

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**HATAY İLİNDE BETA TALASEMİ MUTASYONLARI
DAĞILIMININ DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Naciye ERYILMAZ**

Danışman
Doç. Dr. Nizami DURAN
Doç. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR

HATAY-2012

**T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI**

**HATAY İLİNDE BETA TALASEMİ MUTASYONLARI
DAĞILIMININ DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Naciye ERYILMAZ**

**Danışman
Doç. Dr. Nizami DURAN
Doç. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR**

Bu tez, Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
1103Y0118 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2012

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ VE GENETİK ANABİLİM DALI

HATAY İLİNDE BETA TALASEMİ MUTASYONLARI
DAĞILIMININ DNA DİZİ ANALİZİ YÖNTEMİYLE
ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Naciye ERYILMAZ

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 17/10/ 2012 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oyçokluğu/oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri başkanı: Prof Dr Hasan KAYA
Üye :Doç Dr Ramazan GÜNEŞAÇAR
Üye : Doç Dr Nizami DURAN
Üye : Doç Dr Gülnaz ÇULHA
Üye : Doç Dr Cemil TÜMER

Bu tez, Enstitümüz Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında hazırlanmıştır.

Enstitü Müdürü

Prof Dr İbrahim KÜRTÜL

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan; tez konumun seçilmesinde, yürütülmesinde ve yazımında yardımlarını benden esirgemeyen değerli hocalarım Doç. Dr. Ramazan GÜNEŞAÇAR ve Doç. Dr. Nizami DURAN'a,

Eğitimim ve çalışma sürem boyunca birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm laboratuvar arkadaşlarıma,

Tüm hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini benden esirgemeyen; iyi ve kötü günlerimde bir an olsun beni yalnız bırakmayan sevgili annem Vidat ERYILMAZ, babam Turgut ERYILMAZ'a; kardeşlerim Mehmet Ali ERYILMAZ, Çağla ÇAVUŞ, Hüsamettin ÇAVUŞ ve canım yeğenim Güldeniz Ada ÇAVUŞ'a,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birçok güzel anıya sahip olmama vesile olan sevgili arkadaşlarım Hayat ASLAN, Esra KARAYİĞİT, Cansu ÖNLEN, Burcu GÜLKAN, Saadet Merve OCAK ve arkadaşlığının yanında tezimin laboratuvar aşamalarında yardımlarını eksik etmeyen Başak YAVUZ'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	4
2.1.Hemoglobinin Yapısı ve İşlevi.....	4
2.2.Hemoglobin Fenotipi.....	6
2.3. Globin Gen Aileleri.....	7
2.3.1. Alfa Globin Gen Ailesi	8
2.3.2. Beta Globin Gen Ailesi.....	10
2.4. Eritropoez ve Globin Gen Düzenlenmesi.....	11
2.4.1. Eritropoez	11
2.4.2. Globin Gen Düzenlenmesi	13
2.5. Beta Talaseminin Klinik Fenotipleri	16
2.5.1. Beta Talasemi Majör	16
2.5.2. Beta Talasemi İntermedia.....	17
2.6. Beta Talaseminin Epidemiyolojisi	19
2.7. Beta Talaseminin Patofizyolojisi	21
2.8. Beta Talaseminin Moleküler Temelleri.....	23
2.8.1. Promotor ve 5' UTR Bölgelerindeki Mutasyonlar.....	24
2.8.2. mRNA İşlenmesini Etkileyen Mutasyonlar	25
2.8.3. Anormal mRNA Translasyonuna Neden Olan Mutasyonlar	25
2.8.4. Delesyonel Beta Talasemi Allelleri.....	26
2.8.5. Dominant Beta Talasemi ve Unstabil Beta Globin Zincirlerine Neden Olan Mutasyonlar.....	27
2.9. Türkiye'de Görülen Beta Talasemi Mutasyonları.....	28

2.10. Beta Talaseminin Tanı Yöntemleri	33
2.10.1 Klinik Tanı	33
2.10.2. Hematolojik Tanı.....	33
2.10.3. Periferel Kan Yayması	33
2.10.4. Hemoglobin Analizi	34
2.10.5. Moleküler Tanı.....	34
2.11. Tedavi.....	35
2.12. Korunma.....	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. Araç ve Gereçler.....	36
3.1.1 Araçlar	36
3.1.2. Kimyasal Maddeler	37
3.2. Örnekelerin Toplanması ve Hematolojik Analizi	37
3.3. Yöntemler.....	39
3.3.1 Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması	39
3.4. DNA İzolasyonu.....	40
3.5. Spektrofotometrik Yöntemle DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi.....	41
3.6. PCR Reaksiyonlarının Hazırlanması ve PCR Amplifikasyonu	42
3.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Tekniği ile Görüntülenmesi	44
3.8. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu	45
3.9. Dizi Analizi Reaksiyonunun Hazırlanması	46
3.10. Dizi Analizi Ürünlerinin Saflaştırılması	49
3.11. Dizi Analizi İşleminin Uygulanması.....	50
3.12. Sonuçların Yorumlanması.....	51
4. BULGULAR.....	52
5. TARTIŞMA.....	62
6. SONUÇ	73
7. KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	79

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Erişkin hemoglobin molekülünün şematik görünümü	5
Şekil 2.2. İnsan globin proteinlerinin evrimsel diyagramı	6
Şekil 2.3. β -globin gen ailesi(A), α -globin gen ailesi(B)	8
Şekil 2.4. İnsan alfa globin gen ailesi	9
Şekil 2.5. İnsan α -geninin yapısı	9
Şekil 2.6. β -globin gen ailesi, LCR bölgesi ve gelişim sırasına göre globin gen ekspresyonu	10
Şekil 2.7. İnsan β -globin geninin yapısı	11
Şekil 2.8. Embriyonik ve fetal gelişimin farklı evrelerinde globin zincir sentezi	13
Şekil 2.9. Globin gen değişiminin(switching) düzenlenmesi	14
Şekil 2.10. α ve β -globin gen ailelerinin düzenleyici bölgeleri	15
Şekil 2.11. Talasemilerin dünya yayılımı	20
Şekil 2.12. Beta talaseminin patofizyolojisi	22
Şekil 2.13. Beta talaseminin patofizyolojisi	23
Şekil 2.14. Beta talasemiye neden olan nokta mutasyonlarının sınıflandırılmaları	24
Şekil 2.15. Beta globin geninin ve komşu DNA'nın β^0 talasemi ile ilişkili delesyonları ...	27
Şekil.3.1. Tam kan sayım cihazı	38
Şekil 3.2. PCR ürünlerinin yürütüldüğü elektroforez ünitesi	45
Şekil 3.3. Thermal cycler cihazı	48
Şekil 3.4. Sekans analizi ürünlerinin pürifikasyonunda kullanılan kolonlu tüpler	49
Şekil 3.5. Saflaştırılan sekans ürünleri ile ürünlerin dizi analizi cihazına aktarıldığı plate.	50
Şekil 3.6. Dizi analizi cihazı	51
Şekil 4.1. Heterozigot IVS-I-110 mutasyonunun elektroferogramı	58
Şekil 4.2. Homozigot IVS-I-1 mutasyonunun elektroferogramı	59
Şekil 4.3. Homozigot Kodon 17 mutasyonunun elektroferogramı	59
Şekil 4.4. Heterozigot Kodon 98 mutasyonunun elektroferogramı	60
Şekil 4.5. Heterozigot Kodon 126 mutasyonunun elektroferogramı	61

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Hemoglobin fenotipleri	7
Çizelge 2.2. Beta talaseminin fenotip ve genotipleri ile klinik bulguları	19
Çizelge 2.3. Türkiye’de görülen β -talasemi mutasyonları	28
Çizelge 4.1. Hastaların ilçelere göre dağılımı	52
Çizelge 4.2. Hastaların fenotip dağılımları.....	53
Çizelge 4.3. Majör fenotipli hastaların hemogram sonuçları	53
Çizelge 4.4. İntermedia fenotipli hastaların hemogram sonuçları.....	54
Çizelge 4.5. Minör fenotipli hastaların hemogram sonuçları	54
Çizelge 4.6. Tüm hastaların hemogram sonuçları	55
Çizelge 4.7. Tüm bireylerin mutasyon dağılımı ve allel sıklığı	56
Çizelge 4.8. İlçelere göre mutasyon dağılımları.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Alfa
β	: Beta
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
γ	: Gama
$G\gamma$: Gama G
$A\gamma$: Gama A
μ l	: Mikrolitre
ζ	: Zeta
3' UTR	: 3' kodlanmayan bölge
5' UTR	: 5' kodlanmayan bölge
bp	: Baz çifti
Hb	: Hemoglobin
HCT	: Hematokrit
IVS	: İntron
Kb	: Kilobaz
MCH	: Ortalama eritrosit hemoglobini
MCHC	: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Plt	: Trombosit
RBC	: Eritrosit
RDW	: Eritrosit dağılım genişliği
WBC	: Lökosit

ÖZET

Hatay İlinde Beta Talasemi Mutasyonları Dağılımının DNA Dizi Analizi Yöntemiyle Araştırılması

Beta talasemi beta globin zincir sentezinin azalması veya yokluğu ile karakterize yaygın bir genetik hastalıktır. Beta talasemi Türkiye’de en yaygın kalıtsal hastalıklardan biridir. Bu çalışma Türkiye’nin Hatay bölgesindeki mutasyonları ve mutasyonların frekanslarını tespit etmek için planlanmıştır. Çalışmaya 30 beta talasemi majör, 65 beta talasemi intermedia ve 42 beta talasemi minör hastasını kapsayan toplam 137 hasta dahil edilmiştir. Hematolojik parametreler ölçülmüş ve mutasyonlar günümüzün en hassas yöntemi olan DNA dizi analizi yöntemiyle tespit edilmiştir. Çalışmamızda Türkiye’de ilk kez gösterilen, Kodon 98 G>A (Hb Köln) ve Kodon 126 T>C (Hb Beirut) isimli 2 mutasyonun da dahil olduğu 19 mutasyon tanımlanmıştır: IVS-I-110 (G>A, %22.63), IVS-I-1 (G>A, %13.14), IVS-II-745 (C>G,10.58), IVS-I-6 (T>C, %10.22), Kodon 8 (-AA, %6.93), Kodon 39 (C>T, %4.74), Kodon 5 (-CT, %3.28), Kodon 44 (-C, %2.92), IVS-II-1 (G>A, %2.19), IVS-II-848 (C>A, %2.19), IVS-I-5 (G>C, %1.46), IVS-I-130 (G>C, %0.73), Kodon 17 (A>T, %0.73), Kodon 22/23/24 (-AAGTTGG, %0.73), Kodon 126 (Hb Beirut, %0.73), Kodon 98 (GTG->ATG, Hb Köln, %0.36), Kodon 90 (G>T, %0.36). Sonuçlarımızdan da anlaşılacağı üzere, Türkiye beta talasemi mutasyonları açısından heterojen olduğu için sınırlı sayıda mutasyon tarayan moleküler yöntemler ülkemiz için uygun değildir. Bu nedenle gerek prenatal gerekse postnatal beta talasemi tanısında DNA dizi analizi yönteminin uygulanmasını önermekteyiz. Ülkemizde nadir görülen ve hemoglobinopatiye neden olan mutasyonların tespiti henüz yetersiz olan ulusal hemoglobinopati varyantları veri tabanının oluşturulmasına katkı sağlayabilir ve genetik danışmada karar verme sürecinde yol gösterici olabilir. Bu tez çalışması ile, Hatay bölgesinde beta talasemi mutasyon sıklığı ilk kez DNA dizi analizi yöntemiyle tespit edilmiştir. Bölgemizdeki beta talasemi mutasyonlarının tespitinin Türkiye’nin mutasyon haritasının oluşturulmasına yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Beta talasemi, mutasyon, DNA sekans analizi tekniği, Hatay.

ABSTRACT

Investigation of Beta Thalassemia Mutations in Hatay Region by DNA Sequencing Technique

Beta thalassemia is a common genetic disorder characterized by reduced or absent of beta globin chain synthesis. Beta thalassemia is one of the most common hereditary disorder in Turkey. This study was planned to determine the frequency of beta thalassemia mutations in Hatay region of Turkey. A total of 30 beta thalassemia major, 65 beta thalassemia intermedia and 42 beta thalassemia minor patients were included to the study. Hematological parameters of all patients were analyzed. To determine the mutations in thalassemia were evaluated by DNA sequencing technique. In this study, a total of 19 different mutations were identified. Among these mutations, Codon 98 G>A (Hb Koln) and Codon 126 T>C (Hb Beirut) have been reported for the first time with this study in Turkey: IVS-I-110 (G>A, %22.63), IVS-I-1 (G>A, %13.14), IVS-II-745 (C>G,10.58), IVS-I-6 (T>C, %10.22), Codon 8 (-AA, %6.93), Codon 39 (C>T, %4.74), Codon 5 (-CT, %3.28), Codon 44 (-C, %2.92), IVS-II-1 (G>A, %2.19), IVS-II-848 (C>A, %2.19), IVS-I-5 (G>C, %1.46), IVS-I-130 (G>C, %0.73), Codon 17 (A>T, %0.73), Codon 22/23/24 (-AAGTTGG, %0.73), Codon 126 (Hb Beirut, %0.73), Codon 98 (GTG->ATG, Hb Koln, %0.36), Codon 90 (G>T, %0.36). As seen in our results, Turkey has shown to be heterogeneity in terms of beta thalassemia mutations. For this reason, to determined the beta thalassemia mutations in Turkey should not be used the techniques which can be scan the limited numbers of mutations. Therefore, the DNA sequencing technique is suggested for both prenatal and postnatal diagnosis of the beta thalassemia. The determination of rarely mutations leading to haemoglobinopathy can be supported to a data base of hemoglobinopathy variants in Turkey. Also, it can be useful for the genetic counseling. In this study, the frequency of beta thalassemia mutations in Hatay region was determined by DNA sequencing analysis method. We think that the determination of the these kinds of new mutations in beta thalassemia can be helpful to generate the mutation map of Turkey.

Key words: Beta thalassemia, mutation, DNA sequencing technique, Hatay.

1. GİRİŞ

Talasemi Yunanca “Thalassa”(deniz), “Haima” (anemi) kelimelerinden oluşan Akdeniz anemisi hastalığıdır. Hastalık Akdenize kıyısı olan ülkelerde sık görüldüğünden bu isimle anılmakta ve Akdenize kıyısı olan ülkelerde yaygın olarak görülse de dünya üzerinde nüfus hareketleri sebebiyle son yıllarda hastalığın dünyanın birçok ülkesinde görüldüğü bildirilmektedir. Dünyada Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 250 milyondan fazla talasemi hastasının olduğu tahmin edilmektedir.

Talasemi 1 yaşından küçük çocuklarda solukluk, dalak büyümesi, gelişme bozukluğu ile kendini gösteren daha sonraları yüz kemiklerinde değişimler, demir birikimine bağlı olarak multi organ (kalp, karaciğer, pankreas gibi) bozukluklarıyla karakterize kalıtsal bir hastalıktır (Galanello ve Origa 2010).

Dünya nüfusunun yaklaşık %7'sinin Hb hastalıkları açısından taşıyıcı olduğu ve her yıl 300.000- 500.000 yenidoğanda bu hastalıkların çeşitli formlarının görüldüğü tespit edilmektedir. Sosyo-ekonomik düzeyi düşük veya orta olan ülkelerde her yıl orak hücre anemili çocukların %50-80'inin öldüğü bildirilirken, Beta talasemi hastalığı sebebiyle ise dünyada her yıl 50.000- 100.000 çocuğun öldüğü bildirilmektedir (WHO 2006). Beta talaseminin dünya üzerinde en sık görüldüğü ülkeler arasında Türkiye'nin de içinde bulunduğu özellikle Akdenize kıyısı olan ülkeler başta olmak üzere, Afrika'da, Orta Doğu'da, Hint bölgesi ve Burma'da, Güneydoğu Asya'da ve Endonezya'da yaygındır (Altay 2002). Türkiye'nin güney illeri özellikle Hatay Beta talaseminin en sık görüldüğü şehirlerden biridir. Çukurova bölgesindeki diğer iki şehir olan Adana ve Mersin de yüksek Beta talasemi oranlarına sahiptir. Türkiye'de hastalığın sık görüldüğü illerde Beta talasemi frekansının yaklaşık %4.3 olduğu, hatta bu kentlerde bazı bölgelerde bu oranın %10-13'lere çıktığı bildirilmektedir (Altay 2002, Acemoğlu ve ark. 2008). Ülkemizde doğum hızının yüksek ve akraba evliliklerinin sık olması hastalığın insidansının artmasına katkı sağlayan en önemli faktör olarak bilinmektedir. Hastalık asemptomatik olan talasemi minör, hafif seyirli Beta talasemi intermedia ile transfüzyona bağımlı bir yaşamı gerektiren Beta talasemi majör arasında seyreden klinik tablolar şeklinde kendini gösterebilmektedir.

Beta talasemi dünya genelindeki en yaygın kalıtsal hastalıklar arasında yer alır. Hemoglobinopatiler Beta talaseminin de içinde bulunduğu hemoglobin molekülünün globin zincirlerinin birinin anormal yapısına neden olan genetik defektlerdir. Beta talasemi dünya genelinde yaygın olarak görülen hemoglobinin globin zincirinin azalmış sentezi veya yokluğu ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Beta talasemi, beta globin zincir sentezinin azalmasına (β^+ tip) veya yokluğuna (β^0 tip) neden olan mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (Cao ve Galanello 2010, Galanello ve Origa 2010).

Beta talasemide hastalığın ağır klinik formlarıyla ilişkili olan mutasyonların büyük delesyonlardan ziyade nokta mutasyonlarının sorumlu olduğu bilinmektedir. Özellikle PCR ve moleküler tabanlı yöntemlerin kullanıma girmesinden sonra hastalıkla ilgili çok sayıda mutasyon tanımlanmaya başlanılmıştır. Dünya genelinde 200'ün üzerinde mutasyon tanımlanmış olup her geçen gün bu mutasyonların sayısının değiştiği de bilinmektedir (Weatherall 2004). Hastalıkta mutasyon tiplerinin etnik gruplara göre de farklılıklar gösterebileceği bildirilmiştir. Genellikle toplumlarda görülen mutasyonların az bir kısmının tüm mutasyonların %80-90'lık kısmını oluşturduğu bildirilirken, ülkemizde özellikle Akdeniz bölgesinde yer alan illerde yaşayan hastalarda Beta talasemi mutasyonlarının komplete olduğu bildirilmiştir.

Beta talasemi mutasyon tiplerinin sıklığı ve yaygınlığı ülkeden ülkeye, hatta bölgeden bölgeye değişebilmektedir. Beta talaseminin sık görüldüğü ülkelerden İtalya, Yunanistan ve Cezayir'de talasemi frekansının %2-5 arasında değiştiği bildirilirken, İtalya'nın güneyinde en sık görülen mutasyonun IVS-I-110 (%34.5) ve kodon 39 (% 34.5) mutasyonları olduğu tespit edilirken (Rigoli ve ark. 2001), Yunanistan ve Cezayir'de IVS-I-110 (G>A) mutasyonu en sık rastlanılan mutasyonlar olarak bildirilmiştir (Boudrahem-Addour ve ark. 2009, Georgiou ve ark. 2003). Ülkemizde ise Beta talaseminin sıklığının %2 dolaylarında olduğu bildirilirken, Beta talasemi taşıyıcı sayısının yaklaşık 1.300.000 ve bu hastalıktan etkilenen hasta sayısının ise 4.000 dolaylarında olduğu bilinmektedir (Altay 2002, Başak 2007). Günümüze kadar yapılan çalışmalarda ülkemizde 40'a yakın Beta talasemi mutasyonunun olup en yüksek Beta talasemi frekansının ve mutasyon tiplerinin Türkiye'nin güney ve güneybatısında tespit edildiği bildirilmiştir. Ülkemizde en yaygın Beta talasemi mutasyonunun IVS-I-110 (G>A) mutasyonu olduğu bildirilmiştir. Hatay bölgesinin Beta talasemi hastalarında daha önce mutasyon analizi yapılmadığı için bölgemize ait mutasyon tipleri ve sıklığına ilişkin bir veri bulunmamaktadır.

Bu alışmada Hatay bölgesinde Antakya merkez dahil olmak üzere toplam 11 ilçeyi kapsayan  merkezden (MK, Antakya Devlet Hastanesi, İskenderun Doğum ve ocuk Bakım Hastanesi) talasemi hasta ve taşıyıcılarından tam kan örnekleri alınarak genomik DNA izolasyonları yapıldıktan sonra DNA dizi analizi yöntemiyle mutasyon analizleri yapılmıştır. Talasemi mutasyonlarının araştırıldığı bölgemizde ilk defa tüm ilçelerden hastaların dahil edildiği bu kapsamlı çalışma gerek ülkemiz ve gerekse de dünya literatürüne bu konuda yapılan çalışmalar için katkı sağlayacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

Talasemi ilk defa 1925 yılında Cooley ve Lee tarafından tanımlanmıştır. İlk yıllarda hastalık sadece Akdeniz ve çevresinde görüldüğünden Yunanca *thalassa* (deniz) ve *haima* (kan) kelimelerinden oluşan talasemi adı verilmiştir (Neel ve Valentine 1947).

Talasemi oluşmasına neden olan etmen, eritrositlerde bulunan “**hemoglobin**” molekülünün yapısındaki bozukluktur.

2.1. Hemoglobinin Yapısı ve İşlevi

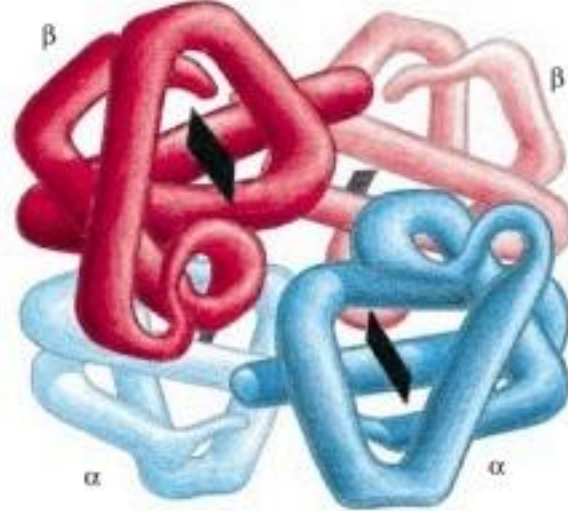
Hemoglobin eritrositler içinde bulunan yaklaşık olarak 64.500 dalton ağırlığında bir moleküldür. Her bir eritrosit hücresinde 300 milyon kadar hemoglobin molekülü bulunduğu bildirilmiştir (Gur 1997). Hemoglobinlerin memelilerdeki esas fonksiyonu oksijenin akciğerden dokulara taşınması olsa da, önemli biyolojik rolleri olan farklı 3 gazla [karbon dioksit(CO₂), karbon monoksit(CO) ve nitrik oksit(NO)] özel etkileşimleri bulunmaktadır (Schechter 2008).

Hemoglobin farklı ikişer çift globin zincirinden oluşan kuaterner yapılu bir proteindir. Çiftler hem simetrik hem de komplementerdirler (Karol ve ark. 2000). Hemoglobin tetramerinin bu 4 polipeptidinden her biri, non-kovalent olarak bağlı bir demir protoporfirin IX molekülü ve 1 adet “hem prostetik grubu” içeren büyük bir merkezi boşluk içerir. Böylece demir atomu, onu çevreleyen aköz solüsyon girişinden korunmuş olur (Schechter 2008).

her bir globin zincirine bir oksijen
molekülü bağlanır



hemdeki oksijen
bağlama bölgesi



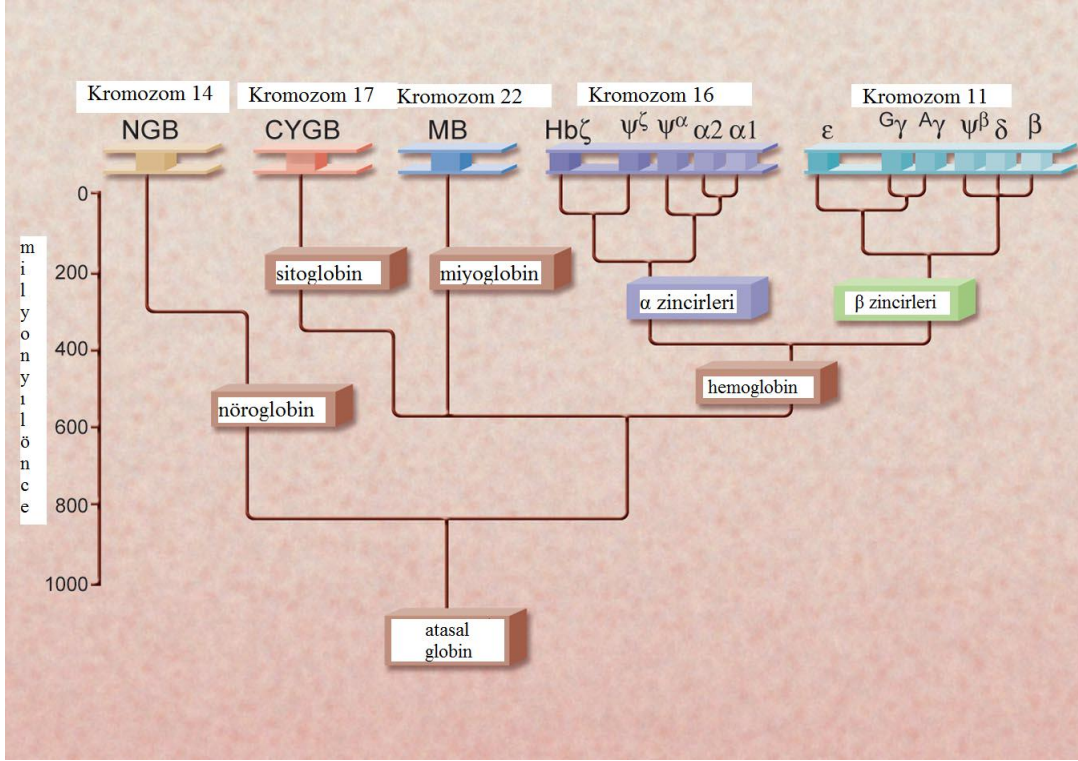
hemoglobin 4 globin zincirinden
meydana gelir

Şekil 2.1. Erişkin hemoglobin molekülünün şematik olarak görünümü (Forget ve Olivieri 2003).

Globin polipeptitlerinin tetramerindeki bu 4 ferröz demir atomuna gazların geri dönüşümlü olarak bağlanması hemoglobinin O₂, CO ve NO taşımaya izin verir. CO₂ kanda demir atomuna bağlı olarak değil, hemoglobinin amino terminal rezidüleri ile zayıf karbomino kompleksi olarak etkileşim yoluyla çözülmüş olarak taşınır (Schechter 2008).

