

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Biyokimya ve Klinik Biyokimya
Anabilimdalı

DİYARBAKIR BÖLGESİNDE BETA-TALASEMİ
MUTASYON TİPLERİNİN MOLEKÜLER
DÜZEYDE İNCELENMESİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr.Kemal GÜNEŞ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. M. Sabri BATUN

DİYARBAKIR
2006

ÖNSÖZ

Bu çalışma; T.C. Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü, Diyarbakır İl Sağlık Müdürlüğü ve Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı işbirliği ile yapılmıştır. Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürü Sayın Dr. Rifat Köse'ye, Diyarbakır İl Sağlık Müdürü Sayın Dr. Namik Kemal Kubat'a ve bölümümüze sundukları maddi ve manevi katkılarından dolayı Dicle Üniversitesi Rektörü Sayın Prof. Dr. Fikri Canoruç hocamıza teşekkür ederiz.

Böylesine büyük çaplı bir mutasyon taramasında, doğal olarak, örneklerin toplanması yaklaşık 2 aylık bir süre boyunca sürdü. Özellikle ilçelerde yaptığımız taramalar için haftaiçi her sabah erkenden yola çıkılıp akşam geç saatlerde geri dönülüyordu. Bu yorucu tempoda bizi yalnız bırakmayan ve bir aile ortamı sıcaklığında biz asistanlarıyla beraber masalara oturup yüzlerce örneğin tek tek tasnif edilmesinde bile bizzat emek veren başta Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Naime Canoruç hocama, tez danışmanım Prof. Dr. M. Sabri Batun hocama, Merkez Laboratuvarı Başkanımız Prof. Dr. Abdurrahman Kaplan hocama, Doç. Dr. Levent Erdiñ hocama ve bölümümüzün diğer hocalarına teşekkürümü ve minnetimi arz ederim.

Yine o yoğun ve yorucu günlerde bizlere yardım ve desteklerini esirgemeyen ve aramızdan ayrılp bölümümüzün koridorlarını sessiz bırakan değerli hocamız Yrd. Doç. Dr. Cengiz Turgut'un anısını burada tazeliyorum. Bu yaşamın hızla uçup gittiğini ve bizim ve sevdiklerimizin daima burada olamayacağımızı bir kez daha bize hatırlatarak; bizlere tutkulu bir yaşam sevgisi ve her şeyi daha iyi yapma arzusu aşılayarak aramızdan ayrılan Cengiz Turgut hocamızın ruhu şad olsun...

Bu çalışma boyunca hep yanımda bulduğum değerleri meslekdaşlarım ve iş arkadaşlarım Dr. Serpil Ekinci, Dr. Metin Demir, Biyolog Bilge Devecioğlu, Uzm. Dr. Ebru Kale, İl Sağlık Müdür Yardımcısı Dr. Derya İzgi ve Diyarbakır Talasemi Merkezi Başkanı Dr. Taylan Atabay'a , emeği geçen diğer asistan arkadaşlarıma, ekibimizde bulunan hemşire ve laboratuvar teknisyeni arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim...

Dr. Kemal Güneş

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖNSÖZ	II
GİRİŞ ve AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
GEREÇ ve YÖNTEM	31
BULGULAR	43
TARTIŞMA	50
ÖZET	56
ABSTRACT	57
KAYNAKLAR	58

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Beta-talasemi (β -talasemi), β -globin zincirinin yeterli düzeyde sentez edilememesi ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır. (1)

Talasemi dünya'da görülen en sık genetik hastalıktır. Dünya nüfusunun yaklaşık %4.5'i Beta-talasemi taşıyıcısıdır. Talasemi'nin yüksek bir sıklıkta görüldüğü talasemi kuşağı adı verilen bölgeler Türkiye'nin de üzerinde bulunduğu Akdeniz ülkelerinden başlayarak; Kuzey Afrika, Ortadoğu, Hindistan ve Güneydoğu Asya'ya kadar uzanır. (2, 3)

Günümüzde β -talasemi'ye yol açan moleküler defektler oldukça iyi bir şekilde incelenmiştir. Hastalığın en önemli nedenini, β -talasemi'de görülen büyük delesyonlar değil; gen içindeki nokta mutasyonlar oluşturmaktadır. Bu alanda tesbit edilen ilk mutasyonlar, DNA dizi analizi ile tanımlandıktan sonra, 1987 yılında rutin kullanıma giren PCR tekniği ve direkt DNA dizi analizi ile tesbit edilebilmişlerken; son 15 yılda. β -talasemi'ye yol açtıkları bilinen mutasyon sayıları büyük bir hızla artmış ve mutasyon çeşitlerinin sayısı günümüzde 200'ü geçmiştir. Bu geniş moleküler çeşitliliği basite indirgeyen bir faktör, tüm bu mutasyonların her toplumda görülmemesi ve mutasyonların etnik gruplara özgün olmasıdır. Genelde bir toplumda az sayıda mutasyon (6-8 çeşit), o toplumdaki β -talasemi genlerinin %90-95'ini oluşturmaktadır. Türkiye'de bu genel kural (6-8 çeşit mutasyonun talasemi mutasyonlarının %90-95'ini oluşturması) geçerli değildir. Türkiye'deki β -talasemi mutasyonlarının çeşitliliği diğer Akdeniz ülkelerine oranla daha karmaşıktır. (4)

Klinik ve laboratuvar verileri ışığında kolayca tesbit edilebilen Talasemi hastalığının aksine; Talasemi taşıyıcılarının kesin olarak tesbit edilmesi için moleküler düzeyde beta Talasemi mutasyon analizlerinin yapılması gerekmektedir. Taşıyıcıların kesin tesbitindeki bu zorluk, toplum taramaları sonucunda bir bölgenin Talasemi mutasyon sıklığının ve çeşitliliğinin belirlenmesini amaçlayan çalışmaları daha anlamlı kıldığı gibi, o bölgeye yapılacak sağlık hizmetleri yatırımlarını da etkileyeceğinden bir sağlık stratejisi olarak da önemli bir konudur.

Beta talasemi vakalarının sık görüldüğü Dünya talasemi kuşağında yer alan Türkiye'de taşıyıcı bireylerin saptanması ve bölgelere göre mutasyon tiplerinin belirlenmesi genetik danışmanlık hizmetlerini ve prenatal tanı uygulanmasını kolaylaştıracağı gibi doğacak hasta bireylerin sayısının artmasının önüne geçebilecek koruyucu bir uygulama olarak önem arz ediyor.

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

Bu tezin konusu olan çalışmada, Diyarbakır İl merkezi ve 13 ilçesinde gerçekleştirilen toplum taraması ile yaşları 9 ile 16 arasında değişen ilköğretim ağındaki 10038 (Onbinotuzsekiz) ocuktan alınan tam kan örneklerinin moleküler analizleri yapılarak, β -talasemi mutasyonlarının Diyarbakır bölgesindeki çeşitliliği ve sıklığı araştırıldı.

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

2. GENEL BİLGİLER

Talasemi, insanlarda tek gen kalıtımıyla en sık geçen hastalıktır. Akdeniz toplumlarında, Ortadoğuda, Hindistan yarı-kıtasında, Burma'da, Çin'in Güneyi, Tayland ve Malaya yarımadası üzerinden Pasifik ada toplumlarını da içine alan bir hat boyunca yüksek bir sıklıkta görülür. Dünya üzerinde 80 milyonu β -talasemi taşıyıcısı olmak üzere yaklaşık 270 milyon (dünya nüfusunun %4.5'i) talasemi taşıyıcısı mevcuttur. (3, 5, 6, 7)

Türkiye'de ise β -talasemi taşıyıcılığı oranı ortalama %2 iken, bu sayı Türkiye'nin bazı yörelerinde %10'a kadar çıkmaktadır. (8)

Talasemiler, hemoglobinin bir veya birden fazla globin zincirlerinin sentez oranının azalması ile karakterize edilirler. Sentezi bozulmuş olan globin zincirine göre α , β , γ , δ , $\delta\beta$, $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemi olarak adlandırılırlar ve oldukça geniş bir genetik yelpazeyi kapsarlar. Ancak diğer globin genlerine bağlı anormalliklerin daha nadir görülmesi ve en sık görülen tiplerin α ve β -talasemi olması nedeniyle α ve β talasemiler olarak iki sınıfa ayrılabilirler. Bütün talasemi formlarında ortak olan; hemoglobindeki globin zincirlerinin üretiminde bir dengesizliğin söz konusu olmasıdır. β -talasemide α globin zincirlerinin, α -talasemide ise β -globin zincirlerinin dengesiz üretimi söz konusudur. Alfa ve Beta zincirlerinin azalmış olması veya hiç olmaması ile sonuçlanan yüzlerce değişik mutasyon α ve β -globin gen lokuslarında tanımlanmışlardır. Alfa talasemi daha ziyade Uzak Doğu'da görülürken, β -talasemi, Akdeniz ülkelerinde siktir. β -Talasemi, β -globin geninde 200'ün üzerinde değişik mutasyonlar sonucu β -globin zincirlerinin; yokluğu (β^0 -thal) veya sentezinin azalması (β^+ -thal) ile sonuçlanan yaygın görülen bir otozomal-resessif bozukluktur. β -Talasemi'den sorumlu genetik defektlerin %95'inden fazlası β -globin geninin moleküler işlevlerini etkileyen nokta mutasyonlardır. Mutasyonların az bir kısmı is gen delesyonları sonucu meydana gelirler. (5, 9, 10, 11)

2.1. HEMOGLOBİNİN YAPISAL ÖZELLİKLERİ VE GENETİK KONTROLÜ

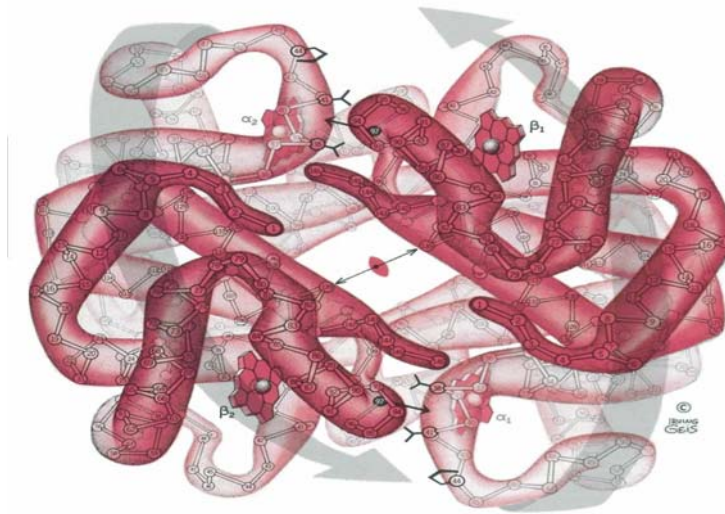
Hemoglobin(Hb) iki adet α -benzeri ve iki adet β -benzeri globin zincirinden meydana gelen bir tetramerdir. Hemoglobindeki globin zincirlerinin herbiri bir prostetik oksijen bağlayan Hem grubuna kovalent olarak bağlanmışlardır. Globin ve Hem'den oluşan Hb, 64400 dalton ağırlığında olup; tetrameri oluşturan polipeptid zincirleri belirli aminoasitlerden oluşmuşlardır. Amino asit dizilimi birincil yapıyı, bu amina asitlerin aralarındaki hidrojen

bağları ile birbirlerine helikal biçimde bağlanmaları ikincil yapıyı; polipeptid zincirlerinin birbiri üzerine katlanarak oluşturdukları üç boyutlu yapı üçüncül yapıyı ve dört polipeptid zincirin nihayetinde oluşturdukları molekül ise dördüncül yapıyı oluşturur. Globuler hemoglobin molekülü içerisinde yer alan Hem molekülü tüm insan hemoglobinlerinde aynı olup; globin zincirinin kendi üzerine katlanması sonucu non-polar (hidrofobik) aminoasitler tarafından meydana getirilen Hem cepleri içerisinde yerleşmiştir. Bundan dolayı Hem'in yerleştiği ortam, hidrofobik bir ortamdır (**Şekil 1**). (12,13)

Globin zincirleri, α -globin zincirinde 141 amino asit ve β , δ ve γ -globin zincirlerinde de 146 amino asitten meydana gelen uzun amino asit dizilerinden meydana gelmişlerdir.(13)

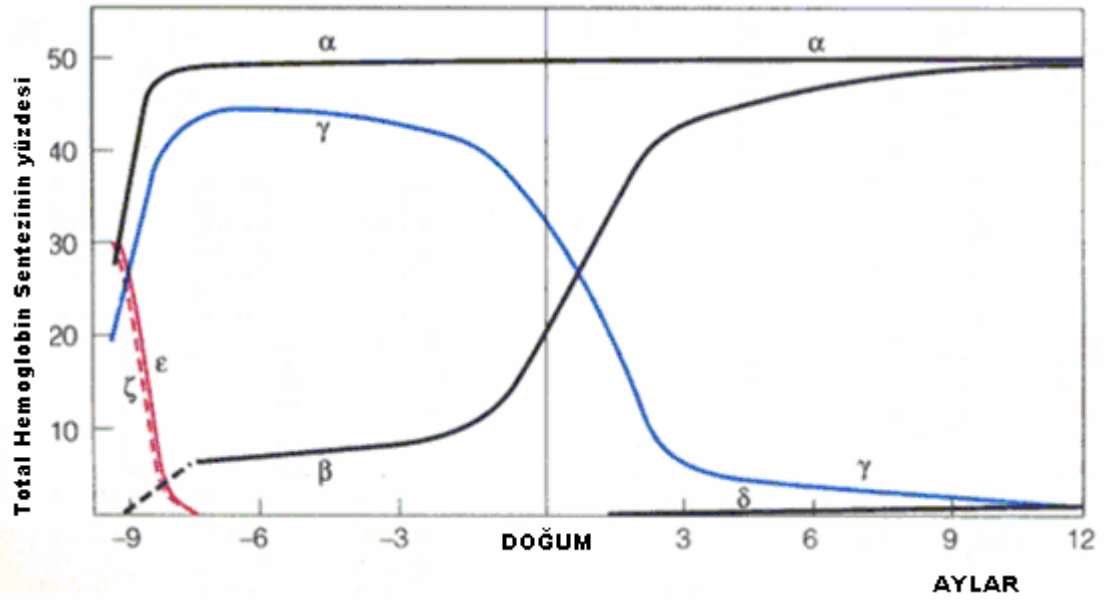
Globin zincirleri değişik hemoglobinlerde farklıdır ve bu farklılıklar; alfa, beta, epsilon, gamma ve zeta olarak ifade edilir. Gestasyonun erken döneminde epsilon zinciri yapılır. Gower1($\zeta_2\epsilon_2$) hemoglobini 2 zeta ve 2 epsilon zinciri içerir. Daha sonra Portland hemoglobini ($\zeta_2\gamma_2$) ortaya çıkar. Otuzyedinci gebelik gününde embriyonun hemoglobin yapısı Gower1 (%42), Gower2 (%24), hemoglobin F (%34)'den oluşur. Gestasyonun 3. ayından doğuma kadar hakim hemoglobin hemoglobin F dir ($\alpha_2\gamma_2$). Altı aylık bir fetusta hemoglobinin %90-95'i hemoglobin F'dir. Bundan sonra bu oran giderek azalarak doğumda ortalama %70'e iner. Doğumda %50-85 oranında olan hemoglobin F değerleri doğumu izleyen günlerde hızla düşmeye başlar (**Şekil 2 ve Şekil 3**). (14)

Sağlıklı erişkinlerde hemoglobinin, yaklaşık %95'i HbA ($\alpha_2\beta_2$) ; <%3.2'si HbA₂($\alpha_2\delta_2$) ve <%1'i ise fetal Hb (HbF, $\alpha_2\gamma_2$) dir. (13, 15)



Şekil 1. Hemoglobinin yapısı

(http://www.enslyon.fr/DSM/magistere/projets_biblio/2002/cmichel/images/oxyhb.jpg)



Şekil 2. Gelişimin değişik evrelerinde insanda globin genlerinin ekspresyonu. (16)

GEN	ζ	α	α	ε	G _γ	A _γ	δ	β
KROMOZOM	#16	#16	#16	#11	#11	#11	#11	#11
POLİPEPTİD ÜRETİLDİĞİ DÖNEM	Embriyo Fetus Aduh	α α α	α α α	ε G _γ A _γ	G _γ A _γ δ	A _γ δ β	δ β	β
HEMOGLOBİN	FORMÜL	İSİM						
Embriyo	ζ ₂ ε ₂	Gower I						
	α ₂ ε ₂	Gower II						
	ζ ₂ γ ₂	Portland						
Fetus	α ₂ β ₂	A						
	α ₂ γ ₂	F						
Adult	α ₂ β ₂	A						
	α ₂ δ ₂	A2						
	α ₂ β ₂ ^{glikoz}	A1C						

Şekil 3. Gelişimin değişik dönemlerinde globin genlerinin ekspresyonu ve buna bağlı olarak değişik hemoglobin tiplerinin ortaya çıkması. (17)

2.2. GEN EKSPRESYONUNUN TEMELLERİ

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

Gen ekspresyonundaki ilk adım; bir DNA iplikçisindeki nükleotid baz dizisinin, RNA'ya karşıt gelen (komplementer) diziye dönüşümü yani; "Transkripsiyondur". RNA, 5'→3' yönünde sentezlenir (**Şekil 4**). (12, 18)

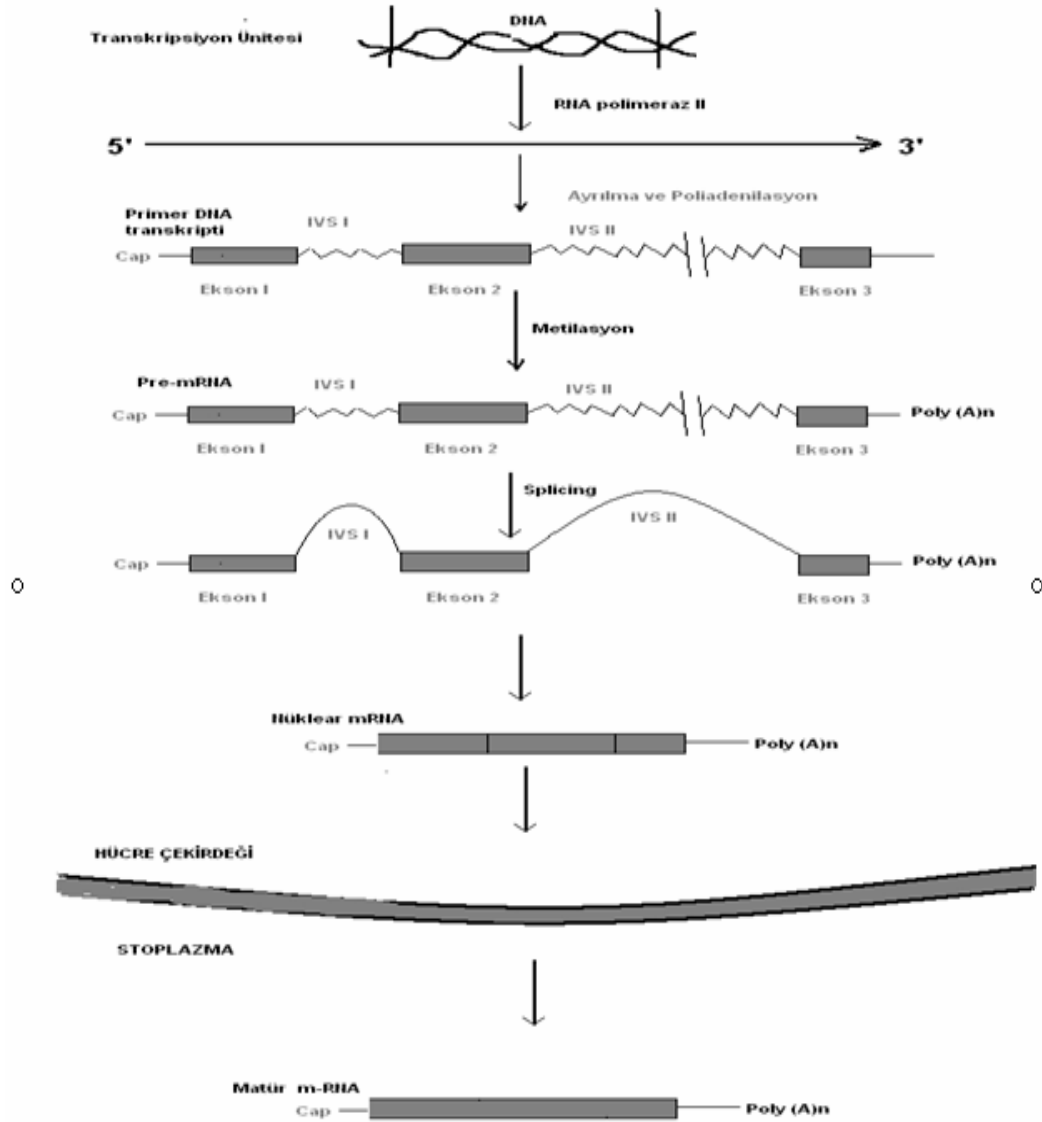
Başlangıçta RNA polimeraz DNA çift sarmalına bağlanır. Bu noktada DNA açılmaya başlar ve RNA sentezi uzama ile başlar. Polimeraz, DNA boyunca hareket ettikçe mRNA oluşur. Polimerazın hemen ardından, DNA tekrar kapanmaya başlar. Sonunda, RNA polimeraz, DNA'dan uzaklaştırılır. Bu noktada, durağan olmayan öncül transkriptin oluşması tamamlanır; durağan olmadığından da hemen modifikasyona uğrar. (18)

