

**T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOCAELİ BÖLGESİNDEKİ TALASEMİ HASTALARINDA
GLOBİN GENLERİNDEKİ MUTASYON SIKLIKLARININ
BELİRLENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyolog Nilüfer ÜZÜLMEZ

Enstitü Anabilim Dalı : Biyoloji
Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Hüseyin AKSOY
Ortak Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Naci ÇİNE

Şubat 2010

T.C.
SAKARYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KOCAELİ BÖLGESİNDEKİ TALASEMİ HASTALARINDA
GLOBİN GENLERİNDEKİ MUTASYON SIKLIKLARININ
BELİRLENMESİ


YÜKSEK LİSANS TEZİ

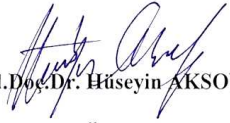
Bio. Nilüfer ÜZÜLMEZ

Enstitü Anabilim Dalı : BİYOLOJİ

Bu tez 03 / 02 /2010 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.


Yrd. Doç.Dr. Cavit Işık YAVUZ
Jüri Başkanı


Yrd. Doç.Dr. Nazan Deniz
KOÇ
Üye


Yrd. Doç.Dr. Hüseyin AKSOY
Üye

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince tez konumun seçimi ve yürütülmesinde teorik ve pratik deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Hüseyin Aksoy'a, tezimin hazırlanma sürecinde bilgisi, desteği, önerileri ve hoşgörüsüyle her zaman katkıda bulunan ortak tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Naci Çine'ye, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı Başkanı Yrd. Doç. Dr. Hakan Savlı ve Sakarya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümündeki değerli hocalarıma, çalışmama katkılarından dolayı Kocaeli Hemoglobinopati Tanı Merkezi çalışanlarından Dr. Vijdan Şenkal'a, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik laboratuvarında beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli araştırma görevlisi ve teknisyen arkadaşlarıma, her zaman sevgisi ve desteğiyle yanımda olan aileme sonsuz teşekkürler sunuyorum.

Biyolog Nilüfer ÜZÜLMEZ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ	vii
TABLolar LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	ix
SUMMARY.....	x
BÖLÜM 1.	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2.	
GENEL BİLGİ.....	3
2.1. Hemoglobinlerin Özellikleri ve Yapısı.....	3
2.1.1. Hem molekülünün yapısı.....	5
2.1.2. Hemoglobin dönüşümü.....	6
2.1.3. Globin gen kümesi.....	7
2.1.3.1. Alfa gen ailesi.....	7
2.1.3.2. Beta gen ailesi.....	8
2.2. Hemoglobinopatiler.....	9
2.2.1. Anormal hemoglobin sendromları.....	9
2.2.1.1. Hb S.....	9
2.2.1.2. Hb C.....	10
2.2.1.3. Hb D.....	10
2.2.1.4. Hb E.....	10

2.2.1.5. Türkiyede saptanan anormal hemoglobin varyantları.....	11
2.2.2. Talasemiler.....	14
2.2.2.1. Alfa talasemiler.....	15
2.2.2.2. Dünyada ve Türkiyede alfa talasemi.....	17
2.2.2.3. Beta talasemi.....	18
2.2.2.4. Beta talasemi minor.....	18
2.2.2.5. Beta talasemi major.....	19
2.2.2.6. Beta talasemi intermedia.....	20
2.2.2.7. Dünyada ve Türkiyede beta talasemi.....	20
2.3. Talasemi Tanısında Kullanılan Hematolojik Metodlar.....	24
2.3.1. Hematolojik indeks.....	24
2.3.2. Hemoglobin elektroforezi.....	24
2.3.3. Otomatik DNA dizi analizi.....	25
2.3.4. Reverse Dot-Blot analizi.....	25
BÖLÜM 3.	
MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Çalışma Grubu.....	27
3.2. Örneklerin Toplanması ve Analizler.....	27
3.3. Globin Gen Mutasyonlarının Çalışılması.....	27
3.3.1. DNA izolasyonu.....	27
3.3.2. Hematolojik incelemeler ve hemoglobin elektroforez yöntemi.....	28
3.3.3. Beta globin ve alfa globin strip assay için PCR yöntemi	29
3.3.3.1. Agaroz jel elektroforez.....	31
3.3.3.2. Hibridizasyon.....	32
3.3.4. DNA dizi analizi için PCR yöntemi.....	34
3.3.4.1. Pürifikasyon.....	35
3.3.4.2. Dizi analizinde kullanılan primerler ve beta globin gen dizisi.....	37
3.4. Alet ve Cihazlar.....	39
3.5. Sarf Malzemeler.....	39

3.6. Kit İçerikleri.....	40
BÖLÜM 4.	
BULGULAR VE TARTIŞMA.....	42
4.1. Bulgular.....	42
4.2. Tartışma.....	49
KAYNAKLAR.....	54
ÖZGEÇMİŞ.....	64

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

A γ	: Alanin [Gamma]
b \check{c}	: Baz çifti
G γ	: Glisin [Gamma]
Hb	: Hemoglobin
HbA	: Hemoglobin A
HbA2	: Hemogloblin A2
HbF	: Hemoglobin F (Fetal Hemoglobin)
Hb Elektr	: Hemoglobin Elektroforezi
Hct	: Hematokrit
Kb	: Kilo baz
MCH	: Ortalama eritrosit hemoglobini (Mean Corpuscular Hemoglobin)
MCHC	: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu (Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration)
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi (Mean Corpuscular Volume)
nm	: Nanometre
RBC	: Eritrosit hücresi (Red Blood Cell)
α	: Alfa
β	: Beta
$\beta+$: β -globin zincirinin normal sentezinin azalması
β°	: β -globin zincirinin normal sentezinin kaybolması
γ	: Gama
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
ζ	: Zeta
Ψ	: Pseudo

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1.	Hemoglobin A molekülünün yapısı.....	4
Şekil 2.2.	Hem'in molekül yapısı.....	6
Şekil 2.3.	Prenatal ve postnatal dönemlerde globin sentezi.....	7
Şekil 2.4.	Globin gen ailesi.....	8
Şekil 2.5.	Talasemilerin dünyadaki dağılımı.....	15
Şekil 2.6.	Beta Talasemi'nin Dünyadaki Dağılımı.....	21
Şekil 3.1.	DNA izolasyonu şematik gösterimi.....	28
Şekil 3.2.	Hemoglobin elektroforezi.....	29
Şekil 4.1.	Alfa talasemi için mutant ve normal oligonükleotit problemlerinin pozisyonunu gösteren referans membranlar.....	48
Şekil 4.2.	Beta talasemi için mutant ve normal oligonükleotit problemlerinin pozisyonunu gösteren referans membran.....	48

TABLolar LİSTESİ

Tablo 2.1.	Embriyonik, fetal ve erişkin dönemde sentezlenen normal insan hemoglobinleri.....	5
Tablo 2.2.	Türkiye’de saptanan tek baz değişimli alfa zincir varyantları....	12
Tablo 2.3.	Türkiye’de saptanan tek baz değişimli beta zincir varyantları...	13
Tablo 2.4.	Türkiye’de saptanan tek baz değişimli gama zincir varyantları..	14
Tablo 2.5.	Türkiye’de gözlenen unstabil (dengesiz) hemoglobinler.....	14
Tablo 2.6.	Türkiye’de saptanan talesemik anormal hemoglobinler.....	14
Tablo 2.7.	Türk populasyonunda tanımlanan beta talasemi mutasyonları...	22
Tablo 2.8.	Hematolojik göstergeler ve normal değerleri.....	24
Tablo 3.1.	Alfa Globin termal döngü protokolünün ısı ve süreleri.....	31
Tablo 3.2.	Beta Globin termal döngü protokolünün ısı ve süreleri.....	31
Tablo 3.3.	Termal döngü protokolünün ısı ve süreleri.....	34
Tablo 3.4.	Termal döngü sekans pcr protokolünün ısı ve süreleri.....	35
Tablo 3.5.	ABI Big Dye v3.1 terminatör reaksiyon kiti içerisindeki ddNTP floresan boya ve renkleri.....	37
Tablo 4.1.	Olguların hematolojik bulguları ve mutasyon tipleri.....	43
Tablo 4.2.	Mutasyon Dağılımı.....	45
Tablo 4.3.	Talasemi ön tanıli hastalarda beta globin genotipleri.....	46
Tablo 4.4.	Talasemi ön tanıli hastalarda alfa globin genotipleri.....	46
Tablo 4.5.	Globin mutasyonlarını homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda allellerin (N=41) frekansı.....	47
Tablo 4.6.	StripAssay sonuçlarının değerlendirilmesi.....	47

ÖZET

Anahtar kelimeler: Talasemi, Globin Geni, Kocaeli

Talasemiler hemoglobinin molekülünün globin zincirlerinin bir ya da daha fazlasının üretimindeki azalmadan kaynaklanmaktadır. α -globin zincir sentezindeki azalma α -talasemiye, β -globin zincir sentezindeki azalma β -talasemiye neden olmaktadır. α ve β talasemi Türkiye'deki en yaygın hemoglobinopatilerdendir.

Çalışmamızda Alfa ve Beta Globin Strip Assay testi ile 54 olgu çalışılmıştır. Talasemi ön tanısı ile refere edilen 54 olgunun 37'sinde sadece beta globin mutasyonu (%68,51), 2'sinde sadece (%3,70) alfa globin mutasyonu, 2'sinde hem alfa hem beta globin mutasyonu (%3,70) saptanmıştır. Saptanan mutasyonlar çeşitlilik göstermektedir. Beta globin zincirinde kodon 44 (-C) / kodon 44 (-C) (N=1) homozigot olarak saptanmıştır. Beta globin zincirinde heterozigot mutasyonlar IVS 1.110 G→A (N=15), IVS 1.6 T→C (N=5), IVS 2.1 G→A (N=5), kodon 8 (-AA) (N=5), kodon 39 C→T (N=4), kodon 8/9 (+G) (N=2), IVS 2.745 C→G (N=1), IVS 1.1 G→A (N=1) olarak belirlenmiştir. Alfa globin zincirinde heterozigot mutasyonlar 3.7 single gene del (3.7/ $\alpha\alpha$) (tek gen delesyonu) (N=3) ve 20.5kb double gene del (çift gen delesyonu) (N=1) olarak belirlenmiştir. 13 olgu talasemi ön tanısı almasına rağmen mutasyon saptanmamıştır. Çalışmamızın sonuçlarına göre; IVS 1.110 (G>A) mutasyonu, Türkiye'nin diğer bölgelerinde olduğu gibi en yaygın mutasyon olarak belirlenmiştir.

DETERMINATION OF GLOBIN GENE MUTATIONS FREQUENCY IN THALASSEMIA PATIENTS IN KOCAELI

SUMMARY

Key Words: Thalassemia, Globin Gene, Kocaeli

Thalassemias are inherited hemoglobinopathies resulting from a decreased rate or production of one or more of the globin chains of hemoglobin. In alpha thalassemias the synthesis of alpha chains is diminished and in beta thalassemias the synthesis of beta chains is diminished. Alpha and beta thalassemias are common hemoglobinopathies in Turkey.

In our study 54 participants were analysed with Alpha and Beta Strip Assay Test. In this study from total 54 participants, 37 beta globin mutations (68.51%), 2 alpha globin mutations (3.70%) and 2 alpha and beta globin mutations (3.70%) were detected. Detected mutations show variations. In beta globin chain codon 44 (-C) / codon 44 (-C) (N=1) were detected as carrying homozygote. Heterozygote mutations in beta globin chain were detected as IVS 1.110 G→A (N=15), IVS 1.6 T→C (N=5), IVS 2.1 G→A (N=5), codon 8 (-AA) (N=5), codon 39 C→T (N=4), codon 8/9 (+G) (N=2), IVS 2.745 C→G (N=1), IVS 1.1 G→A (N=1). In alpha globin chain heterozygote mutations were detected as 3.7 single gene del(3.7/αα) (N=3) ve 20.5 kb double gene del (N=1). Although 13 cases have thalassemia prediagnosis no mutations were detected. As a result of our study IVS 1.110 (G>A) mutations was detected as most frequent like the other parts of Turkey.

BÖLÜM 1. GİRİŞ

Hemoglobinopati, hemoglobin molekülünün polipeptid zincirlerindeki yapısal değişiklikler veya sentez bozukluklarından kaynaklanan bir kan hastalığıdır. Bu kalıtsal hastalık yoğun olarak Afrika, Asya ve Akdeniz ülkelerinde görülmekle birlikte göçlerle Avrupa, Amerika ve Avustralya'ya da yayılmıştır [1]. Dünya Sağlık Örgütü, dünyadaki hemoglobinopati sıklığını % 5,1 olarak açıklamıştır. Bunun yanında dünyada 266 milyon hemoglobinopati taşıyıcısı olduğunu ve her yıl yaklaşık olarak 300000 hasta bebeğin dünyaya geldiğini bildirmiştir [2]. Anormal hemoglobinler hemoglobin molekülün yapısında yer alan globin zincirleri üzerindeki aminoasit değişikliği sonucu meydana gelmektedir. Milyonlarca insanın etkilendiği anormal hemoglobinlerin en yaygın olanları Hb S, Hb C, Hb D ve Hb E'dir [3].

Talasemiler hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirlerinden bir veya bir kaçının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğu ile karakterize olan genetik temelli hastalıklardır. Dünyada en sık görülen genetik hastalıklardan biridir. Akdeniz, Orta Asya, Afrika'nın bazı bölümleri ve Hindistan'ı içine alan kuşakta yüksek sıklıkla gözlenmektedir [4].

Alfa (α) talasemi, alfa globin üretimindeki genetik bozukluğa bağlı olarak α -globin zincir sentezinin azalması ya da yokluğuyla seyreden genetik bir hastalıktır [5]. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda beş tür delesyon gösterilmiştir [6].

Beta (β) talasemilerde, beta zincirinde meydana gelen anormallikler sonucu beta zincir yapımının azalması söz konusu olabilir. β -globin genindeki birçok mutasyon beta talasemiye yol açmaktadır [7]. Türkiye'de taşıyıcı sıklığı % 2,1 oranındadır. Bu oran bazı bölgelerde % 10'a kadar çıkmaktadır [8]. Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye'de beklenenin de üzerinde talasemili çocuk doğmasının önemli nedenlerinden biridir [9, 10].

Bu hastalıkların genetik tanısına yönelik çok çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında Reverse Dot-Blot Analizi (β -globin, α -globin Strip Assay) ve DNA Dizi Analizi oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

Bu çalışmada, 2007 - 2009 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalına, Kocaeli Bölgesi'nden talasemi ön tanısıyla gelen hastaların, globin genlerinde taşınan mutasyon tiplerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

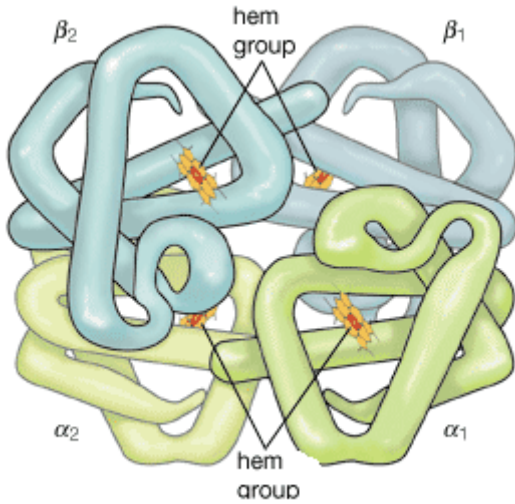
BÖLÜM 2. GENEL BİLGİ

2.1. Hemoglobinlerin Özellikleri ve Yapısı

Yüksek konsantrasyonda oksijen bağlama yeteneği bulunan ve eritrositler içinde yer alan hemoglobin (Hb) molekülü, oksijeni akciğerlerden dokulara, karbondioksiti dokulardan akciğerlere taşımaktadır [11]. Hb'nin bu görevi organ ve dokuların fonksiyonlarını yapabilmeleri için hayati öneme sahiptir. Maksimum 6,4 nm (nanometre) çapında ve sferik yapıda olan Hb, 64500 Da (Dalton) molekül ağırlığına sahip konjuge bir proteindir. Hb molekülü, hücre kuru ağırlığının %60'ını ve kan proteinlerinin 2/3'nü oluşturmaktadır. Erkeklerde 100 ml kanda ortalama 15 gr (gram) kadınlarda ise yaklaşık 13 gr kadar Hb bulunmaktadır. Yeni doğanlarda ise bu değer yaklaşık 20 gr olarak tespit edilmiştir [12]. Tetramer yapıda olan Hb molekülü "globin" adı verilen protein kısım ile "hem" denilen prostetik gruptan oluşmaktadır. Molekülün globin kısmında 4 adet polipeptid zinciri bulunur. Bu polipeptidlerin her biri, bir hem grubuna bağlıdır [3, 13, 14, 15].

Hb molekülü, globin kısmındaki polipeptid zincirlerinin amino asit sayıları ve dizilimleri bakımından farklılık göstermektedir. İnsanda Hb molekülünün globin kısmında 6 farklı polipeptid zinciri tanımlanmıştır. Bunlar, alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), epsilon (ϵ) ve zeta (ζ) polipeptid zinciri olarak adlandırılmıştır. α polipeptid zinciri 141 amino asitten, β , γ , δ , ϵ ve ζ polipeptid zincirleri ise 146'şar amino asitten oluşmaktadır [3, 13, 14].

Normal erişkin bir insanda hemoglobinin yaklaşık %97'sini meydana getiren Hb A'nın yapısında iki alfa ve iki beta zinciri ($\alpha_2\beta_2$) bulunmaktadır. Şekil 2.1' de hemoglobin A molekülünün yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Hemoglobin A molekülünün yapısı [16]

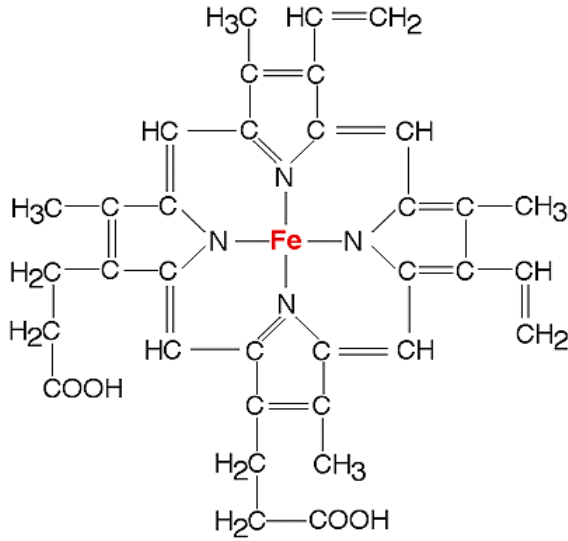
Farklı tipte olan iki zincir hemen hemen eşit uzunluktadır [11]. Bir diğer normal erişkin hemoglobini olan Hb A2 doğumdan yaklaşık 12 hafta sonra ortaya çıkan ve toplam hemoglobinin yaklaşık %2'sini oluşturan minör bir birleşendir. İki α -globin ve iki δ -globin zincirinden meydana gelir ($\alpha_2\delta_2$) [17]. Embriyonik ve fetal gelişim sırasında farklı hemoglobin takımları yer almaktadır. En erken oluşan Gower I takımı, α zincirlerine çok benzeyen iki zeta (ζ) zinciri ve β zincirlerine çok benzeyen iki epsilon (ϵ) zinciri içerir. Gebeliğin sekizinci haftasından itibaren, daha değişik zincirler içeren başka bir hemoglobin molekülü giderek bu embriyonik formun yerini almaya başlar. Hb F ya da fetal hemoglobin denilen bu molekül, iki α zinciri ve iki gama (γ) zinciri içerir. $G\gamma$ ve $A\gamma$ olmak üzere iki tip γ zinciri bulunur. Bu iki zincir birbirinden bir aminoasit değişikliği ile farklıdır ve ikisi de daha çok β zincirine benzer [18]. Farklı dönemlerde sentezlenen insan hemoglobin tipleri Tablo 2.1'de verilmiştir.

