

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

BETA TALASEMİ MAJORLÜ HASTALARDA HBF
İNDÜKSİYONU İÇİN GENETİK VE EPİGENETİK
ÇALIŞMALAR

Yunus ARIKAN

DOKTORA TEZİ

2016-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK ANABİLİM DALI

**BETA TALASEMİ MAJÖRLÜ HASTALARDA HBF
İNDÜKSİYONU İÇİN GENETİK VE EPİGENETİK
ÇALIŞMALAR**

Yunus ARIKAN

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İBRAHİM KESER

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi
tarafından 2013.03.0122.015 proje numarası ile desteklenmiştir

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2016-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼ne;

Bu alışma j¼rimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında doktora tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı :

(¼nvanı, Adı Soyadı) (¼niversite)

¼ye :

(¼nvanı, Adı Soyadı) (¼niversite)

¼ye :

(¼nvanı, Adı Soyadı) (¼niversite)

¼ye :

(¼nvanı, Adı Soyadı) (¼niversite)

¼ye :

(¼nvanı, Adı Soyadı) (¼niversite)

Bu tez, Enstit¼ Y¼netim Kurulunca belirlenen yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun g¼r¼lm¼ř ve Enstit¼ Y¼netim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Enstit¼ M¼d¼r¼

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Yunus ARIKAN

İmza

Prof.Dr. İbrahim KESER

İmza

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimimde her türlü maddi ve manevi desteğini arkamda hissettiğim aileme, danışman hocam Prof.Dr. İbrahim KESER'e, Anabilim Dalı Başkanımız Prof.Dr. Sibel Berker KARAÜZÜM'e ve tüm jüri üyelerine, biyoinformatik ve insan genetiği konusunda akademik bakış açımı genişleten Radboud Üniversitesi bünyesindeki akıl hocam Prof.Dr. Hannie Kremer ve süpervizörlüğümü yapan öğrencisi Dr. Celia Seco Zazo'ya, istatistik çalışmalar için Arş.Gör. Başak Oğuz YOLCULAR'a, etik kurallar gereği tezimde adı geçmeyen talasemi hastalarına, Adem Tolunay Talasemi Kan Hastalıkları Merkezi ve AKHAV Çalışanları'na, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı çalışanlarına, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, Gen ve Hücre Tedavi Merkezi sorumlu öğretim üyesi Prof.Dr. Ahter Dilşat ŞANLIOĞLU ve RNA çalışmalarında yardımcı olmaya çalışan doktora öğrencisi Arş.Gör. Ufuk MERT'e, kritik dönemde laboratuvar malzemelerini kullanmada desteğini esirgemeyen Prof.Dr.Nuray ERİN ve asistanlarına, SBAUM müdürü Prof.Dr.O.Nidai ÖZEŞ'e teşekkürü borç bilirim.

ÖZET

Amaç: Tezimizin amacı, K562 hücre hattında ve Beta Talasemi Major hastalarının primer eritroid hücre kültürlerinde, HbF indüksiyon yollarında işe karışan *BCL11A* ve *KLF1* genlerindeki genetik varyasyonlar ile resveratrol ve sodyum butiratın epigenetik mekanizmaları modifiye etme özellikleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır.

Yöntem: K562 hücre hattı ve iyi sınıflandırılmış 30 BTM hastasının primer eritroid hücre kültürlerinde, resveratrol ve sodyum butiratın p38, ERK1/2 ve NRF-2 sinyal yolları ile globin genleri RNA profilleri üzerine olan etkisine bakıldı. HbF miktarını regüle eden faktörler arasında *KLF1* tüm gen, *BCL11A* rs11886868 varyantı ile *XmnI* polimorfizmleri Sanger Dizileme ve RFLP yöntemleri ile tespit edildi.

Bulgular: Resveratrol ve sodyum butiratın, K562 hücrelerinde doza bağımlı olarak hemoglobinizasyonu artırdıkları gözlemlendi. Her iki ajanın sinerjetik bir etkisi gözlemlenmedi. Yüksek dozda resveratrol kullanımının apoptotik etkisi gözlemlendi. Her iki ajanın da transkripsiyonel olarak gama globin indüksiyonu yapabildikleri gösterildi. K562 hücre hattında NRF-2, ERK1/2 ve p38 aktivasyonu gözlenirken hastaların primer eritroid hücrelerinde p38 aktivasyonu ve ERK1/2 inaktivasyonu gözlemlendi. *BCL11A* rs11886868, *XmnI* polimorfizmi ve *KLF1* genindeki varyasyonlar literatürle uyumlu bulundu.

Sonuç: Beta talasemi major hastalarında, HbF indüksiyonu için kullanılacak farmakolojik ajanların seçiminde, bireysel genetik ve epigenetik faktörler dikkate alınmalıdır.

Anahtar Kelimeler: HbF indüksiyonu, talasemi, farmakogenetik, epigenetik.

ABSTRACT

Objective: Our aim is to reveal relationship between genetic variations of *KLF1* and *BCL11A* genes which are implied on HbF induction pathways, and modifying properties of epigenetic mechanisms of resveratrol and sodium butyrate on both K562 cells and primary erythroid cells in patients with beta thalassemia major.

Method: RNA profiles of globin genes, p38, ERK1/2 and NRF2 signalling pathways were evaluated in both K562 cells and primary erythroid cells in 30 well-characterized BTM patients in which were induced with resveratrol and/or sodium butyrate. Among the factors which regulates the amount of HbF; *KLF1* whole gene, *BCL11A* rs11886868 variation and *XmnI* polymorphisms were investigated by using both RFLP and Sanger Sequencing.

Results: Resveratrol and sodium butyrate caused dose-dependent hemoglobinization pattern in K562 cells. No synergistic effect was found between these two agents. Apoptotic effect was observed at high dose resveratrol in K562 cells. The potential of gamma globin induction of both resveratrol and sodium butyrate were elucidated. NRF2, ERK1/2 and p38 activation were screened in K562 cells while there was activation of p38 and inactivation of ERK1/2 pathways in primary erythroid cells of patients. *BCL11A* rs11886868, *XmnI* polymorphisms and *KLF1* variations were found to be compatible with the literature.

Conclusion: Guidance on selection of pharmacological molecules in HbF induction studies, individual genetic and epigenetic factors should be taken account in patients with beta thalassemia major

Key words: HbF induction, thalassemia, pharmacogenetic, epigenetic

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Hemoglobinopatiler	2
2.1.1. Beta Talasemi	3
2.1.2. Beta Talasemi Epidemiyolojisi	4
2.1.3. Genomda Beta Globin Geninin Yerleşimi ve Yapısı	5
2.1.4. Globin Değişim Sürecinde Görev Alan Başlıca Transkripsiyon Faktörleri	6
2.1.5. Beta Talasemide Mutasyonlar ve Klinik Sınıflandırma	11
2.1.6. Beta Talasemi Majör Hastalarında Klinik Seyir	14
2.1.7. Beta Talasemi İntermedia Hastalarında Klinik Seyir	15
2.1.8. Talasemide Transfüzyon ve Şelasyon	15
2.1.9. Hematopoyetik Kök Hücre Nakli (HKHN)	15
2.1.10. Beta Talasemi’de İnsan Gen Tedavi Çalışmaları	16
2.1.11. Beta Talasemi’de Farmakolojik Çalışmalar	17
2.2. Fetal Hemoglobin Miktarını Düzenleyen Yeni Mekanizmalar	18
2.2.1. <i>BCL11A</i> Varyantları ile HbF Arasındaki İlişki	19
2.2.2. HbF indüksiyonu için HDAC İnhibitörlerinin Kullanımı	21
2.2.3. <i>BCL11A</i> ’nın NuRD Kompleksi İle İlişkisi	23
2.2.4. Antioksidan Moleküllerin HbF İndüksiyonundaki Yeri	23
2.2.5. <i>HBB</i> Lokusunun Epigenetik Düzenlenmesi	31

3.GEREÇ ve YÖNTEM	34
3.1. Hasta Seçimi	34
3.1.2. Periferik Kandan DNA izolasyonu	35
3.1.3. <i>XmnI</i> rs7482144 C>T Polimorfizmi için Genotipleme	35
3.1.4. <i>KLF1</i> ve <i>BCL11A</i> (rs11886868) için Genotipleme	36
3.1.5. PZR Örneklerinin Temizlenmesi	37
3.1.6. DNA Dizileme Reaksiyonu	38
3.1.7. İstatistik-Analiz	39
3.2. K562 Hücre Hattında HbF İndüksiyon Çalışmaları	39
3.2.1. K562 Hücrelerinin Dondurulması	40
3.2.2. Resveratrol ve Sodyum Butirat Solüsyonlarının Hazırlanması	40
3.2.3. Benzidin Boyama Yöntemi	41
3.2.4 K562 Hücrelerinde Hücre Canlılık Testi	42
3.2.5 K562 Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu	42
3.3. Primer Eritroid Hücre Kültürü	43
3.3.1. Faz 1 ve Faz 2 Solüsyonlarının Hazırlanması	43
3.3.2. Primer Eritroid Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu	46
3.3.3. Western Blot Yöntemi	48
4. BULGULAR	54
4.1. Hastalara Ait Demografik ve Hematolojik Bulgular	54
4.2. Hastalara Ait DNA Analizi Bulguları	56
4.3. K562 Hücre Hattında Hemoglobinizasyon Sonuçları	64
4.3.1. K562 Hücre Hattının RNA Sonuçları	65
4.3.2. K562 Hücre Hattında Western Blot Sonuçları	66
4.3.3. K562 Hücrelerine Ait MTT Sonuçları	67
4.4. BTM'li Hastalara Ait Q-RT-PZR Sonuçları	67
4.5. Primer Eritroid Hücre Kültüründe Western Blot Sonuçları	69
5.TARTIŞMA	71
5.1. <i>XmnI</i> Polimorfizmi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	71
5.2. <i>BCL11A</i> rs11886868 (C>T) Sonuçlarının Değerlendirilmesi	73
5.3. <i>KLF1</i> Mutasyon Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	74

5.4. HbF indüksiyonunda Globin RNA Profili Sonuçlarının Değerlendirilmesi	75
5.4.1. K562 Hücrelerinde Globin RNA Sonuçlarının Değerlendirilmesi	76
5.4.2. Primer Eritroid Hücrelerde Globin RNA Sonuçlarının Değerlendirilmesi	76
5.5. HbF indüksiyonunda p38, ERK1/2 ve NRF2 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi	78
5.5.1. K562 Hücre Hattında p38, ERK1/2 ve NRF2 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi	78
5.5.2. Primer Eritroid Hücre Kültüründe p38, ERK1/2 ve NRF2 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi	80
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	83
7. KAYNAKLAR	85
EK-1	
BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU	105
ÖZGEÇMİŞ	108

SİMGELER ve KISALTMALAR

a.a	:Amino asit
α-MEM	: α -Minimal Esansiyel Medium
APS	:Amonyum Per Sülfat
BCL11A	:B hücreli lenfoma 11a proteini
BME	:Beta merkaptto etanol
BSA	:Bovin Serum Albumin
BTI	:Beta Talasemi İntermediya
BTM	:Beta Talasemi Majör
BTT	:Beta Talasemi Taşıyıcısı
cDNA	:Komplementer Deoksiribonükleik asit
cRPMI-1640	:Kompleyt Roswell Park Memorial Institute 1640
del	:Delesyon
DNMT	:DNA metil transferaz
dup	:Duplikasyon
ECL	:Enhanced Kemo-Luminesan
EDTA	:Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
rh-EPO	:Rekombinant insan eritropoyetin
ERK1/2	:Ekstraselülersinyal ilişkili kinaz (p42/p44) proteini
rh-FLT3L	:Rekombinant insan-FMS benzeri tirozin kinaz
FBS/FCS	:Fetal Bovin/Calf Serum (Sığır/Dana Serumları)
FSC	:Çerçeve kayması mutasyonu
GAPDH	:Gliseraldehit 3-fosfat Dehidrojenaz
HAT	:Histon asetil transferaz
HbA1	:Erişkin insan hemoglobini 1
HbA2	:Erişkin insan hemoglobini 2
HBB	:İnsan beta globin geni
HbF	:Fetal hemoglobin
HbG1	:A gama globin alt ünitesi
HbG2	:G gama globin alt ünitesi
HDAC	:Histon deasetilaz
HPFH	:Kalıtsal Fetal Hemoglobin Kalıcılığı-Devamlılığı

HPLC	:Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HS	:Hiper Sensitif bölge
IVS	:Araya giren dizi, intronik bölge
ins	:İnsersiyon
JNK	:c- Jun N terminal kinaz
KLF1	:Krüppel benzeri faktör 1
LCR	:Lokus Kontrol Bölgesi
MAPK	:Mitojen Aktive Protein Kinaz
MCH	:Ortalama alyuvar hemoglobini
MCHC	:Ortalama alyuvar hemoglobin konsantrasyonu
MCV	:Ortalma alyuvar hacmi
mRNA	:Mesajcı Ribonükleik asit
miRNA	:Mikro RNA
NRF-2	:Nükleer eritroid kökenli faktör 2
NuRD	:Nükleozom yeniden düzenlenme ve deasetilaz
OMIM	:Çevrimiçi İnsan Mendelyan Kalıtım
p-p38	:Fosforile p38 proteini
PBS	:Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PBS-T	:Tween20 içeren Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
PVDF	:Polivinilidinflorür
QTL	:Kuantitatif Trait Lokus
RDW	:Alyuvar dağılım genişliği
Rs	:Referans SNP kümesi
SCF	:Kök hücre faktörü
SDS-PAGE	:Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid je elektroforezi
SNP	:Tek nükleotid değişimi
TEMED	:Tetrametiletildiamin
UV	:Ultra viyole ışın
Var	:Varyasyon
W	:Tryptofan amino asidi
<i>XmnI</i>	: <i>Xanthomonas manihotis</i> 1'den izole restriksiyon enzimi
YY1	:Yin Yang transkripsiyon baskılayıcı proteini
ZF	: Çinko parmak transkripsiyon faktör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 2.1.	Embriyolojik süreçte hemoglobin molekülünü oluşturan alfa ve beta benzeri globin zincirlerinin zamana bağlı değişimi ile sentezlendiği doku veya organlar	4
Şekil 2.2.	Beta globin gen lokusunun diyagramik gösterimi	5
Şekil 2.3.	Epsilon geninin sessizleştirilmesi	9
Şekil 2.4.	Hemoglobin switchinde gen rekabeti modeli	9
Şekil 2.5.	Orjinal 1980 tarihli makaleden alınan <i>HBB</i> nükleotid dizisi	10
Şekil 2.6.	Bir kan yaymasında mikrositos, anizositos ve hipokromi örneği	12
Şekil 2.7.	<i>HBB</i> lokusundaki gama globin sessizleştirilmesini gösteren model	19
Şekil 2.8.	<i>BCL11A</i> bağlanma bölgesine göre bazı delesyonel HPFH tiplerinin gösterimi	19
Şekil 2.9.	K562 hücrelerinde MAPK üyelerinin rolünü gösteren hipotetik model	22
Şekil 2.10.	NRF-2/ARE antioksidan hücre içi yolağı	26
Şekil 2.11	Yetişkinlerde <i>KLF1</i> 'in beta benzeri globin ekspresyonunu düzenlediğini gösteren model	27
Şekil 2.12.	<i>KLF1</i> mutasyonlarını gösteren diyagram	29
Şekil 2.13.	<i>KLF1</i> 'in fonksiyonel domeynleri ile literatürde rapor edilen <i>KLF1</i> varyantlarının lokalizasyonları	30
Şekil 2.14.	Sınıf 2 ve Sınıf 3 <i>KLF1</i> varyantlarının hemoglobinopatilerin klinik şiddeti üzerine etkisi	31

Şekil 4.1.	Beta Talasemi hasta grubumuzda görülen <i>HBB</i> genine ait mutasyonların oluşturduğu genotip çeşidi ve sıklığı	56
Şekil 4.2.	BTM hastalarında <i>XmnI</i> polimorfizminin PZR-RFLP yöntemiyle gösterilmesi	57
Şekil 4.3.	<i>XmnI</i> polimorfizmindeki C>T değişiminin Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi	58
Şekil 4.4.	<i>BCL11A</i> rs11886868 C>T değişiminin Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi	59
Şekil 4.5.	<i>KLF1</i> promotor bölgesindeki -148 G>A değişiminin Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi	60
Şekil 4.6.	<i>KLF1</i> 'in 2.ekzonunda p.Ser102Pro'ya sebep olan T>C değişiminin Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi	61
Şekil 4.7.	Resveratrol ve Sodyum Butirat'ın K562 hücrelerindeki benzidin boyanmasına (hemoglobinizasyon) etkisi	65
Şekil 4.8.	Resveratrol ve Sodyum Butirat uygulanmış K562 hücrelerinden izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü	65
Şekil 4.9.	K562 hücrelerinde Q-RT-PZR Sonuçları	66
Şekil 4.10.	Resveratrol ve Sodyum Butirat Uygulanmış K562 hücrelerinde NRF-2 ve MAPK proteinlerindeki değişiklik	67
Şekil 4.11.	Resveratrol ve Sodyum Butirat Uygulanmış K562 hücrelerinde MTT Sonuçları	67
Şekil 4.12.	BTM'li hastalarda Q-RT-PZR sonuçları	68
Şekil 4.13.	<i>BCL11A</i> rs11886868 Varyasyonuna Göre Farklı Genotipteki Hasta Örneklerinin Western Blot Sonuçları	70

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 2.1.	Türkiye’de gerçekleştirilmiş 3 farklı çalışmada beta globin mutasyon çeşitleri ve frekansları	11
Tablo 2.2.	Yaygın kullanılan kan parametrelerine göre beta talaseminin sınıflandırılması	13
Tablo 2.3.	Bir yaşından küçük çocuklarda HPLC sonuçları ile beta talaseminin sınıflandırılması	14
Tablo 2.4.	HbF indüksiyonu için kullanılan bazı ajanlar ve etki mekanizmaları	24
Tablo 2.5.	Resveratrolün farklı genotipteki BT hastalarının eritroid hücreleri üzerindeki etkisi	26
Tablo 2.6.	Farklı <i>KLF1</i> mutasyonları ile HbA2 ve HbF arasındaki ilişki	28
Tablo 2.7.	<i>KLF1</i> mutasyonu taşıyan bireylerde genotip-fenotip ilişkisi	28
Tablo 3.1.	<i>XmnI</i> , <i>BCL11A</i> ve <i>KLF1</i> ’in genotiplenmesinde kullanılan primer dizileri	36
Tablo 3.2.	PZR ile çoğaltılan bölgelerin ampikon uzunlukları, bağlanma sıcaklıkları ve $MgCl_2$ ihtiyaçları	37
Tablo 3.3.	PZR reaksiyonu içindeki malzemeler ve miktarları	37
Tablo 3.4.	Dizileme reaksiyonunda kullanılan malzemeler ve miktarları	38
Tablo 3.5.	5 ml’lik ortamdaki hücrelere eklenecek RV ve SB miktarları ile final konsantrasyonlar	41

Tablo 4.1.	BTM’li 30 hastanın hematolojik parametreleri ile <i>HBB</i> , <i>XMNI</i> (rs7482144), <i>BCL11A</i> (rs11886868) ve <i>KLF1</i> tüm gen analizi sonuçları	55
Tablo 4.2.	<i>XmnI</i> polimorfizminin HbF üzerine etkisi	62
Tablo 4.3.	<i>BCL11A</i> (rs11886868) değişiminin HbF üzerine etkisi	63
Tablo 4.4.	<i>KLF1</i> geni promotor varyasyonunun HbF üzerine etkisi	64
Tablo 4.5.	BTM’li hastalarda Globin Gen Ekspresyon Profili Değişimi	68
Tablo 4.6.	Primer Eritroid Hücrelerdeki Western-Blot Sonucu	70

1. GİRİŞ

Beta talasemi tüm dünyada en sık gözlenen otozomal resesif kalıtılan monogenik bir kan hastalığıdır. Hastalık özellikle Akdeniz Bölgesi coğrafyası içerisinde bulunan popülasyonlarda sık görülmektedir. Kendi içerisinde klinik olarak 3 farklı kategoride değerlendirilen beta talasemi hastalığında; majör ve intermedia hastaları farklı transfüzyon sıklıkları ve hematolojik parametreler ile değerlendirilirken, minör bireyler asemptomatik olup transfüzyon almazlar.

Genetik olarak başlıca beta globin (*HBB*) genindeki mutasyonlar hastalığa sebep olmaktadır. Genetik tanı merkezlerinde hastalığa sebep olan mutasyonların tespiti için rutin olarak beta globin gen mutasyonları değerlendirilmektedir.

Hastalarda transfüzyon sıklığını etkileyen önemli bir faktör ancak elektroforezde tespit edilebilen fetal hemoglobinin (HbF) miktarıdır. Yüksek HbF miktarı ile transfüzyon sıklığı arasında negatif bir korelasyon bulunmaktadır. Aynı *HBB* genomik profiline sahip beta talasemi hastalarındaki farklı transfüzyon gereksinimleri HbF miktarını kontrol eden başka genomik bölgelerin olabileceği fikrini ortaya çıkarmıştır.

Literatürde HbF miktarını artıracak 4 farklı tedavi stratejisi bulunmaktadır. Bunlar, demir şelasyon tedavisi, allojenik kök hücre nakli, gen tedavisi ve farmakolojik olarak indükleyici molekülleri kullanmak suretiyle farklı hücre içi yolları modüle ederek HbF miktarını artırmaktır. P38, ERK, JNK gibi MAPK yolları ile antioksidan yollardan olan NRF-2 yolağının modülasyonu umut vaatetmektedir. Ayrıca kullanılan sodyum butiratın epigenetik olarak çalıştığı bilinmektedir.

Yukarıdaki bilgiler ışığında tezimizin amacı; K562 hücre hattında ve hastaların primer eritroid hücre kültürlerinde, HbF indüksiyon yollarında işe karışan *BCL11A* ve *KLF1* genlerindeki genetik varyasyonlar ile resveratrol ve sodyum butiratın epigenetik mekanizmaları modifiye etme özellikleri arasındaki ilişkiyi ortaya koymaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Hemoglobinopatiler

Dünya popülasyonunun yaklaşık %7'si (yaklaşık 420 milyon) bir globin gen mutasyonu taşıyıcısıdır. Bazı bölgelerdeki taşıyıcı sıklığı %25'lere, hatta daha korunmuş bölgelerde %70'lere kadar yükselmektedir. Bugün dünyada 1693 farklı anormal hemoglobin varyantı ve talasemiler bildirilmektedir. (http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3 Erişim tarihi: 20.06.2016). Akriba evliliğinin yapıldığı toplumlarda homozigot hasta bireylerin sayısı ile mutasyon sıklığı artmakta, hem de aynı tip mutasyonların öne çıktığı görülmektedir. Son çalışmalarda, dünya genelinde bu taşıyıcılardan her yıl yaklaşık 300.000 ile 400.000 hasta çocuk doğumunun gerçekleştiği, bunların %90'dan fazlasının düşük ve orta gelirli ülkelerde olduğu bildirilmektedir (Cousens ve ark., 2010). Birçok ülkede kontrol altına alınan hemoglobinopatiler, dünyanın ve ülkemizin en önemli sağlık sorunu olarak yerini korumaya devam etmektedir. Hemoglobinopatiler tek gen hastalıkları olmalarına karşın, geniş klinik ve hematolojik varyasyonlar ile karakterizedirler. Hemoglobinopatilerdeki bu heterojenitenin temelinde de hemoglobini oluşturan farklı globin zincirlerinin genetik varyasyonları ile diğer genetik ve genetik olmayan faktörler yatmaktadır. İnsanın gelişim basamaklarında farklı hemoglobin molekülleri, globin genlerinin koordineli ekspresyonları ile düzenlenir. İnsan genomunda, kromozom 16p13.3'de yerleşen alfa gen demeti (HBAC), dört fonksiyonel gen (HBZ, HBA2, HBA1, HBQ1) içerir. Beta globin gen demeti (HBBC) ise kromozom 11p15.4 bölgesinde yerleşmiş olup, beş fonksiyonel gen (HBE1, HBG2, HBG1, HBD, HBB) içerir. Sadece alfa ve beta globin zincirlerine bağlı varyasyonun temelinde, 1650'den fazla farklı mutasyon yatmaktadır (http://globin.bx.psu.edu/cgi-bin/hbvar/query_vars3 Erişim tarihi: 20.06.2016).

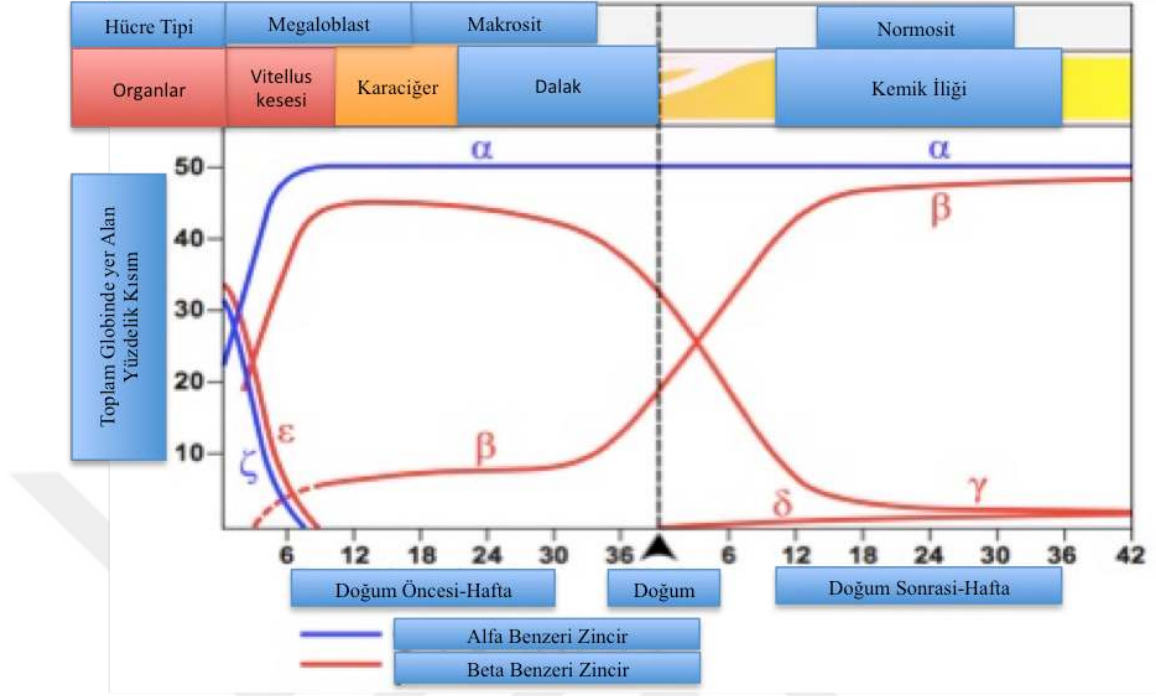
Globin zincir sentezlerinin yokluğu veya azalması ile karakterize olan hemoglobinopatiler, genellikle iki grup altında; talasemiler ve yapısal hemoglobin varyantları (anormal hemoglobinler) olarak sınıflandırılırlar. Talasemilerin en iyi tanımlanan tipleri; α , β , γ , δ , $\delta\beta$ ve $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemilerdir (Kohne, 2011).

Sık görülenlerden alfa talasemiler, alfa1 ve alfa2 genlerinin ikişer kopyasını ilgilendiren ve daha çok delesyonel tip mutasyonlarla ortaya çıkan; sessiz taşıyıcı, taşıyıcı, HbH hastalığı ve HbBart's Hidrops fenotipi ile karakterizedirler.

Beta talasemi ise, sıklıkla nokta mutasyonlarla ortaya çıkan genomda iki kopya gen ile karakterize, taşıyıcı, intermediya ve majör fenotipi ile klinik yansıması en sık görülen hemoglobinopatilerden biridir. Daha çok talasemilerle anılan hemoglobinopatilerin, sistemik hastalık olmaları nedeniyle birçok genin işleyiş biçimi de etkilenmekte ve birçok gen de klinik gidişati ve işleyişi modifiye edebilmekte, hastalığın şiddetini değiştirebilmektedir.