Miyoglobin ve diğer globin genleri, alfa (α) ve beta (β)-globin genlerinden omurgalı evrimi sırasında ayrılmıştır ve bu iki gen (α ve β-globin) farklı kromozomlarda

gelişmişlerdir. Bu genlerin sayısı, kromozomal lokasyonları ve gelişimsel kontrolleri türlere göre çok değişim göstermesine rağmen temel globin yapısı ve protein katlanmaları tüm memeli evrimi boyunca korunmuştur (Şekil 2.2) (Schechter 2008).



Şekil 2.2. İnsan globin proteinlerinin evrimel diyagramı (Sahu ve ark. 2012).

2.2. Hemoglobin Fenotipi

Yetişkinlerde kandaki hemoglobin miktarının yaklaşık %97'si 2α ve 2β globin zinciri içeren HbA'dır. Az bir oranda ise (%3.5'tan daha az), β globin zinciri yerine delta (δ) globin zinciri içeren ve O_2 taşıyamayan HbA₂ bulunur. İnsan embriyosunda O_2 transportu zeta (ζ), gama (γ) ve epsilon (ϵ) zincirleri içeren ve Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) ve Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$) adı verilen embriyonik hemoglobinlerle yapılır. Gebeliğin 6. haftasından sonra fetal hayatın kalan döneminde major komponent HbF'dir ve doğumdan sonra sentezi azalır. HbA yavaş yavaş HbF'in yerini alır ve 2 yaşında kanda sadece %1 civarında HbF bulunur (Çizelge 2.1)(Birgens ve Ljung 2007).

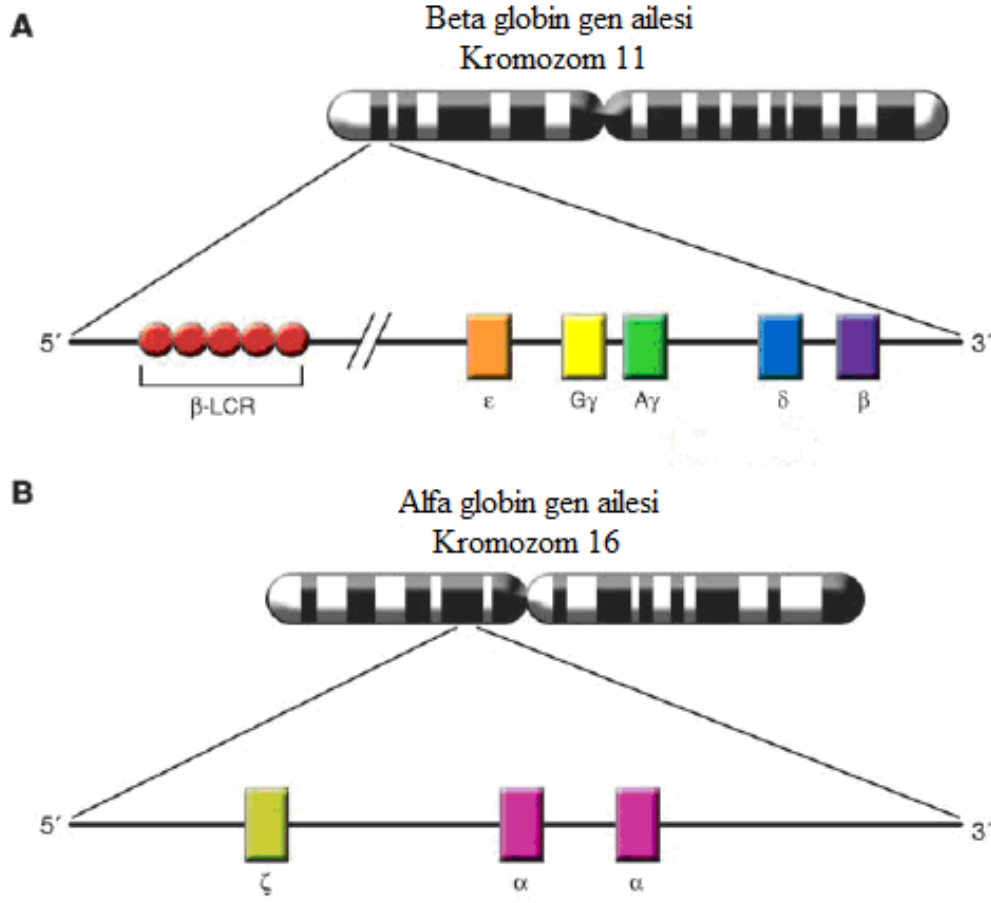
Çizelge 2.1. Hemoglobin fenotipleri.

Hemoglobin adı	İçerdiği globin zincirleri	Sentezlendiği dönem
Hb Gower I	$\zeta_2\varepsilon_2$	Embriyonik dönem hemoglobinleri
Hb Gower II	$\alpha_2\varepsilon_2$	
Hb Portland	$\zeta_2\gamma_2$	
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	Fetal dönem hemoglobini
HbA	$\alpha_2\beta_2$	Yetişkin dönem hemoglobinleri
Hb A ₂	$\alpha_2\delta_2$	

2.3. Globin Gen Aileleri

İnsanda en iyi karakterize edilmiş iki gen α ve β globin genleridir. Bu iki genin bulunduğu bölgeler, genlerin nükleotid dizilerindeki veya kodlanan polipeptidlerin aminoasit dizilerindeki benzerlik nedeniyle gen ailesi olarak tanımlanırlar (Klug ve Cummings 2003).

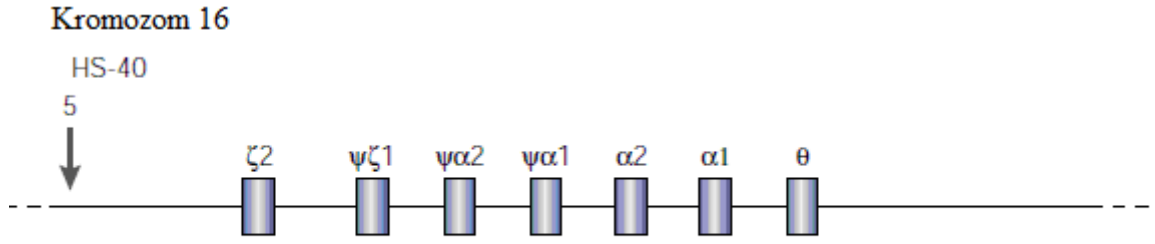
Alfa gen ailesi 16. kromozomda yer alır ve α ve ζ -globin genlerini içerir (Strahler ve ark. 1983). Beta globin gen ailesi ise 11. kromozomda yer alır; ε , γ , δ ve β - globin genlerini içerir (Şekil 2.3) (Yagi ve ark. 1986).



Şekil 2.3. β -globin gen ailesi (A), α -globin gen ailesi (B) (Bank 2005).

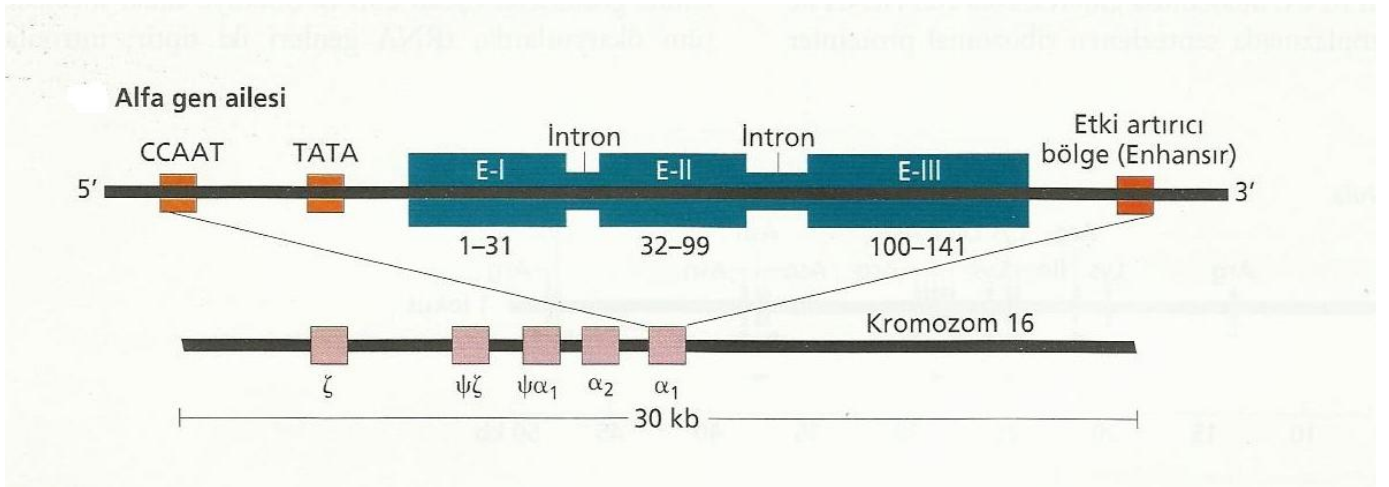
2.3.1. Alfa Globin Gen Ailesi

Alfa globin gen ailesi 16. kromozomun kısa kolu üzerinde, telomere çok yakın (yaklaşık 150 kb) olan p13.3 bölgesinde yer alır. Bu bölge 30 kb'dan daha büyük bir bölgeyi kapsar ve sırasıyla 5'- ζ 2- ψ ζ 1- ψ α 2- ψ α 1- α 2- α 1- θ -3' genlerini içerir (Şekil 2.4 ve 2.5). Yalancı genler isimlendirildikleri genle çok benzerdir, fakat yapılarındaki belirgin nükleotid değişiklikleri, delesyonlar ve duplikasyonlar bu genlerin transkripsiyonlarını ve translasyonlarını engellemektedir (Klug ve Cummings 2003, Ribeiro ve Sonati 2008, Higgs 2004, Weatherall 2001).



Şekil 2.4. İnsan alfa globin gen ailesi (Weatherall 2001).

ζ, α1 ve α2 genleri 141 amino asit uzunluğunda polipeptid kodlar (Ribeiro ve Sonati 2008). Bu polipeptidin aminoasitlerinin ekzonlara göre dağılımı her 3 gende (ζ, α1 ve α2) de aynı şeklindedir. Ekzon I, 1-31 arasındaki aminoasitleri; ekzon II, 32-99 arasındaki aminoasitleri kodlarken ekzon III, 100-141 arası aminoasitleri kodlayarak polipeptid zincirini tamamlar (Klug ve Cummings 2003).



Şekil 2.5. İnsan α-geninin yapısı (Klug ve Cummings 2003).

E: ekzon bölgeleri

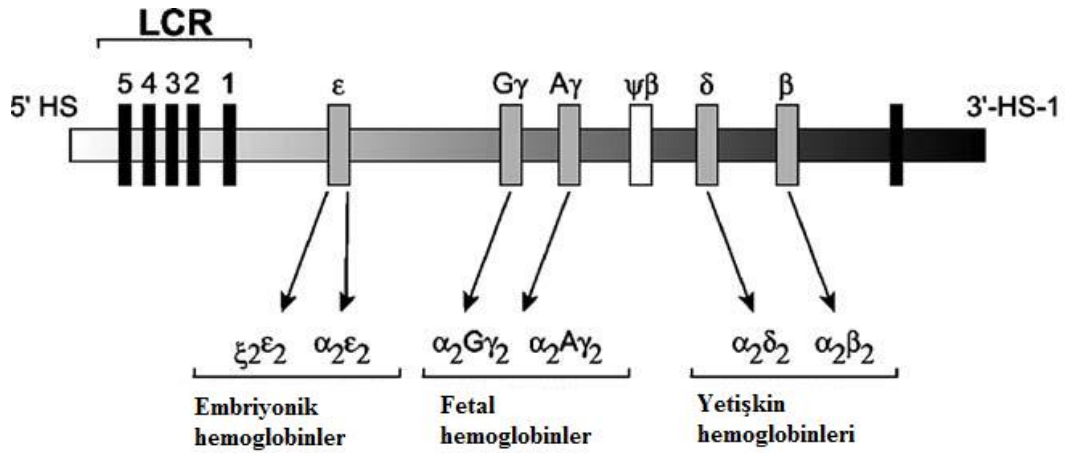
Rakamlar her bir ekzon tarafından kodlanan aminoasitlerin konumlarını göstermektedir.

Alfa lokusunda bulunan α2 ve α1 genleri yapısal olarak benzer protein sentezinden sorumlu olup sadece kodlanmayan (UTR, untranslated region) 5' ve 3' bölgelerinde bazı alanlarda dizi farklılıkları bulundurmaktadır.

ζ -globin geni hamileliğin 7-8. haftalarına kadar α benzeri globin zinciri olarak sentezlenirler ve 7. haftada α globin sentezinin başlamasıyla miktarları hızla azalır. Fakat ağır alfa talasemili hastalarda veya kromozom anormallikleri olan infantlarda doğumda da ζ geni sentezi görülür (Yagi ve ark. 1986, Sabath ve ark. 1996).

2.3.2. Beta globin gen ailesi

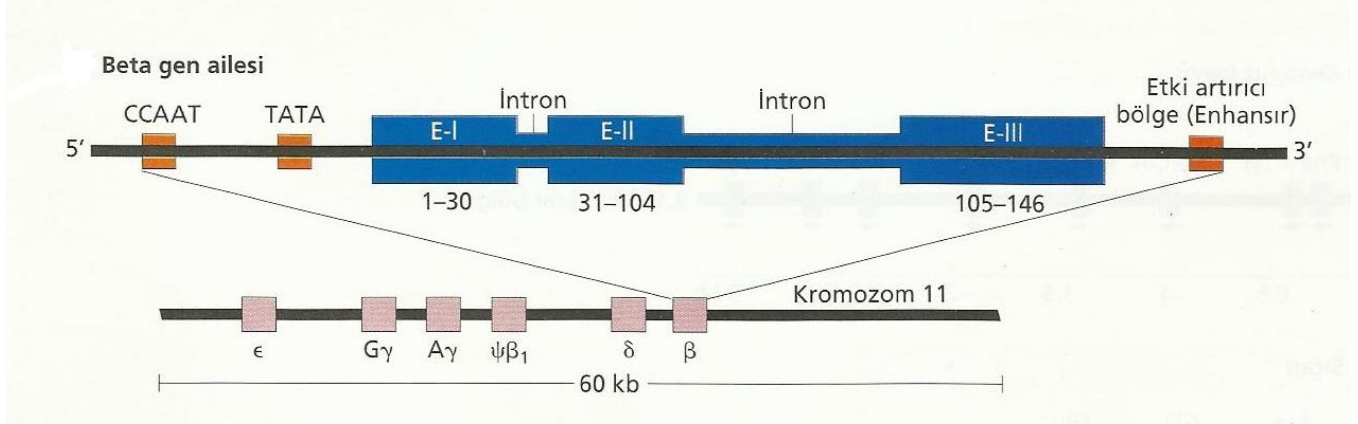
İnsan β -globin lokusu 5 fonksiyonel β -benzeri globin geninden oluşur. Bunlar ϵ (epsilon), $G\gamma$ (gama G), $A\gamma$ (gama A), δ (delta) ve β (beta) genleri olup kromozomda ontojeni boyunca ekspresyon sırasına göre sıralanmışlardır (Harju ve ark. 2002). β -globin gen ailesinin yukarı (upstream) bölgesi, ϵ -globin geninin 5' ucunda 5 ila 25 kb arasında yayılan, gelişimsel olarak stabil (kararlı) 5 adet DNase I hipersensitif bölge (HS 1-5 olarak isimlendirilen) içeren β lokusu kontrol bölgesi (β locus control region= β LCR)'dir (Şekil 2.6) (Harju ve ark. 2002, Ho ve Thein 2000).



Şekil 2.6. β -globin gen ailesi, LCR bölgesi, gelişim sırasına göre globin gen ekspresyonu (Testa 2009).

β -globin geni 146 aminoasit kodlamakta olup büyüklüğü 1.6 kb olan bir gendir (Cao ve Galanello 2010, Ho ve Thein 2000). Bu gen 3 ekzon ve hem 5' hem de 3' uçta olmak üzere 2 UTR bölgesi içerir (Cao ve Galanello 2010). Bu 3 ekzon (kodlanan bölgeler) 2 intron (kodlanmayan aralayıcı dizi= IVS) bölge ile ayrılmıştır. IVS I, kodlanan diziyi 30. kodondan ayırmıştır, IVS II ise kodlanan diziler olan 104. ve 105. kodonlar arasında yer alır. Exon 1 ve 3, globin zincirinin "hem" bağlamayan bölgelerini kodlarken

exon 2, “hem” bağlayan ve $\alpha\beta$ dimer formasyonunu içeren rezidüleri kodlamaktadır. Ekzon 3 bölgesinde 2,3 difosfogliserat bağlayıcı ve Bohr etkisi için gerekli globin alt ünite etkileşimlerini içeren birçok aminoasit kodlanmaktadır (Şekil 2.7) (Ho ve Thein 2000).



Şekil 2.7. İnsan β -globin geninin yapısı (Klug ve Cummings 2003).

E: ekzon bölgeleri

Rakamlar her bir ekzon tarafından kodlanan aminoasitlerin konumlarını göstermektedir.

Gen fonksiyonu için gerekli korunmuş diziler 5' promotor bölgesinde, ekzon-intron bağlanma yerlerinde ve mRNA dizilerinin sonundaki 3' UTR bölgelerinde bulunur. Dizinin 5' UTR bölgesi, başlangıç (ATG) kodonu ile β mRNA'nın başlık (*cap*) bölgesi veya 5' bölgesinin uç kısmı arasındaki 50 nükleotidlik bölgedir. Birkaç globin geninin (α ve β) 5' UTR bölgesinde 2 dizi belirgin olarak korunmuştur. Bunlardan biri “*cap*” bölgesinin 8 ila 13 nükleotid aşağısında, diğer bir deyişle +8'e +13 pozisyonunda bulunan CTTCTG heksanükleotid dizisidir. Diğer korunmuş dizi son 3 nükleotidi başlangıç kodonu (ATG) olan CACCATG dizisidir. Sonlanma kodonu ile polyA kuyruk arasındaki bölge ise 3' UTR'yi oluşturur (Ho ve Thein 2000).

Yüz otuz iki nükleotidlik korunmuş bölgede yer alan AATAAA dizisi, poly(A) kuyruk bölgesinin 20 nükleotit yukarısında lokalize olmuştur. Bu heksanükleotid primer transkriptin 3' ucunun kesilmesi için sinyal görevi yapmakta olup, mRNA işlenmesi ve translasyon esnasında mRNA'nın kararlılığını sağlamaktadır (Ho ve Thein 2000).

2.4. Eritropoez ve Globin Gen Düzenlenmesi

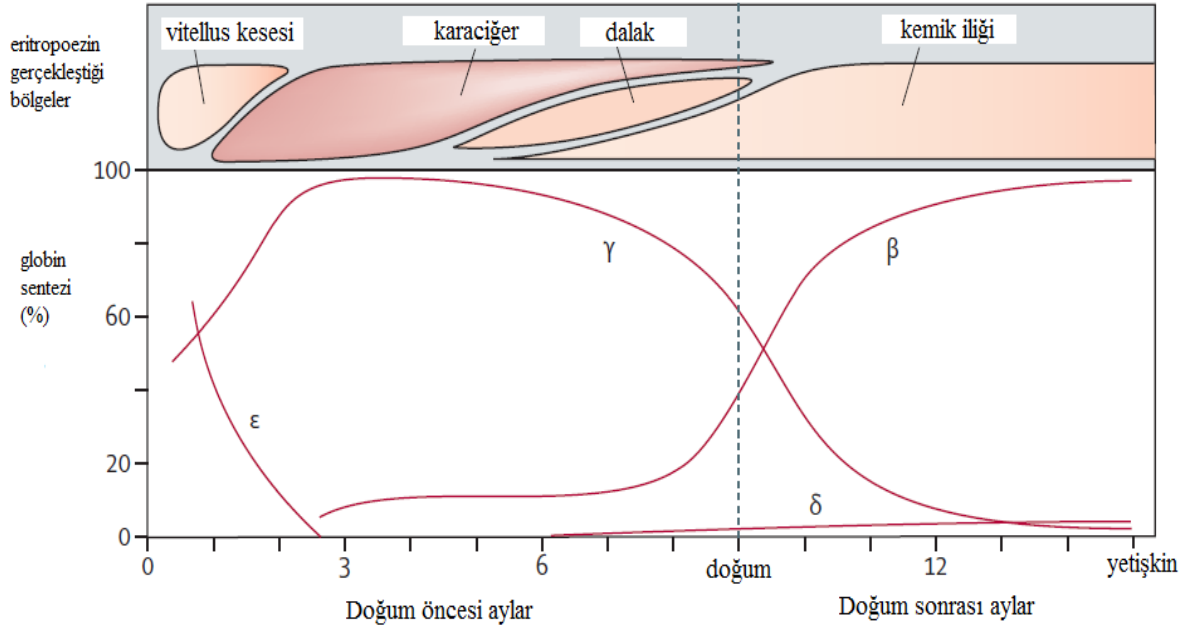
2.4.1. Eritropoez

Globin genlerinin ekspresyonlarının (ifadelerinin) düzenlenmesi globin değişimi (switching) olarak adlandırılır. Ontojeni boyunca fetusun oksijen ihtiyacındaki farklılığa bağlı olarak β -globin gen ekspresyonunda 2 değişim gözlenir. Birinci değişim, gebeliğin 6-8. haftasında embriyonik ϵ -globinden fetal γ -globine geçişte gözlenir. İkinci değişim ise doğumdan kısa bir süre sonra γ -globinden yetişkin β ve δ -globine geçişte gözlenir (Harju ve ark 2002).

Globin genleri, embriyonik yaşamdan erişkine doğru aktivasyon sırasına göre 5' ucundan 3' ucuna doğru dizilidirlir (Harju ve ark. 2002, Schechter 2008). Globin genlerinin sırayla ifade edilmesi esnasında eritropoezin meydana geldiği organlarda da değişiklik görülmektedir (Şekil 2.8).

Embriyonik dönemde eritrositler ilk olarak vitellus kesesinin kan adacıklarında meydana gelir. Fetal ve erişkin hayat boyunca var olan hematopoietik kök hücreler (HKH) daha sonra dorsal aortun ventral duvarından çıkar ve bu hücreler ventral duvardan fetal karaciğere göç ederler. Bu arada öncelikle vitellus kesesi, paraaortik bölge ve daha sonra karaciğerde eksprese olan ζ ve ϵ genlerinin yerine α ve γ genleri eksprese edilmeye başlar ve gebeliğin yaklaşık 60. gününden itibaren ilk fetal eritrositler embriyonik eritrosit yerine dolaşıma salınır. Böylece gebeliğin son iki trimesterinde baskın olacak olan ve 2,3 BPG (Bifosfogliserat)'yi daha gevşek bağlamasından dolayı yetişkin hemoglobinlerine nazaran oksijen affinitesi daha yüksek olan hemoglobin F birikmeye başlar.

Fetal gelişim sürecinde HKH'ler kemik iliğine göç ederler ki, burası erişkin hayat boyunca eritropoezin gerçekleşeceği yerdir. Erken postnatal hayatta dalak ve kemik iliğinde α genlerinin sentezi aynı şekilde devam ederken, γ genlerinin sentezi β -benzeri genlerin ekspresyonunun başlamasıyla karşılıklı olarak sessizleşir. Böylece, yaşamın ilk yılının sonunda yetişkin hemoglobin fenotipi olan hemoglobin A ve A₂ baskın hale gelmiş olur (Berkarda 1977, Harju ve ark. 2002, Higgs ve ark. 2012, Schechter 2008).



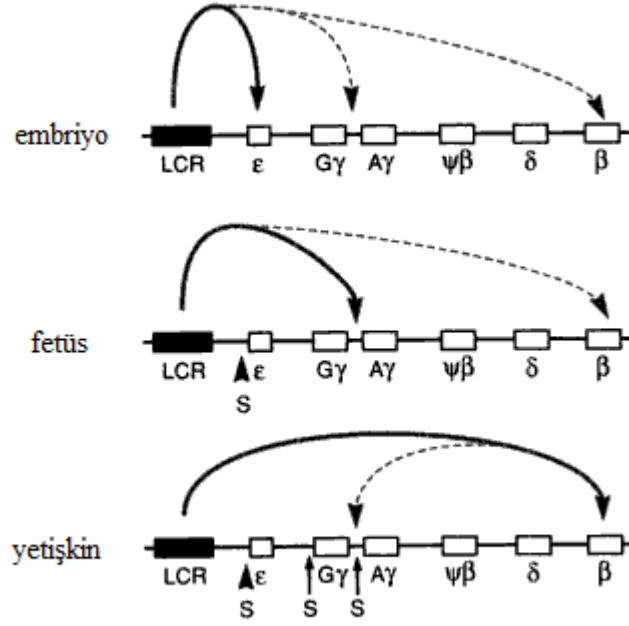
Şekil 2.8. Embriyonik ve fetal gelişimin farklı evrelerinde globin zincir sentezi (Strahler ve ark. 1983).

Gelişimin tüm dönemlerinde yaşlanan eritrositler devamlı olarak yeni kan hücreleriyle yer değiştirir. Bu yeni eritrositler eritroid progenitörleri ve prekürsörleri (eritroblastlar) yoluyla olgun eritrositlere farklılaşan HKH'lerden meydana gelmektedir (Higgs 2012).

Son 30 yıldır α ve β gen ailelerinin ekspresyonundaki değişikliklerin altında yatan moleküler ve hüresel mekanizmaların anlaşılabilmesi için çalışmalar yoğun olarak devam etmektedir. Bunun en başlıca sebebi talasemi ve orak hücre anemisi gibi genetik hemoglobin hastalıklarının tedavilerine yönelik çalışmaların yoğun olarak devam etmesidir (Schechter 2008).

