler

Beta globin geninin tamamı veya bir kısmını içine alan delesyonlar sonucu , hiç mRNA üretilmediği için bu tip mutasyonlar β^0 talasemi ye neden olmaktadır.

Dünyada bu güne kadar 11 tane β gen delesyonu tespit edilmiştir. Büyükleri 44 bp den 27 kb ye kadar değişen delesyonların etnik gruplara göre dağılımı aşağıda gösterilmiştir. (15, 21) (Tablo 14).

Tablo 10: Dizi kaymasının neden olduğu mutasyonlar (21).

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
CD 1 (-G)	β^0	Akdenizliler
CD 5 (-CT)	β^0	Akdenizliler
CD 6 (-A)	β^0	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
CD 8 (-AA)	β^0	Akdenizliler
CDs 8/9 (+G)	β^0	Hintliler
CDs 9/10 (-G)	β^0	Türkler
CD 11 (-T)	β^0	Meksikalılar
CDs 14/15 (+G)	β^0	Çinliler
CD 15 (-T)	β^0	Hindistanlılar, Taylandlılar
CD 16 (-C)	β^0	Hintliler
CD 22 (-AAGTTGG)	β^0	Türkler
CD 24 (-G,+CAC)	β^0	Mısırlılar
CDs 25/26 (+T)	β^0	Tunuslular
CDs 27/28 (+C)	β^0	Çinliler
CD 35 (-C)	β^0	Malezyalılar
CDs 36/37 (-T)	β^0	İranlılar
CDs 37/38/39 (-GACCCAG)	β^0	Türkler
CDs 38/39 (-C)	β^0	Çekoslovaklar
CD 41 (-C)	β^0	Taylandlılar
CDs 41/42 (-TTCT)	β^0	Çinliler
CD 47 (+A)	β^0	Surinamlılar
CD 51 (-C)	β^0	Macarlar
CD 54 (+G)	β^0	Japonlar
CD 64 (-G)	β^0	İsviçreliler
CD 71 (+T)	β^0	Çinliler
CDs 71/72 (+A)	β^0	Çinliler
CDs 74/75 (-T)	β^0	Türkler
CD 76 (-C)	β^0	İtalyanlar
CD 82/83 (- G)	β^0	Azeriler, Çekoslovaklar
CD 88 (+ T)	β^0	Hintliler
CD 95 (+ A)	β^0	Taylandlılar
CDs 106/107(+ G)	β^0	Amerikalı zenciler
CDs 109/110(- G)	β^0	Litvanyalılar
CD 124 (- A)	β^0	Ruslar

Tablo 11: Dayaniksız Globinler (21).

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
CD 60 (GTG→GAG)	β	İtalyanlar
CD 94 (+TG)	β	İtalyanlar
CD 110 (T→C)	β	Japonlar
CD 114 (- CT, + G)	β	Fransızlar, İsviçreliler
CD 123 (- A)	β	Japonlar
CDs 123-125 (-ACCCCACC)	β	Taylandlılar
CD 126 (- T)	β	İtalyanlar
CD 127 (CAG→CGG)	β	Fransızlar
CDs 127/128 (-AGG)	β	Japonlar
CDs 128/129 (-4, +5) (-GCTG, + CCACA)	β	İrlandalılar
CDs 132/135 (- 11) (-AAAGTGGTGGC)	β	İrlandalılar
CDs 134/137 (- 10, +4) -(G) TGGCTGGTGT(G)	β	Portekizliler

Tablo 12: Talasemik Hemoglobinler (21).

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
CD 28 (C <u>I</u> G→C <u>G</u> G)	β ⁰	Hb Chesterfield
CD 30 (G → C)	β ⁰	Hb Monroe
CD 32/34 (- GGT)	β ⁰	Hb Kore
CD 69 (G <u>G</u> T→A <u>G</u> T)	β ⁺	Hb City of Hope
CD 114 (T→C)	β ⁰	Hb Brescia
CD 115 (C →A)	β ⁰	Hb Hradec Kralove Czech
CD 125/126 (+ CCA)	β ⁰	Ruslar
CD 126 (G <u>I</u> G→G <u>G</u> G)	β ⁰	Hb Neapolis

Tablo 13: Poli A mutasyonları (21)

Mutasyon	Tip	Etnik Grup
AATA <u>A</u> AA→AA <u>Ç</u> AAA	β^+	Amerikalı zenciler
AATA <u>A</u> AA→AAT <u>G</u> AA	β^+	Akdenizliler
AATA <u>A</u> AA→AAT <u>A</u> G <u>A</u>	β^+	Malezyalılar
AATAAA→A (-AATAA	β^+	Araplar
AATAAA→AAAA (-AT)	β^+	Fransızlar

Tablo 14: Beta Globin geni üzerinde belirlenen delesyonlar (21).

Mutasyon	Etnik Grup	Delesyonun yeri
12.6 kb delesyon	Hollandalılar	Tüm beta geni
- 27 kb delesyon	Güney Doğu Asyalılar	Tüm beta geni
> 200 kb delesyon	İrlandalılar	β geninin 3' tarafı
619 bp delesyon	Hintliler	β IVS II' nin sonundan 3' 209' a kadar
1393 bp delesyon	Zenciler, İngilizler	Cap-484'den IVS II 415'e kadar
1605 bp delesyon	Yugoslavlar	-985' den 1621 e kadar
4237 bp delesyon	Çekoslavaklar	β geninin 5' ucundan IVS II nin ortasına kadar
290 bp delesyon	Türkler, Ürdünlüler	-123' den IVS I'in 23. Nükleotidine kadar
44 nt delesyon	Yunanlılar	Cd 24'ten IVS-I-26'a kadar
3400 bp delesyon	Taylandlılar	β genini içine alır
532 bp delesyon	Amerikalı zenciler	β geninin 5' tarafını içine alır

8- BETA TALASEMİNİN KLİNİK FORMLARI

Beta talasemi sendromlarındaki temel fizyopatolojik fenomen globin zincir dengesizliğidir. Beta zincir üretim eksikliği sonucu fazla alfa zinciri tetramer oluşturamadığı için kemik iliğindeki gelişen kırmızı hücre öncüleri içinde çökelirler. Beta talaseminin klinik şiddeti zincir dengesizliğinin derecesi ile orantılıdır. Beta geni üzerinde meydana gelen mutasyon sonucu hiç globin sentezlenemiyorsa β^0 , az sentezleniyorsa β^+ talasemi meydana gelir. β^0 talasemi de zincir dengesizliği fazla olduğundan klinik olarak ağır seyreder (31).

A- Beta Talasemi Taşıyıcıları:

Bir beta talasemi ailesine sahip olan erişkin (β talasemi minor) klinik olarak sağlıklıdır. Hematolojik karakterleri ise hipokromik, mikrositik eritrositler ve bazofilik noktalanmadır. Bazı erişkinler hafif anemik olabilirler. Beta talasemi heterozigotun bir önemli özelliği de HbA₂ seviyesinin normale göre yaklaşık iki kat yükselmesidir. Vakaların yarısında HbF %1-5 arasında yükselebilir. Biyosentetik çalışmalar α/β globin sentez oranının 1.5–2.0 arasında olduğunu göstermiştir (23,42,).

B- Beta talasemi Major:

İki beta talasemi geni taşıyan homozigot veya çifte heterozigot vakalarda, Beta globin zinciri hiç sentezlenmiyorsa bunlara talasemi major denir. Beta talasemi majorlu bebek doğduğunda normaldir, fakat altı aydan sonra bir yıla kadar derin anemi gelişmektedir. Anemiye ek olarak kırmızı hücrelerde hipokromi, mikrositoz, anizositoz, poikilositoz, polikromazik fragmantasyon, bazofilik noktalanma ve periferal

kanda çekirdekli eritrositler görülmektedir. Ayrıca hepatosplenomegali büyüme geriliği iskelet bozuklukları beta talasemi homozigotların en iyi bilinen özelliklerindedir. Transfüzyona bağımlı olan hastalığın diğer bir yönü de organizma da fazla demir birikimidir. Son yıllarda başlayan fazla transfüzyon ve şelasyon tedavisi ile fazla demirin atılması hastaları rahatlatarak daha uzun süre yaşamalarını mümkün hale getirmiştir (8,16, 18).

C- Beta Talasemi İntermedia:

Beta talasemi heterozigot ile ağır beta talasemi homozigot arasındaki özelliklere ve klinik sendromlara sahip olan gruba beta talasemi intermedia denir. Bu grupta hastalar taşıyıcılar ve majorlarla aynı spektrumda olduğu halde hastaların çoğu transfüzyon almadan normal Hb değerlerine sahiptirler. Son yıllarda beta talasemi intermedialı hastalarda yapılan çalışmalar hastalığın patogenezini aydınlatmıştır .

Talasemi intermediaya neden olan IVS-I-6 (T→C) homozigot mutasyonu daha çok Akdeniz ülkelerinde görülmektedir (22). Bazı yüksek HbF seviyesi beta globin gen kümesine bağlı olamayabilir. Orta ve şiddetli beta talasemi mutasyonlarının çift heterozigot şekilleri farklı fenotipler gösterebilirler. Bunlar şiddetli beta talasemi intermedia ile talasemia major arasındaki spektruma girerler (18). Alfa gen triplikasyonu ($\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$) ile beraber bulunan beta talasemi heterozigotlarda, zincir dengesizliği arttığı için beta talaseminin formu gibi klinik durum göstermektedir (8).

D- Sessiz Beta Talasemiler:

Sessiz beta talasemi olgularının hematolojik verileri (MCV, MCH ve HbA₂, HbF) normaldir. Bu nedenle normal tarama yöntemiyle belirlenemezler. Erişkin taşıyıcılarda hafif derecede globin zincir dengesizliği vardır. Beta talasemi intermedia lı hastaların anne ve babasından birinde bu durum gözlenirken, diğeri HbA₂ ' si yüksek beta talasemiye sahip olabilirler (17). Dört Akdenizli ailede (3' ü Türk biri Bulgar) sessiz beta talasemi ye neden olan bir (-101 C→T) mutasyon gösterilmiştir (21). Sessiz beta talasemi ye neden olan bu tür mutasyonlar bazı İsrail ve İtalyanlarda da gösterilmiştir (41,42). Yapılan çalışmalar bu mutasyonun transkripsiyonu negatif kontrol eden proteini normale göre dokuz kez daha güçlü bağlayarak , beta globin gen ürününü azalttığını göstermiştir (8).

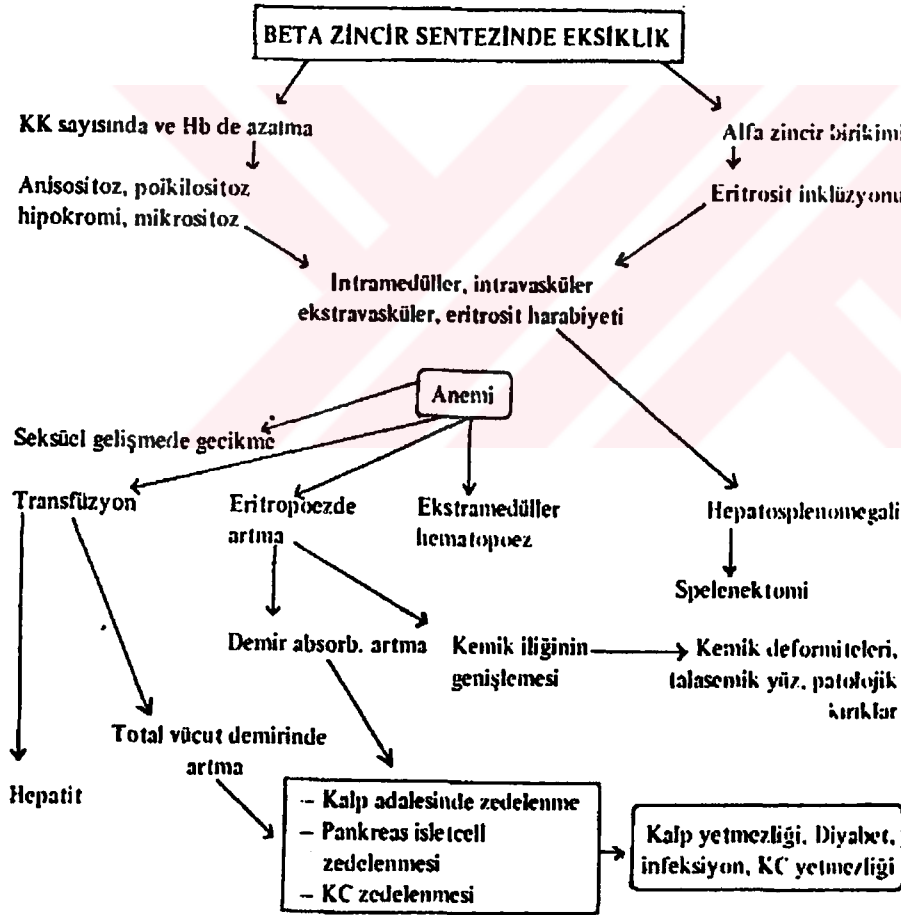
E-İnklüzyon Cisimli Beta Talasemi Mutasyonları:

Çok dayanıksız globin zincirlerinin neden olduğu talasemilerdir. Şiddetli heterozigot beta talasemi olarak belirlenen bu sendromlar talasemi intermedia gibi fenotipik özellik göstermektedir. Belirgin derecede hemoliz ile beraber, biçimsiz kırmızı kan hücrelerinde inklüzyon cisimi bulunmaktadır. Inklüzyon cisimli beta talasemi ye neden olan mutasyonlar; Cod 94 (+GT) İtalyanlarda, Cod 109 (-G) Litvanyalılarda, Cod 123 (-A) Japonlarda, Codon 128/129 (-GCTG) ve Cod 132-135 (+AAAGTGGTGGC) İrlandalılarda gözlenmiştir. Bunlar seyrek alleller olup şiddetli fenotiple beraberdir. Malaryaya karşı seçici bir özellik göstermez. Genellikle Beta talaseminin nadir olduğu toplumlarda (Kuzey Avrupa, Amerika ve Japonya da) bulunmuştur. Inklüzyon cisimli talasemilerin çoğu ekson 3 teki mutasyonlarda

gözlenmiştir. Normal globin zincirindeki H helksinin yokluğu bu peptidin dayanıksız olmasını sağlar. Proteolitik sindirim sonucu globin zinciri hücre içinde çabuk çökmekte ve çökelen alfa zincirleri hücre zarına zarar vermektedir (45).