2.1.1 Beta Talasemi

Talasemi, 1925 yılında ilk defa, İtalyan-Yunan orjinli 4 pediyatrik olguda belirgin anemi, karaciğer-dalak büyümesi ve kemik deformiteleri ile eritroblastik anemi veya daha sonraları bulan kişiye ithafen Cooley's anemi olarak adlandırılmıştır. Yunanca "deniz" veya "Akdeniz" anlamına gelen -thalassa ve "kan" anlamına gelen -haemia kelimelerinin birleşiminden oluşan bir kelimedir ve ilk kez 1932 yılında kullanılmıştır (Whipple, 1935). Yine Yunan alfabesindeki alfa (α), beta (β), gamma (γ), delta (δ), epsilon (ϵ), zeta (ζ) ön ekleri ile oluşturdukları globin zincirine ismini verirler. Eritrositler içerisinde 4 globin zinciri tetramerik halde bulunurlar ve eritrosit içerisinde oksijen ve karbondioksit taşımakla görevli hemoglobinin yapısına katılırlar (şekil 2.1). Fetusun oluşumundan erişkin bireye kadar farklı embriyolojik süreçlerde eritrositler içerisinde 2 alfa benzeri globin zinciri ile beraber bulunurlar (Wood, 1976).



Şekil 2.1: Embriyolojik süreçte hemoglobin molekülünü oluşturan alfa ve beta benzeri globin zincirlerinin zamana bağlı değişimi ile sentezlendiği doku veya organlar (Wood, 1976). Orjinal şekilden modifiye edilmiştir.

2.1.2 Beta Talasemi Epidemiyolojisi

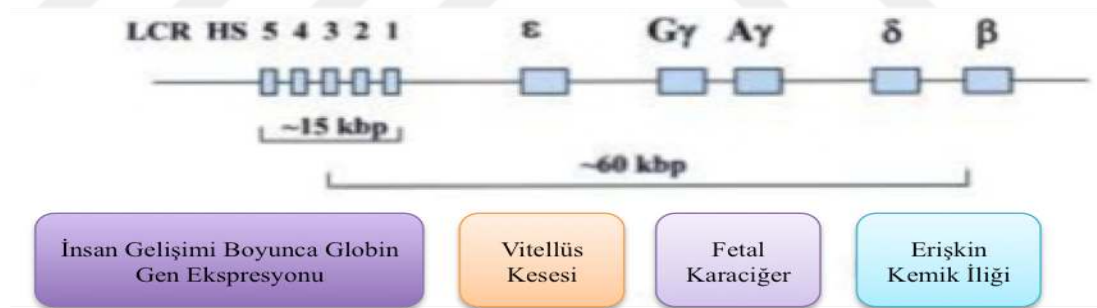
Tüm talasemiler arasında Beta Talasemi (Brand ve ark.), dünya genelinde en sık gözlenen otozomal resesif kalıtılan bir kan hastalığı olup Akdeniz'e kıyısı bulunan Sardinya (%12), Kıbrıs (%14) gibi adalar ile Malezya, Endonezya, Tayland ve Singapur gibi Güney Doğu Asya ülkelerinde yüksek taşıyıcı frekanslarında gözlenir (Flint ve ark., 1998). Bununla beraber Akdeniz ülkeleri (Yunanistan, İtalya, İspanya, Portekiz), Orta Asya, Orta Doğu, Hindistan, Güney Çin, Uzak Doğu, Güney Amerika ve Kuzey Afrika kıyılarında prevalansı yüksektir (Flint ve ark., 1998). Kuzey Avrupa dahil dünyanın hemen hemen her ülkesinde, populasyon göçleri ve farklı etnik gruplar arasındaki evlilikler sebebiyle, dünyada talasemi taşıyıcısı sayısı artmakta ve dünya genelinde yaklaşık 100 milyon beta talasemi taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir (Flint ve ark., 1998).

Uluslararası Talasemi Federasyonu verilerine göre ise yaklaşık 200.000 talasemi hastası düzenli tedavi almaktadır (<http://www.thalassaemia.org.cy/haemoglobin-disorders/beta-thalassaemia>, Erişim tarihi:30 Haziran 2016).

2.1.3 Genomda Beta Globin Geninin Yerleşimi ve Yapısı

İnsanda 11 numaralı kromozomun kısa kolunda (11p15.5) lokalize olan beta globin (*HBB*) geninin (Gene ID:3043), normal allelik varyantı 3 ekzon, 2 intron ve 1600 nükleotidden oluşmaktadır (Efstratiadis ve ark., 1980; Lawn ve ark., 1980). Bu lokusta sırasıyla 5'-Epsilon-G gama-A gama-Delta-Beta-3' yönünde organizasyon görülür ve lokus, beta globin lokusu olarak bilinir (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=3043>, Erişim tarihi:14.06.2016).

Lokusun kontrol mekanizması elemanlarından birisi olan ve LCR (Locus Control Region) adı verilen, *HBB*'nin 5' ucuna yaklaşık 40 kb uzaklıkta bulunan (Şekil 2.2) 5 adet DNaz Hyper Sensitive (HS) kontrol bölgeleri ile sağlanmaktadır (Levings ve Bungert, 2002).



Şekil 2.2: Beta globin gen lokusunun diyagramik gösterimi: LCR:Locus Control Region, HS:Hyper Sensitive (Levings ve Bungert, 2002).Orjinal şekilden modifiye edilmiştir.

Otonom sessizleştirme ve gen rekabeti (competition) modelleri, beta globin lokusundaki hangi globin geninin ne zaman ifade edileceğini belirleyen modeller arasında, 2000'li yılların başına kadar gösterilmiş ve üzerinde çalışılmış modellerdi (Stamatoyannopoulos, 2005). Otonom sessizleştirme modeline göre inaktive edilecek genin promotor bölgesine bağlanacak bir seri transkripsiyon faktörü, LCR ile inaktive edilecek genin fiziksel etkileşimini bozup LCR loop (halkası) oluşumunu imkansız hale getiriyordu (Şekil 2.3).

2.1.4 Globin Değişim Sürecinde Görev Alan Başlıca Transkripsiyon Faktörleri

GATA1: İlk olarak 1989'da zinc finger (çinko parmak) motiflerine sahip, eritroid spesifik beta globin bağlanma proteini (Eryf1) olarak isimlendirildi (Evans ve Felsenfeld, 1989). HbF seviyesi %59.5 olan Congenital Erythropoietic Porphyria hastalığına sahip bir bireyde p.R216W mutasyonu görüldü (Phillips ve ark., 2007).

BCL11A (B-Cell Lymphoma/Leukemia 11A): Önceleri B lenfosit gelişimi için elzem olan bir transkripsiyon faktörü olarak tanımlanan BCL11A'nın (Liu ve ark., 2003b) ileriki bölümlerde daha ayrıntılı anlatılacağı üzere, düşük seviyeleri, yüksek HbF miktarı ile ilişkili bulunduktan sonra (Sankaran ve ark., 2008), gama globini direkt baskılayan bir transkripsiyon faktörü olarak gündeme geldi (Sankaran ve ark., 2009). Beta globin lokusunda; GATA1, FOG1 (Friend of GATA1), SOX6 ve NuRD (Nucleosom Remodelling and DeAcetylase) kompleksleri ile moleküler kompleksler oluşturduğu bilinmektedir (Sankaran ve ark., 2008; Xu ve ark., 2010).

SOX6 (SRY Box 6): Eritropoietik dokularda eksprese edilen SOX6 gelişimin farklı zamanlarında hücre farklılaşmasını sağlayan transkripsiyon faktörlerinden birisi olarak bilinmektedir (Wegner, 1999). GATA1 ve BCL11A ile beraber gama globin sessizleştirilmesinde long range intraction (uzun mesafe etkileşimi) şeklinde etki gösterirler (Xu ve ark., 2010). *SOX6*'nın genomik yapısını bozan bir dengeli translokasyon vakasında eritropoyezde veya hemoglobin seviyelerinde her hangi bir değişime sebep olmadığı gösterilmiştir (Sankaran ve ark., 2011a).

KLF1 (Krüppel Factor 1): Eritroid KLF olarak da bilinen protein, CACCC dizilerine bağlanır (Miller ve Bieker, 1993) ve *HBB* geni aktivasyonu için gereklidir (Nuez ve ark., 1995). İleride ayrıntılı anlatılacağı üzere *KLF1* mutasyonları yüksek HbF ile ilişkili bulunmuştur (Borg ve ark., 2010)

c-MYB (Cellular Myeloblastosis): Thein ve arkadaşları 6q23'de HBS1L-MYB genleri arasında yer alan intergenik bir bölgenin HbF ekspresyonunu kontrol eden bir aday bölge olarak tanımladılar (Craig ve ark., 1996). Daha sonra birbirinden bağımsız çalışmalar bu lokusun HbF ekspresyonu ile olan ilişkisini ortaya koydu.

Bunlardan ilki trizomi 13 karyotipinde bir hastada yüksek HbF seviyesine sebep olan 2 farklı mikro RNA, miR-15a ve miR-16-1 tanımladılar. Bu iki miRNA'nın üzerinde baskılama etkisi gösterdikleri hedeflerden bir tanesi MYB idi (Sankaran ve ark., 2011b). İkinci çalışmada *HBSIL*'nin tamamen fonksiyon kaybına neden olan bir mutasyonu (loss of function) taşıyan bir hastada hemoglobin fenotipini etkilemeyen fenotiplerin söz konusu olduğunun bulunması, *HBSIL*'den ziyade *MYB* geninin yüksek HbF ile ilişkisi olabileceği fikrini doğurdu (Sankaran ve ark., 2013).

2011 yılında yüksek HbF seviyesi ile ilişkilendirilen ve HBSL1-MYB arasındaki intergenik bölgede 3 bç'lik delesyonu keşfedilen bir hastada bu delesyonun, 20 sene önce keşfedilen (Wadman ve ark., 1997) ve *MYB* transkripsiyonu için gerekli olan TAL1/GATA kompleksinin inhibisyonuna neden olarak ilgili fenotipe yol açtığı gösterildi (Farrell ve ark., 2011).

NF-E4 (Nuclear Factor-Erythroid 4): İlk defa tavuk globin switchinginde (değişiminde) bulunan genin insan homoloğu olan p22NF-E4, CP2 adı verilen başka bir transkripsiyon faktörüyle beraber SSP (Stage Selector Protein) olarak da bilinirler ve K562 hücre hattındaki ektopik ekspresyonunun gama globin genlerinin ekspresyonunu artırdığı gösterilse de insan globin switchingindeki tam rolü ortaya çıkarılamamıştır (Sankaran ve ark., 2010).

COUP-TF (Chicken Ovalbumin Upstream Promoter-Transkription Factor): Epsilon ve gama globin promotorunda yüksek korunmuşluk derecesine sahip DR1 (Direct Repeat) dizilerine sahip bölgedeki mutasyonlar *HBE1* (Epsilon globin) ve *HBG1/2* (Gama globin 1 ve 2) genlerinin sessizleştirilmesine yol açarlar (Aerbajinai ve ark., 2009; Choi ve Engel, 1988; Filipe ve ark., 1999). SCF (Stem Cell Factor) eklenmiş hücre kültürü çalışmalarında gama globin üzerindeki baskılama özelliği ortadan kalkar (Aerbajinai ve ark., 2009).

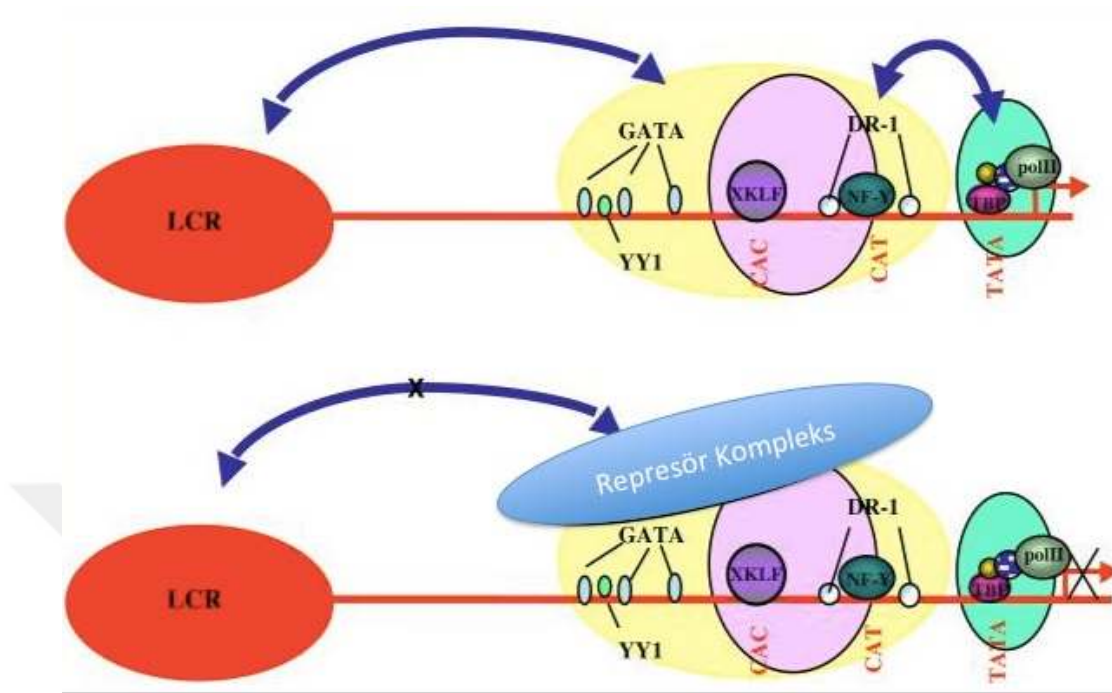
Ikaros-PYR Kompleksi: Delta globin (*HBD*)'nin 5'ucuna doğru 250 baz çiftlik pirimidince zengin DNA dizisine SWI/SNF-NuRD kromatin remodeling (yeniden düzenlenme) kompleksi ile beraber yer alan başka bir komplekstir. Delesyon durumunda HPFH ile alakalı yüksek HbF seviyesi görülür (O'Neill ve ark., 1991).

BRG1 (Brahma Related Gene 1): Genel olarak transkripsiyonel aktivasyon sağlayan SWI/SNF kompleksinin bir üyesidir. Beta globin lokusunda ise ayrıca PYR kompleksinin bir elemanıdır (Bank, 2006).

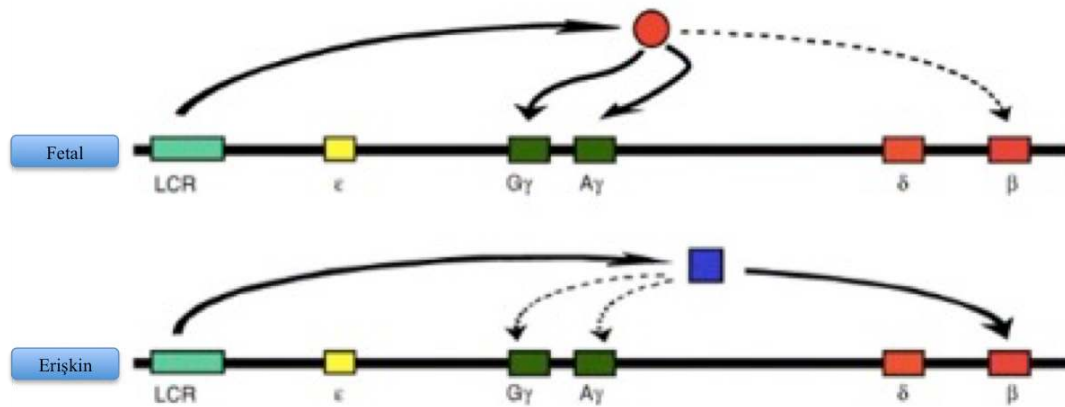
MBD (Methyl CpG Binding Domain): Metillenmiş DNA'ya bağlanarak, HDAC1 (HistonDeAcetylase) kompleksi elemanları ile birlikte erişkin eritroid hücrelerde özellikle *HBG1/2* genlerini baskılamak için gereklidir (Singal ve ark., 2002).

DRED/TR2/TR4 (Direct Repeat Erythroid Definitive): 2000 yılında *HBE1* promotorundaki DR1 dizilerine TR2 ve TR4 reseptörleri ile beraber yüksek afinite ile bağlanarak *HBE1*'nin baskılanmasına neden olur (Tanimoto ve ark., 2000). Aynı zamanda GATA1'in de baskılanmasına sebep olur (Tanabe ve ark., 2007).

Daha çok embriyonik ve fetal eritropoyezde kabul gören gen rekabeti modeline göre ise eksprese edilecek genin transkripsiyonel çevresi hangi globinin ifade edileceğini gösterir (Şekil 2.4). Daha sonra ayrıntılı bahsedileceği üzere erişkin hemoglobin switch (değişimi)'nde ise daha çok otonom sessizleştirme modeli gama globin ekspresyonunu baskılayacak şekilde özelleşecektir. *HBB* organizasyonunda daha sonraki yıllarda farklı genlerdeki mutasyonların keşfi ile epigenetik mekanizmaların da işe karıştığı karmaşık modeller ve bunlara bağlı tedavi yaklaşımları gerçekleştirildi (Krivega ve ark., 2015; Renneville ve ark., 2015).



Şekil 2.3: Epsilon geninin sessizleştirilmesini gösteren şekilde GATA, YY1, NKLF NF-Y ve DR1 transkripsiyon faktörlerini göstermektedir. Bu transkripsiyon faktörlerinin bir araya gelmesiyle inaktive edilecek epsilon globin geni için represör kompleksi oluşturulur. LCR:Locus Control Region. Orjinal şekilden modifiye edilmiştir (Stamatoyannopoulos, 2005) .



Şekil 2.4: Hemoglobin switchinde gen rekabeti modeli:Bu modelde transkripsiyon çevresi önem kazanmaktadır. Kırmızı ile gösterilen transkripsiyon faktörü fetal globin ekspresyonuna izin vermektedir. Orjinal şekilden modifiye edilmiştir (Stamatoyannopoulos, 2005).

İnsanda 11 numaralı kromozomun kısa kolunda yer alan betaa globin geninin (*HBB*) nükleotid dizisi şekil 2.5’de verilmiştir. Bundan sonra bu dizide meydana gelen mutasyonlardan ve mutasyonların klinik yansımalarından bahsedilecektir.

cccctgtggagccacaccctagggttggccaatctactcccaggagcagggagggcagggagccagggcttggccatggg
 gtcagggaagagccatctattgcttACATTTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATG
 ValHisLeuThrProGluGluLysSerAlaValThrAlaLeuTrpGlyLysValAsnValAspGluValGlyGlyGlu
 GTGCACCTGACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTGGTGAG
 AlaLeuGlyArg
 GCCCTGGGCAGGTTGGTATCAAGGTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACCAATAGAACTGGGCATGTGGAGACAGAGAAG
 ACTCTTGGGTTTCTGATAGGCACTGACTCTCTCTGCCTATTGGTCTATTTTCCCACCCTTAGGCTGCTGGTGGTCTAC
 LeuLeuValValTyr
 ProTrpThrGlnArgPhePheGluSerPheGlyAspLeuSerThrProAspAlaValMetGlyAsnProLysValLys
 CCTTGGACCCAGAGGTTCTTTGAGTCTTTGGGGATCTGTCCACTCCTGATGCTGTTATGGGCAACCTAAGGTGAAG
 AlaHisGlyLysLysValLeuGlyAlaPheSerAspGlyLeuAlaHisLeuAspAsnLeuLysGlyThrPheAlaThr
 GCTCATGGCAAGAAAGTCTCGGTGCCCTTAGTGATGGCTGGCTACCTGGACAACCTCAAGGGCACCTTTGCCACA
 LeuSerGluLeuHisCysAspLysLeuHisValAspProGluAsnPheArg
 CTGAGTGAGCTGCACTGTGACAAGCTGCACGTGGATCCTGAGAACTTCAGGGTGAGTCTATGGGACCCTTGATGTTTT
 CTTTCCCCTTCTTTTCTATGGTTAAGTTCATGTCATAGGAAGGGGAGAAGTAACAGGGTACAGTTTAGAATGGGAAAC
 AGACGAATGATTGCATCAGTGTGGAGTCTCAGGATCGTTTTAGTTTCTTTTATTTGCTGTTCAACAATTGTTTTTC
 TTTTGTTTAATTCTTGCTTTCTTTTTTTTCTTCTCCGCAATTTTACTATTATACTTAATGCCTTAACATTGTGTAT
 AACAAAAGGAAATATCTCTGAGATACATTAAGTAACCTAAAAAAAACCTTACACAGTCTGCCTAGTACATTACTATT
 TGGAATATATGTGTGCTTATTTGCATATTCATAATCTCCCTACTTTATTTTCTTTTATTTTAAATTGATACATAATCA
 TTATACATATTTATGGGTTAAAGTGTAATGTTTTAATATGTGTACACATATTGACCAAATCAGGGTAATTTTGCATT
 TGTAATTTTAAAAATGCTTTCTTTTAAATATACTTTTTTGTATCTTATTTCTAATACTTTCCCTAATCTCTTT
 CTTTCAGGGCAATAATGATACAATGTATCATGCCCTTTTGCAACATTCTAAGAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTA
 AGGCAATAGCAATATTTCTGCATATAAATATTTCTGCATATAAATTGTAAGTGTGTAAGAGGTTTCATATTGCTAA
 TAGCAGCTACAATCCAGCTACCATTCTGCTTTTATTTTATGTTTGGGATAAGGCTGGATTATTCTGAGTCCAAGCTAG
 GCCCTTTTGCTAATCATGTTTCATACCTCTTATCTTCTCCACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTGTGTGCTGGCC
 LeuLeuGlyAsnValLeuValCysValLeuAla
 HisHisPheGlyLysGluPheThrProProValGlnAlaAlaTyrGlnLysValValAlaGlyValAlaAsnAlaLeu
 CATCACTTTGGCAAAGAATTCAACCCACAGTGCAGGCTGCCATCAGAAAGTGGTGGCTGGTGTGGCTAATGCCCTG
 AlaHisLysTyrHis
 GCCACAAGTATCACTAAGCTCGCTTTCTTGCTGTCCAATTTCTATTAAGGTTCTTTGTTCCCTAAGTCCAACCTAC
 TAACTGGGGGATATTATGAAGGGCCTTGAGCATCTGGATTCTGCCATAAAAAACATTTATTTTCATTGCaatgat
 gtatttaaatattttctgaatattttactaaaaaggggaatgtgggaggtcagtgcatttaaacataaagaatgatg
 agctgttcaaaccttgggaaaatacactatatcttaactccatgaagaagggtgaggctgcaaccagctaatgcaca
 ttggcaacagccctgatgcctatgccttatttcateccctcagaaaaggattctttagaggcttgatttgcaggttaa
 agttttgctatgctgtattttacattactattgttttagctgtccctcatgaatgtcttttactaccattttgctta
 tcttgcattctcttcagccttgact

Şekil 2.5: Orjinal 1980 tarihli makaleden alınan *HBB* nükleotid dizisi. Başlangıç kodu ATG ve bitiş kodu TAA olan dizi üzerlerinde aminoasit dizisi yazılı 3 ekzon ve 2 introndan oluşan 146 amino asitlik bir proteini kodlar. Ekzon-intron bağlantılarını gösteren GT-AG dizleri ayrıca gösterilmiştir. (Lawn ve ark., 1980)

2.1.5 Beta Talasemide Mutasyonlar ve Klinik Sınıflandırma

Beta talasemiye neden olan beta globin gen mutasyonlarının tipi ve sıklığı bölgelere göre farklılıklar göstermektedir. Ülkemizde görülen çok farklı tipte beta globin gen mutasyonlarının en sık görüleni IVS.I.110 (G>A) mutasyonudur (Keser ve ark., 2004). Beta globin geninin regülatör, ekzon ve intronik bölgelerinde meydana gelen mutasyon tiplerinin, hastaların klinikleri üzerinde değişiklik gösterdiği de bildirilmektedir. Çoğunluğu nokta mutasyonu olmak üzere, beta globin zinciri üzerindeki 214 adet genomik değişikliğin 153 tanesi Beta0 ile ilişkilidir. Ülkemizde, 3 farklı çalışmada ortaya çıkarılmış en sık görülen BT mutasyonları Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1: Türkiye’de gerçekleştirilmiş 3 farklı çalışmada beta globin mutasyon çeşitleri ve frekansları. (Bilgen ve ark., 2011).

Mutasyon Tipi	Frekans (%)		
	Bu çalışma	Başak ve ark	Keser ve ark
IVS-I-110 (G → A)	35.6	39.2	43.3
Hb S [β6(A3) Glu → Val, GAG → GTG]	10.6	4.6	11.5
IVS-I-6 (T → C)	7.4	9.5	8.6
IVS-I-1 (G → A)	6.9	5.5	4.2
IVS-II-1 (G → A)	6.9	5.4	5.4
Cod 8 (– AA)	6.0	6.1	2.2
IVS-II-745 (C → G)	5.1	4.6	6.3
– 30 (T → A)	2.8	3.1	5.1
Hb D [β121(GH4) Glu → Gln, GAA → CAA]	2.8	< 1.0	ND
FSC 5 (– CT)	3.2	2.2	3.1
IVS-I-2 (T → A)	1.9	ND	ND
Cod 44 (– C)	1.9	1.3	2.9
Hb G [β22(B4)Glu → Ala, GAA → GCA]	1.4	ND	0.2
– 87 (C → G)	0.9	< 1.0	0.2
Cod 17 (A → T)	0.9	ND	ND
Cod 39 (C → T)	0.9	3.8	3.6
3'UTR + 1570 (T → C)	0.9	ND	ND
IVS-I-130 (G → A)	0.5	< 1.0	ND
Cod 9/10 (+ T)	0.5	ND	ND
Cod 37/38/39 (del GACCCAG)	0.5	ND	ND
Cod 8/9 (+ G)	0.5	1.5	0.2
Cod 56 (G → C)	0.5	ND	ND
FSC 22/23/24 (7 bp deletion)	0.5	< 1.0	ND
FSC 74/75 (– C)	0.5	< 1.0	ND
Cod 69 (G → A)	0.5	ND	ND

Her üç çalışmadan da anlaşılabacağı üzere ülkemizde en sık görülen beta globin mutasyonu IVS-I-110 (G>A)’dır (Basak ve ark., 1992; Bilgen ve ark., 2011; Keser

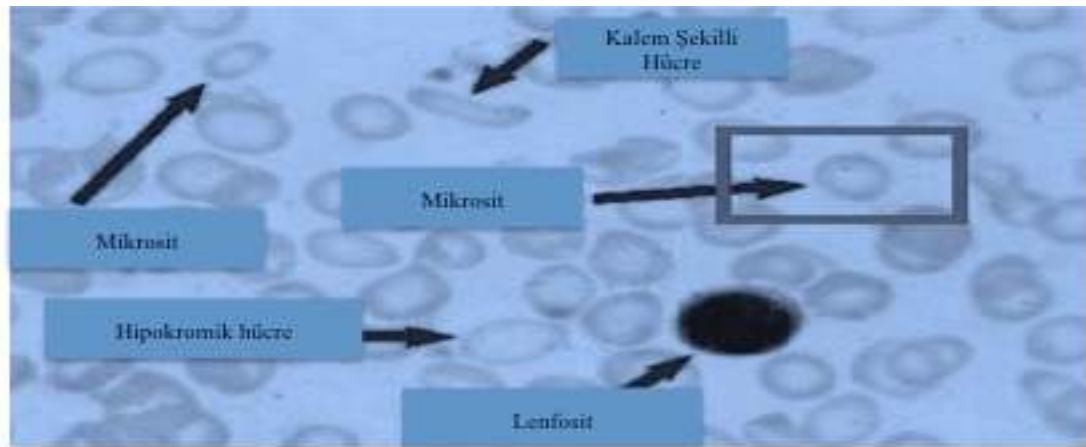
ve ark., 2004). ND:Not Detected (saptanmayan), FSC:Frame Shift (çerçeve kayması) Deletion: delesyon. Orjinal şekilden modifiye edilmiştir.

Beta globin geninde meydana gelen mutasyonların, hemoglobin üzerine olan etkisinden dolayı eritrositlerdeki değişimler, klinik parametreleri ortaya çıkarmaktadır.