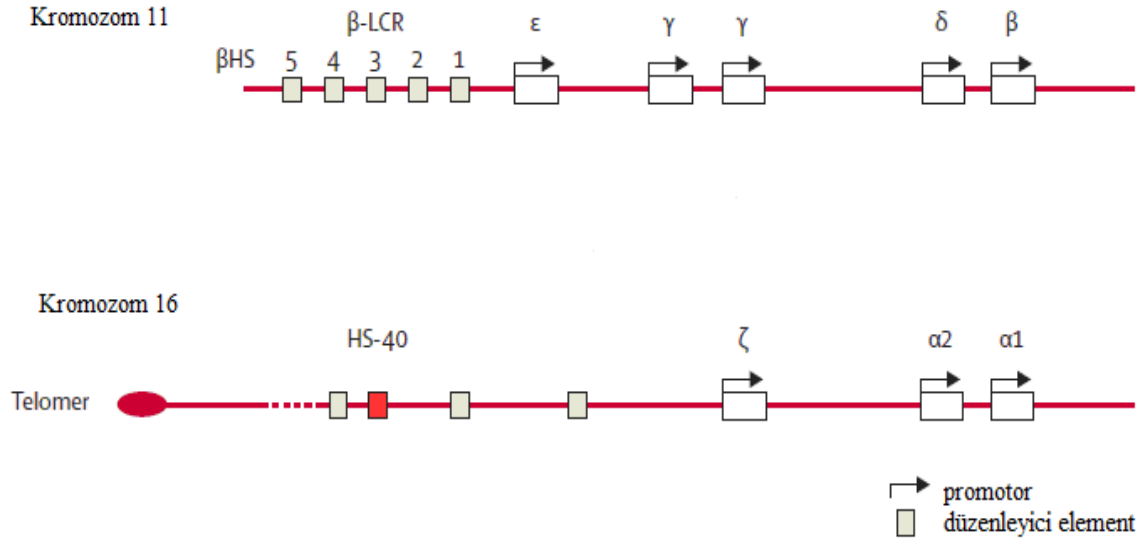
2.4.2. Globin Gen Düzenlenmesi

Globin genleri dokularda ve gelişimsel döneme spesifik olarak farklı hemoglobinlerin üretilmesi aşamalarında düzenlenir. Bu kompleks ekspresyonun düzenlenmesi β -globin gen ailesinde lokus kontrol bölgesi (LCR) ile α -globin gen ailesinde ise major düzenleyici element (MRE) ile gerçekleşir (Şekil 2.9)(Ribeiro ve Sonati 2008).



Şekil 2.9. Globin gen değişiminin (switching) düzenlenmesi. (Oklarla gösterilen bölgeler genlerin LCR etkileşimleri yarışını, S ile gösterilen bölgeler ise sessizleşen dizileri göstermektedir)(Harju ve ark. 2002).

α -globin gen ailesi ζ -globin mRNA “cap” bölgesinin 10 (HS-10), 33 (HS-33), 40 (HS-40) ve 48 (HS-48) kb yukarı bölgelerinde tanımlanmış 4 eritroid spesifik Dnaz I hipersensitivite bölge içerir. Yapılan çeşitli çalışmalarla sadece HS-40 bölgesinin α -gen ekspresyonunda önemli bir etkisi olduğu gösterilmiş ve daha sonra bu dizi α -MRE olarak isimlendirilmiştir (Ribeiro ve Sonati 2008).



Şekil 2.10. α ve β -globin gen ailesinin düzenleyici bölgeleri (Strahler ve ark. 1983).

β -globin gen ailesinde gen transkripsiyonu, *cis-acting* diziler (gen ekspresyonu için gerekli DNA dizileri: promoter, enhancer ve silencer) ile *trans-acting* faktörleri (*cis-acting* dizilere bağlanarak gen ekspresyonunu kontrol eden proteinler) arasındaki kompleks etkileşimler ile kontrol edilir (Bank 2006).

β -LCR bölgesi ϵ geninin 4-20 kb yukarısında lokalize olup (Rigoli ve ark. 2001), DNaz I tarafından kesilmeye aşırı duyarlı olan 5 DNA bölgesi (HS) içerir. Bu bölgelerden her biri yaklaşık 200-300 bp uzunluğunda ve Dnaz duyarlılığı için gerekli tanıma bölgelerine bağlanan NF-E2 (Nükleer eritroid faktör 2), EKLF (Eritroid Krüppel benzeri faktör), GATA-1 (GATA dizi elementlerine bağlanır) ve Sp1 gibi birçok transkripsiyon faktörü bağlama bölgesi içerir (Forget ve Olivieri, 2003; Ho ve Thein, 2000; Schechter, 2008). LCR bölgesinin gen ekspresyonundaki önemi, HS bölgelerinin tamamının veya bir kısmının çıkarıldığı delesyonlarda beta globin geninin inaktive olmasıyla gösterilmiştir (Cao ve Galanello 2010). β -benzeri globin gen ailesi ayrıca TATA, CAAT ve duplike edilmiş CACCC kutularının bulunduğu bitişik 5' promoter ve her globin geninin kendi promotorları yoluyla regüle edilir (Cao ve Galanello 2010, Higgs ve ark. 2012).

2.5. Beta Talaseminin Klinik Fenotipleri

Talasemilerin globin zincir sentezindeki bozukluklardan kaynaklandığı bilinmektedir. Beta globin zincirinin üretimindeki bozukluklar sonucunda β globin sentezinin azalması ya da hiç sentezlenmemesiyle, mevcut α globin zincirleri eritrositler içinde birikerek anormal hücre olgunlaşmasına ve bu hücrelerin kemik iliğinde yıkımına neden olmaktadır. Beta talaseminin kliniği globin zincir dengesizliğinin oranına göre değişmektedir, fakat Beta talasemi tiplerini klinik olarak sınıflandırmak bu kadar kolay olmamaktadır. En ağır (major) ve en hafif (minör) fenotiplerin sınıflandırılması kolayca yapılırken, bunlar arasında kalan formları kategorize etmek oldukça zordur (Bank 2005, Weatherall ve Clegg 2001).

Beta talaseminin klinik olarak 3 ana formu vardır:

-Talasemi majör: Cooley's Anemia veya akdeniz anemisi olarak da bilinir.

-Talasemi intermedia

-Talasemi minör: Beta talasemi taşıyıcılığı ya da heterozigot beta talasemi olarak da bilinir.

Çoğu talasemi resesif olarak kalıtılmaktadır. Nadir dominant formlarından ayrı olarak talasemi major ve intermedialı kişiler beta⁰ veya beta⁺ genleri açısından homozigot veya birleşik (compound) heterozigot olup, talasemi minorlülük kişiler ise çoğu zaman heterozigottur. Talasemi majorlülük bireyler genellikle hayatlarının ilk 2 yılında tıbbi bakım gerektiren ve tedavi için düzenli eritrosit transfüzyonuna ihtiyaç duyan hastalardır. Talasemi intermedialı hastalarda ise klinik bulgular hayatlarının ileriki dönemlerinde ortaya çıkmakta ve düzenli kan transfüzyonuna ihtiyaç duymamaktadırlar (Galanello ve Origa 2010).

2.5.1. Beta Talasemi Major

Talasemi majorün klinik belirtileri 6 ile 24. aylar arasında gözlenir. Hasta bebeklerde gelişme bozukluğu ve ciltte belirginleşen solgunluk görülür. Beslenme bozuklukları, diyare, irritabilite, ateş nöbetleri ile dalak ve karaciğer büyümesi kaynaklı abdomen büyümesi gözlenebilir. Tedavi edilmeyen veya yetersiz transfüzyon alan hastaların olduğu bazı gelişmekte olan ülkelerde talasemi majorün klinik bulguları

arasında; büyüme geriliği, ciltte solma, sarılık, kas zayıflığı, genu valgum (diz kapağının içe bükülmesi), hepatosplenomegali, bacak ülserleri, ekstremitelerde hematopoezde kütle artışı ve kemik iliği genişlemesine bağlı iskelet değişimleri görülür. İskeletsel değişiklikler arasında; bacaklardaki uzun kemiklerin deformitesi, tipik kraniofasyal değişimler (kafatası büyümesi, yanak kemiklerinin çıkıntı yapması, burun köprüsünün yayvanlaşması, mongol gözü, maksiller hipertrofisi) yer alır (Galanello ve Origa 2010).

Beta talasemi majörlü hastalara minimum 9.5- 10.5 g/dl Hb konsantrasyonuna sahip düzenli bir transfüzyon tedavisi programı uygulandığında gelişimleri 10- 12 yaşa kadar normal seyredebilirken, kan transfüzyonu yapılmayan bireyler genellikle 10 yaşından önce ölmektedirler. Transfüzyon yapılan hastalarda demir birikimiyle ilgili komplikasyonlar görülebilmektedir (Kohne 2011, Galanello ve Origa 2010). Çocuklarda demir birikiminin görülebilen komplikasyonları arasında büyüme geriliği ve cinsel olgunlukta gecikme sayılabilir. Demir birikimiyle ilişkili geç komplikasyonlar arasında ise; kalp (büyümüş kardiyopati veya nadiren aritmi) ve karaciğer (fibrozis ve siroz) problemleri ile endokrin bezleri (diyabet, hipogonadizm ve paratiroid, tiroid, hipofiz ve nadiren de adrenal bezler) yetersizliği görülebilir. Hastalığın diğer komplikasyonları; ise dalak büyümesi, kronik hepatit B ve/veya C enfeksiyonu, HIV enfeksiyonu, venöz tromboz ve osteoporozdur. Bu hastalarda viral enfeksiyonlar ve aşırı demir yüklenmesi sebebiyle hepatoselüler karsinoma riski artmaktadır. Düzenli transfüzyon almayan hastaların genellikle 20- 30 yıl içinde öldükleri, düzenli transfüzyon ve uygun şelasyon (biriken demirin vücuttan uzaklaştırılması) tedavisi alan hastaların ise 40'lı yaşlara kadar yaşadıkları bildirilmektedir. Miyokardiyal siderozis kaynaklı kardiyak hastalıklar demir birikimi olan Beta talasemi hastalarının hayatını sınırlandıran en önemli komplikasyondur. Beta talasemi majörlü hastaların %70'den fazlasının kardiyak problemlerden öldükleri tespit edilmiştir (Borgna-Pignatti ve ark. 2005).

2.5.2. Beta Talasemi İntermedia

Talasemi intermedialı bireylerde hafif anemi görülmekte olup, bu hastalar nadiren kan transfüzyonuna ihtiyaç duyarlar. Beta talasemi intermedianın en ağır klinik formlarının görüldüğü kişilerde semptomlar 2- 6 yaş arası ortaya çıkmakta ve düzenli kan transfüzyonu tedavisi almadan yaşayabilmelerine rağmen büyüme ve gelişme geriliği görülebilmektedir. Ekstremitelerde eritropoez sebebiyle oluşan eritroid kemik iliği hipertrofisi kronik

aneminin önlenmesinde kemik iliğince gerçekleştirilen bir mekanizmadır. Bunun sonucu olarak; kemik ve yüz deformiteleri, uzun kemiklerin patolojik kırıkları ile osteoporoz, primer olarak dalak, karaciğer, lenf nodları, göğüs ve omuriliği etkileyen eritropoetik doku artışı tipik görülen deformitelerdir (Galanello ve Origa 2010). Asemptomatik hastalarda ise hayatları boyunca sadece hafif anemi görülür.

Dalak büyümesi kan dolaşımında çok fazlaca bulunan hasarlı kırmızı hücrelerinin temizlemesi sonucu görülür. Ekstramedullar eritropoez spinal kord sıkışması, parapleji gibi nörolojik problemlere de neden olabilir. Periferal hemolizin ve eritropoezin sonucu olarak talasemi intermedia hastalarında da talasemi majorde yaygın olarak görülen safra taşları oluşumu gözlenebilir. Talasemi intermedialı hastalarda sıklıkla bacak ülserleri gelişmekte olup, talasemi major hastaları (özellikle splenektomi yapılmışsa) ile kıyaslandığında yüksek tromboz riskinin olduğu bildirilmektedir. Bazı durumlarda derin ven trombozları, portal ven trombozları, inme ve akciğer embolisi görüldüğü de bildirilmektedir (Galanello ve Origa 2010).

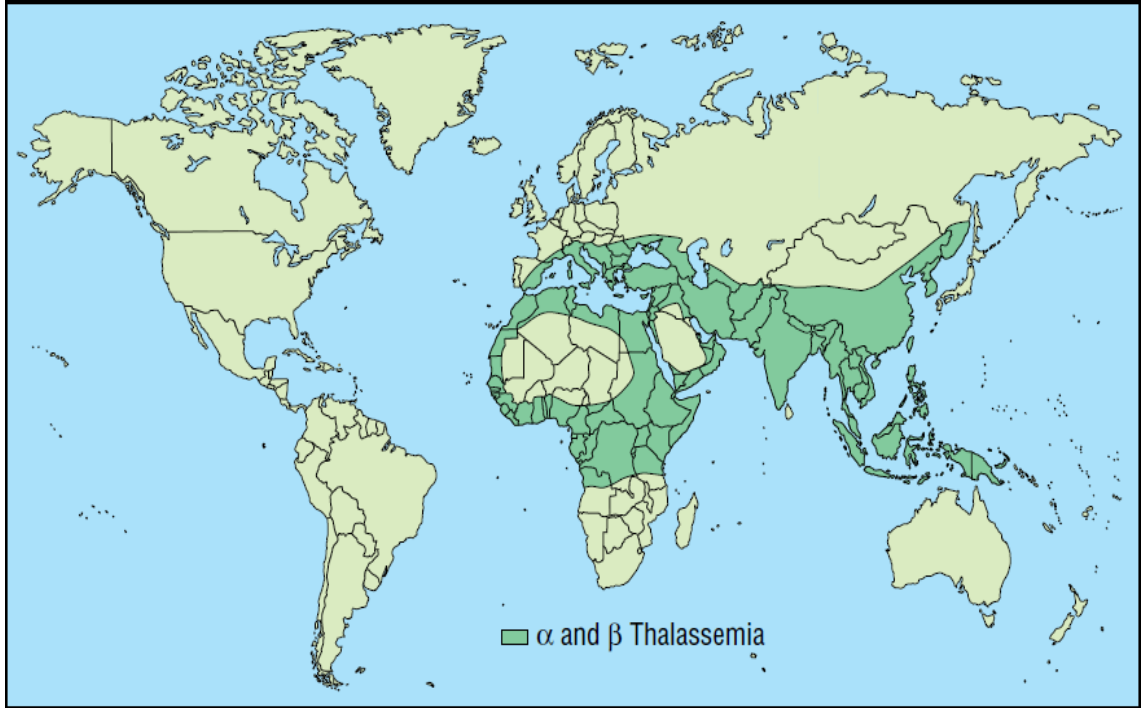
Çizelge 2.2. Beta talaseminin fenotip ve genotipleri ile klinik bulguları (Kohne 2011).

Fenotip	Genotip	Eritrosit değerleri	Hemogloblin Tipi	Başlıca Semptomlar
Heterozigot Beta talasemi = Beta talasemi minor	β^{+++} β^{+} β^0	Hb 9 - 15 g/dL MCV 55 - 75 fl MCH 19 - 25 pg	HbA2 >3.2% HbF 0.5- 6%	Hafif anemi
Homozigot Beta talasemi = Beta talasemi major Birleşik heterozigot Beta talasemi = Beta talasemi major	β^{+}/β^{+} β^0/β^0 β^{+}/β^0	Hb <7 g/dL MCV 50 - 60 fl MCH 14 - 20 pg	HbA2 değişken HbF 70- 90%	Uzun dönem transfüzyon bağımlı anemiyle seyreden ağır talasemi
Hafif homozigot veya birleşik heterozigot Beta talasemi = Beta talasemi intermedia	β^{+}/β^{+} β^{+}/β^{+++} β^{+}/β^0 β^0/β^0 + etkili faktörler	Hb 6 - 10 g/dL MCV 55 - 70 fl MCH 15 - 23 pg	HbA2 değişken HbF % 100'e yakın	Değişken transfüzyon bağımlılığı ile seyreden ılımlı talasemi

2.6. Beta Talaseminin Epidemiyolojisi

Beta talasemi dünyada en sık görülen, otozomal resesif geçişli genetik bir hastalıktır (Altay ve Başak 1995). Beta talasemi Afrika'nın kuzey kıyıları ve Güney Amerika'daki ülkelerin yanı sıra Akdeniz ülkeleri, Orta Doğu, merkez Asya, Hindistan, Güney Çin ve Uzak Doğu ülkelerinde yaygındır (Şekil 2.11). En yaygın taşıyıcı frekansları Kıbrıs (% 14), Sardunya Adaları (% 10.3) ve Güney Asya'da bildirilmiştir (Başak 2011,

Galanello 2012). Bu bölgelerdeki Beta talaseminin yüksek gen frekansının *Plazmodium falciparum* kaynaklı heterozigot avantajıyla yakından ilişkili olduğu bildirilmektedir. Populasyon göçü ve farklı etnik gruplar arası evlilikler hastalığın, daha önce talasemi bulunmayan Kuzey Avrupa ülkeleri dahil dünyanın hemen hemen her ülkesine yayılmasına neden olmuştur. Dünya genelinde Beta talasemi taşıyıcılık oranının % 1.5 (80- 90 milyon insan) olduğu tahmin edilmektedir. Uluslararası talasemi federasyonuna göre dünya genelinde talasemili 200.000 hastanın yaşamakta olduğu ve düzenli tedavi aldığı bildirilse de talasemi hastalarının gerçek sayısı bilinmemektedir (Higgs ve ark. 2012). Bu sayıya her yıl yaklaşık olarak 60.000 yeni vaka eklenmekte ve Beta talaseminin görüldüğü gelişmemiş ya da az gelişmiş ülkelerdeki yeni doğan vakalarında mortalite de yüksek seyretmektedir. Bu hastaların tedavileri yüksek maliyet gerektirdiğinden gelişmekte olan ülkelerde ciddi sorunlar oluşturmaktadır. Örneğin hastalığın sık görüldüğü yerlerden ikisi olan Kıbrıs ve Sardunya adalarında tedavi maliyetinin ülkelerin sağlık bütçesinden yüksek olduğu bildirilmiştir. Hasta doğumların önlenmesi için genetik danışmanlık ve prenatal tanı oldukça önemlidir (Higgs ve ark. 2012, Weatherall ve Clegg 2001).



Şekil 2.11. Talasemilerin dünyada yayılımı (Weatherall 1998).

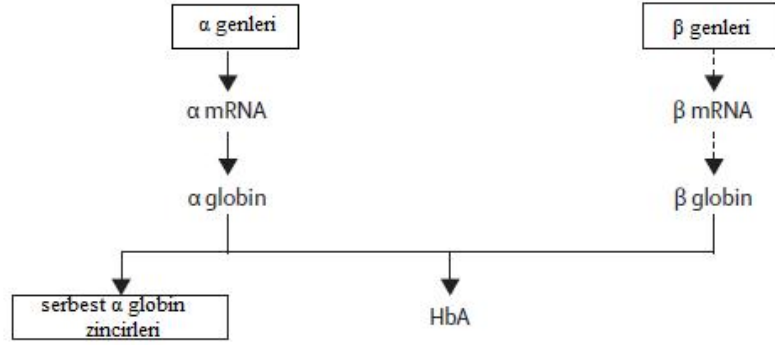
2.7. Beta Talaseminin Patofizyolojisi

Gelişimin her evresinde α ve β benzeri globinlerin üretilmesi bir denge halindedir (Higgs ve ark. 2012). Beta talasemide klinik bulgu ve semptomların çoğunluğunun sebebi alfa zincirlerinin eritrosit prekürsörleri içinde fazla oranda bulunmasıdır. Bu fazlalık beta globin genindeki mutasyonlardan dolayı beta zinciri sentezinin yapılamaması veya oldukça az oranda yapılabilmesinden kaynaklanmaktadır (Birgens ve Ljung 2007). Serbest alfa zincirleri kemik iliğindeki eritroid prekürsörleri içinde çökerek bu hücrelerin olgunlaşmadan ölmesine, dolayısıyla da etkisiz eritropoeze neden olmaktadır (Galanello ve Origa 2010). Gama globin zincir sentezi doğumdan sonra farklı ölçüde devam etse de alfa zincirleri ürünleriyle eşleşecek kadar yeterli olmamaktadır.

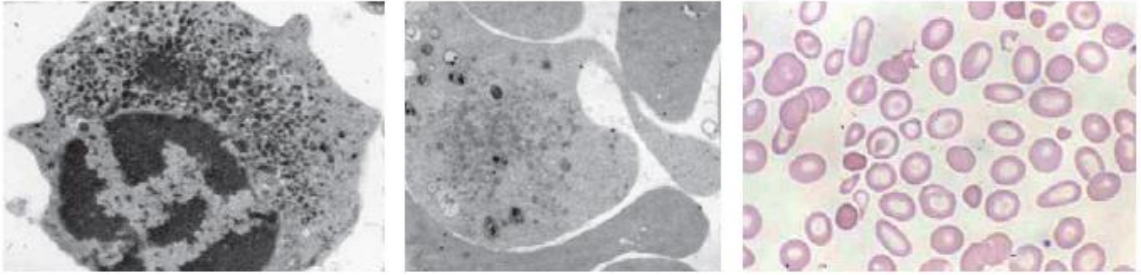
Alfa zincirleri kararlı olmayıp eritrosit prekürsörleri içinde birikerek bu hücrelerin membranlarında hasara neden olmakta, bu hasar da kemik iliğinde apoptozise uğramalarına yol açmaktadır. Dolayısıyla bu hastalarda etkisiz eritropoez sonucu, şiddeti eritrosit prekürsörlerindeki gama ve beta zincirleri ile alfa zinciri arasındaki dengesizliğe bağlı olan anemiler görülmektedir (Thein 2005).

Anemi eritropoetik kemik iliği aktivitesinin şiddetli proliferasyonuna ve genişlemesine öncülük ederek eritropoetin sentezinde artışa neden olur. Kemik iliğindeki bu değişim osteopeni, osteoporoz, kemik hipertrofisi, yüz ve kafatasında deformiteler gibi çeşitli iskeletsel bozukluklara yol açar (Rioja ve ark. 1990, Weatherall 1998).

A



B



Şekil 2.12. Beta talaseminin patofizyolojisi (Higgs ve ark. 2012).

A. Anormal globin sentezi

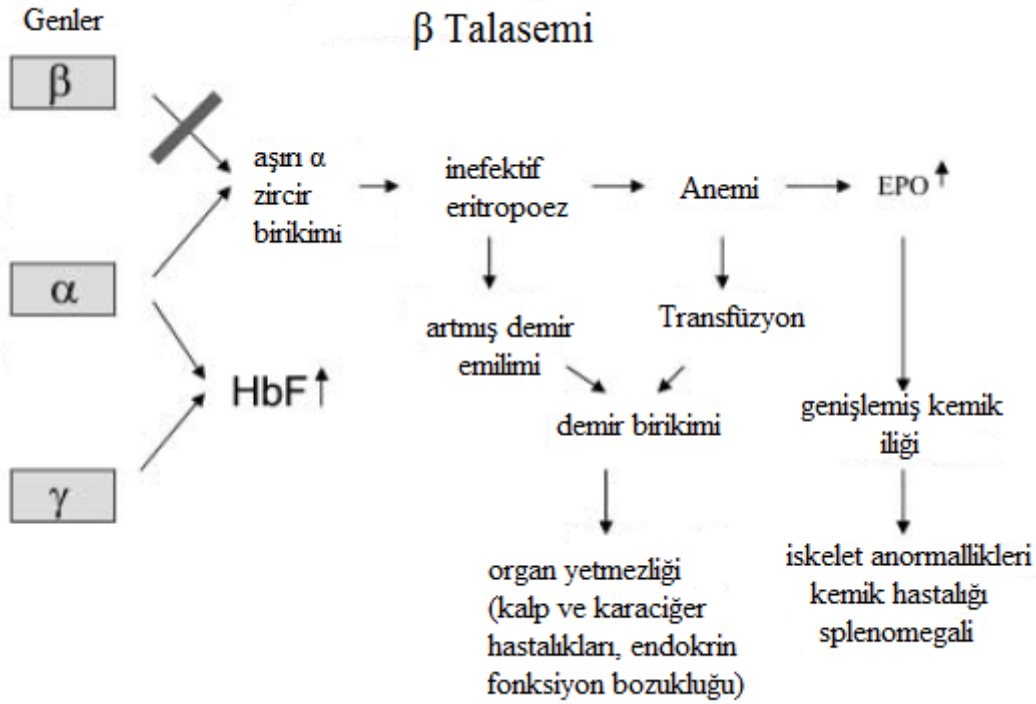
B1. Eritroblast içinde biriken alfa globin zincirlerinin elektron mikroskopik görüntüsü

B2. Olgun bir eritrositin elektron mikroskopik görüntüsü

B3. Beta talasemili bir hastanın tipik kan tablosu

Beta talasemi hastalarında etkisiz eritropoezin tetiklenmesiyle intestinal demir absorpsiyonunun artması ve kan transfüzyonu gibi 2 önemli sebepten dolayı demir birikimi görülmektedir. Plazma demir birikimi Beta talasemi major hastalarında 10 kattan fazla yükselebilmekte ve bu da genişlemiş eritropoetik kütleyle etkilemektedir. Genişlemiş eritropoetik doku Beta talasemi hastalarında görülen splenomegalinin de ana sebebidir (Galanello ve Origa 2010). Gelişmiş şelasyon tedavisi hastalığın prognozunu önemli ölçüde düzeltebilse de, günümüzde demirin aşırı birikimi Beta talasemide en önemli morbidite ve mortalite sebebi olmaya devam etmektedir. Demirin aşırı biriktiği durumlarda proteine bağlı olmayan demir süperoksit anyonları hidrojen peroksit ve hidroksil radikalleri gibi reaktif oksijen türlerinin üretimini provoke eder. Bu maddeler protein hasarı oluşturabilmekte ve hücre membranı lizozom, mitokondri gibi organellerde lipit

peroksidasyonuna sebep olabilmektedir. Sonuçta demir toksisitesi için duyarlı olan organlarda kardiyak problemler, siroz, endokrin bozukluklar gibi bir takım semptomlar görülebilmektedir (Birgens ve Ljung 2007).



Şekil 2.13. Beta talaseminin patofizyolojisi. EPO: Eritropoietin (Birgens ve Ljung 2007).

2.8. Beta Talaseminin Moleküler Temelleri

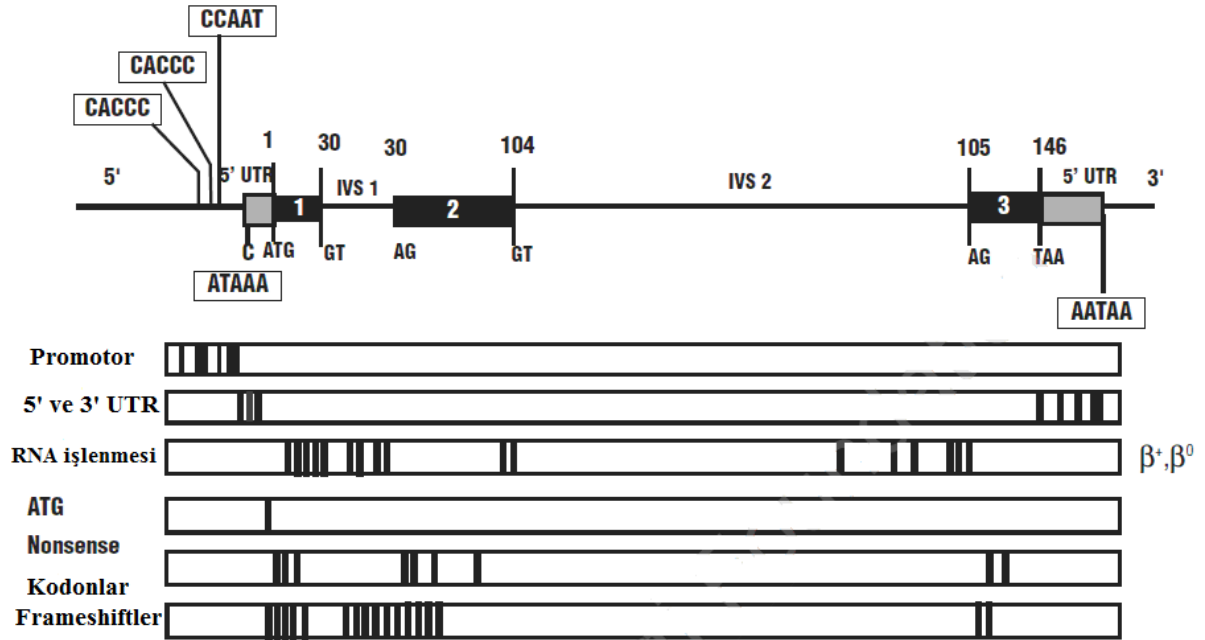
Beta talasemiye neden olan çoğu mutasyonun beta globin geninin fonksiyonel olarak önemli bölgelerindeki nokta mutasyonlarla ilgili olduğu tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalar Beta talasemili hastalarda beta globin geninde 200'den fazla farklı nokta mutasyonu olduğunu göstermektedir (Forget ve Olivieri 2003).