9.BETA TALASEMİNİN PATOGENEZİ

Aşağıdaki şekilde beta talaseminin patogenezi şematik olarak anlatılmak istenmiştir (Şekil 13) (18)



Şekil 13: Beta talaseminin patogenezi (18)

10- β - TALASEMİ MUTASYONLARININ POPULASYON ÖZELLİĞİ

A- β - Talasemi mutasyonlarının Dünyada dağılımı:

β Talasemi mutasyonlarının dağılımı değişik sayıdaki populasyonları ve geniş bir alanı kapsar. Bu populasyonlar ; Amerikan zencileri, Asya Hintlileri, İtalyanlar, Yunanlılar, İspanyollar, Türkler, Çinliler ve Taylandlılardır. En çok etkilenen gruplar ise Akdenizliler, Çinliler, Güneydoğu Asyalılar, Asyalı Hintliler ve Afrika kökenli zencilerdir (22) (Tablo 15).

Mutasyonlar populasyonlara özgüdür. Birçok populasyonda mutasyonların gerçek spektrumu tamamıyla saptanmıştır. Örneğin Yunanlılarda ve İtalyanlarda, IVS-I-110 (G→A) β^+ , Codon 39 (C→T) β^+ , IVS-I-6 (T→C) β^+ , IVS-I-1 (G→A) β^0 , IVS-II-1 (G→A) β^0 ve IVS-II-745 (C→G) β^+ mutasyonları yaygın olup bu bölgede görülen mutasyonların % 92 sini oluşturmaktadır. Sicilyalılarda, IVS-I-110 (G→A) β^+ , Codon 39 (C→T) β^0 ve IVS-I-6 (T→C) β^+ mutasyonları toplam mutant genlerin % 90' nından fazlasını oluşturmaktadır. Kuzey Amerika da β Talasemiye neden olan mutasyonların, Hintlilerde de yaygın olduğu bulunmuştur.

IVS-I-5 (G→C) β^+ , mutasyonu Hintlilerde, Çinlilerde ve Malezyalılarda farklı oranlarda bulunmuştur(22,29). IVS-II-1 (G→A) β^0 , mutasyonu aynı şekilde Akdenizlilerde, Amerikalı zencilerde ve Kuzey Afrikalılarda farklı oranlarda bulunmuştur (1).

Tablo 15: Farklı Populasyonlardaki β Talasemi Mutasyonlarının Dağılımı (%) (22).

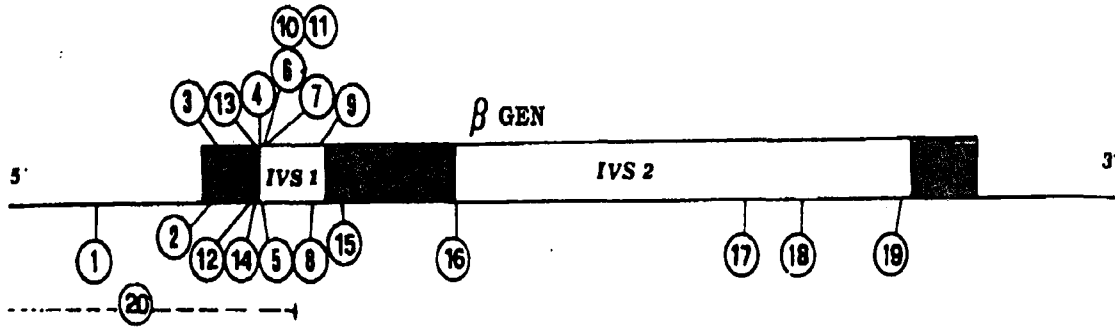
Mutasyon	Sardinya	Sicilya	Yunanistan	Yugoslavya	Bulgaristan	Türkiye	Lübnan	Zenci	Hindistan	malezya	Çin
-68 (C→T)								21,1	1,9		
-87 (C→G)			1.7		3,9	0,6					
-30 (T→A)			0.3			3,6					6,3
-29 (A→G)								55,2			9,5
-28 (A→G)						0,6					
CD 5 (- CT)			1.1		4,7	1,2					
CD 6 (- A)	2.2		2.9	1,2	4,7	0,3		2,6			
CD 8 (- A)			0.6		5,4	6,5	6,0				
CDs 8/9 (+ G)			0.3		5,4	0,9			19,5		
CD 15 (G→A)									4,8		
CD 17 (A→T)										2,4	27,8
CD 24 (T→A)								7,9			
CD 29 (C→T)				1,2			8,0				
CD 39 (C→T)	95.4	36.1	17.0	3,5	21,9	3,9	4,0				
CDs 41/42 (-TTCT)									11,7	12,2	42,1
CDs 71/72 (+A)											5,6
IVS-I-1 (G→A)		3.1	13.2	9,3	3,1	2,4					
IVS-I-1 (G→T)									13,6	7,3	
IVS-I-5 (G→C)						0,9	4,0		22,4	48,9	
IVS-I-6 (T→C)		28.9	7.2	29,1	10,2	18,1	8,0				
IVS-I-110(G→A)	0.4	26.8	42.5	39,5	24,2	38,7	62,0				
IVS-II-1 (G→A)			2,0		1,6	11,9	4,0				
IVS-II-654(C→T)										7,3	7,9
IVS-II-745(C→G)	0.4	3.1	6,9	1,2	10,2	2,1	4,0				
-619 bp delesyonu									21,5		

B- Akdeniz Populasyonlarında Mutasyonların dağılımı

Codon 39 (C→T) β^0 mutasyonu birincil olarak İtalyan toplumunda görülmektedir. Bunun yanında Bulgarlarda da sıkça bulunmuştur. IVS-I-110 (G→A) β^+ mutasyonu Doğu Akdeniz Ülkelerinde görülen bir Beta talasemi⁺ mutasyondur ve Sicilya da dört Beta talasemi kromozomunun birinde bulunmaktadır. Portekiz, Yugoslavya ve Sicilya da yüksek frekansa sahip olan IVS-I-6 (T→C) β^+ mutasyon, Doğu Akdeniz de ise daha düşük frekanslarda görülmektedir. IVS-I-1 (G→A) β^0 mutasyonu çoğunlukla Yugoslavya, Kıbrıs ve Yunanistan da görülürken, IVS-II-1 (G→A) β^0 mutasyonu en sık Türklere görülmüştür. IVS-II-745 (C→G) β^+ mutasyonu Yunanistan ve Bulgaristan da sık bulunmakta ve Doğu Akdeniz kıyılarındaki populasyonlar da ise düşük frekanslarda bulunmaktadır (21, 22).Birkaç mutasyon spesifik olarak düşük frekanslarda bazı ülkelerde bulunabilmektedir. Hafif klinik seyir gösteren -87(C→G) β^+ mutasyonu Bulgaristan'da,-30(T→A) β^+ mutasyonu Türkiye'de bulunmaktadır. Codon 5,6,8 ve 8/9 β^0 mutasyonları Bulgaristan ve Türkiye'de, Codon 29 (C→T) β^0 mutasyonu Lübnan da düşük frekanslarda görülmektedir (Şekil 14)(11,21,22,23,29, 33, 34).

C- Doğu Populasyonların da Mutasyonların Dağılımı

Doğu Asya populasyonunda diğer birçok populasyonda olduğu gibi kendine spesifik mutasyonlara sahiptirler(22). Doğuda görülen başlıca mutasyonlar;-30 (T→C) β^+ , -30 (T→A) β^+ , -29 (A→G) β^+ , -28 (A→G) β^+ , +43 -40 (AAAC) β^+ , IVS-I-5 (G→C) β^+ , Codon 17 (A→T) β^0 , Codon 43 (G→T) β^0 , Codon 14/15(+G) β^0 , Codon 27/28 (+C) β^0 , Codon 41/42(-TTCT) β^0 ,Codon 71(+T) β^0 , Codon 71/72 (+A) β^0 ,



MUTASYONLAR	TIP	HAPLOTIP
Nonfonksiyonel mRNA		
a) Anlamsız Mutasyonlar		
15 CODON 39 (C→T)	BETA°	Genel II-I-IX-VII
b) Frameshift Mutasyonlar-Delesyon ve Eklèmeler		
2 CODON 6 (-1bp)	BETA°	Genel IX-I-V
3 CODON 8 (-2bp)	BETA°	Seyrek IV
RNA MUTASYONLARI		
a) Yapisma Yeri Mutasyonlari		
4 IVS1 pos.1 (G→A)	BETA°	Genel V
5 IVS1 pos.2 (T→G)	BETA°	Seyrek -
16 IVS2 pos.1 (G→A)	BETA°	Genel III
b) Konsensus Mutasyonlar		
6 IVS1 pos.3 (G→T)	BETA°	Seyrek V-VII
11 IVS1 pos.5 (G→C)	BETA°	Seyrek IX
10 IVS1 pos.5 (G→A)	BETA°	Seyrek -
7 IVS1 pos.6 (T→C)	BETA°	Genel VI
19 IVS2 pos.843 (G→T)	BETA°	Seyrek -
14 CODON 30 (G→C)	BETA°	Seyrek -
c) IVS İçindeki Mutasyonlar		
12 CODON 27 (G→T)	Hb Knossos	I
13 CODON 29 (C→T)	BETA°	Seyrek II
8 IVS1 pos.110 (G→A)	BETA°	Genel I-II-IX
9 IVS1 pos.116 (T→G)	BETA°	Seyrek I
17 IVS2 pos.705 (T→C)	BETA°	Seyrek VI
16 IVS2 pos.745 (C→G)	BETA°	Genel VII
PROMOTOR BÖLGE MUTASYONLARI		
1 - 87 (C→G)	BETA°	Seyrek VIII
DELESYONLAR		
20 ~ 300bp	BETA°	Seyrek I

Şekil 14 : Akdeniz Ülkelerinde Beta geni üzerinde meydana gelen moleküler değişiklikler. (9)

başlatıcı kodon olarak $\underline{ATG}-\underline{AGG} \beta^0$, Çinlilerde $-31(A \rightarrow G)\beta^+$, IVS-I-130 $(G \rightarrow C)\beta^0$, IVS-II-848 $(C \rightarrow G) \beta^+$, Codon 24 $(T \rightarrow A) \beta^+$, Codon 54 $(+G) \beta^0$, Codon 90 $(G \rightarrow T) \beta^0$, Codon 110 $(T \rightarrow C) \beta^0$, Codon 121 $(G \rightarrow T) \beta^0$, $(ATG \rightarrow GTG) \beta^0$, $(ATG \rightarrow AGG) \beta^0$ ve Codon 127/ 128 $(-AGG) \beta^0$, Japonlarda, $-32 (C \rightarrow A) \beta^+$, Tayvanlılarda, Codon 26 $(G \rightarrow T) \beta^0$, Codon 35 $(C \rightarrow A) \beta^0$, Codon 41 $(-C) \beta^0$, Codon 95 $(+A) \beta^0$ ve Codon 123-125 $(-ACCCCACC) \beta^0$, Taylandlılarda bulunmaktadır. Korelilerde ise başlatıcı kodon $(\underline{ATG} \rightarrow \underline{AGG}) \beta^+$ 'dır (11,21,23,29, 45)

D- Ender Bazı Mutasyonlar

Başlatıcı kodondaki $(T \rightarrow C) \beta^0$ mutasyonu, promotor yöresindeki -101 pozisyonunda görülen $(C \rightarrow T) \beta^+$ mutasyonu ender görülen mutasyonlardandır. IVS-I-5 $(G \rightarrow A) \beta^+$ mutasyonu Türkiye'de IVS-I-5 $(G \rightarrow T) \beta^+$ mutasyonu Yunanistan ve Türkiye'de, bir Poli A mutasyonu olan $(A \rightarrow G) \beta^+$ Yugoslavya, Bulgaristan ve Malezya da bulunmaktadır. (22).

E- Türkiye'deki β Talasemi Mutasyonlarının Dağılımı.

Türkiye deki β Talasemi mutasyonları geniş bir spektrum göstermektedir. Altı tane çok sık rastlanan mutasyon görülmüştür. IVS-I-110 $(G \rightarrow A) \beta^+$, IVS-I-6 $(T \rightarrow C) \beta^+$, Codon 8 $(-AA) \beta^0$, IVS-I-1 $(G \rightarrow A) \beta^0$, $-30 (T \rightarrow A) \beta^+$ ve frameshift kodon 5 $(-CT) \beta^0$ dir (5,22).

β^+ ve β^0 talasemiye neden olan 17 mutasyon bulunmuştur. (5).

En sık görülen bu 6 mutasyonun frekansı genlerin % 69,3 üdür. % 2' nin üzerinde sıklıkta görülen 10 mutasyon tüm mutasyonların %81,9' unu oluşturur. Bunların sıralaması ise; IVS-I-110 $(G \rightarrow A) \beta^+$ % 42,2 IVS-I-6 $(T \rightarrow C) \beta^+$ % 10,0, Codon 8 $(-AA) \beta^0$ % 4,9 , IVS-I-1 $(G \rightarrow A) \beta^0$ % 4,5 , $-30 (T \rightarrow A) \beta^+$ % 4,0 ,

Fsc 5 (-CT) β^0 % 3.7 , codon 39 (C→T) β^0 % 3.7 , IVS-II-1 (G→A) β^0 % 3.5 , Codon 8/9 (+G) β^0 %3, IVS-II-745 (C→G) β^+ % 2.4 dür. -87 (C→G) β^+ % 1.4 ve IVS-I-5 (G→C) β^+ mutasyonu % 1.2 arasında görülmüştür. 5 mutasyon ise yalnızca bir veya iki kromozomda bulunmuş ve bunların insidansı % 1'den azdır. (Tablo 16) (5,11,22,23,38).

Akdeniz popülasyonlarında görülen 44 tip mutasyonun ana grubu oluşturduğu rapor edilmiştir. Bu mutasyonlar farklı bölgelerde farklı frekanslarda gözlenmiş ve mutasyon tiplerinin frekansının bir ülkeden diğerine çok farklı dağılım gösterdiği vurgulanmıştır (21,22).

Türkiye, beta talasemi açısından çok büyük moleküler heterojenlik göstermektedir. Şimdiye kadar 17 farklı mutasyon gösterilmiştir. Halbuki diğer ülkelerdeki beta talasemi ile ilgili çalışmalar, bu popülasyonların bir çoğunda yalnızca birkaç mutasyonun (6 veya daha az) beta talasemi mutasyonlarının % 90' dan daha fazlasını içerdiği gösterilmiştir. Türkiye de ise beta talasemi nin 10 mutasyonu sadece % 81.9 oranında bulunmaktadır. Nadir görülen 7 mutasyon ise % 3.9' luk bir oranı içermektedir. Geri kalan ve yaklaşık 14.2 lik bir grup ise bilinmeyen mutasyonlar olarak gruplandırılmıştır. 5).