Tablo 2.1. Embriyonik, fetal ve erişkin dönemde sentezlenen normal insan hemoglobinleri [11]

Hemoglobin Cinsi	Zincir Kompozisyonu	Erişkin Miktarı [19]
Embriyonik Hemoglobin		
Hb Gower I	$\zeta_2 \epsilon_2$	-
Hb Gower II	$\alpha_2 \epsilon_2$	-
Hb Portland I	$\zeta_2 \gamma_2$	-
Hb Portland II	$\zeta_2 \beta_2$	-
Fetal Hemoglobin		
Hb F	$\alpha_2 \gamma_2$	<%1
Erişkin Hemoglobin		
Hb A	$\alpha_2 \beta_2$	%96 – 98
Hb A2	$\alpha_2 \delta_2$	%2-3

2.1.1. Hem molekülünün yapısı

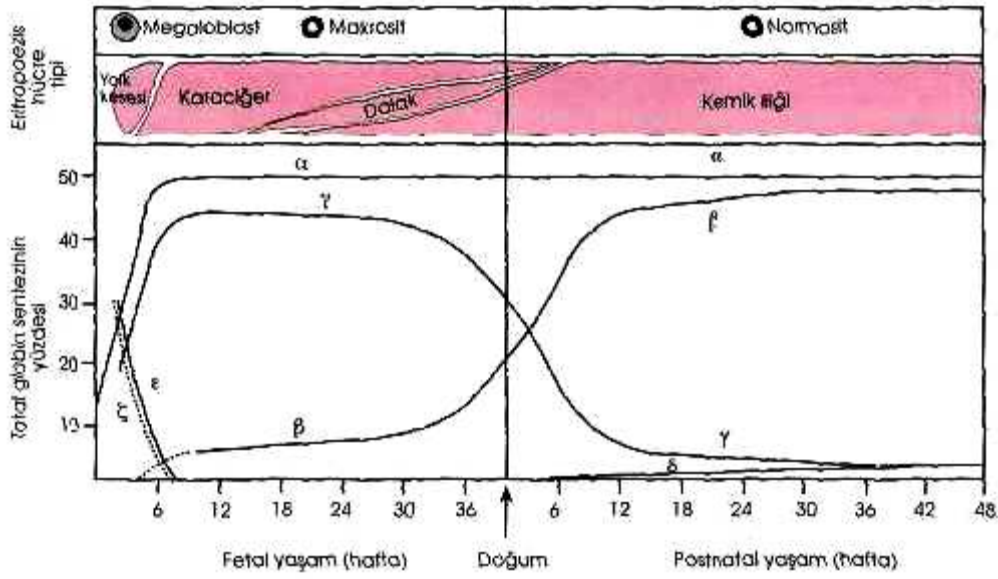
Hemoglobin molekülünün yapısındaki hem molekülü tüm insanlarda aynı yapıdadır (Şekil 2.2). Hem molekülü bir protoporfirin IX ve iki değerlikli demir (Fe^{+2}) kompleksidir. Porphirinler, kolaylıkla metal iyonları bağlayabilen genellikle Fe^{+2} veya Fe^{+3} halka yapısında olan birleşiklerdir. Demir molekülü porfirin halkasının dört azotuyla bağlanarak hem molekülünün ortasında tutulur. Hem'in Fe^{+2} 'i her biri düzlemsel porfirin halkasının ayrı tarafında olan iki bağ daha yapar. Bunlardan biri globin molekülünün bir histidin kalıntısının yan zincirine bağlanırken, diğeri oksijen bağlamaya uygundur. Böylelikle hemoglobin oksijen taşıma pozisyonuna sahip olur. Hem molekülünün biyosentezinin gerçekleştiği temel yerler, birçok hem proteini sentezleyen karaciğer ve hemoglobin sentezinin yapıldığı kemik iliğinin eritrosit üreten hücreleridir. Karaciğerde hem sentezinin hızı hem proteinlerine olan gereksinimdeki değişikliklere yanıt olarak farklılık gösterir. Oysa eritroid hücrelerde hem sentezi globin sentezi ile paralellik gösterir ve oldukça sabittir [8]. Hem'in konjuge çift bağlardan oluşan yoğun ağ yapısı, görünür ışık spektrumunun alt ucundaki ışınları yutarak moleküle koyu kırmızı renk verir [20].



Şekil 2.2. Hem'in molekül yapısı [21]

2.1.2. Hemoglobin dönüşümü

Hemoglobin sentezi prenatal ve postnatal dönemde değişim gösterir. Embriyonik globin sentezi gebeliğin üçüncü haftasından sekizinci haftasına kadar olan dönemde vitellus kesesinde gerçekleşir [11]. Embriyonik hayatın erken safhalarında Hb Gover 1 ($\zeta 2\epsilon 2$), Hb Gover 2 ($\alpha 2\epsilon 2$) ile Hb Portland ($\zeta 2\gamma 2$) üretimiyle hemoglobin sentezi başlar. Gebeliğin 5. haftasından itibaren hemoglobin sentezi vitellus kesesinden fetal karaciğere doğru hareket eder ve 8. haftasında fetal karaciğer, Hb F ($\alpha 2\gamma 2$) ve az miktarda ($< \%10$) Hb A sentez görevini sürdürür. Hb F üretimi dalakta da devam eder. Gebeliğin 13. haftasında embriyonik hemoglobinler kaybolur ve fetal hemoglobin olan Hb F baskın hale geçer. Gebeliğin 18. haftasından doğuma kadar eritrosit üretim görevi fetal karaciğerden kemik iliğine geçmeye başlar. Gebeliğin 35. haftası itibariyle Hb F miktarı belirgin olarak düşmeye, Hb A miktarı yükselmeye başlar (Şekil 2.3). Bu durum doğumdan sonra da devam eder. Bir yaşında Hb F üretimi yaklaşık %2, erişkinde ise yaklaşık olarak %1'in altına inmektedir [22-25]. Globin genlerinin gelişimini kontrol eden bazı transkripsiyon faktörleri bilinmektedir. Globin zincir üretiminin regülasyonunu sağlayan mekanizma, talaseminin potansiyel tedavisinde önem taşır [11].



Şekil 2.3. Prenatal ve postnatal dönemlerde globin sentezi [11]

2.1.3. Globin gen kümesi

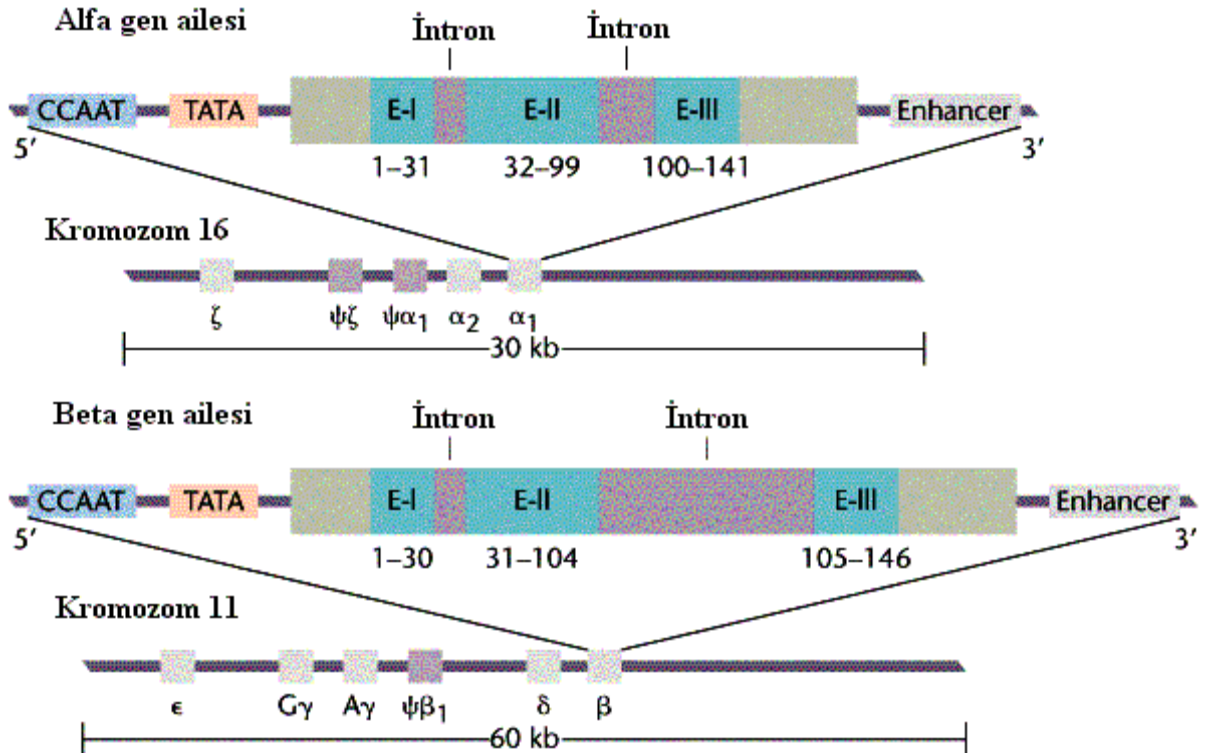
Hemoglobin zincirlerinin α -globin benzeri ve β -globin benzeri alt birimlerini kodlayan, iki ayrı kromozom üzerinde, iki farklı gen ailesi bulunmaktadır [17].

2.1.3.1. Alfa gen ailesi

Alfa gen ailesi 30 kb'dan daha büyük bir DNA bölgesini kapsar ve genler 5'- ζ - $\Psi\zeta$ - $\Psi\alpha 2$ - $\Psi\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ - $\theta 1$ -3' şeklinde sıralanmaktadır. 16. kromozomun kısa kolunda yer alan alfa gen ailesi üç tane α -globin geni bulundurur. Bu genler zeta (ζ) ve iki adet alfa (α_1 - α_2) genleridir. Zeta geni embriyonik gelişimin ilk basamaklarında ifade edilirken, α_1 - α_2 genleri fetal ve erişkin dönemde ifade edilir. Bu genlerin dışında işlevsiz yalancı genler (pseudogene, $\Psi\zeta$ - $\Psi\alpha 2$ - $\Psi\alpha 1$) bulunmaktadır. Alfa gen ailesi iki intron ve üç ekson bölgesini içerir. Ökaryotlarda yaygın olduğu gibi, üç işlevsel gen çok küçük bir bölgede yer almaktadır. Bölgenin büyük bir kısmını genler arası bölgeler oluşturur. ζ ve α_1 - α_2 genlerini içeren eksonlardaki nükleotit dizisi hemen hemen aynıdır. İki ekson bölgesi de 141 amino asit uzunluğunda polipeptit kodlar. Ailede bulunan iki intronun ise nükleotit dizileri tamamen farklıdır [17, 18].

2.1.3.2. Beta gen ailesi

İnsanlarda beta globin gen ailesi alfa gen ailesinden büyüktür. Beta globin gen ailesi yaklaşık 60 kb'lık bir DNA bölgesini kapsar ve genler 5'-ε-Gγ-Aγ-Ψβ-δ-β-3' şeklinde sıralanmaktadır. 11. kromozomun kısa kolunda yer alır ve beş gen içerir. Bu genler ε, Gγ, Aγ, β ve δ genleridir. Epsilon geni embriyonik, gama genleri ise fetal genlerdir. Delta ve beta genleri doğumdan itibaren ifade edilen genlerdir. Beta globin gen ailesinde bir adet pseudogen bulunmaktadır. Üç ekson ve iki introndan meydana gelir [18]. Epsilon, gama, beta ve delta işlevsel genleri 146 amino asitten meydana gelmektedir. Beta gen grubu üzerinde bulunan Gγ ile Aγ genleri yapısal olarak benzer protein ürünü vermektedir. Bu genler 136. aminoasit pozisyonunda Aγ geninin Alanin ve Gγ geninin Glisin içermesiyle farklılık göstermektedir. Gγ/Aγ oranı doğumda 3/1 iken bu oran beş aylıkken 2/3'e iner. [22, 26, 27]. Globin gen ailesi Şekil 2.4'de gösterilmiştir.



Şekil 2.4. Globin gen ailesi [28]

2.2. Hemoglobinopatiler

Hemoglobin molekülünün sentezindeki azalma veya yapısal değişikler sonucu insan popülasyonunda en yaygın görülen ve kalıtsal bir kan hastalığı olan hemoglobinopatiler ortaya çıkmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü tarafından dünyadaki hemoglobinopati sıklığının %5,1 olduğu ve her yıl yaklaşık olarak 300000 hasta bebeğın dünyaya geldiğı açıklanmıştır [2].

Toplum taramasında anormal hemoglobinler elektroforez, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), izoelektrofokusing (IEF) yöntemleri kullanılarak analiz edilmektedir. Bu yöntemler ile kesin tanısı konulamayan varyantlar DNA analizleri sonucunda teşhis edilmiş olup bugüne kadar 920'den fazla hemoglobin varyantı keşfedilmiştir [29]. Hemoglobinin yapısal varyantları, klinik fenotipe bağılı olarak iki grupta incelenebilir [11].

2.2.1. Anormal hemoglobin sendromları

2.2.1.1. Hb S

Hemoglobin molekülünün ilk bulunan varyantı Hb S'dir. Hb S molekülü, Hb A'nın beta globin zincirindeki 6. aminoasidi olan glutamik asidi kodlayan (GAG) dizinin yapısal değişimi sonucunda valin (GTG) kodlayan aminoasit dizisinin meydana gelmesiyle oluşur (β 6 (A3) Glu → Val: GAG-GTG) [11, 24].

Hb S, orak hücreli anemiye (sickle cell anemia) sebep olmaktadır. Homozigot mutasyonla ortaya çıkan orak hücreli anemi özellikle Afrika'da zencilerde görülmesine rağmen Akdeniz ülkelerinde, Arap ülkelerinde ve Amerika'da da bu hastalığa sıkça rastlanılmaktadır [24]. Hb S içeren eritrositler O₂ azlığı sonucunda polimerleşerek ya da fibriller formda toplanarak kırmızı hücrelerin orak şeklini almasına neden olmaktadır. Oluşan bu hücreler kısa ömürlüdürler ve kapiller damarları tıkararak normal kan akımında bozulma ve lokal hipoksiye neden olurlar [11, 24]. Göze çarpan klinik belirtileri tekrarlayan şiddetli ağrılar, organ hasarına yol açabilecek doku enfarktüsleri ve bazı enfeksiyonların şiddetinde artıştır [3, 14]. Hb S geninde heterozigot mutasyon bulunan (Hb A, Hb S) orak hücre taşıyıcıları klinik olarak normaldir. Taşıyıcıların

eritrositlerinde Hb A ve Hb S birlikte bulunur ancak Hb S oranı %50'den azdır [3]. Hb S mutasyonunun 9 farklı beta talasemi mutasyonu ile kombinasyonu gözlenmiştir. Bunlar IVS 1-110/S, IVS 1-1/S, IVS 2-745/S, IVS 2-1/S, IVS 1-6/S, Cd 39/S, Cd 44/S, -30/S ve FSC 8/S 'dir [30].

2.2.1.2. Hb C

Beta zincirinin 6. pozisyonundaki glutamik asit yerini lizin alır (β 6(A3) Glu \rightarrow Lys: GAG \rightarrow AAG). Bu durumda Hb C oluşur. Hb C, Hb A'dan daha az çözünürlüğe sahiptir. Eritrosit dikdörtgen şeklinde deforme olur ve kristalleşerek çöker. Batı Afrika bölgesi insanların sıklıkla rastlanılan bir varyanttır. Bu bölgenin insanlarındaki sıklığı %25 oranında iken Afrika kökenli Amerikalıların yaklaşık %3'ünde gözlenmektedir. Hb C'ye ayrıca Türkiye, İtalya, Yunanistan, Hollanda ve Orta Asya'da da rastlanmaktadır. Hb C taşıyıcısı olan heterozigot bireylerde önemli bir klinik belirti görülmezken, homozigot bireylerde kronik hemolitik anemi ve splenomegali görülmektedir [3, 11, 13].

2.2.1.3. Hb D

Beta globin zincirinin 121. pozisyonundaki glutamik asit yerine glutamin amino asiti geçmiştir (β 121(GH4) Glu \rightarrow Gln: GAA \rightarrow CAA). Hb D'nin, Hb D Los Angeles, D-Punjab, D-North Carolina, D-Portugal, Oak Ridge ve D-Chicago gibi formları vardır. Hb D-Punjab en yaygın formudur ve Hindistan'ın Punjab bölgesinde Hb D varyantı gözlemlendiği için bu adı almıştır. Hemoglobinin bu varyantı, Avusturya, İspanya, Yunanistan, İngiltere, Almanya, Portekiz, Türkiye, İran ve Hindistan'da gözlenmektedir. Hb A/D heterozigot ve Hb D/D homozigot genotipli bireylerde herhangi bir semptom görülmemektedir. Hb S/D genotipli bireylerde orak hücre sendromu görülmektedir [3, 31, 32].

2.2.1.4. Hb E

Hb E'de β -globin polipeptid zincirinde 26. pozisyonundaki glutamik asit yerine lizin amino asitinin geçmesiyle oluşur (β 26 (B8) Glu \rightarrow Lys: GAG \rightarrow AAG). Bu değişim,

pre-mRNA'nın fonksiyonel m-RNA'ya dönüşüm işleminde anormalliğe neden olur ve Hb E, olması gerektiğinden daha az miktarda sentezlenir [31]. Hemoglobinin E varyantı daha çok Uzak Doğu Asya populasyonlarında yaygın olarak görülmektedir. Tayland'da %8-55, Kamboçya'da %32, Laos'da %28, Vietnam'da %3-9, Malezya'da %5-28, Endonezya'da %0-16, Hindistan'da %3, Seylan'da %12 oranında saptanmıştır. Ayrıca İran, Suudi Arabistan'ın doğusu, İtalya, Yunanistan ve Türkiye'de de görülmektedir [3]. Ülkemizde üçüncü sıklıkta gözlenmekte olup (Hb S, Hb D, Hb E), özellikle Çukurova bölgesinde bulunmaktadır ve taşıyıcı sıklığı %0,16 - 2,4 arasında değişmektedir [34]. Hb A/E heterozigotlarında herhangi bir semptom görülmemektedir. Hb E/E homozigot bireylerinde, orta derecede anemi görülmekte olup eritrositlerin ömrü biraz kısalmıştır [31].

2.2.1.5. Türkiye'de saptanan anormal hemoglobin varyantları

Ülkemizde yapılan çalışmalar sonucunda 42 anormal hemoglobin varyantı saptanmıştır. Bunlardan 13 tanesini alfa zincir varyantı ile 24 tanesini beta zincir varyantı oluştururken, 1 gama zincir varyantı, 2 hibrid hemoglobin, 2 tanesi yapısal değişimli, 1 uzamış alfa zinciri ve 1 delesyon/insersiyon sonucunda uzamış beta zincir varyantıdır. Saptanan anormal hemoglobinlerden bazıları ilk defa Türk populasyonunda tanımlanmıştır. Bunlar beta zincir varyantlarından Hb Çapa, Hb Ankara, Hb Hakkari, Hb J-Antakya ve Hb İstanbul'dur. Hb İstanbul Fransız araştırmacılar tarafından başka bir hastada Hb Saint Etienne olarak rapor edilmiştir [33]. İlk kez toplumumuzda tespit edilen alfa zincir varyantlarından Hb Adana ise unstabildir (dengesizdir) [34].

Gözlenen 42 anormal hemoglobin varyantlarından 8 tanesi dengesiz hemoglobinlerden, 3 tanesi talasemik anormal hemoglobinlerdendir [34]. Türkiye'de saptanan anormal hemoglobin tipleri Tablo 2.2-6' da gösterilmektedir.