Nokta mutasyonları beta globin ekspresyonunu 3 farklı kategoride etkilemektedir. Bunlar:

- Hatalı beta globin gen transkripsiyonuna yol açan promotor ve 5' UTR mutasyonları
- mRNA işlenmesini etkileyen bağlantı bölgesi ve konsensus dizi mutasyonları ile poliadenilasyon ve diğer 3' UTR mutasyonları

- Anormal mRNA translasyonuna neden olan anlamsız mutasyonlar, çerçeve kayması (frameshift) ve başlangıç kodonu mutasyonları (Cao ve Galanello 2010).

Beta talasemiye neden olan nokta mutasyonlarına ek olarak daha nadir görülen büyük gen delesyonları da bildirilmiştir. Talasemilerin en ağır formu olan Beta⁰ talasemilerin delesyon, başlangıç kodonu mutasyonları, anlamsız, çerçeve kayması ve özellikle de birleştirme bölgesi bağlantısındaki mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir. Daha hafif bir talasemi formu olan Beta⁺ talasemilerin ise promotor bölgesi (ya CACCC ya da TATA kutusu), poliadenilasyon sinyali ve 5'-3' UTR bölgelerindeki mutasyonlardan veya splicing anomalilerinden kaynaklandığı tespit edilmiştir (Cao ve Galanello 2010).



Şekil 2.14. Beta talasemiye neden olan nokta mutasyonlarının sınıflandırılmaları (Ho ve Thein 2000).

Üç ekzon iki aralayıcı dizi ile beta globin geninin genel yapısı ve gendeki korunmuş diziler.

2.8.1. Promotor ve 5' UTR bölgelerindeki mutasyonlar

Globin genlerinin 5' ucunda promotor bölgenin önemli fonksiyonel elementlerini oluşturan bir grup korunmuş dizi bulunmaktadır. Bu korunmuş dizilerden 3 tanesi (CACCC, CCAAT ve ATAA veya TATA kutuları) tüm globin genlerinin promotor bölgelerinde bulunur. Beta talasemi hastalarında bu 3 korunmuş dizinin ikisinde (CACCC, ATAA) mutasyonların olduğu bildirilmiştir. CCAAT kutusunda HPFH (Hereditary

Persistence of Fetal Hemoglobin) ile ilişkili mutasyonlar olduğu tespit edilirken, bu kutuda Beta talasemiye neden olan bir mutasyon henüz saptanamamıştır (Forget ve Olivieri 2003). Günümüze kadar promotor ve 5' UTR bölgelerinde yaklaşık 23 mutasyon tanımlanmıştır (<http://globin.cse.psu.edu>).

2.8.2. mRNA işlenmesini etkileyen mutasyonlar

Birleşme bölgelerindeki değişmez dinükleotidlerin (5' bölgesindeki GT ve 3' bölgesindeki AG) her ikisindeki mutasyonlar doğrudan birleştirme mekanizmasını ve beta globin üretimini ortadan kaldırarak beta⁰ fenotipine yol açarlar. Örneğin, ekzon I/IVS I, IVS I/ekzon II ve ekzon II/IVS II birleştirme bölgelerindeki mutasyonlar bu tip etkiye neden olmaktadır (Ho ve Thein 2000, Thein 2005, 649- 660).

Bu durumun aksine "splice junction" bölgelerindeki korunmuş dizilerde görülen mutasyonlar, normal "splice" bölgesinin etkinliğini ve beta globin üretimini azaltarak Beta⁺ talasemi fenotipine neden olurlar (Ho ve Thein 2000).

IVS I, IVS II ve kodlayıcı bölgelerdeki değişimler anormal ya da gerekenden daha az miktarda mRNA'nın sentezine yol açan alternatif "splice" bölgeleri oluşturmaktadır (<http://globin.cse.psu.edu>, Thein 2005, 649- 660).

PolyA bölgesindeki mutasyonlar mRNA'nın poliadenilasyonunu ve ayrılmasını etkilemektedir. 3' UTR bölgesindeki mutasyonlar unstabil (kararsız) mRNA oluşumuna yol açmakta ve poliadenilasyon sinyali (AATAAA) ve 3' UTR mutasyonları genelde Beta⁺ talasemiye neden olmaktadır (<http://globin.cse.psu.edu>, Thein 2005, 649- 660). Beta globin geninde mRNA işlenmesini etkileyen yaklaşık 53 adet mutasyon tanımlanmıştır (<http://globin.cse.psu.edu>).

2.8.3. Anormal mRNA translasyonuna neden olan mutasyonlar

Anormal mRNA translasyonuna neden olan mutasyonlardan anlamsız mutasyonlar ve çerçeve kayması mutasyonları mRNA'da erken bir kodonda sonlanmaya neden olmaktadır (Thein 2005, 649- 660).

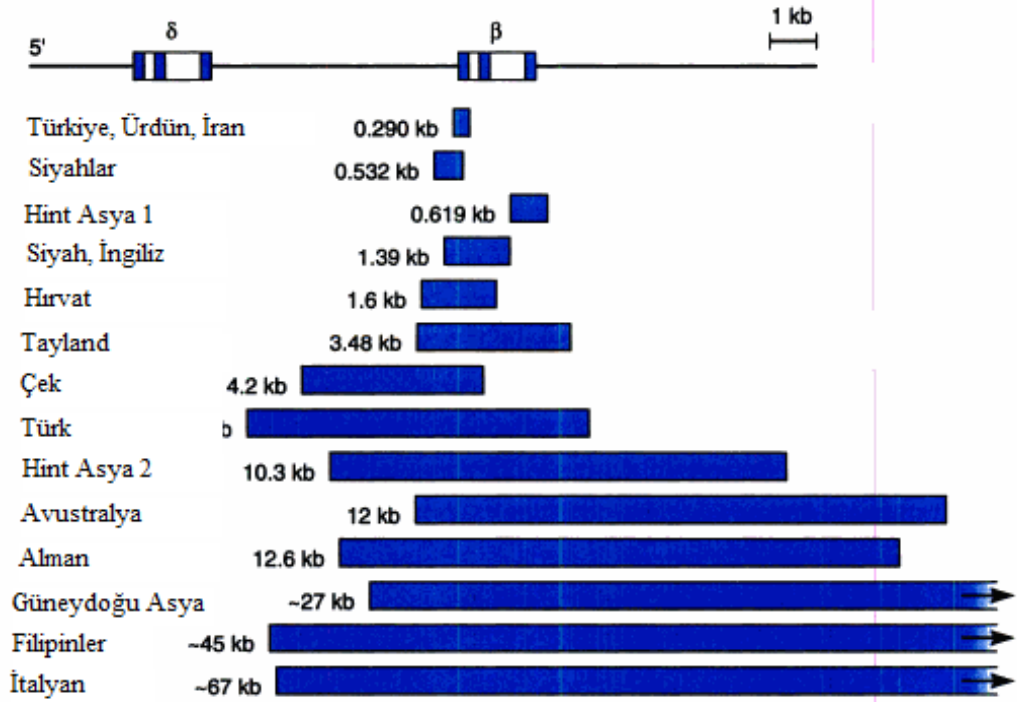
Anlamsız mutasyonlar bir kodonu değiştiren tek baz değişimleri olarak tanımlanmıştır. Bu değişim sonucu belirli bir aminoasiti kodlamakta olan bir kodon sonlanma kodonlarından (UAA, UAG, UGA) birine dönüşebilmekte ve mRNA translasyonu istenmeyen bir yerde sonlanarak normalden kısa bir protein

sentezlenmektedir. Bunun sonucunda kararsız globin zincirleri oluşmakta ve bu zincirlerin yıkılmasıyla beta globin zincir eksikliğiyle karakterize Beta° talasemi oluşmaktadır. Beta globin geninin protein kodlayan bölgesinde bir veya daha çok nükleotidin (üç ve katları dışında) delesyonu veya insersiyonu sonucunda çerçeve kayması mutasyonları meydana gelmektedir. Bu delesyon veya insersiyonlar mutasyon bölgesindeki kodlanmış mRNA'nın normal okuma çerçevesini değiştirmektedir. Bu değişimlerden bazıları yeni okuma çerçevesinde bir sonlanma kodonuna kadar yeni bir anormal aminoasit dizisinin oluşmasına izin verir. Yeni okuma çerçevesindeki bu yeni sonlanma kodonu genelde olması gereken kodondan daha önce yer alır. Bu oluşan anormal ve erken sonlanmış aminoasit zinciri kararsız olup hızlıca yıkılmaktadır. Böylece bu mutasyonlar beta globin zincirlerinin yokluğuyla karakterize Beta° talasemiye yol açmaktadır (Forget ve Olivieri 2003).

Başlangıç kodonu mutasyonları mRNA sentezini inhibe etmekte ve dolayısıyla beta zincirlerinin üretilmemesine yol açarak Beta° talasemiye neden olmaktadır. Günümüze kadar beta globin geninde anormal mRNA translasyonuna neden olan yaklaşık 73 mutasyon tanımlanmıştır (<http://globin.cse.psu.edu>).

2.8.4. Delesyonel Beta talasemi allelleri

Beta talaseminin delesyonuyla oluşmuş 17 farklı Beta talasemi alleli tanımlanmıştır. Mutasyonlardan 8 tanesi küçük, 9 tanesi ise büyük delesyonlar olarak bildirilmiştir. Bu delesyonlardan 4237 bp'lik Çek delesyonu tüm beta globin genini içermektedir. Hint ve bazı Güneydoğu Asya popülasyonlarında yüksek frekansta görülen 619 bp'lik delesyon hariç beta globin geninde delesyonlar nadir olarak görülmektedir (<http://globin.cse.psu.edu>).



Şekil 2.15. Beta globin geninin ve komşu DNA dizisinin Beta⁰ talasemi ile ilişkili delesyonları (Forget ve Olivieri 2003).

2.8.5. Dominant Beta talasemi ve kararsız beta globin zincirlerine neden olan mutasyonlar

Çoğu baz değişimlerinin globin zincir kararlılığı için önemli bölgelerde aminoasit değişimine neden olduğu bilinmektedir. Bu şekilde sentezlenen anormal globin zinciri oldukça kararsız olup eritrositlerde birikerek membran hasarı oluşturur. Kararsız hemoglobin zincirlerinden kaynaklanan dominant Beta talasemilerin çoğununun fenotipinin hipokromi, mikrositoz ve heterozigotlardaki hemolitik anemiyle karakterize olduğu bildirilmiştir. Bazılarında ise mutant globin zincirlerinin hızlı ve etkili bir şekilde proteolizi ile sadece hipokromi ve inklüzyon cisimciği formasyonu olmayan mikrositoz veya hemoliz görülmektedir. Günümüze kadar beta globin geninde, dominant Beta talasemiye ve kararsız beta globin zincir varyantlarına neden olan yaklaşık 30 mutasyon tanımlanmıştır (<http://globin.cse.psu.edu>, Forget ve Olivieri 2003).

2.9. Türkiye’de Görülen Beta Talasemi Mutasyonları

Ülkemizde gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda Beta talasemiye neden olan en az 41 mutasyon tanımlanmıştır. Bunlardan en sık görülenleri IVS-I-110 (G→A), IVS-I-6 (T→C) ve kodon 8 (-AA) mutasyonlarıdır. En sık görülen 6 mutasyon tüm allellerin % 70’inden fazlasını oluştururken, sıralamadaki ilk 12 mutasyon % 83.3’ünü oluşturur. Türkiye’de görülen 41 mutasyon ve bu mutasyonların mekanizmaları Çizelge 2.3’te verilmiştir. (Altay 2002, Genç ve ark. 2012, Güneşaçar ve Çelik 2011, Güvenç ve ark. 2012, Mendilcioğlu ve ark. 2011, Öner ve ark. 2001, Tadmouri ve ark. 1998, Tadmouri ve Başak 2001, Yılmaz ve ark. 2000)

Çizelge 2.3. Türkiye’de Görülen Beta Talasemi Mutasyonları.

Sayı	Mutasyon	Tip	Etnik köken	Mekanizma
1	-101 C>T	beta ⁺	Türk, Bulgar, İtalyan	Promotor bölgedeki korunmuş dizilerden biri olan CACCC kutusundaki bir mutasyon olmakta ve mekanizması tam olarak bilinmemektedir.
2	-87 C>G	beta ⁺	Akdeniz	Promotor bölgedeki korunmuş dizilerden biri olan CACCC kutusunda bir mutasyon meydana gelmekte ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını kısıtlayarak beta globin geninin transkripsiyonunu azaltmaktadır.
3	-30 T>A	beta ⁺	Türk, Makedon, Bulgar	Promotor bölgedeki korunmuş dizilerden biri olan TATA kutusunda bir mutasyon meydana gelmekte ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını kısıtlayarak beta globin geninin transkripsiyonunu azaltmaktadır.
4	-28 A>C	beta ⁺	Kürtler	Promotor bölgedeki korunmuş dizilerden biri olan TATA kutusunda bir mutasyon meydana gelmekte ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını kısıtlayarak beta globin geninin transkripsiyonunu azaltmaktadır.
5	+22 G>A	beta ⁺	Türk, Bulgar, İtalyan	5’ UTR bölgesinde meydana gelen bu mutasyon transkripsiyonu ve ribozomların bağlanmasını kısıtlamaktadır.

Çizelge 2.3. Türkiye’de Görülen Beta Talasemi Mutasyonları çizelgesinin devamı

Sayı	Mutasyon	Tip	Etnik köken	Mekanizma
6	Kodon 5 (-CT)	beta ⁰	Akdeniz	Bu delesyon çerçeve kaymasına neden olarak 21. kodonu bir stop kodonuna (TGA) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
7	Kodon 6 (-A)	beta ⁰	Akdeniz, Amerikan siyahileri	Bu delesyon çerçeve kaymasına-neden olarak 18. kodonu bir stop kodonuna (TGA) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
8	Kodon 8 (-AA)	beta ⁰	Akdeniz	Bu delesyon çerçeve kaymasına neden olarak 21. kodonu bir stop kodonuna (TGA) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
9	Kodon 8/9 (+G)	beta ⁰	Hint Asya	Bu insersiyon çerçeve kaymasına neden olarak 22. kodonu bir stop kodonuna (TGA) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
10	Kodon 15 (TGG>TAG)	beta ⁰	Hint Asya, Türk	Bu anlamsız mutasyon 15. kodonu bir stop kodonuna (TAG) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
11	Kodon 22/23/24 (- AAGTTG G)	beta ⁰	Türk	Çerçeve kaymasına (frameshift) neden olarak 58. kodonu bir stop kodonuna (TAG) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
12	Kodon 26 (G>A) (Hb E; Glu->Lys)	beta ⁺	Güneydoğu Asya	Dünyadaki en yaygın 2. Hb varyantı olan HbE’yi oluşturmaktadır.
13	Kodon 27 (Hb Knossos)	beta ⁺	Akdeniz	Kodon 25’teki alternatif “yapışma (splicing) bölgesini aktive ederek normal mRNA’nın miktarını azaltmaktadır.

Çizelge 2.3. Türkiye’de Görülen Beta Talasemi Mutasyonları çizelgesinin devamı

Sayı	Mutasyon	Tip	Etnik köken	Mekanizma
14	Kodon 30 (G>C) IVS-I (-1)	beta ⁰	Amerikalı siyahiler, Tunuslular, BAE, Hint	Kodon 30’un ilk iki nükleotidi olan AG dinükleotidi normal “splicing” mekanizması için gereklidir. Bu dinükleotiddeki değişimler “splicing”i tamamen engelleyerek normal mRNA oluşumunu ortadan kaldırmaktadır.
15	IVS-I-1 (G>A)	beta ⁰	Akdeniz, Hint Asya	“Splicing” mekanizması için gerekli olan GT dinükleotidindeki bu değişimler “splicing”i tamamen engelleyerek normal mRNA oluşumunu ortadan kaldırmaktadır.
16	IVS-I-1 (G>T)	beta ⁰	Hint Asya	
17	IVS-I-5 (G>A)	beta ⁺	Cezayir, Akdeniz	
18	IVS-I-5 (G>C)	beta ⁺	Hint Asya, Çin, Malezya	Normal 5’ “splicing” bölgesindeki “splicing”in etkinliğini azaltmaktadır.
19	IVS-I-5 (G>T)	beta ⁺	Akdeniz, Amerikalı siyahileri	
20	IVS-I-6 (T>C)	beta ⁺	Akdeniz	5’ “splicing” bölgesindeki “splicing”in etkinliğini azaltmaktadır.
21	IVS-I-110 (G>A)	beta ⁺	Akdeniz	% 20 normal, % 80 anormal bağlanmış mRNA oluşumuna yol açan yeni bir “splice” bölgesi oluşturmaktadır.
22	IVS-I-116 (T>G)	beta ⁰	Akdeniz	Normal mRNA %1’den daha azdır.
23	IVS-I-130 (G>A)	beta ⁰	Mısır	Konsensus akseptör dizisindeki bu değişim (AG>AA) “splicing”i engellemektedir.

Çizelge 2.3. Türkiye’de Görülen Beta Talasemi Mutasyonları çizelgesinin devamı

Sayı	Mutasyon	Tip	Etnik köken	Mekanizma
24	IVS-I-130 (G>C)	beta ⁰	Türk, Japon	Konsensus akseptör dizisindeki bu değişimler (AG>AC) “splicing”i engellemektedir.
25	Kodon 36/37 (-T)	beta ⁰	İran, Kürtler	Bu delesyon çerçeve kaymasına neden olarak 60. kodonu bir stop kodonuna (TGA) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
26	Kodon 37 (G>A)	beta ⁰	Suudi Arabistan, İspanya	Bu anlamsız mutasyon 37. kodonu bir stop kodonuna (TAG) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
27	Kodon 37/38/39 (- GACCCA G)	beta ⁰	Türkler	Bu delesyon çerçeve kaymasına neden olarak 37. kodonu bir stop kodonuna (TGA) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
28	Kodon 39 (C>T)	beta ⁰	Akdeniz	Bu anlamsız mutasyon 39. kodonu bir stop kodonuna (TAG) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
29	Kodon 44 (-C)	beta ⁰	Kürtler	Bu delesyon çerçeve kaymasına neden olarak 60. kodonu bir stop kodonuna (TGA) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
30	Kodon 74/75 (-C)	beta ⁰	Türkler	Bu delesyon çerçeve kaymasına neden olarak 88. kodonu bir stop kodonuna (TGA) dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.
31	IVS-II-1 (G>A)	beta ⁰	Akdeniz; Tunus; Amerikalı siyahiler	5’ yapışma bölgesini ortadan kaldırmaktadır.

Çizelge 2.3. Türkiye’de Görülen Beta Talasemi Mutasyonları çizelgesinin devamı

Sayı	Mutasyon	Tip	Etnik köken	Mekanizma
32	IVS-II-654 (C>T)	beta ⁺	Çin	Tercihen kullanılan yeni bir restriksiyon bölgesi oluşturmaktadır.
33	IVS-II-745 (C>G)	beta ⁺	Akdeniz	Tercihen kullanılabilir yeni bir “splicing” bölgesi oluşturmaktadır.
34	IVS-II-848 (C>A)	beta ⁺	Amerikalı siyahiler, Mısır, İran	“Splicing”i azaltmakta fakat elimine etmemektedir.
35	3'UTR +1,565'de n +1,577'ye	beta ⁺ beta ⁰	Türk	mRNA'yı instabil hale getirmektedir.
36	PolyA (T>C)	beta ⁺	Amerikan siyahileri	Normal polyA bölgesindeki mRNA'nın ayrılma ve poliadenilasyonunu etkisiz hale getirmektedir.
37	PolyA (A>G)	beta ⁺	Kürtler	
38	PolyA (A>G)	beta ⁺	Akdeniz	
39	290 bp delesyon	beta ⁰	Türk, Bulgar	Hatalı mRNA oluşumuna yol açarak normal beta globin sentezini engellemektedir.
40	~ 7.6 kb	beta ⁰	Türk	Beta zincir sentezi olmamaktadır.
41	Kodon 9/10 (+T)	beta ⁰	Türk , Yunanistanlı, İranlı	Bu insersiyon çerçeve kaymasına neden olarak 22. kodonu bir stop kodonuna dönüştürmekte ve translasyonun bu kodonda sonlanmasına yol açmaktadır.

2.10. Beta Talasemide Tanı Yöntemleri

Beta talasemi taşıyıcı ailelerin tespiti için öncelikle kırmızı kan hücresi eritrosit sayılarına bakılmakta olup hemogloblin analizleri gereklidir (Kohne 2011). Beta talasemiye sebep olan mutasyonları tanımlamak için yetişkin ve fetüs DNA'sı kullanılarak çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Spesifik bir coğrafyada mutasyon dağılımı moleküler tanı merkezlerinde belirlenebilmektedir. Anneye ait dolaşımdaki fetal DNA'nın analizine yönelik yeni non-invazif teknikler geliştirilmektedir (Lo ve Chiu 2002).

2.10.1. Klinik Tanı

Talasemi major 2 yaşından küçük çocuklarda ağır mikrositik anemi, hafif sarılık ve hepatosplenomegaliyle seyreder. Beta talasemi majör uzun dönem transfüzyon bağımlı anemi ile seyreder ve tedavi almayan çocuklar 10 yaşından önce ölürlür. Tedavi alan hastalar 50-60 yaşlarına kadar yaşayabilirler. Talasemi intermedia, benzer bir klinik tablo oluştursa da daha hafif klinik bulgular verir. Bu hastalarda transfüzyon bağımlılığı değişkendir. Talasemi intermedianın tipik komplikasyonları iskelet deformiteleri ve ağır hiperplastik eritropoez kaynaklı tümöral kitlelerdir. Talasemi minör ise hafif, mikrositik hipokromik anemi ile karakterizedir (Kohne 2011).

2.10.2. Hematolojik Tanı

Eritrosit indeksleri mikrositik anemi tanısında önemlidir. Talasemi majör düşük Hb seviyesi (<7 g/dl), MCV (ortalama eritrosit hacmi) >50<70 fl ve MCH (ortalama eritrosit hemoglobini) >12<20 pg ile karakterize iken talasemi intermedia 7-10 g/dl Hb seviyesi, 50-80 fl MCV ve 16-24 pg MCH ve talasemi minör ise düşük MCV, MCH ve artmış HbA₂ seviyeleri ile karakterizedir (Galanello ve Origa 2010).

2.10.3. Periferal Kan Yayması

Hastaların eritrosit yaymalarında mikrositozis, hipokromia, anizositozis, poikilositosis (gözyaşı damlası ve uzamış hücreler) ve çekirdekli eritrosit (eritroblastlar) gibi morfolojik değişiklikler görülür. Eritroblastların sayısı aneminin derecesiyle ilişkili olup splenektomi sonrası ciddi şekilde artış gösterir. Taşıyıcılarda hastalardakinden farklı

olarak eritrositlerde daha hafif morfolojik değişiklikler görülür. Taşıyıcılarda eritroblastlar gözlenmez (Galanello ve Origa 2010).

2.10.4. Hemoglobin Analizi

Talasemi taşıyıcılarının tespitindeki metodolojik uygulama eritrosit içeriğinin tamamen belirlenmesi ve HbA₂ ile HbF'in kantitatif tespitine dayanmaktadır (Giambona ve ark. 2009). Selüloz asetat elektroforezi ve DE-52 mikrokromatografi veya HPLC (High-performance liquid chromatography) yoluyla kalitatif ve kantitatif Hb analizi, mevcut Hb'nin miktarı ve tipini belirlemede kullanılmaktadır.

Beta talasemide Hb çeşidi Beta talaseminin tipine göre değişmektedir. Homozigot Beta⁰ talasemide HbA yoktur ve HbF total hemoglobinin %92-95'ini oluşturur. Beta⁺ talasemi homozigotlarda ve beta⁺/beta⁰ genotipinde HbA seviyesi %10-30 arasında olup HbF seviyesi ise %70-90 arasındadır. HbA₂ düzeyi homozigot Beta talasemi hastalarında değişken olup Beta talasemi minörde artmaktadır.

Hb elektroforezi ve HPLC testleri Beta talasemiyle ilişkisi olabilecek diğer hemoglobinopatileri (S, C, E, O_{Arab}, Lepore) de tespit edebilmektedir (Galanello ve Origa 2010).

2.10.5. Moleküler Tanı

Farklı popülasyonlarda hastalığın sınırlı sayıda mutasyonunun olması moleküler genetik testlerin uygulanabilirliğini arttırmaktadır. Genel olarak beta globin geninde görülen mutasyonlar PCR tabanlı yöntemlerle tespit edilebilmektedir. En sık kullanılan yöntemler arasında reverse (ters) dot blot analizi veya primer spesifik amplifikasyon testleri yer almaktadır. Bu yöntemlerle tanımlanamayan beta globin genindeki mutasyonların tespiti dizi analizi yöntemi kullanılarak yapılabilmektedir (Galanello ve Origa 2010).

2.11. Tedavi

Beta talasemi hastalığının kesin ve kalıcı bir tedavisi bulunmamaktadır. Hastalar yaşamlarını devam ettirebilmek için düzenli kan transfüzyonu ve şelasyon tedavisi almalıdırlar. Tedavide amaç transfüzyon sonrasında hemoglobin konsantrasyonunu 130-140 g/L'ye yükseltmek ve hemoglobin seviyesini 9-10 g/dl düzeyinde tutmaktır. Transfüzyon alan hastalarda 10'lu yaşlarda kardiyomiyopati, karaciğer fibrozu ve endokrin fonksiyon bozukluğu gibi demir birikimi kaynaklı komplikasyonlar görülmeye başlamaktadır. Demir birikiminin azaltılmasında kullanılan demir şelatörleri (desferrioxamine) morbidite ve mortalite oranlarında önemli iyileşmeler sağlamaktadır (Borgna- Pignatti ve ark. 2005).