Diğer doğu Akdeniz ülkelerindeki gibi Türkiye' de de en yaygın mutasyon IVS-I-110 (G→A) β^+ mutasyonudur. Bu mutasyonun Türkiye' deki tüm beta talasemi mutasyonları içindeki oranı % 42.2 dir. Sık rastlanan diğer mutasyonlar ise IVS-I-6 (T→C) β^+ ve Cd 8 (G→A) β^0 dir. Bu iki mutasyonun frekansı ise % 41.9 dur. (5)

Tablo 16: Türk Populasyonundaki 17 farklı β Talasemi Mutasyon Sıklığı (5).

Mutasyon	Tip	%
IVS-I-110 (G→A)	β^+	42.2
IVS-I-6 (T→C)	β^+	10.0
FSC 8 (-AA)	β^0	4.9
IVS-I -1 (G→A)	β^0	4.5
- 30 (T→A)	β^+	4.0
FSC 5 (- CT)	β^0	3.7
Cd 39 (C→T)	β^0	3.7
IVS-II-1(G→A)	β^0	3.5
FSC 8/9(+G)	β^0	3.0
IVS-II-745(C→G)	β^+	2.4
- 87 (C→G)	β^+	1.4
IVS-I-5(G→C)	β^+	1.2
FSC 6 (-A)	β^0	0.5
Cd 27 (C→T)	β^+	0.2
- 101 (C→T)	β^+	0.2
-28	β^+	0.2
IVS-I-116(T→G)	β^0	0.2
Bilinmeyen		14.2
Toplam		100.0

MATERYAL VE METOD

A.CİHAZLAR

1-Coulter counter	Coulter T-890
2- Otomatik Pipet	Gilson 20,100,200 μ
3- Microsantrifüj	Fischer 235 B
4- Soğutmalı Santrifüj	Sorvall RC-2B
5- Santrifüj	Centrikon T-124
6- Kar makinası	Scotsman AF-10
7- Speed vac concentrator	SVC 100 H
8- Thermo-cycler	Perkin Elmer Cetus
9- Minigel elektroforez	Pharmacia GNA-100
10-Jel kurutma cihazı	Drygels model SE1160
11-MP4 kamera	Polaroid MP4 land
12-Film Banyo makinası	Kodak XOMAT M20
13- Ultrasonic banyo	Bronson 2200
14-Spektrofotometre	Shimadzu UV-120-02
15-pH metre	Beckman century SS-1

B.KİMYASAL MADDELER

1-Katı maddeler

- Proteinaz K Sigma P 6556
- Amonyum Klorür Sigma
- Amonyum Bikarbonat Sigma
- Agaroz Bio-RAD 162-0126
- Etidium Bromür Sigma E 8751
- NaCl Sigma

- KCl Sigma
- Tris HCl Ph:7.5 Sigma
- EDTA Na₂ Sigma

2.SIVI MADDELER

- HbA₂ kiti Isolob
- Taq Polimeraz Perkin elmer Cetus Amlı Taq
- Mineral oil Sigma M 5904
- Deoksi Adenozin trifosfat (dATP) Sigma D-4788
- Deoksi Sitozin trifosfat (dCTP) Sigma D-4913
- Deoksi Guanozin trifosfat (dGTP) Sigma D-5038
- Timidin Trifosfat Sigma T-9656
- Fenol Baker 2859-01 500 ml

C.MATERYAL TOPLANMASI

Kan örnekleri Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı ve Çocuk Hastalıkları Polikliniğine kontrol amacıyla gelen Beta Talasemi major tanısı konmuş, çeşitli yaşlarda devamlı kan transfüzyonu gören hastalardan alınmıştır.

Kan Transfüzyonu yapılmadan önce her hastadan 5' er ml olmak üzere toplam 10 ml EDTA' lı kan alınmıştır. Alınan bu kanlar buzdolabında 4⁰ C' de korunmuştur.

Alınan bu kan örneklerinin daha sonra termos içerisinde toplandıktan hemen sonra Adana Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalına götürülerek kanların hematolojik testleri yapıldı ve hemen takibinde DNA'ları izole edildi (28).

D.ANALİZ YÖNTEMLERİ

1.COULTER

EDTA' lı tüplere toplanan kanlar yavaş yavaş birkaç defa karıştırılarak Homojen hale getirildikten sonra Coulter Sysmex AX 100 cihazında hematolojik parametreler (RBC, Hb, Hct, MCV, MCH, MCHC) saptandı.

2.LÖKOSİTTEN DNA İZOLASYONU (28)

a- PrensiP

EDTA' lı tüplere alınan kanın, plazması uzaklaştırarak şekilli elemanlar yıkanır. Eritrositler hemoliz edilerek saf lökosit elde edilir. Proteinaz K ve STE ile muamele edilen lökositlerin hücre zarı parçalanarak proteinler hidroliz edilir. Bu homojen karışım fenol ile ekstre edilerek sulu fazda bulunan DNA alkol ile çöktürülür.

b- Fenol- Kloroform-İzoamil Alkol Yöntemi

Ayırıcılar

5X Retikülosit salin Çözeltisi

- 0.13 M NaCl 40.1 g/l
- 5 mmKCL 1.85 g/l
- 7.4 mm MgCl₂.6H₂O 6.16 g/l

Bir litre saf suda çözüldü ve kullanılacağı zaman 1/5 oranında saf su ile sulandırıldı.

Parçalayıcı (Lysing) çözeltisi.

- Aonyum Klorür 7.14 g/l
- Amonyum Bikarbonat 0.070 g/l

Bir litre saf suda çözdürüldü.

STE Çözeltisi.

- Tris HCl (pH:8.5) 10.0 mM
- NaCl 100.0 mM
- EDTA Na₂ 1.0 mM

Bir litre saf suda çözdürüldü.

% 10' luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

- 100 g / l Distile Su

Proteinaz K (10mg/mL)

- Proteinaz K 25mg / ml
- Tris HCL(pH:7.5) 2,5 ml

Fenol Çözeltisi.

DNA asidik pH'da organik faza ayrışacağından fenol kullanılmadan önce PH:7,8' e dengelendi. -20⁰C'den çıkarılan fenol oda sıcaklığına geldikten sonra 68⁰C'de eritildi. Erimiş fenole eşit hacimde tampon (0,5 M Tris.HCl , pH:8.0 20⁰C'de) eklendi. Manyetik karıştırıcıda 15 ' karıştırılıp üst fazı aspire edildi. Fenolik fazın pH'sı 7.8'den fazla oluncaya kadar işleme devam edildi. Fenol dengelendikten sonra son aköz faz uzaklaştırıldıktan sonra %2'lik β-Merkaptoetanol içeren 0.1 hacim 0.1 M Tris,HCl (pH:8.0) eklendi. Ve böylece fenol çözeltisi hazırlanmış oldu.

Fenol:Kloroform:İzoamil alkol Çözeltisi. (25:24:1)

Eşit hacimlerde dengelenmiş fenol ve kloroform:izoamil alkol (24:1) içeren karışım nükleik asit preparasyonlarından proteini uzaklaştırmak için sıklıkla kullanılır. Kloroform proteinleri denatüre eder aköz fazla organik fazın ayrılmasını sağlar.

- Fenol 25 hacim
- Kloroform 24 hacim
- İzoamil alkol 1 hacim

% 70' lik Etil Alkol

Saf Etil Alkol

TE Tamponu

- Tris.HCl (pH:7,5) 1mM
- EDTA 1Mm

c-Yöntem

1- EDTA'lı tam kan 2500 g' de 15 dakika santrifüj edilip, plazması ayrıştırılmıştır.

2- Elde edilen çökelti 50 mL' lik plastik tüplere aktarılarak üzerine yaklaşık 30 mL (10 mL tam kan için) retikülosit salin çözeltisi eklenmiştir. 2500 g' de + 4°C ' de santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır.. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

3-Çökeltiye 3 hacim soğuk lysing çözeltisi eklenerek 15 dakika soğukta buz içinde bekletilmiştir. Daha sonra bir yada iki kez 2500 g' de 15 dakika daha santrifüj edilip eritrositlerin parçalanması sağlanmıştır.

4- Eritrositi parçalanmış olan materyalin süpernatanı atılıp, çökeltiye bu kez (10 mL tam kan için) 19 mL soğuk STE çözeltisi, 1/20 olacak şekilde % 10' luk SDS' den 1 mL ve 100 µl olacak şekilde (200 µl) Proteinaz K eklenmiştir. Hafifçe karıştırılıp su banyosunda 37°C' de bir gece bekletilmiştir. Ertesi gün bakıldığında eğer tüpteki karışım homojen değilse homojen oluncaya kadar su banyosunda 37°C'de bekletilmiştir.

5-Homojen materyale, kendisi kadar doymuş fenol eklenerek 2500 g' de +4°C' de santrifüj edilmiştir.

6- Üst faz (Sıvı Faz) başka bir tüpe alınarak bu işlem birkaç defa tekrarlanarak üst faz başka bir tüpe alınmıştır.

7- Bu aşamada ise fenol-kloroform-izoamil alkol karışımından eşit hacimde eklenerek 2500 g' de 15 dakika bir kez daha santrifüj edilmiştir.

8- Üst faz dikkatlice bir erlen deki saf etilalkole aktarılmıştır. Altan fenol alınmaması önemlidir ve DNA çökünceye kadar yavaşça karıştırılmıştır. Birkaç dakika içinde ise DNA' nın önce hava kabarcığı şeklinde daha sonra ipliksi bir yapı olarak çöktüğü gözlenmiştir.

9- İpliksi görünüm alan DNA pastör pipeti yardımı ile ependorf tüpüne aktarılmıştır. Ependorf tüpünde DNA % 70'lik alkolle yıkanmış ve yıkanan bu DNA santrifüj edilerek içindeki alkol uçurulmuştur.

10- Bu şekilde yıkanan steril DNA tüpündeki pellete göre steril TE tamponunda çözdürülmüştür (28).

11-Bu aşamada artık elde edilen DNA' nın derişimi hesaplanmıştır. 20µl DNA; 600µl ' ye TE ile seyreltilmiş, 260 nm ve 280 nm dalga boyunda spektrofotometre ile optik dansitesi okunmuştur.

d- Hesaplama

DNA derişimi ($\mu\text{l} / \text{mL}$) = OD X Seyreltme Faktörü X 50

$$\mu\text{l} / \text{mL} = \text{OD} \times 20 \times 50$$

50=1 cm ışık yollu küvette 1 OD' ye karşılık gelen $\mu\text{l} / \text{mL}$ biriminden DNA miktarı.

3.Polimeraz Zincir Reaksiyonu(PCR) (28):

a-PCR' in prensibi:

Lökositlerden veya daha değişik materyallerden elde edilen DNA' ların, amaçlanan bir yöresinin, in vitro olarak sentezlenmiş, özel baz dizileri (Primerler) yardımı ile yaklaşık olarak milyon kez çoğaltılmasıdır. İn vitro şartlarda DNA parçasının sentezlenmesinde primerler, in vivo replikasyonda RNA polimeraz tarafından yapılan başlatıcı DNA dizisi görevini, TAQ polimeraz enzimi in vivo sentezdeki DNA polimeraz görevini yaparak istenilen DNA bölgesinin 10^6 kez çoğaltılmasını sağlamaktır.

PCR için gerekli ayıraç ve gereçler

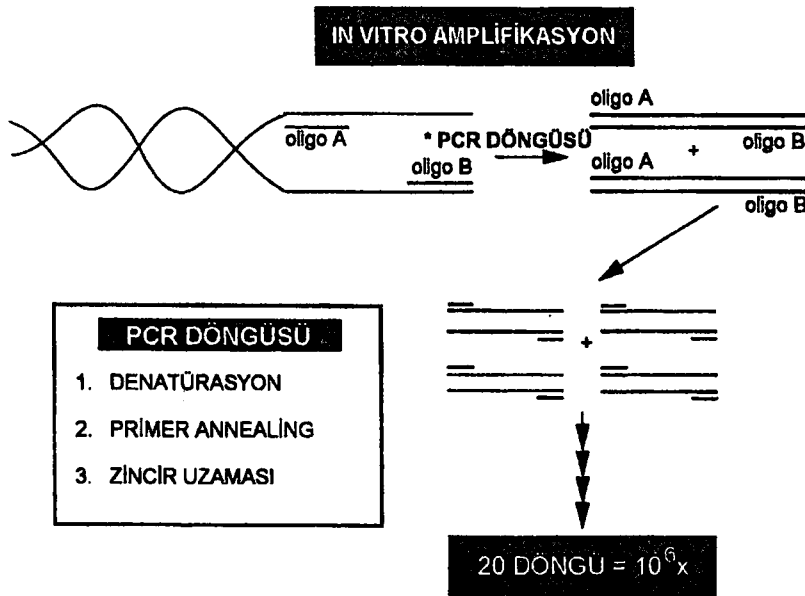
PCR için gerekli ayıraçlar.

<u>Ayıraç</u>	<u>PCR' da Kullanımı</u>
Taq DNA Polimeraz	Primer uzamasını katalize eder
Oligonükleotid	DNA kalıbındaki enzimatik uzamayı başlatır
DNTP' ler HPLC saflığında (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Enzimatik uzama için gereklidir
Slikon, steril mikrosantrifüj tüpleri (0,5, 0.2 μl ' lik)	PCR' ı sağlamak
İnce, Steril Mineral oil	Tepkimeyi buharlaşmadan korur.
Saf steril su	

Pipet uçları	Kontaminasyonu engellemek için
Steril eldiven	Kontaminasyon ve DNAaz dan korumak için
Etidium Bromit	Jeldeki PCR ürününü belirlemek için
Bromfenol mavisi, ksilen siyanol	Jele çözelti yüklemek için

PCR için gerekli araçlar.

Araç	PCR' da Kullanımı
DNA Thermal Cyclers	PCR' ı otomatikleştirir.
Mikrosantrifüj	Tüpün tabanındaki tepkimeyi yoğunlaştırır.
Otomatik Pipetler	Tepkime bileşenlerini karıştırır.
-20°C' lik Derin Dondurucu	Ayıracı saklamak
Analitik terazi	Ayırac hazırlamak
Agaroz jel elektroforez sistemi	jelin analitik incelenmesi
UV Transluminatör	jelin analitik incelenmesi



Şekil 15: PCR Döngüsünün Şekilsel Olarak Gösterilmesi (28).

Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Sikluslar:

Denaturasyon:(Denaturation)

Bu aşamada 94OC' de 1.00 dakika, genomik DNA' nın çift sarmal zincirinin açılması sağlanmıştır.

Yapışma : (Annealing)

Bu aşamada 650C' de 1.00 dakika primerlerin DNA zincirlerine yapışması sağlanmaktadır.

Zincirin Uzaması: (Extension)

Bu aşamada 720C' de 1.30 dakika süreyle açılmış olan DNA zincirlerinin 3' uçlarına 5' uçları ile yapışan primerlerin uç kısmına (5' den 3' ne doğru) TAQ polimeraz enzimi yardımı ile ortamda bulunan dNTP' lerin bağlanması sağlanmıştır. Genomik DNA kalıp olarak kullanılıp, primerlerin ucuna 3'-5' fosfodiester bağı ile bağlanarak DNA zincirinin uzaması sağlanmıştır. Bu üç basamak 25 kez tekrarlanarak istenen DNA yöreni milyon kez çoğaltılmıştır.

b- AMPLIFICATION REFRACTORY MUTATION SYSTEM (ARMS)

Prensip.

Bu teknik blotting, hibridizasyon ve radyoaktivite gerektirmeden moleküler tanı olanağı sağlar. Reaksiyona özgün primerler kullanılarak mutasyonun varlığı hakkında bilgi sahibi olunur. Klasik PCR' da iki primer ile amplifikasyon yapılır iken bu teknikte dört primer kullanılmıştır. Deney koşullarının doğruluğunu göstermesi amacıyla kullanılan iki primer, kontrol amplifikasyonu içindir ve her deneyde kullanılmıştır. Diğer iki primer ise mutasyonun varlığı veya yokluğuna özgün amplifikasyonu göstermektedir ve tanı için gereklidir.(28)

Ayır a lar

Stok  ozeltiler

- 2 M KCl 14.91 g/100 ml
- 1 M Tris.HCl, pH 8,3 12.11 g/100 ml
- 1M MgCl₂ . 6h₂O 20.33 g/100 ml

Bu karışım +4°C' de saklanmıştır.

10X Cetus Tamponu

- 2M KCl 1250 µl
- 1M Tris.HCl 500 µl
- 1M MgCl₂ 75 µl
- Jelatin 5 mg
- Steril distile su 3200 µl
- Toplam Hacim 5025 µl

Jelatinin erimesi i in 37°C' de bekletilmiştir.

PCR Karışımı (4 mL)

- 10X Cetus Tamponu 500 µl
- Steril Distile Su 3096 µl
- 1,25mM dNTP karışımı 400 µl (Herbiri i in 100 µl)
- 1 M Spermidin 4 µl
- Toplam Hacim 4000 µl

dNTP Karışımı

dNTP' lerin (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) her birinden (100mM' lik stoktan) 60 µl alınıp  zerine 4740 µl steril distile su eklenerek 1,25 mM' lik  zelti hazırlanmıştır.

Primerler

Primerler 5 pm/ µl olacak şekilde sulandırılır. Kullanılan primerler tablo 17 'de gösterilmiştir.

Tablo 17 : ARMS' da Kullanılan Primerler

No	Mutasyon Bölgesi	MUTANT			
1	IVS-I-110	40	15	16	31
2	IVS-I-1	42	15	16	30
3	Cd 39	47	15	16	30
4	Cd 8	54	15	16	31
5	IVS-I-6	46	15	16	30
6	-30	57	15	16	31
7	IVS-II-745	50	15	16	2
8	IVS-II-1	49	15	16	30

Amplifikasyonda Kullanılan Primerlerin Baz Dizileri:

Kontrol Primer (15) 5'-CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC-3'

Kontrol Primer (16) 5'-GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA-3'

Ortak Primer (30) 5'-ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC-3'

Ortak Primer (31) 5'-CCC CTT CCT ATG ACA TGA ACT TAA-3'

IVS-I-110 Mutant (40) 5'-ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAG ACT-3'

IVS-I-1 Mutant (42) 5'-TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAT-3'

IVS-I-6 Mutant (46) 5'-TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATG-3'

IVS-II-1 Mutant (49) 5'-AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT CAA-3'

IVS-II-745 Mutant (50) 5'-TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCC AGG-3'

Cd 39 Mutant (47) 5'-CAG ATC CCC AAA GGA CTC AAA GAA CCT GTA-3'

50X AGB Tamponu , ph 8,3

- 2M Tris.HCl 242.28 g/l
- 1M Sodyum Asetat.3H₂O 136.08 g/l
- 10mM EDTA-Na² 3.72 g/l

Saf su ile litreye tamamlanıp pH sı ayarlanmıştır.

c- Protokol

Çözelti	Miktar
PCR Karışımı	20 µl
Primer A	1 µl (5 pmol)
Primer B	1 µl (5 pmol)
Ortak Primer	1 µl (5 pmol)
ARMS Primer	1 µl (5 pmol)
DNA	1 µl (0,3-0,5)
Taq Polimeraz Enzimi	0,5 Ü (0,1 µl)
Toplam Hacim	≈25 µl

d- PCR Programı

94°C → 1 dakika 65°C → 1 dakika 72°C → 1,5 dakika	⇒ 25 Döngü
---	------------

72°C → 3 dakika ⇒ 1 Döngü

e- Yöntem

Son hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanır. 25 döngü yapıldıktan sonra 3 dakika da 72°C' de polimerizasyon için bırakılır ve amplifiye edilen örnekler % 4'lük Nusieve agaroz jelinde elektroforez ile kontrol edilir.

ARMS Yöntemi ile Mutasyonların Saptanması (28)

Amplifikasyonlar ARMS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemde amplifikasyondan sonra direkt olarak elektroforez yöntemi ile, başka bir işleme gerek duyulmadan mutasyon tipleri tespit edilebilmektedir. ARMS yöntemi ile amplifikasyon yapılırken her örnek için hazırlanan tüplere kontrol primerler, ortak primerler ve mutant diziye sahip primerler ilave edilerek amplifikasyon yapılmıştır. Böylece her tüpe 4 primer ilave edilerek amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Bu primerlerden ikisi (15 – 16 nolu primerler) deneyin güvenilirliği bakımından gerekli olan primerler diğer iki primerler ise hangi mutasyon saptanacak ise o mutasyonun baz dizisini içeren primer ile bunun karşılığı olan primerdir (35).

Mutasyonları gösterebilmek amacıyla yapılan ARMS yöntemi için aşağıdaki çalışma sırası izlenmiştir.

1-) Çalışılacak örnek kadar eppendorf tüpleri alınmış ve üzerleri sırasıyla hasta sayısı kadar ve -K , +K olacak şekilde sınıflandırılmıştır.

2-) Daha sonra ayrı bir eppendorf tüpü çalışma havuzu olarak hazırlanmıştır.

3-) Çalışma havuzu olarak adlandırılan eppendorf tüpünün içine yukarıda anlatılan PCR karışımından 20 µl , içinde kullanılacak 4 ayrı primerden 1 er µl olacak

şekilde hazırlanmış primer karışımından 4 μ l , Taq polimeraz enziminden 0.1 μ l konulmuştur.

4-) Hastalar için ayrılan tüplere ise sırasıyla her tüpe hastanın önceden pürifiye edilmiş DNA' sından 1 μ l bırakılmıştır. –K olarak alınan eppendorf tüpüne normal bir insan DNA'sı, +K olarak alınan eppendorf tüpüne ise çalışılacak mutasyonu taşıyan bir insan DNA' sı 1' er μ l olacak şekilde bırakılmıştır.

5-) DNA' ları ihtiva eden tüplerin üzerine toplam 24.1 μ l olacak şekilde PCR karışımı bırakılmıştır.

6-) Toplam 25.1 μ l hacme sahip olan tüplerin üzerine buharlaşmayı engellemek amacıyla birkaç damla mineral yağ bırakılmıştır.

7-) Ağızları sıkıca kapatılan hazırlanmış olan tüpler önceden çalışma protokolü hazırlanan PCR' a bırakılarak amplifikasyonu sağlanmıştır.

8-) PCR sonunda amplifiye edilen örnekler brom fenol boyası ile boyandıktan sonra 150 voltta 20 dakika agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür.

9-) Hazırlanan jel etidium bromide boyası ile boyanan jel saf suda yıkandıktan sonra U.V. ışık altında incelenmiştir.

10-) U.V. ışık altında fotoğrafları çekilen jeller gösterdikleri mutasyonlara göre sınıflandırılmıştır.

A.IVS-I-110 Mutasyon saptanması için Amplifikasyon Ayıraçları

DNA		0,5 μ l
Kontrol	(15)	1 μ l (5 pmol)
Primerler	(16)	1 μ l (5 pmol)
Mutant Primer	(40)	1 μ l (5 pmol)
Ortak Primer	(30)	1 μ l (5 pmol)
PCR Karışımı		20 μ l
Taq Polimeraz		0,1 μ l (0,5 Ü)
Toplam Hacim		\approx25 μl

B.IVS-I-1 Mutasyon Saptanması için Amplifikasyon Ayıraçları

DNA		0,5 μ l
Kontrol	(15)	1 μ l (5 pmol)
Primerler	(16)	1 μ l (5 pmol)
Mutant Primer	(42)	1 μ l (5 pmol)
Ortak Primer	(30)	1 μ l (5 pmol)
PCR Karışımı		20 μ l
Taq Polimeraz		0,1 μ l (0,5 Ü)
Toplam Hacim		\cong 25 μ l

C.Cd 39 Mutasyon Saptanması için Amplifikasyon Ayıraçları

DNA		0,5 μ l
Kontrol	(15)	1 μ l (5 pmol)
Primerler	(16)	1 μ l (5 pmol)
Mutant Primer	(47)	1 μ l (5 pmol)
Ortak Primer	(30)	1 μ l (5 pmol)
PCR Karışımı		20 μ l
Taq Polimeraz		0,1 μ l (0,5 Ü)
Toplam Hacim		\cong 25 μ l

D.Cd 8 Mutasyon Saptanması için Amplifikasyon Ayıraçları

DNA		0,5 μ l
Kontrol	(15)	1 μ l (5 pmol)
Primerler	(16)	1 μ l (5 pmol)
Mutant Primer	(54)	1 μ l (5 pmol)
Ortak Primer	(30)	1 μ l (5 pmol)
PCR Karışımı		20 μ l
Taq Polimeraz		0,1 μ l (0,5 Ü)
Toplam Hacim		\cong 25 μ l

E.IVS-I-6 Mutasyon Saptanması için Amplifikasyon Ayıraçları

DNA		0,5 μ l
Kontrol	(15)	1 μ l (5 pmol)
Primerler	(16)	1 μ l (5 pmol)
Mutant Primer	(46)	1 μ l (5 pmol)
Ortak Primer	(30)	1 μ l (5 pmol)
PCR Karışımı		20 μ l
Taq Polimeraz		0,1 μ l (0,5 Ü)
Toplam Hacim		\cong 25 μ l

F.- 30 Mutasyon Saptanması için Amplifikasyon Ayıraçları

DNA		0,5 μ l
Kontrol	(15)	1 μ l (5 pmol)
Primerler	(16)	1 μ l (5 pmol)
Mutant Primer	(57)	1 μ l (5 pmol)
Ortak Primer	(31)	1 μ l (5 pmol)
PCR Karışımı		20 μ l
Taq Polimeraz		0,1 μ l (0,5 Ü)
Toplam Hacim		\cong 25 μ l

G.IVS-II-745 Mutasyon Saptanması için Amplifikasyon Ayıraçları

DNA		0,5 μ l
Kontrol	(15)	1 μ l (5 pmol)
Primerler	(16)	1 μ l (5 pmol)
Mutant Primer	(50)	1 μ l (5 pmol)
Ortak Primer	(2)	1 μ l (5 pmol)
PCR Karışımı		20 μ l
Taq Polimeraz		0,1 μ l (0,5 Ü)
Toplam Hacim		\cong 25 μ l

H.IVS-II-1 Mutasyon Saptanması için Amplifikasyon Ayıraçları

DNA		0,5 μ l
Kontrol	(15)	1 μ l (5 pmol)
Primerler	(16)	1 μ l (5 pmol)
Mutant Primer	(49)	1 μ l (5 pmol)
Ortak Primer	(30)	1 μ l (5 pmol)
PCR Karışımı		20 μ l
Taq Polimeraz		0,1 μ l (0,5 Ü)
Toplam Hacim		\cong 25 μ l

Yukarıda gösterilen karışımlar daha sonra PCR' a yerleştirilmiş ve protokole göre çalışılmıştır.

Yöntem

Amplifikasyon için hazırlanan

20 μ l PCR mix

1 μ l ARMS Primer

1 μ l ortak Primer

1 μ l 5' mutant primer

1 μ l 3' mutant Primer

0.1 μ l Taq polimeraz

1 μ l DNA

PCR' a yerleştirildi

PCR'da

94⁰C'de 1 dakika

65⁰C'de 1 dakika

72⁰C'de 1^{1/2} dakika 25 döngü yaptırıldıktan sonra,

72⁰C'de 3 dakika döngü yaptırıldı.

PCR işleminin tamamlanmasından sonra Agaroz jel elektroforezine konarak yürütme işlemi başlatıldı.

5- Agaroz Jel Elektroforezi

a- Prensip

DNA parçalarının, elektriksel alanda anoda göç etmesi prensibine dayanır. Ayrıca DNA parçacıklarının kaç baz çiftinden oluştuğu elektroforez ortamına konan işaretler ile tespit edilmiştir.

b- Kullanılan Çözeltiler

%1 agaroz + %1 Nusieve agaroz :

1 gram agaroz + 1 gram nusieve agaroz , 100 ml 1XAGB tamponunda çözdürülerek mikrodalga fırında eritilmiştir.

50XAGB Tamponu:

Tris	242,28 g
NaAC 3 H ₂ O	136,08 g
EDTA ₂ Na	3,72 g
Glasiyel asetik asit	60 ml

1 litre saf suda çözdürüldü ve pH 8,3' e ayarlandı

10XTEA Tamponu:

Tris	193,8 g
NaOAc	65,6 g
NaCl	42,08 g
EDTA ₂ Na	29,76 g

4 litre saf suda çözdürüldü ve pH 8,3' e ayarlandı.

Loading Tamponu:

% 0,25 Brom Fenol Mavisini, % 40 sukroz 1XTEA tamponunda çözdürüldü ve pH 7,5 olarak ayarlandı.