Transkripsiyon, DNA'nın spesifik bir bölgesinden başlar. Bu pozisyon bir genin hemen başlangıcında (5' ucunda)dır. Bu transkripsiyon başlangıç noktası "**Promoter**" olarak adlandırılır. Promoter, kodlanmayan kısa bir DNA nükleotid dizisi olup; RNA-polimeraza bağlanarak, transkripsiyonun başlamasını düzenlemektedir. Transkripsiyon başlama noktasının hemen üzerinde iki belirgin promoter bölgesi tanımlanabilir. Bu diziler, evrim boyunca çok iyi korunmuşlardır ve bunlara (consensus sequences) konsensus sekansları (dizileri) adı verilir. Bu sekanslar, RNA polimerazın bağlanarak mRNA sentezinin başlangıç sinyallerinin verildiği özel dizilerdir ve mRNA transkripsiyonunun hangi sıklık ve miktarda gerçekleşeceğini belirler. Prokaryotlarda altı bazlık (TATAAT) ve (TTGACA) şeklinde diziler, genin başlangıcından 10 ve 35 bazlık mesafelerde yer alırlar. Bunlar, "box" kutu olarak tanımlanırlar. Eukaryotlarda, bu promoter dizilerde farklılık bulunmaktadır. Transkripsiyonda kullanılan DNA dizilerinin tümüne **Transkripsiyon üniti** veya Operon denir (**Şekil 4**). Transkripsiyon üniti, Promoter'de başlar ve Terminatörde sonlanır. Diğer bir deyişle, 7-metil guanosin içeren 5' Cap gölgesinden başlar. (Guanozin-7-metiltransferaz etkisiyle, Guanozin, öncül mRNA'nın birinci ve ikinci riboz gruplarına trifosfat köprüsü ile bağlanır. 7 nolu pozisyondaki guanozin ve RNA zincirinin başlangıcındaki iki başlangıç riboz metile olur). Bu bölge protein sentezinin başlatılmasında görev alır. Daha sonra, aminoasit kodlayan ekson bölgeleri ve aminoasit kodlamayan intron bölgeleri üzerinden poli(A)

sinyalini içeren 3'UTR bölgesiyle sonlanır. Promoter bölgesinde 5' ucu için proximal, terminatör bölgede 3' ucu için de distal terimleri kullanılır. (18, 19, 20)

DNA'da çeşitli düzenleyici diziler bulunur, bunlar, oldukça kısa DNA dizilerinden oluşurlar. Her dizi, bir spesifik protein için olup bu proteinlere **transkripsiyon faktörleri** denir. Bir transkripsiyon kompleksi oluşturan bu transkripsiyon faktörleri adı verilen proteinler bir kompleks olarak DNA'ya bağlanırlar ve bir bağlanma noktası oluştururlar. (18)

Her globin geninde 3 adet ekson ve 2 adet intron (intervening sequence: IVS) bulunur. Globin zinciri kodlayan dizilerin olduğu gen bölgelerine **ekson** denilirken; protein kodlamayan (untranslated) diziler içeren bölgelere de **intron** adı verilir (**Şekil 4**).



Şekil 4. Ökaryotik RNA işlenmesinin şematik görünümü. (25)

Translasyona uğramadıkları halde globin genlerinin 5' ve 3' bölgelerindeki diziler gen ekspresyonunda rol aldıklarından çok önemlidirler. Promoter bölge, genin 5' ucunda bulunup transkripsiyonun başladığı bölgenin önündeki 100 baz çiftlik alanı kapsar ve transkripsiyonun başlaması için gerekli hazırlıklardan sorumlu baz dizilerini içerir.(21, 22, 23)

Eukaryotlarda bir gen tek bir polipeptidi kodlar ve öncül transkript, olgun haberci mRNA'ya dönüştürülür. Geni oluşturan DNA dizisinden nükleer RNA'nın enzimatik yolla kopyalanmasına **''Transkripsiyon''** denir. Transkripsiyon sonucu meydana gelen RNA'ya ise heterojen nükleer RNA (hnRNA) denir. İntron ve Eksonları olan heterojen nükleer RNA'nın olgun mRNA'ya dönüşmesi için intronların kesilip diziden uzaklaştırılmalarına **''Processing''** denir. Bu işlem, öncül mRNA'nın 5' ucuna 5' cap ve 3' ucuna da sayısız adenin nükleotidlerinin eklenmesiyle oluşturulur. Öncül mRNA'ların 3' ucu , AAAUAA kısa dizisinden hemen sonra spesifik bir endonükleaz ile koparılır. Ardından, bu transkriptte 100-250 adenin nükleotidi poli-A-polimeraz aracılığıyla bağlanır (poliadenilasyon) (**Şekil 4**). Bunun ardından, eksonların birbirine yapıştırılması (**Splicing**) gerekir. Eksonların 5' kısmına verici (donör); 3' kısmına da alıcı (acceptor) adı verilir. Intronlar enzimatik yolla kesilip çıkartıldıktan hemen sonra; verici ve alıcı yerler yapışarak matür mRNA oluşmaktadır. Eksonda verici kısmın içinde; G(Guanin) ve T(Timin) yani GT dizisi bulunmaktadır. Alıcı kısmında ise; A(Adenin) ve G(Guanin) kısaca AG dizisi bulunmaktadır. Bunlar korunmuş dizilerdirler. Olgun eukariyotik mRNA, öncül RNA'dan intronların çıkarılması ile meydana gelir. Kodlanmayan bir dizi, çevrim başlangıç işaretinin (AUG) hemen öncesinde yer alır. 3' ucunda ise çevrim dur işaretinin (UAA) hemen ardında kodlanmayan bir dizi bulunur. 5' cap eklenmesi ve poliadenilasyon, enzimatik reaksiyonların kapsamındadır. (10, 12, 18)

Eukaryotik hücrede, transkripsiyon hücre çekirdeğinde, translasyon ise stoplazmada olur. Çekirdekte birtakım değişikliklere uğradıktan sonra sitoplazmaya geçen mRNA ribozomlara bağlanarak protein sentezini başlatır. mRNA üzerinde protein sentezini başlatan ve bitiren kodonlar vardır. mRNA'daki kodonları oluşturan nükleotid dizileri translasyon sırasında amino asitlere karşılık gelen diziyeye dönüştürülür. **Translasyon**, ''başlangıç kodonunda başlar''. Amino asitler, transfer RNA ile sıralanarak, dizi tamamlanır. Her amino asidin, kendi tRNA'sı vardır. Bu mRNA'daki kodona komplementerdir (anti-kodon). Örneğin; Glysin için anti-kodon CCG olan tRNA, mRNA kodonda GGC ile karşılaşır. Bu noktada, sadece Glysin yapışabilir. mRNA'daki 1, 2, 3, 4'üncü kodonlar amino asid dizileri olarak sıralanırlar. Kodon1, her zaman AUG'dir (başlangıç kodonu). **Translasyon** (protein

sentezi) hücre çekirdeği dışındaki, sitoplazmada ribozomlarda oluşur. Ribozomlar, protein ve RNA moleküllerinden (rRNA) oluşur. Translasyon başlangıcında mRNA, ribozom ve tRNA kompleksi oluşur. Bu olay IF1, IF2, IF3 gibi başlatıcı faktörlere ihtiyaç duyar.

Translasyonun ikinci basamağı elongasyon (uzama) evresidir. Bir sonraki kodon tarafından belirlenen amino asit diziye eklenir. Üç fazlı bir uzama siklusu gelişir. Siklus bileşenleri; kodon tanınması, bir sonraki amino asite peptid bağlanması ve 3' yönünde nükleotidlerin hareketidir. mRNA, DUR kodonlarından (UAA, UGA ve UAG) birisine ulaşıldığında, translasyon, sona erer. Oluşan polipeptid zinciri, ribozomu terk eder. (18, 24, 25)

2.3. GLOBİN GEN KÜMELERİ

Alfa globin zinciri, 16. kromozom üzerinde yerleşmiş olan iki α -globin geni (α_2 ve α_1) tarafından kodlanırken; γ, δ ve β zincirlerinin genleri (sırasıyla $G\gamma$, $A\gamma$, δ ve β) 11. kromozom üzerinde bulunan kendilerine ait genler tarafından β -gen kümesi içerisinde kodlanırlar. Globin genleri her iki kümede de gelişim süresi boyunca eksprese edildikleri sıraya göre düzenlenmişlerdir. İki yetişkin α -benzeri globin geni vardır, α_1 ve α_2 . Bunlardan ikincisi predominant olarak eksprese edilir. Normal yetişkinde β -globin geni, eksprese edilen major β -benzeri globin genidir. Delta ve gamma genlerinin ekspresyonları ise minimaldir. (26, 27)

2.3.1. Alfa Gen Kümesi

Alfa gen kümesi genellikle fonksiyonel bir Zeta (ζ) geni ve iki alfa (α) geni içerir. Bu alfa genleri α_1 ve α_2 olarak gösterilirler. Bu kümede ayrıca dört adet psödogen bulunur: $\psi\zeta$, $\psi\alpha_1$, $\psi\alpha_2$ ve θ_1 . Bu psödo genlerin fonksiyonları bilinmiyor ancak varlığını sürdürebilen bir globin zinciri sentez ettirdikleri söylenemez, fetal yaşamın erken dönemlerinde bu genler ifade ediliyor gibi görünüyor. (Şekil 5-a). (5, 10)

2.3.2. β -Gen Kümesi

Beta-globin geni, 11. kromozomun kısa kolu (11p15.4) üzerinde diğer β -benzeri genlerle birlikte bir küme şeklinde bulunur. (Şekil 5-b). Bu küme beş fonksiyonel gen içerir: $5'\epsilon, G\gamma - A\gamma - \psi\beta, \delta - \beta 3'$. Bunlar gelişimsel ekspresyonlarına göre dizilmişlerdir β globin gen kümesi β -locus control region (β -LCR) kontrolü altındadır. Bu kontrol gölgesi, ϵ geninden 5' yönünden yaklaşık 5 ile 20 kilobazlık bir aralıkta yerleşmiş major bir düzenleyici eleman olup; Gen kompleksi içerisinde bulunan bütün genlerin ekspresyonunda

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

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

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

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

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

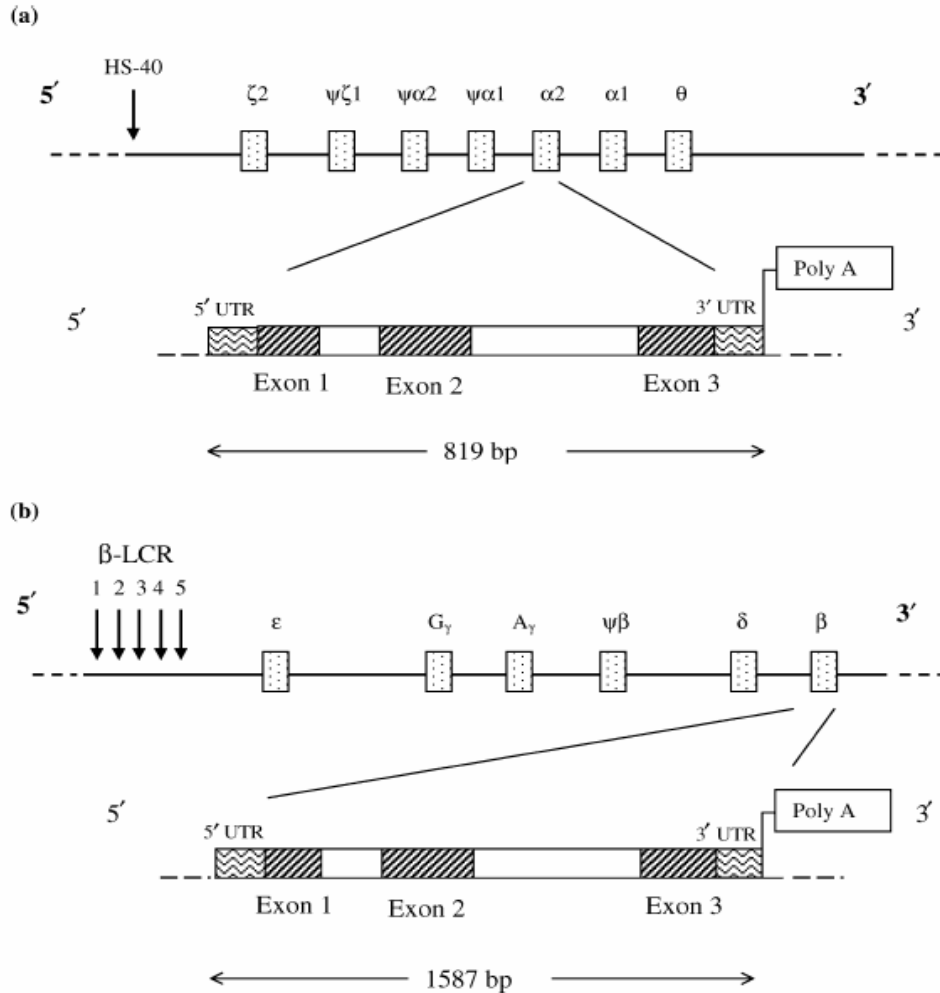
Ekson 3: 105'den 146'ya kadar olan **amino asitleri kodlar**

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

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

β globin gen promoteri, 3 önemli konsensus dizisini içerir. Bunlar, β -globin geninin hangi sıklık ve miktarda üretileceğini tayin ederler. Bunlardan en önemlisi RNA polimeraz II'nin bağlandığı **TATA** kutusu (-28 ile -31 arasındaki pozisyonunda) denilen bölge olup; diğerleri, **CCAAT** kutusu (-72 ile -76 pozisyonlar arasında) ve **duplike CACCC** motifleri (distalde -86 dan -90'a kadarki kısımlarda ve proximalde -101'den -105'e kadarki pozisyonlarda). **CCAAT** ve **TATA** unsurları birçok **ökaryotik promoterlerde** bulunurlarken; **CACCC**

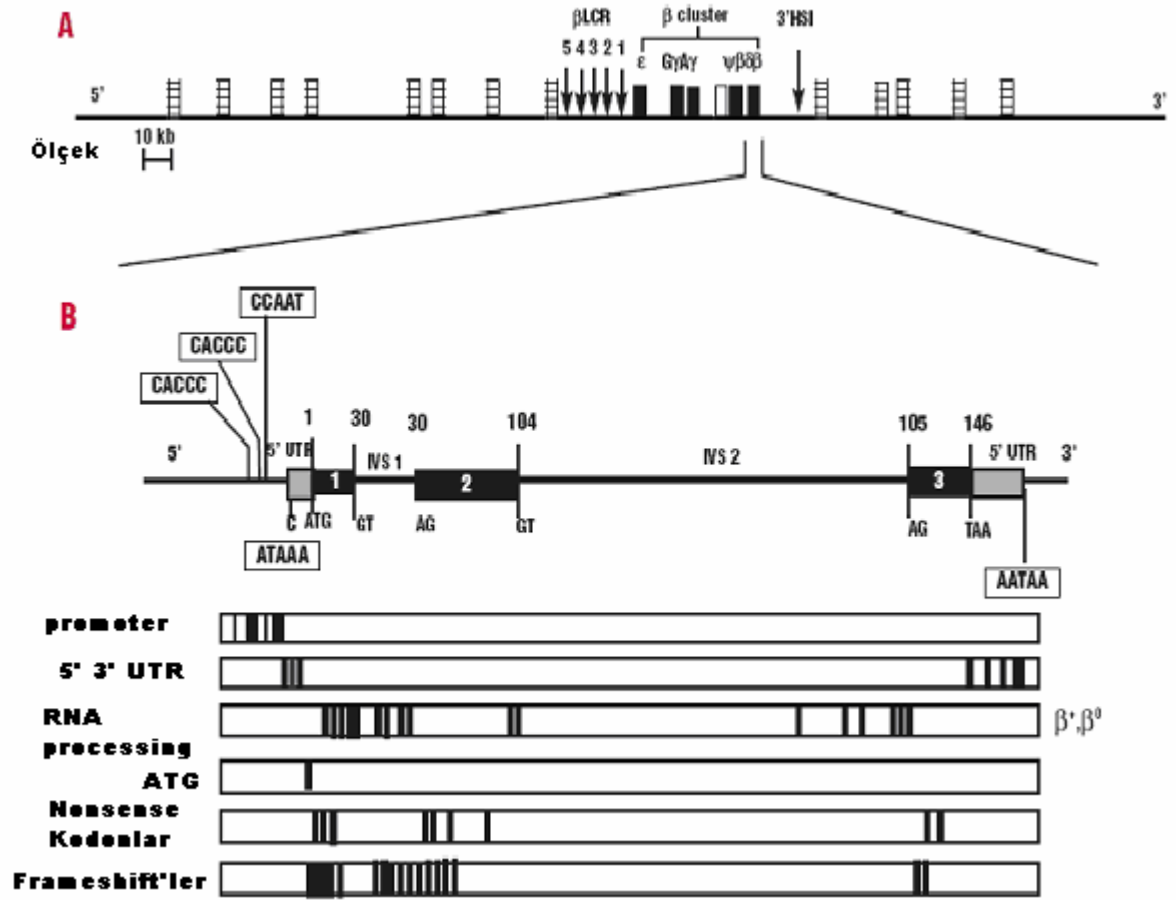
sekansı predominant **olarak eritroid hücre-spesifik promoterlerde** bulunurlar. Bu 5' ucunda yer alan sekansların normal gen ekspresyonu açısından önemi; -80 ile -100 bölgeleri arasındaki CACCC motifleri ve özellikle TATA kutusu içerisinde ve çevresindeki sekanslardaki nokta mutasyonlardan kaynaklanan β -talasemiler nedeniyledir. 3' UTR'de bulunan konsensus sekansı, β -globin genine has olup; "downstream enhancer" adını alır ve poli(A) kuyruğunun 3' yönünde yaklaşık 600 ile 900 bp'lik bir alanda yer alan bölgeyi kapsar. β -globin geninin 3' ucuna doğru zincir sonlandırma kodonundan sonra yaklaşık 200 bp uzunluğunda **AATAAAA** olarak uzayan **poli A** sinyal dizisi de yine 3' UTR bölgesinde bulunur. Bütün globin genleri benzer yapıya sahiptirler. Her gen 5' promoter dizilerin yanında 5' ve 3' protein kodlanmayan (untranslated) gölgelere sahiptir. (6, 27, 28, 29, 30, 31)



Şekil 5. Alfa ve beta-benzeri globin gen kümeleri her bir globin geninin üç eksonu ve iki intronu ile birlikte görülüyorlar.