Günümüzde majör Beta talasemide kemik iliği ve kordon kanı nakilleri kalıcı bir tedavi sağlarken, kök hücre nakli ve gen terapisi yöntemleri de geliştirilme aşamasındadır.

Bazı Beta talasemi intermedialı hastalarda da kan transfüzyonuna ihtiyaç duyulabilirken, talasemi minörlü hastalarda ağır anemi için folik asit desteği uygulanabilmektedir (Kohne 2011).

2.12. Korunma

Beta talaseminin önlenmesi taşıyıcı tespitine, genetik danışmanlığa ve prenatal tanıya dayanır. Genetik danışmanlık ile, taşıyıcı bireylere hastalığın seyri, kalıtımı, mevcut ve araştırılan tedavi yöntemleri hakkında bilgi verilmesi amaçlanmaktadır. Artmış risk durumunda doğum öncesi (prenatal) genetik tanı gebeliğin 15- 18. haftalarında elde edilen amniyotik sıvıdan alınan fetal hücrelerden veya gebeliğin 11. haftasındaki koryonik villus örneklerinden elde edilen DNA'nın moleküler analiziyle yapılmaktadır. Son yıllarda, anne kanından elde edilen fetüse ait hücrelerde genetik analiz yöntemlerinin, diğer bir deyişle non-invaziv tanı yöntemlerinin geliştirilmesi için çalışmalar yapılmaktadır (Borgna-Pignatti ve ark. 2005, Galanello ve Origa 2010, Kohne 2011).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmaya Antakya Devlet Hastanesi ve İskenderun Doğum ve Çocuk Bakım Hastanesi Kalıtsal Kan Hastalıkları Merkezinde kan transfüzyonu yapılan Beta talasemi hastaları (40 kadın, 55 erkek; yaş ortalaması 13.85 ± 7.26) ile Mustafa Kemal Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Hematoloji polikliniğinde klinik olarak Beta talasemi minör şüphesi olan ve aralarında akrabalık ilişkisi olmayan bireyler (25 kadın, 17 erkek; yaş ortalaması 22.55 ± 13.54 standart sapma) dahil edildi. Çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Etik Kurulundan onay alındı.

3.1. Araç ve Gereçler

3.1.1. Araçlar

- Tam Kan Sayım Cihazı (Abbott Cell-Dyn 3700 Hematology Analyzer, AVUSTRALYA)
- Santrifüj (NF 048; Nüve, TÜRKİYE)
- Isı bloğu (Thermo shaker; TS 100, Biosan)
- PCR Cihazı (Thermal cycler, Applied Biosystems, ABD)
- Elektroforez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, ABD)
- UV Transillumunator (Wealtec, Dolphin-View, ABD)
- DNA Dizi Analizi Cihazı (Applied Biosystems Genetic Analyzer; Hitachi AB, Applied Biosystem Genetic Analyzer 3130, USA)
- Otomatik pipetler (Discovery, Transferpette)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Agaroza (Sigma)
- Brom-fenol (Sigma)
- DNA Ladder (100 bp, Fermentas)
- Eritrosit Lizis Tamponu
- Etil Alkol (Merck)
- Etidium Bromid (Sigma)
- Kloroform (Sigma)
- Lizis Tamponu
- Proteinaz K
- SDS (Sodyumdodesilsülfat)
- Sodyum klorür, NaCl (Sigma)
- Sükröz
- TAE Elektroforez Tamponu 50X

3.2. Örneklerin Toplanması ve Hematolojik Analizi

Çalışmaya dahil edilen kişilerin isimleri, yaşı, eğitim durumu, tanısının ne zaman konulduğu, kaç kardeş olduğu, ebeveynler arasında akrabalık ilişkisi olup olmadığı, ebeveynlerinin evlenmeden önce taşıyıcı olduklarını bilip bilmedikleri gibi bilgilerin yer aldığı formlar dolduruldu. Çalışmada her hastadan 2 hemogram tüpüne 5'er ml kan örneği alındı ve tüpler ters-düz edilerek antikoagülan maddenin homojen olarak nüfuz etmesi sağlandı. Tüplerden biri moleküler çalışmalar için -20 °C'de saklanırken, diğer tüp hemogram analizi için hematoloji laboratuvarına yollanarak hemogram cihazında (Abbott

Cell-Dyn 3700 Hematology Analyzer, Australia) tam kan sayımı analizi yapıldı. Tam kan sayımı analizinde aşağıdaki parametrelere bakıldı.

Hemoglobin (Hb)

Hematokrit (HCT)

Eritrosit (RBC)

Lökosit (WBC)

Ortalama eritrosit hacmi (MCV)

Ortalama eritrosit hemoglobini (MCH)

Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (MCHC)

Eritrosit dağılım genişliği (RDW)

Trombosit (platelet) açısından değerlendirmeler yapıldı.



Şekil 3.1. Tam kan sayım cihazı (Abbott Cell-Dyn 3700 Hematology Analyzer, Australia).

Örnek toplama işlemi tamamlandıktan sonra DNA izolasyon işlemine geçildi. DNA izolasyonunu takiben uygun primerler yardımıyla aranan bölgelerin PCR amplifikasyonları yapıldı. Amplifiye edilen ürünler Applied Biosystems Genetic Analyzer (Hitachi AB, Applied Biosystem Genetic Analyzer 3130, USA) cihazıyla dizi analizine tabi tutularak incelendi. DNA izolasyonu, PCR amplifikasyonu ve dizi analizi aşağıda açıklandığı gibi yapıldı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Deneylerde Kullanılan Solüsyonların Hazırlanması

a) Eritrosit Lizis Tamponu (pH: 7.5) : 1 litre

- 0.32 M Sükroz : 109.5
- 10 mM Tris-HCl (pH: 7.5)
- 5 mM MgCl₂; MgCl₂ : 1.01 gr
- %1 Triton X 100: 10 gr

Yukarıda miktarları verilen maddeler (Triton X 100 hariç) karıştırılarak son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı. Triton X otoklavdan sonra eklenerek pH 7.5'a ayarlandı.

b) Lizis Tamponu

- 0.075 M NaCl : 4.4 gr
- 0.025 M EDTA: 9.3 gr

Yukarıda miktarları verilen maddeler karıştırılarak son hacim 1000 ml olacak şekilde bidistile su ile çözdürülüp otoklavlandı ve pH 7.5'e ayarlandı.

c) %10 SDS (Sodyum Dodesil Sülfat)

2 gr SDS bir miktar bidistile su içinde çözdürüldükten sonra son hacim bidistile su ile 20 ml'ye tamamlanarak oda ısısında muhafaza edildi.

d) Proteinaz K (20 mg/ml)

100 mg Proteinaz-K 5 ml bidistile suda çözülerek porsiyonlanıp -20 °C’de muhafaza edildi.

e) 50X TAE Elektroforez Tamponu: 1 litre

- 242 gr Tris Base (Sigma)
- 57.1 ml Glasiyal asetik asit
- 100 ml 0.5 M EDTA (pH 8) (Sigma)

Tris base, 600 ml distile su içerisinde çözdürüldükten sonra glasiyal asetik asit ve son olarak EDTA eklendi. Son hacim distile su ile 1 litreye tamamlandı. TAE 50X olacak şekilde stok solüsyon olarak hazırlandı ve 1xTAE olacak şekilde sulandırılarak kullanıldı.

f) Loading (yükleme) Tamponu (6X)

- 40 gr sükkroz
- 0.25 gr Bromfenol mavisi

Yukarıda miktarları verilen maddeler karıştırılarak 100 ml olacak şekilde bidistile su içinde çözdürüldü. Porsiyonlanarak -20 °C’de muhafaza edildi.

3.4. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu Miller ve arkadaşlarının (Miller ve ark, 1988) tarif ettiği tuz ile çöktürme yöntemi modifiye edilerek aşağıdaki şekilde gerçekleştirildi. Hemogram tüplerine (EDTA’lı tüpler) alınan kan örnekleri 3000 rpm’de 5 dk. santrifüj edildikten sonra plazma kısmı uzaklaştırıldı.

1. Tüpün en altındaki eritrositlerin hemen üst kısmındaki buffy-coat tabakasından 600 µl alınarak bir endorf tüpe kondu ve üzerine 900 µl eritrosit lizis tamponu eklendi. Karışım pipetlendikten sonra ara sıra alt-üst edilerek oda sıcaklığında 5 dk. tutuldu.
2. Tüpler 7000 rpm’de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant atıldı.
3. Pellet üzerine 900 µl lizis tamponu konularak pipetaj yapıldı.
4. 5000 rpm’de 5 dk. santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırıldı.

5. Pellet üzerine 0.5 ml %10'lük SDS (Sodyumdodesilsülfat) ve 10 µl proteinaz-K konularak köpük oluşmamasına dikkat edilerek pipetlendi. Tüpler arada bir alt üst edilerek 65 °C'de 30 dk. inkübasyona bırakıldı.
6. İnkübasyon sonunda +4 °C'de 3-5 dk. tutulduktan sonra üzerine 200 µl 6M NaCl eklenerek vortekslendi.
7. Tüpler 14.000 rpm'de 10 dk. santrifüj edildi.
8. Süpernatant steril bir tüpe alınarak üzerine 1:1 oranında %100'lük kloroform eklenip iyice vortekslendi.
9. 14.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
10. Süpernatant steril bir tüpe alınarak üzerine 1:1 oranında %100'lük soğuk etil alkol eklenip yaçaşça alt-üst edildi.
11. Alt-üst edilen tüpler 14.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi.
12. Tüp ters çevrilerek supernatant atıldı.
13. Dipte kalan pelet (DNA) üzerine 1 ml %70'lik etil alkol konularak bir-kaç kez alt-üst edildi.
14. Tüpler tekrar 13. adımda olduğu gibi santrifüj edilerek etil alkol uzaklaştırıldı (etil alkol uzaklaştırılırken DNA'nın atılmamasına dikkat edildi).
15. Tüpler ters çevrilerek bir kurutma kağıdı üzerine konuldu ve alkolün uçması için yaklaşık 15 dk. beklendi.
16. İzole edilen DNA üzerine steril bidistile su konularak tüpün dibindeki presipite olmuş DNA'nın erimesi sağlandı.
17. Son olarak PCR işleminde kullanılmadan önce DNA konsantrasyonu spektrofotometrik olarak aşağıda açıklandığı gibi belirlendi.

3.5. Spektrofotometrik Yöntemle DNA Konsantrasyonunun Belirlenmesi

Konsantrasyon ölçümü için spektrofotometrenin 1 ml hacimli quartz tüpleri kullanıldı. Bu tüplerden biri blank (referans) olarak seçildi. Bu tüpe 1000 µl, ikinci tüpe ise 990 µl steril bidistile su ve üzerine izole edilen DNA'dan 10 µl konuldu. Karışım pipetlenerek homojen hale getirildikten sonra her iki tüp spektrofotometrede 260 ve 280 nm dalga boyunda ayrı ayrı okunarak DNA konsantrasyonu ve DNA'nın saflığı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

DNA Konsantrasyonu = Absorbans (ABS)₂₆₀ X Sulandırma katsayısı X 50/1000
İzole edilen DNA'nın saflığı ise şu şekilde bulundu: ABS₂₆₀ / ABS₂₈₀

Bu şekilde ölçülen DNA'ların konsantrasyonları 100-200 ng/µl olacak şekilde ayarlandıktan sonra 3 ependorf tüpe bölünerek, PCR işlemi yapılincaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

3.6. Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması ve PCR Amplifikasyonu

İzole edilen genomik DNA örneklerinden, ticari olarak temin edilen GML HBB (GML SeqFinder Sequencing System, HBB Kit, Switzerland) kiti kullanılarak beta globin genine özgü bölgelerin (1. ve 2. bölge) amplifikasyonu gerçekleştirildi.

Reaksiyon Karışımlarının Hazırlanması

Çalışmada PCR karışımı 25 µl olacak şekilde ayarlandı. PCR karışımı aşağıdaki oranlarda hazırlandı.

Beta globin geninin 1. bölgesi için

Bileşen	Her örnek için µl hacim
GML Master Mix	12.5 µl
HBB1-F Primer	2.5 µl
HBB1-R Primer	2.5 µl
Betain	5.0 µl
Genomik DNA	2.5 µl
Toplam	25 µl

Beta globin geninin 2. bölgesi için

Bileşen	Her örnek için µl hacim
GML Master Mix	12.5 µl
HBB2-F Primer	2.5 µl
HBB2-R Primer	2.5 µl
Betain	5.0 µl
Genomik DNA	2.5 µl
Toplam	25 µl

Thermal cycler amplifikasyon döngüsü

Aşama	Tanımlama	Sıcaklık	Süre
1	İlk denatürasyon	95 °C	10 dk.
2	Amplifikasyon: 5 döngü	95 °C	30 sn.
		50 °C	30 sn.
		72 °C	90 sn.
3	Amplifikasyon: 5 döngü	95 °C	30 sn.
		55 °C	30 sn.
		72 °C	90 sn.
4	Amplifikasyon: 40 döngü	95 °C	30 sn.
		59 °C	30 sn.
		72 °C	90 sn.
5	Son uzama (final extension)	72 °C	7 dk.
6	Bekleme	+4 °C	∞

3.7. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi Tekniği ile Görüntülenmesi

PCR işleminden sonra amplifikasyon ürünlerinin varlığı % 2'lik agaroz jelde yürütülerek araştırıldı. Agaroz jelin hazırlanmasında TAE (Tris-Asetat-EDTA) tamponu kullanıldı.

1. Elektroforez için stok TAE solüsyonundan 1xTAE olacak şekilde distile su ile dilüe edildi.
2. 1 g agaroz tartılarak 100 ml'lik bir Erlenmayere konuldu, 50 ml 01X TAE tamponu eklendi (%2'lük agaroz) ve 10 mg/ml'lik ethidium bromid'den 4 µl ilave edildi.
3. Mikrodalga fırında 1-2 dk. kaynatıldı.
4. Elektroforez tarakları jel dökme kabına, tabanda 1mm boşluk kalacak şekilde ayarlanarak yerleştirildi.
5. Yaklaşık 60 °C'ye kadar soğutulan agaroz jeli, jel kabına dökülüp donması için oda sıcaklığında 30 dk. bekletildi.
6. Taraklar dikkatlice çıkartılarak jel kabı elektroforez tankına (Wealtec, Elite 300 Plus, USA) yerleştirildi.
7. Amplifiye edilen örneklerden 7'şer µl 3µl loading (yükleme) tamponu ile karıştırılarak jelde açılan kuyucuklara yerleştirildi.
8. Yükleme sırasında DNA marker (100 bp'lik, Fermentas) kullanıldı.
9. Jele elektrik akımı (15 Volt/cm) verilerek 30 dk. elektroforez yapıldı.
10. Yaklaşık 30 dk sonra yürütme işlemi durdurularak jel görüntüleme cihazı (Wealtec, Dolphin-View, USA) ile bantların varlığı incelendi.



Şekil 3.2. PCR ürünlerinin yürütüldüğü elektroforez ünitesi (Wealtec, Elite 300 Plus, USA)

3.8. PCR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Amplifikasyon sonunda elde edilen ürünler steril PCR tüplerine alındı. Her 5 µl PCR ürünü için 2 µl ExoSAP-IT (GML ExoSap-IT, Switzerland) eklenerek hafifçe vortekslendi ve thermal cycler cihazında aşağıdaki sıcaklık ve sürelerde inkübe edildi.

Enzim inkübasyonu	(37 °C)	30 dk.
Enzim inaktivasyonu	(80 °C)	15 dk.
Bekleme	(4 °C)	∞

3.9. Dizi Analizi Reaksiyonunun Hazırlanması

1. Tüm reaksiyonlar için 1'er tüp dizi analizi reaksiyon karışımı hazırlandı.
2. Her hasta için 4 steril PCR tüpü hazırlandı (1F, 1R, 2F, 2R için).
3. Her forward ve reverse reaksiyonlar için PCR tüplerine 2'şer µl PCR ürünü eklendi.
4. Sonra tüpler hafifçe vortekslenerek reaksiyon hacmi aşağıdaki tablolarda belirtildiği gibi 10'ar µl'ye ayarlandı.

Birinci tüp (1.bölge Forward için)

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Dye terminator mix	2.0
Sekans tamponu	2.0
HBB-1F primeri	2.0
Steril deiyonize su	2.0
Toplam hacim	8.0

İkinci tüp (1.bölge Reverse için)

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Dye terminator mix	2.0
Sekans tamponu	2.0
HBB-1R primeri	2.0
Steril deiyonize su	2.0
Toplam hacim	8.0

Üçüncü tüp (2.bölge Forward için)

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Dye terminator mix	2.0
Sekans tamponu	2.0
HBB-2F primeri	2.0
Steril deiyonize su	2.0
Toplam hacim	8.0

Dördüncü tüp (2.bölge Reverse için)

Bileşen	Her örnek için µl hacim
Dye terminator mix	2.0
Sekans tamponu	2.0
HBB-2R primeri	2.0
Steril deiyonize su	2.0
Toplam hacim	8.0

Yukarıda belirtildiği gibi hazırlanan tüpler aşağıdaki programda Thermal cycler cihazında inkübe edildi.

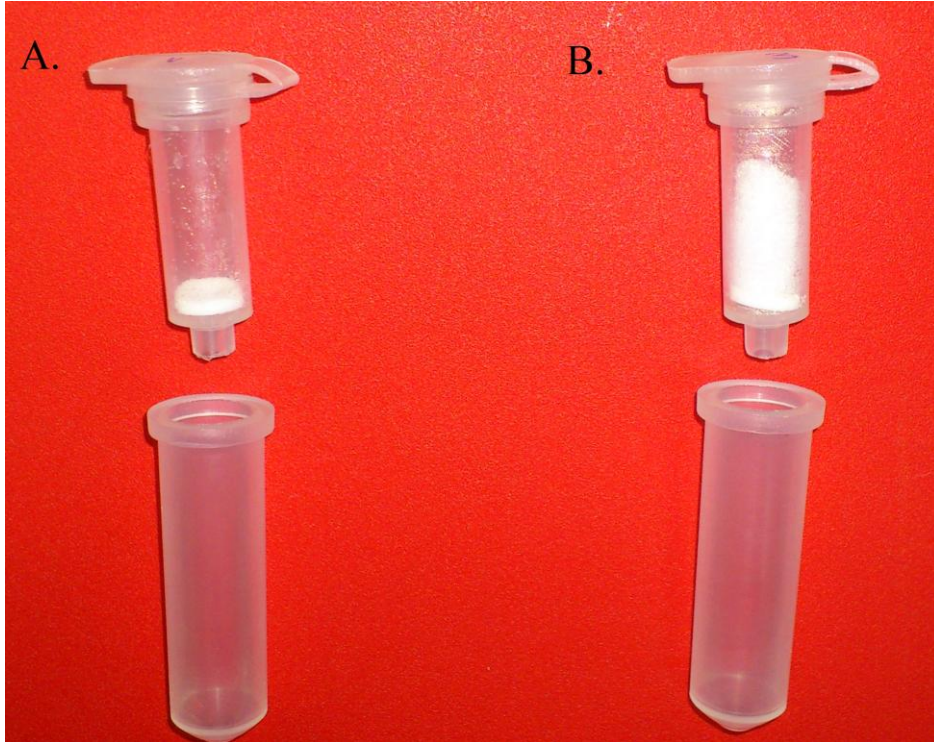
Aşama		Sıcaklık (°C)	Süre
1	Aktivasyon	96	1 dk.
2	25 döngü	96	10 sn.
		50	5 sn.
		60	4 dk.
3	Bekleme	4	∞



Şekil 3.3. Thermal cycler cihazı (Applied Biosystems, USA).

2.10. Dizi Analizi Ürünlerinin Saflaştırılması

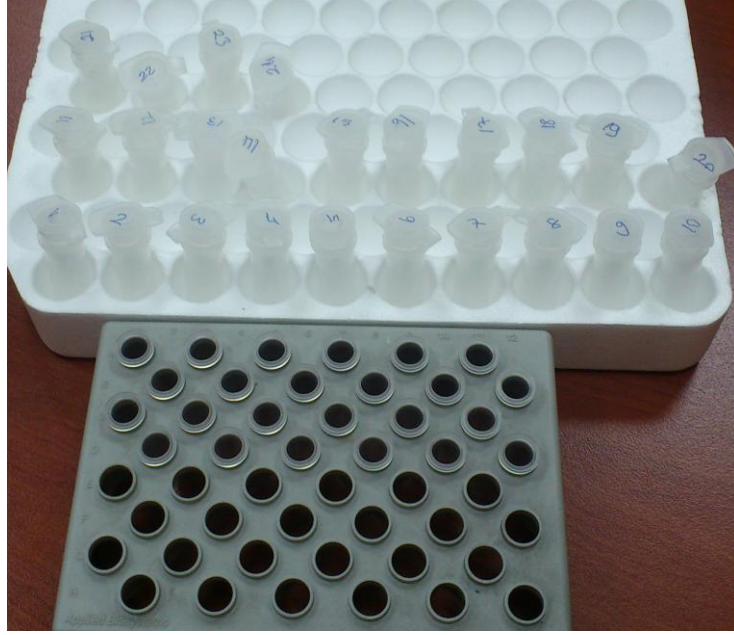
1. 1 gr Sephadex® G-50 (Sigma-Aldrich, Sweden) tartılarak 14 ml bidistile su içinde çözündürüldü. Vorteksledikten sonra 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
2. Her örnek için kolonlu tüplere 600 µl Sephadex konuldu.
3. Tüpler 2 dakika 4600 rpm'de santrifüj edildi.
4. Kolonlu tüplerin aşağısında bulunan toplama tüplerine filtre edilen kısım atıldı.
5. Kolonda biriken ve kristalize olan Sephadex'in üzerine daha önce elde edilen dizi analizi ürünü eklendi.
6. Bu aşamada 3. adım tekrar edildi.
7. Kolonun aşağısında bulunan toplama tüpüne filtre olan saf PCR ürünü, dizi analizinde kullanılmaya hazır hale getirildi.



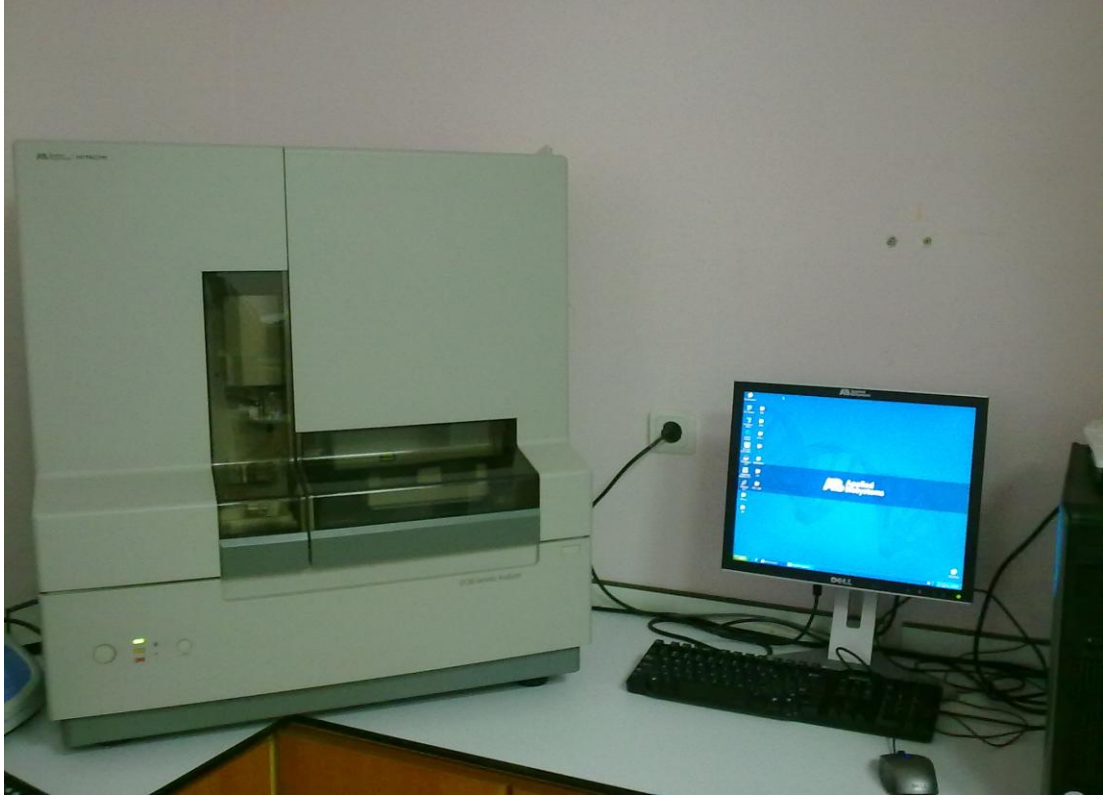
Şekil 3.4. Sekans analizi ürünlerinin pürifikasyonunda kullanılan kolonlu tüpler. A. Boş kolonlu tüp, B. İçinde kristalize halde sephadex bulunan kolonlu tüp.

3.11. Dizi Analizi İşleminin Uygulanması

Safılaştırılan sekans ürünleri dizi analiz cihazına (Hitachi AB, Applied Biosystem Genetic Analyzer 3130, USA) uygun sırayla aktarılarak elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Cihazda *Sequencing Analyses* programı (SeqScape Software v2.6) ile DNA dizi analizi işlemi gerçekleştirildi.



Şekil 3.5. Safılaştırılan sekans ürünleri ve ürünlerin dizi analizi cihazına aktarıldığı plate.



Şekil 3.6. Dizi analizi cihazı (Hitachi AB, Applied Biosystem Genetic Analyzer 3130, USA).

3.12. Sonuçların Yorumlanması

Beta globin geni nükleotid dizileri açısından SeqScape Software v2.6 kullanılarak orijinal beta globin gen bölgesi nükleotid dizisi ile karşılaştırılarak hastalarda varolan mutasyonlar tespit edildi.

4. BULGULAR

Çalışmada Antakya Devlet Hastanesi ve İskenderun Doğum ve Çocuk Bakım Hastanesi'nde transfüzyon yapılan 95 Beta talasemi hastası ile Mustafa Kemal Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Moleküler Genetik Laboratuvarına Beta talasemi minör ön tanısı ile gelen 42 hastanın DNA dizi analizleri Applied Biosystems Genetic Analyzer cihazında (Hitachi AB, Applied Biosystems Genetic Analyzer 3130, USA) gerçekleştirildi.

Çalışmada 65'i kadın, 72'si erkek olmak üzere toplam hasta sayısı 137'dir. Çizelge 4.1'de de görüldüğü gibi hastaların büyük çoğunluğunu Antakya merkezdeki hastalar oluşturmaktadır. Bunu sırasıyla Kırıkhan, Reyhanlı ve İskenderun'dan gelen hastalar izlemektedir (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Hastaların ilçelere göre dağılımı.