Ethidium Bromide:

5 mg/ml olacak şekilde distile su ile hazırlandı.

c- Yöntem:

% 1 agaroz + %1 Nusieve agaroz 50-60°C' ye kadar soğutulduktan sonra jel kabına döküldü ve donana kadar oda ısısında bekletildi. Jele 20 µl amplifiye edilmiş DNA ve 2 µl loading tamponu ilave edildi.

Elektroforez 100 voltta saat, 1XAGB tamponuyla gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonunda Ethidium Bromide Boyası ile birkaç dakika boyandıktan sonra ultraviyole ışık altında incelenmiş ve yürütülen bantların fotoğrafları çekilmiştir.

BULGULAR

Örnekler, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Ana bilim Dalı'ndan mutasyon talasemi mutasyon taraması yapılmak amacıyla alınmıştır. Daha öncede Beta talasemi major tanısı konmuş 36 örneğin mutasyon tipleri ARMS yöntemi ile saptanmıştır. Bu kişilerden 10 ml EDTA' lı kan alınarak lökosit DNA'sı izole edilmiş ve daha sonra ARMS yöntemi ile örnekler amplifiye edilerek mutasyonları saptanmıştır.

Mutasyonu saptanan 36 örneğin hematolojik verileri tablo 18 de gösterilmiştir.

DNA' ları klasik yöntemle izole edilen örneklerin verimleri ise spektrofotometre de, 260 ve 280 nm' deki absorbanslarının tek tek ölçülerek 260 nm/ 280 nm oranıyla da bulunmuştur. Daha sonra Konsantrasyonları tespit edilmiştir. Örnek DNA'ların verimleri ve konsantrasyonları Tablo19 'da verilmiştir. Elde edilen DNA ların verimleri 1,3 ile 1,6 arasında bulunmuştur.

Bu işlem aşağıdaki yöntemle tespit edilmiştir.

$$\begin{array}{l} \text{Konsantrasyon :} \quad \text{Verim} \quad \text{X Sulandırma Oranı} \quad \text{X 50} \\ \text{Konsantrasyon :} \quad \frac{\text{OD-260}}{\text{OD-280}} \quad \text{X} \quad \frac{1000}{20} \quad \text{X 50} \end{array}$$

DNA örnekleri % 0,8 lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmiştir. Genomik DNA'lar kullanılıncaya kadar -20°C 'de saklanmıştır.

DNA örnekleri ARMS yöntemiyle Çukurova bölgesinde yaygın olarak görülen mutasyonlarla çalışıldı. IVS-I-110 (G→A) β^+ , IVS-I-1 (G→A) β^0 , Cd 39(C→T) β^0 ,

IVS-I-6 (T→C) β⁺, IVS-II-1 (G→A) β⁰, IVS-II-745 (C→G) β⁺, Cd 8 (→A) β⁰, I-30 (T→A) β⁺ olarak çalışılan mutasyonlar Çukurova bölgesi örnek alınarak çalışıldı.

Amplifiye edilen örnekler % 1 Neusieve agaroz + %1 agaroz jelde yürütülerek Ethidium Bromide ile boyanmış ve ultraviyole ışık kaynağı altında görünür hale getirilmiş ve bu bantlar filme alınmıştır. Sonunda elimizde bulunan 36 örneğin Beta talasemi mutasyon tipleri tespit edilmiştir. (Tablo 20).

Bu tabloya göre 36 örneğin 10'unun mutasyonu IVS-I-110 (G→A) β⁺, 1' inin IVS-I-1 (G→A) β⁰, 1'inin Cd 39(C→T) β⁰, 4'ünün IVS-I-6 (T→C) β⁺, 3'ünün IVS-II-1 (G→A) β⁰, 2 'inin IVS-II-745 (C→G) β⁺,4'ünün Cd 8 (→A) β⁰, 1'inin -30 (T→A) β⁺ olduğu tespit edilmiştir.

Bu tabloya göre 36 örneğin % 27.8'inin IVS-I-110 (G→A) β⁺, % 2.8' inin IVS-I-1 (G→A) β⁰, % 2.8'inin Cd 39(C→T) β⁰, % 11.1 ' inin IVS-I-6 (T→C) β⁺, % 8.3'ünün IVS-II-1 (G→A) β⁰, % 5.5 'inin IVS-II-745 (C→G) β⁺,% 11.1'inin Cd 8 (→A) β⁰, % 2.8 'inin -30 (T→A) β⁺ olduğu tespit edilmiştir.

Bununla beraber bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz mutasyonların diğer çalışmalarla ilişkisi karşılaştırıldı ve % 27.8 olarak belirlenen IVS-I-110 (G→A) β⁺, % 42.2 , % 2.8 olarak belirlenen IVS-I-1 (G→A) β⁰ , % 4.5, % 2.8 olarak belirlenen Cd 39(C→T) β⁰, % 3.7, % 11.1 olarak belirlenen IVS-I-6 (T→C) β⁺, % 10.0 , % 8.3 olarak belirlenen IVS-II-1 (G→A) β⁰,% 3.5, % 5.5 olarak belirlenen IVS-II-745 (C→G) β⁺,% 2.4, % 11.1olarak belirlenen Cd 8 (→A) β⁰, % 4.9, % 2.8 olarak belirlenen -30 (T→A) β⁺ ise % 4.0 olarak Başak ve Arkadaşları (5) tarafından belirtilmiştir.

Tabloda gösterildiği gibi 4 ve 21 nolu hastalar ikinci bir mutasyonda taşımaktadırlar. Bu iki birey kardeş olup IVS-I-110 mutasyonunu taşımaktadırlar.

Bunun yanında hastalardan birinde IVS-I-6 diğerinde ise IVS-I-1 mutasyonları pozitif olarak sağtanmıştır.

Bu sonuğlar dahilinde elimizde bulunan 10 hastanın ise tarama yapmış olduğumuz 8 mutasyonu taşımadığı tespit edilmiştir. Bu hastaların ülkemiz de daha az sıklıkta görülen mutasyonları tařıdđını düşünmekteyiz. Başak ve arkadaşlarının çalışmasında ise bu oran % 14.2 olarak görülmektedir. Mutasyon tespit edemediğimiz hastaların DNA'ları saklanarak ileride DNA dizi analizi yöntemiyle kontrol edilmesi amaçlanmıştır. Bu saklanan DNA'lardan 5 tanesi bir aileye ait olup bu ailenin mutasyonu tespit edilememiştir.



Tablo : 18 Örneklerin Hematolojik verileri.

No	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	Hb A2	Hb F
1	1,38	3,8	10,9	78,6	27,5	35	2,9	4,2
2	3,27	6,4	22,8	79,2	28,4	36,2	2,2	3,6
3	3,21	8,71	25,5	79,3	27,1	34,2	2,8	4,2
4	2,75	7,89	25,2	78,9	28,2	34,1	3,3	2,9
5	3,24	8,98	26,2	77,9	27,6	33,4	3,1	1,9
6	2,22	6,0	18,2	82,1	27	33,1	2,3	4,8
7	3,66	9,2	26,8	79,3	25	34,1	3,1	5,0
8	3,24	8,96	25,8	81,4	26,4	34,1	2,5	1,7
9	2,95	6,5	26,5	79,5	25,8	34,2	4,3	4,9
10	1,85	6,02	17,5	77,4	29,5	35,2	3,2	0,2
11	2,52	8,25	21,6	80,2	28,4	34,6	4,7	1,4
12	3,24	9,56	28,3	82,4	28,6	33,4	1,8	2,6
13	2,85	6,78	29,6	82,4	28,6	32,6	4,5	3,6
14	3,25	9,0	27,1	83,6	27,8	37,2	1,8	2,8
15	3,71	10,0	29,7	80,1	26,9	33,6	2,3	1,2
16	1,9	5,2	15,4	81	27,2	33,4	1,8	2,7
17	3,94	8,9	17,6	77,8	29,8	35,4	3,5	1,6
18	2,8	7,4	21,5	76,8	26,4	34,4	2,3	2,4
19	1,92	7,56	26,4	75,6	24,7	31,3	1,8	3,9
20	3,19	7,25	21,4	67	21,9	32,7	2,9	2,7
21	3,29	8,4	22,6	79,8	28,4	34,2	3,5	1,3
22	3,38	9,8	28,3	83,2	29	34,5	2,8	5,0
23	2,76	8,75	26,2	84,4	27,8	33,7	4,2	1,6
24	3,04	8,2	24	79,2	26,3	33,3	2,3	3,7
25	2,85	9,2	26,5	78,6	28,4	32,8	3,1	1,6
26	2,96	8,7	25,4	77,6	27,4	33,4	1,8	4,0
27	3,25	9,4	29,6	86,4	28,3	32,4	3,8	0,6
28	2,15	7,62	26,7	75,9	27,4	31,6	2,4	3,4
29	1,96	7,23	25,4	74,3	28,6	30,4	2,6	4,2
30	2,75	8,95	28,6	78,6	29,5	32,5	3,7	1,9
31	3,21	9,4	27,3	84,2	24,6	33,4	4,3	0,8
32	3,19	7,25	21,4	67	21,9	32,7	3,4	4,7
33	3,24	9,56	28,3	82,4	28,6	33,4	1,9	2,8
34	1,56	7,52	27,4	77,2	26,8	31,2	2,4	3,9
35	2,45	8,65	25,4	82,6	29,1	32,2	2,9	3,6
36	2,93	8,69	28,7	81,6	27,6	32,7	3,6	5,0

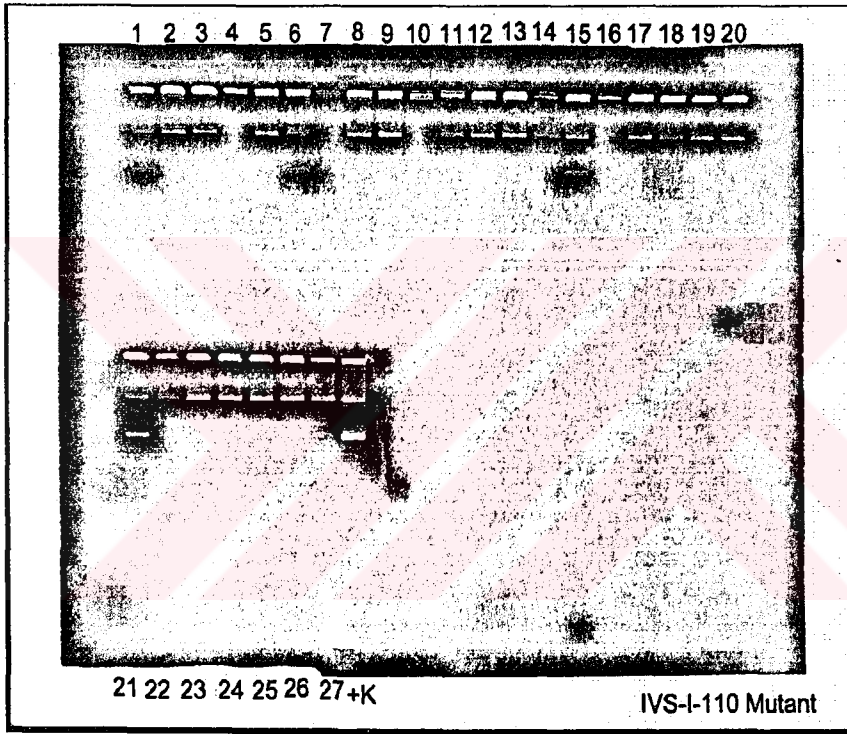
Tablo : 19 Örneklerin DNA verimleri

No	Optik Dansite OD 260 nm	Optik Dansite OD 280 nm	Verim 260/289	Konsantrasyon (mg/ml
1	0,200	0,146	1,4	342
2	0,384	0,264	1,5	364
3	0,313	0,224	1,4	349
4	0,085	0,062	1,4	343
5	0,182	0,118	1,5	386
6	0,225	0,168	1,3	335
7	0,042	0,031	1,4	339
8	0,288	0,185	1,6	389
9	0,267	0,162	1,6	412
10	0,074	0,062	1,2	298
11	0,265	0,203	1,3	326
12	0,242	0,185	1,3	327
13	0,171	0,121	1,4	353
14	0,055	0,043	1,3	320
15	0,289	0,193	1,5	374
16	0,046	0,035	1,3	329
17	0,131	0,083	1,6	395
18	0,384	0,281	1,4	342
19	0,211	0,149	1,4	354
20	0,204	0,154	1,3	331
21	0,342	0,247	1,4	346
22	0,196	0,145	1,4	338
23	0,216	0,167	1,3	323
24	0,405	0,331	1,2	306
25	0,115	0,083	1,4	346
26	0,166	0,131	1,3	317
27	0,196	0,126	1,6	389
28	0,213	0,167	1,3	319
29	0,179	0,138	1,3	324
30	0,135	0,099	1,4	341
31	0,195	0,152	1,3	321
32	0,286	0,211	1,4	339
33	0,274	0,227	1,2	302
34	0,302	0,214	1,4	353
35	0,284	0,187	1,5	380
36	0,299	0,244	1,2	306

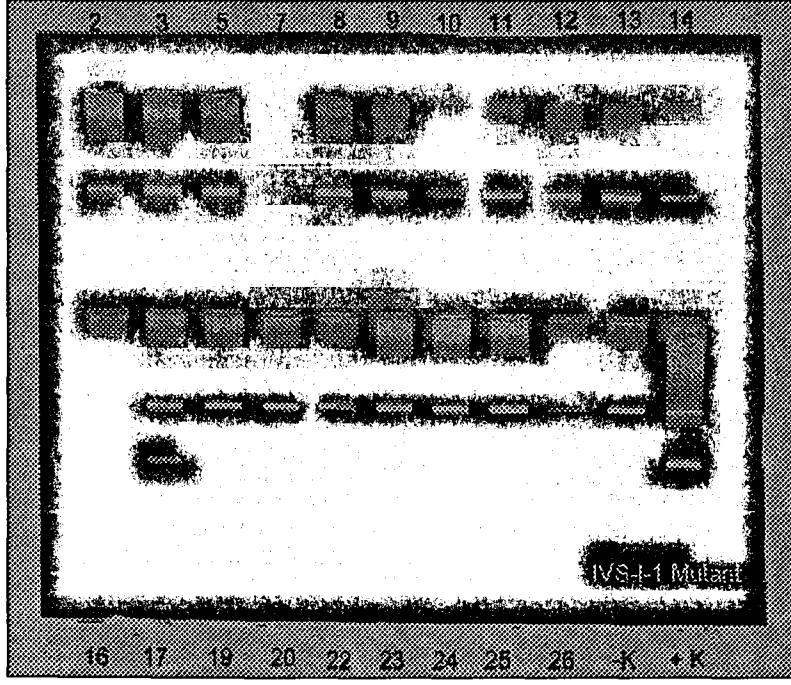
Tablo 20: Taraması yapılan beta talasemi mutasyonları