Tablo 2.2. Türkiye’de saptanan tek baz değişimli alfa zincir varyantları [34, 35]

Hemoglobin Adı	Aminoasit Değişimi	Mutasyon
O-Padova	30 Glu→Lys	GAG→AAG
Hasharon	47 Asp→His	GAC→CAC
Adana	59 Gly→Asp	GGC→GAC
Montgomery	48 Leu→Arg	CTG→CGG
J-Anatolia	61 Lys→Thr	AAG→ACG
Ube-2	68 Asn→Asp	AAC→GAC
Q- Iran	75 Asp→His	GAC→CAC
Moabit	86 Leu→Arg	CTG→CGG
M-Iwate	87 His→Tyr	CAC→TAC
Çapa	94 Asp→Gly	GAC→GGC
G-Georgia	95 Pro→Leu	CCG→CTG
Strumica	112 His→Arg	CAC→CGC
J-Meerut(J Birmingham)	120 Ala→Glu	GCG→GAG
Hb Setif	94 Asp→Tyr	GAC→TAC
Hb Bronova	103 His→Leu	CAC→CTC
Hb Constant Spring	142 Term→Gln	TAA→CAA

Tablo 2.3. Türkiye’de saptanan tek baz değişimli beta zincir varyantları [34, 35]

Hemoglobin Adı	Aminoasit Değişimi	Mutasyon
S	6Glu→Val	GAG→GTG
C	6 Glu→Lys	GAG→AAG
Ankara	10 Ala→Asp	GCC→GAC
E-Saskatoon	22 Glu→Lys	GAA→AAA
G-Coushatt	22 Glu→Ala	GAA→GCA
D- Iran	22 Glu→Gln	GAA→CAA
E	26 Glu→Lys	GAG→AAG
Knossos	27 Ala→Ser	GCC→TCC
Hakkâri	31 Leu→Arg	CTG→CGG
G-Copenhagen	47 Asp→Asn	GAT→AAT
SummerHill	52 Asp→His	GAT→CAT
Hamadan	56 Gly→Arg	GGC→CGC
J-Antakya	65 Lys→Met	AAG→ATG
J-Iran	77 His→Asp	CAC→GAC
G-Szuhu	80 Asn→ Lys	AAC→AAA / AAG
İstanbul Saint Etienne	92 His→Gln	CAC→CAA / CAG
N-Batimore	95 Lys→Glu	AAG→GAG
Köln	98 Val→Met	GTG→ATG
Los Angeles (D-Punjab)	121 Glu→Gln	GAA→CAA
O-Arab	121 Glu→Lys	GAA→AAA
Beograd	121 Glu→Val	GAA→GTA
Sarrebouurg	131 Gln→Arg	CAG→CGG
Bronckton	138 Gln→Arg	GCT→CCT
City of Hope	69 Gly→Ser	GGT→AGT
Volga	27 Ala→Asp	GCT→GAT
Siirt	27 Ala→Gly	GCT→GGT
Tyne	5 Pro→Ser	GCT→TCT
Pyrgos	83 Gly→Asp	GCT→GAT

Tablo 2.4: Türkiye’de saptanan tek baz değişimli gama zincir varyantları [34, 35]

Hemoglobin Adı	Aminoasit Değişimi	Mutasyon
F-Başkent	128 Ala→Thr	GCT→ACT

Tablo 2.5. Türkiye’de gözlenen unstabil (dengesiz) hemoglobinler [34, 35]

Hemoglobin Adı	Aminoasit Değişimi	Mutasyon
Hasharon	α 47 Asp→His	GAC→CAC
Adana	α 59 Gly→Asp	GGC→GAC
Moabit	α 86 Leu→Arg	CTG→CGG
Çapa	α 94 Asp→Gly	GAC→GGC
Hakkâri	β 31 Leu→Arg	CTG→CGG
İstanbul (Saint Etienne)	β 92 His→Gln	CAC→CAA / CAG
Köln	β 98 Val→Met	GTG→ATG

Tablo 2.6. Türkiye’de saptanan talesemik anormal hemoglobinler [34, 35]

Hemoglobin Adı	Aminoasit Değişimi	Mutasyon
E	β 26 Glu→Lys	GAG→AAG
Knossos	β 27 Ala→Ser	GCC→TCC
City of Hope	β 69 Gly→Ser	GGT→AGT

2.2.2. Talasemiler

Hemoglobin molekülünün yapısında yer alan globin zincirlerinden birisinin veya birden fazlasının sentezindeki azalma veya yokluğu ile karakterize olan kalıtsal bir hastalıktır [4, 22]. Talasemiler otozomal mutant genler sonucu oluşur. Dünyada en sık görülen genetik hastalıktır. “ α -talasemi” ve “ β -talasemi” olmak üzere 2 majör talasemi grubu bulunmaktadır [7]. α -talasemi daha yaygın ve geniş bir dağılıma sahip olmasına rağmen α ve β talaseminin her ikisi de birçok toplumda yüksek oranda izlenir. Talasemi ağırlıklı olarak Akdenizliler, Hintliler, Çinliler ve Güney Asya kökenlilerde görülür [11].

Talasemi ilk defa 1925’de hayatlarının ilk yıllarında derin anemi ve splenomegali gelişen bebekleri tanımlayan pediatrist Thomas Cooley tarafından tarif edilmiştir. Daha

sonra benzer vakaların görülmesi üzerine bu kalıtsal hemolitik anemiye Van Jaksch anemisi, splenik anemi, eritroblastozis ve Akdeniz anemisi gibi adlar verilmiştir. George Whipple ve Lesley Bradford inceledikleri vakaların Akdeniz civarı ülkelerden geldiğini saptadıkları hastalığa Yunanca deniz anlamına gelen “Thalassemia” adını vermişlerdir. Daha sonra bu hastalığın yalnız Akdeniz ülkeleri toplumlarında olmadığı diğer toplumlarda da bulunduğu saptanmıştır [36]. Talasemilerin Dünyadaki dağılımı Şekil 2.5’de gösterilmiştir.



Şekil 2.5. Talasemilerin dünyadaki dağılımı [24]

2.2.2.1. Alfa talasemi

Alfa genleri üzerinde meydana gelen delesyonlar veya nokta mutasyonları (tek veya birkaç baz değişimleri) sonucu globin zincir sentezi azalmakta veya tamamen engellenmektedir. En yaygın alfa talasemi formları delesyonlar sonucu oluşanlardır [11]. 4 adet α -globin geni bulunduğundan bu genlerin birinin, ikisinin, üçünün veya dördünün birden fonksiyon görmemesine bağlı olarak farklı klinik tablolar görülmektedir [31]. Eğer 4 genden biri hatalıysa birey sessiz taşıyıcı olarak adlandırılır. Bu kişilerde hastalığa ait hiçbir bulgu yoktur. Eğer iki α -globin geni hatalıysa kişi α -

talasemi taşıyıcısı olarak ifade edilir [17]. Bu kişilerde hafif anemi gözlenir. Bu iki tip fonksiyon bozukluğu Afrika, Akdeniz ve Asya popülasyonlarında oldukça yaygın olarak görülmektedir [31]. Eğer kişide α -globin genlerinin üçü birden fonksiyon görmüyorsa, “Hb H Sendromu” görülmektedir. Bu bireylerde tek bir α -globin geni faaliyet gösterdiğinden sentezlenen α -polipeptid zincir miktarı gerekli fonksiyonların yerine getirilebilmesi için yetersiz kalmaktadır. Fazla miktarda sentezlenen β -zincirlerinin bir kısmı bu α -zincirleri ile birleşerek Hb A’yı oluştururken, geriye kalan β -zincirleri tetramerler (β_4) yaparak “Hb H”ı oluştururlar. Bireyde mevcut Hb’nin %4-30’nu Hb H oluşturmaktadır. O_2 afinitesi yüksek olan Hb H dokulara O_2 vermediğinden, bu bireylerde orta derecede anemi görülmektedir. Güney Doğu Asya’da, Yunanistan’da ve İtalya’da daha sık görülmektedir [14, 37]. Eğer kişide α -globin genlerinin dördü de fonksiyon görmüyorsa, α -talaseminin en ağır şekli olan “Hb Barts Hidrops Fetalis Sendromu” görülür. Daha çok Güney Doğu Asya’da yaygın olan bu sendromda, α -polipeptid zincirleri hiç sentezlenmemektedir. Buna karşılık fazla miktarda γ ve az miktarda β -zinciri sentezi yapılmaktadır. Bu sendromda, fazla miktardaki γ - polipeptid zincirleri, tetramerler yaparak “Hb Barts”ı meydana getirirler. Bu Hb’nin O_2 afinitesi yüksek olduğundan dokulara O_2 vermemektedir. Mevcut Hb’nin %80’nini Hb Barts, geri kalan kısmını ise Hb H (β -zincir tetramerleri) ve Hb Portland oluşturmaktadır. Hb Barts Hidrops Fetalis Sendromlu fetus, hamileliğin 34 - 40. haftaları arasında ölü doğmakta veya doğumdan hemen sonra ölmektedirler. Bu hastalığa sahip fetusun her iki ebeveyni de α -talasemi taşıyıcısıdır [7, 14, 37].

Çeşitli Afrika toplumlarının %10-30’unda bir α -globin allelinde delesyon oluşur ve α -talasemi sessiz taşıyıcılığı oldukça yaygındır. α -talasemi sessiz taşıyıcı şiddetini hafifçe azaltmak için orak sendromlarıyla birbirini etkilemeye eğilimlidir. α -talasemi sessiz taşıyıcının homozigot durumu da yaygındır fakat α -talasemi taşıyıcısı (2 gen delesyonu) bu toplumda yoktur, bu yüzden Hb H hastalığı ve hidrops çok nadirdir [38]. Bazı toplumlarda Hb Constant Spring ile birlikte α -talasemi, α -globin geninin sonlanma kodonu translasyonundaki mutasyondan kaynaklanır. Constant spring genler α -talasemi geni gibi davranır. Hb Constant Spring Asya toplumlarında çok yaygındır. Bu toplumlarda α -talasemi olanlarda yaygındır ve α -talasemi geni olduğu için α -talasemi ile birbirini etkiler. Hb Constant Spring her zaman aynı kromozom üzerindeki normal α alleli ile ilişkili olduğu için hidrops fetalis oluşmaz [38].

2.2.2.2. Dünyada ve Türkiye’de alfa talasemi

Alfa talasemi özellikle uzak doğuda önemli bir sorun haline gelmiştir. Güneybatı Asya’da alfa⁰ – talasemi (--^{SEA}, --^{THAI}, --^{FIL}) ve alfa⁺ - talasemi çok yaygındır. Bu bölgede beklenen görülme sıklığı Hb Bart hidrops fetalis için her bin doğumda 0,5 ile 5 arasında, Hb H hastalığı içinse her bin doğumda 4 ile 20 arasındadır [39].

Afrika’da özellikle Nijerya, Fildişi Sahilleri ve Kenya’yı içine alan ekvatorial bölgede alfa⁺ - talasemiye neden olan -a^{3,7} (3.7 single gene del(3.7/αα)) allelinin frekansı %3 – 4 olarak bildirilmiştir. Alfa⁰ – talasemi Afrika’da ve Afrika kökenli Amerikalılarda nadir gözlenmektedir [39].

Akdeniz bölgesinde -a^{3,7} (3.7 single gene del(3.7/αα)) allel frekansının (%18) en yüksek bulunduğu yer Sardunya Adasıdır. Alfa⁰ – talasemi Akdeniz bölgesinde çok nadirdir. [39]

Arap Yarımadası’nda -a^{3,7} (3.7 single gene del(3.7/αα)) allel frekansının %1 ile %67 arasında değiştiği ve en yüksek frekansın Umman bölgesinde olduğu bildirilmiştir [39].

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda beş tür delesyon gösterilmiştir. Bunlardan üç tanesi (26,5 kb, 20,5 kb ve 17,4 kb) aynı allel üzerindeki α₂ ve α₁ genlerini içine alan ağır alfa talasemi taşıyıcıları (α-tal-1: --/αα), diğer ikisi (3,7 kb ve 4,2 kb) ise sadece bir alfa genini içine alan (α-tal-2: -α/αα) sessiz alfa talasemi taşıyıcılarıdır. Alfa 2 geni üzerindeki delesyonsuz alfa talasemi mutasyonlarından Akdeniz Ülkelerine spesifik olanlar PA1: AATAAA→AATGAA ve PA2: AATAAA→AATAAG ile IVS 1’in donör kısmındaki 5 nükleotidlik delesyon (-TGAGG) ülkemizde de görülmüştür. Alfa 1 geni üzerinde (Cod 59 GGC→GAC: Gly→Asp) bulunan ve G→A değişimi ile meydana gelen dayanıksız Hb Adana varyantı da alfa talasemiye neden olmaktadır. Hb Adana ve Poly A (PA2) mutasyonları ilk kez Türkiye’de Hb H hastalarında tanımlanmıştır [6, 40].

2.2.2.3. Beta talasemi

Beta talasemi hemolitik anemi ve mikrositoz ile karakterize otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalıktır [41]. En yaygın görülen talasemi tipi olup Hb molekülünün β -globin zincirinin hiç sentezlenmemesinden (β^0 talasemi) veya az miktarda sentezlenmesinden (β^+ talasemi) kaynaklanmaktadır [7]. β^0 talasemilerin moleküler düzeyde üç tipi tarif edilmiştir; β -globin mRNA'sının hiç sentezlenemediği durumlar, fonksiyon görmeyen mRNA'nın sentezlendiği durumlar, fonksiyonel β -globin mRNA'sının translayon mekanizmasındaki bozukluktan dolayı kullanılmadığı durumlar. β^+ talasemilerde, β -globin mRNA yapımının azalmasından dolayı β -globin zincir sentezi de değişik derecelerde olmak üzere azalmıştır. Beta globin genindeki mutasyonlar beta zinciri yapımını etkiler. Alfa zincir yapımı normal hızda devam eder. Bu durum alfa zincir lehine bir zincir dengesizliğine neden olur. Hemoglobin sentezinde kullanılmayan alfa zincirleri, hücre içinde büyük inklüzyonlar oluşturarak eritroid serinin kemik iliğinde olgunlaşmakta olan genç hücrelerinde çöker. Bu hücrelerin bir kısmı kemik iliğinde olgunlaşmadan parçalanır (ineffektif eritropoiez). Dolaşıma geçen alfa zincir inklüzyonlarını içeren olgunlaşmış kırmızı seri hücreleri yaşam sürelerini tamamlamadan, özellikle dalağın mikrosirkülasyonundan geçerken tahrip olur. Buna bağlı olarak ortaya çıkan anemi, böbreklerden eritropoietin yapımının artışı için bir uyarıdır. Talasemi majorlü vakalarda hemoglobinin büyük kısmını oluşturan Hb F'in oksijene ilgisi fazla olduğundan dolayı doku anoksisine katkıda bulunarak eritropoietin artışına neden olur. Eritropoietin etkisiyle kemik iliği aktivitesinin artışına bağlı olarak kafatası ve ekstremitelerde kemiklerinde masif bir genişleme ile ilgili olarak ciddi deformiteler oluşur. Anormal kırmızı seri (eritrosit öncü hücreleri) hücreleri daima dalak tarafından dolaşımdan kaldırıldığı için dalak hipertrofiye uğrar. Böylece gelişen splenomegali anemiye katkısı olan plazma volümünün artışına ve hipersplenizme neden olur [6].

2.2.2.4. Beta talasemi minor

β -talasemi geninin heterozigot (Hb A/ β -tal) taşınması durumu “ β -talasemi minor” veya “ β -talasemi taşıyıcılığı” olarak adlandırılmaktadır. Bu bireylerde hafif düzeyde anemi görülmektedir. Bunlar klinik olarak asemptomatiktir. Bu bireylerde mikrositer anemi ve

hipokrom görülmektedir. β talasemi heterozigotun önemli bir özelliği Hb A2 seviyesi normale göre artmıştır. Eritrosit sayısı (RBC) yüksek, ortalama eritrosit volümü (MCV), ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) düşüktür. Talasemi taşıyıcıları demir eksikliği anemisiyle karıştırılabilir. β -talasemi taşıyıcılığında demir, total demir bağlama kapasitesi ve ferritin normaldir. Hb elektroforezinde Hb A2, Hb F veya her ikisinde artışın gösterilmesi ile tanıya gidilir [38, 42, 43].

Genellikle, β -talasemi taşıyıcılığı olan hastalarda MCV 75'den daha küçüktür ve hematokrit 30'dan büyüktür. Tersine, demir eksikliği olan hastalarda nadiren hematokrit 30'un altına düşene kadar MCV 75'in altındadır. Bu prensibin kantitatif hesabı Mentzer indeksidir (MCV/RBC). MCV/RBC 13'ten büyükse demir eksikliği ile uyumludur. 13'den küçükse β -talasemi taşıyıcılığı ile daha uyumludur. β -talaseminin klasik şekillerinde hemoglobin elektroforezi ile genellikle yüksek Hb A2 düzeyi gösterilir ve tanıyı doğrulayan iyi bir araçtır. Yüksek Hb A2 birikiminin esas sebebi bilinmemektedir. Hb F oranı artabilir (%1–5) [38, 42, 43].

2.2.2.5. Beta talasemi major

β -talasemi geninin homozigot olması ise " β -talasemi major" olarak adlandırılmış olup ağır bir hastalıktır. β -talasemi majorlu bebek doğduğunda normaldir, fakat 6 aydan sonra 1 yıla kadar derin anemi gelişmektedir. Kalıtsal olan talasemi major, hamilelik süresince fetusu etkilemez. Her iki β globin geninde görülen talasemik mutasyon ağır anemi, büyüme geriliği, hipokromik, mikrositer anemi, hemoliz ve rejenerasyon bulgularına neden olmaktadır. β talasemi majorlu hasta yaşamın erken evresinden itibaren transfüzyona bağımlıdır [3, 7, 31].

Talasemi majörlü hastaların laboratuvar bulgularında; eritrosit sayısı, MCV, MCH, ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyon (MCHC) değerlerinde azalma, periferik yaymada ağır hipokromi, mikrositoz, poikilositoz, anizositoz, normoblast, bazofilik noktalanma ve hedef hücreleri dikkat çekmektedir. Hemoglobin elektroforezinde; Hb F hakimiyeti ve değişik düzeylerde Hb A2 ve Hb A düzeyleri saptanmaktadır [43, 44].

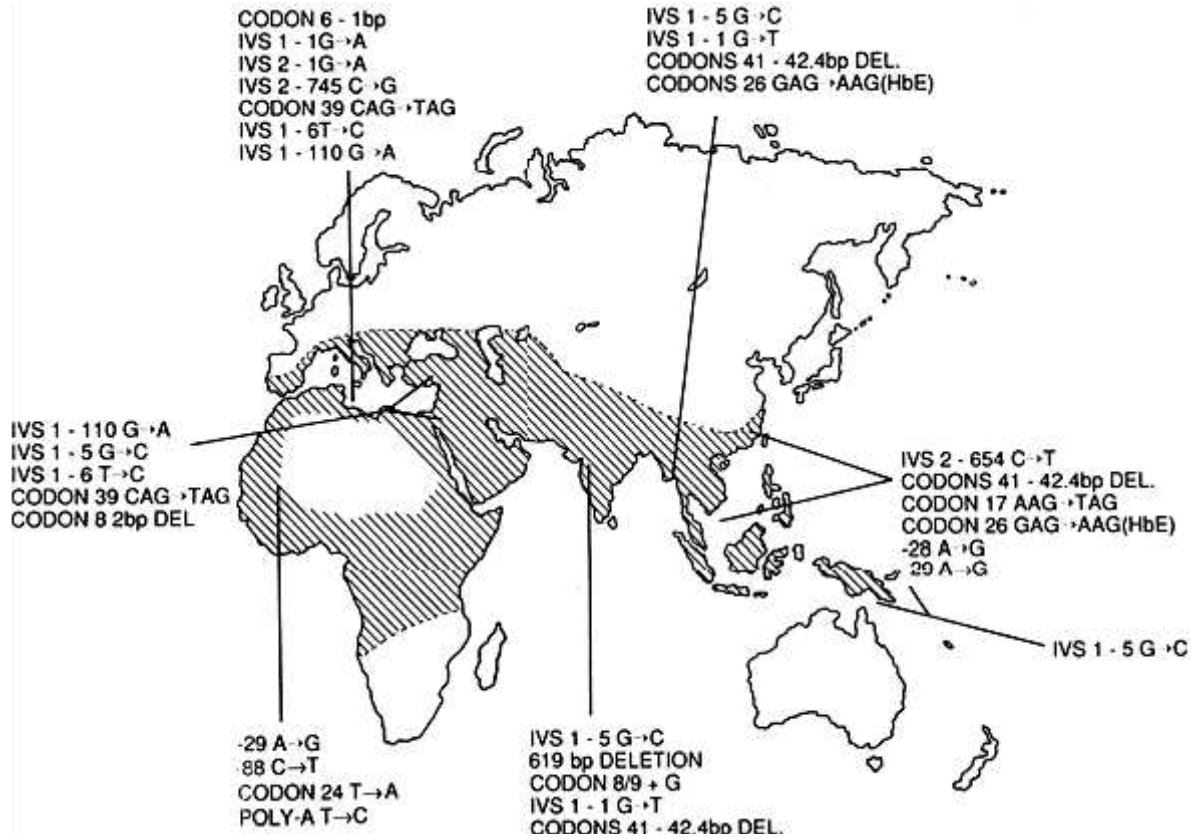
2.2.2.6. Beta talasemi intermedia

“ β -talasemi intermedia” talasemi minor ile talasemi major arasındaki spektrumu içine almaktadır. Transfüzyon olmadan hemoglobin düzeylerini 6 gr/dL civarında koruyabilirler. Fakat büyüme geriliği, splenomegali, iskelet deformiteleri, kemik ağrıları, kronik ülserler görülebilir. Bazen de vakaların bir kısmı 10 - 12 gr/dL Hb düzeyleri ile erişkin yaşa kadar semptomsuz kalabilir [43, 44]. Zencilerde beta talasemi intermedianın en sık nedeni -88(C-T), -29 (A-G) gibi promotör bölge mutasyonlarıdır. Buna karşın Akdeniz ülkelerinde ise homozigot IVS 1.6 (T-C) bozukluğu sıklıkla beta talasemi intermediaya neden olmaktadır [3 - 7].