Şekil 5.(a). Kromozom 16p13.3 üzerindeki alfa lokusu. Şekilde gösterilen yedi genden sadece üç gen klinik olarak anlamlı seviyelerde eksprese edilirler. Bunlar $\zeta 2$ geni(fötal gelişimin erken dönemlerinde eksprese edilir.), α_1 ve α_2 genleri (birçok hemoglobinopati testinin odağı). Diğer genler psödogenler ($\psi\zeta 1, \psi\alpha 1$ ve $\psi\alpha 2$) veya önemli ölçüde eksprese edilmeyen genlerdirler (θ). Düşey ok, lokus gen ekspresyonu için önemli olan upstream hipersensitif bölgenin (HS-40) yerini gösteriyor. Bunun aşağısında α_2 gen yapısı görülmüyor. Üç adet kodlayıcı ekson (çizgili kutular), iki adet intron (içi boş kutular) ve untranslate bölgeler (zigzaglı kutular) bütün globin genlerinde ortak bir özellik olarak bulunurlar.

Şekil 5.(b). Kromozom 11p15.4 üzerinde ϵ , γ^G , γ^A , δ ve β genleri, gelişime koşut ekspresyonlarının sırasına göre dizilmişlerdir. Gelişim esnasında beta benzeri globin ekspresyonunda iki "switch"(şalter) meydana gelmiştir. İlki, erken fötal gelişim esnasında gestasyonun 6-8. haftaları arasında ϵ globin genindenden γ globin genlerine (γ^G ve γ^A). İkinci "switch" de; doğumdan kısa süre önce γ geninden δ ve β genlerine dönüşüm için oluşur. Yine $\psi\beta$, eksprese edilmeyen bir pseudogene işaret eder. Beta globin kümesinin upstream bölgesindeki beş hipersensitive bölgeden oluşmuş olan β locus control region (β LCR), şekilde, düşey oklarla gösterilmiştir. **Şekil-1a**'da olduğu gibi, β globin geni de 1.6 kb lık gen yapısını göstermek üzere büyütülmüştür. Bu bölge ikinci intronun daha büyük olması nedeniyle alfa genlerindekiinden daha büyüktür. (15)



Şekil 6. β -globin gen kümesi ve komşu bölgeler nokta mutasyonların bazıları ile birlikte görülüyor. (6)

(Şekil 6.A): 11p kromozom üzerinde β -globin gen kümesi ve ona komşu bölgeler gösteriliyor. ϵ , γ , δ ve β globin genleri gri kutular şeklinde gösterilmiştir. β LCR'yi oluşturan 5' hipersensitif bölgeler (1 den 5'e kadar) ve 3' hipersensitif bölgeler (3'HSI) vertikal oklarla gösterilmiştir. İnce çizgilerle bölünmüş kutular ise olfaktör reseptörünü temsil ediyorlar.

(Şekil 6.B): 3 ekson (gri kutular) ve 2 intron (intervening sequences (IVS1 ve IVS2) ile birlikte β globin geninin yapısı görülüyor. Korunmuş sekanslar da gösterilmiştir. β -globin genlerinin alt tarafında ise; β -talasemiye neden olan nokta mutasyonların çeşitli sınıfları gösterilmiştir. (6)

2.4. β -TALASEMİ MUTASYONLARI VE MUTASYON TİPLERİ

2.4.1. β -Talaseminin Moleküler Temeli

Beta-talasemi moleküler düzeyde oldukça heterojendir. Yaklaşık 200'ün üzerinde değişik mutasyon çeşitli fenotiplerle alakalı olarak ortaya çıkarılmıştır. Bunlar ikiye ayrılırlar:

i- Beta-globin geninin **delesyonları** ve

ii- Beta-globin messenger'in **transkripsiyon, processing veya translasyonunu** etkileyen **non-delesyonel** mutasyonları,

Alfa talasemilerin tersine β talasemiler, nadiren, delesyonlar sonucu meydana gelirler.

β -Talasemi'den sorumlu genetik defektlerin %95'inden fazlası β -globin geninin moleküler işlevlerini etkileyen **nokta mutasyonlardırlar**. Mutasyonların sadece az bir kısmı gen delesyonları sonucudurlar. Beta globin genindeki mutasyonları sınıflandırırken; mutasyonların gen ekspresyonundaki çeşitli kademelere etkilerine göre sınıflandırma yapılabilir çünkü bu mutasyonlar gen ekspresyonundaki çeşitli kademeleri etkileyerek β -globin zincir sentezinin bozulmasına neden olurlar. (4, 9, 32, 33, 34, 35)

2.4.2. Delesyonel Mutasyonlar

Sadece beta genlerini etkileyen en az 17 değişik delesyon tanımlanmıştır. Bunlardan biri hariç diğerleri nadir görülür. Beta geninin 3' ucundaki 619-bp delesyon en yaygın görülen delesyonel β -globin geni mutasyonudur. Bu mutasyon Intron II'den başlayıp β -globin geninin 3' sonuna kadar gider. Ancak, bu mutasyon Pakistan ve Hindistanın Sind ve Gujarati popülasyonlarında sınırlı olup; buradaki beta-talasemi allellerinin yaklaşık %50'sini teşkil eder. Hint 619-bp delesyonu beta geninin 3' ucunu ortadan kaldırır ama 5' ucu korunmuş olarak kalır. Halbuki diğer birçok delesyon, 5' ucunu ortadan kaldırıp δ -genini korunmuş olarak bırakır. Bu delesyon için homozigot olanlar β^0 - talasemilidirler. Hint delesyonu için heterozigot olanların, diğer beta-talasemilerin heterozigot formlarında olduğu gibi yükselmiş HbA₂ HbF düzeyleri vardır. Delesyonel mutasyonlar için heterozigot olan formların hepsinde yüksek HbA₂ düzeyleri söz konusudur. Artmış δ -zincir üretimi, delesyonun yanında artmış δ -gen transkripsiyonu sonucudur ve bu da muhtemelen delesyona uğramış beta-geninin transkripsiyon faktörleri için yarışmasının azalmış olmasıdır. (5, 36, 37)

Kalan β -talasemilerin çoğu genin içerisinde veya hemen komşuluğundaki sekanslardaki nokta mutasyonlar tarafından meydana getirilir. Bunlar tek baz değişimi, birkaç

bazın minör insersiyon veya delesyonlarıdır, gen regulasyonunu etkiledikleri mekanizmalara göre sınıflandırılırlar. (6)

2.4.3. Transkripsiyonel Mutasyonlar

Beta-globin genindeki konsensus dizilerinin yapısında birçok değişik baz yerdeğiştirmeleri saptanmıştır. Bu konsensus dizilerindeki mutasyonlar, *RNA polimerazın* β -genindeki promoter bölgelere bağlanmasını önleyerek, *transkripsiyonu* başlatma kabiliyetinde azalmaya neden olur. Bu kategoriye giren değişik mutasyon tipleri ile ilişkili olarak, klinik şiddetlerinde önemli değişikliklerin olmasına rağmen bütün bu olgularda **fenotip β^+ talasemidir**. Upstream (5'ucu doğrultusu) bölgesindeki düzenleyici elemanlarla ilişkili bu mutasyonlar, bu bölgedeki korunmuş dizilerin beta-globin genlerinin transkripsiyonlarının düzenleyici rollerinin önemini teyid eder ve Ortadoğuda, özellikle Afrika popülasyonlarındaki en hafif talasemi formları ile ilgili bir temel veri sunar. Bu olgularda, β -globin zincir sentezi hem homozigot formlarda hem de çift heterozigot formlarda talasemi major'u önlemeye yeterli olup; sadece **%20-30** arasında **β -globin mRNA sentezi düşüklüğüne** neden olurlar ve klinik olarak hafif seyirli **talasemia intermedia fenotipi** meydana getirirler. Bu mutasyonlardan bazıları, mRNA CAP bölgesine göre -88 ve -87 pozisyonlarında olduğu gibi **CCAAT kutusuna yakın** iken; diğer bazı mutasyonlar Cap bölgesinden 30 nükleotid uzaklıktaki **TATA kutusu içerisinde**, genellikle tek nükleotid değişimi ile meydana gelirler. Beta globin geninin 5' ucu doğrultusunda (upstream) yer alan bazı mutasyonlar, fenotipte daha az farkedilebilir bazı değişikliklerle ilişkilidirler. Örneğin: **-101 pozisyonunda C→T yerdeğiştirmesi**, bahsedilen upstream bir promoter elemanla ilgili olarak **"sessiz" β -talasemi** ili ilişkilidir ki bu; tamamen normal fenotipte olup sadece çift heterozigotlardaki β -talaseminin daha ciddi formları ile etkileşimi ile saptanabilir. CAP (+1) bölgesinde bir A→C yerdeğiştirmesi bulunan sadece bir örnek, Hintlilerde saptanmıştır. Bu vaka mutasyon açısından homozigot olmasına rağmen; fenotipik olarak β -talasemi trait fenotipine sahipti. (5, 28, 38, 39)

Tablo 1. Transkripsiyonel Mutasyonlar (40, 41)

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİSİTE
- 101 (C→T)	β^+	Türk, Bulgar, İtalyan
- 92 (C→T)	β^+	Akdeniz
- 90 (C→T)	β^+	Portekiz
- 88 (C→T)	β^+	Amerikalı Siyahi
- 88 (C→A)	β^+	Kürt
- 87 (C→G)	β^+	Akdeniz
- 87 (C→T)	β^+	Alman, İtalyan
- 87 (C→A)	β^+	Yugoslav, Amerikalı siyahi
- 86 (C→G)	β^+	Lübnanlı
- 86 (C→A)	β^+	İtalyan
- 32 (C→A)	β^+	Tayvanlı
- 31 (A→G)	β^+	Japon
- 31 (A→C)	β^+	İtalyan
- 30 (T→A)	β^+	Türk, Bulgar
- 30 (T→C)	β^+	Çinli
- 29 (A→G)	β^+	Amerikalı Siyahi, Çinli
- 28 (A→C)	β^+	Kürt
- 28 (A→G)	β^+	Çinli
+10 (-T)	β^+	Greks (Yunanistan)
+22 (G→A)	β^+	Türk, Bulgar, İtalyan

2.4.4. RNA-Processing Mutasyonları

Beta-talasemi ile ilgili vurgulanması gereken bir nokta da, intranükleer mRNA'nın **processing** sürecini engelleyen **tek-baz mutasyonlarının** olağanüstü çeşitliliğidir. (5)

Ekson ve intronların sınırları sabit-değişmez dinükleotidler tarafından meydana getirilmişlerdir: **5' ucunda (donor) GT** ve **3' ucunda (akseptör) AG** dinükleotidler gibi... Bu bağlantı bölgelerinin (**splice junction**) herhangi birinde meydana gelen tek-baz değişiklikleri

normal ''RNA splicing'' olayını tamamen ortadan kaldırır ve olay β^0 fenotipi ile sonuçlanır. (5, 42)

Splice Junction (kavşak) bölgelerinde değişmeyen-sabit **dinükleotidleri çevreleyen** yüksek derecede korunmuş (konsensus) diziler mevcut olup; bunlar da mRNA processing işlevinde görev alırlar. Bu konsensus dizileri, **donör bölgede**: Intronun ilk 6 nükleotidi ve eksonun son 3 nükleotidi iken; **akseptör bölgede**: Eksonun ilk nükleotidi ile intronun son 10 nükleotidinden oluşur. Bu bölgelerdeki mutasyonlar, β^+ fenotipinde talasemiler ile sonuçlanır.(43)

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

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

intronu içerisinde yeni donör bölgeleri oluşumuna neden olan çeşitli mutasyonlar da tesbit edilmiştir. (5, 11, 37, 43, 44)

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

Exon I içerisinde 24. ile 27. kodonlar arasındaki bölgede bir kriptik (gizli) donör bölgesi vardır. Bu bölge bir **GT dinükleotidi** içerir; buna komşu bölgelerde meydana gelen değişimler bunu değiştirerek konsensus donör splice bölgesine daha fazla benzemesini ve sonuç olarak **aktivasyonunu** sağlar ve bu olay normal splicing bölgesinin aktif olması halinde bile meydana gelebilir. Bu bölgedeki çeşitli mutasyonlar bu bölgeyi aktifleştirip RNA processing işlemi esnasında kullanıma girmesini sağlar ki; bunun sonucu anormal mRNA üretimidir. Bu mutasyonlardan en iyi bilinen üç tanesi: 19. , 26. ve 27. kodonlardaki baz değişimleri ile ilişkilidir.

19. kodonda A→G (HbMalay)

26. kodonda G→A (HbE)

27. kodonda G→T (HbKnossos)

Bu baz değişikliklerinin sonucunda bir taraftan β-globin mRNA'sının azalması öte taraftan bir aminoasit yerine başka bir aminoasidin sentezi söz konusudur çünkü anormal olarak splice edilen mRNA da proteine çevrilir. Oluşan anormal hemoglobinlerin, izah edilen kodonlardaki baz değişikliklerine izafeten karşılıkları yukarıda verilmiştir. Bu Hb varyantlarının hepsi muhtemelen normal mRNA'nın toplam üretimindeki azlığa bağlı, genelde orta şiddette, bir β⁺ talasemi fenotipi ile ilişkilidirler. Eksonlar içerisindeki diğer bazı splice mutasyonlar da tanımlanmışlardır. (5, 43)

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

birinin transkript edilmesi dolayısıyla şiddetli β^+ talasemi fenotipi ile sonuçlanacaktır. (5, 34, 43)

Tablo 2. RNA Processing İle İlişkili Mutasyonlar: (40, 41)

(Tablo 2.) i-Splice Junction Mutasyonları:

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİSİTE
IVSI-1 (G→A)	β^0	Akdeniz
IVSI-1 (G→T)	β^0	Hintli, Çinli
IVSII-1 (G→A)	β^0	Akdeniz,Tunus,Amerikalı Siyahi
IVSI-2 (T→G)	β^0	Amerikalı Siyahı
IVSI-2 (T→C)	β^0	Kürt
IVSI-2 (T→A)	β^0	Akdeniz
IVSI (17 nt del 3' uç)	β^0	Alman, İtalyan
IVSI (25 nt del 3' uç)	β^0	Hintli
IVSI-130 (G→C)	β^0	Lübnanlı
IVSI-130 (G→A)	β^0	İtalyan
IVSII-849 (A→G)	β^0	Tayvanlı
IVSII-849 (A→C)	β^0	Japon
IVSII-850 (G→C)	β^0	İtalyan
IVSII-850 (- G)	β^0	Türk, Bulgar
IVSII-850 (G→A)	β^0	Çinli

(Tablo 2.) ii- Konsensus Dizi Değişikliklerine Neden Olan Mutasyonlar:

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİSİTE
IVSI-5 (G→C)	β^+	Hintli, Çinli, Malezyalı
IVSI-5 (G→T)	β^+	Akdeniz, Amerikalı siyahi
IVSI-5 (G→A)	β^+	Cezayir, Akdeniz
IVSI-6 (T→C)	β^+	Akdeniz
IVSI, -1 (Cd30) (G→C)	β^+	Tunuslu, Amerikalı siyahi
IVSI, -1 (Cd30) (G→A)	?	Bulgar
IVSI, -3 (Cd29) (C→T)	?	Lübnanlı
IVSI-128 (T→G)	β^+	Suudi Arabistan
IVSII-837 (T→G)	?	Hintli
IVSII-843 (T→G)	β^+	Cezayirli
IVSII-844 (C→G)	β^+	İtalyan
IVSII-848 (C→A)	β^+	Amerikalı siyahi, Mısır, İran
IVSII-848 (C→G)	β^+	Japon

(Tablo 2.) iii- İntronlarda Değişikliklere Neden Olan Mutasyonlar:

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİSİTE
IVSI- 110 (G→A)	β^+	Akdeniz
IVSI- 116 (T→G)	β^0	Akdeniz
IVSII- 4,5 (-AG)	β^+	Portekiz
IVSII- 654 (C→T)	β^+	Çinli
IVSII- 705 (T→C)	β^+	Akdeniz
IVSII- 745 (C→G)	β^+	Akdeniz

(Tablo 2.) iv-Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar:

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİSİTE
Cd 19 (A→T) Asn→Ser	β^+	Malay-Hb _{Malay}
Cd 24 (T→A)	β^+	Amerikalı siyahi, Japon
Cd 26 (G→A) Glu→Lys	β^+	Uzakdoğu Asya-HbE
Cd 27 (G→T) Ala→Ser	β^+	Akdeniz-Hb _{Knossos}

2.4.5. mRNA'nın Anormal Translasyonuna Neden Olan Mutasyonlar

β -talasemi allelerinin yaklaşık yarısı RNA translasyonun değişik evrelerini etkiler ve bütün bu olgularda, β globinin üretilmediği β^0 talasemi ile sonuçlanırlar. Bu defektlerin çoğu, **frameshift** veya **nonsense** mutasyonlara bağlı premature terminasyon kodonlarının meydana gelmesinden dolayı olup; hemen hepsi exon1 ve 2 içerisinde sonlanırlar. (45)

2.4.5.1. Anlamsız (Nonsense) Mutasyonlar

Bir aminoasit kodonunu, sonlandırma kodonuna (Stop codon: UAA, UAG veya UGA) çeviren tek baz yer değiştirmeleri, yani ''nonsense'' mutasyonlar, mRNA'nın translasyonunu durdurur ve β^0 -talasemi ile sonuçlanırlar. Bu şekilde etkide bulunan birçok baz yerdeğiştirmesi tipi saptanmıştır. Örneğin; kodon 17 mutasyonu Güneydoğu Asya'da, kodon 39 C→T (CAG→TAG) mutasyonu ise Akdeniz bölgesinde yüksek bir sıklıkta görülen bu tip mutasyonlardırlar. β -globin zincir sentezinin bu tür mutasyonlarda olduğu gibi premature bir şekilde durdurulması, β^0 -talasemilerin en sık nedenleri arasında yer alır. (25, 46, 47)

2.4.5.2. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonlar

Beta-globin geninin kodlayıcı bölgelerinde meydana gelen bir, iki, veya dört insersiyon veya delesyon sonucu upstream (3'→5) veya downstream (5'→3') yönünde nükleotid kayması sonucu çerçevenin normal okunmasını bozarak, mRNA translasyonu açısından, yeni oluşmuş pencerede bir terminasyon (sonlandırma) kodonun okunmasına kadar anormal aminoasitlerin sentezine neden olurlar. Farklı aminoasit diziliimli ve normalden kısa olarak oluşan mRNA'lar normal globin zinciri oluşturamazlar ve β^0 -talasemi fenotipinde olgulara sebep olurlar. Bu şekilde çeşitli ''frameshift''(çerçeve kayması) mutasyonları

tanımlanmıştır. Hintlilerde yaygın olan 8. ve 9. kodonlar arasına bir nükleotidin girmesi sonucu meydana gelen frameshift mutasyon (Codon 8/9 (+G)) ile yine Hintliler ve Güneydoğu Asyallarda yaygın olan 41. ve 42. kodonlarda dört nükleotidin delesyona uğraması sonucu görülen (CDs 41/42 -TTCT) frameshift mutasyonlar bunlardan ikisidir. (40, 48)

Tablo 3. RNA Translasyon Mutasyonları: (40, 41)

(Tablo 3.) i- Anlamsız (Nonsense) Mutasyonlar:

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİK KÖKEN
Cd 15 (TGG→TAG)	β^0	Hintli
Cd 15 (TGG→TGA)	β^0	Portekiz
Cd 17 (A→T)	β^0	Çinli
Cd 22 (G→T)	β^0	Reunion Adaları
Cd 26 (G→T)	β^0	Tayland
Cd 35 (C→A)	β^0	Tayland
Cd 37 (G→A)	β^0	Suudi Arabistan
Cd 39 (C→A)	β^0	Akdeniz
Cd 43 (G→T)	β^0	Çinli
Cd 61 (A→T)	β^0	Siyahi
Cd 90 (G→T)	β^0	Japon
Cd 112 (T→A)	β^0	Slovak
Cd 121 (G→T)	β^0	Polonya, Fransa, İsveç, Japon, İngiliz
Cd 127 (C→T)	β^0	İngiliz

(Tablo 3.) ii- Frameshift (Çerçeve Kayması) Mutasyonları:

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİSİTE
Cd 1 (-G)	β^0	Akdeniz
Cd 5 (-CT)	β^0	Akdeniz
Cd 6 (-A)	β^0	Akdeniz, Amerikalı Siyahi

Cd 8	(-AA)	β^0	Akdeniz
Cd 8/9	(+G)	β^0	Hintli
Cd 9/10	(+C)	β^0	Türk
Cd 11	(-T)	β^0	Meksikalı
Cd 14/15	(+G)	β^0	Çinli
Cd 15	(-T)	β^0	Hintli
Cd 16	(-C)	β^0	Hintli
Cd 22	(-AAGTTGG)	β^0	Türk
Cd 24	(-G+ CAC)	β^0	Mısırlı
Cd 25/26	(+T)	β^0	Tunuslu
Cd 27/28	(+C)	β^0	Çinli
Cd 29	(-G)	β^0	Japon
Cd 35	(-C)	β^0	Malay
Cd 36/37	(-T)	β^0	İranlı, Kürt
Cd 37/38/39	(-GACCCAG)	β^0	Türk
Cd 38/39	(-C)	β^0	Çek
Cd 40	(-G)	β^0	Japon
Cd 41	(-C)	β^0	Taylandlı
Cd 41/42	(-TTCT)	β^0	Çinli
Cd 43	(+G)	β^0	Japon
Cd 44	(-C)	β^0	Kürt
Cd 47	(+A)	β^0	Surinamlı
Cd 47/48	(+ATCT)	β^0	Pencaplı
Cd 51	(-C)	β^0	Macar
Cd 54	(+G)	β^0	Japon
Cd 54	(-T)	β^0	Cezayirli
Cd 55	(+A)	β^0	Hintli
Cd 57/58	(+C)	β^0	Pencaplı
Cd 59	(-A)	β^0	İtalyan
Cd 64	(-G)	β^0	İsveç
Cd 67	(-TG)	β^0	Filipinli

Cd 71 (+T)	β^0	Çinli
Cd 71/72 (+A)	β^0	Çinli
Cd 74/75 (-C)	β^0	Türk
Cd 76 (-C)	β^0	İtalyan
Cd 82/83 (-G)	β^0	Azerbaycan, Çek
Cd 84/85 (+C)	β^0	Japon
Cd 85/86 (+T)	β^0	Japn
Cd 88 (+T)	β^0	Hintli
Cd 95 (+A)	β^0	Taylandlı
Cd 106/107 (+G)	β^0	Amerikalı siyahi

2.4.6. Diğer Mutasyonlar

Başlık bölgesindeki +1 nükleotid transkripsiyonun başlangıç bölgesidir. Bu pozisyonda A→C nükleotid yer değiştirmesi sonucunda ”capping” yavaşlaması ve mRNA kararlılığının bozulması sonucu transkripsiyon azalır. Homozigot olgularda bile heterozigot gibi bulgu veren bir fenotip söz konusudur. Heterozigot bireyler ise normal sayılabilecek MCV ve sınırda HbA₂ düzeylerine sahip sessiz taşıyıcılarıdır. (40, 48, 49)

Translasyonu yapılmayan 3’ UTR bölgesindeki +1565’den +1577’ye kadarki nükleotid dizilerini içeren bölgenin delesyonu β^+ fenotipinde talasemiye neden olur.

Başlangıç kodonu olan birinci eksonun ilk kodonu **ATG** dizisindeki nükleotidlerin mutasyonları sonucu transkripsiyonun başlatılamaması ise β^0 talasemi fenotipinde olguların ortaya çıkmasına neden olur. Bu kodondaki her bir nükleotidi etkileyen farklı mutasyonlar bulunmuştur. Bunların hepsi de şiddetli klinik gösteren mutasyonlarıdır. (25, 43, 48)

Tablo 4. RNA Ayrılması ve Poliadenilasyon Mutasyonları: (40, 41)

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİSİTE
AATAAA→AACAA	β^+	Amerikalı siyahi
AACAAA→AATAAG	β^+	Kürt
AATAAA→AATGAA	β^+	Akdeniz
AATAAA→AATAGA	β^+	Malezyalı
AATAAA→A (-AATAAA)	β^+	Arap
AATAAA→AAAA (-AT)	β^+	Fransız

Tablo 5. Cap Site (Başlık Bölgesi) Mutasyonları: (40, 41)

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİSİTE
+1 A→C	β^+	Hintli

Tablo 6. (3'-UTR) 3' Translasyonu Yapılmayan Bölge Mutasyonu: (40, 41)

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİSİTE
3' UTR bölgesinde (+1565'den +1577 bp'e kadar -GCATCTGGATTCT)	β^+	Türk

Tablo 7. Başlangıç Kodunu Mutasyonları: (40, 41)

MUTASYON TİPİ	FENOTİP	ETNİSİTE
ATG→ACG	β^0	Yugoslav
ATG→AGG	β^0	Çinli, Koreli
ATG→GTG	β^0	Japon
ATG→ATC	β^0	Japon
ATG→ATA	β^0	İtalyan

2.5. β -TALASEMİLERDE PATOFİZYOLOJİ

Talasemilerin patofizyolojik özelliklerinin hemen hepsinin kökeninde yatan olgu; globin zincirinin dengesiz üretimi ve bunun sonucunda ortaya çıkan anemidir.

Beta talasemilerdeki aneminin üç komponenti vardır. İlk ve en önemlisi; eritrosit öncül hücrelerin kemik iliğinde değişik oranlarda yıkılması ile birlikte **inefektif eritropoez**'dir. İkincisi, α -zincir inklüzyonlarını içeren olgun kırmızı hücre elemanlarının yıkımına bağlı oluşan **hemoliz**. Üçüncüsü ise; hemoglobın sentezindeki azalmaya bağlı **hipokromi ve mikrositoz**'dur. (5, 50)

Homozigot β -talasemili olgularda, β -globin sentezi, yoktur (β^0) veya farkedilebilir ölçüde azalmıştır (β^+). Bunun sonucunda fazladan α -globin zincirlerin üretimi söz konusudur. Alfa-globin zincirleri tek başlarına fonksiyon görebilecek hemoglobın tetramerleri oluşturma yeteneğinde olmadıklarından ve ayrıca çözünür olmadıklarından, kırmızı hücre prekürsörleri içerisinde çökerler. Meydana gelen inklüzyon cisimcikleri elektron mikroskobu veya ışık mikroskobunda gösterilebilir. Bu inklüzyonlar hücre membranını zedeler, esnekliğini azaltır ve eritrositlerin mononükleer fagositik sistem hücreleri tarafından fagositozuna yol açarlar. Böylece, olgun eritrositler erken parçalanmaya uğrarken; eritroblastlar da içlerindeki inklüzyonlar nedeniyle kemik iliği içindeyken parçalanırlar ve etkisiz eritrosit yapımına neden olurlar (inefektif eritropoezis). (5, 50, 51)

2.6. β -TALASEMİLERDE FENOTİPLER VE KLİNİK FORMLAR

β -talasemilerin klinik şiddeti zincir dengesizliğinin derecesi ile orantılı olup;bu bakımdan iki sınıfa ayrılabilir; hiç β -globinin üretilmediği **β^0 talasemiler** ve bir miktar β globinin üretilbildiği ama normalden az üretildiği **β^+ talasemi**.Daha az ciddi formlar bazen β^{++} olarak gösterilirler ve β zincir üretiminde minimal yetersizliği anlatırlar. (52, 53, 54)

2.6.1. Heterozigot β -Talasemi Fenotipi (β -talasemi taşıyıcılığı)

β -talasemi taşıyıcıları, sadece bir tek etkilenmiş globin lokusu olan ve hayat boyu sağlıklı kalan; ancak hastalığı kendi nesillerine aktarabilme riskini taşıyan bireylerdirler. Bunlar, o bozukluk için homozigot ve çift heterozigot olgulardan ayırt edilmelidirler. (55)

Talasemi formlarının ortak özellikleri, **heterozigotlarda**, Hemoglobın A₂ (HbA₂) düzeylerinin artmış olmasıdır. Ancak, bazı β -talasemili olgularda HbA₂ düzeyleri normaldir.

Bu olgular,iki kısımda incelenebilirler:**Tip-1**'de anormal hematolojik bulgular bulunmadığından bunlara **''sessiz'' heterozigotlar** denir.**Tip-2**'de ise hematolojik değişiklikler, yüksek HbA₂ değerleri bulunan β -talasemi taşıyıcılarından ayırt edilemeyecek durumdadır. Sessiz β -talasemiler hematolojik veriler normal olduğundan tarama yöntemleri ile saptanamazlar. Ancak hafif derecede bir globin zincir dengesizliği (α/β globin zincir oranı birden büyük) söz konusudur. Sessiz talasemi'ye neden olan mutasyonlardan biri olan (-101 C→T) mutasyonunun, transkripsiyonu negatif kontrol eden proteinlerden birini normale göre dokuz kat daha güçlü bağlayarak, β -globin gen ürününü azalttığı gösterilmiştir.(5, 41, 56, 57)

β -talasemi taşıyıcılarındaki hematolojik parametreler şu şekildedir: Eritrosit sayısı (RBC) artmış, MCV (ortalama eritrosit volümü) 60-75 fl kadar düşmüş.HbA₂ konsantrasyonu %3.5-%7 kadar artmış, HbF düzeyinde ise sınırlı bir artış (%1.5-%8) vardır. Periferik kan yaymalarında hipokrom mikrositer eritrositler saptanır. Bu bireylerin globinlerinin α/β sentez oranları 1.5-2.0 oranındadır. Bir β -talasemi ailesine sahip bu bireylerde yaşam süreleri normal olup; sağlıklı bireylerdirler. (25, 58, 59)

2.6.2. β -Talasemi Major

İki adet aynı çeşit mutasyona sahip mutant β -talasemi geni taşıyan **''homozigot''** veya birbirinden farklı iki adet mutasyona sahip mutant β -talasemi genini bir arada taşıyan **çifte heterozigot** (veya birleşik heterozigot) olgular olup; şiddetli talasemi kliniğine sahip bireylerdirler. Doğumu takip eden aylarda başlayan sarılık ve hepato-splenomegali mevcuttur. HbF ve HbA₂ düzeyleri altta yatan moleküler patolojiye göre oldukça değişkenlik gösterir. HbF artmıştır (%30-99), HbA₂ düzeyi %1-9 arasında değişir. HbF düzeyi çok yüksek olan olgularda eğer HbA yoksa β^0 düşünülür. β^0 -talasemide HbA₂ düzeyi çok yüksek olan olgularda β -gen promoter bölgesini de içine alan büyük gen delesyonları düşünülmelidir. (17, 60, 61)

2.6.3. β -Talasemi İntermedia

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

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

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

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

Periferik yayma özellikleri β-talasemi major'e benzer. Bir yaşından sonra talasemi tanısı konulan ve kan transfüzyonuna bir yaşından sonra başlanan olgularda talasemi intermedia olasılığı akla gelmelidir. Tanı genellikle 2-5 yaşları arasında konulur veya tanı yaşı 2. dekada kadar uzamış da olabilir. Hemoglobin değerleri daha yüksek olup orta düzeyde kemik değişiklikleri olur. Aneminin daha az şiddetli görülmesinin nedeni serbest α-zincirlerinin genetik faktörler tarafından azaltılması ve α/non-α globin zincir imbalansının daha az olmasıdır. Bu imbalansı düşüren faktörler; orta düzeyde β-talasemi alelleri, birlikte bulunan α-talasemi ve birlikte bulunan δβ veya HPFH sendromudur. (25, 41,61, 62, 63)

2.6.4. İnküzyon Cisimcikli Beta Talasemi

Aşırı dayanıksız globin zincirleri nedeniyle meydana gelen talasemilerdirler. Talasemi intermedia gibi fenotipik özellik gösterirler ve şiddetli heterozigot beta talasemi şeklinde dirler. Belirgin hemoliz ve eritrositlerde inküzyon cisimcikleri ile karakterize edilirler. Bu tip talasemilere neden olan mutasyonlar: İtalyanlarda Codon 94(+GT), Litvanyalılarda Codon 123 (-A), Japonlarda Codon 128/129 (GCTG) şeklinde görülür. Bunlar seyrek görülen β-talasemi alelleri olup malaryaya karşı seçici bir özellik göstermezler ve dağılımları da β-talaseminin nadir görüldüğü toplumlardadır (Kuzey Amerika, Japonya vs.). İnküzyon cisimcikli talasemilerin çoğu exon3 'deki mutasyonlarda gözlenirler. Normal globin zincirindeki H heliksinin yokluğu globinin dayanaksız olmasını sağlar. Proteolitik sindirim sonucu globin zinciri hücre içinde çabucak çökler ve çökelen alfa zincirleri de hücre zarına zarar verir. (41, 64)

2.7. TÜRKİYE'DE BETA TALASEMİ

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

birlikte, Türkiye’de β -talasemi majör olguları ağır basmaktadır. Halen Türk toplumunda 30’u aşkın mutasyon tanımlanmıştır; bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde güçleştirmektedir. (65, 66, 67)

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

IVS-I-6,

FSC-8,

IVS-I-1,

IVS-II-745,

IVS-II-1,

Cd39,

-30

FSC- 5 (Frameshift codon-5) mutasyonları takip etmektedir (**Tablo 8**). IVS-I-110’un Türkiye genelinde %40 olan sıklığı, Orta Anadolu’da %50’yi aşmakta, buna karşılık Doğu ve Güney Doğu Anadolu’da %25’lere düşmektedir. Türkiye’nin coğrafi bölgeleri, mutasyon sıklığı ve çeşitliliği açısından kıyaslandığında, ülke nüfusunun %50’sini barındıran Batı Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin, Türkiye genelindeki dağılımla uyumlu olduğu, ve Kuzey, Güney ve Doğu Anadolu bölgelerinin daha heterojen olduğu, ve kendilerine özgü mutasyonlar içerdiği görülmektedir (-30, -87, FSC8/9, IVS-II-745 gibi) . (4, 68)

Tablo 8. Türkiye’de en sık görülen β -talasemi mutasyon çeşitlerinin genel dağılımları ve sıklıklarına göre ilk on sırada yer alan mutasyonlar.

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

2.8. DİYARBAKIR BÖLGESİNDE BETA TALASEMİ

Diyarbakır bölgesinde daha önce moleküler düzeyde β -talasemi mutasyon tiplendirmesi üzerine, sadece, bir çalışma yapılmıştır. Bu çalışma daha önce β -talasemi major tanısı konmuş 36 örneğin mutasyon tiplerinin belirlenmesi adı altında yapılmıştır. (41)

Söz konusu çalışmada Çukurova bölgesinde yaygın olarak görülen 8 adet mutasyonun Diyarbakır bölgesindeki sıklıkları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 36 hastadan 10 hastanın araştırılan 8 mutasyondan hiçbirisini taşımadığı; diğer 26 hastanın ise Çukurova bölgesinde sık görülen 8 mutasyondan herhangi birini taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu araştırmanın sonuçlarına göre Diyarbakır bölgesinde tesbit edilen mutasyon tiplendirmesinin Türkiye'deki mutasyon tiplendirmesi ile karşılaştırmalı gösteren (Tablo 9) incelenebilir.(41)

Tablo 9. Daha önce yapılmış bir çalışmaya göre Diyarbakır'da ve Türkiye'de en sık görülen β -talasemi mutasyon çeşitlerinin sıklıklarının karşılaştırılması

MUTASYON	Tipi	Diyarbakır Bölgesindeki Sıklığı (%)	Türkiye'deki Genel Dağılımı (%)
IVS-I-110 (G→A)	β^+	27.8	39.3
IVS-I-6 (T→C)	β^+	11.1	10.1
Bilinmeyen Mutasyonlar		27.8	9.1
FSC-8 (-AA)	β^0	11.1	5.5
IVS-I-1 (G→A)	β^0	2.8	5.0
IVS-II-745 (C→G)	β^+	5.5	5.0
IVS-II-1 (G→A)	β^0	8.3	4.7
Cd 39 (C→T)	β^0	2.8	3.8
- 30 (T→A)	β^+	2.8	3.1
FSC-5 (-CT)	β^0	Bakılmamış	2.2

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

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

Bunun için her çocuktan iki adet EDTA'lı tam kan tüplerine; her birine 2 cc olacak şekilde kan örnekleri alındı. Bu kanlar soğuk zincir kuralına uyularak Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi (DÜTF) Biyokimya Anabilimdalı Laboratuvarına ulaştırıldı. Örneklerin kayıtları ve numaralanması işleminin ardından tam kan tüplerinden biri hematolojik parametrelerin çalışıldığı Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Acil laboratuvarına gönderildi. Diğer tam kan tüpü ise muhtemel mutasyon çalışılmak üzere (-80°C 'de) soğuk zincir kurallarına uygun bir şekilde saklandı. Örneklerin alındığı günün akşamı çalışılan tam kan örneklerine ait kanlardan MCV değerlerinin 79 fl'nin altında olanları seçilip HPLC'de HbA₂ çalışılmak üzere DÜTF Biyokimya ABD Moleküler Tanı laboratuvarına teslim edildi. Bütün örneklerin bu şekilde işlemde geçirilmesinden sonra derlenen veriler ışığında Talasemi taşıyıcısı olduğu muhtemel olan şahısların ($\text{MCV} < 79 \text{ fl}$ ve $\text{HbA}_2 \geq 3.5\%$) daha önce β -talasemi mutasyon analizi için (-80°C 'de) saklanmış örnekleri, soğuk zincir kuralları gözetilerek DÜTF Hematoloji Laboratuvarında DNA izolasyonları yapıldı ve örnekler (-20°C 'de) saklandı. İzolasyon işlemlerinden sonra aynı Hematoloji laboratuvarında DNA'ları izole edilmiş bütün örneklerin PCR yardımı ile DNA ürünleri çoğaltıldı ve ardından çoğaltılmış DNA ürünleri, '' β -globulin Strip Testi'' ile β -talasemi mutasyonları açısından incelendi. Çıkan sonuçlar daha önce oluşturulmuş Hematolojik parametrelerin ve HPLC sonuçlarının işlendiği hasta kayıtlarına eklendi.

3.2. KULLANILAN ALETLER:

1- Tam Kan Sayımı	Abbott Cell-Dyn 3700
2- Hb varyant analizörü	Bio-RAD Variant Hb testing system
3- Mikrosantrifüj	Beckman GS-15 R model
4- IsıtıcıBlok (İnkübatör)	Wealtec Corp. B-1 model
5- Vorteks (Karıştırıcı)	Jencons/Julabo Miximatic
6- Derin Dondurucu (-80 °C)	Heto Ultra Freze UF 4420
7- Derin Dondurucu (- 20 °C)	Arçelik 2031 D
8- Termal Döndürücü	Gene Amp PCR system 9700 Perkin Elmer Cetus
9- Su banyosu (Shaker water-bath)	İnnogenetics Auto LIPA 48
10- Otomatik Pipet	Mettler Toledo (10-100µl ve 100-1000 µl) Biohit Proline (0.5-10 µl)
11- Spektofotometre	Unicam 8625 UV/VIS

3.3. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER ve KİTLERİN BİLEŞİMİ:

1-Hemoglobin Varyant analiz kiti:

Buffer 1 (lot no): 102864

Buffer 2 (lot no): 102865

Wash Solution (lot no): 102844

Variant HbA_{1c} / HbA₂ Dual kit (lot no): 102840

2-β-globulin Strip Assay Kiti (β-globulin Mutasyon Analiz Kiti):

(Vienna Lab Labordiagnostika GmbH)

Lysis Solution	50 ml
GEN ^x TRACT Resin	5 ml
Amplification Mix	500 µl
Taq Dilution Buffer	500 µl
DNAT	1.5 ml
Typing Tray	3 adet
Teststrip	20 adet

Hybridization Buffer	25 ml
Wash Solution A	80 ml
Conjugate Solution	25 ml
Wash Solution B	80 ml
Color Developer	25 ml
Taq DNA Polymerase (5U/μl)	75 U

DNAT (1.6 NaOH içerir), Conjugate Solution (Streptavidin-Alkaline Fosfatase içerir), Wash Solution B (0.05% NaN₃ içerir). Color Developer (Nitroblue tetrazolium NBT ve 5-bromo-4-chloro-3-indoyl phosphate (BCIP) içerir.)