Mikrositoz: 80 fL'den düşük MCV (Mean Cell Volume, Ortalama Eritrosit Hacmi) değeri ile karakterize küçük eritrositleri ifade eden bir terimdir.

Hipokromi: 27 pg/h'den düşük MCH (Mean Cell Hemoglobin, Ortalama Hücre Hemoglobini) değeri ile karakterize, bir eritrositin içerisindeki ortalama hemoglobin miktarını ifade eden bir terimdir. Ortalama Hb miktarı düşünce kan yaymasında daha soluk eritrosit boyanması görülür (Şekil 2.6).

Anizositoz: Talasemi majörde artmış RDW (Red cell Distribution Width) değeri ile karakterize, eritrositlerin normal boyutlarından sapma farklılığını ifade eden bir terimdir. RDW değeri genellikle MCV ile beraber bir anlam ifade etmektedir. Örneğin yüksek RDW değeri, demir eksikliği anemisinde düşük MCV ile beraber, görülürken, folat eksikliğine bağlı anemide yüksek MCV ile takip edilir. Normal aralığı %11,5-%14,5 arasındadır (şekil 2.6, <http://ehealthhall.com/microcytosis-symptoms-causes.html>, Erişim tarihi: 19.06.2016).



Şekil 2.6: Bir kan yaymasında, mikrositoz, anizositos ve hipokromi örneği.Orjinal şekilden modifiye edilmiştir (<http://ehealthhall.com/microcytosis-symptoms-causes.html>)

BT, erişkin bireyde 2 alfa ve 2 beta zincirinden oluşan erişkin hemoglobin tetrameri içerisinde (HbA1) yer alan beta globin zincirinin sentezindeki azalma (beta+) veya

yokluk (beta0) ile karakterize bir hastalıktır (DJ ve JB, 2001). Yeterli beta globin zinciri sentezi ise beta++ ile gösterilir. Klinik ve hematolojik parametrelere bağlı olarak 3 ana sınıfta incelenirler, Beta Talasemi Major (BTM), Beta Talasemi Intermedia (BTI), Beta Talasemi Taşıyıcılığı (BTT). BTT, klinik olarak semptom göstermeyen (asemptomatik) ve spesifik hematolojik parametreler gösterirken, BTM'de şiddetli kan transfüzyon bağımlılığı söz konusudur. BTI ise klinik ve genotipik olarak çok heterojen bir grup olup, hastalar asemptomatik olabileceği gibi BTM'de olduğu gibi sık sık kan transfüzyonuna ihtiyaç duyabilirler. Beta talasemide klinik, alfa zincirlerinin non-alfa zincirleri ile dengesiz eşleşme oranıyla ilişkilidir (Cao ve Galanello, 2010). Eritrositler içerisinde eşleşmemiş alfa zincirleri çökelti oluşturarak hücre membranında oksidatif hasara bağlı olarak hücre ölümü ile ilişkili inefektif eritropoyeze sebep olurlar (Olivieri N, 2001). Beta globin zincirinde azalma olduğu zaman genellikle beta benzeri olan gama globin ve/veya delta globin zincirlerinde bir artış görülür ve sırasıyla bu hemoglobinler fetal hemoglobin (HbF) ve erişkin globülin 2 (HbA2)'yi oluştururlar (Tablo 2.3).

BTM'li 2 yaşından küçük çocuklarda, şiddetli mikrositik-hipokromik anemi (düşük MCV ve MCH), ılımlı sarılık ve karaciğer-dalak büyümesi ile karakterizedirler ve tedavi almazlarsa gelişme geriliğinin yanı sıra etkisiz eritropoyez gösterirler (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1426/> Erişim tarihi: 19.06.2016, Tablo 2.2) .

Yeni doğan taraması şeklinde yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile 12 aylıktan daha küçük çocuklarda hemoglobin elektroforezine göre belirgin patern verirler (Tablo 2.3, (Telen MJ ve RE, 1999))

Tablo 2.2:Yaygın kullanılan kan parametrelerine göre beta talaseminin sınıflandırılması.

Eritrosit Endeksi	Normal		Hasta	Taşıyıcı
	Erkek	Kadın	BTM	BTT
MCV	89.1±5.01	87.6±5.5	50-70	<79
MCH (pg)	30.9±1.9	30.2±2.1	12-20	<27
Hemoglobin (g/dL)	15.9±1.0	14.0±0.9	<7	Erkek: 11.5-15.3 Kadın: 9.1-14

Orjinal tablodan modifiye edilmiştir.

Tablo 2.3:Bir yaşından küçük çocuklarda HPLC sonuçları ile beta talaseminin sınıflandırılması.

Hb	Normal	Etkilenmiş		Taşıyıcı
		β^0 -Tal Homozigot	β^+ Tal Homozigot veya β^+/β^0 Birleşik Heterozigotlar#	BTT
HbA1 ($\alpha^2 \beta^2$)	96%-98%	0	10%-30%	92%-95%
HbF ($\alpha^2 \gamma^2$)	<1%	95%-98%	70%-90%	0.5%-4%
HbA2 ($\alpha^2 \delta^2$)	2%-3%	2%-5%	2%-5%	>3.5%

#Birleşik heterozigotluk durumunda aynı genin komşu bölgelerinde farklı genomik değişimler söz konusudur. Orjinal tablodan modifiye edilmiştir.

2.1.6 Beta Talasemi Majör Hastalarında Klinik Seyir

BTM'nin klinik profili ilk 6 ay ila 2 yaş arasında izlenir. Etkilenmiş kişilerde soluk cilt rengi ve gelişme geriliği gözlenirken ilerleyen zamanlarda kısa süreli tekrarlayan ateşler, ishal ve splenomegaliye bağlı abdomen büyümesi görülür. Bu yaşlarda tanı koyulabilir ve tedaviye başlanırsa 95-105 g/L Hb değeri hedeflenerek 11 yaşına kadar normal gelişme sağlanabilir (Rund ve Rachmilewitz, 2005).

11 yaşından sonra ise kişilerde aşırı demir yüküne bağlı kalp (dilate kardiyomiyopati), karaciğer (fibroz ve siroz), endokrin bez (diyabet, paratiroid, tiroid, hipofiz ve daha az görülmekle beraber adrenal bez) sistemik hastalıkları ile seksüel gelişmede gecikme gibi bir çok hastalık izlenebilir. Dalak büyümesi, kronik hepatit, HIV enfeksiyonu, venöz tromboz, osteoporoz gibi diğer komplikasyonlar da ilerleyen dönemlerde gözlenebilir. En sık görülen ileri dönem hastalıkları kardiyomiyopatiler ve kemik gelişimindeki anomaliler (genu valgum, kranifasiyal abnormaliteler) yer almaktadır (Rund ve Rachmilewitz, 2005). Düzenli transfüzyon ve doğru şelasyon kullanımı ve gelişen teknoloji sayesinde son 10 yılda kardiyak mortalitelerde belirgin bir azalma gözlenmiştir (Borgna-Pignatti ve ark., 2004; Modell ve ark., 2008; Telfer ve ark., 2006).

2.1.7 Beta Talasemi İntermedia Hastalarında Klinik Seyir

BTM'deki kadar ağır demir yüklemesi söz konusu olmadığı için demir yüklemesine bağlı komplikasyonlar ya daha ileri yaşlarda görülür ya da daha az şiddetli görülür. Karaciğer ve dalak büyümesi, orta dereceden şiddetli dereceye değişebilen kemik deformiteleri, osteopeni ve osteoporoz, kolelitiazis-sarılık gibi komplikasyonlar BTI'da daha az şiddetle izlenir (Cappellini ve ark., 2012; Eldor ve Rachmilewitz, 2002). Trombotik komplikasyonlar ise BTM'de %0.9 oranında gözlenirken BTI'da %4 oranında gözlenir (Aessopos ve ark., 2007; Succar ve ark., 2011). Splenektomi ve düzenli transfüzyon tedavisinin trombolitik komplikasyonlar açısından koruyucu rolleri oldukları gösterilmiştir (Taher ve ark., 2010).

2.1.8 Talasemide Transfüzyon ve Şelasyon

Hedeflenen Hb miktarını 9-10 g/dL miktarlarında tutabilmektir. Her bir transfüzyonda yaklaşık olarak 200 mg demir vücuda girer ve demir metabolizmasını düzenlemek için karaciğerde üretilen Hcpidin, BTM hastalarındaki inefektif eritropoyez sebebiyle yeteri kadar sentezlenemez. Karaciğerde fazla biriken demir sebebiyle barsaklardan ihtiyaçtan daha fazla demir Emilimi gerçekleşir. Bu ise karaciğer, kalp ve dalakta daha büyük tahribata yol açar (Ganz, 2011; Gardenghi ve ark., 2010). Bu sebeptir ki demir şelasyon tedavisinde kardiyak ve hepatik disfonksiyonun önüne geçilmeye çalışılır. Düzenli şelasyon tedavisinin T2 myokardiyal ve sol ventrikül fonksiyonunu geliştirdiği gösterilmiştir (Cassinerio ve ark., 2012; Maggio ve ark., 2012).

Tedavide deferasirox (Exjade) ve deferiprone (ferriprox) gibi oral şelatörlerin yanı sıra deferoxamine (desferal) gibi intravenöz veya subkutenoz uygulanan şelatörler kullanılmaktadır (Angelucci ve ark., 2008; Olivieri ve ark., 1998).

2.1.9 Hematopoyetik Kök Hücre Nakli (HKHN)

Allojenik (aynı türün farklı bireylerinden) olarak yapılan ve kemik iliği, periferel kan veya göbek kordonundan gerçekleştirilebilmektedir. Genellikle kişinin kardeşinden veya yakın akrabalarından yapılmaktadır. İlk başarılı allojenik kök hücre nakli 1982 yılında 16 aylık erkek çocuğa 16 yaşındaki kız kardeşinden kemik iliği transferi (Chaisue ve ark.) şeklinde yapılmış ve başarılı olmuştur (Thomas ve ark.,

1982). HLA uyumlu kardeşlerden alınan ve erken dönemde gerçekleştirilen (18 yaşından önce) kemik iliği veya göbek kordonundaki kök hücre nakillerinde başarı oranı daha yüksek bulunmuşken, dolaşımdaki periferik kan kök hücre nakillerinde GVHD (Graft Versus Host Disease, Vericinin T hücrelerinin alıcıda ciddi komplikasyonlar oluşturması) sebebiyle daha düşük nakil başarı oranı saptanmıştır. Nakil başarısı, demir yükü yüksek olmayan ve demir yüküne bağlı ciddi komplikasyonları olmayan hastalarda daha yüksek bulunmuştur (Angelucci ve ark., 2014). 18 yaşından sonra genellikle transplantasyondan çok fazla verim alınamaz ve çok az sayıda merkez ileri yaş nakilleri gerçekleştirir. Bilinen transplantasyona bağlı ölüm oranı %25 olarak açıklanmıştır (Gaziev ve ark., 2005). Tüm dünya genelinde uzun süreli takip sonucu elde edilen verilere göre 1980 ve 1990'lar ile kıyaslandığında, hastaların %90'dan daha fazlası hayatta iken bunların %80'inde hastalıkla ilişkili semptomlar ortadan kalkmıştır (Angelucci, 2010).

2.1.10 Beta Talasemi'de İnsan Gen Tedavi Çalışmaları

Günümüzde BTM'de en etkili tedavi şekli HKHN olarak uygulansa da HLA uyumlu donör ihtiyacı, donörün periferik kanındaki kök hücreleri mobilize etmek için kullanılan GCSF'in (Granülosit Colony Stimulating Factor) yan etkileri, girişimsel kemik iliği toplama işlemi, göbek kordonundaki kök hücre sayısının yeterli olmaması gibi bazı kısıtlayıcı faktörler alternatif yeni tedavi yöntemleri geliştirilmesi ihtiyacını ortaya çıkarmıştır (Bernaudin ve ark., 2007; Hsieh ve ark., 2014; Locatelli ve ark., 2013; Walters ve ark., 2000).

Viral vektörler kullanılarak gerçekleştiren gen tedavi stratejileri arasında BTM hastalığını tedavi etmek için geliştirilen BB305 Lenti Globin isimli vektör, 28 Ekim 2015 tarihinde uluslararası, çok merkezli, açık uçlu-tek doz uygulamalı, devam eden, Faz1/2 The NorthStar Study (HGB204) çalışmasında, 13 transfüzyon bağımlı BTM hastasına uygulanmıştır (Marina Cavazzana ve ark., 2015). American Society of Hematology (Chaouch ve ark.) Kongresi'nce paylaşılan 9 tane hastanın 6 aylık takip verilerine göre;

Beta0 fenotipine sahip olan 4 hastada transfüzyon bağımlılığı %33-%100 değişen oranlarda azalmışken, düzeltilmiş ortalama hemoglobin üretimi 5.0g/dL olarak

sağlanmıştır. Beta0 olmayan 5 hastada ise transfüzyon bağımlılığı ortadan kaldırılmıştır.

Tek merkezli açık uçlu devam eden HGB205 çalışmasındaki 4 BTM hastası ile başlanmış ve 2 tanesi (1201 ve 1202)'nin uzun süreli takip verilerine göre; 1201 numaralı hastada 23.4 aylık transfüzyon bağımsızlığı sağlanırken toplam hemoglobin miktarının 7.9 g/dL'si düzeltilmiş hemoglobine ait olmak üzere 10.8 g/dL'ye çıktığı, 1202 numaralı hastada ise 20.1 aylık transfüzyon bağımsızlığı sağlanmış ve 10.3 g/dL'si düzeltilmiş hemoglobine ait olmak üzere 13.1 g/dL toplam hemoglobin miktarı sağlanmıştır (<http://www.bluebirdbio.com/medical-professionals/>, Erişim tarihi: 20.06.2016). Geleneksel gen terapi yöntemlerindeki düşük gen modifikasyon etkinliği, insersiyonel mutagenез riskleri, olası immün cevap ve yüksek maliyet farklı gen terapi yaklaşımlarını ortaya çıkarmıştır (Cottle ve ark., 2016) . Bunlar arasında son yıllarda bulunan ve invitro çalışmaları umut vaat eden CRISPR-Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9) genom düzenleme yöntemi henüz invivo insan faz çalışmalarında kullanılmamıştır (Masuda ve ark., 2016; Niu ve ark., 2016; Shariati ve ark., 2016).

BTM'nin kliniğini girişimsel olmayan yöntemlerle iyileştirmeyi amaçlayan yaklaşımlardan bir tanesi de, oksijen afinitesi yüksek olan fetal hemoglobin (HbF) miktarının artırılmasıdır.

2.1.11 Beta Talasemi'de Farmakolojik Çalışmalar

Erişkin bireylerin çoğunda toplam hemoglobinin yalnızca %1'i kadarı fetal hemoglobin (HbF) molekülünden oluşur (Thein ve Craig, 1998). Bazı bireylerde ise HbF miktarı daha fazla olabilmektedir. Özellikle hiç transfüzyon almamış fakat beta talasemi mutasyonları saptanmış, kliniği daha ılımlı seyreden bazı durumlarda ise HbF miktarının yüksek olduğu gözlenmiş olup bu durum HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin, Fetal Hemoglobinin Kalıtsal Devamlılığı) olarak bilinmektedir (Bollekens ve Forget, 1991; Ottolenghi ve ark., 1982). Böylece HbF miktarını artırmayı hedefleyen yeni bir araştırma alanı gündeme gelmiş olup HbF seviyeleri düşük bireyler ile yüksek bireyler arasındaki farklılığı genom düzeyinde

açıklayabilmek amacıyla tüm genomla ilişkili çalışmalar (GWAS; Genome Wide Association Studies) başlatılmıştır (Maurano ve ark., 2012).

2.2 Fetal Hemoglobin Miktarını Düzenleyen Yeni Mekanizmalar

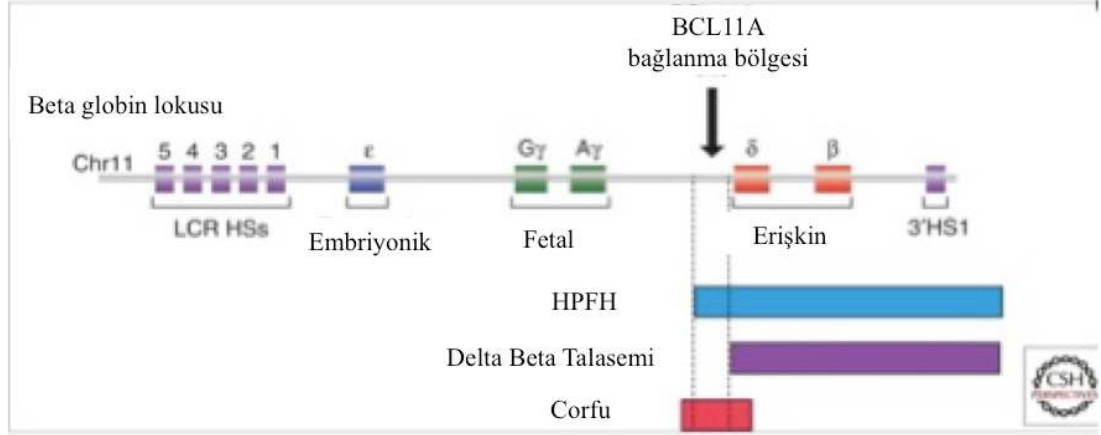
Organizmanın gözlemlenebilir fenotipik özelliklerini (quantitative trait), kabaca farklı kromozom bölgelerindeki (lokus) genomik değişiklikler ile ortaya çıkarmayı amaçlayan GWAS çalışmalarında anlamlı bulunan lokuslar için QTL (Quantitative Trait Locus) adı verilmektedir (Falconer ve Mackay, 1996). Araştırmaların sonunda en az 4 genomik bölge ile ilişki kurulmuş olup (Borg ve ark., 2010; Farrell ve ark., 2011; Lettre ve ark., 2008; Menzel ve ark., 2007; Nuinoon ve ark., 2010; Solovieff ve ark., 2010; Thein ve ark., 2007; Uda ve ark., 2008) bunlar;

1. 11p15.4'deki HBB ve olfaktör reseptör genlerini içeren bir bölge (%10.2)
2. 6p23.3'deki HBS1L-MYB (HBS1-like translational GTPase - v-myb avian myeloblastosis viral oncogene homolog) arasındaki intergenik bölge olan HMIP (%19.4)
3. 2p16.1'deki BCL11A (B-Cell CLL/Lymphoma) lokusu (%15.1)
4. 19p13.13'deki KLF1 (Krüppel Like Factor 1) geni olarak verilmektedir.

İlk 3 tanesinin farklı etnik gruplarda, HbF seviyesindeki %20-%50'lik değişiklikten sorumlu olduğu gösterilmiştir (Bae ve ark., 2012; Cardoso ve ark., 2014; Makani ve ark., 2011; Nguyen ve ark., 2010; Wonkam ve ark., 2014).

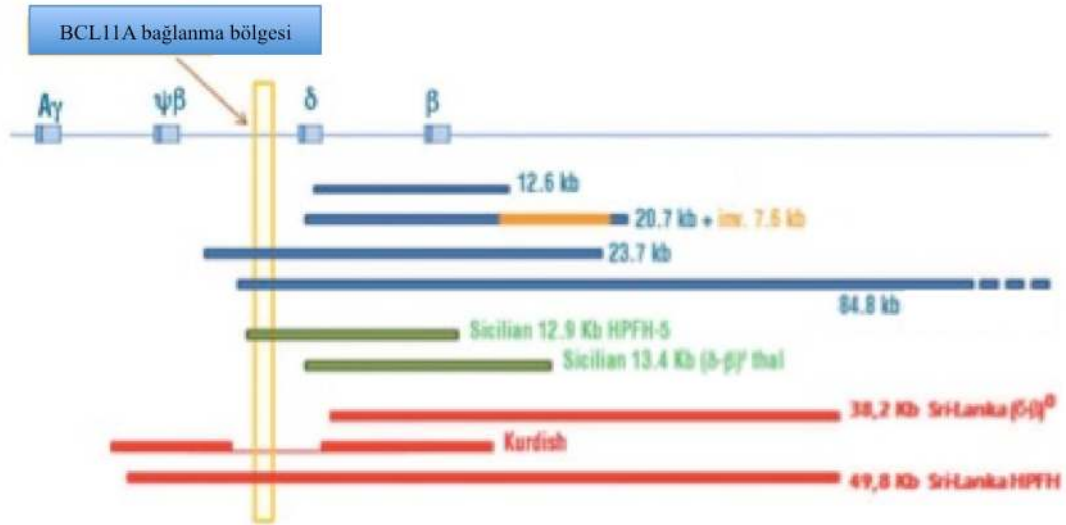
HBB lokusu içerisinde *HBG2* (G Gama Globin) promotorunda yer alan -158 C>T değişimi (rs7482144), normal bireyler ile orak hücre anemisi veya BT hastalarındaki yüksek HbF seviyeleri ile ilişkili bulunduğunu gösteren değerli çalışmalar bulunmaktadır (Gilman ve Huisman, 1985; Labie ve ark., 1985; Leonova ve ark., 1996; Sampietro ve ark., 1992). Bu bölge için gösterilen fonksiyonel durumun yokluğunda, bu bölgenin *HBB* lokusundaki LCR (Locus Control Region) içerisinde yer alan 5'DNase HS4 bölgesi ile benzer haplotip durumlarında olduğu gösterilmiştir (Neishabury ve ark., 2013; Neishabury ve ark., 2012; Weatherall, 2012).

Fetal hemoglobin sessizleştirilmesinde görevli proteinlerden biri olan *BCL11A* ile *HBB* lokusunda yer alan HS bölgeler bazı HPFH'a sebep olan delesyonlar gösterilmiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: HBB lokusundaki gama globin sessizleştirilmesini gösteren model: Delta globin dizisinin yaklaşık 3000 baz önüne yer alan ve çeşitli delesyonel tipte HPFH'a neden olan *BCL11A* bağlanma bölgesini göstermektedir (Sankaran ve Orkin, 2013). Orjinal makaleden modifiyede edilmiştir.

BCL11A bağlanma bölgesini içermeyen delesyonlardaki HbF yüksekliği, bu bölgeyi içeren delesyonel HPFH'a sebep olan mutasyonlara göre daha düşüktür (Craig ve ark., 1994; Ghedira ve ark., 2013). Şekil 8'de farklı tipte HPFH' a sebep olan delesyonel tip mutasyonlar gösterilmiştir.



Şekil 2.8: *BCL11A* bağlanma bölgesine göre bazı delesyonel HPFH tiplerinin gösterimi (Ghedira ve ark., 2013). Orjinal makaleden modifiye edilmiştir.

2.2.1 *BCL11A* Varyantları ile HbF Arasındaki İlişki

Sardinya'da en sık görülen, HBB'de 39. kodonda stop kodonu oluşturan ve Beta0'a sebep olan homozigot mutasyona sahip fakat yine yüksek HbF seviyesi ile ilişkilendirilmiş *XmnI* (C>T) polimorfizmi olmayan 74 BTM ve 52 BTI olgusunda *BCL11A*'nın 2.intronunda yer alan rs11886868 C alelli taşıma ile yüksek HbF

seviyesi arasında yüksek ilişki bulunmuştur. Aynı çalışmada orak hücre anemisi ile HPFH'li hastalarda da C alelinin yüksek HbF ile ilişkisi kurulmuş olup sadece 1242 kişilik orak hücre anemi grubunda C aleli taşımanın %8.1 oranında HbF'i etkilediği gösterilmiştir. *BCL11A*'daki tüm varyasyonların HbF seviyesindeki değişikliklerin %15.1'inden sorumlu olabileceği gösterilmiştir (Menzel ve ark., 2007; Uda ve ark., 2008).

Rs1188668'den başka en çok çalışılan bir diğer SNP ise rs4671393 (A>G)'dir. Afrikan-Amerikan kökenli 1275 ve Brezilya'lı 350 orak hücre anemisi bireyde yapılan çalışmada en yüksek bağlantı gösteren varyasyonun sırasıyla %14.1 ve %9 olarak rs4671393 olduğu gösterilmiştir (Galarneau ve ark., 2010; Lettre ve ark., 2008). Tunus kökenli 148 orak hücreli anemi hastasının bu iki SNP açısından değerlendirilmesi sonucunda ise her bir SNP kendi içerisinde yüksek HbF seviyesi ile ilişkili olup ikisi arasından daha fazla bağlantı gösteren SNP, rs4671393 G aleli olarak bulunmuştur. En fazla HbF varyasyonu ise rs1188668 CT ve rs 4671393 GG olma durumunda gözlenmiştir (Chaouch ve ark., 2016).

Etnik kökene bağlı olarak farklı *BCL11A* varyantlarının HbF seviyesi üzerine farklı etkileri olmakla beraber Afrika-Amerikan kökenli orak hücreli anemi hastalarında başka bir varyant olan rs10128556 ile *XmnI* polimorfizmi karşılaştırıldığında, *XmnI* polimorfizminin bu etnik kökene sahip hastalarda HbF seviyesi üzerine bir etkisinin olmadığı da gösterilmiştir. Öyle ki bu grupta HbF'i modüle eden en önemli varyantın rs4671393 yerine rs10128556 olduğu da gösterilmiştir (Galarneau ve ark., 2010). HbF üzerine etkisi olduğu bilinen ve farklı populasyonlarda farklı önem derecesine sahip 12 adet *BCL11A* SNP'si için kısa süre içerisinde tanımlanmasını sağlayan yöntemlerin geliştirilmesi kaçınılmaz olmuştur (Fanis ve ark., 2014)

Dört yaşından önce yılda en az 8 transfüzyon alan/almayan talasemi hastalarını BTM/BTI şeklinde gruplandıran bir grubun yaptığı çalışmaya göre alfa talasemi mutasyonu ve *XmnI* polimorfizminden sonra *BCL11A*'daki rs1188668 C aleli taşıma durumunun BTI ile ilişkili olabileceği belirtilmiş olup diğer tüm bilinen modifiye edici bölgelerin hesaba katılması durumunda talaseminin tipini belirlemede %83.2 oranında belirleyici olduğu gösterilmiştir (Badens ve ark., 2011).

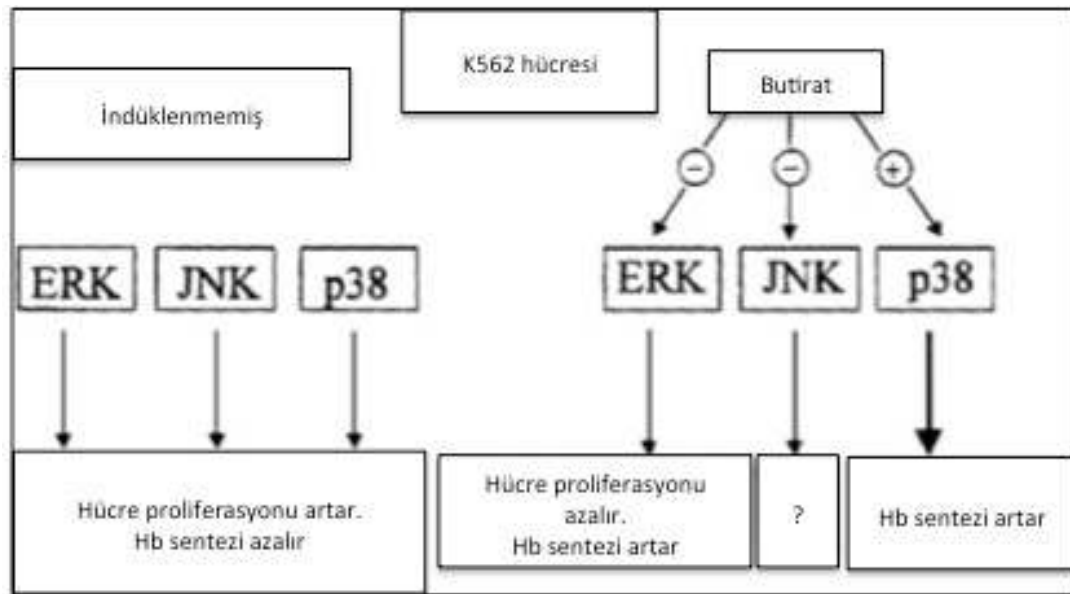
BCL11A'nın HBB lokusundaki HbF baskılayıcı özelliği, başlıca represör epigenetik modifikasyonlardan olan HDAC1/2 (Histon Deasetiaz) ve DNMT1 (DNA Metil Transferaz) olarak bilinen proteinler ile etkileşimlerinin bir sonucudur (Bauer ve ark., 2012; Shi ve ark., 2013; Trowbridge ve ark., 2009; Xu ve ark., 2013). Primer eritroid hücre kültürü deneylerinde lentiviral gen tedavi ile eritroid spesifik *BCL11A* knock-down çalışmalarında, gama globin sessizleştirilmesinin önüne geçildiği gösterilmiştir (Wilber ve ark., 2011). Bu gelişmeler doğrultusunda HbF represyonuna neden olan proteinlerin etkisini ortadan kaldırmaya yönelik farmakolojik çalışmaların sonucunda HDAC inhibisyonu yapan SCFA (Short Chain Fatty Acids, kısa zincirli yağ asitleri) türevleri ile DNA'nın hipometilasyonu sağlayan ilaçlar geliştirilmiştir. Bunlar arasında en çok bilineni Akut Myeloid Lösemi (AML) ve Miyelodisplastik Sendrom (MDS) tedavisinde de kullanılan 5-aza-2'deoxyctidine (Decitabine), DNA metilasyon inhibitörü olarak görev görmektedir (Kantarjian ve ark., 2006; Kantarjian ve ark., 2003). BTI hastalarındaki pilot çalışması başarılı sonuçlar verse de uzun dönemdeki toksisite potansiyeli yüzünden günümüzde decitabine, BTM tedavisinde tercih edilen bir ilaç değildir (Fathallah ve Atweh, 2006; Ley ve ark., 1982; Ley ve ark., 1983; Olivieri ve ark., 2011).