2.2.2.7. Dünyada ve Türkiye’de beta talasemi

β -talasemi geni daha çok İtalya, Yunanistan, Kıbrıs, Fransa, Kuzey Afrika ülkeleri, Türkiye’nin güney ve batı kıyıları gibi Akdeniz ülkeleri ile Orta Doğu Asya, Hindistan, Vietnam ve Kamboçya’da yaygın olarak görülmektedir. β -talasemi taşıyıcı oranları; İtalya’da % 13, Kuzey Kıbrıs’ta % 13, Kıbrıs Rum kesiminde % 18, Yunanistan’da % 20-30 olarak bildirilmiştir [3, 4]. β -talasemi’nin Dünyadaki yayılışı Şekil 2.6’da gösterilmiştir.

Talasemilerin Türkiye’de en sık görülen tipi β -talasemidir. Türkiye’de β -talasemi taşıyıcı sıklığının bölgelere göre %0,6-13 arasında olduğu bildirilmiştir. Bu sıklık oranı Türkiye genelinde %2,1 olarak bildirilmiştir [45, 46]. Ülkemizde Çukurova, Akdeniz kıyı şeridi, Ege ve Marmara bölgelerinde talasemi taşıyıcılığı çok sıktır. İç Anadolu, Doğu ve Güneydoğu Anadolu’ da yeterince araştırma merkezi olmadığından bu yörelerde kesin bir rakam bilinmemektedir. Türkiye genelinde 1300000 taşıyıcı ve 4000 civarında hasta olduğu bildirilmiştir [47].



Şekil 2.6. Beta talasemi'nin Dünyadaki dağılımı [22]

Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği beta talasemili çocuk doğmasının nedeni olarak görülmektedir. Hastalık, hafif klinikli β -talasemi intermedia ile transfüzyona bağımlı β -talasemi majör arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmekle birlikte, Türkiye'de β -talasemi majör olguları ağır basmaktadır. Halen Türk toplumunda 30'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. Türk popülasyonunda tanımlanan beta talasemi mutasyonları Tablo 2.7'de gösterilmiştir. Bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde güçleştirmektedir. IVS 1.110 Türkiye'de en sıklıkla rastlanan β -talasemi mutasyonudur. IVS 1.110'un Türkiye genelinde %40 olan sıklığı, Orta Anadolu'da %50'yi aşmakta, buna karşılık Doğu ve Güney Doğu Anadolu'da %25'lere düşmektedir. Türkiye'nin coğrafi bölgeleri, mutasyon sıklığı ve çeşitliliği açısından kıyaslandığında, ülke nüfusunun %50'sini barındıran Batı Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin, Türkiye genelindeki dağılımla uyumlu olduğu ve Kuzey, Güney ve Doğu Anadolu bölgelerinin daha az heterojen olduğu ve kendilerine özgü mutasyonlar (-30, -87, FSC 8/9, IVS 2.745 gibi) içerdiği görülmektedir. β -talasemi Türkiye'de önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Bu hastalığın henüz kesin tedavisi yoktur, dolayısı ile

moleküler tanı ve doğum öncesi erken tanı riskli aileler için büyük önem taşımaktadır. β -talasemi geninde görülen heterojenite hastalığın tanısının konulmasında ve önlenmesinde problemlere neden olabilmektedir. Bugün otomatizasyona yönelik, tek aşamalı ve kit yapısında yöntemlerin devreye girmesi ile bu zorluk büyük oranda aşılmıştır [9].

Tablo 2.7. Türk populasyonunda tanımlanan beta talasemi mutasyonları [41]

Mutasyon	Kaynak
-101 (C-T)	48
-87 (C-G)	49
-30 (T-A)	50
-28 (A-C)	51
FSC-5 (-CT)	51
5'-UTR +22 (G-A)	52
FSC-6 (-A)	51,53
FSC-8/9 (+G)	51,53
Cd 15 (G-A)	53
IVS 1.5 (G-A)	53
IVS 1.5 (G-T)	53
IVS 1.130 (G-C)	53
FSC-8 (-AA)	54
FSC 22/23/24 (-AAGTTGG)	55
Cd 26 (G-A) HbE	56
IVS 1.1 (G-T)	56
Cd 37 (G-A)	56
IVS 2.848 (C-A)	56
Cd 27 (G-T) Hb Knossos	57
Cd 30 (G-C)	58

Tablo 2.7 (Devam). Türk popülasyonunda tanımlanan beta talasemi mutasyonları [41]

FSC-36/37 (-T)	58
IVS 1.1 (G-C)	59
IVS 1.110 (G-A)	60
IVS 1.116 (T-G)	61
IVS 1.130 (G-A)	62
FSC 37/38/39 (-7 bp)	63
FSC-74/75 (-C)	64
IVS 2.654 (C-T)	65
12 kb	65
3'-UTR +1,565 to +1,577 (-13 bp)	66
Poly A (AATAAA-AATAAG)	66
Poly A (AATAAA-AACAAA)	67
Poly A (AATAAA-AATGAA)	68
HbD Los Angeles	68
HbE Saskatoon	68
d β -Thalassemia	68
290 bp deletion	69
IVS 1.1 (G-A)	69
IVS 1.5 (G-C)	69
IVS 1.6 (T-C)	69
Cd 39 (C-T)	69
FSC-44 (-C)	69
IVS 2.1 (G-A)	69
IVS 2.745 (C-G)	69
7.6 kb	70
30 kb	71
HbS	72

2.3. Talasemi Tanısında Kullanılan Hematolojik Metodlar

2.3.1. Hematolojik indeks

Hematolojik parametreler elektronik bir aygıt (kırmızı hücre sayıcı) tarafından ölçülür. Bununla kırmızı kan hücrelerinin büyüklüğü, hacmi ve ihtiva ettikleri hemoglobin miktarı ölçülür. Kırmızı kan hücrelerinin büyüklüğü ile hacmindeki azalma ve içerisindeki hemoglobin miktarı 2-6 gr/dL gibi belirli bir şekilde düşerse talasemi tanımı yapılabilir. Hematolojik göstergelerin normal değerleri Tablo 2.8’de verilmiştir.

Tablo 2.8. Hematolojik göstergeler ve normal değerleri [73]

Test	Normal Değerler
RBC ($10^{12}/L$)	3,50 – 5,50
Hb (gr/dL)	11,0 – 16,0
Hct (%)	37,0 – 50,0
MCV (fL)	80,0 – 100,0
MCHC (gr/dL)	32,0 – 36,0
RDW-CV	11,5 – 14,5

MCV eritrositin büyüklüğü hakkında fikir verir. MCV normalden düşükse mikrositoz (Fe eksikliği anemisi, talasemiler), yüksekse makrositoz (pernisyöz anemi), normal değerde ise normositer durum söz konusudur. MCH ve MCHC ise eritrositin kromisi (Hb’e bağlı) hakkında bilgi verir.

2.3.2. Hemoglobin elektroforezi

Elektroforez, yüklü moleküllerin, bir elektriksel alan uygulandığında, sıvı (tampon) içeren bir ortamda hareket hızlarının ölçüldüğü bir yöntemdir. Elektroforezin prensibi, eksi yüklü moleküller (anyonlar), artı yüklü elektroda (anoda) hareket ederken, artı yüklü moleküllerin (katyonlar), eksi yüklü elektroda (katoda) hareket etmesine dayanır [18].

Alkali pH'da hemoglobin molekülü negatif yüklüdür ve elektriksel ortamda anoda doğru göç eder. Yüzey yük değişikliği olan varyantlar ise farklı göç ederler [74]. Hb A'ya göre Hb S 2, Hb C 4 tane daha fazla negatif yük içerdikleri için Hb S anoda doğru daha yavaş, Hb C ise Hb S'den de daha yavaş olarak anoda doğru göç eder. Bu amaçla nişasta [75, 76], jel [77], kağıt [78] gibi ortamlar kullanılmakta ise de en yaygın kullanılan ortam selüloz asetatıdır [79].

2.3.3. Otomatik DNA dizi analizi

Otomatik DNA analizinde, Sanger'in [80], enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılmaktadır. Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak, bilgisayar programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. İncelenecek DNA'nın bulunduğu jel matrisi bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya, ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir detektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir [81].

ABI 3130 Genetik Analizatörü, kapiler elektroforeze dayalı DNA analizi cihazıdır. Bu cihaz, jel dökme ve örnek yükleme işlemlerini otomatikleştirmektedir. Floresan rengi algılama sistemi ile dizi analizi ve DNA parça analizi işlemleri oldukça kolaylaşmıştır. Cihaz iki ana parçadan oluşur. Birinci kısım veri ünitesidir. Veri ünitesi bir bilgisayar sisteminden ibarettir. Bu bilgisayarda, ikinci kısım ile bağlantıyı kuran ve ikinci kısmı kontrol eden programlar yüklüdür. İkinci kısım analizin yapıldığı elektroforez kısmıdır [82].

2.3.4. Reverse Dot-Blot analizi

β -Globin ve α -Globin Strip testleri PCR (Polimeraz zincir reaksiyonu) ile çoğaltılmış DNA ürünlerinin mutasyona özgü oligonükleotid problemleriyle hibritleşmesi prensibi

üzerine kurulmuştur. Normal Dot-Blot hibridizasyonunda DNA örnekleri membrana sabitleştirilirken, bu yöntemde oligonükleotid problemleri membrana sabitleştirilmiş durumdadır.

β -globin Strip testi β -globin geninde sıklıkla görülen ve Akdeniz ülkelerine özgü 22 mutasyonu kapsamaktadır. Bunlardan iki tanesi anormal hemoglobin olan Hb S ve Hb C'dir. 20 tanesi ise β -talasemi mutasyonudur. Membranın üst kısmında toplam 22 mutant dizi, alt kısmında ise 12 tane normal dizi vardır. Test şeridindeki mutasyonların bazıları birbirine çok yakın bulunurlar [9].

α -globin Strip testi sık karşılaşılan alfa genindeki 21 mutasyonu ve iki test şeridini kapsamaktadır. A test şeridinde 9 mutant dizi ve 2 normal dizi vardır. B test şeridinde ise 12 mutant dizi ve 7 normal dizi vardır. β -globin Strip testinde olduğu gibi bu test şeridindeki mutasyonların da bazıları birbirine çok yakındır [9, 83, 84].

BÖLÜM 3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Çalışma 2007 – 2009 yılları arasında Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı laboratuvarında yürütülmüştür. Çalışmaya dahil edilen 54 olgu, laboratuvara talasemi şüphesiyle Kocaeli Hemoglobinopati Tanı Merkezi ve hastane polikliniğinden gönderilen kişiler arasından seçilmiştir. 54 olgunun çalışmaya dahil edilme kriteri olarak hematolojik verileri dikkate alınmıştır. Hb (g/dL) 11-16, Hct (%) 37-50, MCV (fl) 80-100, MCH (pg) 20-37, MCHC (g/dL) 32-36, Hb A2 (%) 2-3, Hb F (%) <1, Hb A0 (%) 96-98 verileri alt ve üst sınır değerleri olarak kriter alınıp bu değerlerin dışında verilere sahip olan olgular çalışmaya dahil edilmiştir.

3.2. Örneklerin Toplanması ve Analizler

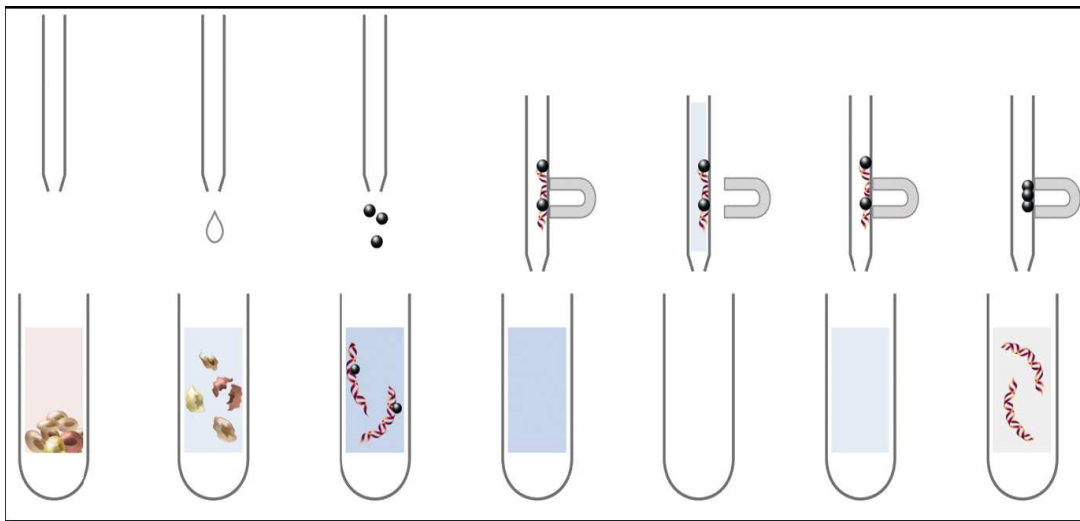
Globin gen mutasyonlarını saptamak için EDTA'lı tüplere 3 mL venöz kan alınmıştır. Olgulara ait kan örneklerinden bir hafta içinde DNA izole edilmiştir. Daha sonra multipleks polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi ile alfa ve beta talasemi gen dizileri invitro olarak çoğaltılmıştır. Reverse insitu hibridizasyon yöntemi ile Vienna Lab. Austria marka α -globin strip assay ve β -globin strip assay kiti kullanılarak globin gen mutasyonları çalışılmıştır. Mutasyon saptanan olguların bir kısmı Otomatik DNA dizi analiz yöntemiyle kontrol edilmiştir.

3.3. Globin Gen Mutasyonlarının Çalışılması

3.3.1. DNA izolasyonu

Çalışmaya katılan hastalardan 3 ml EDTA'lı tüplere kan alınır. Toplanan kanlardan MagNA Pure Compact Instrument cihazı kullanılarak magnetik yöntem ile DNA

elde edilir (Şekil 3.1). Çalışmada DNA eldesi için MagNA Pure Compact Nükleik Asit İzolasyon Kiti I (Roche. Diagnostics GmbH, Germany) kullanılır. İzolasyon kitinin kartuşu cihazın yuvasına yerleştirildikten sonra hastanın 500 μ L kan örneği 2 ml'lik eppendorf tüpe konularak cihazda ilgili yerlere yerleştirilir. Son olarak DNA toplanacak (elution) tüpler cihaza yerleştirildikten sonra cihaz çalıştırılarak 25 dakika içinde 100 μ L izole edilmiş DNA elde edilir. 260 ve 280 nm dalga boyundaki absorbanlar spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000) kullanılarak ölçülür. A_{260}/A_{280} oranı 1,7 ile 2.0 arasında olan DNA'lar kullanılır.



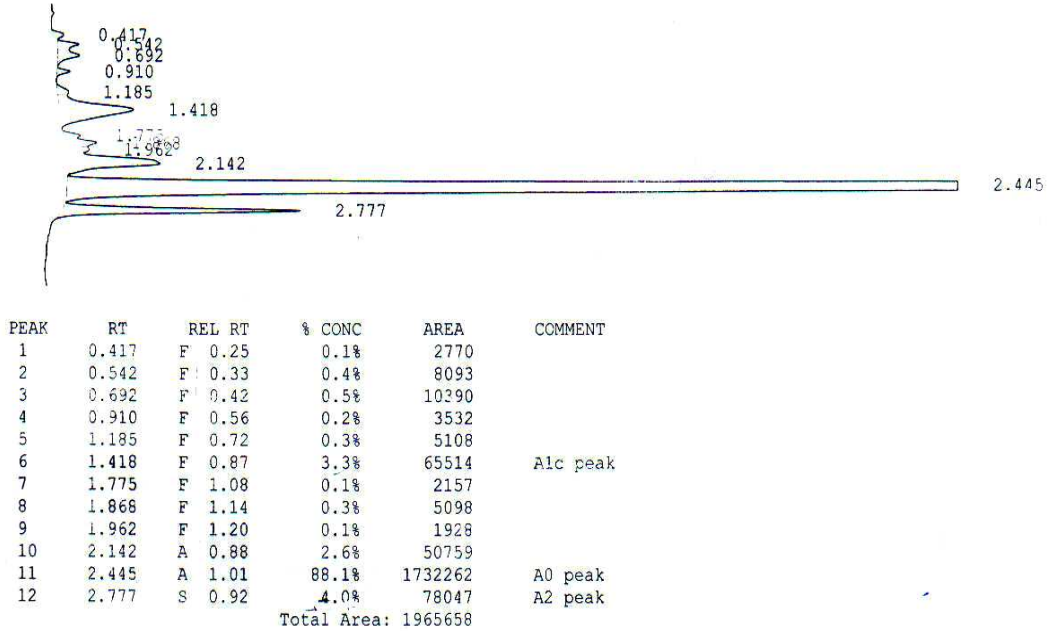
Şekil 3.1. DNA izolasyonunun şematik gösterimi [85].

3.3.2. Hematolojik incelemeler ve hemoglobin elektroforez yöntemi

Hematolojik analizlerden Hemoglobin (Hb), Hematokrit (Hct), Eritrosit sayısı (RBC), Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV), Ortalama Eritrosit Hemoglobini (MCH) ve Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu (MCHC) kan sayım cihazı ile yapılır.

Hemoglobin elektroforezi için yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) tekniği kullanılmıştır. Sıvı Kromatografisi, hareketli sıvı fazın kolon ya da ince tabaka partikülleri arasında dağılması esasına göre yapılan ayırma tekniğidir. Bu sistem ile proteinler, peptidler, ilaçlar ve metabolik ürünler kolaylıkla analiz edilebilmektedir. Güvenilir, tekrarlanabilir ve hızlı olan bu yöntem, hemoglobin ve globinlerin

ayrıştırılması ve miktarlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır. Bu işlem globinlerin hidrofobik özelliklerinden faydalanılarak yapılmaktadır [86-88]. Örnek hemoglobin elektroforez sonucu Şekil 3.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Hemoglobin elektroforezi

3.3.3. Beta globin ve alfa globin strip assay için polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yöntemi

Mikrotüpler içine her reaksiyon için 5 µL genomik DNA ve 75 mmol/L Tris-HCl (pH 8.8), 20 mmol/L (NH₄)₂SO₄, %0.01 Tween 20, 200 mmol/L dNTPs, 2,5 mmol/L MgCl₂, 1.66 U Taq polimeraz ve her karışım için optimize edilmiş, biyotinle işaretlenmiş primerler içeren 20 µL amplifikasyon karışımı eklenir. PCR karışımı içeren mikrotüpler Thermal cycler (Applied Biosystems 2720) cihazına yerleştirilir ve amplifikasyon başlatılır. Alfa globin termal döngü protokolünün ısı ve süreleri Tablo 3.1’de, beta globinin ise Tablo 3.2’de gösterilmiştir.