Kullanılan ''β-globulin strip Assay Lot numaraları''

- Lot :(04-DR.05.02)
- Lot :(01-SE.05.04)
- Lot :(01-EL.05.11)
- Lot :(01-TW.05.09)

3.4. TAM KAN SAYIMI YÖNTEMİ

Taramadan geçirilen 10038 çocuğun her birinden EDTA'lı tam kan tüplerine alınan 2 cc'lik kan örnekleri, DÜTF Acil Laboratuvarında bulunan Abbott firmasına ait CellDyne 3700 cihazında çalışıldı. MCV değerleri 79 fl ve altında olan örnekler HbA₂ ölçümü yapılmak üzere seçilip kaydedildi.

3.5. HbA₂ ÖLÇÜMÜ

Tam kan parametrelerinden MCV değerinin 79 ve altında olduğu örnekler ertesi gün DÜTF Moleküler Tanı laboratuvarında Bio-Rad firmasına ait ''Bio-RAD Variant Hb testing system'' ile HPLC yöntemi kullanılarak otomatize bir şekilde HbA₂ ölçümü yapıldı. HPLC sonucunda, HbA₂ değerleri (≥%3.5) olan örnekler seçilip kaydedildi.

3.6. β-GLOBULİN STRIP ASSAY

β-globulin gen mutasyonlarını belirlemek için Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve Reverse-Hybridization usulleri üzerine kurulu bir testtir.

Metodoloji: İşlem üç basamağı içerir.Bunlar:

1-DNA izolasyonu

2- β -globin geninin biyotin ile işaretlenmiş primerler kullanılarak **PCR ile amplifikasyonu**

3-Bir şerit üzerine paralel bantlar şeklinde dizili immobilize edilmiş normal ve mutasyona özgü oligonükleotid problemlerini içeren membranları taşıyan bir test strip'ine amplifikasyon ürünlerinin **hibridizasyonu**. (11)

Bağlı bulunan **biotinlenmiş** sekanslar, ''**streptavidin-alkalin fosfataz ve color substrat**'' kullanılarak tespit edilir.Sonuçta meydana gelen renk reaksiyonu ile görüntüleme yapılır. (**β -globin StripAssay™ Kullanım kitapçığı**.Instructions for Use.(2004): 1-6)

β -globin Strip testi β -globin geninde sıklıkla görülen ve Akdeniz ülkelerine özgü 22 mutasyonu kapsamaktadır. Bunların iki tanesi anormal hemoglobin (HbS ve HbC), 20 tanesi ise β -talasemi mutasyonudur (**Tablo 11 ve Şekil 7**). Membranın üst kısmında toplam 22 mutant dizi, alt kısmında ise 12 tane normal dizi vardır. Test şeridindeki mutasyonların bazıları birbirine çok yakın oldukları için, bunlara tek bir normal oligonükleotid probu kullanılmıştır; dolayısıyla 22 mutasyon sadece 12 normal prob ile tanımlanabilmektedir. (11)

Test, 22 β -globulin mutasyonunu kapsar.Bu mutasyonlar şunlardır:

-87(C>G), -30(T>A), Codon 5(-CT), hemoglobin C, hemoglobin S, Codon 6(-A), Codon 8 (-AA),Codon 8/9 (+G), Codon 22 (7bp del), Codon 30 (G>C), IVS 1.1 (G>A), IVS 1.2 (T>A), IVS 1.5 (G>C), IVS 1.6 (T>C), IVS 1.110 (G>A), IVS 1.116 (T>G), IVS 1-25 (25bp del), Codon 36/37 (-T), Codon 39 (C>T), Codon 44 (-C), IVS 2.1 (G>A), IVS 2.745 (C>G).

(**β -globin StripAssay™ Kullanım kitapçığı**. Instructions for Use.(2004): 1-6)

Test kapsamındaki globin mutasyonlarına bakıldığında bunlardan 2 tanesinin anormal hemoglobinlerden HbC ve HbS'yi tespiti yönelik oldukları geriye kalan 20 mutasyonun ise beta talasemi mutasyonları oldukları görülüyor.

3.6.1 Beta Globin Strip Assay ile Beta Talasemi Mutasyon Analizi

3.6.1.1. DNA İzolasyonu

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

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

- 100µl kan örneği 1.5 ml'lik kapaklı ependorff tüpüne bir pipet aracılığı ile aktarılır.
- 1 ml Lysis solüsyonu eklenir ve iyi bir karışım için vortekslenir.
- Ependorff'lar 15 dakika oda ısısında bekletilir.
- Mikrosantrifüj'de 3000 rpm devirde 5 dakika çevrilir.
- Bir pipet yardımıyla tüpün üst kısmındaki 1 ml'lik supernatan alınıp atılır.
- 1ml Lysis solüsyonu eklenir ve tekrar vortekslenir
- Mikrosantrifüj'de 12,000 rpm devirde 5 dakika çevrilir.
- Tüplerin alt kısmında birikmiş yaklaşık 50 µl'lik yumuşak çökeltiye dokunmadan üstteki sıvı (supernatan) bir pipet yardımıyla alınıp atılır.
- ''GEN^xTRACT Resin'' şişesi kuvvetli bir şekilde çalkalanıp içeriğinin karışması sağlanır
- 200 µl ''GEN^xTRACT Resin'' ependorff tüpünde kalmış çökeltinin üzerine bir pipet yardımıyla eklenir. Ependorff tüpünün kapağı kapatılır ve 10 saniye vortekslenir.
- 56 °C'de 20 dakika inkübe edilen örnekler sonra 10 saniye vortekslenir
- 98 °C'de 10 dakika inkübe edilen örnekler sonra 10 saniye vortekslenir.
- Örnekler 12,000 rpm devirde 5 dakika mikrosantrifüj'de çevrilir.
- PCR için kullanılacak olan DNA kalıpları (DNA template) santrifüj sonrasında ependorff tüpleri içerisindeki supernatan'da bulunur. Bu supernatan, bir pipet yardımıyla alınıp üzerlerine hastaların adı-soyadı ve örnek no'su yazılı başka ependorf tüplerinin içerisine aktarılıp PCR ile amplifikasyon yapılana kadar (-20 °C'de) saklanır.

(Bu işlemler yapılırken kullanılan pipet uçlarının ve ependorff tüplerinin steril olmasına dikkat edilmelidir. Bunun için hazır steril pipet uçlarının yanında kendi laboratuvarımızda sterilizasyonu yapılan ependorff tüpleri kullanıldı.)

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

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

3.6.1.2. In-vitro Amplifikasyon (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, dizisi bilinen iki bölge arasında uzanan DNA parçasını çoğaltmak için kullanılır. PCR, Lökositlerden veya değişik materyallerden elde edilen genomik DNA'nın istenilen bir bölgesinin, in vitro koşullarda, bu hedeflenen bölgeye özgü primer adı verilen özel baz dizileri kullanılarak milyon kez çoğaltılması yani "amplifikasyonu" işlemidir. DNA üzerinde belirlenen; en az 50-100, en fazla 2500 nükleotid uzunluğundaki bir bölge hedeflenen bölgedir. Amplifikasyonda, önce DNA 95 °C'ye kadar ısıtılarak çift iplikli DNA'nın ayrılarak; tek iplikli DNA haline geldiği **Denaturationon** (denatürasyon) işlemi sağlanır. İkinci aşamada ortamın ısısı 55-60 °C'ye düşürülerek özgün primerlerin komplementer dizilere yapışması sağlanır. Bu aşamaya da yapışma anlamına gelen **Annealing** denir. Son aşamada ise; ısı 72 °C'ye yükseltilerek DNA polimerazın yerini tutan Taq polimeraz enzimiyle ortamdaki dNTP'lerin (deoksiniükleotidtrifosfat) 5'→3' yönünde zincire eklenerek zincirin uzaması sağlanır. Bu son aşamaya da **Extension** adı verilir. Denatürasyon, Annealing ve Extension aşamalarından meydana gelen bir döngü her tekrar edildiğinde meydana gelen ürün sonraki döngüde kalıp görevi gördüğünden her bir başarılı döngü temel olarak istenilen DNA ürününün miktarını ikiye katlar. Taq DNA polimeraz ısıya dayanıklı olup 95 °C'lik uzamış inkübasyonda canlı kalarak amplifikasyonun her aşamasında ortama yeniden enzim ekleme gereksinimini ortadan kaldırmıştır. Yüksek etkinliğe rağmen hedef dizilerin amplifikasyonu sınırsız bir işlem değildir. Normal tepkime koşullarında Taq DNA polimerazın miktarı amplifikasyonun 25-30 döngüsünden yani yaklaşık 10^6 defalık bir amplifikasyon düzeyine eriştikten sonra giderek kısıtlanır. (69, 70, 71, 72, 73, 74)

Bu prensiplere dayanarak çoğaltılan DNA izolasyon ürünleri, aşağıdaki prosedürler uygulanarak Perkin Elmer Cetus firmasına ait Gene Amp PCR system 9700 termal döndürücüde (thermal cycler) amplifiye edildi:

- Taq DNA Polimeraz'ın Taq Dilution Buffer içerisinde (1:25, nihai konsantrasyon 0.2 U/μl olacak şekilde) çalışma dilusyonu hazırlanır.

- Amplifiye edilecek her örnek için bir reaksiyon tüpü hazırlanır. Tüpler örnek no'ları da üzerlerine yazıldıktan sonra buz üzerine konulur.
- Her örnek için bir PCR reaksiyon karışımı, buz üzerinde hazırlanır:
 - o 15 µl Amplifikasyon karışımı
 - o 5 µl dilue edilmiş Taq DNA Polimeraz (1U)
 - o 5 µl DNA kalıbı (DNA template)
- Tüplerin kapakları kapatılır ve termal döndürücü (thermocycler) 94 °C'ye kadar ısıtılır.
- Reaksiyon tüpleri termal döndürücüye yerleştirilir ve aşağıdaki termal döngü (thermocycling) programı uygulanır:
 - o Pre-PCR: 94 °C / 2 dakika
 - o Termal Döngü: 94 °C / 10 saniye- 54 °C / 15 saniye- 72 °C / 45 saniye
(Termal Döngü, 35 döngü olacak şekilde programlanmıştır)
 - o Nihai ekstansiyon (Final Extension): 72 °C / 3 dakika

PCR ile amplifiye edilen örnekler 2-8 °C 'de saklanır.

3.6.1.3. Hibridizasyon

PCR ürünleri "reverse hibridizasyon" tekniği ile analiz edilir. Bu test, bir nitroselüloz strip üzerine paralel diziler şeklinde immobilize edilmiş bir dizi oligonükleotid problara biotinile PCR ürünlerinin hibridize edilmesi esasına dayanır. (75, 76)

Test stipleri, Konjugat solüsyonu (conjugate solution), Wash solution B ve Color Developer oda ısısına gelene kadar bekletildikten sonra; her bir örnek için bir test stribi temiz eldivenle alınıp; otomatik su banyosunda (İnnogenetics firmasına ait Auto LIPA 48 cihazı) bulunan tepsideki havuzlara birer adet yerleştirildi. PCR ile çoğaltılan DNA ürünlerinden her örnek için 10 µL olacak şekilde bir pipetle alınıp tepsideki striplerin bulunduğu havuzlara bırakıldı. Gerekli kit bileşimleri Auto LIPA 48 cihazına uygulandıktan sonra gerekli inkubasyon ve yıkama işlemlerinin sırası ve süresi dahil otomatik olarak Auto LIPA 48 otomatik su banyosu tarafından gerçekleştirildi. İşlem sonunda elde edilen test stripleri yorumlanmak üzere kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra sonuç alınamadığı tesbit edilen örnekler daha sonra tekrar edilmek üzere belirlendi. Daha sonra sonuç alınan örneklerin yorumlanmasına geçildi

3.7. SONUÇLARIN YORUMLANMASI

Bir örneğin genotipi, β -globin strip assay kiti ile birlikte verilen "Collector for β -globin strip assay" adlı kağıt skala ile test striplerinin tek tek karşılaştırılması ile tesbit edilir. Test stripleri bu kağıt üzerinde gösterilen yerlerden birine, kırmızı işaret üste; yeşil işaret alta gelecek şekilde yerleştirilir (**Şekil 7**). Test stripinin en üst kısmında yer alan kontrol bandının pozitif reaksiyonu konjugat solusyonunun (conjugate solution) ve renk vericinin (color developer) uygun fonksiyonunu gösterir. Bu bant her zaman pozitif olmalıdır.

Beta globin strip assay Sonuçlarının Yorumlanması

En üstte bulunan " Control" (kontrol) bandının pozitif reaksiyonu; Conjugate Solution'un (konjugat solusyon) ve Color Developer'in (renk verici) düzgün işlevini gösterir. Bu bant her zaman pozitif boyanmalıdır.

Her bir örnek aşağıda (**Tablo 10**) görülen boyanma özelliklerinden birini göstermelidir.

Tablo 10. Beta-blobin strip assay sonuçlarının yorumlanması:

	Wilde Type Bandı	Mutant Bant	Genotip
NORMAL	Pozitif	Negatif	Normal
HETEROZİGOT	Pozitif	Pozitif	Heterozigot
HOMOZİGOT	Negatif	Pozitif	Homozigot

Beta-globin strip assay ile gösterilen mutasyonların bazıları, beta-globin geni üzerinde birkaç nükleotid içerisinde yerleşmişlerdir. Bunlar, test şeritleri üzerinde ortak bir "wilde type" prob ile gösterilirler. Böylece, 22 mutasyon sadece 12 adet "wilde type" prob ile karşılanır (**Tablo 11**).

Tablo 11. Wilde Type Prob ile gösterilen mutasyonlar

Bant	Wilde Type Prob	Mutasyon
23	-87	-87
24	-30	-30
25	Kodon 5 - 9 arası	Kodon 5, HbC, HbS, Kodon 6, Kodon 8, Kodon 8/9
26	Kodon 22	Kodon 22
27	Kodon 30- IVS 1.6 arası	Kodon 30, IVS 1.1, IVS 1.2, IVS 1.5, IVS 1.6
28	IVS 1.110 ve IVS 1-25	IVS 1.110, IVS 1-25
29	IVS 1.116 ve IVS 1-25	IVS 1.116, IVS 1-25
30	Kodon 36/37	Kodon 36/37
31	Kodon 39	Kodon 39
32	Kodon 44	Kodon 44
33	IVS 2.1	IVS 2.1
34	IVS 2.745	IVS 2.745

(β -globin StripAssayTM Kullanım kitapçığı. Instructions for Use.(2004): 1-6)

Örneğin: Bu mutasyonlardan iki tanesi için birleşik heterozigot olan örnekler (örneğin: HbC + HbS) ortak ''wilde type'' bandının (25. sıradaki bant) yokluğu ile gösterileceklerdir.

IVS 1-25 için homozigot mutant olan örneklerde ise; IVS 1.110 ve IVS 1.116 (28. ve 29. sıradaki bantlar) için ''wilde type'' bandının olmaması ile gösterileceklerdir

β -globin strip testinde bazı mutasyonlar, β -globin geni üzerindeki birkaç nükleotid içerisinde yerleşmişlerdir. Bu mutasyonlar, test çubuğu üzerinde, ortak bir ''wilde type'' bant ile temsil edilirler.Böylece 22 mutasyon 12 ''wilde type'' bant ile karşılanır.

Şekil (8)'de bu yöntem kullanılarak yapılmış üç DNA tanısı görülmektedir. β -globin genotipini tanımlamak için, **Şekil (7)**'de görülen referans membranı kullanılmakta; test membranında elde edilen bantlar, referans ile kıyaslanmaktadır.

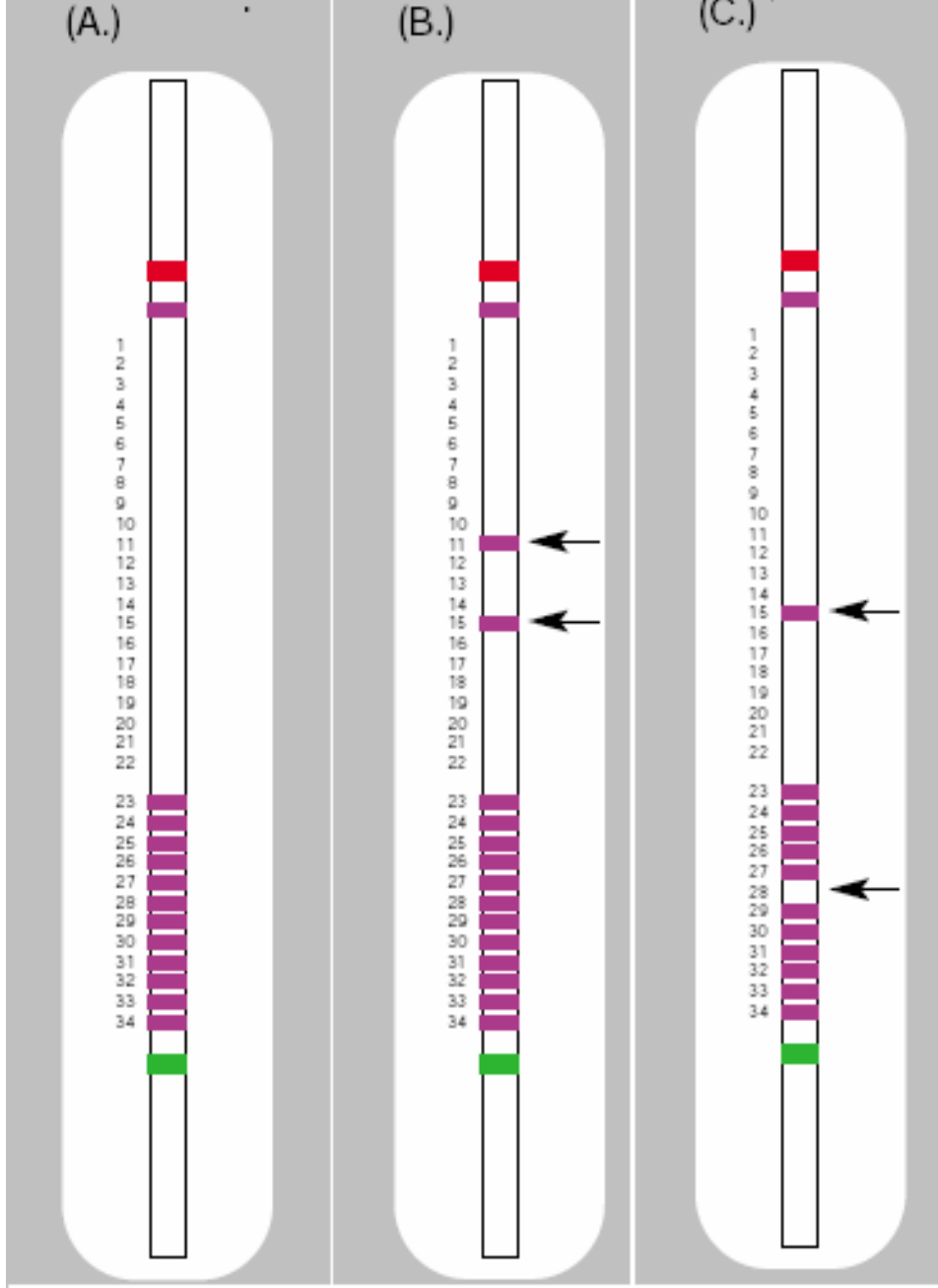
Şekil 8-(A.)'da: Test membranındaki mutasyonların hiçbirini taşımayan bir birey örnek olarak gösterilmiştir. Bu birey ''normal'' olabileceği gibi; nadir veya yeni bir mutasyon da taşıyor olabilir.