2.2.2 HbF indüksiyonu için HDAC İnhibitörlerinin Kullanımı

Hiperinsülinemiye maruz kalan diyabetik annelerin yeni doğan çocuklarının, yüksek doğal n-bütirik asit seviyelerine sahip olmaları sayesinde, normal hemoglobin değişim (switch) paterni göstermedikleri ve yüksek gama globin seviyelerine sahip olmaları, aynı zamanda bütirik asidin çocuklarda herhangi bir gelişme geriliğine sebebiyet vermemesi fetal globin ekspresyonu için güvenilir bir ajan olarak kullanılabilir olduğunu göstermiştir (Perrine ve ark., 1985). Daha sonraki yıllarda deney hayvanlarında, primatlarda, orak hücreli anemi ve talasemi hastalarının eritroid hücre kültürlerinde, sodyum butirat gibi bütirik asit türevlerinin denenmesi ve HbF'i artırıcı özelliklerinin yanı sıra gama globin ekspresyonunu artırma suretiyle alfa/non-alfa imbalansını %38 oranında düzelttiği gösterilmiştir (Perrine ve ark., 1989). Butirik asit türevleri arasında en güvenilir olanlarının talasemi ve orak hücreli anemi hastalarındaki faz 1 çalışmasında 3 farklı genotipe sahip BTM ve 3 orak hücre anemisi hastasına intravenöz infüzyonlar halinde uygulanan arjinin

butiratın minimal yan etki ile maksimum 7 haftalık sonuçlarına göre; HbF seviyesi %6-45 arasında değişen artış ve 10.2 g/dL'ya ulaşan hemoglobin seviyesine ulaşılmıştır (Perrine ve ark., 1993; Perrine ve ark., 1994). Bununla beraber, farklı kullanılış şekilleri olan bütirik asit türevlerinin uzun süreli terapötik etkileri bilinmediği için ve olası karsinojeik etkileri olabileceği düşünüldüğü için BTM hastalarında uzun süreli kullanımı hala soru işaretidir (Boosalis ve ark., 2001; Perrine ve ark., 2005).

Bütirat ve türevlerinin çeşitli tümör hücrelerinde in vitroda hücre farklılaşmasına neden olduğu bilinmekteydi (Witt ve ark., 2000). Hücre içi sinyal yollarındaki proteinlerin, bilinen görevleri ile karşılaştırıldığında farklılaşmadan sorumlu proteinler arasında önemli görevleri olduğu bilinen MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) ailesi üyelerinin, K562 lösemi hücre hattındaki çalışmalarında, butiratın ERK (Extracellular Signal Regulated Kinase) ve JNK (c-Jun N-Terminal Kinase) yolağının inhibisyonuna ve p38 MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) yolağının aktivasyonuna yol açarak eritroid hücre farklılaşmasını sağladığı (şekil 9) açıklığa kavuşturuldu (Witt ve ark., 2000). Hatta ERK ve p38 moleküllerinin HbF indüksiyonundaki antagonistik etkilerinin hem biyosentezi ve demir alımında da söz konusu olduğu gösterildi (Mardini ve ark., 2010).



Şekil 2.9: K562 hücrelerinde MAPK üyelerinin rolünü gösteren hipotetik model (Witt ve ark., 2000). Orjinal makaleden modifiye edilmiştir.

K562 hücrelerinde olduğu gibi BT hastalarının primer hücre hatlarından kurulan hücre kültürü deneylerinde, sodyum bütiratın yanı sıra, diğer bazı HDAC inhibitörleri olan hemin, trichostatin A, scriptaid ve apicidin gibi moleküllerin, p38 MAPK hücre içi sinyal yolağını kullanarak gama globin seviyesini artırdığı gösterilmiştir (Cao ve ark., 2004; Pace ve ark., 2003; Wei ve ark., 2007). Özellikle apicidin molekülünün diğer HDAC inhibitörlerinden daha düşük dozlarda istenilen cevabı vermesi, p38 MAPK sinyal yolağı ile diğer bir epigenetik yolak olan histon asetilasyonu sağlayan HAT (Histon Acetyl Transferase)/p300'ün aktivasyonuna sebep olduğu gösterilmiştir (Wei ve ark., 2007).

2.2.3 BCL11A'nın NuRD Kompleksi İle İlişkisi

BCL11A'nın primer eritroid hücrelerinin beta globin lokusunda, *GATA1* transkripsiyon faktörü ve içerisinde HDAC1/2 gibi proteinlerin bulunduğu represör özellikteki NuRD (Nucleosom chromatin Remodeling Deacetylase) kompleksi ile beraber bulunduğu kromatin immunopresipitasyon çalışmalarında gösterilmiştir (Sankaran ve ark., 2008). NuRD kompleksindeki varlıklarından dolayı HbF indüksiyonu için HDAC inhibiyonu hedef alınırsa bu HDAC'lerin HDAC1/2 olması gerektiği bildirilmiştir (Bradner ve ark., 2010).

2.2.4 Antioksidan Moleküllerin HbF İndüksiyonundaki Yeri

Talasemi tedavisinde önemli gelişmeler olsa da transfüzyon sonrası aşırı demir yüküne bağlı bazı doku hasarları durumu söz konusudur. Hücre membranı ile organel membranlarındaki demir yüküne bağlı olarak gelişen peroksidatif stres, özellikle karaciğer, hipofiz bezi, pankreas ve kalpte doku hasarına sebep olmaktadır (Doroshov ve ark., 1980; Halliwell ve Gutteridge, 1990). Hücredeki oksidan ve antioksidant denge oksidatif hasarın şiddetini belirler. Eritrosit ve plazma içerisindeki E vitamini yetersizliği ile superoksit dismutaz (Gaziev ve ark.) gibi enzimlerin eksikliği yetersiz peroksidant korumaya sebep olmaktadır (Giardini ve ark., 1985; Suthutvoravut ve ark., 1993). E vitamininin BTM hastalarında oral ve parenteral uygulamalarını karşılaştıran bir çalışmada parenteral E vitamini uygulamasının eritrositleri oksidatif hasardan koruyabildiği gösterilmiştir (Giardini ve ark., 1985). Beta talasemide, E vitamini, fermente papaya ürünleri, C vitamini (askorbat), curcumin gibi çeşitli antioksidan moleküller reaktif oksijen türlerinin

oluşumuna bağlı oksidatif stresi engellemede başarılı olsalar da, hastalarda anemik tablonun uzun süreli iyileşmesinde etkili olamamışlardır (Amer ve ark., 2008b; Dissayabutra ve ark., 2005; Prus ve Fibach, 2010). Demir şelasyonu yapan ajanlar oksijen radikalleri oluşumuna sebep olan demiri uzaklaştırdıkları için ayrıca antioksidan olarak kabul edilebilirler (Prus ve Fibach, 2010). Son dönemde şelatörler ile oral N-Asetil Cystein veya E vitamini birlikte kullanımı oksidan stresi azalttığı gibi, 3 aylık tedavi sonrasındaki, transfüzyon öncesi kan parametrelerinde de iyileşmeyi sağladığı gösterilmiştir (Ozdemir ve ark., 2014; Rachmilewitz ve ark., 2005).

Son dönemde yayınlanan güncel bir makalede ise lotus bitkisi (*Nelumbonucifera gaertn*) yaprağından elde edilen bir özütün güçlü antioksidan, anti hemolitik ve demir şelasyonu etkisi yaptığı gösterilmiştir (Fibach ve Rachmilewitz, 2010; Pangjit ve ark., 2016). Fetal hemoglobin indüksiyonu için kullanılan bir çok molekülün hücre içi stres sinyallerine cevap veren özellikle p38 MAPK gibi sinyal yolları ile gama globin miktarını artırdıkları gösterilmiştir (Tablo 2.4, Mabaera, West et al. 2008).

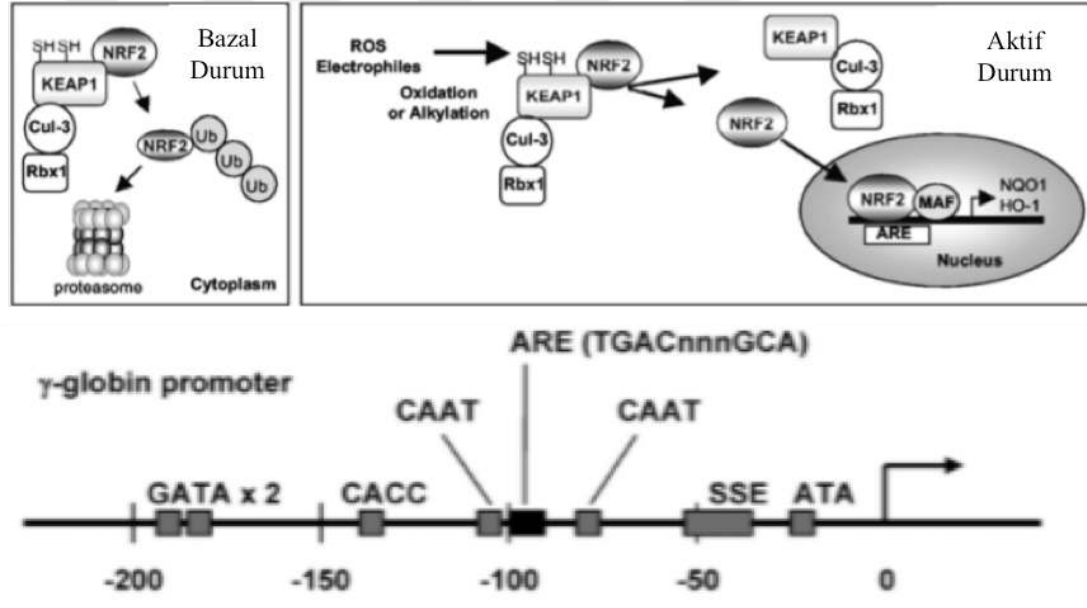
Tablo 2.4: HbF indüksiyonu için kullanılan bazı ajanlar ve etki mekanizmaları

Ajan	Sınıf	İşe karışan yolak
5-Azasitidin	DNMT inhibitör	cAMP
Hidroksiüre	Sitotoksik	cAMP
	NO/cGMP	
	P38 MAPK	
Anisomisin	Sitotoksik	P38 MAPK
Butirat	SCFA	P38 MAPK
	ROS/p38 MAPK	
	cAMP	
Valproat	SCFA	P38 MAPK
Apicidin	HDAC	P38 MAPK
Scriptaid	HDAC	P38 MAPK
Trichostatin A	HDAC	ROS/P38 MAPK
Talidomid	IMiD	ROS/P38 MAPK
CysNO	NO vericisi	NO, cGMP
Rapamisin	mTOR inhibitör	mTOR

Tabloda SCFA (kısa zincirli yağ asitleri, Short Chain Fatty Acids, ayrı bir sınıf olarak ele alınmış olup HDAC içerisinde bulunmaktadır.) NO:Nitrik Oksit, ROS:Reactive Oxygen Species, cAMP:cyclicAdenosine Mono Phosphate, cGMP:cyclic Guanosine Mono Phosphate, IMiD:İmmun

Modulator Drug, mTOR: murine Target of Rapamycin, DNMT: DNA Metil Transferaz (Mabaera ve ark., 2008).

HbF indüksiyonu yapabilen 2 farklı molekülün (Angelicin, Resveratrol), NRF-2/ARE Nuclear factor erithroid-Related Factor 2/ Antioxidant Response Element) yolağını aktive etme özellikleri (Kode ve ark., 2008; Lampronti ve ark., 2003; McMahon ve ark., 2001; Rodrigue ve ark., 2001) hesaba katıldığında p38'den başka hücre içi sinyal yollarının HbF indüksiyonundan sorumlu olabileceği gösterilmiş oldu (Macari ve Lowrey, 2011). Lowrey ve arkadaşlarının yaptığı çalışmaya göre yüksek antioksidan aktiviteye sahip tert-Butylhydroquinone (tBHQ) isimli molekül K562 hücrelerinde en etkili HbF indüksiyonunu sağlayan molekül olarak seçilmiş ve hücre içinde NRF-2 yolağını aktive ettiğini göstermişlerdir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10: NRF-2/ARE antioksidan hücre içi yolağı (Orjinal makaleden modifiye edilmiştir).

Normal koşullarda altında KEAP1 proteini tarafından proteazomlarda inaktif halde kalması sağlanan NRF-2 proteini, elektrofiller veya reaktif oksijen türlerinin, KEAP1'in NRF2 üzerindeki baskısını ortadan kaldırması sayesinde, NRF2'nin nükleusa gitmesini sağlarlar. Nükleusa giden NRF-2, MAF proteinleri ile beraber promotöründe ARE dizisi (TGACnnnGCA) taşıyan antioksidan özellikteki NADPH-quinone oxireductase 1 (NQO1), glutamate-cysteine ligase (GCL), and glutathione S-transferase (GST) gibi proteinler ile 7/7 baz eşleşmesi sayesinde gama globin promotörüne bağlanarak fetal globin ekspresyonu sağlar (Macari ve Lowrey, 2011). SSE: Stage Selector Element.

Resveratrolün farklı çalışmalarda NRF-2 sinyal yolağını çalıştırdığı, K562 ve primer eritroid hücrelerde gama globin ekspresyonu sağladığı bildirilmiştir (Fibach ve ark., 2012; Ungvari ve ark., 2010). 2012 yılında Fibach ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada 7 talasemi hastasının primer hücre kültüründe gerçekleştirdikleri resveratrol ile HbF indüksiyonu çalışmasında (tablo 2.5) hücre içi sinyal yollarına herhangi bir atıf yapılmadan antioksidan yanıt ve HbF indüksiyonu parametreleri

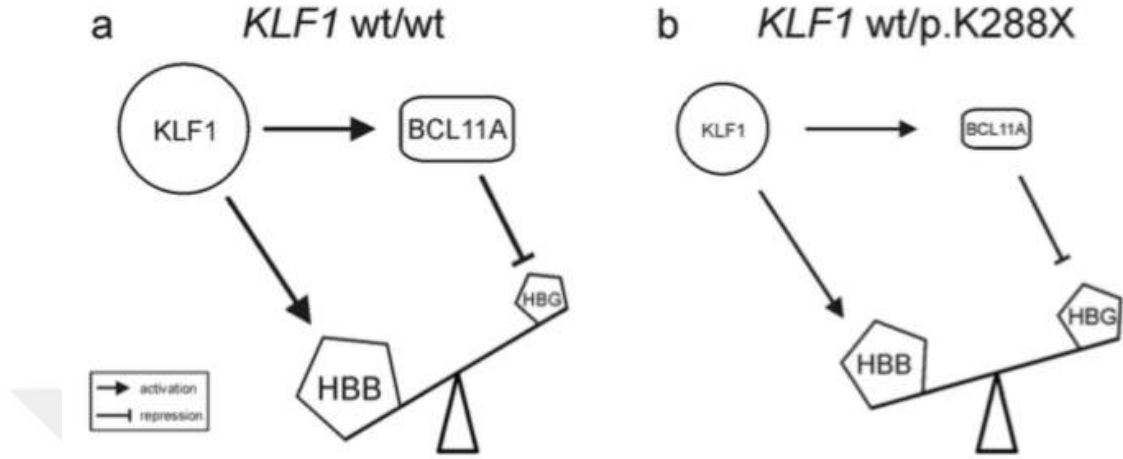
değerlendirilmiş ve resveratrolün BTM hastalarında hastaların genotiplerine bağlı olarak kullanılabileceği öne sürülmüştür (Fibach, Prus et al. 2012).

Tablo 2.5:Resveratrolün farklı genotipteki BT hastalarının eritroid hücreleri üzerindeki etkisi (Fibach, Prus et al. 2012).

Hasta No	Genotip	HbF (%)		HbF (Kat İndüksiyon)
		-	40 uM Resveratrol	
1	$\beta^{*39}/\beta^{*IVS1-110}$	14.21	20.27	1.44
2	β^{*39}/β^{*39}	8.08	18.02	2.24
3	$\beta^{*39}/\beta^{*IVS1-6}$	13.07	19.31	1.47
4	$\beta^{*39}/\beta^{*IVS1-110}$	10.25	39.27	3.83
5	$\beta^{*39}/\beta^{*IVS1-6}$	21.15	27.01	1.27
6	$\beta^{*IVS1-6}/\beta^{*IVS1-110}$	1.97	11.42	5.78
7 ^a	$\beta^{*39}/\beta^{*IVS1-110}$	3.35	5.85	1.75
7 ^a	$\beta^{*39}/\beta^{*IVS1-110}$	3.5	9.07	2.59
7 ^a	$\beta^{*39}/\beta^{*IVS1-110}$	3.1	6.51	2.11

Bu çalışmalara ek olarak son yıllarda K562 hücrelerinde doz bağımlı olarak resveratrol kullanımının p38 sinyalleşmesini artırıp, ERK1/2 sinyalleşmesini azaltarak antiproliferasyona yol açtığı da ayrıca gösterilmiştir (Wu ve ark., 2015).

2010 yılında Nature Genetics dergisinde yayınlanan bir çalışmada, Malta kökenli 10 HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin) tanıli bireylerin ailelerine gidilip HbF'i modifiye eden diğer bölgelerin varlıkları linkaj çalışmalarını takiben tüm genom fonksiyon analizleri ile araştırıldı ve Krüppel Like Factor 1 (*KLF1*) geninde p.K288X mutasyonunun heterozigot varlığı ilk defa olarak HbF modifiye eden yeni bir gen olarak tanımlandı. Dahası *KLF1*'in *BCL11A*'yı aktive ettiği ve HbF indüksiyonunu baskıladığı gösterildi (Borg ve ark., 2010). *KLF1*'in sadece sağlam bir kopyasının *BCL11A* üzerindeki yetersiz aktivasyon etkisi (haploinsufficiency) yüksek HbF seviyesi ile ilişkilendirilerek HbF indüksiyonu için yeni bir HbF indüksiyon hedefi olarak *KLF1* etkisinin hafifletilmesi gerektiği önerildi (şekil 2.11). *KLF1*'in mutasyonlarının (9 tane), sağlıklı bireylerde daha önceki yıllarda herhangi bir patolojiye yol açmadan sadece Lutheran kan grupları üzerine etkileri (Singleton ve ark., 2008) ve fonksiyon olarak, konumuz olan *HBB* spesifik bir transkripsiyon faktörü olarak beta globin (*HBB*) promotorundaki CACCC dizilerine bağlandığı biliniyordu. Öyle ki aynı promotor bölgedeki 2 farklı mutasyonun (-101 C>T, -101 C>G), silent (sessiz) beta talasemi ile ilişkisi kurulmuş ve bireylerde HbA1 ekspresyonda düşüklük HbA2 ekspresyonlarında kısmi artışlar gözlenmişti (Gonzalez-Redondo ve ark., 1989; Moi ve ark., 2004; Ristaldi ve ark., 1990).



Şekil 2.11: Yetişkinlerde *KLF1*'in beta benzeri globin ekspresyonunu düzenlediğini gösteren model: Bu modele göre wt: wild type, yabani tip. a) *KLF1*, tercihi olarak *HBB* genini aktivasyonunu sağlarken (Donze ve ark., 1995; Wijgerde ve ark., 1996) *BCL11A* üzerinden HBG'yi sessizleştirir b) K288X mutasyonunu taşıyan bireylerde hem *KLF1* hem de *BCL11A* ekspresyonu düşeceğinden HBG üzerindeki sessizleşme özelliği büyük oranda ortadan kalkar ve HBG genleri eksprese olur (Borg ve ark., 2010).

Aynı yıl *KLF1* genindeki p.E235K mutasyonu, bir başka grup tarafından CDA'lı (Congenital Dyserythropoietic Anemias) 2 hastada de novo olarak bulunmuştur. Ayrıntılı analiz edilen 1 hastada HbA1 ve HbA2 toplamı %55.5 iken HbF %37.3 olarak bulunmuştur ve erişkin bireyde hiç olmaması gereken Hb Portland (%2.2) gözlenmiştir. Ayrıca, ilgili hastada aynı gende daha önce patojenik olmadığı gösterilen heterozigot p.S102P mutasyonu da gözlemlendi (Arnaud ve ark., 2010).

2011 yılında yapılan bir çalışmada ise *KLF1* mutasyonlarının sınırda (borderline) HbA2 seviyesi ile ilişkili olduğu ortaya çıkarılmış olup, 145 bireyin 52'sinde (%35.9) *KLF1* mutasyonu, bunların 42'sinde (%80.8) de p.Ser270X mutasyonu bulunmuştur. p.T327S and p.T280_H283del mutasyonları (tablo 2.6) ise ilk kez bulunmuştur (Perseu ve ark., 2011). Atipik beta talasemi taşıyıcılarında (MCV ve MCH normal olup HbA2 seviyesi 3.3-3.8 arasında olan) farklı *KLF1* mutasyonlarının (şekil 2.13) dikkate alınması gerektiği gösterilmiş olup aynı çalışmada *BCL11A* rs11886868, *HBS1L-MYB* rs9399137 ve *XmnI* varyasyonları ile yüksek HbF arasında bir ilişki bulunamamıştır (Perseu ve ark., 2011).

Tablo 2.6:Farklı *KLF1* mutasyonları ile HbA2 ve HbF arasındaki ilişki.

Mutasyon	p.Ser270X	p.Thr280_His283del	p.Arg319GlufsX34	p.Leu326Arg	p.Thr327Ser	p.Lys332Gln
Birey Sayısı	42	2	4	1	2	1
HbA2 % ort	3,6	3,7	3,5	4	3,4	3,8
HbF % ort	2,1	1,25	2,2	0,7	1,8	0,9

Orjinal makaleden modifiye edilmiştir.

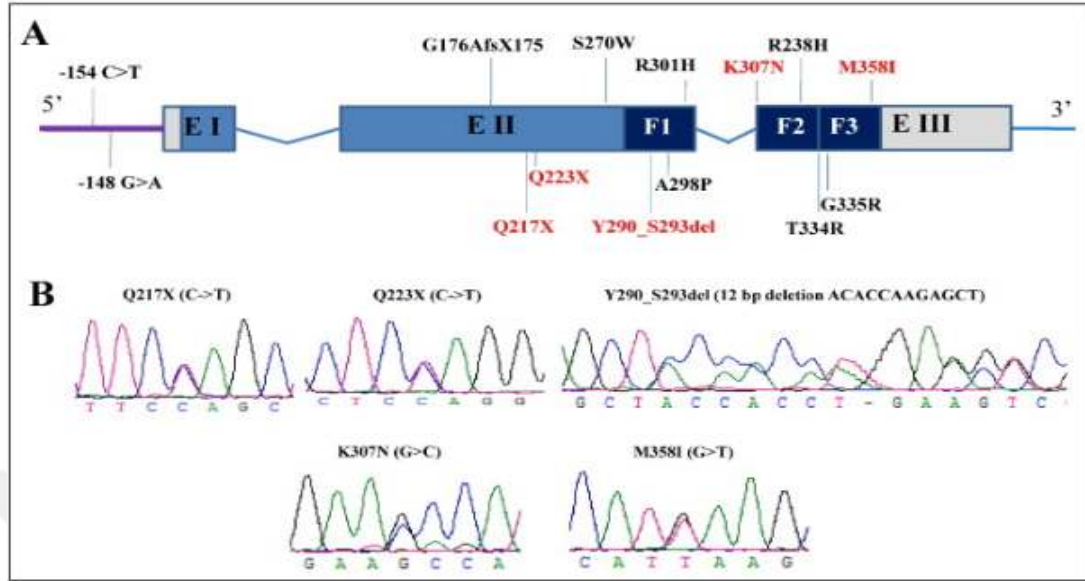
Aynı yıl yapılan başka bir çalışmada ise HbF seviyesi %1.5-%25 arasında değişen, farklı etnik orjinli 131 yetişkin bireyin 11'inde (%8.4), 10 yeni *KLF1* mutasyonu saptanmış olup mutasyon bulunan bireylere ait hematolojik parametreler tablo 2.7'de verilmiştir (Gallienne ve ark., 2012). *KLF1* promotor bölge mutasyonunun (-148 G>A) ve birleşik heterozigot tipte farklı mutasyonlarının yüksek HbF değeri ile ilişkisi ve farklı bir fenotipik etki olarak yüksek eritrosit içi çinko protoporfirin seviyesi ile ilişkisi, ilgili çalışmalarda gösterilmiştir (Radmilovic ve ark., 2013; Satta ve ark., 2011).

Tablo 2.7:*KLF1* mutasyonu taşıyan bireylerde genotip-fenotip ilişkisi

Etnik Grup	Hb	Eritrosit	MCV	MCH	HbA2	HbF	HBB	Alfa	KLF1
Britanya	14.3	6,18	69,4	23,1	3,3	3	HPFH	N/N	K54fsX9
Pakistan	12.7	4,72	79,4	26,9	2,4	14,6	HPFH	N/N	R301C
Afrika	10.6	5,43	61	19	2,4	6,6	HPFH	(-3.7/N)	R301H
Afrika	12.1	4,74	81	25,5	2,8	7,3	HPFH	(-3.7/N)	W313C
Tayland	12.6	5,51	75,2	22,8	2,4	5,9	HPFH	(-3.7/N)	R328H
Slovakya	13.0	4,29	91,7	30,3	3,2	8,7	HPFH	N/N	R328L
Afrika	10.7	4,24	80,4	25,2	3,3	6,8	HPFH	(-3.7/N)	T334K
Afrika	8.9	BD	73	23	3,8	6,7	HPFH	(-3.7/N)	*
Vietnam	13.7	5,38	77,6	25,4	2,8	9,5	HPFH	(-3.7/N)	G176fsX179/L51R
Kore	13.8	5,34	78	24,5	4	1,7	HPFH	(-3.7/N)	G176fsX179
Tayland	11.8	5,80	62,1	20,4	BD	11	EE	N/N	T334R
Nijerya	12.7	6,00	67	21	BD	20,3	SS	(-3.7/-3.7)	*

HPFH:Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin, EE:HbE mutasyonlu homozigot hasta, SS:Orak hücreli homozigot hasta olup son hasta 55 kişilik orak hücre hasta grubundam seçilmiştir.BD:Belirli Değill.Orjinal makaleden modifiye edilmiştir.