Alfa Globin PCR Karışımı

Amplifikasyon Karışım A1: 15 µL

Taq Dilüsyon Buffer: 4,6 µL
Taq DNA Polimeraz (=1.66 U): 0,4 µL
Genomik DNA: 5µL
Toplam hacim 25µL

Amplifikasyon Karışım A2: 15 µL
Taq Dilüsyon Buffer: 4,6 µL
Taq DNA Polimeraz (=1.66 U): 0,4 µL
Genomik DNA: 5µL
Toplam hacim 25µL

Amplifikasyon Karışım B: 15 µL
Taq Dilüsyon Buffer: 4,6 µL
Taq DNA Polimeraz (=1.66 U): 0,4 µL
Genomik DNA: 5µL
Toplam hacim 25µL

Beta Globin PCR Karışımı

Amplifikasyon Karışım: 15 µL
Taq Dilüsyon Buffer: 4,6 µL
Taq DNA Polimeraz (=1.66 U): 0,4 µL
Genomik DNA: 5µL
Toplam hacim 25µL

Tablo 3.1. Alfa Globin termal döngü protokolünün ısı ve süreleri

Pre-PCR Denatürasyon	PCR I			PCR II			Final Extension
	Denatürasyon	Annealing	Extension	Denatürasyon	Annealing	Extension	
95° C ↓	97° C ↓	64° C ↓	72° C ↓	97° C ↓	58° C ↓	72° C ↓	72° C ↓
05:00	00:40	00:40	01:30	00:40	00:40	01:30	05:00
1 siklus	3 siklus			37 siklus			1 siklus

Tablo 3.2. Beta Globin termal döngü protokolünün ısı ve süreleri

Pre-PCR Denatürasyon	PCR			Final Extension
	Denatürasyon	Annealing	Extension	
94° C ↓	94° C ↓	54° C ↓	72° C ↓	72° C ↓
02:00	00:10	00:15	00:45	03:00
1 siklus	35 siklus			1 siklus

3.3.3.1. Agaroz jel elektroforezi

1lt 1X TBE Hazırlanışı: 100 mL 10X TBE (Tris, Borik Asit, EDTA- AppliChem, Germany) 900 mL distile su içinde çözülür.

% 3'lik agaroz jel, 80 mL 1X TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritildikten sonra bir süre soğumaya bırakılır. Çözünen agaroz jelin içine 2 µL ethidium bromid eklenerek jel içinde homojen olarak dağılması sağlanır. Jel, elektroforez tepsisine döküldükten sonra soğumaya bırakılır. 1X TBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankı içine yerleştirilerek jel içine yerleştirilmiş tarak çıkartıldıktan sonra oluşan kuyulara 7 µL ampikon, 2 µL yükleme boyası ile karıştırılarak pipetlenir. DNA

boyut markırı da bir başka kuyuya pipetlenerek 90 voltta 60 dakika yürütülür. DNA fragmentleri UV translüminatör ile görüntülenip fotoğrafı çekilerek değerlendirilir.

3.3.3.2. Hibridizasyon

Normal ve mutant-spesifik immobilize oligonükleotid problemlerini taşıyan bir test şeridine amplifikasyon ürünlerinin hibridizasyonu sağlanıp sonrasında biyotinle işaretlenen dizilerin streptavidine-alkaline fosfataz ve renk substratları kullanılarak Profi Blot T48 (Mannedorf, Switzerland) cihazında belirlenmesinin ardından sonuçlar analiz edilmiştir [89].

Ön İşlemler:

1. Çalkalamalı su banyosu ısısı 45° C ayarlanır.
2. Hibridizasyon ve yıkama A solüsyonları 45° C kadar ısıtılır.

Alfa Talasemi Test Strip A1 ve A2 için:

1. 20 µL DNAT[®] (denatürasyon solüsyonu) küvetin kuyucuklarının köşelerine pipetlenir.
2. 10 µL PCR ile çoğaltılmış karışım A1 ve 10 µL PCR ile çoğaltılmış karışım A2 örnekleri DNAT[®] solüsyonuna pipetlenerek karıştırılır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.

Alfa Talasemi Test Strip B için:

1. 10 µL DNAT[®] (denatürasyon solüsyonu) küvetin kuyucuklarının köşelerine pipetlenir.
2. 10 µL PCR ile çoğaltılmış karışım B örnekleri DNAT[®] solüsyonuna pipetlenerek karıştırılır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.

Alfa Talasemi Test Strip B için:

1. 10 µL DNAT[®] (denatürasyon solüsyonu) küvetin kuyucuklarının köşelerine pipetlenir.
2. 10 µL PCR ile çoğaltılmış örnekler DNAT[®] solüsyonuna pipetlenerek karıştırılır ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edilir.
1. Cihaz küvetin örneklerin koyulduğu kuyucuklarına önceden ısıtılmış 1 mL hibridizasyon solüsyonunu dağıtır.
2. Stripler dikkatlice küvetin kuyularına yerleştirilir.

Cihazda Gerçekleşen İşlemler

1. Küvet önceden hazırlanan su banyosunda 45° C’de 30 dakika çalkalanarak inkübe edilir.
2. Her bir kuyucuğa 1 mL yıkama solüsyonu A eklenir ve 1 dakika çalkalanır. Solüsyon boşaltılır.
3. Her bir kuyucuğa 1 mL yıkama solüsyonu A eklenir ve 15 dakika 45° C’de çalkalanarak inkübe edilir.
4. Kuyucuklardan yıkama solüsyonu A boşaltılır ve yeniden 1mL yıkama solüsyonu A ile 15 dakika 45° C’de çalkalanarak inkübe edilir.
5. Yıkama solüsyonu A kuyucuklarda tamamen boşaltılır.
6. Her bir kuyucuğa 1 mL bağlama solüsyonu eklenir ve 15 dakika oda sıcaklığında çalkalanarak inkübe edilir, solüsyon boşaltılır.
7. Her bir kuyucuğa 1 mL yıkama solüsyonu B eklenir ve 1 dakika çalkalanarak boşaltılır.
8. Her bir kuyucuğa 1 mL yıkama solüsyonu B eklenir ve 5 dakika oda ısısında çalkalanarak inkübe edilir.
9. Kuyucuklardan yıkama solüsyonu B boşaltılır ve her bir kuyucuğa 1 mL yıkama solüsyonu B eklenir ve 5 dakika oda ısısında çalkalanarak inkübe edilir.
10. Her bir strip üzerine renk geliştirme solüsyonu eklenir ve karanlıkta test koşullarına bağlı olarak bantların oluşmasına göre 15 dakika çalkalanarak inkübe edilir.
11. Bant oluşma işlemi striplerin iki kez distile su ile yıkanması ile sonlandırılır.
12. Son olarak, stripler kuyucuklardan alınır kurutma kağıdının arasına konularak kurutulur ve değerlendirme aşamasına geçilir.

3.3.4. DNA dizi analizi için polimeraz zincir reaksiyon (PCR) yöntemi

Mikrotüpler içinde hazırlanan PCR karışımı Termal Döngü Düzenleyici Cihazı'na (Termal Cycler) yerleştirilerek amplifikasyon başlatılır. Termal döngü protokolünün ısı ve süreleri Tablo 3.3'de gösterilmiştir.

PCR Karışımı

Terminatör Hazır Reaksiyon Karışımı:	12,5µL
Genomik DNA:	2,5 µL
Forward Primer:	5 µL
Reverse Primer:	5 µL
Toplam Hacim	25 µL

Tablo 3.3. Termal döngü protokolünün ısı ve süreleri

	Pre-PCR	PCR			Final Extension
Sıcaklık (°C)	94° C	94° C	55° C	72° C	72° C
	↓	↓	↓	↓	↓
Süre (dakika:sn)	05:00	01:00	01:00	01:00	07:00
Döngü Sayısı	1	35			1

%3'lük agoroz jel 1X TBE tamponu ile dolu olan elektroforez tankı kullanılır. Jel içine yerleştirilmiş tarak çıkartıldıktan sonra oluşan kuyulara 7 µL amplikon, 2 µL yükleme boyası ile karıştırılarak pipetlenir.

3.3.4.1. Pürifikasyon

Toz halindeki Sephadex'ten 1gr tartılır ve 12 mL distile su içinde çözülür. Filtreli Sephadex kolonları içine 600 µL karışım konular ve 5400 rpm'de iki dakika santrifüj edilir. Kolonlar içinde oluşan jel kolonunun üstüne PCR ürünü pipetlenir. 5400 rpm'de iki dakika santrifüj edilir. Tüp içinde toplanan PCR ürünü sekans PCR'ı için hazır hale gelir. Termal döngü sekans PCR protokolünün ısı ve süreleri Tablo 3.4'de gösterilmiştir.

Sekans PCR Karışımı

BigDye	2 µL
Forward Primer	1 µL
Reverse Primer	1 µL
5X Buffer	2 µL
PCR ürünü	1 µL
Su	4 µL

Tablo 3.4. Termal döngü sekans PCR protokolünün ısı ve süreleri

	Pre-PCR	PCR			Final Extension
Sıcaklık (°C)	95° C	95° C	55° C	60° C	72° C
	↓	↓	↓	↓	↓
Süre (dakika:sn)	05:00	00:30	00:10	04:00	07:00
Döngü Sayısı	1	40			1

Örnek pürifiye edildikten sonra cihazda bulunan örnek tepsinine yerleştirilir ve cihaza başlama komutu verilir. Başlama komutu ile cihazın gerçekleştirdiği işlemler şu şekilde sıralanır:

- 1- Cihaz başlama komutunu aldıktan sonra kapiler ünitesinin sıcaklığını elektroforez için uygun sıcaklık olan 60 °C'ye çıkarır.
- 2- Uygun sıcaklık sağlandıktan sonra kapilerin platin çubuğa bağlı serbest uçları örnek yükleme ünitesinde bulunan distile su tüpüne girer. Cihaz polimer blok sonunda bulunan ve anoda açılan kapağı kapatır. Polimer şırıngası, üzerinde bulunan piston ile sıkıştırılır. Polimer, anot tarafı kapalı olduğu için hareket edebileceği tek yön olan kapiler içine yayılmaya başlar.
- 3- Kapiler, polimer ile doldurulduktan sonra serbest kapiler uçları örnek tepsisi üzerinde hareket ederek örnek içerisine girer.
- 4- Anot kapağı açılan cihaz üzerinde elektriksel alan yaratılır. Yaratılan elektriksel alanda tüp içerisinde bulunan DNA parçaları kapiler boru içerisine doğru harekete geçerler. DNA parçalarının kapilere taşınması için gerekli sürenin dolması ile akım kesilir ve serbest kapiler uçları distile su içerisine döner.
- 5- Platin çubuk ile kapiler çevresine örnekten bulaşan kirlilikler temizlenir.
- 6- Kapiler serbest uçları temizleme sonrası tekrar hareket ederek örnek tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi içerisine girer. Burası kapiler serbest uçları için son noktadır.
- 7- Anot kapağı açıldıktan sonra cihaz üzerine tekrar akım verilir. Örnek tepsisi üzerinde bulunan yürütme çözeltisi ile polimer blok sonunda bulunan yürütme çözeltisi arasında 14000 V' a varan bir gerilim oluşur. DNA parçaları kapiler serbest uçlarından kapiler boyunca, polimer bloğa doğru harekete geçerler. Bu yürütme sırasında lazer ünitesi içerisinden geçerler ve yaydıkları floresan ışık ile tespit edilirler. Elektroforez sonlandığında cihaz yeni deney için işlemleri tekrar eder [82].

Cihazın gerçekleştirdiği işlemler bittikten sonra cihaz örneklerden aldığı bilgiyi bilgisayar sistemine aktarır. Bu sistemde iki ana program yüklüdür. İki programdan birinin görevi elektroforez cihazı ile bağlantıyı kurmak, elektroforez koşullarını sağlamak ve verileri toplamaktır. İkinci programın görevi ise toplanan verilerinin değerlendirilmesidir. ABI 3130 Genetik Analizatöründe "DATA Collection" programı birinci tip bilgisayar programına örnektir. "Sequance Analyse" programı ise cihazın ikinci tip programıdır.

ABI Big Dye v3.1 terminatör reaksiyon kiti içerisinde bulunan karışım içerisinde PCR için gerekli tüm kimyasallar yanında her bir bazın eşit miktarda ddNTP' leri de bulunur. Bu ddNTP'lerin her biri farklı bir floresan boya ile işaretlenmiştir (Tablo 3.5). Bu sayede tek bir reaksiyonla dizi analizi yapılabilir. Kit tüm kalıp DNA'lar için ortak bir PCR protokolü içerir ve PCR süresi ortalama 2,5 saattir [90].

Tablo 3.5. ABI Big Dye v3.1 terminatör reaksiyon kiti içerisindeki ddNTP floresan boya ve renkleri [82]

ddNTP	Florasın Boya	Renk
A	dR6G	Yeşil
T	dROX	Kırmızı
C	dR110	Mavi
G	dTAMRA	Siyah

3.3.4.2. Dizi analizinde kullanılan primerler ve beta globin gen dizisi

BTG1F (Beta Talasemi Grup 1 Forward):

5'-AAGGGTGGGAAAATAGACCAATA - 3'

BTG1R (Beta Talasemi Grup 1 Reverse) :

5' - ACGATCTTCAATATGCTTACCAAGCTG - 3'

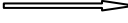


BTG2F (Beta Talasemi Grup 2 Forward):

5' - CCTTTTGTTATAACAATGTTAA - 3'

BTG2R (Beta Talasemi Grup 2 Reverse):

5' - TATTGGTCTATTTTCCCACCCTT - 3'

Beta globin gen dizisi, otomatik DNA dizi analizi için PCR primerleri ve yerleri.

tgagtggagt caaggctgag agatgcagga taagcaaatg ggtagtgaaa agacattcat	421
gggacagct aaaacaataa gtaatgtaaa atacagcata gcaaaacttt aacctccaa	361
tcaagcctct acttgaatcc tttctgagg gatgaataag gcata t/g gcat cagggtctgt	301
gccaatgtgc attagctggt tgcagcctca ccttctttca tggagttaa gatatagtgt	241
atthtccaa ggthtgaact agctcttcat ttctttatgt tttaaatgca ctgacctccc	181
acattccctt tttagtataa tattcagaaa taatttaaat acatcattgc aatgaaaata	121
aatgthTTTT ATTaggcaga atccagatgc tcaaggccct tcataatata cccagthta	61
gtagttggac ttagggaaca aaggaacctt taatagaat tggacagcaa gaaagcgagc	UTR 1
tta gtg ata ctt gtg ggc cag ggc att agc cac	cd 137
acc agc cac cac ttt ctg ata ggc agc ctg cac tgg tgg ggt gaa ttc	cd 121
ttt gcc aaa gtg atg ggc cag cac aca gac cag cac gtt gcc cag gag	exon 3
ctgtgggagg	841
aagataagag gtagaacat gattagcaaa agggcctagc ttggactcag aataatccag	781
ccttatccca accataaaat aaaagcagaa tggtagctgg attgtagctg ctattagcaa	721
tatgaaacct cttacatcag ttacaattta tatgcagaaa ttttatatg caga g/a atatt	661
gctattgcct taaccagaa attatcactg ttattcttta gaatggtgca aagaggcatg	601
atacattgta tcattattgc cctgaaagaa agagattagc gaaagtatta gaaataagat	541
aaacaaaaaa gtatatataa agaagaaagc atthtttaaa attacaaatg caaaattacc	481
ctgatttggc caatatgtgt acacatatta aaacattaca ctttaaccba taaatatgta	421
taatgattat gtagcaatta aaaataaaag aaaataaaag agggagatta tgaatatgca	361
aataagcaca catatattcc aaatagtaat gtactaggca gactgtgtaa agthtttttt	301
taagttactt aatgtatctc agagatattt <u>cctttgtta tacacaatgt taa</u> ggcatta	241
BTG2-FORWARD 	
agtataatag taaaattgc ggagaagaaa aaaaaagaaa gcaagaatta aacaaaagaa	181
aacaattgth atgaacagca aataaaagaa actaaaacga tcctgagact tccacactga	121
tgcaatcatt cgtctgtttc ccattctaaa ctgtaccctg ttactt a/d tcc ccttctatg	61
acatgaactt aacctagaa aagaagggga aagaaaacat caagc g gtccc atagactcac	IVS2 1
cct gaa gth ctc agg atc cac gtg cag ctt	95 cd
gth aca gtg cag ctc act cag tgt ggc aaa ggt gcc ctt gag gth gth	cd 79
cag gtg agc cag gcc atc act aaa ggc acc gag cac ttt ctt gcc atg	cd 63
agc ctt cac ctt agg gth gcc cat aac agc atc agg agt gga cag atc	cd 47
ccc aaa gga ctc aaa gaa cct ctg ggt cca agg gta gac cac cag cag c	exon 2
ct <u>aagggtgg</u>	121
BTG1-FORWARD 	
<u>gaaaatagac caata</u> ggcag agagagtcag tgcctatcag aaaccaaga gcttctctg	61
BTG2-REVERSE 	
tctccacatg cccagthtct attggtctcc ttaaacctgt cttgtaacct tgataccaac	IVS1 1
ct gcc cag ggc ctc acc acc aac ttc atc cac gth cac/gac ctt gcc	cd 16
cca cag ggc agt aac ggc aga ctt ctc ctc agg agt cag atg/atg cac cat	exon 1
ggtgtctg thtgaggttg	+24
ctagtgaaca cagthgtgtc agaagcaaat gtagcaata gatggctctg cctgactth	- 28
tatgccagc cctggctcct gccctcctg ctctctggag tagattggcc aacctaggc	- 88
tgtgctcca cagggtgagc tctaagtat gacagccgta cctgtcctg gctctctg	- 148
cactgctta ggagthggac thcaaacct cagcctccc tctaagatat atctctggc	- 208
cccataccat cagtacaaat tgcactaaa aacatcctcc thtgcaagtg thtttacgta	- 268
atthttggaa tca <u>cagcttg gtaagcatat tgaagatcgt</u> thtccaaat thcttatta	- 337
BTG1-REVERSE 	

3.4. Alet ve Cihazlar

1. DNA izolasyon cihazı (MagNA Pure Compact Instrument)
2. Spektrofotometre (NanoDrop, ND-1000)
3. Mikrosantrifüj (Beckman Coulter)
4. Derin dondurucu (-20°C Arçelik)
5. Thermal cycler (Applied Biosystems, 2720)
6. Mikrodalga fırın (Sinbo)
7. Jel elektroforez cihazı (Lightning Volt Power Supply, Model 05P-300)
8. Fotograf bağlantılı UV translüminatör (Geneline Image Analysis System)
9. Hassas terazi (AND Gr-200)
10. Otomatik pipet (2.5, 10, 100, 1000 µL) (eppendorf)
11. ProfiBlot T48 (Tecan, Mannedorf, Switzerland)
12. 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)

3.5. Sarf Malzemeler

1. Beta Globin Strip Assay Kiti (Vienna Lab)
2. Alfa Globin Strip Assay Kiti (Vienna Lab)
3. MagNA Pure Compact Nükleik Asit İzolasyon Kiti I (Roche. Diagnostics GmbH, Germany)
4. TBE-Buffer 10X (Tris, Borik Asit, EDTA- AppliChem, Germany) :Tris 0,89 M, Borik Asit 0,89 M, EDTA 0,02 M (pH 8,3)
5. Agaroz (Prona)
6. Ethidium bromür
7. Yükleme boyası (Loading dye) (6X Fermentas)
8. AmpliTaq Gold PCR Master Mix (Applied Biosystems)
9. PCR Pürifikasyon Kiti, Sephadex G-50 (Sigma)
10. BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)
11. BigDye Terminator v3.1 5x Sequencing Buffer (Applied Biosystems)
12. Buffer (10x) EDTA'lı (Applied Biosystems)
13. 3130 POP-7 Performance Optimized Polymer (Applied Biosystems)

3.6. Kit İçerikleri

Beta Globin Strip Assay Kiti (Vienna Lab)

1. Amplification Mix: 500 µL
2. Taq Dilution Buffer: 500 µL
3. DNAT: 1.5 mL x R 36/38
4. Teststrips: 20
5. Hybridization Buffer: 25 mL
6. Wash Solution A: 80 mL
7. Wash Solution B: 80 mL
8. Conjugate Solution: 25 mL
9. Color Developer: 25 mL

Alfa Globin Strip Assay Kiti (Vienna Lab)

1. Amplification Mix A1 (250 µL):
2. Amplification Mix A2 (250 µL):
3. Amplification Mix B (250 µL):
4. Taq Dilution Buffer (500 µL):
5. DNAT[®] (1.5 mL x R 36/38):
6. Teststrips A: 10
7. Teststrips B: 10
8. Hybridization Buffer: 25 mL
9. Wash Solution A: 80 mL
10. Wash Solution B: 80 mL
11. Conjugate Solution: 25 mL
12. Color Developer: 25mL

MagNA Pure Compact Nükleik Asit İzolasyon Kiti I (Roche. Diagnostics GmbH, Germany)

1. Reaktif Kartuju

- a. Birinci Kuyucuk: Proteinase K
 - b. İkinci Kuyucuk: Lysis Buffer
 - c. Üçüncü Kuyucuk: Manyetik Partiküller
 - ç. Dördüncü ve Beşinci Kuyucuklar: Wash Buffer I
 - d. Altıncı Kuyucuk: Wash Buffer II
 - e. Yedinci Kuyucuk: Wash Buffer III
 - f. Sekizinci Kuyucuk: Elution Buffer III
2. Pipet uçları-Tip Tray : İki büyük ve bir küçük pipet ucu ve kartuj delme aparatı
 3. Örnek Tüpü
 4. Elution Tüpü
 5. Elution Tüpü Kapağı

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)

1. ABI Prism BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix
2. pGEM- 3Zf(+) Kontrol Template, 0,2 µg/µL
3. 21 M13 Kontrol Primer (forward), 0,8 pmol/µL

BÖLÜM 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Bulgular

Bu çalışmada Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'na, Kocaeli Hemoglobinopati Tanı Merkezi'nden talasemi ön tanısı almış olarak gelen 54 hastanın kan örnekleri çalışılmıştır. Hastaların hematolojik verileri Kocaeli Hemoglobinopati Tanı Merkezinde HPLC yöntemiyle belirlenmiş olup Tablo 4.1'de verilmiştir. Tablo 4.2'de gözlemlendiği gibi 54 örneğin 37'sinde sadece beta globin mutasyonu, 2'sinde sadece alfa globin mutasyonu ve 2'sinde hem alfa hem beta globin mutasyonu saptanmıştır.