NO	Kullanılan Primerler								SONUÇ
	IVS I-110	IVS I-1	Cd 39	Cd 8	IVS I-6	-30	IVS-II-745	IVS-II-1	
1	+	-	-	-	-	-	-	-	IVS 1-110
2	-	-	-	-	-	-	-	-	BİLİNMEYEN
3	-	-	-	-	-	-	-	-	BİLİNMEYEN
4	+	+	-	-	-	-	-	-	IVS 1-110+IVS-I-1
5	-	-	-	-	-	-	-	-	BİLİNMEYEN
6	+	-	-	-	-	-	-	-	IVS 1-110
7	-	-	-	-	-	-	-	-	BİLİNMEYEN
8	-	-	-	-	-	-	+	-	IVS-II-745
9	-	-	-	-	-	+	-	-	-30
10	-	-	-	-	-	-	-	-	BİLİNMEYEN
11	-	-	-	+	-	-	-	-	Cd 8
12	-	-	-	-	-	-	-	-	BİLİNMEYEN
13	-	-	-	-	-	-	-	-	BİLİNMEYEN
14	-	-	-	+	-	-	-	-	Cd 8
15	+	-	-	-	-	-	-	-	IVS 1-110
16	-	-	-	+	-	-	-	-	Cd 8
17	-	+	-	-	-	-	-	-	IVS 1-1
18	+	-	-	-	-	-	-	-	IVS 1-110
19	-	-	-	-	+	-	-	-	IVS 1-6
20	-	-	-	-	-	-	-	-	BİLİNMEYEN
21	+	-	-	-	+	-	-	-	IVS 1-110+IVS-I-6
22	-	-	-	-	-	-	-	-	SEKANS
23	-	-	-	-	-	-	-	+	IVS II-I
24	-	-	-	-	-	-	-	-	BİLİNMEYEN
25	-	-	-	-	+	-	-	-	IVS I-6
26	-	-	-	-	+	-	-	-	IVS I-6
27	+	-	-	-	-	-	-	-	IVS 1-110
28	-	-	+	-	-	-	-	-	Cd 39
29	-	-	-	-	-	-	-	+	IVS II-I
30	-	-	-	-	-	-	-	+	IVS II-I
31	-	-	-	-	-	-	+	-	IVS II-745
32	-	-	-	-	+	-	-	-	IVS I-6
33	-	-	-	+	-	-	-	-	Cd 8
34	+	-	-	-	-	-	-	-	IVS 1-110
35	+	-	-	-	-	-	-	-	IVS 1-110
36	+	-	-	-	-	-	-	-	IVS 1-110

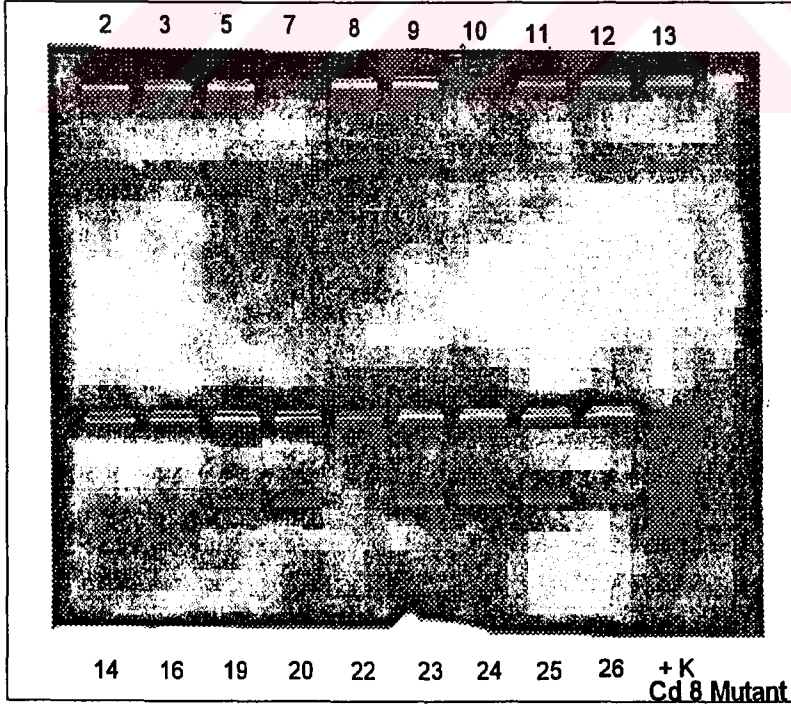
Tabloda gösterilen primerler kullanılarak 8 mutasyon tipi incelendiğinde tablo 20 de görüldüğü gibi 36 örnekte 8 mutasyon tespit edilmiştir. ARMS yöntemiyle amplifiye edilen örneklerin agaroz jel elektroforezi sonucunda yürütülmesiyle oluşan bantlar film edilmiş ve aşağıdaki resimlerle bu mutasyonlar gösterilmiştir.



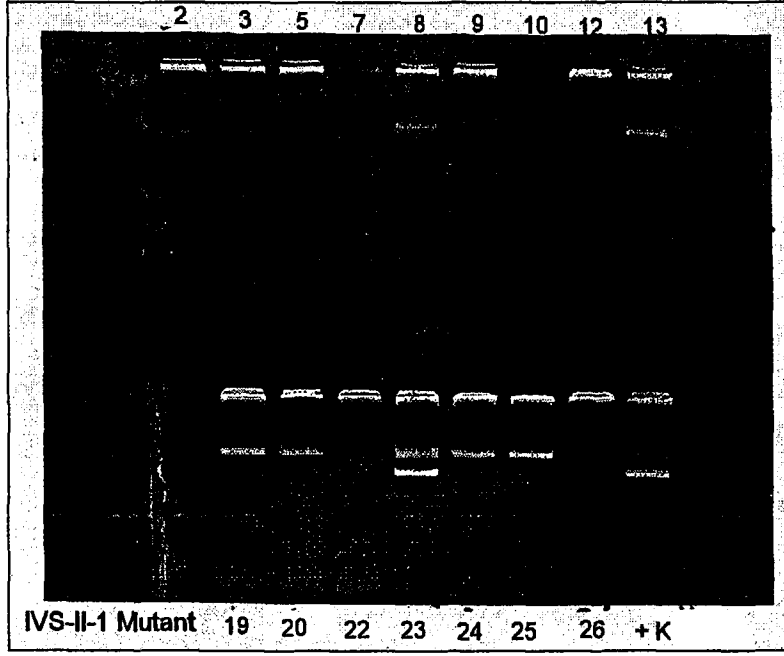
Resim 1: IVS-I-110 mutasyonunun Görünümü. (1,4,6,15,18,21 nolu hastaların bu mutasyonu taşıdığı +K 'a bakılarak tespit edilmiştir)



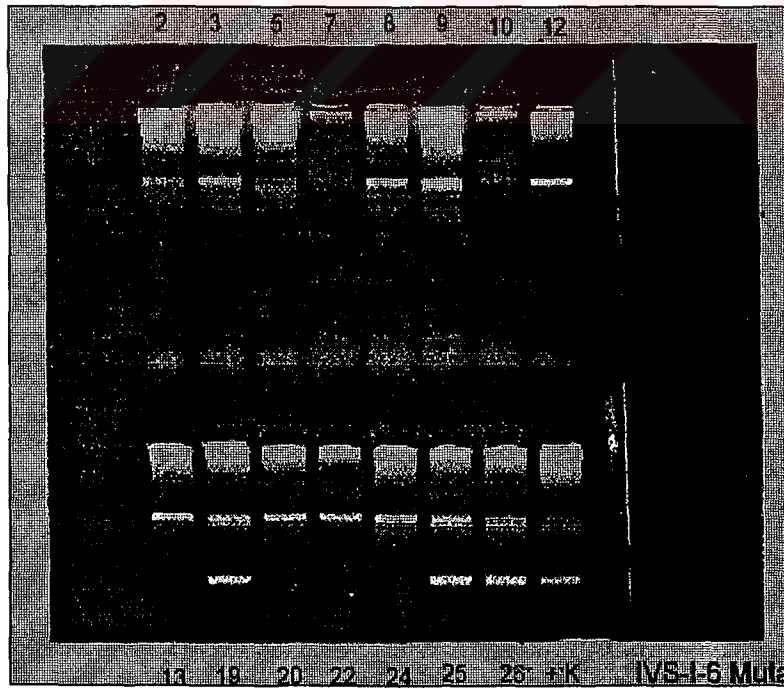
Resim 2: IVS-I-1 Mutasyonunun Görünümü. (17 nolu hastanın bu mutasyonu taşıdığı +K 'a bakılarak tespit edilmiştir)



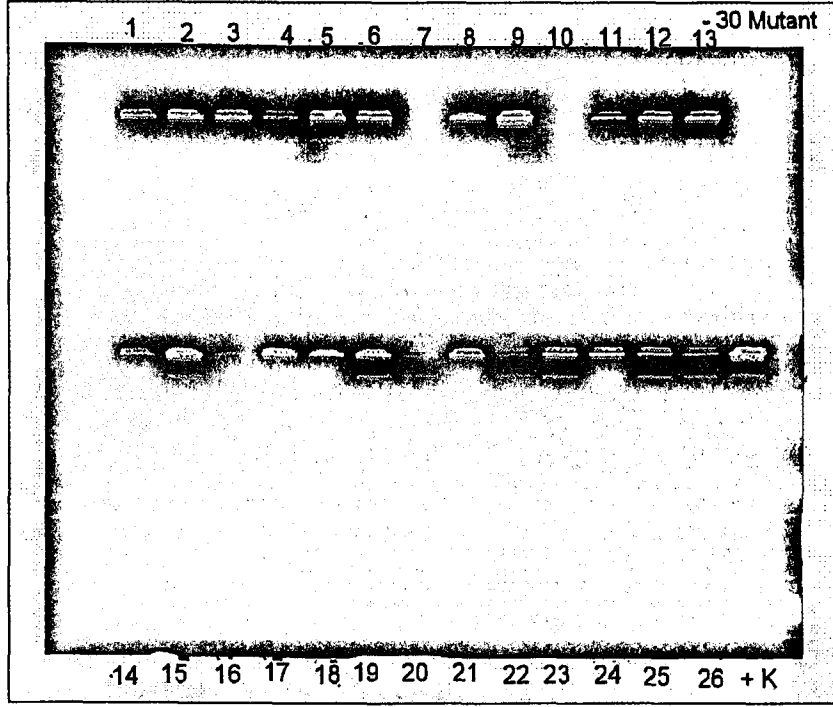
Resim 3: Cd 8 Mutasyonunun Görünümü. (11,14,16 nolu hastaların bu mutasyonu taşıdığı +K 'a bakılarak tespit edilmiştir)



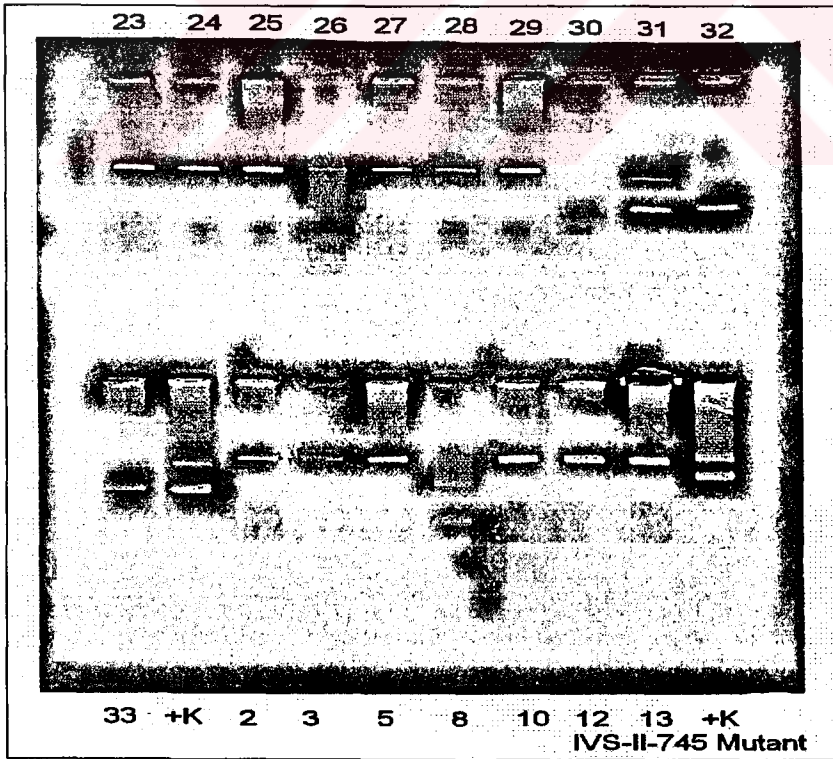
Resim 4: IVS-II-1 Mutasyonunun Görünümü. (23 nolu hastanın bu mutasyonu taşıdığı +K 'a bakılarak tespit edilmiştir)



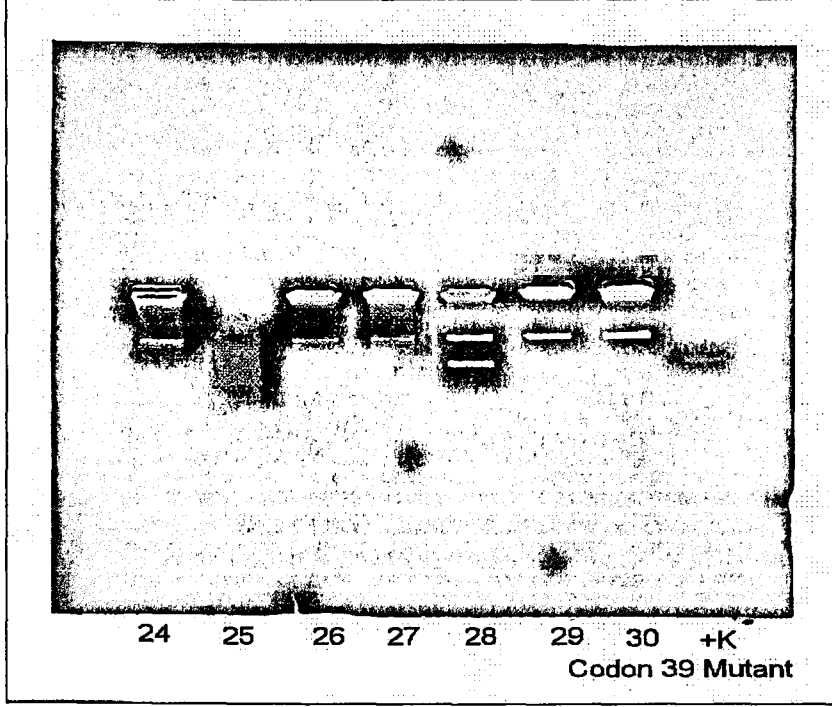
Resim 5: IVS-I-6 Mutasyonunun Görünümü. (19,25,26 nolu hastaların bu mutasyonu taşıdığı +K 'a bakılarak tespit edilmiştir)