Güneydoğu Asya'da en yaygın *HBB* mutasyonu olan (Fucharoen ve Winichagoon, 2011) ve varyant hemoglobinler arasında sınıflandırılan ve Beta+ fenotip ile ilişkilendirilen HbE (Cod 26, GAG>AAG), HbF ve HbA2 değerleri yüksek HbE homozigot mutasyonlu 575 birey ve heterozigot 278 bireyde yapılan güncel bir çalışmada (Tepakhan ve ark., 2016), bilinen 9 *KLF1* mutasyonunun yanı sıra 5 yeni *KLF1* mutasyonu (Q217X, Q223X, Y290_S293del, K307N, and M358I) daha tanımlanmıştır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12: KLF1 Mutasyonlarını gösteren diyagram A:Bilinen 9 *KLF1* geni mutasyonu ile yeni bulunan 5 mutasyonunun *KLF1* genindeki lokalizasyonları ile (B) yeni bulunan mutasyonların DNA dizi analiz sonuçları. E:Ekzon F:KLF1'in DNA'ya bağlandığı zinc finger (çinko parmak) domeynleri (Tepakhan ve ark., 2016)

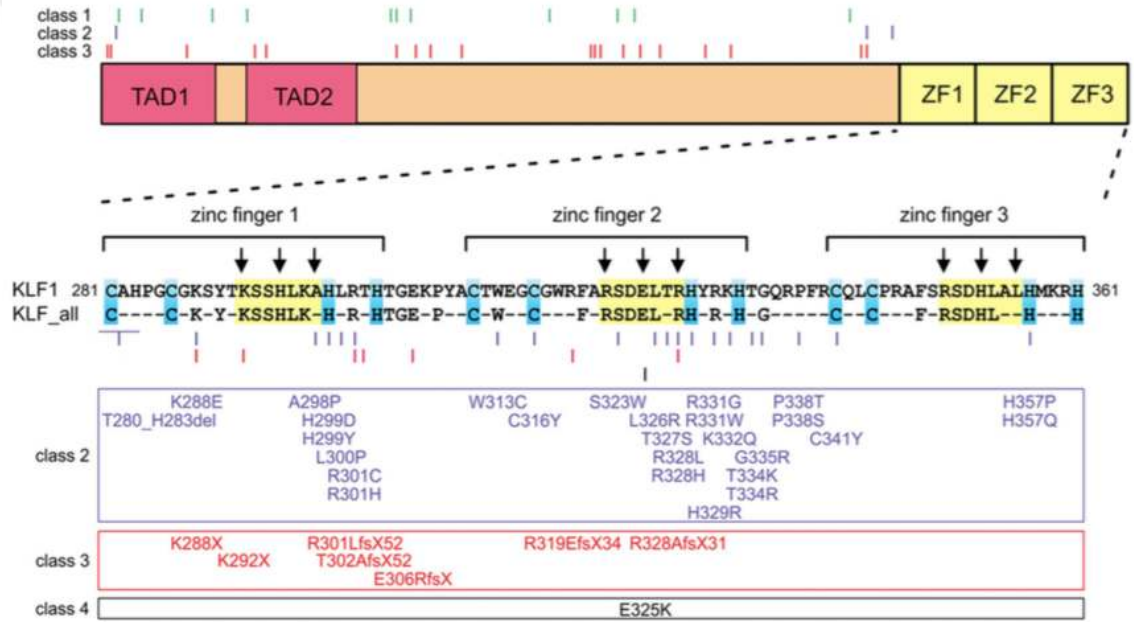
Aynı çalışmada, *XmnI* polimorfizmi, *BCL11A*'daki rs4671393, *HBS1L-MYB* (rs4895441) ve (rs9399137) polimorfizmleri de değerlendirilmiş olup HbE hastalarındaki farklı HbF ekspresyon profillerine, *KLF1* ile diğer 4 modifiye edici varyasyonun birlikte etkisi olabileceği gösterilmiştir.

KLF1'in HbF artırıcı etkisinin 2010'daki keşfinden sonra son 6 yıl içerisinde 65'den fazla *KLF1* varyantı farklı fenotipler ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar arasında HPFH, farklı Lutheran kan grupları oluşumu, şiddetli diseritropoietik anemi, hidrops fetalis gibi fenotipler bulunmaktadır. *KLF1*'in alfa ve beta talasemideki kan parametrelerine etkisi Şekil 2.14'de özetlenmeye çalışılmıştır (Perkins ve ark., 2016). Yapılan çalışmaların toparlandığı bir derlemede *KLF1* varyantları sebep olduğu fenotipik özelliklere göre 4 farklı sınıfa (Class1, Class2, Class3, Class4) ayrılmıştır;

Sınıf 1 varyantları: *KLF1*'in DNA'ya bağlanma domeyni dışında meydana gelen ve genellikle yanlış anlamlı mutasyonların (aminoasit değişikliğine sebep olan) sebep olduğu, Trans Aktivasyon Domeyni (TAD) içerisindeki mutasyonların ise *KLF1* aktivitesini engelleyebileceği mutasyonlardır.

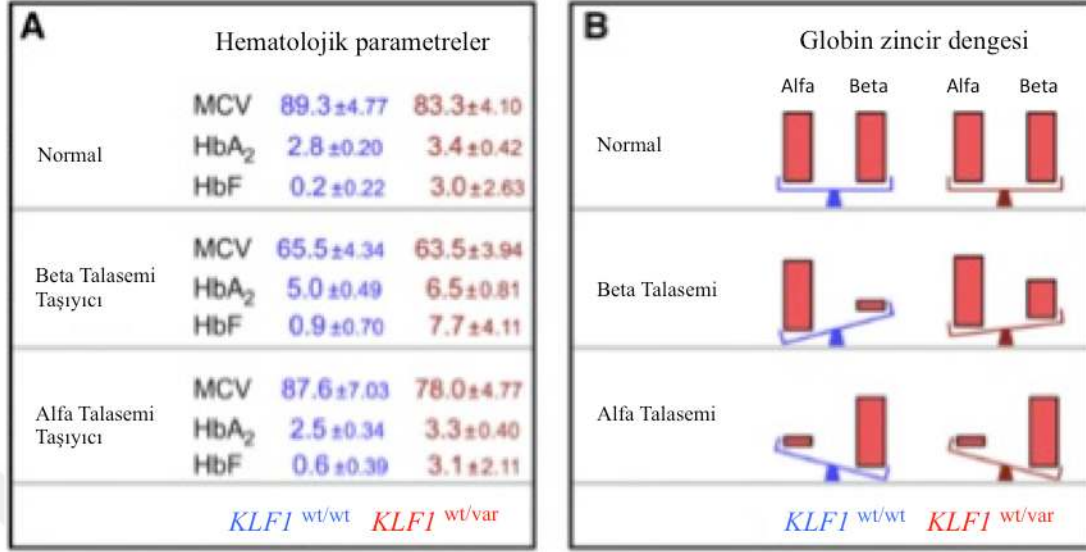
Sınıf 2 varyantları: KLF1'in azalmış aktivasyonuna sebep olan genellikle yanlış anlamlı mutasyonların ve nadiren topyekün çerçeve kaymasına neden olmayan (in frame) delesyonları içerisinde bulunduğu grupta birleşik heterozigot mutasyonlara ev sahipliği yapar.

Sınıf 3 varyantları: Güdük protein oluşumuna bağlı disfonksiyonel durum açığa çıkar. Daha çok stop kodonu oluşturan veya çerçeve kaymasına sebep olan mutasyonlar (frame shift) bu gruptadır. Bu gruptaki KLF1 proteini DNA bağlanma bölgesi içermez. Diğer alel normal olduğunda ılımlı fenotipe yol açar (Şekil 2.13).



Şekil 2.12: KLF1'in fonksiyonel domeynleri ile literatürde rapor edilen KLF1 varyantlarının lokalizasyonları. TAD: Trans aktivasyon Domeyni. ZF: Zinc Finger (Çinko Parmak) DNA bağlanma bölgesi (Perkins ve ark., 2016).

Sınıf 4 Varyantı: KLF1'in çinko parmak 2 (Zinc Finger 2) bölgesindeki oldukça korunmuş 325. amino asitte de novo olarak meydana (p.E325K) gelen ve şiddetli fenotiplere yol açan gruptur.



Şekil 2.14:Sınıf 2 ve Sınıf 3 *KLF1* varyantlarının hemoglobinopatilerin klinik şiddeti üzerine etkisi (Perkins ve ark., 2016). wt:wild type, var:variant. Orjinal makalesinden modifiye edilmiştir.

Beta talasemiyi ilgilendiren kısmı ile ilgili olarak, tam kan sayımında düşük MCV ve MCH ile yüksek retikülosit, sınırda (borderline) HbA₂, yüksek HbF seviyesi durumunda (Şekil 2.14) Sınıf 2 ve Sınıf 3 *KLF1* varyantlarının aranması gerektiği söylenebilir (Perkins ve ark., 2016).

2.2.5 *HBB* Lokusunun Epigenetik Düzenlenmesi

Biyolojide epigenetik, DNA dizisinde bir değişiklik olmadan gen ekspresyonundaki düzenlenmeyi ifade eden bir terim olup epigenetikteki major mekanizmalar DNA metilasyonu, histon post translasyonel modifikasyonları ve mikro RNA'lar olarak öne sürülmektedir (Ginder, 2015; Xu ve ark., 2016). DNA metilasyonu epigenetik regülasyonda en çok çalışılan mekanizmalardan birisidir ve genellikle transkripsiyonel inaktivasyon ile sonuçlanır. DNA metilasyonu yapan enzimler arasında DNMT1 (DNA Metil Transferaz1) inaktivasyonu yapan ajanlardan, decitabin ve 5 azasitidinin HbF indüksiyonundaki rolleri daha önceki bölümlerde ayrıntılı olarak açıklanmış (Ley ve ark., 1982) ve hangi hücre içi yolları kullandıkları tartışılmıştı (Mabaera, West et al. 2008). DNA metilasyonunu tanıyan moleküller olarak beta globin lokusunda en çok ismi geçen proteinler aynı zamanda NuRD kompleks elemanları olan MBD (MethylCytosine Binding Domain) proteinleri olan MBD1, MBD2, MECP2 ve MBD4 proteinleridir. Bunlar arasında ise MBD2-NuRD-Mi2Beta üzerinde yapılan fonksiyonel çalışmalar sonucunda

Mi2Beta'nın *BCL11A* ve *KLF1*'in pozitif regülatörü olduğu ve kısmi olarak engellendiği durumlarda HbF miktarında artış olduğu gözlenmiş ve Mi2Beta HbF indüksiyonu için potansiyel hedef moleküllerinden biri haline gelmiştir (Amaya ve ark., 2013).

DNA metilasyonu yapan veya bu metilasyonu tanıyan proteinlerin inaktivasyonundan başka olmak üzere, gen sessizleştirilmesinden sorumlu olan bir grup histon metilasyonu yapan proteinleri inaktive eden ajanların da HbF indüksiyonu yaptıkları gösterilmiştir (Krivega ve ark., 2015).

Histon metilasyonu yapan bir diğer grup protein ailesinden PRMT (Protein Arginin Methyl Transferase) grubundan PRMT1 ve PRMT5 ile FoP (Friends of PRMT1) inhibisyonu da beklenildiği gibi HbF indüksiyonu ile sonuçlanmıştır (He ve ark., 2013; van Dijk ve ark., 2010).

BCL11A'nın gama globin sessizleştirmesinde birlikte bir kompleks halinde bulunduğu CoREST (CoRepressor Element1 Silencing Transcription Factor) içerisinde yer alan LSD1 (Lysine Spesifik Demethylase1)'in enzimatik inhibisyon çalışmalarında da HbF indüksiyonu gözlenmiştir (Xu ve ark., 2013).

Mikro RNA'lar (miRNA), post-transkripsiyonel gen sessizleştirilmesinde epigenetik regülasyonun önemli bir basamağı olarak görev alırlar (Castel ve Martienssen, 2013). *HBB*'inin pozitif regülatörü olan *c-MYB*'i baskılayan miR-15a ve miR-16-1 miRNA'larından başka (Sankaran ve ark., 2011b), benzer şekilde gama globini baskılayan *BCL11A*'yı inhibe eden miR-486-3p son dönemde bulunan HbF indüksiyonunu sağlayan hedef bir molekül olarak tanımlanmıştır (Lulli ve ark., 2013). 2009 yılında kord kanındaki miRNA'lar ile erişkin bireydeki miRNA'lar arasındaki ekspresyon farklılıklarını araştıran bir çalışmada let-7 miRNA'sının erişkin örneklerde belirgin bir şekilde artmış olduğu görüldü (Noh ve ark., 2009). Bu çalışmadan 1 yıl önce Let-7 öncül miRNA (pre-let-7 miRNA)'sının parçalanmasını sağlayan *LIN28B* tanımlandı (Heo ve ark., 2008). Fonksiyonel çalışmalarla ikisi arasındaki ilişki kurulduğunda, *LIN28B*'nin fetal dönemine spesifik bir aktivator olduğu ve ayrıca let-7'nin *BCL11A*'nın pozitif regülatörü olduğu ortaya çıkarıldı.

LIN28B aracılı let-7 inhibisyonu, *BCL11A*'yı inhibe ettiğinden, HbF indüksiyonunu sağlamıştır (Lee ve ark., 2013).

Sonuç olarak HbF indüksiyonunda, *BCL11A* ve *KLF1* gibi iki majör transkripsiyon faktörlerinin, DNA ve histon metilasyonu, histon deasetilasyonu ve miRNA modülasyonu gibi epigenetik mekanizmalar ile veya epigenetik mekanizmalardan bağımsız olarak yadsınamaz HbF indüksiyonu özellikleri bulunmaktadır. P38 MAPK hücre içi sinyal yolağı ile farklı bir yolak olan antioksidan sinyal yolaklarının birlikte veya yalnız başlarına işe karıştığı durumlarda HbF indüksiyonu meydana gelmektedir.

Biz de projemizde HbF seviyeleri farklı olan Beta Talasemi hastalarında *BCL11A*, *KLF1* ve *XmnI* genotiplemesinin ardından, bireysel genotip ile indüklenebilir HbF seviyesindeki ilişkiyi 2 farklı farmakolojik ajan olan resveratrol ve sodyum butirat ile gerçekleştirmeyi amaçladık. Bu sayede hangi kimyasalın hangi hücre içi yolağını daha çok kullanarak ne kadar HbF indüksiyonu yapabildiği, hastaların periferel kanlarından alınan örneklerdeki eritroid öncülü hücrelerin 21 gün süren, 2 fazlı primer eritroid hücre kültürü yöntemi ile (Fibach ve Prus, 2005) açığa çıkarılacaktır.

3.GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Hasta Seçimi

Proje çalışmamıza, Antalya Adem Tolunay Talasemi Kan Hastalıkları Merkezi ve Antalya Kan Hastalıkları Vakfında takip edilen, hasta seçim kriterlerine (18 yaşın üzerinde, beta talasemi majör fenotipli, beta globin gen mutasyonları belirlenmiş, kan transfüzyonu alan, yüksek HbF'e sahip), uyan bilgilendirilmiş onam formu doldurtulan (EK-1) 30 beta talasemi majör hastasından transfüzyon öncesi olmak üzere, heparinli ve K2EDTA'lı tüplere 3'er ml periferik kan alınması ile başlandı. Bu kan örneklerinin her birinden DNA eldesi ve periferik kan tek nükleuslu hücre (peripheral blood mononuclear cell; PBMC) izolasyonları yapıldı.

Hemoglobin elektroforezi ile (Biorad Variant™ Hemoglobin Testing System II) yüksek HbF değerine sahip olduğu belirlenen hastalardan 2 farklı tüpe 3'er ml kan örneği alındı ve aynı gün heparinli tüplerden histopaque (Sigma) ile PBMC izolasyonu ve K2EDTA'lı tüpten DNA izolasyonları ticari kitler (Invitrogen) ile gerçekleştirildi.

3.1.1 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) İzolasyonu

1. 15 ml'lik falkonda bulunan steril 3 ml 1XPBS solüsyonu (pH:7.2-7.4) üzerine 3 ml heparinli kan eklendi ve karışımın homojenize olması sağlandı.
2. Başka bir 15 ml falkon içerisine 3 ml histopaque (Sigma 10771, Lot RNBD2583) eklendi.
3. 3 ml histopaque içerisine 6 ml'lik kan-PBS karışımı yavaşça eklendi.
4. Toplam 9 ml'lik karışım 400-500 g'de 30 dk. santrifüj edildi.
5. Ara opak tabakada bulunan PBMC'ler dikkatlice temiz bir falkon içerisine aktarıldı ve karışım 10 ml'ye PBS ile tamamlandı.
6. 200 g'de 10 dk santrifüj edildi.
7. Süpernatant atıldı. Pellet 5 ml PBS ile resüspanse edildi.
8. 200 g'de 10 dk santrifüj edildi.
9. Süpernatant atıldı. Pellet 1-2 ml %10 DMSO, %10 serum içeren sıvı antibiyotiksiz sıvı RPMI-1640 (Gibco, Lot 1581467) besiyerinde

cryopendorflar içerisinde -20' °C de 1 gece ve -80 °C de uzun süreli olarak saklandı.

3.1.2 Periferik Kandan DNA izolasyonu

Pure Link Genomic DNA Kits (Invitrogen) ile hastaların transfüzyon öncesi periferik kanlarından genomik DNA (gDNA) izolasyonları aşağıdaki şekilde yapıldı.

1. Su banyosu veya ısıtıcı blok (heat-block) önceden 55 °C'ye ayarlandı.
2. EDTA'lı tüplerden steril 1.5 ml'lik ependorflara alınan 200 µl periferik kan üzerine kitle beraber gelen 20'şer µl Proteinaz K ve RNaz A eklendi. Pipetaj yapıp 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
3. Üzerine 200 µl PureLink Genomic Lysis/binding Buffer eklendi ve vortekslendi.
4. 55 °C'de 10 dk inkübasyon yapıldı.
5. Üzerine 200 µl %96'lık etanol eklendi. 5 sn vortekslendi.
6. 640 µl'lik karışım filtreli kolonlara eklendi ve 10.000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
7. Toplama kabı atıldı ve yeni toplama kabı üzerindeki eski filtreli tüpün içerisine etanol ile hazırlanmış 500 µl yıkama tamponu (Washing Buffer, WB1) eklendi.
8. 10.000 g'de 1 dk santrifüj edildi.
9. Dökelti atıldı, filtreli tüpün üzerine 500 µl yine etanol ile hazırlanmış WB2 eklendi.
10. Maksimum hızda 3 dk santrifüj edildi.
11. Filtreli tüp steril 1.5 ml'lik ependorfa aktarıldı ve 100 µl elüsyon tamponu ilave edildi.
12. Oda sıcaklığında 60 sn beklendi ve maksimum hızda 60 sn santrifüj edildi.
13. Filtreli tüp atıldı ve 100 µl'lik örnek bulunduran örnek kalitelendirme için spektrofotometrede değerlendirildi.
14. Örnekler PZR kuruluncaya kadar -20 °C'de saklandı.

3.1.3 *XmnI* rs7482144 C>T Polimorfizmi için Genotipleme

Tablo 3.1'de verilen primer çiftleri ile PZR yapıldı ve 641 baz çiftlik (bç) ampikon için NEB (New England BioLabs Inc.)'in *XmnI* restriksiyon enzimi ile genotipleme

yapıldı. Buna göre, toplam 25 µl'lik reaksiyon hacmi için distile su ile tamamlanmak üzere; 500 ng amplikon, 10 unite *XmnI* enzimi, 2.5 µl 10x NEBuffer karışımı kullanıldı. 37 °C'de 15-45 dk enzim kesimi gerçekleştirilen örnekler %2'lik agaroz jelde elektroforez işlemine tabi tutuldu ve UV-transilluminatorde görüntülendi. 418 bp ve 223 bp'lik kesim örneklerinin varlıklarına göre genotiplleme yapıldı. Doğrulama için 10 örneğe DNA dizileme işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tablo 3.1: *XmnI*, *BCL11A* ve *KLF1*'in genotiplenmesinde kullanılan primer dizileri

<i>XmnI</i> polimorfizmi için	İleri Primer:5'-GAACTTAAGAGATAATGGCCTAA-3' Geri Primer:5'-ATGACCCATGGCGTCTGGACTAG-3'
<i>BCL11A</i> rs11886868 varyantını içeren bölge için	İleri Primer:5'-CATGGATGAATCCCAGAATC-3' Geri Primer:5'-CGTCCACCAGTCTAGAAAG-3'
<i>KLF1</i> geni promotor bölge ve 1.ekzon için (PE1)	İleri Primer:5'-TTTGACTTGGCTTTGGACAC-3' Geri Primer:5'-GACCCCAAGATCTGTGACTG-3'
<i>KLF1</i> geni 2. ekzon için (E2A)	İleri Primer:5'-CAAAGCCTCTGCGTCAGAG-3' Geri Primer:5'-GGGGTACCCGGACAGTAG-3'
<i>KLF1</i> geni 2. ekzon için (E2B)	İleri Primer:5'-TCCTCGGGTGGCTACTTC-3' Geri Primer:5'-GTCTCGGCTATCACACCTG-3'
<i>KLF1</i> geni 2. ekzon için (E2C)	İleri Primer:5'-GGGAGGAAGAGGACGATGA-3' Geri Primer:5'-GGACAAGGAAGCCATAAGC-3'
<i>KLF1</i> geni 3. ekzon için (E3)	İleri Primer:5'-GGACATGACTGGGCAGAC-3' Geri Primer:5'-GGTTTACAGCCTCCTGCC-3'

Ekzon 2 primerlerinin çoğalttığı bölgelerin bir kısmı birbiri ile kesişecek şekilde dizayn edilmiştir. Liyofilize halde Sigma veya Sentegen firmalarından gelen tüm primerler 100 µM stok solüsyon olacak şekilde steril distile su ile hazırlanmıştır.

3.1.4 *KLF1* ve *BCL11A* (rs11886868) için Genotiplleme

KLF1 geni 5 bölge halinde ekzon ve klasik intron kırpılma bölgelerini içerecek şekilde farklı 5 primer çifti aracılığı ile *BCL11A*'daki rs11886868 ise bu bölgeyi içerecek şekilde bir çift primer ile çoğaltıldı ve sekanslandı.

KLF1 sırasıyla promotor ve exon1 bölgesi (PE1), ekzon 2 iki farklı primer çifti halinde Ex2A ve Ex2B olacak şekilde, ekzon 3 ise tek bir çift primer ile çoğaltıldı (Tablo 3.2 ve Tablo 3.3).

Tablo 3.2: PZR ile çoğaltılan bölgelerin amplikon uzunlukları, bağlanma sıcaklıkları ve MgCl₂ ihtiyaçları.

Bölge-Gen	Amplikon Uzunluğu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı	[MgCl ₂] mM
<i>XmnI</i>	641	56	1.5
<i>BCL11A</i>	208	58	1.5
PE1	395	58	1.5
EX2A	619	57.9	0.5
EX2B	254	58	1.5
EX3	750	61.5	1.5

KLF1 E2C bölgesi 986 baz çifti uzunluğunda olup Touch-down PZR yöntemiyle çoğaltılmıştır. Buna göre PZR koşulları; 2.5 mM MgCl₂ konsantrasyonunda ve 95 °C’de 2 dk ön denatürasyon, 95 °C’de 10 sn. ve her döngüde 0.5 °C’de düşmek üzere 62 °C’den 55 °C’ye değişen bağlanma sıcaklıklarında 20 sn., 72 °C’de 45 sn. olmak üzere 14 döngüyü takiben 95 °C’de 10 sn., 55 °C’de 20 sn., 72 °C’de 45 sn. den oluşan 28 döngüden oluşmaktadır. Final uzama aşaması ise 72 °C’de 10 dk yapılmıştır.

Tablo 3.3: PZR reaksiyonu içindeki malzemeler ve miktarları.

Distile Su	10X tampon	25 mM MgCl ₂	10 uM Primerler	dNTP karışımı	Polimeraz (5u/ µl)	gDNA (25-50 ng/ µl)
Son hacim 25 µl	2.5 µl	0.5-1.5 µl	1’er µl	1 µl	0.2 µl	1 µl

3.1.5 PZR Örneklerinin Temizlenmesi

İlgili amplikon uzunluklarında PZR ürünleri elde edildikten sonra, GeneJET PCR Purification Kit kullanılarak temizleme işlemi yapıldı.

1. Eşit hacimde PZR örneği ile bağlama tamponu (binding buffer) pipetaj yapıldı.
2. Renk sarıya döndükten sonra filtreli kolon üzerine toplam 40 µl’lik karışım yüklendi.
3. 1dk 13.000 rpm’de santrifüj edildi.
4. 400 µl yıkama tamponu (washing buffer) eklendi ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi.
5. Toplama tüpü içeriği boşaltıldı ve kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirildi. Son kez aynı koşullarda yıkama yapmadan boş santrifüj yapıldı.

6. Filtreli kolon steril 1.5 ml ependorfa alındı ve üzerine 35 µl ayrıştırma tamponu (elüsyon buffer) eklendi.
7. Aynı koşullarda santrifüj edildi ve örnekler kullanılana kadar saklandı.

3.1.6 DNA Dizileme Reaksiyonu

Dizileme reaksiyonu Tablo 3.4’de verilmiştir.

Tablo 3.4:Dizileme reaksiyonunda kullanılan malzemeler ve miktarları.

Distile Su	5x Tampon	Tek yönlü primer	Temiz ürün	PZR	Big Dye karışımı
2 µl	2 µl	2 µl	2 µl		2 µl

Dizileme reaksiyonu Gradient Palm Cyclyer Cyler cihazında, 96 C’de 1 dk ön denatürasyonun ardından 25 her bir döngü 96’de C 10 sn, 50 C’de 5 sn, 60 C’de 4 dk olmak üzere 25 defa ve son olarak +4 C’de bekleme aşamalarından oluşmaktadır.

Reaksiyon bittikten sonra ise son temizleme işlemi sephadexs G-50 (GE Health Care) aracılığıyla yapılmıştır. Buna göre,

1 gr sephadex başına 14 ml dH₂O en az 20 dk çalkanma işlemine tabi tutulmuş ve hemen arkasından +4 C’de en az 30 dk bekletilmiştir. Yükleme yapılacağı zaman filtreli kolonların üzerine 650 µl ilave edilmiş ve 5000 rpm’de 2 dk santrifüj edilmiştir. Toplama tüpü içeriği boşaltıldıktan sonra filtreli kolon tekrar yerleştirilmiş ve üzerine 10 µl’lik sekans reaksiyonu örneği yüklenmiştir. Aynı koşullarda santrifüjden sonra toplama tüpünde biriken sıvı 96 well-plate’in daha önceden belirlenen kuyucuklarına yüklenmiştir. Plate 10 sn düşük devirde döndürüldükten sonra 16 kapırlı ABI 3130 XL cihazına tanıtılmış ve dizileme sonucu için cihaz çalıştırılmış ve kapiller elektroforez işlemi başlatılmıştır.

Dizileme işlemi sonuçlarına ait veriler MySequence adlı yazılım programında değerlendirilmiş ve normal insan genomuna karşı NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) aracılığı ile karşılaştırılmıştır.

3.1.7 İstatistik-Analiz

Bulunan varyasyonların HbF değeri üzerine etkileri SPSS 20 ile gerçekleştirildi.

3.2 K562 Hücre Hattında HbF İndüksiyon Çalışmaları

K562 hücreleri BCR-ABL ekspresyonu gösteren bir KML (Kronik Myeloid Lösemi) hastasının immortalize edilmiş eritrolösemi hücreleridir (Andersson ve ark., 1979; Liu ve ark., 2003a). Bipotansiyel özellikteki bu hücreler, hücre kültürü ortamına ilave edilen ajanlara bağlı olarak hemoglobinizasyon gösteren eritroid veya başka özellikler gösteren megakaryositik hücrelere farklılaşabilmektedir (Lockhart ve ark., 1996). Bu sebeptendir ki lösemi gelişimi (lökogenezis) veya embriyonik-fetal globin ekspresyonu çalışmalarında sıkça kullanılır. Beta talasemi ve orak hücre anemisi gibi hastalıklarda fetal globin gen ekspresyonu için yeni terapötik ilaç keşfi çalışmalarında en çok kullanılan hücre hattı modelidir (Brand ve ark., 2004; Forget, 1998; Schultheis ve ark., 2002). Benzidin boyama işlemi ise hücrelerdeki hemoglobini göstermek için kullanılan bir işlemdir (Hafner ve ark., 1995; Orkin ve ark., 1975). K562 hücreleri fetal dönemdeki tüm globin genlerini eksprese edebilirken erişkin beta globin geni ekspresyonu göstermezler (Rutherford ve ark., 1981; Rutherford ve ark., 1979)

K562 Hücre Kültürü

K562 hücrelerinin çoğalabileceği komplekt sıvı besiyeri (cRPMI-1640) ortamının hazırlanması.