Mutasyonların belirlenmesinde strip testi yöntemi kullanılmıştır. Bu test hastalık tanısının konmasını büyük ölçüde kolaylaştıran ve kolay uygulanabilen bir yöntemdir. Ayrıca DNA izolasyonundan tanıyı almaya kadar olan süreç tam bir gündür. Normal ve mutant oligonükleotit problemlerini içeren referans membrana göre analiz yapılmıştır. Membranın üst kısmında mutant diziler alt kısmında ise normal diziler mevcuttur (Şekil 4.1-2). Test şeridinde bulunan bazı mutasyonlar birbirlerine çok yakın olduklarından bu mutasyonlar için tek bir oligonükleotit normal prob dizisi kullanılmıştır. Analiz aşamasında test şeridi üstünde yalnızca normal alel pozitif ise birey normal, yalnızca mutant alel pozitif ise birey homozigot mutant, hem normal hem de mutant alel pozitif ise birey heterozigot olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.6).

Talasemi ön tanısı ile referans edilen 54 olgunun 37'sinde sadece beta globin mutasyonu (%68,51), 2'sinde sadece alfa globin mutasyonu(%3,70), 2'sinde hem alfa hem beta globin mutasyonu (%3,70) saptanmıştır. Saptanan mutasyonlar çeşitlilik göstermektedir. Beta globin zincirinde kodon 44 (-C) / kodon 44 (-C) (N=1) homozigot olarak saptanmıştır. Beta globin zincirinde heterozigot mutasyonlar

IVS 1.110 G→A (N=15), IVS 1.6 T→C (N=5), IVS 2.1 G→A (N=5), kodon 8 (-AA) (N=5), kodon 39 C→T (N=4), kodon 8/9 (+G) (N=2), IVS 2.745 C→G (N=1), IVS 1.1 G→A (N=1) olarak belirlenmiştir. Alfa globin zincirinde heterozigot mutasyonlar 3.7 single gene del (tek gen delesyonu) (3.7/aa) (N=3) ve 20.5 kb double gene del (çift gen delesyonu) (N=1) olarak belirlenmiştir. 13 olgu talasemi ön tanısı almasına rağmen mutasyon saptanmamıştır.

Talasemi ön tanılı hastalarda beta globin genotipleri Tablo 4.3'de, alfa globin genotiplerini Tablo 4.4'de ve globin mutasyonlarını homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda allelerin (N=41) frekansı ise Tablo 4.5'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Olguların hematolojik bulguları ve mutasyon tipleri

No	Mutasyon Yeri ve Türü	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dL	Hct %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dL	HbA2 %	HbF %	HbA0 %
1	Codon 44 (-C) / Codon 44 (-C)	28	5,64	11,1	38,4	68	19,6	28,9	5,4	0	87,2
2	IVS 1.110 G→A	28	6,43	12,7	42,0	65	19,7	30,2	3,98	0	81,89
3	IVS 1.110 G→A	24	5,07	11,2	33,6	66,3	22,09	33,3	4,92	0,54	81,08
4	IVS 1.110 G→A	19	6,13	13,0	40,6	66,2	21,2	32,0	4,48	0	80,93
5	IVS 1.110 G→A	24	6,35	12,1	38,2	60,2	33,2	31,7	4,72	0,93	77,68
6	IVS 1.110 G→A	22	5,06	9,8	32,4	64,0	19,36	30,2	4,1	0	86,5
7	IVS 1.110 G→A	25	5,72	11,8	37,7	66	20,62	31,2	4,1	1,1	88,7
8	IVS 1.110 G→A	3	5,85	10,6	34,8	59	18,11	30,4	3,8	8,6	80,1
9	IVS 1.110 G→A	28	6,29	12,4	39,6	63	19,71	31,2	5,2	0	88,8
10	IVS 1.110 G→A	29	6,71	12,5	41,9	62	18,62	29,7	4,91	0	81,59
11	IVS 1.110 G→A	42	5,93	12,3	39,6	67	20,74	31,0	4,8	0	87,2
12	IVS 1.110 G→A	25	6,87	13,8	44,3	64	20,08	31,2	4,6	0	88,4
13	IVS 1.110 G→A	30	5,63	13,1	38,6	68	23,26	33,9	5,0	0	86,2
14	IVS 1.110 G→A	29	6,37	12,1	39,7	62,3	18,99	30,5	4,84	0,88	81,40
15	IVS 1.110 G→A	29	5,39	11,7	36,6	68	21,70	31,9	5,38	1,64	80,73
16	IVS 1.110 G→A	25	6,18	12,0	37,8	61	19,41	31,9	4,6	0	87,7
17	IVS 1.6 T→C	29	5,18	10,6	35,0	68	20,46	30,4	3,97	0,61	81,48

RBC: Eritrosit, Hb: Hemoglobin, Hct: Hematokrit, MCV: Ortalama eritrosit hacmi, MCH: Ortalama eritrosit hemoglobini, MCHC: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu

Tablo 4.1(Devam). Olguların hematolojik bulguları ve mutasyon tipleri

No	Mutasyon Yeri ve Türü	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dL	Hct %	MCV fl	MCH Pg	MCHC g/dL	HbA2 %	HbF %	HbA0 %
18	IVS 1.6 T→C	35	5,04	11,3	35,2	69,8	22,42	32,1	3,93	0,45	81,03
19	IVS 1.6 T→C	24	5,48	13,2	41,2	75	24	32,0	3,87	0,55	83,00
20	IVS 1.6 T→C	24	5,33	11,9	40,2	75,4	22,32	29,6	3,71	0,51	82,10
21	IVS 1.6 T→C	26	5,98	12,9	41,6	70	21,57	31,0	3,6	0	90,3
22	IVS 2.1 G→A ve -α/α3.7 kb del.	32	5,48	11,1	34,9	64	20,25	31,7	6,03	0,50	81,00
23	IVS 2.1 G→A	24	4,89	8,5	31,7	64,9	17,38	26,8	4,85	0,87	81,14
24	IVS 2.1 G→A	34	6,54	12,5	39,7	61	19,11	31,4	5,3	1,1	86,4
25	IVS 2.1 G→A	29	5,58	11,1	35,6	64	19,89	31,3	4,9	5	83,9
26	IVS 2.1 G→A	31	6,62	13,4	42,0	63,5	20,24	31,9	5,15	0,46	78,35
27	Codon 8 (-AA)	25	6,65	10,6	37,6	57	15,93	28,3	5,08	1,00	80,74
28	Codon 8 (-AA)	37	6,64	13,2	43,8	66	19,87	30,1	5,4	0	84,8
29	Codon 8 (-AA)	4	5,57	10,1	31,9	57	18,13	31,6	4,7	8,8	79,8
30	Codon 8 (-AA)	39	5,43	10,7	33,6	62	19,70	31,9	5,1	1,2	85,7
31	Codon 8 (-AA)	26	6,32	13,4	43,3	68	21,20	30,9	4,7	0	87,3
32	Codon 39 C→T	33	4,51	8,7	28,4	63	19,29	30,7	5,47	1,75	80,87
33	Codon 39 C→T ve -α/α3.7 kb del.	19	5,47	11,3	36,6	67	20,65	30,8	4,79	3,16	78,91
34	Codon 39 C→T	24	6,97	12,9	41,6	60	18,50	31,1	5,3	0	86,5
35	Codon 39 C→T	33	6,16	13,4	40,3	65	21,75	33,3	5,4	0	86,5
36	Codon 8/9 (+G)	24	6,07	8,6	33,7	56	14,16	25,4	4,16	0,94	81,75
37	Codon 8/9 (+G)	27	5,77	13,2	41,9	72	22,87	31,5	4,7	0	87,5
38	IVS 1.1 G→A	27	7,07	13,7	44,3	63	19,37	30,8	4,5	0	87,0
39	IVS 2.745 C→G	38	6,55	15,4	43,1	65,8	23,51	35,7	4,98	0,87	80,45
40	-α/α3.7 kb del.	33	5,96	6,08	15,5	47,1	10,20	78	14,4	4,271	83,154
41	-α/α20.5 kb del	25	6,66	15,7	49,0	73	23,57	32,0	5,9	0	86,4
42	Mutasyon yok	24	4,75	14,5	41,2	86,7	30,52	35,2	3,11	0,54	82,46
43	Mutasyon yok	27	4,57	13,0	40,6	88,9	28,44	32,0	3,73	2,95	80,01
44	Mutasyon yok	29	4,67	14,9	47,0	100	31,90	31,7	3,40	1,04	79,33
45	Mutasyon yok	30	4,57	13,9	40,4	88,3	30,41	34,4	3,5	0	88,9
46	Mutasyon yok	25	5,78	15,3	48,8	84,5	26,47	31,4	3,67	1,37	81,06

RBC: Eritrosit, Hb: Hemoglobin, Hct: Hematokrit, MCV: Ortalama eritrosit hacmi, MCH: Ortalama eritrosit hemoglobini, MCHC: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu

Tablo 4.1(Devam). Olguların hematolojik bulguları ve mutasyon tipleri

No	Mutasyon Yeri ve Türü	Yaş	RBC 10 ¹² /L	Hb g/dL	Hct %	MCV fl	MCH pg	MCHC g/dL	HbA2 %	HbF %	HbA0 %
47	Mutasyon yok	30	6,69	12,2	38,9	58,1	18,23	31,4	5,0	0	85,9
48	Mutasyon yok	27	4,91	15,0	42,2	85,9	30,54	35,5	3,55	1,33	82,62
49	Mutasyon yok	27	6,34	16,1	50,5	80	25,39	31,9	4,5	0	87,8
50	Mutasyon yok	22	3,88	12,1	39,0	100	31,18	31,0	3,7	0	89,6
51	Mutasyon yok	27	5,89	16,5	51,5	87,5	28,01	32,0	3,6	0	88,1
52	Mutasyon yok	43	5,41	16,1	50,3	93,0	29,75	32,0	3,8	0	85,5
53	Mutasyon yok	23	4,34	13,6	42,4	97,8	31,33	32,1	3,68	0,35	82,17
54	Mutasyon yok	23	4,69	12,5	36,9	78,6	26,65	33,9	3,66	0,89	81,65

RBC: Eritrosit, Hb: Hemoglobin, Hct: Hematokrit, MCV: Ortalama eritrosit hacmi, MCH: Ortalama eritrosit hemoglobini, MCHC: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu

Tablo 4.2. Mutasyon Dağılımı

Toplam olgu sayısı	Heterozigot Beta globin mutasyon taşıyan olgu sayısı	Homozigot Beta globin mutasyon taşıyan olgu sayısı	Heterozigot Alfa globin mutasyon taşıyan olgu sayısı	Normal olgu sayısı
54	38	1	4	13

Tablo 4.3. Talasemi ön tanımlı hastalarda beta globin genotipleri

Allel I	Allel II	Hasta Sayısı
Codon 8/9 (+G)	Wt	2
IVS 2.1 G→A	Wt	5
Codon 39 C→T	Wt	4
IVS 1.110 G→A	Wt	15
IVS 1.6 T→C	Wt	5
Codon 8 (-AA)	Wt	5
IVS 1.1 G→A	Wt	1
IVS 2.745 C→G	Wt	1
Codon 44 (-C)	Codon 44 (-C)	1
Toplam		39

wt : yabancıl tip, normal allel

Tablo 4.4. Talasemi ön tanımlı hastalarda alfa globin genotipleri

Allel I	Allel II	Hasta Sayısı
3.7 single gene del(3.7/αα)	wt	3
20.5kb double gene del	wt	1
Toplam		4

wt : yabancıl tip, normal allel

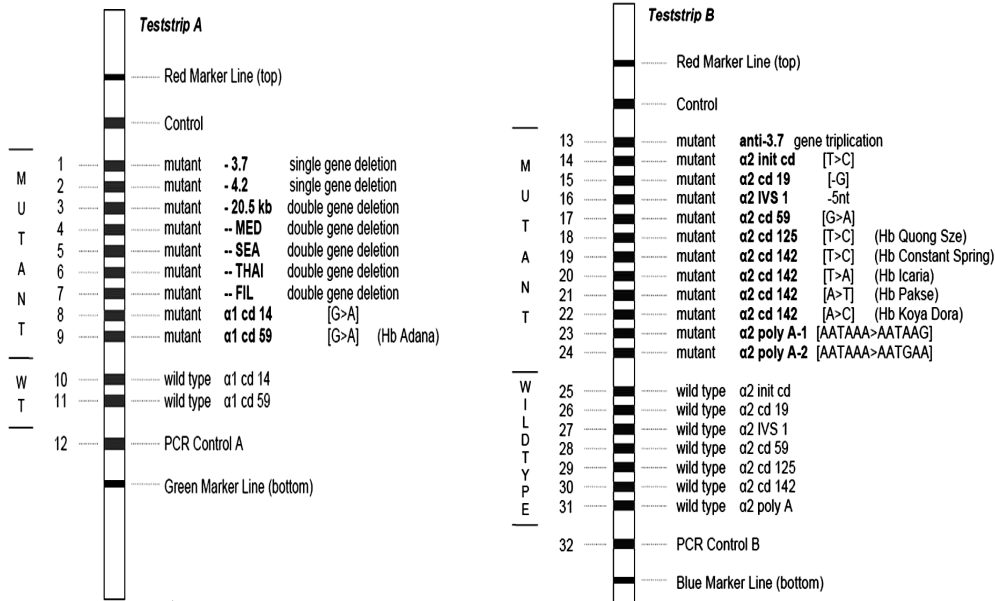
Tablo 4.5. Globin mutasyonlarını homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda allellerin (N=41) frekansı

Mutasyon	Allel Sayısı	%
IVS 1.110 G→A	15	17,45
IVS 1.6 T→C	5	5,81
IVS 2.1 G→A	5	5,81
Codon 8 (-AA)	5	5,81
Codon 39 C→T	4	4,65
Codon 8/9 (+G)	2	2,32
Codon 44 (-C)	2	2,32
IVS 2.745 C→G	1	1,17
IVS 1.1 G→A	1	1,17
3.7 single gene del(3.7/αα)	3	3,49
20.5kb double gene del	1	1,17
Wt	42	48,83
Toplam	86	100

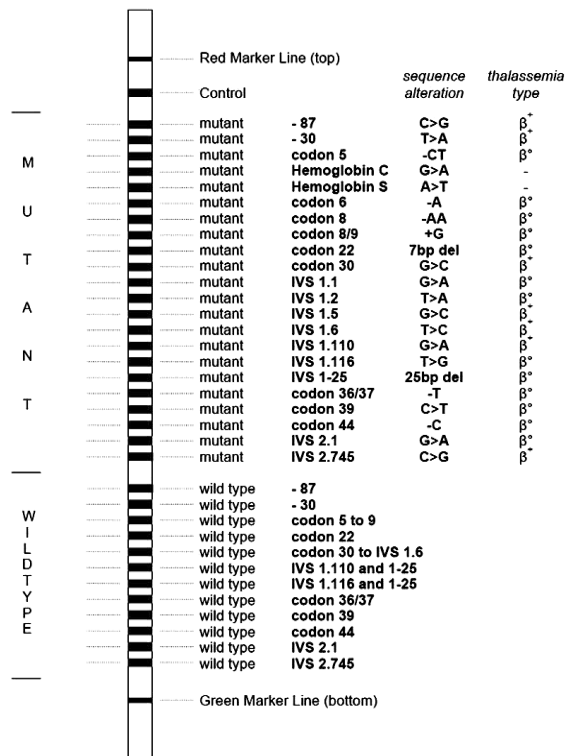
wt.: yabancı tip, normal allel

Tablo 4.6. StripAssay sonuçlarının değerlendirilmesi

Wild Type	Mutant	Genotip
Pozitif	Negatif	Normal
Pozitif	Pozitif	Heterozigot
Negatif	Pozitif	Homozigot



Şekil 4.1. Alfa talasemi için mutant ve normal oligonükleotit problemlerinin pozisyonunu gösteren referans membranlar



Şekil 4.2. Beta talasemi için mutant ve normal oligonükleotit problemlerinin pozisyonunu gösteren referans membranlar

4.2. Tartışma

Talasemiler dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de yaygındır. Türkiye’de beta talasemi alfa talasemiye oranla daha sık gözlenmektedir [91]. Beta talasemi kalıtsal bir hastalıktır. Otozomal resesif geçiş gösterir ve otozomal resesif geçiş gösteren hastalıklarda taşıyıcılar, genellikle sağlıklıdırlar. Ancak kendileri gibi bir taşıyıcıyla evlendikleri zaman hasta çocuk doğmasına neden olmaktadır [8]. Türkiye’de beklenenin üzerinde hasta çocuk doğmasının sebebi akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliğidir [9]. Ülkemizdeki akraba evlilik oranı %20-40 arasındadır. Bu oran bölgelere göre değişiklik göstermektedir. Bu durum talasemi gibi kalıtsal hastalıkların toplumda hızla yayılmasına olanak sağlamaktadır [92].