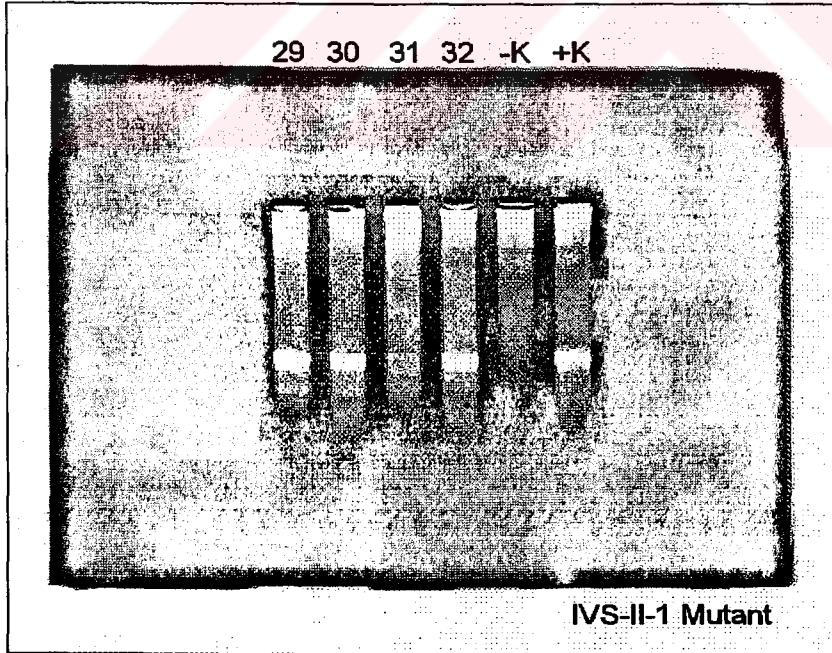
Resim 6: - 30 Mutasyonunun Görünümü. (9 nolu hastanın bu mutasyonu taşıdığı +K 'a bakılarak tespit edilmiştir)



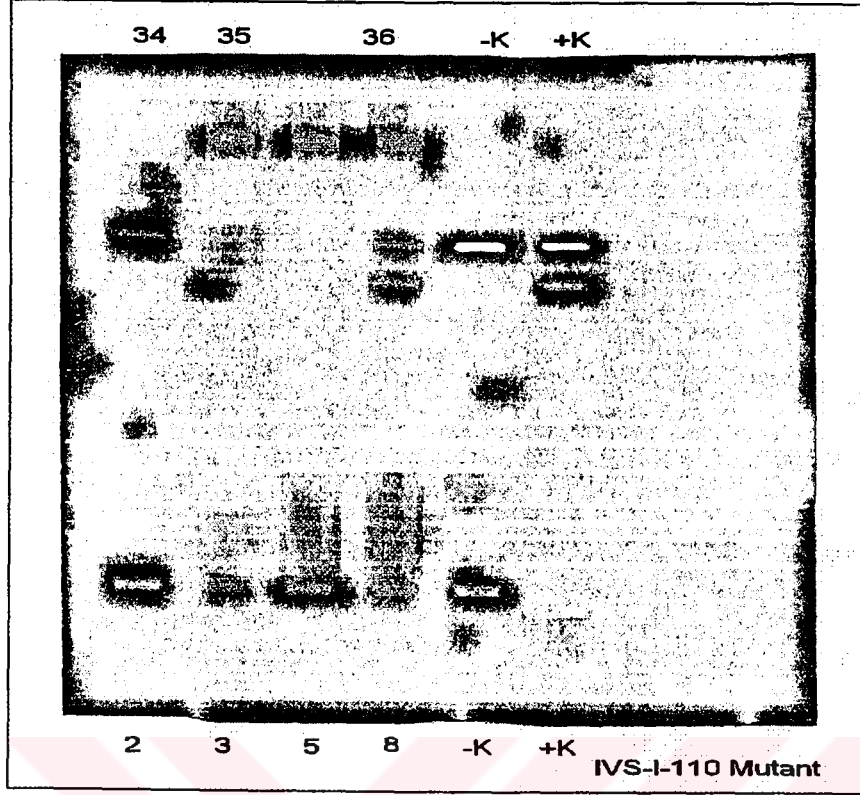
Resim 7: IVS-II-745 Mutasyonunun Görünümü (8,31 nolu hastaların bu mutasyonu taşıdığı +K 'a bakılarak tespit edilmiştir)



Resim 8 : Codon 39 Mutasyonunun Görünümü (28 nolu hastanın bu mutasyonu taşıdığı +K 'a bakılarak tespit edilmiştir)



Resim 9: IVS-II-1 Mutasyonunun Görünümü(29,30 nolu hastaların bu mutasyonu taşıdığı +K 'a bakılarak tespit edilmiştir)



Resim 10: IVS-I-110 Mutasyonunun Görünümü (34,35,36 nolu hastaların bu mutasyonu taşıdığı +K 'a bakılarak tespit edilmiştir)

TARTIŞMA

Beta talasemi, hemoglobin molekülünün β globin zincirinin sentezinde azalma veya yokluk ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır. En sık görülen anormal hemoglobinler içerisinde yer alır. Talaseminin yaygın olduğu populasyonlar Akdeniz ülkeleri, kuzey Afrikalılar, Orta Doğulular, Asya Hintlileri, Çinliler, Güneydoğu Asyalılar ve Siyah Afrikalılardır. (29)

Ülkemizin Dünya talasemi kuşağı üzerindedir. Özellikle Çukurova bölgesinde talasemi insidansı diğer bölgelere göre daha yüksektir. β Talasemili hastalar klinik olarak kolaylıkla teşhis edilebilmektedirler. Bu hastalar ömür boyu kan transfüzyonuna ihtiyaç duymaktadırlar. Major hastaları teşhis etmenin kolay olmasına rağmen taşıyıcıların tespiti normal görünümde olduklarından teşhisleri zordur. (5,21,31,36).

Yeni gelişen DNA yöntemleri ile her gün yeni bir β talasemi mutasyonu tespit edilebilmektedir. Bu güne kadar 141 farklı β talasemi mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyonların bir kısmı yaygın olarak bir kısmı da ender olarak görülmektedir (21).

Moleküler düzeydeki yöntemlerin pahalı olmasına rağmen toplum sağlığı açısından mutasyonların belirlenmesi önemli bir yer tutmaktadır. Bilhassa taşıyıcıların mutasyonlarının saptanması radikal bir tedavisi olmayan β talasemi için doğacak hastaların sayısını azaltabilecektir. Bu da ancak prenatal tanı ile olabilmektedir. Prenatal tanının kısa sürede sonuçlanabilmesi içinde o bölgede yaygın olan mutasyonların daha önceden ortaya çıkarılmış olması gereklidir. Hatta mutasyon haritasının çıkarılmış olması bu çalışmaların daha rahat yürütülmesini sağlayacaktır (29, 49).

Güneydoğu Anadolu Bölgesinde de β -talasemi önemli bir sorun olduğundan bu çalışmada moleküler düzeyde mutasyon tiplerini saptayarak mutasyon haritasının çıkarılması amaçlandı.

Talaseminin moleküler tanımlanmasında farklı yöntemler kullanılmaktadır. Tüm dünyada yaygın olarak kullanılan dot-blot hibridizasyon yönteminde radyoaktif madde kullanılması ve uzun zaman almasına karşın bu çalışmada kullanılan ARMS yönteminde ise radyoaktif madde kullanılmaması ve deney süresinin kısa olması nedeniyle bu yöntem , dot-blot hibridizasyon yöntemine tercih edildi (8,17,26,35).

Çalışmada kullanılan 36 örneğin 26' sında 8 farklı β -Talasemi mutasyonu tespit edilmiştir (Tablo 20). Bu tabloya göre 36 örneğin 10'unun mutasyonu IVS-I-110 (G→A) β^+ , 1 'inin IVS-I-1 (G→A) β^0 , 4'ünün Cd 39(C→T) β^0 , 4 ' ünün IVS-I-6 (T→C) β^+ , 3'ünün IVS-II-1 (G→A) β^0 , 2'sinin IVS-II-745 (C→G) β^+ ,4'ünün Cd 8 (→A) β^0 , 1'inin -30 (T→A) β^+ olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda bulunan bu 8 mutasyon Akdeniz popülasyonlarına özgün mutasyonlar olup bunlar arasında en sık rastlananaı IVS-I-110' dur. Aksoy' un çalışmasında da belirtildiği gibi IVS-I-110 mutasyonu Türkiye'de en sık rastlanan mutasyondur. Yine Huisman Türkiye örnekleriyle yaptığı çalışmada IVS-I-110 mutasyonunun Türkiye'de % 38,7 sıklık ile en yaygın gözlenen mutasyon olduğunu göstermiştir (21). Başak ve arkadaşları çalışmalarında IVS-I-110 mutasyonunun, Türkiye'deki sıklığını % 42,2 olarak saptamışlar ve yine en sık rastlanan mutasyon olduğunu belirtmişlerdir (5). Öner ve arkadaşları IVS-I-110 mutasyonunun Türkiye'de sıklığını % 38,7 olarak bildirmişlerdir (42).

Çalışmamızda tespit ettiğimiz mutasyonların diğer çalışmalarla ilişkisi karşılaştırıldığında, % 27.8 olarak belirlenen IVS-I-110 (G→A) β^+ % 42.2 , % 2.8 olarak belirlenen IVS-I-1 (G→A) β^0 % 4.5, % 2.8 olarak belirlenen Cd 39(C→T) β^0

% 3.7, % 11.1 olarak belirlenen IVS-I-6 (T→C) β^+ % 10.0 , % 8.3 olarak belirlenen IVS-II-1 (G→A) β^0 % 3.5, % 5.5 olarak belirlenen IVS-II-745 (C→G) β^+ % 2.4, % 11.1 olarak belirlenen Cd 8 (→A) β^0 % 4.9, % 2.8 olarak belirlenen -30 (T→A) β^+ ise % 4.0 olarak belirtilmiştir (5) .

Bir ailenin iki ferdinden (kardeş) saflaştırılan DNA' larının amplifikasyonu sonucu IVS-I-110 olan mutasyonların diğer kollarının ise IVS-I-1 ve IVS-I-6 olduğu tespit edildi. (Tablo 2 de 4 nolu ve 21 nolu vakalarda)

Bunun yanında 10 hastada ise çalışmış olduğumuz mutasyonlardan hiçbirine rastlanmadı. Bu hastaların DNA ları ise DNA dizi analizi yapılmak üzere saklandı. Bu saklanan DNA'ların 5'i aynı aileye ait bireylere aitti. İlerde yapılacak bu aileye ait dizi analizi ile daha detaylı sonuçlara ulaşılabilecektir.

Akdeniz ülkelerinde de mutasyonların dağılımı farklı oranlardadır. Ülkemizde en sık görülen IVS-I-110 mutasyonu, Kıbrıs'ta % 69.9 , Yunanistan'da % 42.5 , Yugoslavya'da % 39.5 , Sicilya'da % 26.8 ve Bulgaristan'da ise % 24.2 oranında bulunmuştur. Sardinya ve Sicilya'da gözlenen en sık mutasyon ise Cd 39'dur. Sardinya'da bu mutasyon % 95.4 Sicilya'da ise % 36.1'dir (24,42) .

Türkiye örnekleriyle yapılan tüm çalışmalara bakıldığında ise görüleceği gibi IVS-I-110 mutasyonu diğer bir çok Akdeniz ülkesinde olduğu gibi en sık rastlanan mutasyon tipidir (5,42).

Huisman'ın 14 farklı mutasyon tipi kullanarak yaptığı çalışmada, Türkiye'de mutasyonu saptanamayan örneklerin oranının yüksek olduğunu (% 8.3) bildirmiştir. Yine Başak ve arkadaşları Türkiye'den topladıkları örnekleri 17 farklı mutasyon ile taradıklarında, örneklerden % 14.2'sinin mutasyonunu tespit edememişlerdir. Bu sonuçlara göre beta talasemi mutasyonları açısından ülkemizin belirli bir heterojenlik gösterdiği görülmektedir. (5,24,42).

Bu alışma neticesinde elde edilen veriler yardımıyla Diyarbakır bölgesinde Beta talasemi hasta ve taşıyıcılarında, Prenatal tanı çalışmaları kolaylaşacak ve ilerde yapılacak talasemi araştırmalarına ışık tutacağı kanaatindeyiz. Sonuç olarak bu güne kadar bölgemizde, beta talasemi mutasyonlarının sık görülen 8 ' i ile ilgili mutasyonlar bu çalışma ile aydınlatılmış oldu.



DİYARBAKIR BÖLGESİNDE BETA TALASEMİ MUTASYONLARININ MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE İNCELENMESİ

ÖZET

Diyarbakır bölgesindeki Beta talasemi mutasyonlarını belirlemek amacıyla Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Hematoloji ve Çocuk Hastalıkları Kliniğine gelen 36 kontrol hastasından kan örneği toplandı.

Çalışmamızda 36 beta talasemi majorlu kontrol hastalarından alınan örnekler moleküler yöntemlerle (Amplification Refractory Mutation System) analiz edildi. Transfüzyona bağımlı olan bu hastalarda 8 farklı beta talasemi mutasyonu çalışıldı. Bu mutasyonların tamamı akdeniz ülkelerine özgü olup; bunların % 27.8'inin IVS-I-110 (G→A) β⁺, % 2.8'inin IVS-I-1 (G→A) β⁰, % 2.8'inin Cd 39(C→T) β⁰, % 11.1'inin IVS-I-6 (T→C) β⁺, % 8.3'ünün IVS-II-1 (G→A) β⁰, % 5.5'inin IVS-II-745 (C→G) β⁺, % 11.1'inin Cd 8 (→A) β⁰, % 2.8'inin -30 (T→A) β⁺ olduğu tespit edildi. Doğu Asya ülkelerinde belirlenen -30 (T→A) β⁺ mutasyonu ise % 2.8 oranında bulundu. Bunlardan 10 tanesi ise bilinmeyen mutasyonlar olup toplamın % 27.8 ini oluşturmaktadır.