500 ml sıvı L-Glutamin içeren RPMI-1640 (Gibco, Katalog No:11875001)

56 ml FBS (Fetal Bovine Serum) (Gibco, Katalog No: 10270106).

5.6 ml penisilin streptomisin (Biological Industries, Katalog No: 03-033-1B).

5.6 ml 200mM L-glutamin (Gibco, Katalog No:25030024).

Soğuk zincir ile gelen laboratuvarımızda sıvı azotun buhar fazında muhafaza ettiğimiz K-562 (ATCC® CCL-243™) hücre hattına ait örnek aşağıdaki anlatıldığı gibi çözdürüldü:

1. Hücrelerin bulunduğu orjinal cryovial 1,5 dk süre içerisinde 37 C'ye ayarlanmış su banyosunda çözdürüldü.

2. Dekontaminsayon için tüpün ağzı %70'lik alkol ile temizlendi.
3. Hemen içerisinde 9 ml cRPMI-1640 besiyeri bulunan 15 ml'lik falkona aktarıldı ve homojenizasyon sağlandı.
4. 200 g'de 5 dk santrifüj edildi.
5. Pellet 10 ml cRPMI-1640 resüspanse edildi.
6. 2 ayrı T25 flaska 5'er ml olacak şekilde ekim yapıldı.
7. %5 CO₂ içeren 37 °C'lik etüvde 3 gün inkübasyon yapıldı.
8. Her 3 günün sonunda gerektiği durumlarda 1×10^5 hücre ile pasajlama yapıldı.
9. Resveratrol ve/veya sodyum butirat sıfırıncı günde besiyerlerine eklendi.
10. 72. saatte benzidin boyama yapıldı.
11. Benzidin boyama yöntemiyle mavi boyanan hücrelerin görüntülenmesi ve skorlanması yapıldı.
12. İndüksiyon yapılmayan gruptaki hücreler donduruldu.

3.2.1 K562 Hücrelerinin Dondurulması

1. 500 µl DMSO (Dimetil Sülfoksit), içerisinde 9.5 ml RPMI-1640 (%10 FCS, %1 antibiyotik, %1 L-glutamin) sıvı besiyeri içerisine konulur.
2. 1 ml hacimlerde $1-2 \times 10^6$ hücre/ml olacak şekilde soğuğa dayanıklı cryoviallere dağıtılır.
3. İçerisinde %70'lik etanol bulunduran soğutucu kap (CryoFreezing Container) içerisine alınır.
4. -20 °C'de 2-3 saat bekletilir.
5. Daha sonra -80 °C'de (Thermo Scientific 994) gece boyu bekletilir.
6. Son olarak sıvı azotun buhar fazında tekrar çözündürülene kadar muhafaza edilir.

3.2.2 Resveratrol ve Sodyum Butirat Solüsyonlarının Hazırlanması

Resveratrol (Stok 50 mM) (SİGMA R5010, Lot #SLBG2022V, 100 mg)

228,24 gr/mol moleküler ağırlığa sahip, 2.85 mg toz resveratrol (RV), 250 µl DMSO içerisinde çözülür. Etrafı alüminyum folyo ile sarılan ependorflara bölünür ve -20 °C'de saklanır.

Sodyum Butirat (Stok 10 mM) (SC-202341B, Lot #B1914, 5 gr)

110.1 gr/mol moleküler ağırlığa sahip, 20 mg Sodyum Butirat (SB), 18.167 ml distile su içerisinde çözülür. RV gibi karanlıkta ve -20 °C’de saklanır.

5 ml cRPMI-1640 besiyeri içerisinde hazırlanan ependorflardan aşağıdaki hacimlerde ve konsantrasyonlarda RV ve/veya SB eklenir (Tablo 3.5).

Tablo 3.5: 5 ml’lik ortamdaki hücelere eklenecek RV ve SB miktarları ile final konsantrasyonlar.

	μl	[final] μM	μl	[final] μM	μl	[final] μM	μl	[final] μM
RV (50 mM)	0	0	2,5	25	5,0	50	10	100
SB (10 mM)	0	0	75	150	150	300	300	600

Örneğin; stok SB (10mM)’den 150 μl alınır ve final hacim olan 5 ml içerisindeki hücelere eklenirse son SB konsantrasyonu M:Molarite, V:Hacim (volüm) f:finali göstermek üzere;

$M1.V1=Mf.Vf$ formülünden hesaplanır. Buna göre,

$$50 \text{ mM}.150 \mu\text{l} = Mf.5000 \mu\text{l}$$

$$Mf=1.5 \text{ mM}=150 \mu\text{M} \text{ olarak bulunur}$$

K562 hücrelerine eklenen farklı final konsantrasyonlardaki SB ve RV’nin benzidin boyama üzerine etkisi değerlendirildi.

3.2.3 Benzidin Boyama Yöntemi

Öncelikle benzidin boyama solüsyonu (BBS) hazırlandı. Buna göre;

1. Bir kabın içerisinde 14,6 ml glasiyel asetik asit (Merck, Katalog No: 100063.2511) ve 485,4 ml distile su karıştırıldı. 1 gr benzidin dihidroklorit (SC-214584A) tartıldı ve bu karışımın içerisinde çözüldü. BBS karanlık bir ortamda saklandı.
2. BBS hazırlandıktan sonra boyamanın yapılacağı zaman bu karışımdan 1ml örnek ile 20 μl %30’luk H_2O_2 solüsyonu karıştırıldı.
3. Kültürü yapılmış indüksiyonu yapılmış/yapılmamış 1 ml hücre süspansiyonu üzerine aynı hacimde, hidrojen peroksit içeren BBS eklendi.
4. Mavi boyanan hücreler motorize-inverted mikroskopta (Olympus IX2-UCB) görüntülendi.

3.2.4 K562 Hücrelerinde Hücre Canlılık Testi

Hücre canlılığı ve proliferasyonunu ölçmede kullanılan yöntemlerden birisi Metil - Tiazolil-Tetrazolyum (MTT) testine göre, normalde sarı renkli olan MTT ajanı, canlı hücre içerisindeki dehidrogenaz enzimi ve indirgeyici moleküller ile mor renkli formazan molekülüne dönüşür. Spektrofotometrede ölçülen mavi renk miktarı ile hücre canlılığı arasında orantısal bir ilişkiye göre kullanılan ajanların etkisi değerlendirilebilir (Mosmann, 1983; van Meerloo ve ark., 2011).

Resveratrol ve veya sodyum butiratın artan dozları ile 72 saat boyunca muamele edilen 5000'er hücre (100 µl), 96 kuyucuklu hücre kültürü pleytlerinde inkübe edildi. 5mg/mL olacak şekilde distile su içerisinde hazırlanan MTT (Sigma M2128)'den 10'ar µl kuyucuklara eklenerek etüvde 3 saat daha inkübe edildi. Süre sonunda pleyt 400 g'de 10 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası fazla süpernatant uzaklaştırılarak, geriye kalan pellet üzerine 100'er µl çözücü (DMSO) ilave edildi. Açığa çıkan mor renk kolorimetrik olarak 490 nm'de değerlendirildi.

3.2.5 K562 Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu

Gerekli miktarlarda resveratrol ve/veya sodyum butirat ile indüksiyon yapılan kültürlerin içerisindeki 1×10^6 hücreden toplam RNA izolasyonu aşağıdaki şekilde Roche High Pure RNA Isolation Kit'i ile yapıldı.

1. Hücreler 200 µl PBS ile resuspanse edildi.
2. 400 µl Lysis/Binding Buffer eklendi. 15 sn vortekslendi.
3. Toplama tüpünün üzerinde bulunan filtreli tüpün içine aktarıldı.
4. 15 sn 800 g'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası dökelti atıldı.
5. Başka bir ependorfta örnek başına 90 µl DNase Incubation Buffer ile 10 µl DNase 1 karıştırıldı ve pipetaj yapıldı.
6. Toplam 100 µl ilk karışım filtreli tüpe aktarıldı.
7. 15 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.
8. 500 µl Wash Buffer I eklendi.
9. 15 sn 800 g'de santrifüj yapıldı.
10. Dökelti atıldı. 500 µl Wash Buffer 2 (WB2) eklendi.
11. 15 sn 800 g'de santrifüj edildi.

12. Dökelti atıldı. 200 µl WB2 eklendi.
13. 13.000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi.
14. Filtreli tüp yeni steril 1.5 ml’lik ependorfa aktarıldı ve üzerine 100 µl Elüsyon Buffer ilave edildi.
15. 1 dk 8000 g’de santrifüj edildi.
16. Kalitelendirme için RNA ölçümü ve agaroz jel elektroforezi yapıldı.
17. Kullanılincaya kadar -80 °C’de bekletildi.

3.3 Primer Eritroid Hücre Kültürü

Primer eritroid hücre kültürü 2 fazda gerçekleştirilir (Brugger ve ark., 1993; Fibach ve Prus, 2005; Pope ve ark., 2000). Buna göre, birinci faz eritropoietin (Epo) bağımsız faz olup izole edilmiş PBMC’lerin büyüme faktörleri ve sitokinlerce zengin ortamda kültürü gerçekleştirilir. Birinci fazın sonunda (7 gün), kültürde başlıca makrofajardan oluşan tutunan (adherent) ve lenfositlerden oluşan tutunmayan (non-adherent) hücreler bulunur. Tutunmayan hücreler, harvest edilip yıkanır ve Epo varlığında ikinci faz (14 gün) boyunca kültüre edilir. İkinci fazda, erken eritroid öncülleri (Burst-forming units erythroid, BFUe) Epo varlığında çoğalır ve koloni oluşturabilen eritroid öncülleri (CFUe)’ne farklılaşır. İkinci fazın 4. ve 5. günlerinde protoeritroblastlar görülmeye başlar. Epo varlığında proliferasyon devam ederken olgun ortokromatik normoblastlar ile çekirdekli eritrositler oluşur. Bu süreç için kullanılan solüsyon ve malzemeler aşağıda verilmektedir.

3.3.1 Faz 1 ve Faz 2 Solüsyonlarının Hazırlanması

Faz 1 Solüsyonları

- 1) **Siklosporin A (Sigma 30024, 25 mg):** Özellikle immün sistem baskılayıcı özelliği olan siklosporin a (CsA), hücre kültüründe de T lenfositlerin üremesini engellemek amacıyla kullanılmaktadır (Waters ve ark., 2005).
25 mg CsA, 5 ml DMSO içerisinde çözülür, ependorflara bölündü ve -20 °C’de saklandı. 50 ml %10’luk serum içerecek Alfa-MEM (Biological Industries, Katalog No:01-042-1A) sıvı besiyeri içerisinde 10 µl bulunulacak şekilde 1µg/ml konsantrasyonunda kullanıldı.

2) Rekombinant İnsan FLT3 Ligandı, rhFLT3-L (Peprotech 30019, 100 µg):

Erken dönem hematopoyetik hücrelerin çoğalmasını düzenleyen bir büyüme faktörü olarak kullanılan FLT3L, diğer interlökin ve colony stimulating faktör (CSF) ile beraber kullanıldığında farklılaşmayı da indükler (Lyman ve ark., 1994).

Hücre kültürümüzün 1. fazında rekombinant insan kök hücre faktörü - recombinant human Stem Cell Factor- (rhSCF) ve rekombinant insan interlökin 3 - recombinant human InterLeukin 3 (rhIL-3) ile beraber kullanıldı.

100 µg liyofilize örnek, 1 ml steril distile su (sdH₂O) içerisinde çözöldü. Ependorflara bölöştüröldü ve -20 °C’de saklandı. 50 ml %10’luk serum içeren Alfa-MEM besiyeri içerisinde 50 µl bulunulacak şekilde 100 ng/ml konsantrasyonunda kullanıldı.

3) Rekombinant İnsan Kök Hücre Faktörü#, rhSCF (Sigma H8416, 10 µg)

Özellikle erken dönem hematopoyetik kök hücrelerin ve öncöllerinin çoğalmasını indükler (Zsebo ve ark., 1990).

10 µg liyofilize örnek, 1 ml steril PBS içerisinde çözöldü. Ependorflara bölöştüröldü ve -20 °C’de saklandı. 50 ml %10’luk serum içeren Alfa-MEM besiyeri içerisinde 250 µl bulunulacak şekilde 50 ng/ml konsantrasyonunda kullanıldı.

#Faz 2 solösyonları içerisinde de yer alan rhSCF, 2. fazda 5 kat daha az, 50 µl kullanıldı.

4) Rekombinant İnsan İnterlökin 3, rhIL3 (R&D Systems 203-IL/CF, 50 µg)

Çok farklı etkilere sahip (pleiotropik) bir sitokin olarak temel olarak T hücrelerinden salınan ve pluripotent hematopoyetik hücrelerin farklılaşmasını ve çoğalmasını indükler (Fung ve ark., 1984).

50 µg liyofilize örnek, 0.5 ml steril PBS içerisinde çözöldü. Ependorflara bölöştüröldü ve -20 °C’de saklandı. 50 ml %10’luk serum içeren Alfa-MEM besiyeri içerisinde 25 µl bulunulacak şekilde 50 ng/ml konsantrasyonunda kullanıldı.

Faz 2 Solüsyonları

1) Bovin Serum Albumin (BSA-Sigma, A7906, 50 mg)

Hücreleri ve yağ asitleri ve piridoksal gibi besiyeri içerisinde bulunan molekülleri oksidatif hasardan korur ve komponentlerin stabilizasyonunu sağlar (Francis, 2010).

1 gr BSA tartıldı ve 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözöldü. 0.45 μM filtreden geçirildikten sonra, ependorflara bölünüp, +4 °C'de saklandı. %10'luk bu stok solüsyondan 50 ml %30'luk serum içeren Alfa-MEM besiyeri içerisinde 500 μl bulunulacak şekilde %1'lik konsantrasyonunda kullanıldı.

2) Dexamethasone (Serva, 18660.01, 100 mg).

Hücre yaşlanmasını geciktirme özelliğine sahip antiinflamatuvar bir glukokortikoid olarak hücre canlılığı üzerine olumlu etkileri bulunur (Asahara ve ark., 1997) .

20 mg toz dexamethasone 5.09 ml DMSO/Etanol içerisinde çözöldü. 10 mM'lık stoklar ependorflara bölüştürölüp -20 °C'de saklandı. 50 ml %30'luk serum içeren Alfa-MEM besiyeri içerisinde 5 μl bulunulacak şekilde 1 μM 'lik konsantrasyonunda kullanıldı.

3) Beta Merkaptöetanol (BME,Amresco M131, 100ml)

Oksijen radikallerinin toksik etkilerini azaltma özelliğine sahip redükleyici bir ajan olarak bazı hücre kültürlerinde kullanılır (Inui ve ark., 1997).

14.2 M'lık stok BME solüsyonundan 7 μl alınıp 993 μl dH₂O ile karışırılıp, 100 mM'lık solüsyon hazırlandı, oda sıcaklığında saklanılmak üzere ependorflara bölündü. 50 ml %30'luk serum içeren Alfa-MEM besiyeri içerisinde 5 μl bulunulacak şekilde 1 μM 'lik konsantrasyonunda kullanıldı.

4) Rekominant İnsan Eritropoyetin, rhEPO (Cell Signalling, 6980 SC, 10 μg)

EPO, bir hormon ve büyüme faktörü olarak eritroid öncölü hücreleri apoptozisden korur, kemik iliğinden eritroid hücre farklılaşmasını stimüle eder ve NF- κ B sinyalleşmesini inhibe ederek proinflamatuvar sitokin sentezini bozar (De Maria ve ark., 1999; Nairz ve ark., 2011).

10 µg'lık liyofilize rhEPO, içerisinde %1 BSA olacak şekilde 1 ml steril PBS içerisinde çözüldü. Ependorflara bölündü, -20 °C'de saklandı. 50 ml %30'luk serum içeren Alfa-MEM besiyeri içerisinde 25 µl bulunulacak şekilde 5ng/ml konsantrasyonunda kullanıldı.

5) L-Glutamin (Gibco, 25030081, 200 mM)

Nukleotid ve protein sentezi ile glukoz üretimi için hücrelerin ihtiyaç duyduğu bir amino asittir (Newsholme ve ark., 2003). 200 mM'lık stok içerisinde 50 ml %30'luk serum içeren Alfa-MEM besiyeri içerisinde 500 µl bulunulacak şekilde 2 µM konsantrasyonunda kullanıldı.

6) rhSCF: Faz 1 solüsyonlarında nasıl hazırlandığı açıklandı.

16 ve 18 numaralı hastalardan 1.260.000 hücre, 23 numaralı hastadan ise 1.400.000 hücre ile faz 1 hücre kültürüne başlandı. Yedinci günün sonunda T25 flask içeriğinin tutunmayan hücrelerinden oluşan sıvı kısmı 15 ml'lik falkonlara alındı. 200 g'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atıldı pellet üzerine kompleyt 5 ml Alfa-MEM besiyeri eklendi (yıkama), aynı koşullarda santrifüj edildi. Tekrar yıkama yapıldı. Son olarak pellet üzerine hücre yoğunluğuna göre ilgili miktarda kompleyt Alfa-MEM eklendi ve süspansiyon hacmi her bir örnek için 3 adet flaska bölünerek toplam 5 ml hacimde 5 gün daha etüvde (37 °C, %5 CO₂) inkübasyona bırakıldı. Beşinci gün sonunda 50 µM resveratrol veya 600 µM sodyum butirat eklenen flasklar 7 gün daha inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her flasktan 200'er µl örnek RNA izolasyonu için geriye kalan 4,8 ml örnek western blotlama çalışmaları için toplandı.

3.3.2 Primer Eritroid Hücre Kültüründen RNA İzolasyonu

1 milyon hücre için; High Pure RNA Isolation Kit Roche (Katalog No:1828665001) ile gerçekleştirilen RNA izolasyonu aşağıdaki gibi gerçekleştirilmiştir:

200 µl 1XPBS içerisinde resüspanse edilen hücrelerin üzerine 400 µl lizis-bağlanma tamponu eklendi ve 15 sn vortekslendi. Filtreli kolonların üzerine en fazla 700 µl olacak şekilde ilave edilen karışım 8.000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Toplama kabına biriken sıvı döküldü. 90 µl DNaz inkübsayon Tamponu-10 µl DNaz I karışımı filtreli kolona aktarıldı ve 15 dk boyunca 15- 20 °C'de inkübe edildi. 500 µl Yıkama Tamponu I eklendi ve 8.000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Sıvı döküldü. 500 ul Yıkama

Tamponu II eklendi ve 8.000 g'de 15 sn santrifüj edildi. Sıvı döküldü. 200 µl Yıkama Tamponu II eklendi 13.000 g'de 2 dk santrifüj edildi. Sıvı döküldü. 50-100 µl elüsyon tamponu ile 8.000 g'de 1 dk santrifüj edilerek elde edilen örnekten cDNA sentezi reaksiyonu kuruldu.

cDNA Sentezi

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor Roche (Katalog No 4374966) içeriği ile master miks hazırlandı. Buna göre her bir örnek için 2 defa hazırlanmak üzere;

10X RT Tamponu'ndan 2 µl

25X dNTP miks (100 mM)'den 0.8 µl

10X RT Random Primerler'den 2 µl

10X MultiScribe™ Reverse Transkriptaz'dan 1 µl

RNaz inhibitörü 1 µl

Nükleaz içermeyen distile su 3.2 µl alınarak 10 µl hacimde buz üzerindeki ependorfların içerisinde master miks hazırlandı.

Bu karışım ilgili reaksiyon tüplerine dağıtıldı ve üzerlerine ilgili örneğe ait toplam RNA'dan 10'ar µl ilave edildi. İki defa hafifçe pipetaj yapıldı. Kısa süreli (spin-down) santrifüj edildi. PZR cihazına yüklenene kadar buzda bekletildi.

cDNA PZR koşulları

25 °C'de 10 dk, 37 °C'de 2 saat, 85 °C'de 5 dk inkübasyona bırakılan örnekler kısa süreli +4 °C'de uzun süreli -20 °C'de saklandı.

cDNA sentezinden sonra ilgili globin genleri ekspresyonunun tayini için kullanılan primerler (Sigma) aşağıda verilmiştir. Her bir primer 100 µl konsantrasyonunda distile su veya 1X Tris-EDTA ile hazırlanmış ve kullanılabileceği kadar -20 °C'de saklanmıştır.

Alfa globin

İleri primer: 5'-TGGGGTAAGGTCGGCGCGCA - 3'

Geri primer: 5'- TGCACCGCAGGGGTGAACTC - 3'

Beta globin

İleri primer: 5'- GGTGGTCTACCCTTGGACCC - 3'

Geri primer: 5' - GATACTTGTGGGCCAGGGCA - 3'

Gama globin

İleri primer: 5'-GGGAGATGCCATAAAGC-3'

Geri primer: 5' - ATTGCCAAAACGGTCAC- 3'

Beta aktin (kontrol)

İleri primer: 5' - GTGGGGCGCCCCAGGCACCA - 3'

Geri primer: 5' - CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC - 3'

Power SYBR® Green PCR Master Mix ticari kiti (Katalog No:4367659) ile globin genleri ve beta aktine ait PZR koşulları şu şekilde hazırlanmıştır:

Toplam reaksiyon hacmi 25 µl olmak üzere;

Power SYBR Green PZR Master Miks (2X) solüsyonundan 12.5 µl,

Son konsantrasyon 100 nM olacak şekilde ileri primerden 0.25 µl,

Son konsantrasyon 100 nM olacak şekilde geri primerden 0.25 µl,

Kalıp olarak kullanılacak 20 µl'lik cDNA karışımından 2.5 µl,

Deiyonize sudan 10.5 µl kullanıldı.

95 °C'de 10 dk başlangıç denatürasyonunu takiben 40 döngü olacak şekilde 95 °C'de 15 sn, 60 °C'de 1 dk eş zamanlı (Real Time) PZR kurulur. Örnekler %2'lik agaroz jelde yürütülüp görüntülendi.

3.3.3 Western Blot Yöntemi

BCL11A açısından 3 farklı genotipteki hastalardan (16,18 ve 23 numaralı hastalar) gerçekleştirilen ve 50 µM resveratrol ile 600 µM sodyum butirat uygulanmış 21 günlük primer eritroid hücre kültürü sonucunda 4,8 ml besiyeri içerisindeki hücrelerden lizatlar toplandı.

Lizat Toplama ve Kullanılan Solüsyonlar

İçerisine 1 adet proteinaz inhibitör tableti (Roche, Katalog No:05892791001) atılan 10 ml Lizis Tamponu (RIPA Buffer: 50 mM TrisHCl, %1 NP40, %0.5 SodyumDeoksikolat, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaF, %0,1 SDS pH:8.0)

ile 4.8 ml besiyeri içerisindeki hücreler (lizat) toplanır ve dondurulur. Kullanılacağı zaman çözödürölen hücrelerden protein miktarı hesaplandı.

Protein İzolasyonu

21 gün sonunda hücre költürü sonlandırıldı ve içerik 15 ml falkonlara aktarıldı. 450 g'de 5 dk santrifüj edildi.Süpernatant uzaklaştırıldı pellet üzerine 5 ml 1XPBS eklendi ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi (yıkama). 2 defa daha yıkama yapıldıktan sonra pellet üzerine 1'er ml RIPA buffer eklendi.Buz üzerinde 20 dk boyunca bekletildi. Örnekler daha sonra kullanılmak üzere -80 °C'de saklandı.

Western Blotta Kullanılan Solösyonların Hazırlanması

Alt Jel Tamponu (Resolving Buffer)

1.5 M Tris Base (Applichem, Katalog No:77-86-1) pH:8.8 hazırlamak için 181.64 gr Tris Base tartılır ve pH ayarlanarak 1lt distile suda çözödürölen.

Üst Jel Tamponu (Stacking Buffer)

0.5 M Tris Base pH:6.8 hazırlamak için 60.5 gr Tris Base tartılır ve pH ayarlanarak 1lt distile suda çözödürölen.

10X Yürötmö Tamponu (Running Buffer)

15 gr Tris Base ve 94 gr Glisin (Vivantis-PR0608) tartılır 50 ml %10'luk SDS (Sigma, Katalog NO:114H0311) karışımı eklenir ve 1lt distile suya tamamlanır.

10X TBS-T

24.2 gr Tris Base ve 80 gr NaCl tartılır 800 ml distile suda çözödürölen. pH:7.6'ya ayarlandıktan sonra 1lt'ye tamamlanır. Bu karışımaya 1 ml Tween-20 (Cayman, Katalog No:400035) deterjanı ilave edildiğinde TBS-T olarak adlandırılır.

10XPBS-T

25.6 gr $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 80 gr NaCl, 2 gr KCl ve 2 gr KH_2PO_4 tartılarak 800 ml distile suda çözödürölen.pH:7.4'e ayarlandıktan sonra 1 litreye tamamlanır. Stok 10X solösyondan 1X solösyon hazırlanır ve otoklavlanır. 1X PBS solösyonuna 1 ml Tween-20 deterjanı eklendiğinde PBS-T olarak adlandırılır.

3X Yükleme Boyaması (SDS Loading Dye)

Aynı hacimlerde (20'şer ml) distile su, stacking buffer ve %10 SDS karıştırılır üzerine 40 ml gliserol ve 6 mg bromofenol mavisi (Sigma, Katalog No:M3148) eklenir. 950'şer µl olacak şekilde ependorflara dağıtılır ve -80 °C'ye kaldırılır. Kullanılacağı zaman 50 µl çeker ocakta beta merkaptan etanol eklenir.

%10 APS (Applichem, Katalog No:7727-54-0)

0.1 gr APS (Amonyum PerSulfat), aynı gün 1ml distile suda çözülür.

Transfer Tamponu

14.5 gr Tris Base ve 7.5 gr Glisin 2 lt distile suda çözülür. 500 ml metanol (Merck, Katalog No:106009) eklenir. +4 °C'de saklanır.

Akrilamid/Bisakrilamid (Biorad, Katalog No:161-0156)

29 gr akrilamid ve 0.8 gr bisakrilamid karıştırılarak 1lt distile suda çözülür.

TEMED (TetraMetilEtilenDiAmin) (Applichem, Katalog No:110-18-9)

Ticari olarak hazır gelen solüsyondur.

Alt ve Üst Jelin Hazırlanması

SDS içeren poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) için jellerin hazırlanacağı cam plakalar %70'lik etanol ile temizlendi ve %10'luk alt jel ve üst jel hazırlanır.

Alt jel için;

11.55 ml distile su üzerine 7.5 ml resolving buffer ve sırasıyla 10.5 ml akrilamid-bisakrilamid, 0.3 ml %10'luk APS, 0.3 ml %10'luk SDS ve 30 µl TEMED ilave edilir. Üst jel için;

6 ml distile su üzerine 2.5 ml stacking buffer ve sırasıyla, 1.25 ml akrilamid-bisakrilamid, 0.1'er ml %10'arlık APS, SDS ve son olarak 10 µl TEMED ilave edildi. Önce alt jel cam plakalar arasına pipet yardımıyla döküldü ve üzerine düzgün üst yüzey sağlamak adına %1'lik SDS eklendi. Alt jel polimerleşince SDS uzaklaştırıldı ve üst jele TEMED eklenir eklenmez üst jel döküldü ve taraklar yerleştirildi

SDS-PAGE işlemi

Lizatlar -80 °C'den çıkarıldı ve buzda çözülmeye bırakıldı. Protein konsantrasyonları Bradford Yöntemi (Olson, 2016) ile hesaplanan örneklerden toplamda 20-50 µg protein ile örnek miktarının yarısı hacminde 3X yükleme boyası karıştırıldı. 20 sn 10.000 rpm'de spin-down yapıldı ve 95 °C'de 5 dk kaynatıldı. Polimerleşme tamamlandıktan sonra üst jeldeki tarak çıkarıldı. Cam plakalar elektroforez tankına yerleştirildi. Tankın içerisine 1X yürütme tamponu ilave edildi. İlk kuyucuğa 10 µl protein belirteci (Thermo, Katalog No:26630) yüklenir sonraki kuyucuklara örnekler yüklendi. Güç kaynağı çalıştırıldı ve örnekler üst jeli geçinceye kadar 120V potansiyel farkı ile yürütüldü. Aynı hizaya gelen proteinler üst jeli geçince 150V değerinde elektroforez işlemine tabi tutuldu. Yeteri kadar elektrik akımına tabi tutulan örnekler daha sonra membrana transfer edildi.