İlçe adı	Gelen hasta sayısı
Antakya	57
Kırıkhan	18
Reyhanlı	16
İskenderun	15
Altınözü	11
Dört Yol	8
Samandağ	4
Hassa	2
Yayladağı	2
Belen	1
Kumlu	1
TOPLAM	137

Hastalardan 30 tanesi Beta talasemi majör olarak tespit edilirken, 64'ü Beta talasemi intermedia ve 43'ü Beta talasemi minör olarak belirlendi (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2.Hastaların fenotip dağılımları.

Toplam hasta sayısı	Beta talasemi majör	Beta talasemi intermedia	Beta talasemi minör
137	30	65	42

Beta talasemi majör fenotipli hastaların tam kan sayımları incelendiğinde eritrosit ortalamaları $3.47 \pm 0.38 \times 10^6/\mu\text{l}$ olarak bulunurken; hemoglobin ortalamaları 8.98 ± 1.04 g/dL, hematokrit ortalamaları $\% 27.35 \pm 3.22$ olarak tespit edildi. Ortalama eritrosit hacmi 79.09 ± 3.96 fL, ortalama eritrosit hemoglobini 25.94 ± 1.25 pg olarak hesaplandı. Tam kan sayımları ayrıntılı bir biçimde Çizelge 4.3'te açıklanmıştır.

Çizelge 4.3. Majör fenotipli hastaların hemogram sonuçları.

	WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	RBC ($10^6/\mu\text{l}$)	HB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT ($10^3/\mu\text{l}$)	RDW- SD (fL)
Ortalama	12.00	3.47	8.98	27.35	79.09	25.94	32.81	372.46	44.32
Standart Sapma	7.11	0.38	1.04	3.22	3.96	1.25	1.39	126.47	7.09

Beta talasemi intermedia fenotipli hastaların tam kan sayımları incelendiğinde ise eritrosit ortalamaları $3.62 \pm 0.63 \times 10^6/\mu\text{l}$ olarak tespit edilirken; hemoglobin ortalamaları 8.88 ± 1.31 g/dL, hematokrit ortalamaları $\% 27.38 \pm 3.95$ ve ortalama eritrosit hacmi 76.66 ± 8.93 fL, ortalama eritrosit hemoglobini 24.89 ± 3.18 pg olarak hesaplandı (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. İntermedia fenotipli hastaların hemogram sonuçları.

	WBC (10 ³ /μl)	RBC (10 ⁶ /μl)	HB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (10 ³ /μl)	RDW- SD (fL)
Ortalama	14.19	3.62	8.88	27.38	76.66	24.89	32.44	411.73	48.33
Standart Sapma	14.07	0.63	1.31	3.95	8.93	3.18	1.43	234.88	9.58

Çizelge 4.5'te Beta talasemi minör fenotipli bireylerin tam kan sayımları verilmiştir. Bu çizelgeye göre eritrosit ortalamaları $4.63 \pm 1.02 \times 10^6/\mu\text{l}$ olarak tespit edilirken; hemoglobin ortalamaları $9.85 \pm 1.41 \text{ g/dL}$, hematokrit ortalamaları $\% 30.56 \pm 4.45$ ve ortalama eritrosit hacmi $67.67 \pm 9.99 \text{ fL}$, ortalama eritrosit hemoglobini $21.90 \pm 3.40 \text{ pg}$ olarak bulundu (Çizelge 4.5).

Çizelge 4.5. Minör fenotipli hastaların hemogram sonuçları.

	WBC (10 ³ /μl)	RBC (10 ⁶ /μl)	HB (g/dL)	HCT (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)	PLT (10 ³ /μl)	RDW- SD (fL)
Ortalama	11.60	4.63	9.85	30.56	67.67	21.90	32.36	325.86	59.87
Standart sapma	11.88	1.02	1.41	4.45	9.99	3.40	1.64	168.87	23.03

Çalışmamıza dahil edilen tüm bireylerin tam kan sayımları incelendiğinde ise eritrosit ortalamaları $3.86 \pm 0.86 \times 10^6/\mu\text{l}$, hemoglobin ortalamaları $9.17 \pm 1.34 \text{ g/dL}$, hematokrit ortalamaları $\% 28.24 \pm 4.16$ olarak bulunurken ortalama eritrosit hacmi $74.78 \pm 9.44 \text{ fL}$, ortalama eritrosit hemoglobini $24.32 \pm 3.28 \text{ pg}$ olarak tespit edildi (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6. Tüm hastaların hemogram sonuçları.

	WBC	RBC	HB	HCT	MCV	MCH	MCHC	PLT	RDW-SD
Ortalama	12.97	3.86	9.17	28.24	74.78	24.32	32.51	378.6	48.43
Standart sapma	12.14	0.86	1.34	4.16	9.44	3.28	1.48	198.0	12.08

Çalışmaya dahil edilen tüm bireylerin mutasyon dağılımı ve allel sıklığına bakıldığında ise ilk sıradaki IVS-I-110 (G>A) mutasyonunun toplam 47 birey, 62 allelde (%22.63) görüldüğü tespit edilmiştir. İkinci sırada 36 allelde IVS-I-1 (G>A) ve üçüncü sırada 29 allelde (%10.58) IVS-II-745 (C>G) mutasyonları saptanmıştır. IVS-I-6 (T>C), kodon 8 (-AA) mutasyonlarına sırasıyla 28 (%10.22) ve 19 (%6.93) allelde rastlanmıştır. Bu mutasyonları sırasıyla kodon 39 (C>T; 13/274, %4.74), kodon 5 (-CT; 9/274, %3.28), kodon 44 (-C; 8/274, %2.92), IVS-II-1 (G>A; 6/274, %2.19), IVS-II-848 (C>A; 6/274, %2.19) mutasyonlarının takip ettiği tespit edilmiştir. Bu verilen mutasyonlar dahil çalışmamızda tespit edilen toplam 19 mutasyon ve allel sıklıkları Çizelge 4.7’de ayrıntılı olarak verilmiştir.

Çizelge 4.7. Tüm bireylerin mutasyon dağılımı ve allel sıklığı.

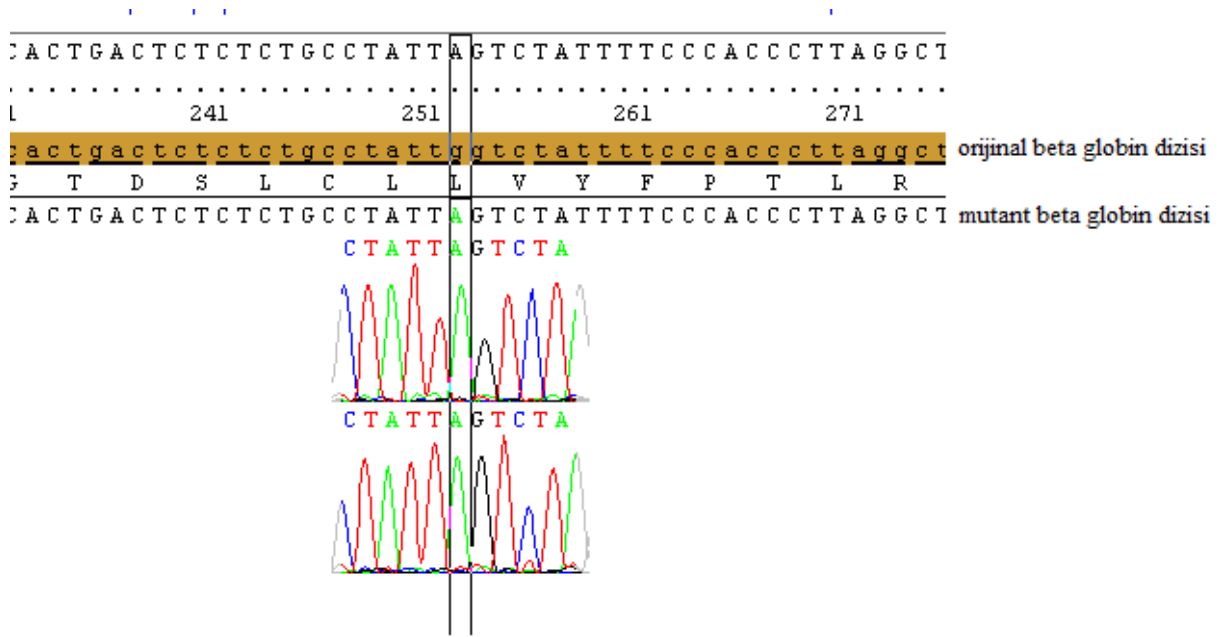
No	Mutasyon	Tip	Birey sayısı	Allel sayısı	Allel yüzdesi (%)
1	IVS-I-110 (G>A)	beta ⁺	47	62	22.63
2	IVS-I-1 (G>A)	beta ^o	27	36	13.14
3	IVS-II-745 (C>G)	beta ⁺	20	29	10.58
4	IVS-I-6 (T>C)	beta ⁺	20	28	10.22
5	Kodon 8 (-AA)	beta ^o	17	19	6.93
6	Kodon 39 (C>T)	beta ^o	12	13	4.74
7	Kodon 5 (-CT)	beta ^o	8	9	3.28
8	Kodon 44 (-C)	beta ^o	7	8	2.92
9	IVS-II-1 (G>A)	beta ^o	5	6	2.19
10	IVS-II-848 (C>A)	beta ⁺	4	6	2.19
11	IVS-I-5 (G>C)	beta ⁺	3	4	1.46
12	IVS-I-130 (G>C)	beta ^o	1	2	0.73
13	Kodon 17 (A>T)	beta ^o	1	2	0.73
14	Kodon 22/23/24 (-AAGTTGG)	beta ^o	1	2	0.73
15	Kodon 126 (Hb Beirut)	beta ⁺	2	2	0.73
16	Kodon 98 (GTG->ATG) (Hb Köln)	beta ^o	1	1	0.36
17	Kodon 90 (G>T)	beta ^o	1	1	0.36
18	Kodon 26	beta ⁺	1	1	0.36
19	Kodon 6	beta ^o	1	1	0.36
				Mutasyonlu allel sayısı:232 Mutasyonsuz allel sayısı:42 Toplam allel sayısı: 274	100

Çalışmada Hatay ili bölgelerine göre mutasyon dağılımı incelendiğinde hasta yoğunluğuyla doğru orantılı olarak mutasyon dağılımının görüldüğü tespit edildi. En fazla hasta yoğunluğu olan Antakya 100, daha sonra sırasıyla Kırıkhan, Reyhanlı, İskenderun bölgelerinde ise 29, 28 ve 26 allelde mutasyon görüldüğü saptanmıştır. En az hasta grubunu oluşturan 2 ilçeden Samandağ ve Yayladağı'nda sırasıyla 6 ve 4 allelde mutasyon olduğu tespit edildi (Çizelge 4.8).

Çizelge 4.8. İlçelere göre mutasyon dağılımları.

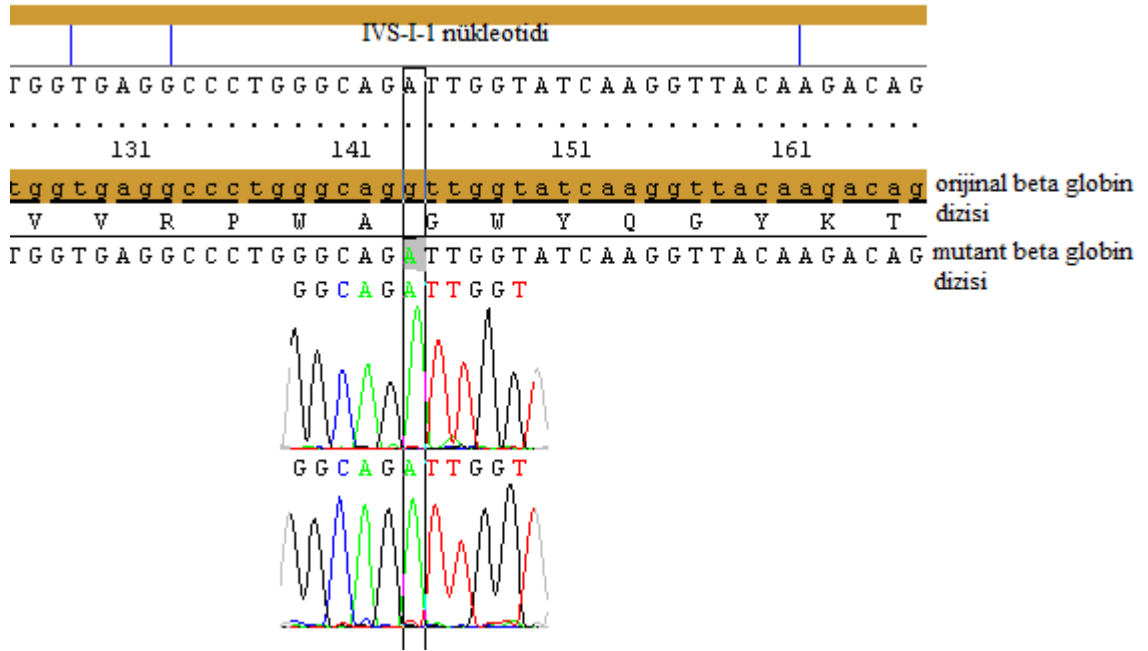
İlçeler Mu- tas- yon	Antakya	İskenderun	Kırıkhan	Dört Yol	Hassa	Belen	Kumlu	Reyhanlı	Altınözü	Samandağ	Yayladağı
	IVS-I-110	27	9	7	2	2	2	-	3	6	4
IVS-I-1	13	4	10	-	-	-	2	5	9	-	2
IVS-II-745	9	7	3	4	-	-	-	3	3	-	-
IVS-I-6	15	1	1	-	-	-	-	2	-	-	-
Kodon 8	14	1	1	1	-	-	-	1	1	-	-
Kodon 39	5	-	2	1	-	-	-	3	-	-	2
Kodon 5	7	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-
Kodon 44	1	-	-	3	-	-	-	4	-	-	-
IVS-II-1	-	-	4	1	-	-	-	1	-	-	-
IVS-II-848	4	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
IVS-I-5	1	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-
IVS-I-130	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-
Kodon 17	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kodon 22/23/24	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kodon 126	1	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Kodon 98	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Kodon 90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Kodon 26	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kodon 6	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOPLAM ALLEL SAYISI	100	26	29	13	2	2	2	28	19	6	4

Bazı mutasyonlara ait elektroferogramlar aşağıdaki şekillerde (Şekil 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 ve 4.5) verilmiştir. Bunlardan Şekil 4.4'deki elektroferogram Hemoglobin Köln, Şekil 4.5'deki elektroferogram ise Hemoglobin Beyrut'u göstermektedir. Bu iki hasta laboratuvarımıza beta talasemi minör ön tanısıyla gönderilmiş olup bu hastalarda tesadüfen hemoglobin varyantları tespit edilmiştir. Bu iki hemoglobin varyantı ülkemizde ilk kez gösterilmiştir.



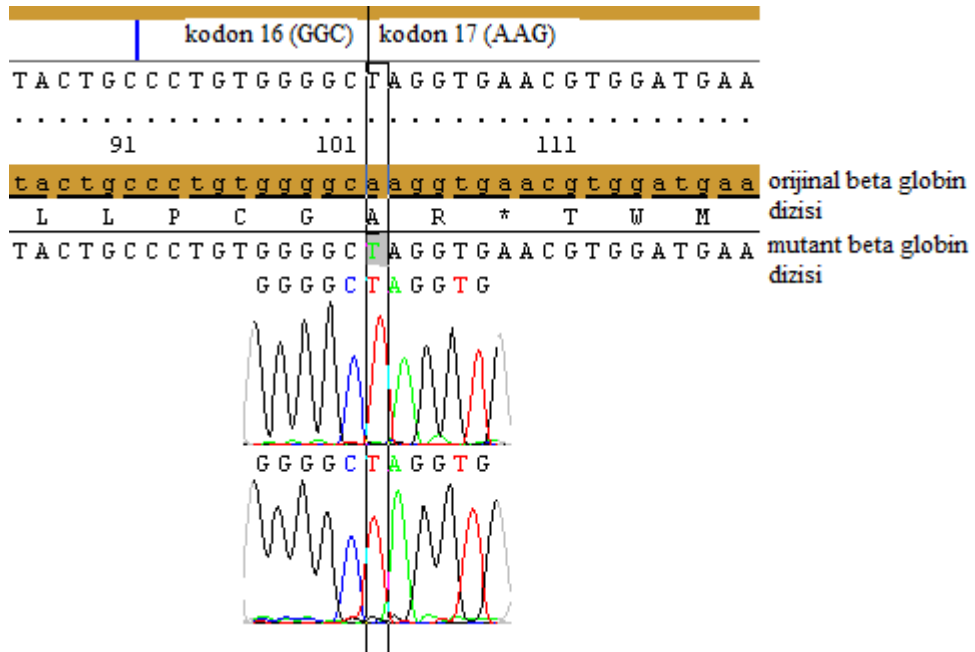
Şekil 4.1. Homozigot IVS-I-110 mutasyonu elektroferogramı (G>A değişimi).

İşaretli sütun IVS-I-110'daki orijinal nükleotid olan 'Guanin'in 'Adenin'e dönüşümünü işaret etmektedir.



Şekil 4.2. Homozigot IVS-I-1 mutasyonu elektroferogramı (G>A değişimi).

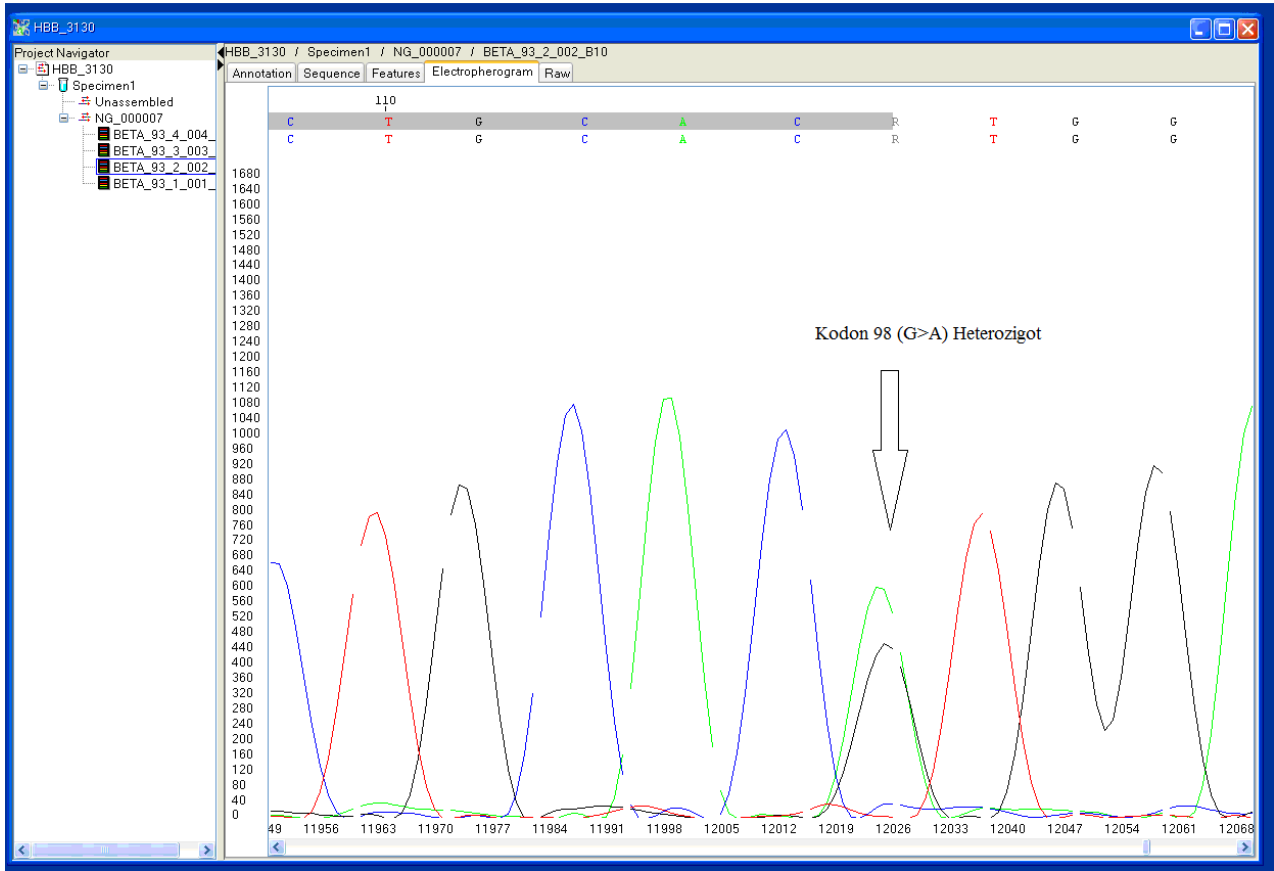
İşaretili sütun IVS-I-1'deki orijinal nükleotid olan 'Guanin'in 'Adenin'e dönüşümünü işaret etmektedir.



Şekil 4.3. Homozigot Kodon 17 mutasyonu elektroferogramı (A>T değişimi).

İşaretili sütun kodon 17'deki orijinal nükleotid olan 'Adenin'in 'Timin'e dönüşümünü işaret etmektedir.

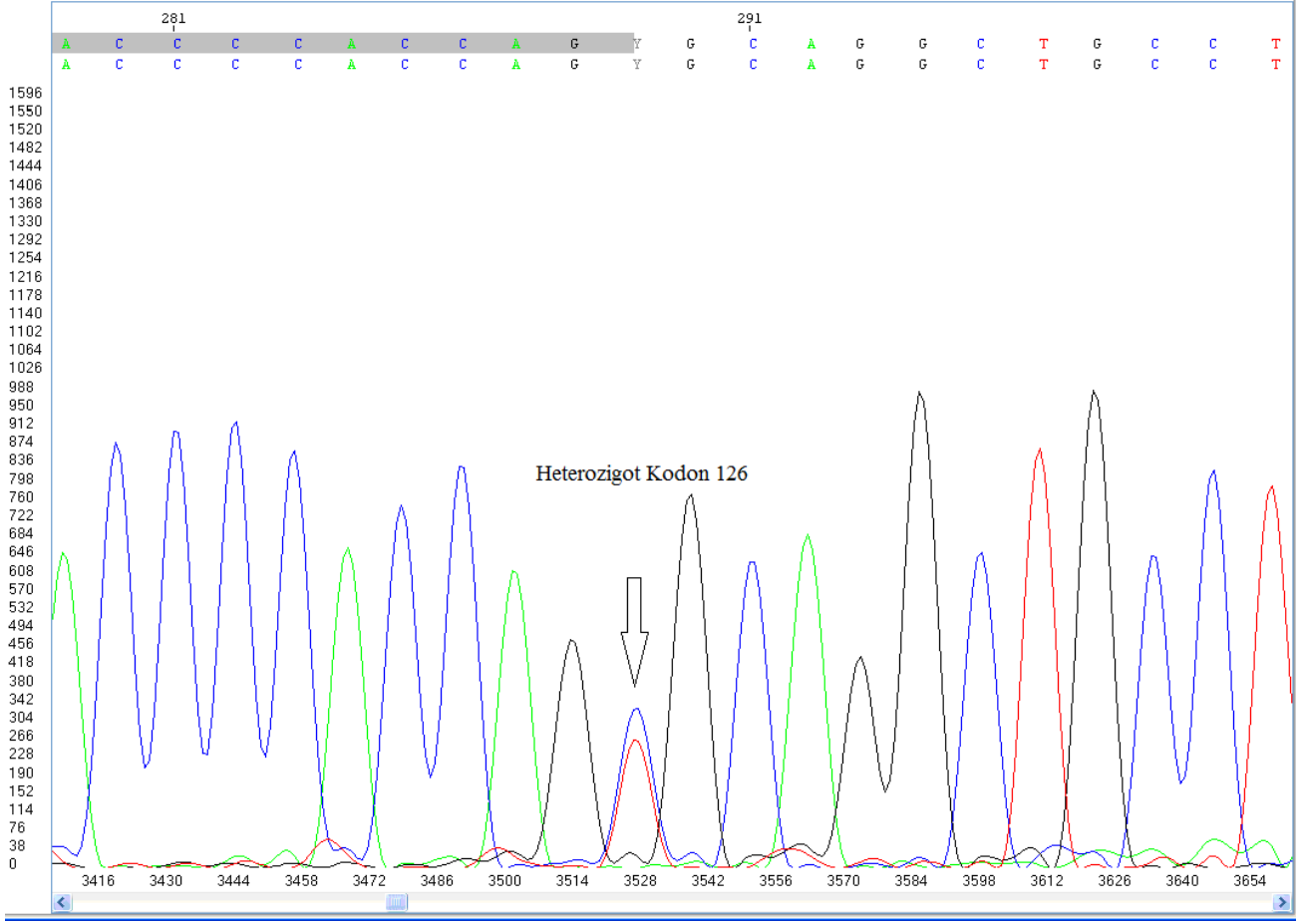
AAG (Lys) >TAG (stop kodonu)



Şekil 4.4. Heterozigot Kodon 98 mutasyonu elektroferogramı (Hb Köln, G>A değişimi).

İşaretili sütun kodon 98'deki orijinal nükleotid olan 'Adenin'in 'Timin'e dönüşümünü işaret etmektedir.

GTG >ATG (Val->Met)



Şekil 4.5. Heterozigot Kodon 126 mutasyonu elektroferogramı (Hb Beirut, T>C değişimi).

İşaretleli sütun kodon 126'daki orijinal nükleotid olan 'Timin'in 'Sitozin'e dönüşümünü işaret etmektedir.

GTG >GCG (Val->Ala)

5. TARTIŞMA

Kalıtsal hemoglobin hastalıkları (hemoglobinopatiler) hemoglobin varyantları ve talasemiler olmak üzere 2 grupta incelenir. Talasemiler hemoglobin sentezindeki bozukluklardan kaynaklanan, dünyadaki en yaygın tek gen hastalıklarıdır (Higgs ve ark. 2012, Weatherall 2004). Hemoglobinin tetramer yapısındaki α ve β -benzeri globin zincirlerinin sentezi ve yapısındaki bozukluklar kalıtsal anemilerin en sık görülen formlarını oluşturmakta ve talasemi hastalarında ya α -benzeri ya da β -benzeri globin zincirlerinin üretiminde bir problem olduğu bildirilmektedir (Higgs ve ark 2012). α -globin sentezinin eksikliğinde Alfa talasemi, β - globin sentezinin eksikliğinde ise Beta talasemi oluşmaktadır. Günümüzde α - ve β - globin zincirlerinin sentezini veya yapısını etkileyen 1000'den fazla mutasyon olduğu bildirilirken, Beta talasemili hastalarda beta globin genlerinde ise ikiyüzden fazla mutasyon tespit edilmiştir (Higgs 2004).