Şekil 8-(B.)'de IVS 1.1 ve IVS 1.110 için çift heterozigot olan bir bireye ait örnek görülmekte. Yani Çift Heterozigot (compound heterozigot) bir durum söz konusudur.

Şekil 8-(C.)'de ise; IVS 1.110 mutasyonunu her iki kromozomunda taşıyan bir bireye ait örnek görülmektedir (IVS 1.110 homozigot).

Çalışmadaki bütün örnekler çalışılıp; test sonuçları referans membranlarla karşılaştırılıp genotipler yorumlandıktan sonra her örnek için elde edilen sonuçlar kaydedildi.

β -globin genotipini tanımlamak için, **Şekil (7)**'de görülen referans membranı kullanılmakta, test membranında elde edilen bantlar (**Şekil 8**) ise; referans ile kıyaslanmaktadır.



Şekil 8. β -globin strip testinde değişik durumları gösteren test çubuğu.
(<http://www.viennalab.com/pdf/4120.pdf>)

4. BULGULAR

Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı'nın, T.C. Sağlık Bakanlığı Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü ve Diyarbakır İl Sağlık Müdürlüğü ile yaptıkları işbirliği çerçevesinde Diyarbakır il merkezi ve 13 ilçesinde ilköğretim öğrencilerinde yapılan β -Talasemi taraması sonucunda: 10038 kişiden toplanan tam kan örnekleri ile yapılan analizler sonucunda MCV değerleri 79 fl altında olan örnekler belirlenip; bunlardan HPLC sonucunda HbA₂ değerleri % 3.5 veya bu değer üzerinde tesbit edilen 133 kişiye ait örneklerin PCR ile DNA'larının amplifikasyonundan sonra β -globin StripAssay kiti ile örneklerin DNA'larında Türkiye'de sık görülen 22 β -globulin mutasyonu araştırıldı. HbS ve HbC dışında, bu globin mutasyonlarından 20 tanesi β -talasemi mutasyonlarını içeriyordu.

Elde edilen sonuçlara göre mutasyon taşıyan örnekler ait veriler **Tablo (12)**'de gösterilmiştir. **Tablo (12)**'de araştırmamızda taradığımız kişilerin örnek numaraları, örneğin alındığı bölge (Diyarbakır il merkezi ve İlçeleri), Örneklerin MCV ve HbA₂ değerleri ve son sütunda da tespit edilen mutasyonun çeşidi görülmektedir.

Tablo 12. Araştırmamızda elde ettiğimiz toplu sonuçlar.

SIRA NO	HASTA NO	İLÇE	MCV	HbA ₂	MUTASYON
1	15	ÇINAR	63,8	4,3	Bilinmeyen
2	122	ÇINAR	59,2	5,1	Codon 44 (-C) Heterozigot
3	157	ÇINAR	61,1	4,1	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
4	1244	ÇERMİK	57,6	4,5	Codon 8/9 (+G) Heterozigot
5	1296	ÇERMİK	62,9	3,9	Bilinmeyen
6	1308	ÇERMİK	61,1	3,8	Bilinmeyen
7	1347	ÇERMİK	62	4,5	Bilinmeyen
8	1363	ÇERMİK	60,9	4,5	Bilinmeyen
9	1987	SİLVAN	60,8	4,9	Codon 8 (-AA) Heterozigot
10	2055	SİLVAN	56,3	4,9	Codon 44 (-C) Heterozigot
11	2062	SİLVAN	63,4	4,9	IVS 1.1 (G>A) Heterozigot
12	2064	SİLVAN	61,4	4,6	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
13	2136	SİLVAN	57,3	4,6	Codon 8 (-AA) Heterozigot
14	2196	SİLVAN	78,1	3,6	Bilinmeyen
15	2282	SİLVAN	66	4,2	Bilinmeyen
16	2315	SİLVAN	66,3	4,4	Bilinmeyen
17	2357	SİLVAN	63,1	4,2	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
18	2407	SİLVAN	61,5	4,3	IVS 1.6 (T>C) Heterozigot
19	2550	HAZRO	59,9	4	Codon 44 (-C) Heterozigot
20	2601	HAZRO	64,4	3,9	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
21	2808	HAZRO	63,3	4,5	Codon 44 (-C) Heterozigot
22	2841	HAZRO	64,6	4,4	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot

23	2856	HAZRO	68,9	4	IVS 1.6 (T>C) Heterozigot
24	2932	HAZRO	64,8	3,6	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
25	3024	DİCLE	65,9	4	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
26	3129	DİCLE	65,9	4,5	Bilinmeyen
27	3256	DİCLE	63,2	4,5	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
28	3393	BİSMİL	57,4	5,1	Bilinmeyen
29	3429	BİSMİL	60	6,1	Codon 5 (-CT) Heterozigot
30	3433	BİSMİL	62,3	5,3	Bilinmeyen
31	3454	BİSMİL	60	5	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
32	3492	BİSMİL	61,4	5,1	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
33	3746	BİSMİL	55,3	5,3	Codon 8 (-AA) Heterozigot
34	3790	BİSMİL	64,1	5,4	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
35	4012	KULP	62,2	5,1	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
36	4094	KULP	62,1	5,2	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
37	4337	KULP	64,7	5,5	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
38	4566	LİCE	76,2	4,1	Bilinmeyen
39	4682	LİCE	78,3	3,5	Bilinmeyen
40	4815	LİCE	64,9	3,5	Bilinmeyen
41	4959	KOCAKÖY	57,9	4,5	Codon 8 (-AA) Heterozigot
42	4984	KOCAKÖY	77,6	3,6	Bilinmeyen
43	4999	KOCAKÖY	58,5	4,7	Codon 5 (-CT) Heterozigot
44	5018	KOCAKÖY	61,5	3,7	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
45	5019	KOCAKÖY	59,8	4,5	Codon 5 (-CT) Heterozigot
46	5021	KOCAKÖY	59,1	4,2	Codon 5 (-CT) Heterozigot
47	5040	KOCAKÖY	67,2	4,8	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
48	5184	KOCAKÖY	61,6	4,3	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
49	5507	HANİ	78	3,6	Bilinmeyen
50	5639	BİSMİL	78,4	3,8	Bilinmeyen
51	5649	BİSMİL	64,7	5,2	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
52	5767	BİSMİL	76,5	3,7	Bilinmeyen
53	5788	BİSMİL	77,6	4,3	Hb-S
54	5896	ÇINAR	76,4	3,7	Bilinmeyen
55	5898	ÇINAR	60,2	4,9	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
56	5960	ÇINAR	77,8	6,4	IVS 1.2 (T>A) Heterozigot
57	5972	ÇINAR	56	6,2	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
58	5980	ÇINAR	74,7	3,6	Bilinmeyen
59	6023	ÇINAR	57,5	7,2	Codon 22 (7bp del) Heterozigot
60	6030	ÇINAR	58,4	6,8	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
61	6032	ÇINAR	61,7	6,8	Codon 22 (7bp del) Heterozigot
62	6038	ÇINAR	65,2	6,7	Codon 44 (-C) Heterozigot
63	6068	ÇINAR	66,1	7,5	Codon 44 (-C) Heterozigot
64	6076	ÇINAR	61,4	5,1	Bilinmeyen
65	6078	ÇINAR	58,1	7,3	Codon 22 (7bp del) Heterozigot
66	6094	ÇINAR	69,9	4,3	Bilinmeyen
67	6102	ÇINAR	62,8	5,7	Codon 44 (-C) Heterozigot
68	6129	ÇINAR	61,7	6,6	Codon 22 (7bp del) Heterozigot
69	6154	ÇINAR	78,2	3,5	Bilinmeyen
70	6159	ÇINAR	59	6,2	Codon 22 (7bp del) Heterozigot
71	6172	ÇINAR	62,2	5,5	Codon 8 (-AA) Heterozigot
72	6181	ÇINAR	60,8	6,5	Codon 22 (7bp del) Heterozigot

73	6188	ÇINAR	58,4	5,6	Codon 22 (7bp del) Heterozigot
74	6263	MERKEZ	61,8	5,5	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
75	6469	MERKEZ	59,8	5,7	Codon 44 (-C) Heterozigot
76	6499	MERKEZ	62,3	5,6	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
77	6793	MERKEZ	59,5	6,1	Bilinmeyen
78	6834	MERKEZ	56,9	6,2	Bilinmeyen
79	6836	MERKEZ	67,9	4,9	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
80	6934	MERKEZ	59,9	6	Codon 44 (-C) Heterozigot
81	6977	MERKEZ	64,2	5	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
82	7030	MERKEZ	61,2	4,8	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
83	7041	MERKEZ	64	5	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
84	7158	MERKEZ	65,2	5	Bilinmeyen
85	7192	MERKEZ	68,4	5,6	(-30) T>A Heterozigot
86	7207	MERKEZ	59,2	5,6	Codon 8 (-AA) Heterozigot
87	7238	MERKEZ	75,1	4	Hb-S
88	7319	MERKEZ	59,5	7	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
89	7339	MERKEZ	58,1	6,1	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
90	7516	MERKEZ	61	5,5	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
91	7546	MERKEZ	63,8	6,2	Codon 44 (-C) Heterozigot
92	7562	MERKEZ	62,4	5,3	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
93	7654	MERKEZ	62,2	5,9	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
94	7837	MERKEZ	67,1	5,4	Bilinmeyen
95	7845	MERKEZ	60,2	5,1	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
96	7956	MERKEZ	74	3,7	Bilinmeyen
97	8026	MERKEZ	77,8	5,7	IVS 1.6 (T>C) Heterozigot
98	8211	MERKEZ	59,5	5,4	Codon 8 (-AA) Heterozigot
99	8236	MERKEZ	58,6	4,9	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
100	8310	MERKEZ	70,4	3,8	IVS 1.6 (T>C) Heterozigot
101	8357	MERKEZ	66	5,4	Bilinmeyen
102	8582	MERKEZ	64,3	5,5	Codon 44 (-C) Heterozigot
103	8585	MERKEZ	69,6	3,9	IVS 1.6 (T>C) Heterozigot
104	8693	MERKEZ	61,6	4	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
105	8797	MERKEZ	60,7	4,2	IVS 2.745 (C>G) Heterozigot
106	8808	MERKEZ	60,4	4,5	Codon 44 (-C) Heterozigot
107	8843	MERKEZ	67,6	4,5	(-30) T>A Heterozigot
108	8996	MERKEZ	65,5	4,8	IVS 1.6 (T>C) Heterozigot
109	9038	MERKEZ	59,3	6,6	Bilinmeyen
110	9073	MERKEZ	65	5,9	Bilinmeyen
111	9076	MERKEZ	78,9	3,5	Bilinmeyen
112	9126	MERKEZ	61,9	5,7	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
113	9195	MERKEZ	60,6	5,1	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
114	9196	MERKEZ	60,2	6	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
115	9245	MERKEZ	58,5	5,4	Bilinmeyen
116	9276	MERKEZ	58	6,6	Codon 44 (-C) Heterozigot
117	9314	MERKEZ	60,5	5,1	Bilinmeyen
118	9321	MERKEZ	66,8	5,1	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
119	9386	MERKEZ	59,1	6,2	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
120	9421	MERKEZ	61,4	5,9	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
121	9481	MERKEZ	61,9	5,9	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
122	9525	MERKEZ	57,1	5,5	Codon 5 (-CT) Heterozigot

123	9574	MERKEZ	57,5	4,9	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
124	9588	MERKEZ	75,1	3,7	Bilinmeyen
125	9653	MERKEZ	61,5	6,2	Codon 39 (C>T) Heterozigot
126	9663	MERKEZ	60,2	6	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
127	9771	MERKEZ	60,4	5,6	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
128	9780	MERKEZ	61,4	5,8	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
129	9799	MERKEZ	61,4	5,1	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
130	9803	MERKEZ	61,3	6,4	IVS 2.1 G>A) Heterozigot
131	9838	MERKEZ	74,1	4,4	IVS 1.6 (T>C) Heterozigot
132	9858	MERKEZ	62,9	5	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot
133	9911	MERKEZ	65,2	5,6	IVS 1.110 (G>A) Heterozigot

Araştırmamızda elde ettiğimiz veriler ışığında Diyarbakır bölgesinde tespit ettiğimiz mutasyon tiplerini, aynı mutasyonu taşıyan kişilerin sayısı ve tespit ettiğimiz mutasyon tiplerinin Diyarbakır bölgesinde belirlediğimiz sıklıklarını içeren **Tablo (13)**, daha basit bir şekilde Diyarbakır'daki β -talasemi mutasyon dağılımını göstermektedir.

Tablo 13. Çalışmamızda elde edilen Mutasyon türleri ve Dağılımları

MUTASYON	Mutasyonu Taşıyan Kişi Sayısı	Diyarbakır Bölgesindeki Sıklığı (%)
IVS-I-110 (G→A)	36	27.1
Bilinmeyen Mutasyonlar	35	26.3
IVS-II-1 (G→A)	14	10.5
Codon 44 (-C)	13	9.7
IVS-I-6 (T→C)	7	5.2
Codon 8 (-AA)	7	5.2
Codon 22 (7bp del)	7	5.2
Codon 5 (-CT)	5	3.7
- 30 (T→A)	2	1.5
HbS	2	1.5
IVS-I-1 (G→A)	1	0.7
IVS-I-2 (T→A)	1	0.7
Codon 8/9 (+G)	1	0.7
Codon 39 (C→T)	1	0.7
IVS-II-745 (C→G)	1	0.7

Elde ettiğimiz sonuçlara göre. Mutasyonları araştırılan 133 örnekten ''β-globin StripAssay'' kiti ile araştırılan 22 çeşit β-globulin mutasyonundan herhangi birini göstermeyen örneklerin sayısı 35 olarak bulundu. ''Bilinmeyen Mutasyonlar'' adı altında kategorize edilen bu örnekler; β-talasemi açısından herhangi bir mutasyon taşımayıp normal olabilecekleri gibi, β-globin strip assay kitinin araştırdığı 20 β-talasemi mutasyonu dışında bilinen 200 kadar β-talasemi mutasyonundan herhangi birini veya şu ana kadar tesbit edilememiş yeni bir mutasyonu da taşıyor olabilirler. Bunu, DNA dizi analizi belirleyecektir ve örnekler daha ileriki bir süreçte DNA dizi analizi yapılmak üzere saklanmıştır.

Tablo (13) ve **(14)**'te görüldüğü gibi bilinmeyen mutasyonların yanı sıra 2 örnekte HbS (Orak hücre mutasyonu) saptandı. HbS'de HbA2 değerlerinin yükselmeyeceği düşünüldüğünde; HbA2 değerleri yüksek saptanan bu örnekler, HbS ile birlikte bilinmeyen bir β-talasemi mutasyonu da taşıyor olabilirler ve bu açıdan bakıldığında tesbit ettiğimiz bilinmeyen mutasyonların sayısı göreceli olarak 35 (%26.3) yerine; 37 (%27.8) kabul edilebilir. Bunu da yine DNA dizi analizi belirleyecektir.

Bulgularımıza göre; **IVS-I-110(G→A)**, %27.1'lik bir sıklıkta tesbit edilmiş olup; bilinmeyen mutasyonlar bir yana bırakılırsa Diyarbakır bölgesinde en sık rastlanan mutasyon çeşidi olarak bu çalışmada ilk sırayı alıyor. Ardından, ikinci ve üçüncü sıklıkta görülen mutasyonlar sırasıyla **IVS-II-1(G→A)** (%10.5) ve **Codon 44** (%9.7) tipi mutasyonlar olarak tesbit edildiler ve Diyarbakır bölgesindeki talasemi mutasyon tipleri içerisinde ikisi birlikte %20.2' lik bir pay ile yaklaşık olarak mutasyon tiplerinin beşte bir'lik bir kısmını teşkil ettiler. **IVS-I-6(T→C)**, **Codon 8(-AA)** ve **Codon 22(7bp del)** mutasyonları ise her biri %5.2'lik bir pay ile Diyarbakır bölgesindeki mutasyon çeşitlerinin toplam %15.6'lık bir kesimini oluşturdukları görüldü. **Codon 5(-CT)** mutasyonu %3.7'lik bir pay kaparken; **-30 (T>A)** mutasyonu 133 hastanın sadece 2'sinde görüldü ve tespit edilen toplam mutasyon tiplerinin % 1.5 kadarlık bir kesimini oluşturdu. Tesbit edilebilen diğer mutasyonlar ise her biri sadece birer örnekte ve %0.7'lik sıklıkta tesbit edilmiş olan **IVS-I-1(G→A)**, **IVS-I-2(T→A)**, **Codon 8/9(+G)**, **Codon39(C→T)**, ve **IVS-II-745(C→G)** mutasyonlarıdır.

Tablo (13)'ten de görülebileceği gibi araştırılan 20 çeşit β-talasemi mutasyonundan 13 çeşidi Diyarbakır bölgesinde tesbit edilebilmiştir. Bilinmeyen mutasyonlar ise 35 kişide (%26.3) tespit edilmiş ve HbS tespit edilen 2 kişide HbS'ye ek olarak muhtemel β-talasemi mutasyonu da bulunabileceği düşünüldüğünde bu oran 37 kişiye (%27.8) çıkabilecektir.

Tablo 14. Tespit ettiğimiz mutasyonların Tipleri, Mekanizmaları ve Fenotip ile ilişkileri.

MUTASYON TİPİ	MEKANİZMA	FENOTİP
IVS-I-110 (G→A)	İntronlarda Değişikliklere Neden Olur.	β^+
IVS-II-1 (G→A)	RNA Processing İle İlişkili Splice Junction Mutasyonu	β^o
Codon 44 (-C)	Frameshift Mutasyonu	β^o
IVS-I-6 (T→C)	RNA Processing İle İlişkili Konsensus Dizi Değişikliklerine Neden Olan Mutasyon	β^+
Codon 8 (-AA)	Frameshift Mutasyonu	β^o
Codon 22 (7bp del) (-AAGTTGG)	Frameshift Mutasyonu	β^o
Codon 5 (-CT)	Frameshift Mutasyonu	β^o
- 30 (T→A)	Transkripsiyonel Mutasyon	β^+
IVS-I-1 (G→A)	RNA Processing İle İlişkili SpliceJunction Mutasyonu	β^o
IVS-I-2 (T→A)	RNA Processing İle İlişkili SpliceJunction Mutasyonu	β^o
Codon 8/9 (+G)	Frameshift Mutasyonu	β^o
Codon 39 (C→T)	Anlamsız (Stop) Kodon oluşturan (nonsense) Mutasyon	β^o
IVS-II-745 (C→G)	İntronlarda Değişikliklere Neden Olur.	β^+

Tablo (14) verilerine göre: Diyarbakır bölgesinde tesbit ettiğimiz mutasyonlardan IVS-I-110 (G→A), IVS-I-6 (T→C), - 30 (T→A), IVS-II-745 (C→G) mutasyonları β^+ fenotiplerine sahiptirler. Bu mutasyonları taşıyan bireylerin sayısı 46 kişi olup %34.6'lık bir kesimi kapsamaktadırlar.