Transfer İşlemi

Uzun süre yüksek voltaja maruz kalan cam plakaların arasındaki %10'luk poliakrilamid jelin soğuması için akan çeşme suyu altında soğutuldu. Soğutma işleminden sonra cam plakalar dikkatlice açıldı ve jel,transfer tamponunda ıslatıldı. Transferin gerçekleştirileceği PVDF (Polivinil diflorid) membran (Miliopore-Katalog NO:IPVH00010) uygun boyutlarda kesildikten sonra metanolde yaklaşık 1 dk ıslatıldı. Altan üste doğru, siyah sünger, 3 kat whatman kağıdı, jel, PVDF membran, 3 kat whatman kağıdı, beyaz sünger olacak şekilde hazırlandı. Sandwichin her katmanı hazırlanırken, hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edildi. Sistem klipslerinden kapatılıp, transfer tankına yerleştirilip üst sınıra kadar transfer tamponu eklendi ve jelden memrana 30 V-90 mA'de gece boyu transfer gerçekleştirildi. Transfer bittikten sonra güç kaynağı kapatıldı ve membran çıkarıldı. 1 dk boyunca metanol ile proteinlerin memrana fiksasyonu sağlandı.

Membranın Boyanması

Transfer işleminin başarılı bir şekilde gerçekleştirildiğini göstermek için metanol ile fikse edilmiş membran uygun bir saklama kabı içerisinde Ponceau S (Sigma P7170) solüsyonu ile muamele edildi. Bantlar gözlemlendikten sonra 3X10 dk çeşme suyunda yıkama yapıldı.

İşaretleme İşlemi

Metanol fikse membran %1 BSA (Bovine Serum Albumin) ile hazırlanmış 1XTBS-T ile 2 saat boyunca çalkalanarak blokladı. Bloklama bittikten sonra ilgili primer antikör ile işaretleme yapıldı. İşaretlemede kullanılacak primer antikörler NRF-2 (Cell Signalling, D1Z9C, tavşan mAb#12721S) 1/1000 oranında, fosfo-NRF-2 (Genetex, GTX61664, tavşan mAb #EP1809Y)1/5000 oranında, p38 (Cell Signalling, D13E1, tavşan mAb #8690L) 1:1000 oranında, fosfo-p38 (Cell Signalling, D3F9, tavşan mAb #4511L) 1:1000 oranında, p-ERK1/2 (137F5, tavşan mAb, #4695S) 1:1000 oranında, fosfo-p-ERK1/2 (D13.14.4E, tavşan mAb #4370S) 1:1000 oranında, GAPDH (Ab9485) 1/3000 oranında %1 BSA içeren 1XTBS-T ile hazırlandı ve 1 saat çalkalamalı inkübasyon sağlandı. Primer antikör tekrar 50 ml'lik falkonlara alınıp -20 °C'de saklandı. Inkübasyon bitince her 30 dakikada 1 defa 1XTBS-T ile 2 defa yıkama yapıldı. Yıkamalar bittiğinde 1:3000 oranında dilüe keçi anti-tavşan Ig-G (H+L) sekonder antikoru ile (goat anti-rabbit)(Bio-Rad, Katalog No: #170-6515) 2 saat işaretleme yapıldı. Süre sonunda aynı şekilde 2 defa yıkama yapıldı ve görüntülemeye geçildi.

Strip Off İşlemi (Antikör Uzaklaştırma)

İşaretlenmiş membranı farklı primer antikör ile işaretleme için geliştirilmiş yöntemde 20 ml %10'luk SDS, 12.5 ml stacking buffer ve 67.5 ml distile su karışımı 55 °C'de bekletildi. Daha sonra 704 µl beta merkaptotanol eklenerek 55 °C'de 30 dk çalkalandı. Daha yumuşak antikör uzaklaştırma işlemi için ise 0.1 M Glisin (pH:2.5) solüsyonu ile strip off işlemi yapıldı.Strip off solüsyonunu uzaklaştırmak için 15'er dk arayla 3 defa 1X TBS-T ile yıkama yapıldı. Daha sonra 2 saat bloklamanın ardından ilgili primer antikoru eklenmesiyle devam edildi.

Görüntüleme

Kaset içerisindeki şeffaf dosya içerisine yerleştirilen, 1:1 oranında hazırlanan kemoluminesan ve substratı (Clarity™ Western ECL Substrate, Katalog No:1705061) ile 2-5 dk muamele edilen membran, kasetle beraber karanlık odaya götürüldü ve üzerine film (Kodak, Katalog No:AI0241 veya GE HealthCare (Katalog No: 28-9068-37) kapatıldı. Sinyal yoğunluğuna göre bekleme süresi ayarlanarak Konika Minolta SRX-101A cihazında developer, yıkama, fiksasyon ve tekrar yıkama

işlemleri sonrası filme alındı. Filme alınan örneklerdeki proteinlerin miktarındaki değişimler Image J bilgisayar programında değerlendirildi. Office Excel programında grafikler çizildi.



4. BULGULAR

4.1 Hastalara Ait Demografik ve Hematolojik Bulgular

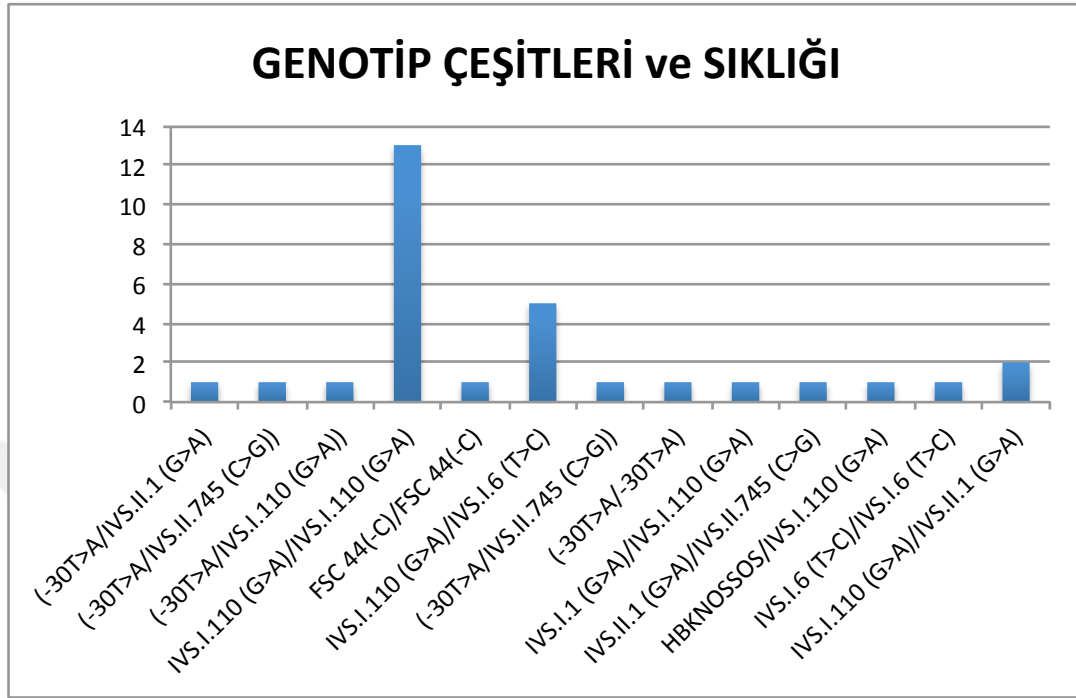
Transfüzyon alan 30 beta talasemi majör hastasına ait bulgular Tablo 4.1’de gösterilmiştir. Buna göre 30 hastanın yaş ortalaması 29 olup, ortalama HbF değeri 12.2 iken en küçük HbF:2.1 ve en yüksek HbF değeri 61.4’dür. Hemoglobin elektroforezi ile tespit edilebilen ve diğer varyant hemoglobinelere göre daha sık görülen HbS, HbD ve HbC’ye rastlanılmamıştır. Hastalarımızın %70’i splenektomize olup, IVS.I.110 homozigot genotipindeki hastaların ise %77’si, IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.6 (T>C) birleşik heterozigot grubundaki hastaların ise %100’ü splenektomizedir (Tablo 4.1).

30 hastada beta talasemi majore sebep olan 13 farklı *HBB* mutasyonu gözlenmiştir. En sık görülen genotipler 13 hastada IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A), 5 hastada IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.6 (T>C), 2 hastada birleşik IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A) heterozigot şeklinde olup, diğer genotipler 1’er hastada gözlenmiştir (Şekil 4.1). Hastalarımızın tümü (%100) Akdeniz Bölgesi’nden olup; 26 tanesi Antalya, 3 hasta Burdur ve 1 tanesinde Isparta bölgelerindendir. Ortalama transfüzyon sayısı 104.5, ortalama transfüzyon miktarı 1,7 ünite ve transfüzyon sıklığı 21,1 gündür. Cinsiyet dağılımları yapıldığında 13 hastanın erkek (%43,3), 17 hastanın kadın ve toplamda ortalama hemoglobin miktarının ise 8.64 olduğu gözlenmiştir.

Tablo 4.1: BTM’li 30 hastanın hematolojik parametreleri ile *HBB*, *XMNI*(rs7482144), *BCL11A* (rs11886868) ve *KLF1* tüm gen analizi sonuçları.

NO	YAŞ-C	BETA GLOBIN MUTASYONU	XMNI	BCL11A	PE1	E2A	E2B	E3	HBf	SP	HB	MCV	MCH	MCHC	RDW	HBa1	HBa2
1	27,6-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CT	GG	TC	NN	NN	11,1	E	8,3	84,2	26,9	31,9	15,9	74,4	2,8
2	25,9-E	IVS.II.1 (G>A)/IVS.II.745 (C>G)	CC	CT	GG	TT	NN	NN	16,7	H	7,8	77,3	26	33,6	16,5	67,9	2,8
3	26,6-E	(-30T>A)/IVS.II.745 (C>G)	CC	TT	GG	TC	NN	NN	6,5	E	8,6	82	27,2	33,2	16,1	76,7	2,8
4	22,5-K	IVS.II.1 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	TT	TT	GG	TC	NN	NN	7,6	H	8,5	82,4	27,5	33,4	16,7	78,2	2,5
5	20,5-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	CT	TT	GA	TC	NN	NN	4,9	H	8,8	83	27,5	33,2	14,6	79	2,9
6	24,7-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.16 (T>C)	CC	CC	GG	TT	NN	NN	14,3	E	8,7	85,2	25,2	29,5	19,7	71,5	3,2
7	29-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CT	GG	TC	NN	NN	17,6	E	8,6	83,7	27	32,2	18,5	67,9	2,6
8	22,4-E	IVS.I.1 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CC	GG	TT	NN	NN	16,7	H	8,9	78,3	25,6	32,7	19,4	70,8	3,1
9	27,5-E	(-30T>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CT	GG	TT	NN	NN	39	E	9,8	81,1	24,9	30,7	25,6	50,1	4,1
10	29,1-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.6 (T>C)	CC	CC	GG	TT	NN	NN	2,2	E	7,8	81,3	26,8	32,9	15,6	80,6	3,1
11	39,7-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.6 (T>C)	CC	TT	GG	TT	NN	NN	4,8	E	8,1	86,9	27	31	16,7	78	3,1
12	40,4-K	HBKNOSSOS/IVS.I.110 (G>A)	CT	CT	GG	TT	NN	NN	19,4	E	8,5	77,1	24,6	31,9	29,9	69	2,6
13	36,5-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	CC	CC	GG	CC	NN	NN	3,1	E	7,8	78,8	25,9	32,9	16,5	78,6	3
14	62,5-K	(-30T>A/-30T>A)	CC	TT	GG	TT	NN	NN	30,2	E	8,4	76,7	22,7	29,5	28,6	57,4	4,6
15	22,3-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CT	GG	TT	NN	NN	3,8	E	10	85,2	28,3	33,2	17,3	77,6	3,2
16	26,5-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CC	GG	TT	NN	NN	4,5	E	10,1	86,6	28,2	32,5	14,7	79,2	2,7
17	37,3-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CC	GG	TT	NN	NN	2,1	E	10,1	87,1	29,2	33,5	15,4	80,2	2,6
18	25,2-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CT	GG	TT	NN	NN	2,6	E	9,3	87,8	28,4	32,3	14,4	80,3	2,9
19	27,2-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	TT	GG	TT	NN	NN	7	E	8,8	71,8	22	30,6	36	73,6	5,6
20	24,4-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CT	GA	TT	NN	NN	61,4	E	8	74,7	22	29,5	31	27	7,9
21	20,9-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	TT	GG	TT	NN	#	12,1	H	8,5	75	25,7	34,2	27,4	74,1	3
22	19,7-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	TT	GG	TT	NN	NN	5,8	H	8,5	79,8	27,1	34	14,8	78,6	2,8
23	29-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	TT	GG	TT	NN	NN	2,67	H	9,6	83	28,4	34,2	14,2	82,6	2,9
24	20,6-E	FSC 44(-C)/FSC 44(-C)	CC	CT	GG	TT	NN	NN	11,4	H	8,1	78,8	26,2	33,2	15,3	73,8	3
25	29,5-K	(-30T>A)/IVS.II.1 (G>A)	CT	TT	GG	TT	NN	NN	18,7	H	8,5	77,3	25,4	32,9	19,8	68,6	3,6
26	37,7-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	CC	CT	GG	TC	NN	NN	5,9	E	9,2	78,6	24,3	30,9	27,2	77,9	3,9
27	39,4-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.6 (T>C)	CC	CT	GG	TC	NN	NN	8,0	E	8,4	81,7	25,5	31,3	21,2	74,8	2,9
28	23,3-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CT	GG	TC	NN	NN	4,6	E	7,4	84,4	27,4	32,5	17,5	72,4	2,9
29	27-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	CC	CT	GG	TT	NN	NN	5,1	E	8,1	84,8	27,1	31,9	14,8	79,5	2,9
30	24,3-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.6 (T>C)	CC	CT	GG	TC	NN	NN	4,7	E	8,6	89,3	26,8	30,1	17,1	78,7	3,3

Parametrelerdeki turuncu renk nötr durumu, kırmızı normalin altını ve yeşil üstünü göstermektedir. C: Cinsiyet, E:Erkek K:Kadın, PE1:Promotor ve Ekzon1, E2A: Ekzon2A E3:Ekzon3; NN:Normal .E2A’daki değişimler c.304 T>C değişimini göstermektedir.S:Splenektomi durumunu, E (Evet): Splenektomi yapılmış durumu H (Hayır): Splenektomi yapılmamış durumu göstermektedir. #:Sonuç alınamadı.Hemoglobin (HB) için normal değer aralığı Antalya Adem Tolunay Kan Hastalıkları Merkezi laboratuvarlarındaki referans aralıkları; 13.6-17.2, MCV için 80.7-95.5 MCH:27.2-33.5, MCHC:32.7-33.5, RDW için ise 11.6-14.6’dır.



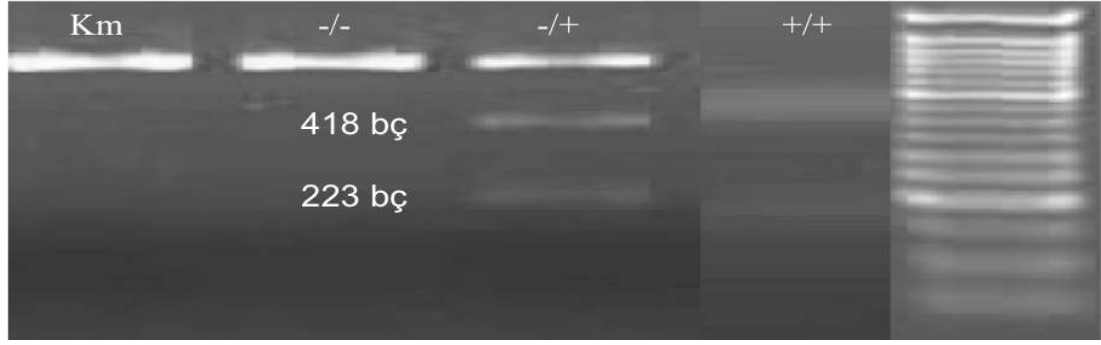
Şekil 4.1:Beta Talasemi hasta grubumuzda görülen *HBB* genine ait mutasyonların oluşturduğu genotip çeşidi ve sıklığı.

4.2 Hastalara Ait DNA Analizi Bulguları

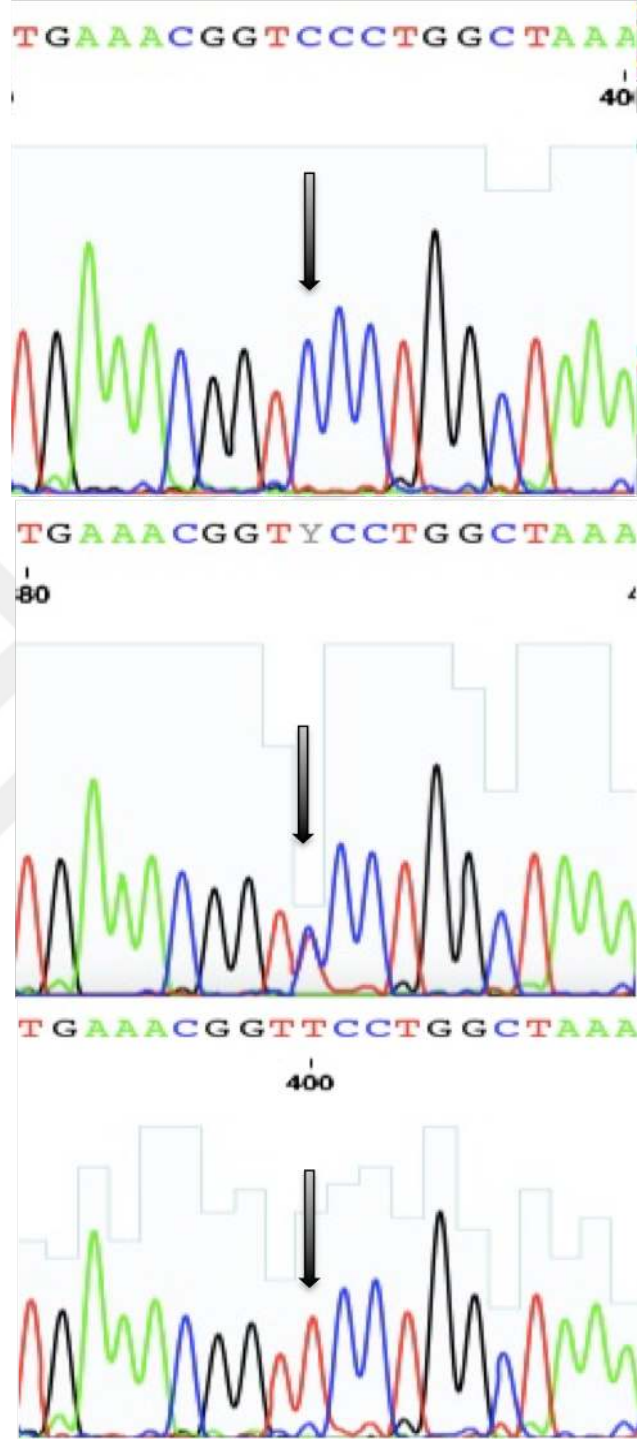
XmnI polimorfizmi için yapılan genotipleme çalışmalarında, 3 hastanın heterozigot ve 1 hastanın homozigot olduğu bulunmuştur (şekil 4.2 ve 4.3). Altı hastada ise *XmnI* polimorfizmi gözlenmemiştir.

BCL11A rs11886868 varyantı için yapılan çalışmada ise 14 hastanın heterozigot, 10 hastanın homozigot olduğu tespit edilmiştir (şekil 4.4).

KLF1 geni DNA dizilemesinde, promotor bölgesinde 2 hastada -148 G>A mutasyonu gözlenirken (şekil 4.5), 9 hastada ekzon 2'de rs2072597 (c.304T>C, p.Ser102Pro) değişimi heterozigot, 1 hastada ise homozigot olarak tespit edilmiştir (şekil 4.6).



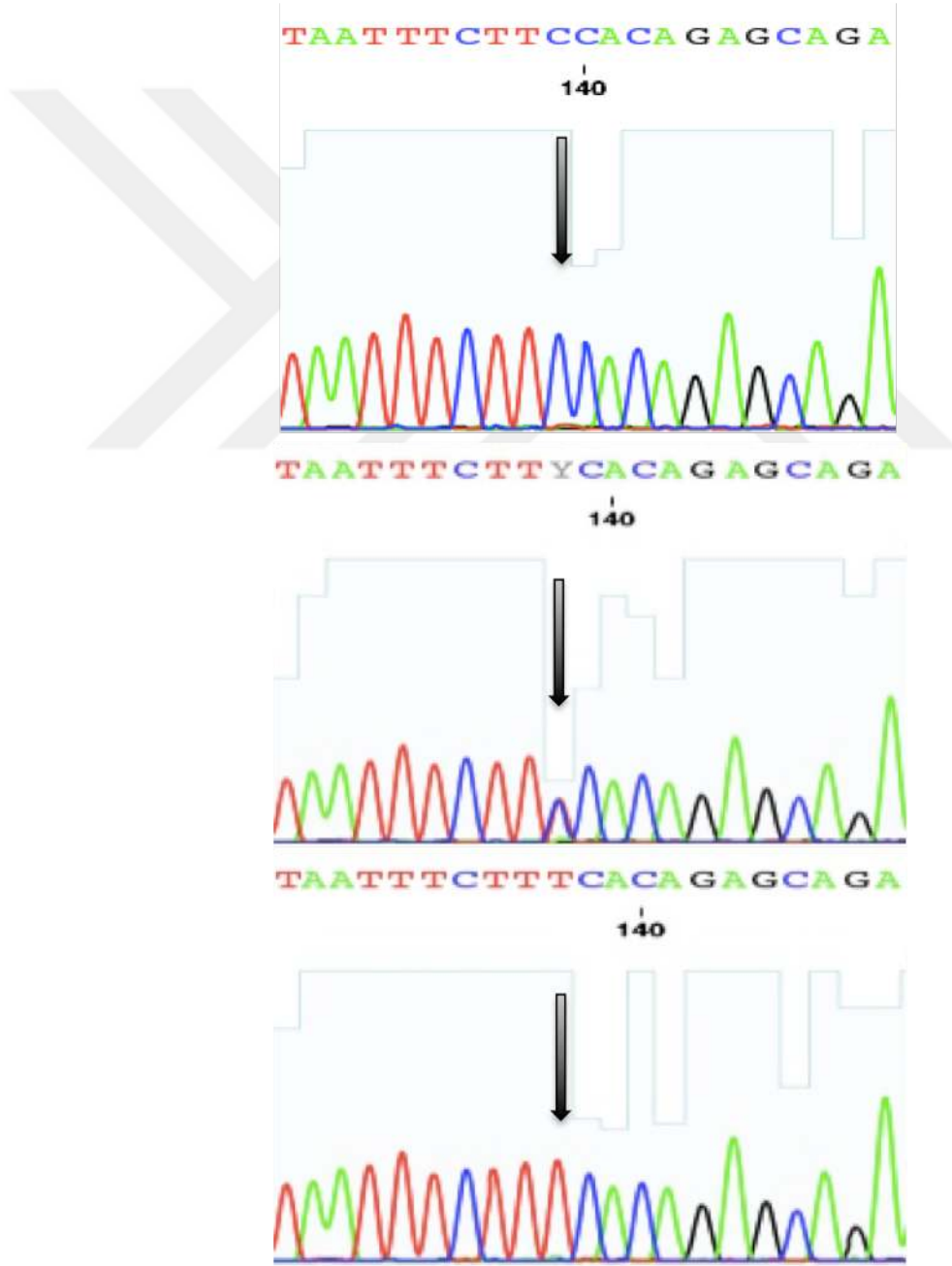
Şekil 4.2:BTM hastalarında *XmnI* polimorfizminin PZR-RFLP yöntemiyle gösterilmesi
Km:Kesilmemiş 641 PZR ürünü,-/-:normal genotip, -/+ :heterozigot, +/+:homozigot mutasyonlu bireyin agaroz jel elektroforez görüntüsü.



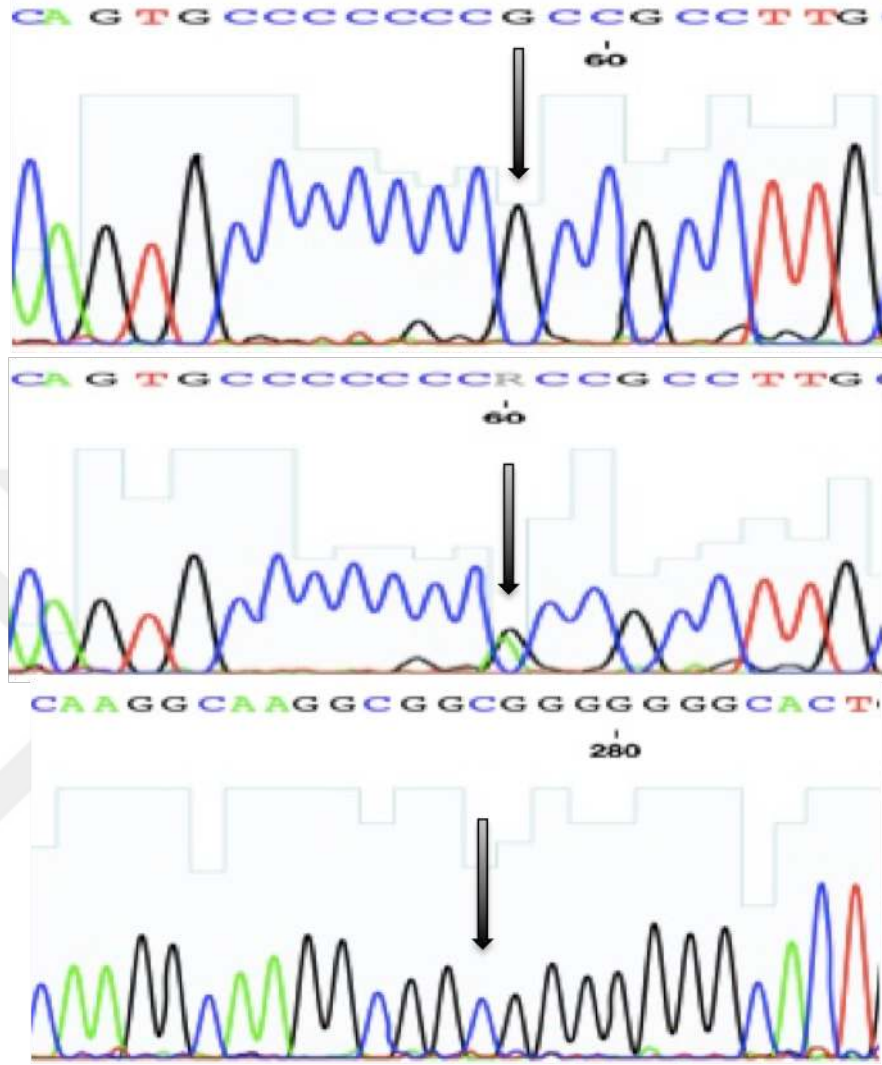
Şekil 4.3: *XmnI* polimorfizmindeki C>T değişiminin Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi. Sırasıyla yukarıdan aşağıya 1,5 ve 4 numaralı hasta örneklerine ait sonuçlara göre 1 numara normal, 5 numara heterozigot ve 4 numara homozigot mutasyonlu bireylerdir.

IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A) homozigot mutasyona sahip 13 hastamızın HbF ortalaması 10.79'dur. Bu hastaların hiç birinde *XmnI* poliformizmi gözlenmemiştir. Aynı zamanda bu hastaların 7 tanesinde *BCL11A* rs11886868'i heterozigot (şekil 4.4) durumda iken 5 tanesinde homozigot ve 1 tanesinde normal bulunmuştur.