Diyarbakır bölgesinde ise bugüne kadar Beta talasemi hastalarının mutasyonlarının moleküler düzeyde incelenmemiş olması ve bu konu hakkında herhangi bir bilginin olmaması bizim bu hastalığın bölgemizdeki dağılımını belirlemeye yönlendirmiştir. Toplumsal bir etkiye sahip olan beta talaseminin mutasyonlarının belirlenmesi amacıyla yaptığımız bu çalışmanın, bölgemizdeki mutasyonların tespiti ile mutasyon haritasının çıkarılmasına, dünya talasemi mutasyon haritasının tamamlanmasına ve bununla beraber yöredeki prenatal tanı çalışmalarını kolaylaştıracağı ve sonuç olarak sağlıklı bireylerin dünyaya getirilmesi için yapılacak çalışmalara ışık tutacağına inanmaktayız.

DETECTION OF BETA THALASSEMIA MUTATIONS WITH MOLECULAR TECHNIQUES IN DIYARBAKIR REGION

SUMMARY

We have collected 36 blood samples from the patients of Dicle University Faculty of Medicine department of haematology and pediatrics in order to research for Beta Thalassemiias mutations. Beta Thalassemia mutations in our region were not determined previously.

In our study 36 blood samples from patients with Beta thalassemia major have been analysed with molecular methods (Amplification Refractory Mutation System). Eight different mutations were determined. All of the mutations were specific to Mediterranean country and of those: IVS-I-110 (G→A) β^+ 27.8 %, IVS-I-1 (G→A) β^0 2.8 %, Cd 39(C→T) β^0 2.8 %, IVS-I-6 (T→C) β^+ 11.1 %, IVS-II-1 (G→A) β^0 8.3 %, IVS-II-745 (C→G) β^+ 5.5 %, Cd 8 (→A) β^0 11.1 %, -30 (T→A) β^+ 2.8 %. The mutation of -30 (T→A) β^+ which is found specific to East Asian countries was found 2.8 %. Ten of them were classified as unknown mutations and rate was 27.8 %.

A study like this has never been done and we have no knowledge about it in our region. This reason guided us to determine the dispersion of beta thalassemia in Diyarbakir region. We hope that this study will help making the Beta-Thalassemiias chart of Turkey and the World.

KAYNAKLAR

1. Adams JG, Coelaman MB: Structural Hemohlobin Variants that produce the Phenotype of Thalassemia. *Senin Hematol* 27: 229-238, 1990
2. Arcasoy A: Türkiye'de Talasemi Taşıyıcı Sıklığı. *Ankara Talasemi Deneği* 1994.
3. Altay C, Yilgör E, Beksac S, Gürgey A: Premarital Screening of Hemoglobinopathies: A pilot Study in Turkey. *Hum Hered* 46: 112-114, 1996.
4. Altay C, Öner C, Öner R, Mesci L, Balkan H, Tüzmen S, Başak AN, Gümrük F, Gürgey A: Genotype-Phenotype Analysis in HbS-Beta-Thalassemia. *Hum Hered* 47: 161-164, 1997.
5. Başak AN, Özçelik H, Özer A, Tolun A, Aksoy M, Ağaoğlu L, Ridolfi F, Ulukutlu L, Akar N, Gürgey A, Kırdar B: The Molecular Basis of β -Thalassemia in Turkey. *Hum Genet* 89: 315-318, 1992.
6. Bouhass R, Augercif M, Trabuchet G, Godet J: A new Mutation at IVS1 nt 2 (T-A), in β -Thalassemia from Algeria. *Blood* 76: 1054-1055, 1990.
7. Cai SP, Eng B, Francombe WH, Olivieri NF, Kendall AG, Wayne JS, Chui DHK: Two Novel β -Thalassemia Mutations in the 5' and 3' Noncoding Regions of β -Globin Gene. *Blood* 79: 1342-1346, 1992.
8. Camaschella C, Alfarano A, Gottardi E, Serra A, Revello D, Saglio G: The Homozygous State for the -87 C-G β^+ Thalassemia. *Br J Haematol* 75: 132-138, 1990.
9. Cao A, Gossens M, Pirastu M: β -Thalassemia Mutations in Meditarrenaeen Populations. *Br J Haematol* 71: 309-312, 1989.

10. Çürük MA, Yüreğir GT, Asadov CD, Dadasova T, Gu LH, Baysal E, Gu YC, Ribeiro MLS, Huisman THJ: Molecular Characterization of β -Thalassemia in Azerbaijan. Hum Genet 90: 417-419, 1992.
11. Çürük MA: Azerbeycan Türklerin'de Beta Talaseminin DNA ve Globin Zincir Analizi İle Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı Adana 1994.
12. Deidda G, Novelletto A, Hafez M, El-Ziny M, Terranato L, Felicetti L: A New β -Thalassemia Frameshift Mutation Detected by PCR After Selective Hybridization to Immobilized Oligonucleotides. Br J Haematol 79: 90-92, 1991.
13. Dimowski A, Efrenow DG, Jankovic L, Juricic D, Zisovski N, Stojanovski N, Nikolov N, Petkov GT, Reese AL, Stoming TA, Efremow GD, Huisman THJ: β -Thalassemia in Yugoslavia: Hemoglobin: 15-24, 1990.
14. Fucharoen S, Katsube T, Fucharoen G, Sawady H, Oishi H, Katsuno M, Nishimura J, Motomura S, Miura Y, Fukumaki Y: Molecular Heterogeneity of β -Thalassemia in the Japanese: Identification of Two Novel Mutations. Br J Haematol 74: 101-107, 1990.
15. Fucharoen S, Kobayashi Y, Fucharoen G, Ohba Y, Niyazono K, Fukumaki Y, Takaku F: A Single Nucleotide Deletion in Codon 123 of the β -Globin Gene Causes an Inclusion Body β -Thalassemia Trait: A Novel Elongated Globin Chain β^{Makabe} . Br J Haematol 75: 393-399, 1990.
16. Gonzales-Redondo JM, Kattamis C, Huisman THJ: Characterization of Three Types of β^0 -Thalassemia Resulting From a Partial Deletion of the β - Globin Gene. Hemoglobin 13: 377-392, 1989.
17. Gonzales-Redondo JM, Stoming TA, Kutlar A, Kutlar F, Lanclos KD, Howard EF, Fei YJ, Aksoy M, Altay Ç, Gürgey A, Başak AN, Efremow GD, Petkov G,

- Huisman THJ: A C-T Substitution at nt -101 in a Conserved DNA Sequences of the Promotor Region of the β - Globin Gene in Associated With " Silent " β -Thalassemia. Blood 73: 1705-1711, 1989.
18. Gürgey A: Talasemi ve Hemoglobinopatilerde yeni Görüşler. TÜBİTAK Tıp Araştırma Gurubu TAG 1986.
19. Gürgey A, MD, Beksaç S, MD, Gümrük F, MD, Çakar N, PhD, Mesçi L, BS, Altay S, BS, Öner C, PhD, Altay Ç: Prenatal Diagnosis of Hemoglobinopathies in Turkey. Pediatric Hematology and oncology 13: 163-166, 1996.
20. Huang SZ, Zhou XD, Ren ZR, Zeng YT,: Detection of the β -Thalassemia Mutations in the Chinese Using Amplified DNA from Dried Blood Specimens. Hum Genet 84: 129-131, 1990.
21. Huisman THJ: The β^+ and δ Thalassemia Repository Hemoglobin 16: 237- 259, 1992.
22. Huisman THJ: Frequencies of Common β Thalassemia Alleles Among Different Populations: Variability in Clinical Severity. Br J Haematol 75: 454-457, 1990
23. Huisman THJ: β -Thalassemia in Four Meditarrenae Countries: An Editorial Commentary. Hemoglobin 14: 35-39, 1990.
24. Humpries RK, Ley TJ, Anagnou NP, Baur AW, Nienhuis AW: β^0 -39 Thalassemia Gene: A Premature Termination Codon Causes β -mRNA Deficiency without Affecting Cytoplasmic β -mRNA Stability. Blood 64: 23-32, 1994.
25. Jankovic L, Efremow GD, Petkov G, Kattamis C, George E, Yang KG, Stoming TA, Huisman THJ: Two Novel Polyadenylation Mutation Leading to β -Thalassemia . Br J Haematol 75, 122-126, 1990.

26. Kaplan F, Kokotsis G, DeBraekeleer M, Morgan K, Scriver CR: β -Thalassemia Genes in French – Canadians: Haplotype and Mitation Analysis of Portneuf Chromosomes. *Am J Hum Genet* 46: 126-132, 1990
27. Kattamis C, Hu H, Cheng G, Reese AL, Gonzales-Redondo JM, Kutlar A, Kutlar F, Huisman THJ: Molecular Characterization of β -Thalassemia in 174 Greek Patients with Talassemia Major. *Br J Haematol* 74: 342-346, 1990.
28. Kayrın L, Aksoy K, Tuli A, Çürük MA, Attila G: Tanıda DNA Teknikleri Çukurova Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana 1999.
29. Kazazian HHJr, Boehm CD: Molecular Basis and Prenatal Diagnosis of β -Thalassemia. *Blood* 72: 1107-1113, 1988.
30. Kogan SC, Doherty M, Gitschier J: An Improved Method for Prenatal Diagnosis of Genetic Diseases by Analysis of Amplified DNA Sequences. *N Eng J Med* 317: 985-990, 1987.
31. Kutlar A: The Thalassemia Repository, *Hemoglobin* 11: 93-109, 1987.
32. Lie-Injo LE, Cai SP, Wahidiyat I, Moeslichan S, Lim ML, Evagelista L, Doherty M, Kan YW: β -Thalassemia Mutations In Indonesia and Their Linkage to β Haplotypes *Am J Hum Genet* 45: 971-975, 1989.
33. Lindeman R, Hu SP, Volpato F, Trent RJ: Polymerase Chain Reaction Mutagenesis Enabling Rapid Non-Radioactive Detection of Common β -Thalassemia Mutations in Meditarrenaens. *Br J Haematol* 76: 100-104, 1991
34. Losekoot M, Fodde R, Harteveld CL, Haeren HV, Giardano PC, Bernini LF: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Direct Sequencing of PCR Amplified Genomic DNA: A Rapid and Reliable Diagnostic Approach to β -Thalassemia. *Br J Haematol* 76: 269-274, 1990.

35. Newton CR, Graham A, Heptinsal LE, Powell SJ, Summer C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF : Analysis of Any Point Mutation in DNA. The Amplification Refractory Mutation System (ARMS) . *Nucleic Acids Res* 17: 2503-2515, 1989.
36. Nienhuis-AW, Nicholas P, Anagnau J, Timoty J: *Advances in Thalassemia Research: A review Blood* 63: 738-749, 1984.
37. Nisli G, et al: β -Thalassemia Alleles in Aegean Region of Turkey: Effect on Clinical Severity of Disease. *Pediatr Hematol Oncol* 14: 59-65, 1997.
38. Öner R, Altay Ç, Gürgey A, Aksoy M, Kılınç Y, Stomig TA, Reese AL, Kutlar A, Kutlar F, Huisman THJ: β -Thalassemia in Turkey. *Hemoglobin* 14: 1-13, 1990.
39. Öner R, Öner C, Erdem G, Balkan H, Özdağ H, Erkan M, Gümrük F, Gürgey A, Altay Ç : A Novel (δ β)⁰-Thalassemia Due to Approximately 30-kb Deletion Observed in a Turkish Family. *Acta Haematol* 96: 232-238, 1996.
40. Öner C, Öner R, Balkan H, Gürgey A, Yalçın F, Altay Ç: Molecular Analysis of the Turkish form of Deletion-Inversion (δ β)⁰ Thalassemia. *Br J Haematol* 96: 229-234, 1997.
41. Ristaldi MS, Morru S, Loudianos G, Casula L, Porcu S, Pigheddu D, Fanni B, Sciarratta GV, Agosti S, Parodi MI, Leone D, Camaschella C, Serra A, Pirastu M: The C-T Substitution in the Distal CACCC Box of β -Globin Gene Promotor is a Common Cause of Silent β -Thalassemia in The Italian Population . *Br J Haematol* 74: 480-486, 1990.
42. 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* 79: 238-243, 1992.

43. Singer K, Chernof AA, Singer L: Studies on Abnormal Hemoglobins I. Alkali Denaturation. Blood 6: 413-424, 1991.
44. Tadmouri GO, et al: Rare β -Thalassemia Mutation in a Turkish Patient: FSC – 36/37 (-T). Hum Biol 69:263-7, 1997.
45. 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 47: 369-375. 1990.
46. Tuzmen S, Tadmuri OG, Özer A, Baig SM, Özçelik H, Başaran S, Başak N: Prenatal Diagnosis of β -Thalassemia and Sickle Cell Anemia in Turkey. Prenat Diagn 16: 252-8, 1996.
47. Tüzmen S: Rare β -Thalassemia Mutations IVS-II-848 (C-A) First Reported in a Turkish Cypriot Family. Am J Hematol 54: 338-9, 1997.
48. Vetter B, et al. β -Thalassemia in The Imigrant and Non-Imigrant German Populations. Br J Haematol. 97: 266-72, 1997.
49. Varawalla NY, Old JM, Sarkar R, Venkatesn R, Weatherall DJ: The Spectrum of β -Thalassemia Prenatal Disgnosis. Br J Haematol 78: 242-247, 1991.
50. Varawalla NY, Dokras A, Old JM, Sargent IL, Barlow H: An Approach To Preimplantation Diagnosis of Beta Thalassemia. Prenatal Diagnosis 11: 775-785, 1991.
51. VW Rodwel, Murray RK, Granner DK, Mayes PA: Harper's Biochemistry. Lebanon, 326, 1988.
52. Weatherall DJ: The New Genetics and clinical Practice . Oxford University press, New York, 1991.
53. Willard HF, Thomoson M, Mcinnes RR: Genetics in Medicine. B Saunders Comp Philadelphia, 247-270, 1991.
54. Yüreğir GT: Temel Biyokimya II, Kemal Matbaası, Adana, 1983.