Diğer tesbit edilen mutasyonlar; IVS-II-1(G→A), Codon 44(-C), Codon 8(-AA), Codon 22 (7bp del)(-AAGTTGG), Codon 5 (-CT), IVS-I-1 (G→A), IVS-I-2 (T→A), Codon 8/9(+G) ve Codon 39 (C→T) mutasyonları ise β^o fenotipine sahip mutasyonlar olup çalışmamızda tespit ettiğimiz bu fenotipe sahip bireylerin sayısı ise 50 kişidir ve %37.5'lik bir kesimi kapsamaktadırlar. Böylece, 133 kişide bakılan 20 β -talasemi mutasyonundan tespit edilen 13 çeşit mutasyondan herhangi birine sahip olan bireylerin sayısının toplam 96 kişi (%72.1) olduğu tespit edildi. Geriye kalan bireyler, bilinmeyen mutasyonlara sahip olabilecekleri gibi β -talasemi taşıyıcılığı açısından tamamen normal bireyler de olabilirler. Beta talasemi mutasyonu taşıdığı tespit edilen 96 kişinin hepsinin

genotipik olarak Heterozigot oldukları saptandı. Yine HbS taşıyan 2 kişide de bu mutasyonlar Heterozigot olarak tespit edildi.

5. TARTIŞMA

Sağlık şartlarının düzeldiği, beslenme bozuklukları ve infeksiyonlara bağlı çocuk ölümlerinin azaldığı gelişmekte olan ülkelerde, talasemili yaşayan çocuk sayısı artmakta ve tedavi gereksinimleri fazlalaşmaktadır. Sonuçta, talasemi her geçen gün daha acil ve büyük bir sağlık sorunu haline gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün yayınlarına göre dünyada en az 70 milyon talasemi taşıyıcısı vardır ve her yıl en az 42 bin talasemi major çocuk dünyaya gelmektedir. Beta talasemi major tanısı almış hastaların tedavisinde karşılaşılan güçlükler ve hastalığın ciddi komplikasyonları bu genetik problemi tamamen eradike etmeye yönelik çalışmaların önemini arttırmıştır. (17)

Bir β -talasemi alleleline sahip olan erişkin (β -talasemi minor) bireyler morfolojik olarak anormal eritrositlere sahip olmalarına rağmen klinik olarak sağlıklıdırlar. İki tane hasarlı kromozoma sahip olan homozigot veya çift heterozigot talasemik bireylerde ise hemolitik bir anemi söz konusudur. Aneminin şiddeti ise taşınan mutasyonun tipinin yanı sıra; gama zincir sentezinin kompensasyon derecesi gibi faktörlere bağlıdır. Örneğin, β -talasemi geni taşıyan kromozomda $G\gamma$ promoterinin -158. pozisyonunda C→T mutasyonunun bulunması ile HbF üretiminin artması klinik şiddeti azaltan bir faktördür. Alfa globin genindeki delesyonlar alfa globin sentezini azaltacağından yine beta talasemi homozigotlarında alfa globin birikimini ve sonuçta beta talasemi kliniğini hafifletebilir bir etkidir. Artmış alfa globin ürününü varlığı ise beta talasemi taşıyıcısı olan bir bireyde klinik olarak asemptomatik durumu talasemi intermedia'ya çevirebilir. Zira, beta talasemide eritrosit öncüllerinde serbest alfa zincirlerinin tetramer oluşturamayıp inklüzyon cisimleri olarak birikmesi, eritrosit öncül hücrelerinde yıkıma neden olan temel etkidir. Gamma zincir sentezinin reaktif olması ise serbest alfa globin miktarını HbF oluşumuna kaydırarak serbest α -globinin zararlı etkilerini hafifletir. Bunlardan da anlaşılacağı gibi β -talasemi mutasyonları oldukça heterojen olduğu gibi klinik gidişi etkileyen faktörler de o denli çeşitlidir. Şiddetli anemi nedeni ile kan transfüzyonlarına bağımlı Talasemi Major fenotipine sahip bireyler sürekli transfüzyon programlarına alınmakta, vücutlarında biriken demir düzeyin azaltıcı ilaçlar kullanmakta, tedavinin bir parçası olarak dalak büyüklüğünün yarattığı komplikasyonları azaltmak için cerrahi olarak dalakları alınabilmekte, kemik iliği transplantasyonu veya sitotoksik ajanlarla (Hidroksiüre, Azatidin) gamma gen ekspresyonlarının artışı ve dolayısıyla HbF düzeylerinde artış sağlama gibi diğer birçok riskli ve pahalı tedavi seçeneklerine maruz kalmaktadırlar. (17, 25, 40, 77, 78)

Bir halk sağlığı problemi olan talasemide, prenatal tanı yöntemlerindeki gelişmeler ve taşıyıcıların taramalarla ortaya çıkarılışı koruyucu tedavi açısından çok etkili olmuş ve gelişmiş Avrupa Ülkeleri'ndeki talasemi sorunu büyük ölçüde çözülmüştür. (17)

Türkiye, talaseminin yüksek oranda görüldüğü Akdeniz Ülkeleri'nden biridir ve farklı bölgelerde dağılım bakımından heterojenite gösterir. Türkiye genelinde %2 olarak gösterilen bu oran bazı bölgelerde %10'lara kadar çıkar. Batı Trakya, Ege ve Akdeniz Bölgeleri yüksek riskli yerlerdir. Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye'de beklenenin üzerinde β -talasemili çocuk doğmasının nedenidir. Hastalık, hafif klinikli β -talasemi intermedia ile, transfüzyona bağımlı β -talasemi major arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmekle birlikte, Türkiye'de β -talasemi major olguları ağır basmaktadır. Türkiye'de 30'u aşkın mutasyon tanımlanmıştır. Bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde güçleştirmektedir. (17, 65, 67, 68, 79, 80)

Beta talasemi taşıyıcılarının belirlenmesi, hastalığa neden olan mutasyonların moleküler düzeyde saptanması, genetik danışmanlık ve bilinçlendirme çalışmalarının yapılması, riskli ailelere prenatal tanı uygulanması toplum sağlığı açısından çok büyük önem taşımaktadır. Bu şekilde hastalıktan etkilenmiş bireylerin doğumları önlenilecek; riskli ailelerin kendi tercihlerine göre taşıyıcı ya da normal çocuk sahibi olabilmeleri sağlanabilecek ve hasta çocukların tedavileri için harcanan giderlerden de ekonomik anlamda tasarruf sağlanabilecektir. (17, 25)

Bugüne kadar dünyadaki dağılımları farklı olan beta globin sentezini azaltan ya da ortadan kaldıran birkaç delesyon dışında çoğu nokta mutasyonu olan 200'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu geniş moleküler çeşitliliği biraz basite indirgeyen bir faktör, tüm 200 mutasyonun her toplumda görülmemesi ve mutasyonların etnik gruplara özgün olmasıdır. Genelde bir toplumda az sayıda mutasyon o toplumdaki β -talasemi genlerinin %90-95'ini tanımlamaktadır. (5, 17, 68, 81)

Görülen mutasyonların çeşitliliği küçük izole etnik gruplarda daha da azalmaktadır. Örneğin; Sardunya Adası'nda sadece iki tip β -talasemi mutasyonu hastalık genlerinin %99'unu oluşturmaktadır. (17, 25)

Akdeniz ülkeleri genelinde bakılacak olursa, yaklaşık 35 mutasyon Akdeniz Bölgesine özgü olarak nitelendirilmiş olmakla beraber, bu mutasyonların dağılımı ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Türkiye'deki β -talasemi mutasyonlarının çeşitliliği, diğer Akdeniz ülkelerine oranla daha karmaşıktır. (4, 82)

Biz bu çalışmamızda, Diyarbakır bölgesinde yaptığımız tarama ile β -talasemi taşıyıcılarında moleküler düzeyde β -talasemi mutasyonlarının tiplerini belirlemeyi ve bunların sıklıklarını saptamayı amaçladık. Türkiye’de sık görülen β -globin gen mutasyonlarından 22 mutasyonu çalışma olanağı veren β -globin StripAssay kiti ile Diyarbakır bölgesinde 13 değişik mutasyon çeşidine rastladık (**Tablo 13**). Bu mutasyonlardan IVS-I-110 (G→A) mutasyonu, bulgularımıza göre, Diyarbakır bölgesinde en sık karşılaşılan mutasyon olmuştur (% 27.1). Diyarbakır bölgesinde sıklık açısından birinci sırada tespit ettiğimiz bu mutasyon, aynı zamanda Türkiye’nin yanı sıra birçok Akdeniz ülkesinde de en sık görülen mutasyon tipidir. Bu mutasyonda, intron I’in 110. pozisyonunda G→A değişimi sonucu alternatif bir splice bölgesi meydana gelir. Doğu Akdeniz ülkelerinden Lübnan’da %62.0, Kuzey ve Güney Kıbrısta sırasıyla %74.1 ve %79.8, Lübnan’da %62, eski Yugoslavya’da %45.4, Arnavutluk’ta %43.2, Yunanistan’da %42.6 ve Türkiye’de (**Tablo 8**) %39,3 sıklığında görülür. Diyarbakır’ın da içerisinde yer aldığı Türkiye’nin Güneydoğu Anadolu Bölgesinde ise bu mutasyonun sıklığı daha önce %26.4 olarak bildirilmiştir (41). Bizim çalışmamızda bu verilerle uyumlu olacak bir sonuçla IVS-I-110 (G→A) sıklığı Diyarbakır bölgesinde %27.1 oranında ve yine en sık görülen mutasyon tipi olarak tespit edildi. Fenotipik olarak β^+ özellikte olan IVS-I-110 mutasyonu için , taramamız esnasında Diyarbakır bölgesinde tespit ettiğimiz bütün vakalar, taşıyıcı olup Heterozigot genotip taşımaktaydılar. (11, 25, 83)

Diyarbakır bölgesinde, bizim bu çalışmamızdan önce, 2000 yılında doktora tez çalışması olarak moleküler düzeyde β -talasemi mutasyon tiplendirmesi üzerine Dr. İnce ve ekibi tarafından benzer bir araştırma yapılmıştır (**İnce H: Diyarbakır Bölgesinde β -Talasemi Mutasyonlarının Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi: Doktora Tezi;Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi.Diyarbakır: 2000**). Bu çalışmanın sonuçlarına göre de Diyarbakır bölgesinde en sık görülen mutasyon çeşidi yine bizim ilk sıklıkta tespit ettiğimiz IVS-I-110 (G→A) mutasyonu olup; sıklık oranı %27.8 bulunmuştur. Bu oran, bizim bulduğumuz (**%27.1**) orana çok yakın bir değerdir. Ancak her iki oranın da gösterdiği üzere; Türkiye’de en sık saptanan bu mutasyon Diyarbakır’da (%27.1- %27.8), Türkiye ortalaması (%39.3) kadar sık değildir. Daha önce beta talasemi major tanısı konmuş 36 örneğin mutasyon tiplerinin belirlenmesine yönelik olarak İnce ve ekibi tarafından yapılan çalışmada; Çukurova bölgesinde yaygın olarak görülen 8 adet mutasyonun Diyarbakır bölgesindeki sıklıkları incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre 36 hastadan 10 hastanın (**%27.8**) araştırılan 8 mutasyondan hiçbirisini taşımadığı; diğer 26 hastanın ise Çukurova bölgesinde sık görülen 8 mutasyondan birini

taşıdığı tesbit edilmiştir. Bu tespit de yine bizim çalışmamızda tesbit edilen ''bilinmeyen mutasyonların'' sıklığı (%26.3) ile benzerlik gösteren bir bulgudur.

Tablo 15. Araştırmamızda elde ettiğimiz mutasyon sıklıklarının daha önce Diyarbakır'da elde edilen bulgularla ve Türkiye'deki genel dağılımla karşılaştırılması

Mutasyon Tipi	Bizim Bulgularımız (%)	Daha önce Diyarbakır bölgesinden elde Edilen Bulgular (ref.) (%)	Türkiye'deki Genel Dağılımı (%)
IVS-I-110 (G→A)	27.1	27.8	39.3
IVS-I-6 (T→C)	5.2	11.1	10.1
Bilinmeyen Mutasyonlar	26.3	27.8	9.1
Codon 8 (-AA)	5.2	11.1	5.5
IVS-I-1 (G→A)	0.7	2.8	5.0
IVS-II-745 (C→G)	0.7	5.5	5.0
IVS-II-1 (G→A)	10.5	8.3	4.7
Codon 39 (C→T)	0.7	2.8	3.8
- 30 (T→A)	1.5	2.8	3.1
Codon 5 (-CT)	3.7	Bakılmamış	2.2
Codon 44 (-C)	9.7	Bakılmamış	1.3
Codon 22 (7bpdel)	5.2	Bakılmamış	0.1
Codon 8/9 (+G)	0.7	Bakılmamış	1.3

Tablo (15)'ten de izlenebileceği gibi IVS-I-110 (G→A) mutasyonu gerek bizim çalışmamızda; gerekse daha önce Diyarbakır bölgesinde yapılan çalışmada en sık rastlanan mutasyon olarak görülüyor. Yine, bu mutasyonun Türkiye'de en sık rastlanan mutasyon tipi olduğu tabloda, yüzde(%), sıklığı ile veriliyor. **Tablo (15)**'de görülen diğer çarpıcı bir sonuç da; daha önce Diyarbakır'da yapılan ancak Çukurova bölgesindeki 8 adet mutasyonu araştıran mutasyon taramasında(41) bakılmayan; ancak bizim bakabildiğimiz 4 adet mutasyonun (codon 5, Codon 44, Codon 22 ve Codon 8/9) toplam görülme sıklıklarının %19.3 gibi önemli bir rakam olmasıdır. Bu detay bize, Türkiye'deki bölgeler arasındaki mutasyon çeşitliliğinin önemini telkin ediyor ve fakat yapılacak çalışmalarda mümkün olduğu kadar çok

mutasyonun taranmasının doğal olarak mutasyon sıklıklarını tespitite daha sağlıklı sonuçlara varabileceğimizi gösteriyor.

Tablo 16. Araştırmamızda Elde Ettiğimiz Sonuçların Türkiye genelinde elde edilen sonuçlarla karşılaştırılması

MUTASYON	Bu araştırmada Tespit Ettiğimiz Mutasyonların DİYARBAKIR Bölgesindeki Sıklığı (%)	GÜNEY-DOĞU ANADOLU Bölgesindeki Mutasyon Sıklığı (%)	TÜRKİYE’deki Genel Sıklığı (%)
IVS-I-110 (G→A)	27.1	26.4	39.3
Bilinmeyen Mutasyonlar	26.3	8.5	9.1
IVS-II-1 (G→A)	10.5	2.6	4.7
Codon 44 (-C)	9.7	2.6	1.3
IVS-I-6 (T→C)	5.2	8.5	10.1
Codon 8 (-AA)	5.2	4.3	5.5
Codon 22 (7bp del)	5.2	0.9	0.1
Codon 5 (-CT)	3.7	3.4	2.2
- 30 (T→A)	1.5	6.7	3.1
HbS	1.5	23.8	4.9
IVS-I-1 (G→A)	0.7	0.9	5.0
IVS-I-2 (T→A)	0.7	Bakılmamış	Bakılmamış
Codon 8/9 (+G)	0.7	-	1.3
Codon 39 (C→T)	0.7	0.9	3.8
IVS-II-745 (C→G)	0.7	6.0	5.0

Tablo (16)’da bu araştırmada elde ettiğimiz sonuçlar, Diyarbakır ilinin de içerisinde bulunduğu Güneydoğu Anadolu Bölgesi’ndeki mutasyon sıklıkları ve Türkiye’deki mutasyon sıklıkları ile karşılaştırılmıştır. Bizim çalışmamızda, tanımlanmış 22 adet β -globin gen mutasyonu araştırılmışken **Tablo (16)**’da sonuçlarımızı karşılaştırdığımız Başak ve

arkadaşlarının verilerini 31 adet β -globin mutasyonunu araştırarak derledikleri anlaşılıyor. Başak ve arkadaşlarının bu araştırmasına göre (11): Türkiye’de **IVS-I-110** mutasyonunu sıklık sırasına göre **IVS-I-6, FSC-8, IVS-I-1, IVS-II-745, IVS-II-1, Codon39, -30 (T→A), FSC- 5** mutasyonları takip etmektedir. (**Tablo 8 ve Tablo 16**)

Tablo (15) ve **Tablo (16)**’daki veriler incelendiğinde ise Türkiye’de görülen en sık mutasyonun IVS-I-110 olması dışında bilinmeyen mutasyonların sıklıklarının fazla miktarda oldukları görülmektedir. Huisman’ın 14 farklı mutasyon tipi kullanarak yaptığı çalışmada, Türkiye’deki mutasyonu saptanamayan örneklerin oranının yüksek olduğu (%8.3) bildirilmiştir. Yine Başak ve arkadaşlarının 17 farklı mutasyonla yaptıkları tarama çalışmasında örneklerden %14.2’sinin, 31 farklı mutasyonla yaptıkları çalışmada ise örneklerden % 9.1’inin mutasyonlarını belirleyememişlerdir. Bu verilerle birlikte bizim 20 mutasyon ile yaptığımız bu çalışmada belirleyemediğimiz %26.3’lük oran (HbS tesbit ettiğimiz 2 vakada da mutasyon olabileceğini düşünürsek bu oranı %27.8 olarak da düşünmek mümkün) Türkiye’de β -talasemi mutasyonlarının heterojen bir dağılım gösterdiğini teyid ediyor. Dahası, Türkiye’de sık görülen 20 β -talasemi mutasyonunu içeren β -globin strip assay metodunu kullandığımız göz önüne alındığında, tespit edilemeyen mutasyon sayısının kabarık olması Diyarbakır’da çok daha heterojen bir mutasyon dağılımı ile karşılaşabileceğimizi düşündürüyor.

Bu heterojen dağılım nedeniyle, tarama çalışmalarında daha sağlıklı sonuçlara ulaşmak için; öncelikle taramanın yapılacağı bölgelerde sık görülen tanımlanmış mutasyonların araştırılması gerekir. Bu maliyet hesapları bağlamında avantajlı bir durum yaratacaktır. Ancak bununla yetinmeyip, özellikle, bir bölgede mutasyon çeşitliliğinin fazla olduğu düşünülüyorsa; mutasyon tipleri belirlenemeyen ancak talasemi taşıyıcısı olması muhtemel örneklerde, mutasyonu açığa çıkarmak için bir adım daha ileriye gidilmelidir. Bu örnekler, tarama çalışmasında kullanılmamış ancak daha önce tanımlanmış mutasyonları taşıyor olabilirler, veya hiç tanımlanmamış yeni mutasyonlara da sahip olabilirler. Mutasyonu belirlenemeyen bu tip örneklere DNA dizi analizi yöntemini uygulayarak; muhtemel bir mutasyonu açığa çıkarmak mümkündür.

ÖZET

DİYARBAKIR BÖLGESİNDE BETA-TALASEMİ MUTASYON TİPLERİNİN MOLEKÜLER DÜZEYDE İNCELENMESİ

Beta talasemi, beta-globin üretiminin yetersiz olması ile karakterize kalıtsal bir hastalıktır. Bu genetik bozukluk, aynı zamanda, Dünya’da en sık görülen genetik bozukluktur. Türkiye, talasemi kuşağı üzerinde yer alır. Talasemi’nin günümüzde kesin tedavisi bilinmediğinden, prenatal teşhis, hastalığın önlenmesinde temel hedeftir. Diyarbakır bölgesinde beta-talasemi mutasyon tiplerinin sıklığını tespit etmenin prenatal teşhis açısından yararı açıktır. Bu amaçla, Diyarbakır bölgesinde yapılan talasemi taşıyıcılığı taraması esnasında toplanan 10038 örnekte mutasyon sıklığı araştırıldı. Toplanan örneklerin rutin hematolojik analizleri ve HPLC ile HbA₂ düzeyleri tespit edildikten sonra; Talasemi taşıyıcısı olabilecekleri tespit edilen 133 örnek, PCR ve Reverse Hibridizasyon yöntemleri ile mutasyon analizine tabi tutuldular. Elde edilen sonuçlara göre tespit edilen beta-globin mutasyon türleri ve sıklıkları: IVS-I-110 (G→A) %27.1, IVS-II-1 (G→A) %10.5, Codon 44 (-C) %9.7, IVS-I-6 (T→C) %5.2, Codon 8 (-AA) %5.2, Codon 22 (7bp del) %5.2, Codon 5 (-CT) %3.7, -30 (T→A) %1.5, IVS-I-1 (G→A) %0.7, IVS-I-2 (T→A) %0.7, Codon 8/9 (+G) %0.7, Codon 39 (C→T) %0.7, IVS-II-745 (C→G) %0.7 ve HbS %1.5 (HbS taşıyıcılarının aynı zamanda bilinmeyen bir talasemi mutasyonu da taşıyabilecekleri düşünüldü). Bu çalışmada 22 beta-globin mutasyonu araştırılmış olup; bilinmeyen mutasyon sıklığı %26.3 bulunmuştur. En sık mutasyon olarak tespit edilen IVS-I-110 (G→A) mutasyonu; aynı zamanda Türkiye’de en sık görülen mutasyon tipidir.