Talasemiler Afrika, Akdenize kıyısı olan ülkeler, Orta Doğu, Hindistan yarımadası, Güney Çin ve Güneydoğu Asya'ya kadar dünyada oldukça geniş bir alanda yayılım göstermektedir (Weatherall 2004). Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre dünya nüfusunun %1-5'inin Beta talasemi taşıyıcısı olduğu bildirilirken tüm dünyada her yıl yaklaşık 60.000 hasta bebek doğumunun gerçekleştiği bildirilmektedir (Higgs ve ark. 2012).

Beta talasemi minör hastaları (tek beta talasemi allelinde mutasyon olan kişiler) morfolojik açıdan anormal eritrositlere sahip olsalar da, bu kişilerin klinik olarak sağlıklı kişiler olduğu bildirilmiştir. Globin geninde homozigot veya birleşik heterozigot mutasyon olan kişilerde ise hemolitik aneminin görülebileceği bildirilmiştir. Talasemi tanısında tam kan sayımı ve kan yaymasının önemli yeri vardır. MCH (ortalama eritrosit hemoglobini), MCHC (ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu) ve RBC (eritrosit sayısı) önemli tanı kriteridir. Talasemi, demir ve ferritin eksikliğinden kaynaklı demir eksikliği anemisiyle birbirinden ayrılır. Talasemi minör hastalarında kan sayımı değerleri genellikle normal olmakla birlikte ortalama MCV (eritrosit hacmi) ve MCH değerlerinin azaldığı bildirilmektedir. Literatürde belirtildiği gibi çalışmamızda Beta talasemi minör hastalarının kan sayım sonuçları incelendiğinde hemotokrit ortalamasının % 36'dan küçük, MCV'nin 80 fl'den ve MCHC'nin ise 33 pg'den küçük olduğu görülmektedir. Beta talasemi

intermedia ve major hastalarında ise hemotokrit değerinin % 28'den, MCV değeri 80 fl'den, MCHC ise 33 pgden küçük olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda da Beta talasemi minör hastalarının ortalama MCV, MCH, MCHC ve hemoglobin miktarları normal bulunurken, Beta talasemi intermedia ve Beta talasemi major hastalarında da hemoglobin düzeylerinin çok farklı olmadığı tespit edilmiştir.

Dünya konjonktüründe ülkemiz, talasemi frekansının yüksek olduğu ülkeler arasında yer almaktadır. Yapılan çeşitli çalışmalarda ülkemizde talasemi taşıyıcı frekansının %2- 11 arasında değiştiği bildirilmektedir (Altay 2002, Tadmouri ve ark. 1998, Tadmouri ve Başak 2001). Özellikle Akdeniz bölgesi yerleşim bölgeleri ile Batı Anadolu ve Trakya bölgeleri yüksek talasemi insidansı ile seyreden yerleşim alanları arasında yer almaktadır. Ülkemizde yüksek doğum hızı ve akraba evlilikler sebebiyle hasta bebek sayısı da yüksektir. Beta talaseminin yüksek frekansta görüldüğü bildirilen bu bölgelerde Beta talasemi hastalarında β -globin geninde oldukça yüksek mutasyon heterojenitesinin görüldüğü bildirilmiştir.

Hastalıkla mücadelede Beta talasemi taşıyıcılarının belirlenmesi, hastalığa neden olan mutasyonların moleküler yöntemlerle tespit edilmesi ve genetik danışmanlık hizmetinin verilmesi hasta çocuk doğumlarını önlemede oldukça önemlidir. PCR ve moleküler temelli yöntemlerin özellikle de DNA dizi analiz çalışmalarının araştırmalarda kullanılmasını takiben Beta talasemi mutasyonlarının hızlı ve doğru tanısı yapılmaya başlanmıştır.

Beta talasemide sensitif yöntemlerle mutasyonun belirlenmesi hastalığın tanısında oldukça önemlidir. Beta talasemi mutasyonlarının araştırıldığı moleküler çalışmalar farklı bölgelerde ve etnik gruplarda farklı beta globin mutasyonların görülebileceğini göstermiştir. Bugüne kadar ülkemizde çeşitli şehir ve bölgelerde beta globin gen mutasyonlarıyla ilgili olarak çok sayıda çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardan biri 2012 yılında Adana bölgesinde yapılmıştır. Beta talaseminin en sık görüldüğü illerden biri olan Adana'da yapılan bu çalışmada Beta talasemi frekansının belirlenmesi amaçlanmış, çalışmaya Kalıtsal Kan Hastalıkları Merkezi'ne kayıtlı 3.000 birey dahil edilmiştir. Çalışmada beta-globin geninin moleküler analizi beta-globin strip assay yöntemi ile yapılmış, Beta talasemi frekansı %13.46 olarak bulunurken, Beta talasemili hastalarda

toplam 18 farklı mutasyonun tespit edildiği bildirilmiştir. Moleküler analizlerde Beta talasemi geninde tespit edilen mutasyonların sıklık oranlarına göre dağılımının IVS-I-110 (G>A), kodon 8 (-AA), IVS-I-1 (G>A), IVS-I-6(T>C), -30(T>A), IVS-II-1(G>A), kodon 39(C>T), kodon 44 (-C), IVS-I-5 (G>C), kodon 5 (-CT), kodon8/9 (+G), IVS-II-745 (C>G), kodon 22 (7 bp delesyon), -101 (C>T), kodon36/37 (-T), IVS-I-15 (T>G), kodon 6(-A), -88(G>A) şeklinde olduğu bildirilmiştir. Hatay bölgesine en yakın illerden biri ve Beta talaseminin en sık görüldüğü kentlerin başında gelen Adana bölgesindeki mutasyon tiplerinin çalışmamızla kıyaslandığında benzer mutasyonlar olduğu görülmektedir. Çalışmamızda, Adana’da yapılan bu çalışmadan farklı olarak kodon 98 (GTG->ATG) ve kodon 90 (G>T) mutasyonlarının % 0.4 olarak tespit edildiği görülmektedir. Ayrıca Adana ili Beta talasemi hastalarında en sık olarak bildirilen IVS-I-110 (G>A), IVS-I-1 (G>A) ve IVS-I-6 (T>C) mutasyonlarının bölgemiz talasemi hastalarında da benzer şekilde en yüksek oranda olduğu saptanmıştır. Hatay ile Adana’nın aynı bölgede yer aldığı halde mutasyon tiplerinde bazı farklılıkların olmasını her iki çalışmada kullanılan yöntemlerden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda sensitivitesi “gold” standart olan DNA dizi analizi yöntemi kullanılırken, Güvenç ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada ise beta globin strip assay yöntemi kullanılmıştır. DNA dizi analiz yöntemi bu tip mutasyon analizleri için en uygun olduğu bildirilen yöntemlerin başında gelmektedir. Bu iki çalışma arasındaki farklılığın Adana’da yapılan çalışmada duyarlılığı DNA dizi analizine kıyasla daha düşük olan strip assay testinin kullanılmasından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz (Güvenç ve ark. 2002).

Yurdumuzda Akdeniz’e kıyısı olan şehirlerden ve hastalığın yüksek insidansta seyrettiği illerden olan Antalya’da yapılan bir diğer çalışmada ise Beta talaseminin prenatal tanısı için toplam 407 fetüs çalışmaya dahil edilmiş, gebelerden ilk trimesterde fetal örnekler koryonik villi örnekleme yoluyla, ikinci trimesterde ise amniyon sentez ve kordo sentez yoluyla örnekler alınarak analizleri yapılmıştır. Çalışmada en sık tespit edilen Beta talasemi mutasyonlarının IVS-I-110 (G>A), IVS-II-1 (G>A), IVS-I-6 (T>C) ve IVS-II-745 (C>G) olduğu saptanmıştır. Hasta profili ve bölge benzerliği bakımından Hatay bölgesine oldukça yakın olan bu çalışmada elde edilen verilerin bizim çalışma sonuçlarıyla oldukça uyumlu olduğu görülmektedir. Bölgemizde en sık görülen IVS-I-110 (G>A) mutasyonunun Antalya’da da ilk sırada yer aldığı görülmektedir. Bu mutasyonu bölgemizde IVS-I-1 (G>A), IVS-II-745 (C>G) ve IVS-I-6 (T>C) mutasyonları takip

ederken, Antalya bölgesinde ise ikinci sıklıkla görülen mutasyonun IVS-II-1 (G>A) mutasyonu olduğu, bunu sırasıyla IVS-I-6 (T>C) ve IVS-II-745 (C>G) mutasyonlarının takip ettiği saptanmıştır (Mendilcioğlu 2011).

Yine 2004 yılında Antalya’da da yapılan bir başka çalışmada 377 doğum sonrası ve 82 doğum öncesi vakada toplam 918 kromozom reverse dot blot hibridizasyon yöntemiyle analiz edilerek Beta talasemi hastalarında mutasyon dağılımı incelenmiştir. Hastaların %18.6’sının Beta talasemi major ve %5’inin de Beta talasemi intermedia hastası olduğu belirlenmiş ve çalışmada 16 farklı Beta talasemi mutasyonu varlığı saptanmıştır. Bu mutasyonlar arasında en sık tespit edilen mutasyonun %44.4’lük oranla IVS-I-110(G>A) olduğu bulunmuştur (Keser ve ark. 2004). IVS-I-110(G>A) mutasyonu gerek bizim çalışmamızda ve gerekse de Akdeniz bölgesi ve Türkiye’de daha önce yapılan çalışmalarda bildirildiği gibi en sık tespit edilen mutasyondur. Gerek Hatay ve gerekse de Antalya benzer iklim ve hasta profiline sahip Akdeniz şehirleri olmasına rağmen bu çalışmada Beta talasemi hastalarında 16 farklı mutasyon tespit edildiği bildirilirken çalışmamızda 19 farklı mutasyon tespit edilmiştir. Bu farklılığın sebebinin bu iki çalışmada farklı yöntemlerin kullanılmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Yöntem farklılığı yanında bu iki çalışma arasındaki mutasyon farklılığının sebebi Hatay bölgesinin Kuzey Afrika ülkelerinden yüksek oranda göç alıyor olması ile de ilişkili olabilir.

Bugüne kadar yapılan çalışmalarda Beta talasemi hastalığının ülkemizde özellikle Hatay, Adana ve Antalya gibi Akdenize kıyısı olan kentlerde yüksek insidanda seyrettiği bildirilmiştir. Bunun yanında, özellikle son dönemlerde Güneydoğu Anadolu, Ege ve İç Anadolu bölgelerinde de hastalığın insidansında önemli artışlar olduğu da bildirilmektedir. Güneydoğu Anadolu bölgesinde Ayçiçek ve arkadaşlarının 115 Beta talasemi hastasında 22 mutasyon tarayarak yaptıkları bir çalışmada, en sık görülen mutasyonun IVS-I-110 (G-A) olduğu bunu sırasıyla IVS-I-1 (G-A), kodon 39 (C>T) ve kodon 8 (-AA) olarak belirlemişler ve bu 4 mutasyonun sıklığını %62.5 olarak saptamışlardır (Ayçiçeği ve ark. 2011). Çalışmamızda ise benzer olarak bu 4 mutasyonun en sık rastlanan mutasyonlar arasında olduğu ve sıklığının da 47.47 olduğu görülmektedir. Yine, aynı bölgeden Gülbay ve arkadaşlarının 6’sı majör, 32’si minör Beta talasemi hastasında 22 mutasyon tarayarak yaptıkları çalışmada sadece 9 farklı mutasyon tespit etmişlerdir. Bu çalışmada en sık görülen mutasyonun IVS-I-110 (G-A) (%47.4) olduğu, bunu sırasıyla IVS-I-1 (G-A)

(%15.8), IVS-II-1 (G>A)(%7.9), kodon 8 (-AA)(%7.9), ve kodon 8/9 (+G)(%7.9) mutasyonlarının takip ettiğini belirlemiştirlerdir. Bu çalışmayı bizim çalışmamızla kıyasladığımızda IVS-I-110 (G-A) ve IVS-I-1 (G-A) mutasyonlarının her iki çalışmada da ilk iki sırada olduğu, bununla birlikte frekanslarının farklı olduğu görülmektedir. Diğer mutasyonların sıklık sırası ise çalışmamızdan farklıdır. İki çalışma arasındaki bu farklılıklar, çalışmaya dahil edilen hasta sayıları ve kullanılan moleküler yöntemlerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Gülbay ve arkadaşlarının çalışmasında hem hasta sayısı oldukça sınırlı hem de kullanılan strip assay yöntemi sınırlı sayıda mutasyon tarayabilmektedir (Gülbay ve ark. 2009).

Beta talasemi ülkemizde en sık görülen hemoglobinopatilerden biridir. Beta talaseminin, hemoglobinopati hastalarının yaklaşık 3/4'ünü oluşturduğu bildirilmektedir. Beta talasemide rastlanılan mutasyon sıklığı ve mutasyon tipi bölgeden bölgeye değişebilmektedir. Altay tarafından 2002 yılında ülkemizde geniş ölçekli yapılan bir çalışmada mutasyon tipi ve sıklığı araştırılmış, çalışmada 5 farklı mutasyonun tespit edildiğini bildirmiştir. Bu mutasyonların başında %41 oranında IVS-I-110 en sık olarak tespit edilirken, bu mutasyonları sırasıyla IVS-I-6 (%10.3), IVS-II-1 (%8.1), IVS-II-745 (%6.2) ve IVS-I-1 (%5.7)'in takip ettiği bildirilmiştir. Çalışmada bu 5 mutasyonunun Beta talasemide görülen tüm mutasyonların %5'ini oluşturduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile uyumlu olarak bizim çalışmamızda da en sık tespit edilen mutasyonların ilk 5'nin IVS-I-110 (%22.63), IVS-I-1 (%13.14), IVS-II-745 (%10.58), IVS-I-6 (%10.22) ve kodon 8 (-AA) (%6.93) mutasyonları olduğu tespit edilmiştir. IVS-I-110 ve IVS-I-1 mutasyonları çalışmamızda saptanan tüm mutasyonların %35.77'sini oluşturmaktadır. Aynı şekilde, Başak'ın Beta talasemi mutasyonlarının Türkiye'deki dağılımını gösterdikleri çalışmada en sık 5 mutasyonun sırasıyla IVS-I-110 (G-A), IVS-I-6 (T>C), kodon 8 (-AA), IVS-I-1 (G-A) ve IVS-II-745 (C>G) olduğunu ve bu 5 mutasyonun %59.9 sıklığında bulunduğunu saptamışlardır (Başak 2007). Çalışmamızda da bu 5 mutasyon en sık görülen mutasyonlar olup %63.5 oranında saptanmıştır. Bu nedenle sonuçlarımız Türkiye'deki mutasyon dağılımları ve sıklığı ile oldukça benzerlik göstermektedir.

Ülkemizde yapılan çeşitli çalışmalarda görüleceği gibi IVS I-110 (G>A) mutasyonunun tüm bölgelerde en yaygın mutasyon olduğu bildirilmektedir. Bu mutasyona Akdeniz bölgesi başta olmak üzere, Marmara bölgesi ile Doğu Anadolu bölgelerinde sık

rastlanıldığı bildirilmektedir. Bunun yanında ikinci sıklıkta görülen mutasyon ise IVS 1-6 (T>C) mutasyonudur. Bu mutasyonun Marmara, Akdeniz, Orta Anadolu ve Karadeniz bölgesinde sık görüldüğü bildirilmektedir. Beta talasemi mutasyonlarından IVS-I-1 (G>A) mutasyonunun Ege bölgesi hastalarında en sık görülen mutasyon olduğu fakat bu mutasyonun son dönemlerde ülkemizde Marmara, Karadeniz, Orta Anadolu ve Güney-Batı Anadolu'da da sık rastlandığı bildirilmektedir. Bunun dışında IVS-II-745 (C>G) mutasyonunun en yaygın olduğu bölgenin ise Akdeniz bölgesi olduğu bildirilmektedir. Yine IVS-I-1 (G>A) mutasyonunda olduğu gibi son zamanlarda bu mutasyona ülkemizin diğer bölgelerinde de rastlanılmaya başlanıldığı bildirilmektedir. Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak en sık bulunan mutasyonun IVS-I-110 (G>A) mutasyonu olduğu tespit edilirken bunu IVS-I-1 (G>A) mutasyonunun takip ettiği saptanmıştır (Altay 2002).

Çalışmamızda bölgemizde en sık rastlanılan mutasyon olan IVS-I-110 mutasyonu Yılmaz ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonucuyla oldukça uyumlu bulunmuştur. Bu çalışmada Yılmaz ve arkadaşları Ege bölgesinde talasemi mutasyonlarını saptamak amacıyla ARMS yöntemiyle yaptıkları çalışmada IVS-I-110 mutasyonu (%32.85) en yüksek oranda saptarken, bunu IVS-I-6 (%7.14), IVS-I-1 (%7.14) ve IVS-II-745 (%4.28) mutasyonlarının takip ettiğini bildirmişlerdir (Yılmaz ve ark. 2000).

Ülkemizde Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde altı ili (Van, Ağrı, Hakkari, Bitlis, Muş ve Siirt) içine alan 2001 yılında yaşları 12-18 arasında değişen 1014 sağlıklı öğrenci dahil edildiği bir çalışmada Beta talasemi taşıyıcılık oranının %0.6 (6 öğrenci) olduğu bulunurken, çocuklardan 1 (%0.1)'inin -30 (T>A) mutasyonu açısından homozigot, 1 çocuğun ise HbD-Los Angeles mutasyonu açısından heterozigot olduğu bulunmuştur. Bu mutasyonlar dışında 3 öğrencide kodon 8/9 (+G), 2 öğrencide -30 (T>A) ve 1'er öğrencide de IVS-I-110 (G>A), IVS-II-1 (G>A) ve IVS-I-130 (G>A) mutasyonlarının varlığı gösterilmiştir. Çalışmamızdaki veriler irdelendiğinde, bölgemizdeki hastalarda Doğu Anadolu bölgesinde Beta talasemi hastalarında görülen mutasyon dağılımından farklı bir dağılımın olduğu anlaşılmaktadır. Bölgemizde kodon 8/9 (+G) ve -30 (T>A) mutasyonlarına rastlanılmazken Doğu Anadolu'da 1'(%0.1)er hastada bu mutasyonlara rastlanılmıştır (Öner ve ark. 2001).

Ülkemizde Beta talasemi mutasyonları konusunda en eski ve kapsamlı çalışmalardan biri 1998 Tadmouri ve arkadaşlarının Beta talasemi ve orak hücre anemi

taşıyıcıları üzerinde yaptıkları çalışmadır. Bu çalışmada 5 farklı bölgede (İstanbul, Ankara, İzmir, Adana, Antalya) Beta talasemi mutasyonu dağılımı sıklığı değerlendirilmiş, en sık görülen Beta talasemi mutasyonunun IVS-I-110 (G>A) mutasyonu olduğu tespit edilirken, bunu IVS-I-6 (T>C), kodon 8 (-AA), IVS-I-1 (G>A), IVS-II-745 (C>G), IVS-II-1 (G>A), kodon 39 (C>T), -30 (T>A) ve kodon 5 (-CT) mutasyonlarının takip ettiği tespit edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen bölgesel sonuçlar ülke genelindeki mutasyon sıklığı ile karşılaştırıldığında Türkiye'nin Güney ve Batı bölgelerinin tüm dağılımıyla uyumlu olarak en yüksek oranda IVS-I-110 (G>A), IVS-I-6 (T>C) ve kodon 8 (-AA) gibi sık görülen mutasyonların yüksek oranda olduğu bulunurken, Doğu ve Kuzey bölgelerinin ise bölgedeki popülasyona özel -87 (C-G) ve -30 (T-A) gibi bazı mutasyonların yüksek oranda tespit edildiği saptanmıştır (Tadmouri ve ark. 1998).

Talasemi Akdeniz ülkeleri ve göçlerle yayılarak dünyanın birçok ülkesinde görülen bir hastalıktır. Dünyada Orta Doğu, merkez Asya ve Hindistan gibi ülkelerde sık görüldüğü bildirilmiştir. Abuzenadah ve arkadaşlarının 2011 yılında Suudi Arabistan'ın batı bölümlerinde yapılan 172 hastayı kapsayan bir çalışmada Beta talasemili hastalarda mutasyon varlığı PCR-ARMS ve dizi analizi yöntemleriyle araştırılmış ve çalışmada toplam 23 farklı mutasyon tespit edildiği bildirilmiştir. Çalışmada IVS-II-1 (G>A), IVS-I-110 (G>A), IVS-I-5 (G>C), kodon 39 (C>T), kodon 26, kodon 8/9 (+G) ve IVS-I-1 (G>A) mutasyonlarının hastaların %78'lik gibi büyük bir kısmında saptandığı bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda ise bu çalışmadan farklı olarak allellerin %63.5'lik bir kısmını IVS-I-110 (G>A), IVS-I-1 (G>A), IVS-II-745 (C>G), IVS-I-6 (T>C), kodon 8 (-AA) mutasyonları oluşturmaktadır. Ayrıca bu çalışmada dizi analizi yöntemiyle kodon 41/42 (-TCTT), IVS-I-25 bp delesyon, kodon 37, kodon 44 (-C), cap bölgesi +1 (A-C), IVS-I-6 (T>C), kodon 5 (-CT) ve IVS-I-1 (G>A) mutasyonlarında oldukça nadir görüldüğü tespit edilmiştir. Çalışmamızda ise Suudi Arabistan'nın batı bölgelerinde nadiren görüldüğü bildirilen bu mutasyonlardan kodon 44 (-C) ve IVS-I-1 (G>A)'in daha yaygın olduğu tespit edilmiştir (Abuzenadah ve ark. 2011).

Beta talaseminin yüksek oranlarda seyrettiği bölgelerden biri de Irak'tır. Irak özellikle Irak'ın Kuzey kesimlerinde yüksek talasemi taşıyıcılık oranları ve akraba evliliği sıklığı nedeniyle Beta talasemili doğumların da sık olduğu bildirilmektedir. Allawi ve arkadaşlarının bu bölgede 2006 yılında yaptıkları bir çalışmada 104 Beta talasemi

major/intermedialı hasta ve ailelerinin dahil edildiği bir çalışmada hastalığın moleküler temelleri araştırılmış, çalışmada Beta talasemi hastalarında IVS-II-1 (G>A), kodon 44 (-C), kodon 5 (-CT), IVS-I-1 (G>A), kodon 39 (C>T), IVS-I-6 (T>C), kodon 8/9 (+G) ve IVS-I-5 (G>C) mutasyonlarının hastaların %81.7'sinde bulunduğu tespit edilmiştir. Bunların dışında kodon 8 (-AA), IVS-I-110 (G>A), kodon 30 ve kodon 22 mutasyonlarının da nadiren tespit edildiği bildirilmiştir. Kodon 8 (-AA) mutasyonunun bölgede nadir görülen mutasyonlar arasında olduğu belirlenirken, çalışmamızda ise bu mutasyonun sık görülen mutasyonlar arasında bulunduğu saptanmıştır (Al-allawi ve ark. 2006).

Yine Beta talaseminin yüksek frekansta seyrettiği ülkelerden biri olarak bilinen Hint bölgesi ya da Hindistan'da 2012 yılında yapılan bir çalışmada Beta talasemi hastası olarak doğan çocuklar ve kardeşlerinin genotiplendirilmesi yapılarak genotip-fenotip korelasyonu araştırılmış, çalışmada hastalarda major genotip olarak homozigot IVS-I-5 (G>C) %26 oranında bulunurken, %37 oranında ise diğer mutasyonlar (kodon 8/9, HbE, kodon 41/42)'la veya hemoglobinopatilerle birleşik heterozigot şeklinde bulunduğu tespit edilmiştir (Sahu ve ark. 2012).

Beta talasemi ülkemizde olduğu gibi Akdeniz'e kıyısı olan Kıbrıs gibi ülkelerde de yüksek frekansta seyretmekte olup özellikle son yıllarda hastalığa Akdenize kıyısı olmayan ülkelerde de oldukça yüksek frekansta ve yaygın mutasyon varlığı ile rastlanıldığı bildirilmektedir. Doğu Anadolu bölgemize komşu olan İran'da Beta talasemi hastalarının oldukça yüksek frekansta olduğu bildirilmiştir. İran'da son dönemlerde yapılan çalışmalarda 2 milyonun üzerinde Beta talasemi taşıyıcılığından söz edilmektedir. Bu ülkede 8 farklı coğrafyada yaşayan insanlar üzerinde 10 yılı kapsayan Najmabadi ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada farklı etnik gruplar arasında Beta talasemi taşıyıcılığı ve mutasyon tiplerinin tespit edilmesi amaçlanmış, çalışmada ARMS PCR yöntemi kullanılarak 174 Beta talasemi hastası ile 889 akrabalık ilişkisi olmayan taşıyıcılar analiz edilmiştir. Çalışmada toplam 1217 kromozom çalışılmış, kromozomların %81 gibi büyük bir kısmında Beta talasemi mutasyonlarına rastlanmıştır. Çalışmada bölgemizden farklı olarak en yüksek insidanda IVS-II-1 (G>A)(%34) mutasyonunun yer aldığı bildirilmiş ve ülkenin kuzey kesimlerinde bu mutasyon tipinin diğer bölgelerden daha yüksek olduğu, güney kısımlara doğru ise azaldığı tespit edilmiştir. Ülkenin güney bölgelerinde ise IVS-I-5 (G>C)(%7.55) mutasyonun daha yaygın olduğu saptanmıştır.

İran'da bu mutasyonları sırasıyla kodon8/9 (%4.76) ve IVS-I-110 (G>A)(%4.76) mutasyonları takip ettiği tespit edilmiştir. Ülkemizde ve bölgemizde en yüksek frekansta seyreden IVS-I-110 (G>A) mutasyonunun İran'da yaygın bir mutasyon olmadığı görülmektedir. Çalışmada %34'lük oranla en sık olarak tespit edilen IVS-II-1 (G>A) mutasyonu, bölgemizde %2.19'luk oranla 9. sırada yer almaktadır. Beta talasemi sıklığı ve mutasyon dağılımı ülkeden ülkeye hatta aynı ülkenin farklı bölgeleri arasında bile farklılık göstermektedir (Najmabadi ve ark. 2001).