Talasemilerin tanısında ilk yol hematolojik verilerin analizidir. Talasemi taşıyıcı tanısında kan sayımı, Hb A2 ve Hb F düzeyleri kullanılmaktadır [23]. Beta talasemi taşıyıcılarında MCV ve MCH değerleri sırasıyla 80 fL ve 27 pg’ın altındadır [93]. Alfa talasemi taşıyıcılarında MCV ve MCH değerleri ise 71 - 81 fL ve 22 - 26 pg aralığındadır [94]. Alfa ve beta talasemilerin ayırt edilmesindeki en önemli değişken Hb A2 düzeyleridir. Hb A2 konsantrasyonları %3,7 ve/veya Hb F için %2,0’nin üzerindeki olgular talasemi taşıyıcısı olarak düşünülürler ve moleküler düzeyde araştırmaya gidilir [23]. Beta talasemi taşıyıcılarında Hb A2 düzeyleri %3,7’nin üstündedir [95]. Alfa talasemi taşıyıcılarında Hb A2 düzeyleri %1,5 - %3 arasında değişmektedir [96].

Çalışmamızda 54 örneğin 37’sinde sadece beta globin mutasyonu, 2’sinde sadece alfa globin mutasyonu ve 2’sinde hem alfa hem beta globin mutasyonu saptanmıştır. Beta globin geninde homozigot mutasyon bulunan olgunun MCV değeri 68 fL ve MCH değeri 19,6 pg olarak saptanmıştır. Bu olgunun Hb A2 değeri %5,4 olarak bulunmuştur. Bunun dışında alfa ve beta globin zincirinde mutasyon taşıyan 41 olgunun MCV, MCH ve Hb A2 değerleri de literatürle uyumlu bulunmuştur [19, 93].

Topal’ın (1998) çalışmasında Hb A2 düzeyleri heterozigot taşıyıcılarda %3,9, homozigotlarda %2,5 bulunmuştur [97]. Çalışmamızdaki 54 olgunun ortalama Hb

A2 değeri %4,6 olarak bulunmuştur. Mutasyon taşıyan 41 olgunun ortalama Hb A2 değeri ise %4,9 dur.

Yüreğir ve arkadaşları (2001) Kahramanmaraş ve çevresinde yaptıkları tarama çalışmasında Hb A2 düzeyi %3,5'in üzerindeki talasemi taşıyıcı sıklığını %0,68 olarak saptamışlardır [98].

Arpacı'nın çalışmasında (1992); Hb F değeri yüksek olan 2 olguda mutasyon tipi IVS 1.110 bulunmuş, 2 olguda Hb AS olup talasemi mutasyonu yine IVS 1.110 bulunmuş ve bir olguda da Hb SF ve IVS 1.110 mutasyonu bulunmuştur [99]. Çalışmamızda 54 olgunun 14 tanesinde Hb F değeri %1 den fazladır. Bu 14 olgunun 10 tanesinde mutasyon saptanmıştır. 4 olgunun Hb F değeri %1 den fazla olmasına rağmen uyguladığımız strip testiyle mutasyona rastlanılmamıştır.

Ülkemizde β -talasemi mutasyon tiplerini belirlemeye yönelik birçok çalışma yapılmıştır. β -talasemi Türkiye'de ilk olarak 1941 yılında Aksoy tarafından tanımlanmıştır. Fakat β -talaseminin ciddi bir sağlık problemi olduğu 1950'li yılların sonlarına doğru anlaşılmıştır [100]. Genel popülasyonda β -talasemi taşıyıcılığı prevalansına ait ilk saptama Çavdar ve arkadaşları tarafından 1971 yılında %2 olarak belirtilmiştir [101].

Tadmouri ve arkadaşları (1998) yaptıkları bir çalışmada, beta talasemide Türkiye'de saptanan en yaygın mutasyonu IVS 1.110 (G>A) olarak saptamışlardır. Bunu sırasıyla IVS 1.6 (T>C), kodon 8 (-AA), IVS 1.1 (G>A), IVS 2.745 (C>G), IVS 2.1 (G>A), kodon 39 (C>T), -30 (T>A), kodon 5 (-CT) mutasyonları takip etmektedir. Çalışmada belirlenen 31 beta talasemi ve anormal hemoglobin mutasyonları Türkiye'nin 6 farklı bölgesine göre sınıflandırmışlardır. Buna göre beta talasemi ve anormal hemoglobinlerin frekansı Marmara Bölgesi'nde %11, Ege/Akdeniz Bölgesi'nde %24,9, Orta Anadolu Bölgesi'nde %13,9, Güneydoğu Anadolu Bölgesi'nde %14,7, Karadeniz Bölgesi'nde %6,9, Doğu Anadolu Bölgesi'nde %7,5 olarak belirlenmiştir. Göçmen Türklerde ise frekans %7,7 olarak belirtilmiştir. Bu çalışmada Marmara Bölgesi'nde saptanan mutasyonların frekansı IVS 1.110 (G>A)'nin %34,1, IVS 1.6 (T>C)'nin %14,8, kodon 8 (-AA)'in %8,0, IVS 1.1

(G>A)'in %9,1, IVS 2.745 (C>G)'nin %4,6, IVS 2.1 (G>A) %3,4, kodon 39 (C>T)'nin %4,6, kodon 5 (-CT) %3,4, kodon 8/9 (+G)'in % 2,3, kodon 44 (-C), -87(C-G), kodon 6 (-A), IVS 2.848 (C>A), IVS 1.116 (T>G) ve -101 (C>T) %1,1 ve bilinmeyen mutasyonlar %9,1 olarak saptamışlardır [68].

Güleşken ve arkadaşlarının (2000) Ege Bölgesi'nde talasemi major veya intermedia tanılı 75 olguda yaptıkları çalışma sonucunda beta talasemi mutasyon frekanslarını IVS 1.110 (G>A) %44,1, IVS 1.1 (G>A) %28,2, IVS 1.6 (T>C) %13,3, IVS 2.745 (C>G) %9,3, IVS 2.1 (G>A) %2,7, kodon 39(C>T) %2,4 olarak saptamışlardır [102].

Çürük ve arkadaşlarının (2001) Çukurova Bölgesi'nde yaptıkları bir çalışmada 20 farklı beta talasemi alleli gösterilmiş olup %57,3 ile en yüksek frekansa sahip IVS 1.110 (G>A) mutasyonu belirlenmiştir. Bunu sırasıyla IVS 1.1 (G>A) %8,3, kodon 39 (C>T) %6,4, IVS 1.6 (T>C) %5,7, kodon 8 (-AA)'in %5,7, -30 (T>A) %4,7, IVS 2.1 (G>A) %3,4, IVS 2.745 (C>G) %2,8, kodon 5 (-CT) %1,1, kodon 44 (-C), %0,7 mutasyonları takip etmektedir [103].

Keser ve arkadaşları (2004) Antalya Bölgesi'nde 918 kromozom üzerinde yaptıkları çalışmada beta globin geninde 19 mutasyon belirlemişlerdir. Çalışma beta talasemi minör, beta talasemi intermedia, beta talasemi major, Hb S/beta talasemi veya Hb S mutasyonlarını içermektedir. Frekansı en yüksek mutasyon olarak IVS 1.110 (G>A) (%38,6) bulunmuştur. Bunu sırasıyla IVS 1.6 (T>C) %9,4, -30 (T>A) %8,4, IVS 2.1 (G>A) %6,9, IVS 2.745 (C>G) %5,9, kodon 44 (-C) %3 ve IVS 1.1 (G>A) %3 izlemektedir. Beta talasemi mutasyonları arasında Hb S'nin frekansı ise %14,9 olarak saptanmıştır. Aynı çalışmada 2 yeni mutasyon belirlenmiştir. Bu mutasyonlardan kodon3 (+T) Türkiye'de ilk kez Antalya'da tanımlanmıştır [104].

İnce ve arkadaşlarının (2003) Diyarbakır Bölgesi'nde yaptıkları bir çalışmada ARMS (amplifikasyon refractory mutation system) yöntemini kullanarak sıklıkla gözlenen sekiz farklı mutasyonu belirlemişlerdir. Çalışmada beta talasemi major tanısı almış 36 hasta örnekleri kullanılmış olup 10 hastada %27,8'lik frekansla IVS 1.110 (G>A) mutasyonu belirlenmiştir. Bunun dışında saptanan mutasyonların frekansları kodon 8 (-AA) %11,1, IVS 1.6 (T >C) %11,1, IVS 2.1 (G>A) %8,3, IVS 2.745 (C>G) %5,5,

IVS 1.1 (G>A) %2,8, kodon 39 (C>T) %2,8 ve -30 (T>A) %2,8 olarak belirtilmiştir [105].

Özkaralı'nın (2007) çalışmasında hem klasik yöntemlerle (ARMS) hem de DNA mikroarray yöntemi ile mutasyon taraması yapılmış ve her iki yöntemle de mutasyon frekansları IVS 1.110 (%22,11), IVS 1.1 (%12,50), IVS 1.6 (%8,65), IVS 2.1 (%8,65), Cd 39 (%7,69) ve IVS 2.745 (%5,76) olarak saptanmıştır. Cd 6 ve -87 mutasyonlarına ise hiçbir olguda rastlanmamıştır. Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi bu çalışmada da en yüksek oranda gözlenen mutasyonun IVS 1.110 olduğu belirlenmiştir [106].

Arıyürek'in (2009) çalışmasında 81 olguda β talasemi, 34 olguda ise α talasemi taşıyıcılığı şüphesi ile aile bireyleriyle birlikte toplam 164 olgunun mutasyon taraması yapılmıştır. Yalnızca bir olguda $\alpha^{3,7}$ talasemi mutasyonu taşıyıcılığı, bir olguda Hb S mutasyonu taşıyıcılığı, birisinde D Los Angeles/ IVS 1.110 çifte heterozigotluğu saptanmıştır. β talasemi mutasyonu belirlenen 84 olgunun %74'ünde IVS 1.110, %9'unda Cd 8, %5'inde Cd 39, %4'ünde Cd 5, %4'ünde IVS 1.1, %2'sinde IVS 2.745, %1'inde Cd 44 ve -87 mutasyonu bildirilmiştir [107].

Altunkılıç ve Aksoy'un (2003) Anamur Bölgesinde yaptığı beta talasemi mutasyon tiplendirilmesi çalışmasında IVS 1.110, IVS 2.745, IVS 2.1, Cd 8 ve Fsc 5 mutasyonlarını saptamışlardır. IVS 1.110 mutasyonunun Anamur Bölgesi'nde de yüksek oranda olduğu bu çalışmada da rapor edilmiştir [108].

İlk α talasemi çalışması ülkemizde Aksoy ve arkadaşları tarafından 1950-1960 yılları arasında yapılmıştır. Bu çalışmada $\alpha^{3,7}$ ve $\alpha^{20,5}$ mutasyonlarının birlikte Hb H hastalığına neden olduğu gösterilmiştir. Altay ve arkadaşları (1989) Hb H hastalarında yaptıkları çalışmalarında en sık gözlenen mutasyonunun $\alpha^{20,5}$ olduğunu ve bu mutasyonu $\alpha^{3,7}$ mutasyonunun takip ettiğini bildirmişlerdir [109].

Yalın (2004) yaptığı çalışmada α talasemiye neden olan mutasyonlardan $\alpha^{3,7}$ yi %45, MED I % 28,3, $\alpha^{20,5}$ %1,7 olarak bildirmiştir [110].

Polat ve arkadaşları (1995) Mersin merkeze bağlı bir köyden topladıkları kan örneklerinde yaptıkları çalışmada 8 olguda $\alpha^{3,7}$, bir olguda $\alpha^{20,5}$ ve 6 olguda IVS 1.110 mutasyonu belirlemişlerdir [111]. Çalışmamızda 54 olguya alfa talasemi strip testi uygulanmıştır. Bu 54 olgudan sadece 4 tanesinde alfa globin mutasyonu belirlenmiştir. 3 olguda $\alpha^{3,7}$ (3,7 kb single gene delesyonu) ve 1 olguda $\alpha^{20,5}$ (20,5 kb double gene delesyonu) mutasyonu saptanmıştır.

Çalışmamızda saptadığımız mutasyon çeşitleri daha önce ülkemizde yapılmış çalışmalarda bulunan mutasyonlarla uyum sağlamaktadır. Çalışmaya hematolojik verileri kriter alınarak dahil edilen 54 olgunun 13 tanesinde mutasyon saptanmamıştır. Bunun sebebi olarak bu 13 olgunun, strip testinde yer alan, sık rastlanılan ve Akdeniz ülkelerine özgü olan mutasyonların dışında farklı bir mutasyon taşıyabilme ihtimali olmasıdır. Kocaeli Bölgesinin kozmopolit bir yapıya sahip olması da bu düşüncemizi desteklemektedir. Bu mutasyonların saptanması için daha detaylı moleküler analizler önerilebilir. Çalışmamızda beta globin mutasyonu alfa globin mutasyonuna oranla daha yüksek bulunmuştur. Bu veri de Türkiye’de beta talaseminin alfa talasemiye oranla daha yaygın olduğunu desteklemektedir.

Yapılan çalışmalardan da görüldüğü gibi talasemi moleküler düzeyde oldukça geniş bir çeşitlilik göstermektedir. Ülke içinde farklı bölgelerde farklı mutasyon çeşidine ve sıklığına rastlanılmaktadır. Bu değişkenlik ülkeler arasında da gözlenmektedir. Bu durumda etnik ve kültürel köken göz ardı edilmemelidir.

Talaseminin henüz kesin bir tedavisi yoktur. Buna rağmen hastalık doğum öncesi tanıyla hasta çocuk doğumu engellenebilmektedir.

Çalışmamızdaki veriler hastaların klinik bulgularıyla birleştirilebilir. Hasta sayısı artırılarak talaseminin fenotipik etkileri ve genetik geçişi hakkında daha detaylı bilgilere ulaşabilmek mümkündür. Elde edilen veriler ileride genişletilerek klinisyenlere hastalığın seyri ve takibi hakkında yardımcı olabilecektir. Gelecekte yapılabilecek çalışmalarla talasemi taşıyıcıları için kolay, ucuz ve uygulanabilir tedavi yöntemleri bulunabilir. Ayrıca elde edilen veriler Türkiye’nin talasemi mutasyon haritasına katkı sağlayabilecektir.

KAYNAKLAR

- [1] CAVALLI, S.L., MENOZZI, P., PIAZZA, A., The History and Geography of Human Genes. University Pres. Princeton. 1996.
- [2] Guidelines for The Control of Hemoglobin Disorders, WHO/HDP/HB/GL/94.1. Control of Hereditary Diseases. Genova WHO, 1996.
- [3] LUKENS, J.N., LEE, G.R., The Abnormal Hemoglobins. Ed. LEE, G.R., BITHELL, C.T., FOERSTER, J., ATHENS, J.W., WKENS, J.N., Wintrobe's Clinical Hematology. Lea and Febiger Com., Pennsylvania, 1993.
- [4] LUKENS, J.N.: The Thalassemias and Related Disorders In: Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis; Eds: Lee, G.R., Bithell, C.T., Foester, J., Athens J.W., Lukens, J.N. Lea and Febiger Com, Pennsylvania, 1993.
- [5] KUTLAR, A., HUISMAN, T.H.J., Dedection of hemoglobinopathies techniques in diagnostic. Hum Biochem Gen, 519, 1991.
- [6] DINÇOL, G., PEKÇELEN, Y., ATAMER, T., SARGIN, D., NALÇACI, M., AKTAN, M., BEŞİŞİK, S., Hemolitik Anemiler. Edited by: Nobel Tıp Kitabevleri Klinik Hematoloji. İstanbul Üniversitesi, 87-152, Türkiye, 2003.
- [7] WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B., The Thalassaemia Syndromes. 3. ed., Blacwell Scientific Pub, Oxford, 1981.
- [8] ARCASOY, A., Türkiye'de Thalassemia Taşıyıcı Sıklığı ve Anormal Hemoglobinler. Ankara Talasemi Derneği, 1994.
- [9] BASAK, A.N., Talasemi Moleküler Genetigi. Temel Moleküler Hematoloji Kursu. 99-106, Mersin, 2005.
- [10] CAI, S.P., WALL, J., KAN, Y.W., CHEHAB, F.F., Reverse dot blot probes for the screening of beta-thalassemia mutations in Asians and American blacks. Hum Mutat 3(1), 59-63, 1994.
- [11] THOMPSON, M., MCINNES, R.R., WILLARD, H.F., Genetics in Medicine. 5. ed., B. Saunders Comp, 247-270, Philadelphia, 1991.
- [12] MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RADWELL,

- V.W., Harper's Biochemistry. 21. ed., Long Medical Book, London, 1988.
- [13] HUISMAN, T.H.J., The Structure and Function of Normal and Abnormal Hemoglobins. *Bailieres Clin Haematol*, 6:1-30, 1993.
- [14] HUISMAN, T.H.J., Human Hemoglobin. *Blood Disease of Infancy and Childhood*. 7. ed., Ed. Miller, D.R., Baehner, R.L., Mosby-Year Book Inc., St Louis, 1995.
- [15] TOKULLUGIL, A., DIRICAN, M., ULUKAYA, E. (Çev. Eds.), *Biyokimya*. Champe P.C., Harvey R.A., Biochemistry, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd. Şti., İstanbul, 1997.
- [16] <http://media-2.web.britannica.com/eb-media/66/53066-004-75E3A8ED.gif> Erişim tarihi: 10.11.2009
- [17] CHAMPE, P.C., HARVEY, R.A., *Globuler Proteinler*. Lippincott Biyokimya Nobel Kitabevleri, Ankara, 2007.
- [18] KLUG, W.S., CUMMINGS, M.R., *Genetik Kavramlar*. Çev. Ed. ONER C. Palme Yayıncılık, 6.Baskı, Ankara, 2003.
- [19] TELEN, M.J., KAUFMAN, R.E., The mature erythrocyte. In: Lee GR et al (Eds), *Clinical Hematology*, 10. ed. Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore, 207, 1999.
- [20] MURRAY, R.K., GRANNER, D.K., MAYES, P.A., RODWELL, V.W., Harper *Biyokimya*. 25. Baskı, Nobel Matbaacılık, İstanbul, 2004.
- [21] <http://physiology.pharyngula.org/lectures/resp/heme.gif>, Erişim tarihi: 13.12.2009
- [22] WEATHERAL, D.J., The Thalassemias. Eds; Beutler E., Coller B.S., Lichtman M.A., Kipps T.J., Seligsohn U. In. *Williams Hematology*, 6. Ed., Mc Graw Hill Publishing Co, 547-580, New York, 2001.
- [23] GÜRGEY, A., *Talasemi ve hemoglobinopatilerde yeni görüşler*. TÜBİTAK Yayınları, 628, Ankara, 1986.
- [24] WEATHERALL, D.J., CLEGG, J.B., HIGGS, D.R. AND WOOD, W.G., *The Hemoglobinopathies*. SCRIVER, C.R., BEAUDET, A.L., SLY, W.S., VALLE, D. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Volume III. Eighth edition, International Edition, 4571-4627, U.S.A, 2001.
- [25] STAMATOYANNOPOULOS, G. AND GROSVELD, F., *Hemoglobin Switching*. STAMATOYANNOPOULOS, G., MAJERUS, P.W.,

- PERLMUTTER, R.M., VARMUS, H., The Molecular Basis of Blood Diseases. Third edition, W.B Saunders Company, 135-182, Philadelphia, 2001.
- [26] OLIVIERI, N.F., WEATHERAL, D.J., Thalassemias. Eds; Lilleyman JS, Hann IM, Blanchette VS In. Pediatric Hematology, 2. Ed., London: Churchill &, 307-327, Livingstone, 1999.
- [27] GÜMRÜK, F., Hemoglobin ve Hemoglobinopatiler. Eds; İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalın HE, Süleymanlar G, In. Temel iç Hastalıkları, 1.Baskı, Ankara, Günes Kitabevi Ltd, 1233-1243, 1996.
- [28] http://www.mun.ca/biology/scarr/Fg17_19.gif Erişim tarihi: 13.12.2009
- [29] HUISMAN, T.H.J., JONXIS, J.H.P., The hemoglobinopathies, Techniques of Identification. Marcel Dekker Inc, New York, 1977.
- [30] ALTAY, Ç., The frequency and distribution pattern of β -thalassemia mutations in Turkey. Turk J Haematol, 19(2): 309-315, 2002.
- [31] BUNN, H.F., FORGET, B.G., Hemoglobin: Molecular, Genetic, and Clinical Aspects. W.B. Saunders Com, Philadelphia, 1986.
- [32] FLINT, J., HILL, A.V.S., BOWDEN, D.K., High Frequencies of α -Thalassaemia are The Result of Natural Selection by Malaria. Nature, 321:744-750, 1986.
- [33] AKSOY, M., ERDEM, Ş, EFREMOV, G.D., WILSON, J.B., HUISMAN, T.H.J., SCHROEDER, J.R., SHELTON, J.B., ILITIN, O.N., MÜFTÜOĞLU, A., Hemoglobin İstanbul: Substitution of Glutamine for Histidine in a Proximal Histidine (F8(92) β). The Journal of Clinical Investigation, 51: 1380-1387, 1972.
- [34] ALTAY, Ç., Anormal hemoglobins in Turkey. Turk J Hea 19(1): 63–74, 2002.
- [35] AKAR, E., AKAR, N., A review of abnormal hemoglobins in Turkey. Turk J Hematol, 24:143-145, 2007.
- [36] GÜNÇAĞ, D., PEKÇELEN, Y., ATAMER, T., Klinik Hematoloji. Nobel Matbaacılık, İstanbul, 2003.
- [37] HIGGS, D.R., Alpha-Thalassaemia. Ed. Higgs, D.R., Weatherall, D.J Bailliere's Clinical Haematology, Saunders Company, London, 1986.
- [38] WEATHERALL, D.J., The thalassemias. In: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW, et al., eds. Molecular basis of blood diseases, 2. ed., WB Saunders, 157, Philadelphia, 1994.