Anahtar Kelimeler: beta-Talasemi, PCR, Mutasyon

ABSTRACT

MOLECULAR ANALYZES OF BETA-THALASSEMIA MUTATIONS AT DIYARBAKIR PROVINCE

Beta thalassemia is characterized by defective beta-globin production. This genetic abnormality is one of the most common genetic abnormality worldwide and also, Turkey is in the thalassemic belt. There is no cure for beta-thalassemia at present. Therefore, prevention of this disease by prenatal diagnosis has been a major objective. For that purpose the frequency of the mutation types of beta-thalassemia has needed to be identified in Diyarbakir province. In this study, beta-thalassemia carriers, have been detected by screening survey in order to reveal the mutation types of these carriers. Blood samples of 10038 individuals were collected during screening survey. Hematological parameters analyzed by routine analysis and HbA₂ levels were detected by HPLC. Among 10038 samples, 133 samples were evaluated as beta-thalassemia carriers. After performing PCR and Reverse Hybridization methods on these carriers; the frequency of the mutations were detected as follows: IVS-I-110 (G→A) 27.1%, IVS-II-1 (G→A) 10.5%, Codon 44 (-C) 9.7%, IVS-I-6 (T→C) 5.2%, Codon 8 (-AA) 5.2%, Codon 22 (7bp del) 5.2%, Codon 5 (-CT) 3.7%, -30 (T→A) 1.5%, IVS-I-1 (G→A) 0.7%, IVS-I-2 (T→A) 0.7%, Codon 8/9 (+G) 0.7%, Codon 39 (C→T) 0.7%, IVS-II-745 (C→G) 0.7% and HbS 1.5% (HbS carriers were mentioned as to be probable carriers of unknown mutations of beta-thalassemia as well). The frequency of unknown mutations were found 26.3%. The most common mutation in Diyarbakir was found IVS-I-110 (G→A) which is also the most common mutation in Turkey.

Keywords: beta-Thalassemia, PCR, Mutation

KAYNAKLAR

1. **Liliana CR, Héctor MT, Viviana V.** *The molecular basis of β - thalassemia in Argentina. Influence of the pattern of immigration from the Mediterranean Basin.* Hematologica (**2004**): 88; 746-747.
2. **Lukens JN.** *The thalassemia and the related disorders:quantitative disorders of hemoglobin synthesis*, In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F , Greer JP and Rodgers GM, (Eds). Wintrobe's Clinical Hematology. 10th Ed.: Baltimore (**1999**): 1405-1448.
3. **Tüzmen Ş, Schechter AN.** *Genetic diseases of hemoglobin:Diagnostic method for elucidating β -thalassemia mutations.* Blood Rev (**2001**): 15 (1); 19-29.
4. **Başak AN:** *Türkiye'de β -Talasemi'nin Moleküler Temeli. Tanıda Moleküler Tıp Senpozyumu.* Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD: Diyarbakır (**2003**): 33-35.
5. **Weatherall DJ.** *The Thalassemias*, In; Beutler E, Lichtman M, Coller BS, Kipps TJ, Seligsohn U, (Eds), Williams Hematology 6th Ed. McGraw-Hill Medical Publishing Division (**2001**): 5; 547-580.
6. **Thein SL.** *Thalassemia syndrome, Molecular Basis of Disease. Genetic Modifiers of β -Thalassemia.* Haematologica (**2005**): 90; 649-660.
7. **Kazazian HHJr, Boehm CD.** *Molecular Basis and Prenatal Diagnosis of β -Thalassemia.* Blood (**1988**): 72; 1107-1113.
8. **Altay Ç.** *The Frequency and DistributionPattern of β -Thalassemia Mutations in Turkey.* Turk J Haematol (**2002**): 19(2); 309-315.
9. **Perea FJ, Magan MT, Cobia'n JG, Sa'nchez-Lo'pez JY, ML Cha'vez, Zamudio G,** (Eds). *Molecular spectrum of β -thalassemia in the Mexican population.* F.J. Perea et al./ Blood Cells, Molecules and Diseases. (**2004**): 33;150.
10. **Weatherall DJ, Clegg JB, Higgs DR., WG Wood.** *The hemoglobinopathies*, In: Scriver Charles R, Beaudet AL, Williams S, (Eds). The Metabolic&Molecular Bases of Inherited Disease, 8th Edition; McGraw-Hill companies.(**2001**): Vol-III ; 4571-4636.
11. **Başak AN.** *Talasemi Moleküler Genetiği.* Türk Hematoloji Derneği Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi Temel Moleküler Hematoloji Kursu. Mersin. (**2005**): 99-106.
12. **Higgs DR, Thein SL, Wood WG.** *Human Hemoglobin*, In: Gibbons R. Higgs DR. Old JM., Oliveri NF, Thein SL, Wood WG, (Eds.). The Thalassemia Syndromes 4th Ed. Blackwell Science Ltd. Oxford (**2001**): 65-120.

13. **Fairbanks VF, Klee GG.** *Biochemical Aspects of Hematology*, In: Burtis Burtis CA, Ashwood ER, (Eds.). Tietz Textbook of Clinical Chemistry 3rd Ed. WB Saunders Company (1999): 1642-1710.
14. **Gedikoğlu G.** *Yenidoğanda Hematopoetik Adaptasyon*, In: **Neyzi Olcay, Ertuğrul Türkan.** *Pediatrici*. Nobel Tıp Kitabevleri (1993): 2.Cilt, Bölüm16: 347-350.
15. **Clark BE, Thein SL.** *Molecular diagnosis of haemoglobin disorders*. Clin. Lab. Haem Blackwell Publishing Ltd. (2004): 26; 159–176.
16. **Telefoncu A.** *Hemoglobin: Yapısı ve Fonksiyonu*. Uluslararası Katılımlı Titus HJ. Huisman Memorial Symposium II & Anormal Hemoglobinler ve Talasemiler Kursu. Adana (2006): 1-15.
17. **Çavuşoğlu A,** *Beta Talasemi ve Genetik Heterojenitesi*. Uluslararası Katılımlı Titus HJ. Huisman Memorial Symposium II & Anormal Hemoglobinler ve Talasemiler Kursu. Adana (2006): 23-33.
18. **Akar N.** Klinik Patolojiye Giriş, 2.Baskı, Antıp A.Ş. Ankara (1999).
19. **Zubay G.** *RNA Synthesis and processing*, In: Biochemistry, Zubay G. (Eds), 3rd Edition. Wm C. Brown Publishers, Iowa USA (1993): 791-829.
20. **Wong C, Dowling CE, Saiki RK, Higuchi GR, Erlich HA, Kazazian HHJ.** *Characterization of β thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA*. Nature (1987): vol 330; 384-386.
21. **Gümrük F.** *Hemoglobin ve Hemoglobinopatiler*. İliçin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın HE, Süleymanlar G, (Eds.), *Temel İç hastalıkları*, 1.Baskı, Güneş Kitabevi Ltd. Ankara (1996): 1233-1243.
22. **Yüreğir GT.** Temel Biyokimya II, Kemal Matbaası. Adana (1983)
23. **Yüreğir GT.** *Hemoglobin Yapı ve Özellikleri*. Klinik Biyokimya I (1990): 132-143.
24. **Weatherall DJ.** The New Genetics and Clinical Practice. Oxford University Press, New York (1991)
25. **Topal K.** *Antakya, Kayseri ve İzmir Örneklerinde β -talasemi Mutasyon Tiplerinin Saptanması*. Uzmanlık Tezi; ÇÜ Tıp Fak Biyokimya ABD. Adana (1998).
26. **Clark BE, Thein SL.** *Molecular diagnosis of haemoglobin disorders*. Clin. Lab. Haem. Blackwell Publishing Ltd. (2004): 26; 159–176.
27. **Joy Ho P.** *The Regulation of β -Globin Gene Expression and β -Thalassemia*. Pathology. Carfax Publishing (1999): 31; 315-324.

28. **Maloni A, Rosatelli MC, Faa V, Sardu R, Saba L, Murru S, Sciratta GV et al.** *Promoter Mutations producing mild β -thalassemia in the Italian population.* Br J Haematol **1992**;80:222-226)
29. **Marini MG, Asunis I, Porcu L, Salgo MG, Loi MG, Bruchietti A, et al.** *The distal β -globin CACCC box is required for maximal stimulation of the β -globin gene by EKLF.* Br J Haematol **2004**: 127;114-7.
30. **Trudel M, Constantini F.** *A 3' enhancer contributes to the stage specific expression of the human β -globin gene.* Genes Dev. (1987): 1; 954-961.
31. **Tuan D, Solomon W, Li Q, London IM.** *The β -like Globin Gene Domain in Human Erytroid cells.* Proc Natl Acad Sci USA (1985): 82; 6384-6388)
32. **Stamatoyannopoulos G.** Hemoglobin switching, In: *The molecular Basis of Blood Diseases*. 2nd Ed. By Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Leder P, Majerus PW, Varmus H. Saunders. Philadelphia (1994): 107.
33. **Forget BG.** *Molecular Genetics of the Human Globin Genes*, In: SteinbergMH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*. Cambridge, UK, Cambridge University Press (2001): 117-30.)
34. **Lukens JN:** *The Thalassemia and related disorders: Quantitative disorders of hemoglobin synthesis*, In: Wintrobe's Clinical Hematology, (Eds.), Lee RG, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN. 9th Ed, Lea & Febiger Philadelphia, London (1993): 1; 1102-1145.
35. **Talmaci R, Traeger-Synodinos J, Kanavakis E, Coriu D, Colita D, Gavrila L.** *Scanning of β -globin gene for identification of β -thalassemia mutation in Romanian population.* J. Cell. Mol. Med. (2004): 8; 2: 232-240.
36. **Thein SL.** *β -Thalassemia*, In: **Balliere's Clinical Hematology. International Practice and Research.** Sickle Cell Disease and Thalassemia, Ed, GP Rodgers London (1998): 91.
37. **Cao A, Galanello R, Rosatelli MC.** *Genotype-Phenotype Correlations in β -Thalassemias.* Blood Rev (1994): 8; 1: 1-12)
38. **Athanassiadou A, Adamandia P, Zoumbos N, Maniatis GM, Gibbs R.** *A novel β -thalassemia mutation in the 5' untranslated region of the β -globin gene.* Br J Haem (1994): 88; 307-310)
39. **Orkin SH, Sexton JP, Cheng TC, Goff SC, Giardina PJV, Lee JI, Kazazian HH Jr.** *ATA box transcription mutation in β -thalassemia.* Nucleic Acid Researchs (1983): 11; 14: 4727-4734.

40. **Çürük MA**, *Beta Talasemi Sendromları ve Mutasyonları*. Uluslararası Katılımlı Titus HJ. Huisman Memorial Symposium II & Anormal Hemoglobinler ve Talasemiler Kursu. Hemoglobin Derneği, Adana (2006): 34-51.
41. **İnce H**. *Diyarbakır Bölgesinde β -Talasemi Mutasyonlarının Moleküler Yöntemlerle İncelenmesi*. Doktora Tezi; Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi. Diyarbakır (2000).
42. **Orkin SH, Sexton JP, Goff SC, Kazazin HH**; Inactivation of an acceptor splice site by a short deletion in β -thalassemia. *J Biol Chem* (1983): 258; 7249
43. **Kazazian HH Jr**. *The Thalassemia syndromes; Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990*. *Sem. Hematol* (1990): 27; 3:209-228.
44. **Basslinger M, Moschanas N, Flavell RA**. β^+ thalassemia: Aberrant splicing results from a single point mutation in an intron. *Cell* (1981): 27; 289.
45. **Maquat LE**. *When cells stop making sense: effects of nonsense codons on RNA metabolism in vertebrate cells*. *RNA* (1995): 1; 453-465.
46. **Orkin SH, Goff SC**. *Nonsense and Frameshift Mutations in β^0 -Thalassemia Detected in Cloned β -Globin Genes*. *The journal of biological chemistry* (1981): 256; 19; 9782-9784.
47. **Arpacı A**. *Antakya yöresinde β -talasemik gen sıklığı ve mutasyonlarının gen amplifikasyonu yöntemi ile saptanması*. Uzmanlık tezi; ÇÜ Tıp Fak. Biyokimya ABD. Adana (1991).
48. **Huisman THJ**. *The β^+ and δ Thalassemia Repository*. *Hemoglobin* (1992): 16; 237-259.
49. **Rosatelli MC, Pischedda A, Meloni A, Saba L, Pomo A, Travi M, et al**. *Homozygous β^- Thalassemia Resulting in The β^- Thalassemia Carrier State Phenotype*. *Br. J. Haem* (1994): 88; 562-565.
50. **Robbins SL, Kumar V**. *Hematopoetik ve Lenfoid Sistemler* In: *Basic Pathology*, 4th edition; WB. Saunders Company / Güneş Kitabevi: Ankara (1990): 12; 453-524.
51. **Nagel LR, Ranney HM**. *Genetic Epidemiology of structural mutations of the β -globin gene*. *Sem Hematol* (1990): 27; 4: 342-359.
52. **Flint J, Harding RM, Boyce AJ, Clegg JB**. *The population genetics of the haemoglobinopathies*, In: *Rodgers GP, ed. Baillière's Clinical Haematology*. London: Bailliere Tindall (1998): 1-52.
53. **Trecartin RF, Liebhaber SA, Chang JC, Lee KY, Kan YW**. β^0 Thalassemia in Sardinia Is Caused by a Nonsense Mutation. *J. Clin Invest* (1981): 68; 1012-1017.
54. **Kutlar A**. *The Thalassemia Repository*. *Hemoglobin* (1987): 11; 93-109.

55. **Davies S.C, Cronin E, Gill M, Greengross P, Hickman M, Norman C.** *Screening for sickle cell disease and thalassemia: a systemic review with supplementary research.* Health Technology Assessment (2000): vol.4; No.3.
56. **Bianco I, Cappablanca MP, Foblietta E, Lerone M, Deidda G, Morlupi L, et al.** *Silent Thalassemias: Genotype and Phenotypes: Haematologica* (1997); 82:269-280.
57. **Cappellini MD.** *Silent Thalassemias: Journal of Hematology* (1997): 82: 3: 257-258.
58. **Rund D, Filon D, Strauss N, Rachmilewitz EA, Oppenheim A.** *Mean Corpuscular Volume of Heterozygotes for β -Thalassemia Correlates with the Severity of Mutations.* Blood (1992): 79; 238-243.
59. **Pirastu M, Ristaldi MS, Loudianos G, Murru S, Sciarrata GV, Parodi MI, et al.** *Molecular Analysis of Atypical β -thalassemia heterozygotes.* Ann NY ACAD (1990): 2; 90-97.
60. **Öner C, Öner R, Gurgey A, Altay Ç.** *A New Turkish Type of beta-thalassemia major with homozygosity for two non-consecutive 7.6 kb deletions of the pseudo beta and beta genes and an intact delta gene.* Br. J Haematol (1995): 89; 306-312.
61. **Huisman THJ.** *Frequencies of Common β thalassemia alleles among different populations: Variability in Clinical Severity.* Br. J Haematol (1990): 75; 454-457.
62. **Altay Ç.** *Talasemide Klinik ve Hematolojik Bulgular.* Tanıda Moleküler Tıp Senpozyumu. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ABD. Diyarbakır (2003): 38-43.
63. **Camascella C, Cappellini Maria D:** *Thalassemia Intermedia. Haematologica* (1995): 85; 58-68.
64. **Thein SL, Winichagoon P, Hesketh C, Best S, Fucharoen S, Wasi P, Weatherall DJ:** *The molecular Basis of β - Thalassemia in Thailand Application to Prenatal Diagnosis.* Am J Hum Genet (1990): 47; 369-375.
65. **Altay Ç.** *Pattern of β -Thalassemia Mutations in Turkey.* Turk J Haematol (2002): 19 (2); 309-315.
66. **Altay Ç, Basak AN.** *Molecular basis and prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Turkey.* Int J Pediatr Hematol Oncol (1995): 2; 283-90.
67. **Öner R, Altay Ç, Gurgey A, Aksoy M, Kilinc Y, Stoming TA, et al.** *β -thalassemia in Turkey.* Hemoglobin (1990):14; 1-13.
68. **Ghazi O Tadmouri, Başak AN,** *β -thalassemia in Turkey; A review of the clinical epidemiological molecular and evolutionary aspects.* Hemoglobin (2001): 25/2; 227-239.

69. **Arakawa H, Uetanaka K, Maeda M, Tsuji A.** *Analysis of polimerase chain reaction product by capillary electrophoresis and its application to the detection of single base substitution in genes.* J Chromat A (1994): 664; 89-98.
70. **Arcasoy MO, Gallagher PG.** *Molecular diagnosis of hemoglobinopathies and other red blood cell disorders.* Semi Hematol (1999): 36 (4); 328-339.
71. **Murray RK, Myes PA, Grenner DK, Rodwell VW.** Harper's Biochemistry, Prentice Hall International Inc. 22nd edition. (1994): 42;432-439.
72. **White TJ, Arnheim N, Erlich HA..** *The Polymerase Chain Reaction.*Trends Gen, (1989): vol 5: 6; 185-189.
73. **Saiki RK, Chang CA, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian DJ, Erlich HA.** *Diagnosis of sickle cell and β -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele specific oligonucleotide probes.* N Eng J. Med. (1988): 319(9); 537-541.
74. **Kayrın L, Aksoy K, Tuli A, Çürük A, Attila G.** *Tanıda DNA Teknikleri.* Biyokimya Yaz Okulu.Çukurova Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilimdalı. Adana (2003): 15-26.
75. **Hacia JG.** *Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays.* Nat Genet (1999): 21; 42-47.
76. **Saiki RK, Walsh PS, Levenson CH, Erlich HA.** *Genetic analysis of amplified DNA with immobilized sequence-specific oligonucleotide probes.* Proc Natl Acad Sci USA (1989): 86; 6230-6234.
77. **Loukopoulos D.** *Thalassemia: Genotypes and phenotypes.* Ann Hematol (1991): 62;145-150.
78. **Nienhuis AW, Anagnou NP, Ley JT.** *Advances in Thalassemia Research.*Blood (1984), vol 63, No 4; 738-758.
79. **Ghazi O Tadmouri, Tüzmen Ş, Özçelik H, Özer A, Baig SM, Senga EB, Başak AN:** *Moleküler and Population Genetic Analyses of β -thalassemia in Turkey,* Am. J. Hemat. (1998): 57; 215-220.
80. **Arcasoy A.** *Türkiye'de talasemi taşıyıcı sıklığı ve anormal hemoglobinler.* Ankara Talasemi Derneği. (1994)
81. **Tüzmen Ş, G. O Tadmouri, Özer A, Baig SM, Özçelik H, Başaran S, Başak AN.** *Prenatal Diagnosis of β -thalassemia and Sickle Cell Anemia in Turkey.* Prenatal Diagnosis (1996): 252-258.
82. **T.H.J. Huisman, M.F.H. Carver, E. Baysal.** *A syllabus of Thalaassemia Mutations.* The Sickle Cell Anemia Foundation (1999).

83. **Başak AN, Özçelik H, Özer A, Tolun A, Aksoy M, Ağaoğlu L.** *Molecular Basis of β -thalassemia in Turkey.* Hum. Genet (**1992**): 315-318.