Dünya'da Beta talasemi mutasyonları genellikle popülasyona spesifiktir ve her bir etnik grupta belirli bazı mutasyonlar yaygın olarak görülmektedir. Çeşitli popülasyonlarda yapılmış olan birçok çalışmada 4 ya da 6 mutasyonun o toplumdaki Beta talasemi hastalarının %90 ila 95'inde tespit edildiğini göstermektedir (Kazazian ve Boehm 1988). Bu popülasyonlarda sınırlı sayıda mutasyon bulunması, sekansa spesifik primer ya da problemlerin kullanıldığı sekansa spesifik amplifikasyon, reverse dot blot, PCR-RFLP, ARMS ve benzeri gibi sınırlı sayıda mutasyon tarayan sistemlerin kullanılmasını mümkün kılmıştır. Buna karşın Türkiye, Asya, Afrika ve Avrupa kıtalarının birbirine en yakın olduğu noktada yer almakta ve Asya ile Avrupa'nın birleştiği coğrafik bir bölgede bulunmakta olup, tarihsel süreç içerisinde birçok medeniyete ve çeşitli etnik gruplara ev sahipliği yapmış olması nedeniyle ülkemizde çok çeşitli beta globin gen mutasyonları tespit edilmiştir. Türkiye'de günümüze kadar en az 41 Beta talasemi mutasyonu tespit edilmiş olup, ülkemiz Beta talasemi mutasyonları açısından oldukça heterojendir. Bundan dolayı sınırlı sayıda mutasyon tarayan sistemlerle, nadir ya da bilinmeyen Beta talasemi mutasyonlarını tespit etmek mümkün değildir. Bu nedenle çalışmamızda hem nadir görülen hem de bilinmeyen mutasyonların tespitini sağlayan ve hem de daha sensitif ve güvenilir olan DNA dizi analizi yöntemini kullanmayı tercih ettik.

Çalışmamızda, dünyada oldukça nadir ve Türkiye'de ilk kez gösterilen 2 adet Beta talasemi mutasyonu tespit ettik. Bu mutasyonlardan birisi beta globin geninin 90. kodonunda, 271. pozisyonundaki Guanin nükleotidinin Timinle yer değiştirmesi sonucu (GAG>TAG) glutamin amino asitinin stop kodonuna değişimini sağlayan nonsense (anlamsız) mutasyon olup (beta 90(F6) Glu>Stop; HBB: c.271G>T) Beta° talasemi fenotipine neden olmaktadır. Bu mutasyonu taşıyan hastamız heterozigot genotipe sahip olup talasemi minör bulgularına sahipti. Bu mutasyon literatürde ilk olarak Japonya'dan

Fucharoen ve arkadaşları ile Nomura ve arkadaşları tarafından 1990 yılında aynı zaman diliminde bulunmuştur. Daha sonra 1992 yılında yine Japonya'dan Hattori arkadaşları tarafından gösterilmiştir (Fucharoen ve ark. 1990, Hattori ve ark. 1992, Nomura ve ark. 1990). Bilgilerimize göre beta 90(F6) Glu>Stop, HBB:c.271G>T mutasyonu Türkiye'de ilk kez gösterilmiş olup, literatürde Japonya'dan sonra üçüncü kez gösterilen nadir mutasyon olarak tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, Türkiye'de ilk kez gösterilen diğer bir mutasyon ise beta globin geninin 126. kodonunda 380. pozisyonda bulunan Timin nükleotidinin Sitozin ile yer değiştirmesi sonucu (GTG>GCG), Valin amino asitinin Alanin amino asitine değişimini sağlayan missense (yanlış anlamlı) mutasyon olup (Beta 126(H4) Val>Met; HBB: c.380 T>C) hemoglobin Beirut isimli bir etkisiz (silent) bir hemoglobin varyantının ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Bu mutasyon ilk kez 1983 yılında Stahler tarafından Lübnanlı bir erkekte, daha sonra ise Blibech ve arkadaşları tarafından 1986 yılında Cezayirli bir ailede gösterilmiştir. Çalışmamızda hemoglobin Beirut heterozigot genotipe sahip bir taşıyıcıda belirlenmiş olup, Türkiye'de ilk, literatürdeki 3. bulgudur (Blibech ve ark. 1986, Strahler ve ark. 1983).

Çalışmamızda ayrıca, nadir görülen Beta talasemi gen mutasyonlarından birisi olan ve genin 17. kodonunda 52. pozisyonda bulunan Adenin'in Timin ile yer değiştirmesi sonucu (AAG>TAG), Lizin amino asitinin stop kodonuna dönüşümünü sağlayan nonsense bir mutasyon (Beta 17(A14), HBB:c.52A>T Lys>Stop) olup Beta^o talasemi fenotipine neden olmaktadır. Bir hastamızda bu mutasyona homozigot formda rastlanmış olup, bu hasta transfüzyon bağımlı Beta talasemi major fenotipine sahipti. Beta 17(A14); HBB:c.52A>T Lys>Stop mutasyonu literatürde ilk kez Chang ve Kan tarafından Çinli bir hastada tanımlanmıştır. Bu mutasyona Uzak Doğu'da sık görülen mutasyonlar arasındadır. (Chang ve Kan 1979, Laosombat ve ark. 2001, Nopparatana ve ark. 1995, Rozitah ve ark. 2008, Sanguansermisri ve ark. 2004). Ülkemizde bu mutasyona ilk kez Genç ve arkadaşları tarafından sağlıklı bir bireyde rastlanmıştır (Genç ve ark. 2012). Bu nedenle kodon 17 mutasyonu Türkiye'de ikinci olarak tarafımızdan gösterilmiştir.

Türkiye'de nadir olarak görülen mutasyonlardan birisi de beta globin geninin 98. kodonunda 295. pozisyonda bulunan Guaninin, Adeninle yer değiştirmesi sonucu (GTG>ATG), Valin amino asitinin Metinoin amino asitine değişimini sağlayan missense

(yanlış anlamlı) mutasyon olup, hemoglobin Köln isimli bir hemoglobin varyantının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Beta 98(FG5) Val>Met; HBB: c.295G>A). Çalışmamızda, bir hastamızda bu mutasyona rastlanılmış olup, bu hastamızın genotipi hemoglobin Köln/Kodon 44 (-C) birleşik heterozigot genotipi şeklinde idi. Hastamız Beta⁰ fenotipine sahipti.

Çalışmamız Hatay'da yaşayan Beta talasemi hastalarında yapılmış en kapsamlı genetik çalışma olma özelliği taşımaktadır. Bulgularımız genetik danışmada karar verme sürecinde yol gösterici olabileceği gibi, hemoglobinopatilere neden olan ve nadir görülen mutasyonların bu çalışma ile ülkemizde ilk kez gösterilmesi, henüz yetersiz olan ulusal hemoglobin varyantları veri tabanının oluşturulmasına katkı yapma potansiyeli bulunması açısından da yararlı olabilir. Bu nedenle, hematolojik testlerde hemoglobinopati şüphesi olan ve gerek HPLC ve elektroforez gibi biyokimyasal tarama testleri, gerekse de sınırlı sayıda mutasyon tarayan moleküler sistemlerle tanı konulamayan vakalarda ve doğum öncesi genetik tanıda mutlaka DNA dizi analizinin uygulanması gerektiği kanısındayız.

6. SONUÇ

1. Bu çalışma Beta talasemi mutasyonlarının belirlenmesi için tüm Hatay bölgesini kapsayan ilk kapsamlı çalışmadır. Çalışmaya Hatay'ın 11 ilçesinin dahil edildiği 3 merkezden (Mustafa Kemal Üniversitesi Arastırma ve Uygulama Hastanesi, Antakya Devlet Hastanesi ve İskenderun Doğum ve Çocuk Bakım Hastanesi) toplanan 137 Beta talasemi hastası dahil edilmiş olup beta globin mutasyonlarının için DNA analizi yöntemi kullanılmıştır.
2. Çalışmada, 19 farklı beta globin gen mutasyonu saptanmış olup, 53 hastada homozigot, 42 hastada birleşik heterozigot ve 42 hastada ise heterozigot (taşıyıcı) genotip tespit edilmiştir.
3. En sık rastlanılan beta globin mutasyonunun IVS-I-110 (G>A) (%22.63) olduğu, bunu IVS-I-1 (G>A) (%13.14), IVS-II-745 (C>G) (%10.58), IVS-I-6 (T>C) (%10.22), Kodon 8 (-AA) (%6.93) ve Kodon 39 (C>T) (%4.74)'nin takip ettiği saptanmıştır.
4. En sık rastlanılan homozigot genotipin IVS-I-110 (G>A) olduğu , bunu IVS-I-1 (G>A), IVS-II-745 (C>G), IVS-I-6 (T>C), genotiplerin takip ettiği belirlenmiştir.
5. En sık rastlanılan birleşik heterozigot genotipin ise IVS-I-110 (G>A)/ IVS-I-6 (G>A) olduğu, bu genotipi IVS-I-110(G>A) /Kodon 8 (-AA), Kodon 39(C>T)/IVS-I-1 (G>A) ve IVS-I-110 (G>A)/IVS-I-1(G>A) genotiplerinin takip ettiği saptanmıştır.
6. Hatay'ın ilçelere göre dağılımı yapıldığında IVS-I-110(G>A) mutasyonunun en yüksek oranda Antakya, İskenderun ve Samandağ ilçelerinde görüldüğü tespit edildi.
7. Kırıkhan, Altınözü ve Reyhanlı ilçelerinin en yaygın mutasyonu IVS-I-1 iken Dört Yol ilçesinin en yaygın mutasyonu IVS-II-745 olarak saptandı.
8. Beta talasemi hastalarında ortalama hemoglobin ve Hematokrit değerleri sırasıyla 8.9 ± 1.2 ve 27.4 ± 3.7 , taşıyıcılarda ise 9.9 ± 1.4 ve 30.6 ± 4.4 olarak tespit edilmiştir.

9. Çalışmada, dünyada oldukça nadir ve Türkiye’de ilk kez gösterilen 2 farklı beta globin gen mutasyonu tespit edilmiştir. Bu mutasyonlardan birisi beta globin genin 90 kodonunda, 271. pozisyonundaki Guanin nükleotidinin Timinle yer değiştirmesi sonucu (GAG>TAG) glutamin amino asitinin stop kodonuna değişimini sağlayan nonsense (anlamsız) mutasyon (beta 90(F6) Glu>Stop; HBB: c.271G>T), diğeri ise beta globin geninin 126. kodonunda 380. pozisyonda bulunan Timin nükleotidinin Sitozin ile yer değiştirmesi sonucu (GTG>GCG), Valin amino asitinin Alanin amino asitine değişimini sağlayan missense (yanlış anlamlı) mutasyon (Beta 126(H4) Val>Met; HBB: c.380 T>C) olup hemoglobin Beirut isimli bir hemoglobin varyantıdır. Çalışmada ayrıca beta globin genindeki kodon 17 T>C nonsense mutasyonu (Beta 17(A14); HBB:c.52A>T Lys>Stop) Türkiye’de ikinci olarak tarafımızdan gösterilmiştir.

10. Çalışmamızda, Hatay bölgesinde Türkiye geneline benzer bir mutasyon dağılımı tespit edilmiştir.

11. Türkiye tarihsel göç ve ticaret yolları üzerinde bulunduğundan dolayı birçok medeniyete ve çeşitli etnik gruplara ev sahipliği yapmış olması nedeniyle Beta globin geni bakımından oldukça heterojendir. Türkiye’de günümüze kadar en az 41 Beta talasemi mutasyonu tespit edilmiş olup, ülkemiz Beta talasemi mutasyonları açısından oldukça heterojendir. Bundan dolayı sekansa spesifik primer ya da problemlerin kullanıldığı sekansa spesifik amplifikasyon, reverse dot blot, PCR-RFLP, ARMS ve benzeri gibi sınırlı sayıda mutasyon tarayan sistemler ülkemiz için uygun değildir. DNA dizi analizi hem nadir görülen hem de bilinmeyen mutasyonların tespitini sağlayan ve hem de daha sensitif ve güvenilir olan ve bizim de bu çalışma kapsamında tercih ettiğimiz yöntemdir. Bu nedenle, hematolojik testlerde hemoglobinopati şüphesi olan ve gerek HPLC ve elektroforez gibi biyokimyasal tarama testleri, gerekse de sınırlı sayıda mutasyon tarayan moleküler sistemlerle tanı konulamayan vakalarda ve doğum öncesi genetik tanıda mutlaka DNA dizi analizi yönteminin uygulanması gerektiği kanısındayız.

12. Bulgularımız, hemoglobinopatilere neden olan ve nadir görülen mutasyonların bu çalışma ile ülkemizde ilk kez gösterilmesi, henüz yetersiz olan ulusal hemoglobinopati varyantları veri tabanının oluşturulmasına katkı yapma potansiyeli bulunması açısından da yararlı olabileceği gibi, genetik danışmada karar verme sürecinde de yol gösterici olabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Abuzanadah AM, Hussein IMR, Damanhour GA, A-Sayes F, Gari MA ve ark.** Molecular basis of β -thalassemia in the western province of Saudi Arabia: Identification of rare β -thalassemia mutations. *Hemoglobin*, **2011**,35 (4): 346-357.
2. **Acemoğlu H, Beyhun NE, Vançelik S, Polat H, Güraksın A.** Thalassaemia screening in a non-prevalent region of a prevalent country (Turkey): is it necessary? *Public Health* **2008**; 122: 620-4.
3. **Al-allawi NAS, Jubrael JMS, Hughson M.** Molecular characterization of β -thalassemia in the dohuk region of İraq. *Hemoglobin*, **2006**, 30 (4): 479:486.
4. **Altay Ç.** The Frequency and Distribution Pettern of β -thalassemia Mutations in Turkey. *Turk J Haematol*, **2002**; 19 (2): 309-315.
5. **Altay Ç, Basak AN.** Molecular basis and prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Turkey. *Int J Pediatr Hematol Oncol* **1995**; 2: 283-90.
6. **Ayçiçeği A, Koç A, Özdemir ZC, Bilinç H, Koçyiđit A, Dilmeç F.** Beta-globin gene mutations in children with beta-thalassemia major from Şanlıurfa province,Turkey. *Turk J Hematol* **2011**; 28: 264-8.
7. **Bank A .** Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood*, **2006**; 107: 435-443.
8. **Bank A.** Understanding globin regulation in β -thalassemia: it's as simple as α , β , γ , δ . *J Clin Invest.* **2005**, 115:1470-1473.
9. **Basak N.** The molecular pathology of β -thalassemia in Turkey: the Bogaziçi University experience. *Hemoglobin.* **2007**;31(2):233–241.
10. **Berkarda B, Müftüođlu AÜ, Ulutin O.** Kan Hastalıkları. *Istanbul*, **1977**, 3-16.
11. **Birgens H ve Ljung R.** The thalassaemia syndromes. *Scand J Clin Lab Invest*, **2007**, 67:11-26.
12. **Blibech R, Mrad H, Kastally R, Brissart MA, Potron G ve ark.** Hemoglobin Beirut [α 2 β 2(126)(H4)Val----Ala] in an Algerian family. *Hemoglobin*, **1986**, 10(6):651-4.
13. **Boudrahem-Addour N, Zidani N, Carion N, Labie D, Belhani M ve ark.** Molecular Heterogeneity of β -Thalassemia in Algeria: How to Face Up to a Major Health Problem **2009**, Vol. 33, No. 1 , Pages 24-36.
14. **Borgna- Pignatti C, Cappellini MD, De Stefano P, Del Vecchio GC, Forni GL ve ark.** Survival and complications in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci*, **2005**, 1054:40-47.
15. **Borgna- Pignatti C, Rugolotto S, De Stefano P, Zhao H, Cappellini MD ve ark.** Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica* **2004**, 89:1187-1193.
16. **Cao A ve Galanello R.** Beta-thalassemia. *Genet Med*, **2010**: 12(2):61-76.
17. **Chang JC, Kan YW.** Beta 0 thalassemia, a nonsense mutation in man. *Proc Natl Acad Sci USA*, **1979**, 76(6): 2886-9.

18. **Danjou F, Anni F, Galanello R.** Beta-thalassemia: from genotype to phenotype. *Haematologica*, **2011**; 96(11): 1573-1575.
19. **Fucharoen S, Katsube T, Fucharoen G, Sawada H, Oishi H ve ark.** Molecular heterogeneity of beta-thalassaemia in the Japanese: identification of two novel mutations. *Br J Haematol.* **1990**, Jan;74(1):101-7.
20. **Galanello R, Origa R.** Beta-thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases.* **2010**; 5: 11.
21. **Galanello R.** Recent advances in molecular understanding of non-transfusion-dependent thalassemia. *Blood Reviews*, **2012**, s.7-11.
22. **Georgiou I, Makis A, Chaidos A, Bouba I, Hatzi E. ve ark.** Distribution and frequency of β -thalassemia mutations in northwestern and central Greece. *Eur J Haematol*, **2003**, 70: 75-78.
23. **Genç A, Korkmaz DT, Büyükleyla M, Çeliker M.** Prevalence and molecular analysis of β -thalassemia in Adiyaman, Turkey. *Hemoglobin*, **2012**, 36 (2): 131-138.
24. **Giambona A, Passarello C, Renda D, Maggio A.** The significance of the hemoglobin A₂ value in screening for hemoglobinopathies. *Clinical Biochemistry*, **2009**, 42:1786-1796.
25. **Globin Gene Server** (<http://globin.cse.psu.edu>) (erişim tarihi: 01.09.2012).
26. **Gur E.** Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden: Biyokimya, 2. Baskı, Türkçe Çeviri. Champe P. C. , Harvey R.A. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi. **1997**, 25-38.
27. **Gülbay G, Yeşilada E, Aydoğdu İ, Özgen Ü, Otlu G.** Malatya'da Beta Talasemi Mutasyonları. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, **2009**, 16 (4): 209-212.
28. **Güneşaçar R, Çelik M.** First report from Turkey of a rare frameshift mutation [codons 9/10 (+T)] in the beta-globin gene. *Turk J Hematol*, 2011; 28: 343-5.
29. **Güvenc B, Canataroğlu A, Unsal C, Yıldız SM, Turhan FT.** β -Thalassemia mutations and hemoglobinopathies in Adana, Turkey: results from a single center study. *Arch Med Sci*, **2012**, 411-414.
30. **Forget BG ve Olivieri NF.** *Blood : Principles and practice of hematology. Hemoglobin synthesis and the Thalassemias.* 2. baskı, Lippincott Williams & Wilkins, USA, 2003, s. 1503-1596.
31. **Harju S, McQueen KJ, Peterson KR.** Chromatin Structure and Control of β -Like Globin Gene Switching. *Exp Biol Med Vol*, **2002**, 227(9):683-700.
32. **Hattori Y, Yamamoto K, Yamashiro Y, Ohba Y, Miyamura S ve ark.** Three beta-thalassemia mutations in the Japanese: IVS-II-1 (G>A), IVS-II-848 (C>G), and codon 90 (GAG>TAG). *Hemoglobin*, **1992**;16(1-2):93-7.
33. **Higgs DR, Engel JD, Stamatoyannopoulos G.** Thalassaemia. *Lancet*, **2012**; 379: 373-83.
34. **Higgs D.** Gene Regulation in Hematopoiesis: New Lessons from Thalassemia. *Hematology*, **2004**, 1-13.
35. **Ho PJ ve Thein SL.** Gene regulation and deregulation: a β -globin perspective. *Blood Reviews*, **2000**; 14, 78-93.
36. **Karol S, Ayvalı C, Suludere Z.** Hücre Biyolojisi. 4. Baskı, **2000**, 27-86.
37. **Kazazian HH, Boehm CD.** Molecular basis and prenatal diagnosis of β -Thalassemia. *Blood* **1988**; 72:1107-1116.
38. **Keser İ, Sanlioglu AD, Manguoglu E, Kayışlı OG, Nal N ve ark.** Molecular Analysis of Beta-Thalassemia and Sickle Cell Anemia in Antalya. *Acta Haematol* **2004**;111:205-210.

39. **Klug SW, Cummings RM.** Genetik Kavramlar. Genlerin Kromozom Üzerindeki Organizasyonu. Palme Yayıncılık. **2003**, s. 553-575.
40. **Kohne E.** Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int* **2011**; 108(31-32): 532-40.
41. **Laosombat V, Wongchanchailert M, Sattayasevana B, Wiriyasateinkul A, Fucharoen S.** Clinical and hematological features of codon 17, A-T mutation of beta-thalassemia in Thai patients. *Eur J Haematol*, **2001**, 66(2): 126-9.
42. **Lo YM ve Chiu RW.** Noninvasive approaches to prenatal diagnosis of hemoglobinopathies using fetal DNA in maternal plasma. *Hematol Oncol Clin North Am*, **2002**, 24; 1179-86.
43. **Mendilcioğlu İ, Yakut S, Keser İ, Şimşek M, Yeşilipek A ve ark.** Prenatal diagnosis of β -thalassemia and other hemoglobinopathies in southwestern Turkey. *Hemoglobin*, **2011**, 35 (1): 47-55
44. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF.** A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. **1988**, Vol 16, no 3, s.1215.
45. **Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S ve ark.** The β -thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. *Hemoglobin*, **2001**, 25 (3), 285-296.
46. **Neel JV ve Valentine WN.** Further studies on the genetics of thalassemia. *Genetics*, **1947**, s. 38-63.
47. **Nomura Y, Nanjo K, Miyamura K, Harano T, Harano K ve ark.** Beta 0-thalassemia due to a nonsense mutation at beta 90 (GAG---TAG) in human hemoglobin gene. *Jpn J Med*. **1990**, 29(1): 2-6.
48. **Nopparatana C, Panich V, Saechan V, Sriroongrueng V, Nopparatana C ve ark.** The spectrum of beta-thalassemia mutations in southern Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. **1995**, 26 Suppl 1:229-34.
49. **Öner AF, Özer R, Üner A, Arslan Ş, Gümrük F.** Beta-Thalassemia Mutations in the East of Turkey. *Turk J Haematol*, **2001**; 18(4): 239-242.
50. **Petkov GH, Efremov GD.** Molecular basis of β -thalassemia and other hemoglobinopathies in Bulgaria: an Update. *Hemoglobin*, **2007**, 31 (2): 225-232.
51. **Ribeiro DM, Sonati MF.** Regulation of human alpha- globin gene expression and alpha-thalassemia. *Genet. Mol. Res*. **2008**. 7(4): 1045-1053.
52. **Rigoli L, Meo A, Miceli MR, Alessio K, Caruso RA ve ark.** Molecular analysis of beta-thalassaemia patients in a high incidence area of southern Italy. *Clin Lab Haematol*. **2001** Dec;23(6):373-8.
53. **Rioja L, Girot R, Garabedian M, Cournot-Witmer G.** Bone disease in children with homozygous β thalassemia. *Bone mineral*, **1990**, 8: 69-86.
54. **Rozitah R, Nizam MZ, Nur Shafawati AR, Nor Atifah MA, Dewi M ve ark.** Detection of beta-globin gene mutations among Kelantan Malay thalassaemia patients by polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism. *Singapore Med J*. **2008**, 49(12):1046-9.
55. **Sabath DE, Karen MK, Yang W.** Structure and function of the ζ - globin upstream regulatory element. *Nucleic Acids Research*, **1996**, Vol. 24, No. 24, 4978- 4986.
56. **Sadiq MF, Eigel A, Horst J.** Spectrum of β -thalassemia in Jordan: Identification of Two Novel Mutations. *Am J Hematol*, **2001**, 68: 16-22.

57. **Sahu PK, Pati SS, Mishra SK.** Genotype-phenotype correlation of β -thalassemia spectrum of mutations in an Indian population. *Hematology Reports*, **2012**, volume 4: e9, 24-27.
58. **Sanguanserm Sri P, Shimbhu D, Wongvilairat R, Saetung R, Sanguanserm Sri T.** Homogeneity of beta(0)-thalassemia codon 17 (A-->T) alleles in Northern Thailand using a direct DNA sequencing method. *J Med Assoc Thai*, **2004**, 87(8): 883-6.
59. **Schechter NA.** Hemoglobin research and origins of molecular medicine. *Blood*, **2008**; 112: 3927-3928.
60. **Strahler JR, Rosenbloom BB, Hanash SM.** A silent, neutral substitution detected by reverse-phase high-performance liquid chromatography: hemoglobin Beirut. *Science*, **1983**, 221(4613): 860-2.
61. **Susana H, McQueen KJ, Peterson KR.** Chromatin Structure and Control of β - Like Globin Gene Switching. *Exp Biol Med Vol.* **2002**, 227(9):683-700.
62. **Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Özçelik H, Özer A, Baig SM ve ark.** Molecular and Population Genetic Analyses of β -Thalassemia in Turkey. *American Journal of Hematology*, **1998**, 57:215-220.
63. **Testa U.** Fetal hemoglobin chemical inducers for treatment of hemoglobinopathies. *Ann Hematol*, **2009**; 88: 505-528.
64. **Tadmouri GO ve Başak N.** β - Thalassemia in Turkey: a review of the clinical, epidemiological, molecular, and evolutionary aspects. *Hemoglobin*, **2001**, 25(2), 227-239.
65. **Thein SL.** Genetic modifiers of β -thalassemia. *Haematologica*, **2005**; 90: 649-660.
66. **Thein SL.** Pathophysiology of β - Thalassemia- A Guide to Molecular Therapies. *Hematology*, **2005**, 31-37.
67. **Weatherall D ve Clegg JB.** Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bulletin of the World Health Organization*, **2001**, 79:704-712.
68. **Weatherall D.** 2003 William Allan Award address. The thalassaemias: the role of molecular genetics in an evolving global health problem. *Am J Hum Genet.* **2004**;74(3):385-392.
69. **Weatherall DJ.** Phenotype-Genotype relationships in monogenic disease: Lessons from the Thalassaemias. *Nature Reviews, Genetics*, **2001**, vol:2, 245-255.
70. **Weatherall DJ.** Pathophysiology of thalassaemia. *Baillieres Clin Haematol* **1998**, 11:127-46.
71. **World Health Organization.** Management of birth defects and haemoglobin disorders: report of a joint WHO-March of Dimes meeting, held in Geneva, Switzerland, 17-19 Mays **2006**.
72. **Yagi M, Gelinas R, Elder JT, Peretz M. , Papayannopoulou T, Stamatoyamopoulos G, Groudine M.** Chromatin Structure and Developmental Expression of the Human α - Globin Cluster. *Molecular and Cellular Biology.* **1986.** Vol: 6, No: 4, 1108-1116.
73. **Yılmaz B, Balım Z, Özkınay F, Gündüz C, Altıntaş N ve ark.** Beta talasemi mutasyon tiplerinin moleküler analizi. *Ege Tıp Dergisi*, **2000**, 39 (3): 153-157.

ÖZGEÇMİŞ

Naciye Eryılmaz 11.09.1985 tarihinde Antakya’da doğdu. İlköğrenimini Hatay ve Haydar Mursalođlu İlköğretim okullarında, orta ve lise öğrenimini Hatay Osman Ötken Anadolu Lisesi’nde tamamladı. Üniversite eğitimini 2004- 2008 yılları arasında Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü’nde alarak 2009 yılında Mustafa Kemal Üniversitesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik bölümünde yüksek lisans yapmaya hak kazandı ve yüksek lisans eğitimini 2012 yılında “Hatay İlinde Beta Talasemi Mutasyonları Dağılımının DNA Dizi Analizi Yöntemiyle Araştırılması” adlı tezle bitirdi.