- [39] BERNINI, L.F., Geographic distribution of alpha thalassemia. In: Steinberg MH, Forget PG, Higgs DR, Nagel RL (eds) Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Cambridge University Press, 878-94, Cambridge, UK., 2001.
- [40] YÜREGİR, G.T., AKSOY, K., ÇÜRÜK, M.A., HbH disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional α -thalassemia-1 and a newly discovered poly A mutation. *Br J Haematol* 80:527, 1992.
- [41] TADMOURI, G.O., BAŞAK, A.N., β -Thalassemia in Turkey: A Review of the Clinical, Epidemiological, Molecular and Evolutionary Aspects Hemoglobin. 25(2): 227-239, 2001.
- [42] WEATHERALL, D.J., The Thalassemias, In: William's Hematology ed: E Beutler, B Coller, MA Linchtman, TJ Kipps, U Seligsohn. 6. ed, Mc Graw Hill, Medical Publishing Division, 547-80, Newyork, St Louis, 2001.
- [43] CAPPELLINI, N., COHEN, A., ELEFThERIOU, A., PIGA, A., PORTER, J., (EDS). Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia. Thalassaemia International Federation, 2000.
- [44] GÜMRÜK, F., ALTAY, Ç., Talasemiler. *Katkı Pediatri Dergisi*, 3:307-25, 1995.
- [45] AKSOY, M., DİNÇOL, G., ERDEM, Ş., Survey on Hb Variants, β -Thalessemia, G-6PD Deficiency and Haptoglobin Types in Turkish People Living in Manavgat, Serik and Boztepe (Antalya). *Hum Hered*, 30:3-6, 1980.
- [46] AKSOY, M., KUTLAR, A., KUTLAR, F., DİNÇEL, G., ERDEM, Ş., BAŞTESBIHÇI, S., Survey on Hemoglobin Variants, Beta-Thalessemia, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, and Haptoglobin Types in Turks From Western Thrace. *J Med Genet*, 22:288-290, 1985.
- [47] USTUNDAG, M., Hemoglobinopati Kontrol Programı. Edited by: Canatan D., Aydınok Y.: 3.UluslararasıTalasemi Yaz Okulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbı Okulu, 145-148, İstanbul, 2004.
- [48] GONZALEZ-REDONDO, J.M., STOMING, T.A.; KUTLAR, F., KUTLAR, A., HU, H., WILSON, J.B., HUISMAN, T.H.J., Hb Monroe or $\alpha_2\beta_2\gamma_3(B12)Arg\rightarrow Thr$, a variant associated with β -thalassemia due to a G \rightarrow C substitution adjacent to the donor splice site of the first intron. *Hemoglobin*, 13(1):67-74, 1989.
- [49] DIAZ-CHICO, J.C., YANG, K.G., STOMING, T.A., EFREMOV, D.G., KUTLAR, A., KUTLAR, F., AKSOY, M., ALTAY, Ç.,

- GÜRGEY, A., KILINÇ, Y., HUISMAN, T.H.J., Mild and severe beta thalassemia among homozygotes from Turkey: Identification of the types by hybridization of amplified DNA with synthetic probes. *Blood*, 71:248-251, 1988.
- [50] FEI, Y.J., STOMING, T.A., EFREMOV, G.D., EFREMOV, D.G., BATTACHARIA, R., GONZALEZ- REDONDO, J.M., ALTAY, Ç., GÜRGEY, A., HUISMAN, T.H.J., β -thalassemia due to a T \rightarrow A mutation within the ATA box. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 153:741-747, 1988.
- [51] ÖNER, R., ALTAY, Ç., GÜRGEY, A., AKSOY, M., KILINÇ, Y., STOMING, T.A., REESE, A.L., KUTLAR, A., KUTLAR F., HUISMAN, T.H.J., Beta thalassemia in Turkey. *Hemoglobin*, 14(1):1-13, 1990.
- [52] ÖNER, R., AGARWAL, S., DIMOVSKI, A.J., EFREMOV, G.D., PETKOV, G.H., ALTAY, Ç., GÜRGEY, A., HUISMAN, T.H.J., The G \rightarrow A mutation at position 2230 to the Cap site of the β -globin gene as a possible cause for a β -thalassemia. *Hemoglobin*, 15(1):67-76, 1991.
- [53] AULEHLA-SCHOLZ, C., BAŞARAN, S., AĞAOĞLU, L., ARCASOY, A., HOLZGREVE, W., MINY, P., RIDOLFI, F., HORST, J., Molecular Basis of beta thalassemia in Turkey: detection of rare mutations by direct sequencing. *Hum. Genet.*, 84:195-197, 1990.
- [54] ORKIN, S.H., GOFF, S.C., Nonsense and frameshift mutations in β -thalassemia detected in cloned β -globin genes. *J. Biol. Chem.*, 256:9782-9784, 1981.
- [55] ÖZÇELİK, H., BAŞAK, A.N., TÜZMEN, S., KIRDAR, B., AKAR, N., A novel deletion in a Turkish β -thalassemia patient detected by DGGE and direct sequencing: FSC 22-24 (-7 bp). *Hemoglobin*, 17(4):387-391, 1993.
- [56] ALTAY, Ç., BAŞAK, A.N., Molecular basis and prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Turkey. *Int. J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 2:283-290, 1995.
- [57] GÜRGEY, A., ALTAY, Ç., DIAZ-CHICO, J.C., KUTLAR, A., HUISMAN, T.H.J., Molecular heterogeneity of beta thalassemia intermedia in Turkey. *Acta Haematol.*, 81:22-27, 1989.
- [58] JANKOVIC, L., PLASESKA, D., EFREMOV, G.D., TCHAICAROVA, P., PETKOV, G.H., Two rare mutations [Cd 30 (G \rightarrow C) and CDs 36/37 (-T)] in a Turkish thalassemia major patient from Bulgaria. *Hemoglobin*, 18(4&5): 359-364, 1994.

- [59] RUND, D., COHEN, T., FILON, D., DOWLING, C.E., WARREN, T.C., BARAK, I., RACHMILEWITZ, E., KAZAZIAN, H.H., OPPENHEIM, A., Evolution of a genetic disease in an ethnic isolate: β -thalassemia in the Jews of Kurdistan. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 88: 310-314, USA, 1991.
- [60] AKAR, N., ÇAVDAR, A.O., DESSI, E., LOI, A., PIRASTU, M., CAO, A., Beta thalassaemia mutations in the Turkish population. *J. Med. Genet.*, 24: 378-379, 1987.
- [61] BASAK, A.N., OZCELIK, H., OZER, A., TOLUN, A., AKSOY, M., AGAOGLU, L., RIDOLFI, F., ULUKUTLU, L., AKAR, N., GURGEY, A., KIRDAR, B., The Molecular Basis of β -Thalassemia in Turkey. *Human Genetics*, 89: 315-318, 1992.
- [62] TADMOURI, G.O., BILENOĞLU, O., KANTARCI, S., KAYSERILI, H., PERRIN, P., BAŞAK, A.N., A rare mutation [IVS-I-130 (G→A)] in a Turkish β -thalassemia major patient. *Am. J. Hematol.*, 63: 223-225, 2000.
- [63] SCHNEE, J., GRIESE, E.U., EIGEL, A., HORST, J., β -thalassemia gene analysis in a Turkish family reveals a 7 bp deletion in the coding region. *Beta Thalassemia In Turkey: A Review 237. Blood*, 73: 2224-2230, 1989.
- [64] BAŞAK, A.N., ÖZER, A., ÖZÇELİK, H., KIRDAR, B., GÜRGEY, A., A novel frameshift mutation: deletion of C in codons 74/75 of the β -globin gene causes β^0 -thalassemia in a Turkish patient. *Hemoglobin*, 16(4):309-312, 1992.
- [65] VETTER, B., SCHWARZ, C., KOHNE, E., KULOZIK, A.E., β -thalassaemia in the immigrant and non-immigrant German populations. *Br. J. Haematol.*, 97: 266-72, 1997.
- [66] BASAK, A.N., ÖZER, A., KIRDAR, B., AKAR, N., A novel 13 bp deletion in the 30 UTR of the β -globin gene causes β -thalassemia in a Turkish patient. *Hemoglobin*, 17(6): 551-555, 1993.
- [67] ALTAY, Ç., GÜRGEY, A., ÖNER, R., KUTLAR, A., KUTLAR, F., HUISMAN, T.H.J., A mild thalassemia major resulting from a compound heterozygosity for the IVS-II-1 (G→A) mutation and the rare T→C mutation at the polyadenylation site. *Hemoglobin*, 15(4): 327-330, 1991.
- [68] TADMOURI, G.O., TÜZMEN, S., ÖZÇELİK, H., ÖZER, A., BAIG, S.M., SENG, E.B., BAŞAK, A.N., Molecular and population genetic analyses of beta thalassemia in Turkey. *Am. J. Hematol.*, 57: 215-220, 1998.

- [69] DIAZ-CHICO, J.C., YANG, K.G., KUTLAR, A., REESE, A.L., AKSOY, M., HUISMAN, T.H.J., An ~300 bp deletion involving part of the 50 β -globin gene region is observed in members of a Turkish family with β -thalassemia. *Blood*, 70: 583-586, 1987.
- [70] ÖNER, C., ÖNER, R., GÜRGEY, A., ALTAY, Ç., A New Turkish type of β -thalassaemia major with homozygosity for two non-consecutive 7.6 kb deletion of the $\psi\beta$ and β genes and an intact δ gene. *Br. J. Haematol.*, 89: 306-312, 1995.
- [71] ÖNER, R., ÖNER, C., ERDEM, G., BALKAN, H., ÖZDAG, H., ERKAN, M., GÜMRÜK, F., GÜRGEY, A., ALTAY, Ç., A novel ($\delta\beta$)(0)-thalassemia due to a approximately 30-kb deletion observed in a Turkish family. *Acta Haematol.*, 96: 232-236, 1996.
- [72] EGELI, E.S., ERGUN, S., A Case of Sickle Cell Anemia in the White. *Bulletin of the Turkish Medical Society*, 1: 251-261, 1946.
- [73] ANDREOLI, T., CARPENTER, C., BENETTI, J., Hematolojik Hastalıklar. *Cecil Essential of Medicine*, 4. Edisyon, Çevik matbaa, 356, İstanbul, 2000.,
- [74] KOHN, J., Separation of hemoglobin on cellulose acetate. *J Clin Pathol*, 22: 109-110, 1969.
- [75] SMITHIES, O., Aim improved procedure for starch-gel electrophoresis: Further variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochem. J.* 71: 585, 1959.
- [76] PEARSON, H.A., MCFARLAND, V., Starch block electrophoresis of hemoglobin. *U. S. Armed Forces M. J.*, 10: 693-700, 1959.
- [77] MARDER, V. J., CONLEY, C. L., Electrophoresis of hemoglobins on agar gels. *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 105: 77-78, 1959.
- [78] Spinco Division, Beckman Instruments Co., Palo Alto, Calif.: Technical Bulletin No. TB-6052-B, 1958.
- [79] SCHNEIDER, R.G., ET A.L., Laboratory Identification of the Hemoglobins, *Lab Management*, August, 29-43, 1981.
- [80] SANGER, F., NICKLEN, S., COULSON, A.R., DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74: 5463–5467, 1977.
- [81] SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T., *Molecular Cloning, a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory Press New York, 1989.

- [82] PERKIN ELMER, ABI 310 Genetic Analyzer Manuel, 2000.
- [83] FOGLIETTA, E., DEIDDA, G., GRAZIANI, B., MODIANO, B., BIANCO, I., Detection of a-globin gene disorders by a simple PCR methodology. *Haematologica*, 81:387–96, 1996.
- [84] TAN, A.S., QUAH, T.C., LOW, P.S., CHONG, S.S., A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alfa thalassemia. *Blood*, 98:250–1, 2001.
- [85] KIRCHGESSER, M., SCHLAGENHAUFE, R., KIRCHNER B., ADEM, C., MALMBERG, W., TGETGEL, A., HUBER, I., NIESWANDT, V., WALTER, T., The New MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kits – Fast and Flexible Fully Automated Sample Preparation, Roche Applied Science, Biochemica, No:4, Penzberg, Germany, 2003.
- [86] HUISMAN, T.H.J, High Performance liquid chromatography as a method to identify hemoglobin abnormalities. *Acta Haemat*, 78-123, 1987.
- [87] ÇÜRÜK, M.A., Hemoglobinopatilerde Tarama ve Tanı Yöntemleri Neler Olmalı? Edited by: Canatan D., Aydınok Y., 3.Uluslar arası Talasemi Yaz Okulu & Avrupa Transfüzyon Tıbbi Okulu, 157-168, İstanbul, 2004.
- [88] KUTLAR, A., KUTLAR, F., HUISMAN, T.H.J., Seperation of normal and abnormal hemoglobin chains by reversed phase high performance liquid chromatograh. *J Chromatogr*, 357: 147-153, 1986.
- [89] YEŞİLADA, E., SAVACI, S., YÜKSEL, Ş., GÜLBAY, G., OTLU, G., KAYGUSUZOĞLU, E., Ailesel Akdeniz Ateşi (FMF) Düşünülen Olgularda MEFV Gen Mutasyonları. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 12(4): 235-238, 2005.
- [90] PE Applied Biosystems, ABI Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit protocol, 1998.
- [91] THEIN, S.W., Beta Thalassemia. *Br Clin Haem*, 6:151, 1993.
- [92] BASARAN, N., Tıbbi Genetik. 6. Baskı, , Bilim Teknik Yayınevi, 128-129, Eskişehir, 1996.
- [93] GALANELLO, R., MELIS, M.A., RUGGERI, R., ADDIS, M., SCALAS, M.T., MACCIONI, L., FURBETTA, M., ANGIUS, A., TUVERI, T., CAO, A., Beta⁰ thalassemia trait in Sardinia. *Hemoglobin*; 3: 33–46, 1979.
- [94] GALANELLO, R., ARU, B., DESSI, C., ADDIS, M., PAGLIETTI, E., MELIS, M.A., COCCO, S., MASSA, P., GIAGU, N., BARELLA, S.,

- ET AL., Hb H disease in Sardinia: Molecular, hematological and clinical aspects. *Acta Haematol*, 88: 1–6, 1992.
- [95] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=b-thal>. Erişim tarihi 07-12-09.
- [96] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene&part=a-thal>. Erişim tarihi 07-12-09.
- [97] TOPAL, K., Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde β –Talasemi mutasyon tiplerinin saptanması. Doktora tezi, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 1998.
- [98] YÜREĞİR, G.T., KILINÇ, M., EKERBIÇER, H., BILALOĞLU, N., TEKİN, N., Screening of hemoglobinopathies in Kahramanmaraş, Turkey. *Turk J Haematol*, 18(2): 79-83, 2001.
- [99] ARPACI, A., AKSOY, K., YÜREĞİR, G.T., Preliminary studies for prenatal diagnosis: Incidence and mutation sites of β -thalassaemia in Antakya, Türkiye. *Ann Med Sci.*, 1:103-110, 1992.
- [100] AKSOY, M., The history of β thalassaemia in Turkey. *Turk J Pediatr*, 33:195-197, 1991.
- [101] CAVDAR, A.O., ARCASOY, A., The incidence of beta thalassaemia and abnormal hemoglobins in Turkey. *Acta Haematol.*, 45(5):312-8, 1971.
- [102] GÜLEŞKEN, S., ÖREN, H., VERGIN, C., ŞANLI, N., GÜLEN, H., UÇAR, C., İRKEN, G., Mutational Analysis of Turkey Using an Allele-Specific Oligonucleotide Hybridization Technique. *Acta Haematologica* 104:181-184, 2000.
- [103] ÇÜRÜK, M.A., ARPACI, A., ATILLA, G., TULI, A., KILINÇ, Y., AKSOY, K., YÜREĞİR, G.T., Genetic Heterogeneity of β -Thalassaemia at Çukurova in Southern Turkey. *Hemoglobin*, 25(2): 241-245, 2001.
- [104] KESER, I., ŞANLIOĞLU, A.D., MANGUOĞLU, E., KAYIŞLI, GÜZELOĞLU, O., NAL, N., SARGIN, F., YEŞİLİPEK, A., ŞİMŞEK, M., MENDILCIOĞLU, I., CANATAN, D., LÜLECI, G., Molecular Analysis of Beta-Thalassaemia and Sickle Cell Anemia in Antalya. *Acta Haematologica* 111: 205-210, 2004.
- [105] İNCE, H.H., AYYILDIZ, O., KALKANLI, S., BATUN, S., MÜFTÜOĞLU, E., Molecular basis of beta-thalassaemia mutations in Diyarbakır in the southeastern region of Turkey. *Hemoglobin* 27(4): 275-278, 2003.

- [106] ÖZKARALI, E., Beta Talasemi Moleküler Tanısında Klasik Yöntemlerle Mikroarray Yönteminin Karşılaştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2007.
- [107] ARIYÜREK, S., Konya Bölgesinin Anormal Hemogloblin ve Talasemi Mutasyon Tiplerinin Belirlenmesi. Doktora Tezi, ÇÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2009.
- [108] ALTUNKILIÇ, S., AKSOY, K., Anamur Bölgesinin Talasemi Mutasyon Tiplendirilmesi. Tanıda Moleküler Tıp Sempozyumu, Diyarbakır, 2003.
- [109] GÜRGEY, A., ALTAY, Ç., BEKSAÇ, M.S., BHATTACHARYA, R., KUTLAR, F., HUISMAN, T.H.J., Hydrops fetalis due to homozygosity for α thalassaemia-1, $-(\alpha)20,5$ kb: The first observation in a Turkish family. *Acta Haematol*, 81: 169-171, 1989.
- [110] YALIN, E., α talasemi ve g6pd enzim eksikliğine neden olan mutasyonların moleküler düzeyde incelenmesi. Doktora Tezi, ÇÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Adana, 2004.
- [111] POLAT, G., Alfa talasemili bir ailenin mutasyon tiplerinin moleküler düzeyde incelenmesi. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana, 1995.

ÖZGEÇMİŞ

Nilüfer Üzülmez, 22.01.1985 de Kocaeli' de doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini İzmit'te tamamladı. 2003 yılında Kocaeli Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi' nden mezun oldu. 2003 yılında başladığı Marmara Üniversitesi Biyoloji bölümünü 2007 yılında bitirdi. 2007 yılında Sakarya Üniversitesi, Biyoloji Bölümüne girdi ve 2010 yılında mezun oldu. 2007 yılında Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Biyolog olarak çalışmaya başladı. Halen Kocaeli Üniversitesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalında Biyolog olarak görev yapmaktadır.