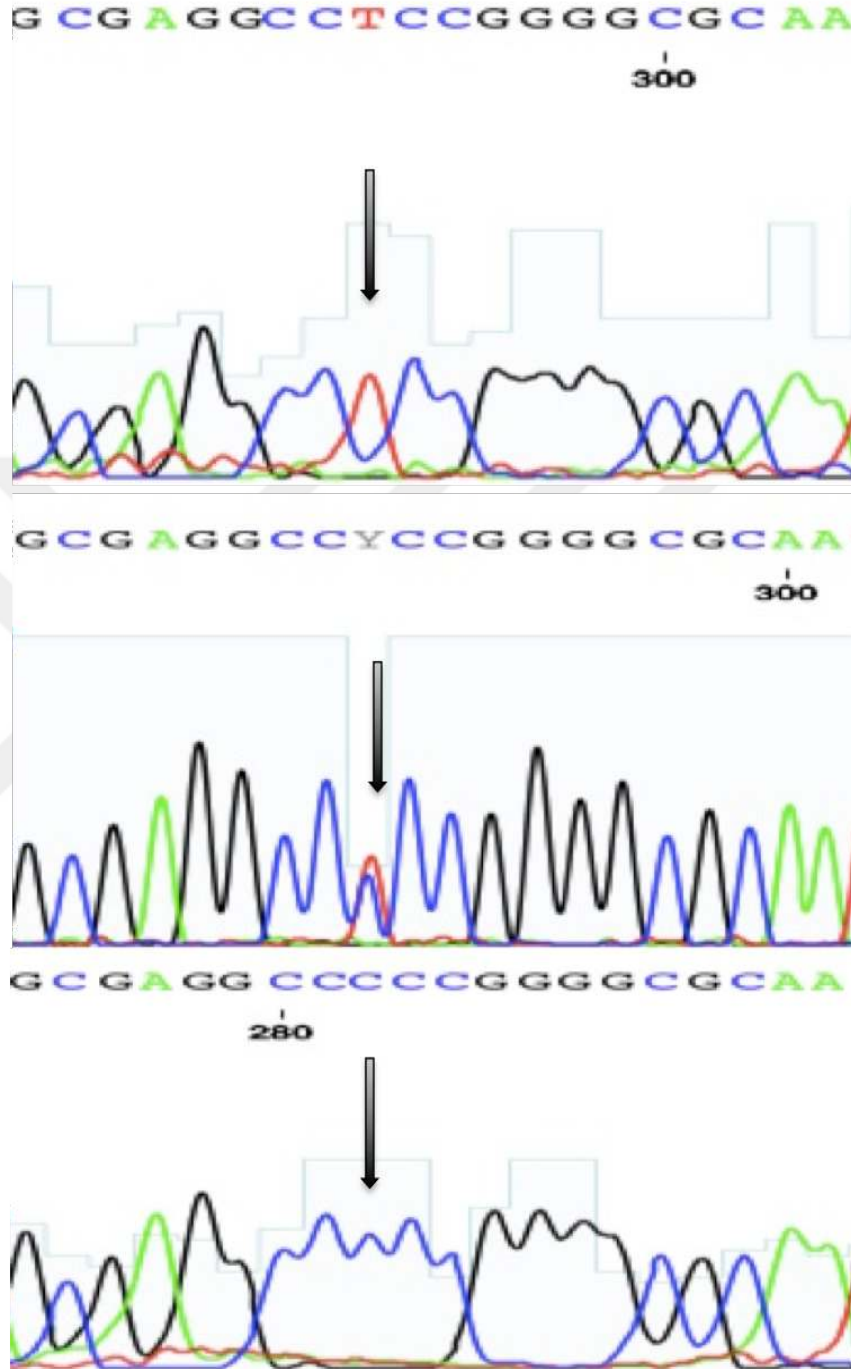
Aynı grupta patolojik *KLF1* ekzonik mutasyona rastlanmazken, promotor bölgesinde -148 G>A değişimine (şekil 4.5) sahip 1 hastada HbF değeri 61,4 olarak gözlenmiştir. Yine IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A) homozigot olan 13 hastanın bulunduğu bu grupta 3 hastada, ekzon 2 missense varyantı rs2072597 (c.304T>C, p.Ser102Pro) heterozigot durumda gözlenmiştir (şekil 4.6). Bu grupta, 1 hastanın *KLF1* geninin ekzon 3 bölgesi tekrarlı çalışmalara rağmen başarılı bir şekilde dizilenememiştir.



Şekil 4.4: *BCL11A* rs11886868 C>T değişiminin Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi. Sırasıyla yukarıdan aşağıya 16,18 ve 23 numaralı hasta örneklerine ait sonuçlara göre 16 normal, 18 heterozigot ve 23 homozigot mutasyonlu bireylerdir.



Şekil 4.5: *KLF1* promotor bölgesindeki -148 G>A değişiminin Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi: Yukarıdan aşağı sırasıyla 6 numaralı bireye ait ileri primerle çoğaltılmış normal genotipi, 5 numaralı bireye ait ileri primerle çoğaltılmış heterozigot genotipi, 20 numaralı bireye ait geri primerle çoğaltılmış normal genotipi göstermektedir.



Şekil 4.6:*KLF1*'in 2.ekzonunda p.Ser102Pro'ya sebep olan T>C değişiminin Sanger dizileme yöntemiyle gösterilmesi:Yukarıdan aşağıya sırasıyla 14 nolu bireye ait normal genotip, 26 numaraya ait heterozigot genotip ve 13 numaralı bireye ait homozigot mutasyon genotipi.

4.2.1 Genomik Değişikliklerin HbF Seviyeleri Üzerine Etkileri

XmnI polimorfizmi (rs7482144) için gerçekleştirilen Mann Whitney U testinin sonuçlarına göre $p=0.152$ istatistiki değeri bulunmuştur. Mutasyon bulunan grupta

HbF ortalaması 37.7 ve bulunmayan grupta 12.1'dir (Tablo 4.2). Bu test için *XmnI* polimorfizmi homozigot olan bir hasta otomatik olarak hariç tutulmuştur.

Tablo 4.2: *XmnI* polimorfizminin HbF üzerine etkisi

Descriptives ^a				
	XMNI		Statistic	Std. Error
HBF	N/N	Mean	12,1704	2,60786
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6,7994
			Upper Bound	17,5414
		5% Trimmed Mean	10,2503	
		Median	6,2000	
		Variance	176,824	
		Std. Deviation	13,29752	
		Minimum	2,60	
		Maximum	61,40	
		Range	58,80	
		Interquartile Range	11,20	
	rs7482144/N	Mean	37,7667	25,95640
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-73,9147
			Upper Bound	149,4480
		5% Trimmed Mean	.	
		Median	19,4000	
		Variance	2021,203	
		Std. Deviation	44,95780	
		Minimum	4,90	
		Maximum	89,00	
		Range	84,10	

a. HBF is constant when XMNI = rs7482144/rs7482144. It has been omitted.

Test Statistics ^a	
	HBF
Mann-Whitney U	19,000
Wilcoxon W	370,000
Z	-1,432
Asymp. Sig. (2-tailed)	,152
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,172 ^b

a. Grouping Variable: XMNI

b. Not corrected for ties.

BCL11A (rs11886868) değişimi heterozigot olan 14, homozigot olan 10 ve normal olan 6 birey için gerçekleştirilen Kruskal Wallis testi sonuçlarına göre 0.5395 değeri bulunmuştur. Varyasyon bulunmayan grupta HbF ortalaması 9.91, heterozigot varyasyon bulunan grupta HbF ortalaması 15.09, homozigot varyasyon bulunan grupta ise 8.36 olarak bulunmuştur (Tablo 4.3).

Tablo 4.3:*BCL11A* (rs11886868) değişiminin HbF üzerine etkisi

Descriptives					
	BCL11A			Statistic	Std. Error
HBF	N/N	Mean		9,91	3,043
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,095	
			Upper Bound	17,74	
		Median		9,4	
		Std. Deviation		7,453	
		Minimum		2,91	
		Maximum		18,70	
	rs11886868/ rs11886868	Mean		8,36	2,581
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	2,528	
			Upper Bound	14,21	
		Median		6,15	
		Std. Deviation		8,162	
		Minimum		3,76	
		Maximum		30,20	
	rs11886868/ N	Mean		15,0929	4,39111
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	5,6065	
			Upper Bound	24,5793	
		Median		9,5500	
		Std. Deviation		16,43001	
		Minimum		2,60	
		Maximum		61,40	
		Kruskal-Wallis Test		P Value	0,5395

KLFI geninin promotor bölgesinde bulunan rs79334031 (–148 G>A) varyasyonu sadece 2 hastada heterozigot olarak bulunmuş olup, 28 hastada normal bulunmuştur. yapılan Mann Whitney U testinde 0.454 değeri ortaya çıkmıştır. Varyasyon bulunmayan grupta HbF ortalaması 13.25 iken, heterozigot varyasyon bulunan grupta ise 33.15 olarak bulunmuştur (Tablo 4.4).

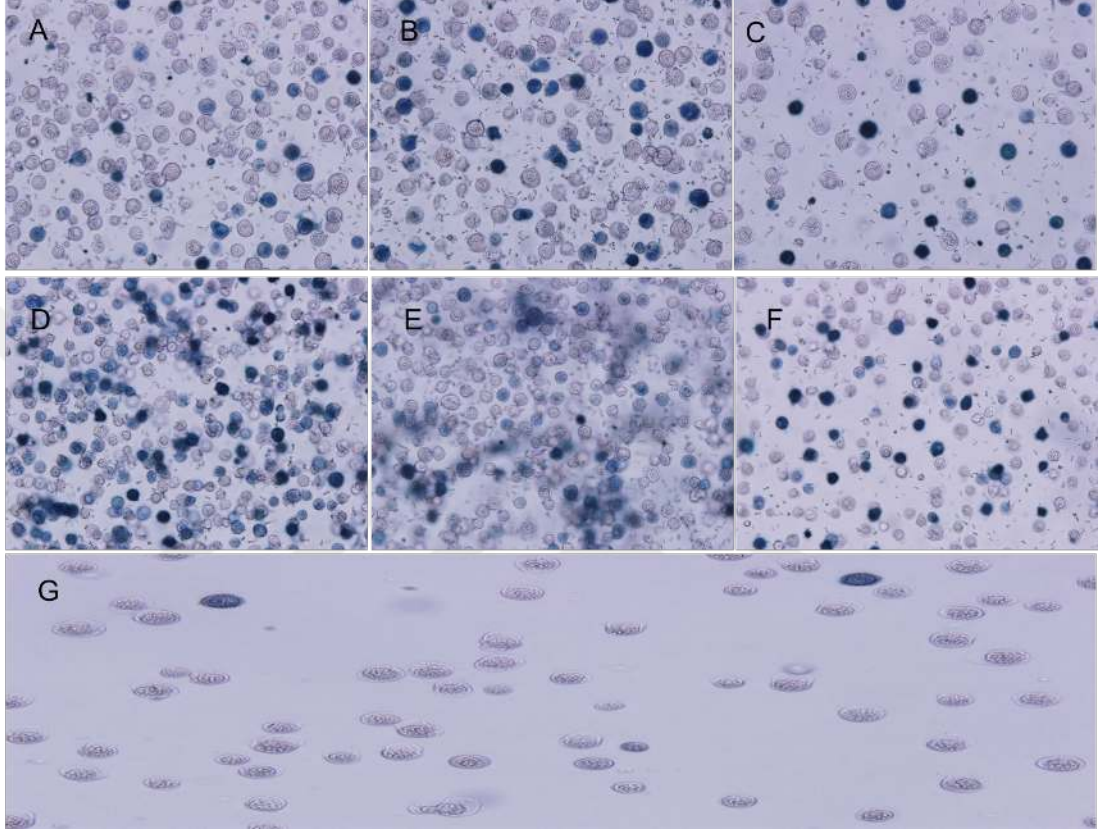
Tablo 4.4:*KLFI* geni promotor varyasyonunun HbF üzerine etkisi

Descriptives					
	PE1			Statistic	Std. Error
HBF	N/N	Mean		13,2511	3,24084
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	6,6014	
			Upper Bound	19,9007	
		5% Trimmed Mean		10,4233	
		Median		7,0500	
		Variance		294,085	
		Std. Deviation		17,14890	
		Minimum		2,60	
		Maximum		89,00	
	rs79334031/ N	Mean		33,1500	28,25000
		95% Confidence Interval for Mean	Lower Bound	-325,8003	
			Upper Bound	392,1003	
		5% Trimmed Mean		.	
		Median		33,1500	
		Variance		1596,125	
		Std. Deviation		39,95153	
		Minimum		4,90	
		Maximum		61,40	
		Range		56,50	
		Asymp. Sig. (2-tailed)	.454		

4.3 K562 Hücre Hattında Hemoglobinizasyon Sonuçları

Resveratrol (RV) ve Sodyum Butirat (SB)'nin tablo 3.5'de verilen dozlarıyla 72 saat boyunca gerçekleştirilen hücre kültürü işleminin sonucunda hemoglobinizasyonu gösteren benzidin boyama sonuçları şekil 4.7'de verilmiştir. Doza bağlı olarak RV ve

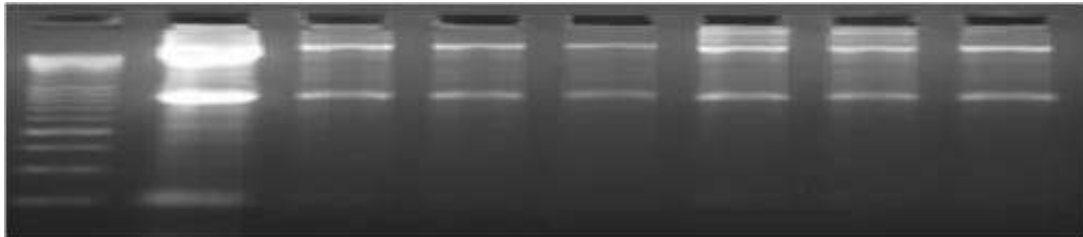
SB'nin benzidin boyama yöntemiyle hemoglobinizasyonu artırdığı gözlenmiştir. Boyama için en uygun RV dozu 50 μ M ve SB dozu 150 μ M olarak izlenmiştir. Ajan uygulanmamış grupta minimal boyanma takip edilmiştir.



Şekil 4.7:Resveratrol ve Sodyum Butirat'ın K562 hücrelerindeki benzidin boyanmasına (hemoglobinizasyon) etkisi. Resveratrol; A (25 μ M) , B (50 μ M), C (100 μ M) D,E,F:Sodyum Butirat; (150, 300 ve 600 μ M). G: Farmakolojik bir ajan uygulanmamış orjinal K562 hücresi. Benzidin ile hemoglobinlerde mavi boyanma söz konusudur.

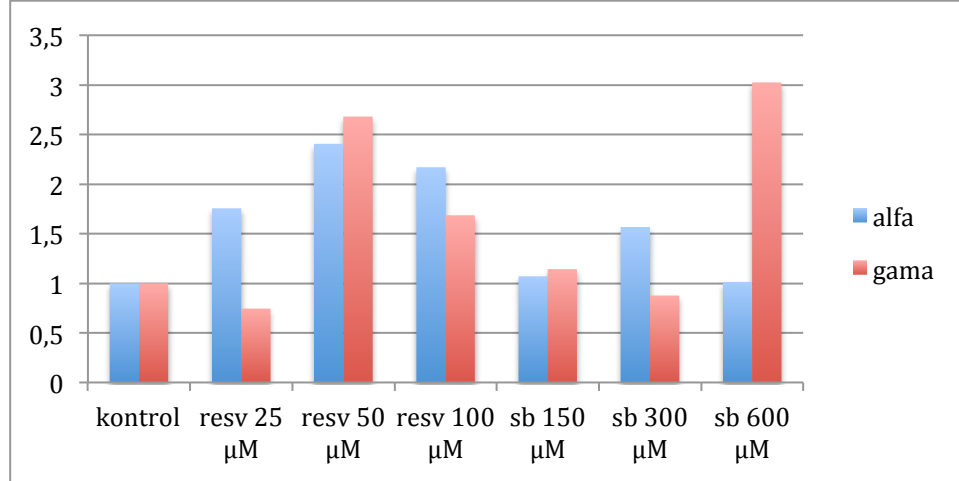
4.3.1 K562 Hücre Hattının RNA Sonuçları

Farmakolojik ajan ile muamele edilmiş K562 hücrelerinden toplanan RNA'lara ait agaroz jel elektroforez görüntüsü şekil 4.8'de verilmiştir.



Şekil 4.8:Resveratrol ve Sodyum Butirat uygulanmış K562 hücrelerinden izole edilen RNA'ların agaroz jel elektroforezi görüntüsü. Soldan sağa, Marker, Kontrol, 25, 50, 100 μ M RV ile 150, 300 ve 600 μ M SB ile muamele edilmiş hücrelerden izole edilmiş RNA'lar.

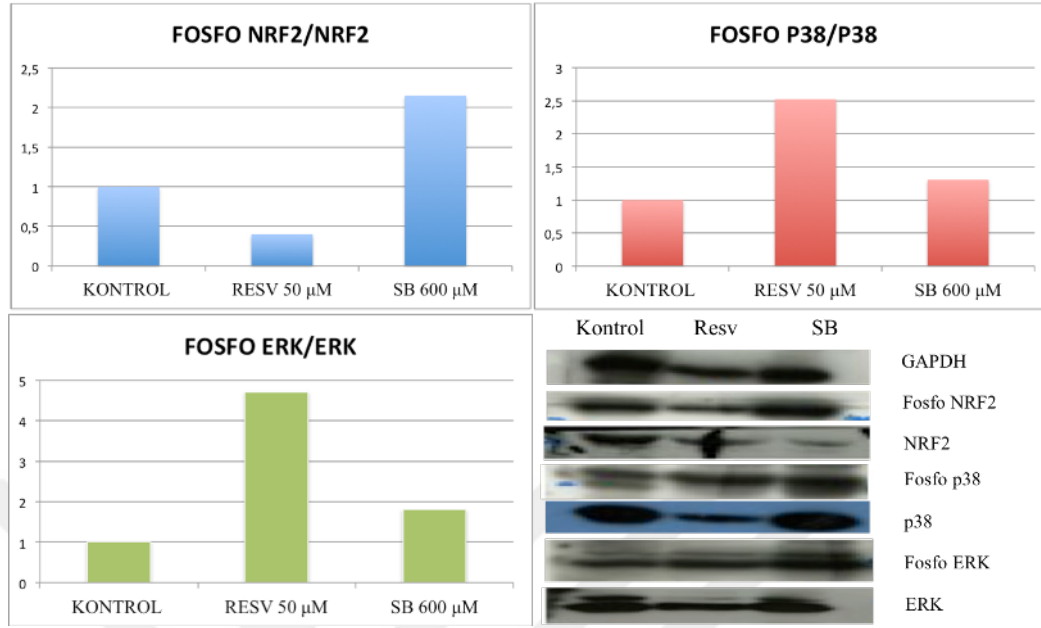
Hem RV hem SB ile indüklenmiş K562 hücrelerinin RNA'larında kalite olarak bir fark bulunmamıştır. Bu RNA'lardan globin genlerine ait kantitatif eş zamanlı-real time- PZR (Q-RT-PZR) sonuçlarına göre (Şekil 4.9); hem resveratrol hem de sodyum butirat doz bağımlı olarak alfa ve gama globin ekspresyonunda değişikliğe sebep olmuştur. En fazla gama globin ekspresyonu artışı 50 μ M resveratrol uygulamasından sonra yaklaşık 2.7 kat ve 600 μ M sodyum butirat uygulamasından sonra yaklaşık 3 kat olarak görülmüştür. Bununla beraber en fazla gama globin ekspresyonu gözlenen dozlarda resveratrol grubunda alfa globin mRNA'sında yaklaşık 2.4 kat artış gözlenmiştir.



Şekil 4.9: K562 hücrelerinde Q-RT-PZR Sonuçları:Resveratrol (Resv) veya Sodyum Butirat (SB) uygulaması sonrası globin alfa ve gama globin genlerine ait mRNA seviyelerinde değişiklik gözlenmiştir.

4.3.2 K562 Hücre Hattında Western Blot Sonuçları

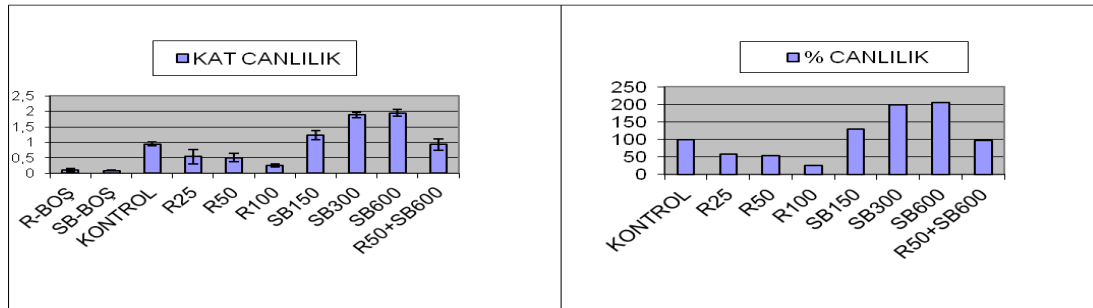
Hücre lizatlarından elde edilen proteinlerden gerçekleştirilen western blot çalışmalarının sonuçlarına göre (Şekil 4.10) ise 50 μ M resveratrol muamelesi sonucu NRF2 yolağı aktivasyonunda 0.6 kat azalma MAPK yolağı elemanlarından p38 aktivasyonunda 2.5 kat ve ERK yolağı aktivasyonunda 4.7 kat artış meydana gelmiştir. 600 μ M sodyum butirat uygulanmış grupta ise NRF2, p38 ve ERK yolaklarında sırasıyla 2.1, 1.3 ve 1.8 kat artış meydana gelmiştir.



Şekil 4.10: Resveratrol ve Sodyum Butirat Uygulanmış K562 hücrelerinde NRF-2 ve MAPK proteinlerindeki değişiklik:Resveratrol; p38 ve ERK aktivasyonu sağlarken, NRF-2 fosforilasyonunda azalmaya neden olmuştur.Sodyum butirat ise her üç proteinde de artışa neden olmuştur.

4.3.3 K562 Hücrelerine Ait MTT Sonuçları

Hücre canlılık testi sonuçlarına göre 72 saat boyunca 100 μ M resveratrol uygulaması hücrelerin yarısından fazlasını öldürmektedir (Şekil 4.11). Sodyum butiratın artan dozları ise hücre proliferasyonuna olumlu yönde katkı yapmaktadır. Bu yüzden bundan sonraki deneylerimizde 50 μ M resveratrol ile 600 μ M sodyum butirat dozları tercih edilmiştir.

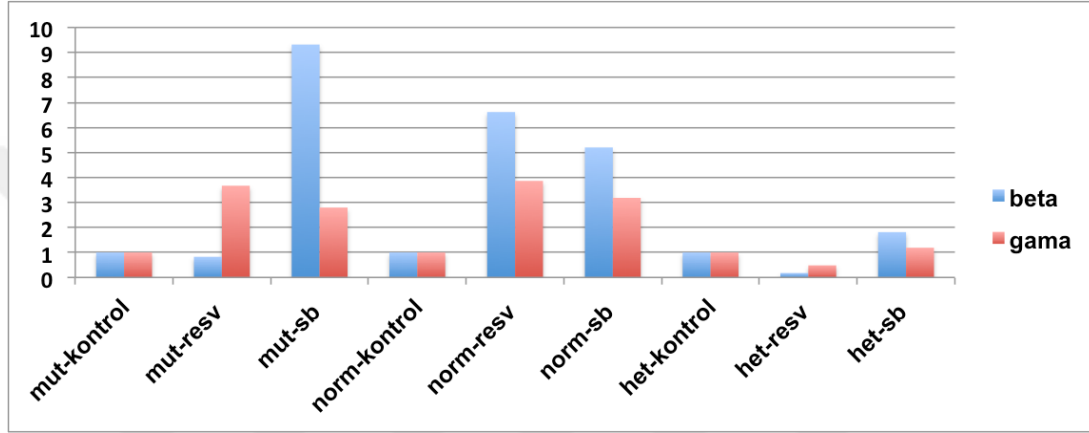


Şekil 4.11: Resveratrol ve Sodyum Butirat Uygulanmış K562 hücrelerinde MTT Sonuçları:Resveratrolün artan dozları hücre ölümü ile sodyum butiratın artan dozları ise proliferasyona sebep olmuştur.R:Resveratrol SB:Sodyum Butirat

4.4 BTM'li Hastalara Ait Q-RT-PZR Sonuçları

Beta globin geni açısından aynı mutasyona sahip (IVS.1.110 homozigot) ancak *BCL11A* rs11886868 varyasyonu açısından farklı genotiplere sahip 3 BTM'li hastanın, resveratrol veya sodyum butirat ile indüklenmiş, 21 gün süren primer

eritroid hücre hattından elde edilen Q-RT-PZR sonuçlarına göre en yüksek gama globin indüksiyonu; normal, heterozigot ve homozigot mutasyonlu bireylerde 3.8, 1.2 ve 3.6 kat olarak bulunmuştur (şekil 4.12). 3.8 katlık artış, resveratrol uygulanmış grupta, 1.2 katlık artış, sodyum butirat uygulanmış grupta ve 3.6 katlık artış ise yine resveratrol uygulanmış grupta izlenmiştir (tablo 4.5).



Şekil 4.12:BTM’li hastalarda Q-RT-PZR sonuçları:Şekle göre Resv:50 µM resveratrol ve SB:600 µM sodyum butiratu ifade etmektedir. Benzer şekilde mut:mutasyonlu bireyin, norm:normal bireyin het :heterozigot bireyin sonuçlarını göstermektedir.Kontrol ile farmakolojik ajan uygulanmamış grup ifade edilmektedir.

Ayrıca, mutasyonlu bireyin SB uygulanmış hücrelerinde 9.3 kat, resveratrol uygulanmış normal genotipli bireyin hücrelerinde 6.6 kat, SB uygulanmış normal genotipli bireyin hücrelerinde 5.2 kat ve SB uygulanmış heterozigot genotipli bireyin hücrelerinde 1.8 kat beta globin ekspresyonu artışı meydana gelmiştir.

Tablo 4.5: BTM’li hastalarda Globin Gen Ekspresyon Profili Değişimi

	mut-kontrol	mut-resv	mut-sb	norm-kontrol	norm-resv	norm-sb	het-kontrol	het-resv	het-sb
alfa	1,00	0,49	1,52	1,00	2241,95	14660,07	1,00	2,54	1,91
beta	1,00	0,83	9,32	1,00	6,62	5,20	1,00	0,18	1,81
gama	1,00	3,67	2,80	1,00	3,86	3,19	1,00	0,48	1,19

Bu bireylerin alfa globin genlerinin mutasyon profillerindeki heterojenite sebebiyle alfa globin gen ekspresyonlarındaki değişim deneysel olarak dikkate alınmamıştır.

Tablo 4.5’de *BCL11A* rs11886868 varyantı açısından mutasyonlu olan bireyin alfa globin genlerinde $\alpha 2$ Cod 59 (G>A) mutasyonu, *BCL11A* rs11886868 varyantı açısından normal olan bireyde ise -20.5 kb’lık homozigot gen delesyonu bulunmaktadır (sunulmamış proje verisi). *BCL11A* rs11886868 varyantı açısından heterozigot olan bireyde ise herhangi bir alfa globin gen mutasyonu bulunmamaktadır. -20.5 kb’lık homozigot gen delesyonu olan bireyin hücrelerindeki alfa globin ekspresyonu çok düşük olmasına rağmen $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüyle normalizasyon yapıldığında resveratrol uygulanan veya sodyum butirat uygulanan grupta sırasıyla 2241 ve 14660 kat alfa globin ekspresyonu artışı meydana gelmektedir.

BCL11A rs11886868 varyasyonunu heterozigot olarak bulunduran BTM hastasında resveratrol veya sodyum butirat uygulaması her iki grupta da alfa globin geni ekspresyonunda artışa sebep olurken, resveratrol grubunda hem beta hem de gama globin ekspresyonunda azalma sodyum butirat grubunda ise beta ve gama globin ekspresyonlarında kısmi artışa sebep olmuştur (tablo 4.5).

4.5 Primer Eritroid Hücre Kültüründe Western Blot Sonuçları

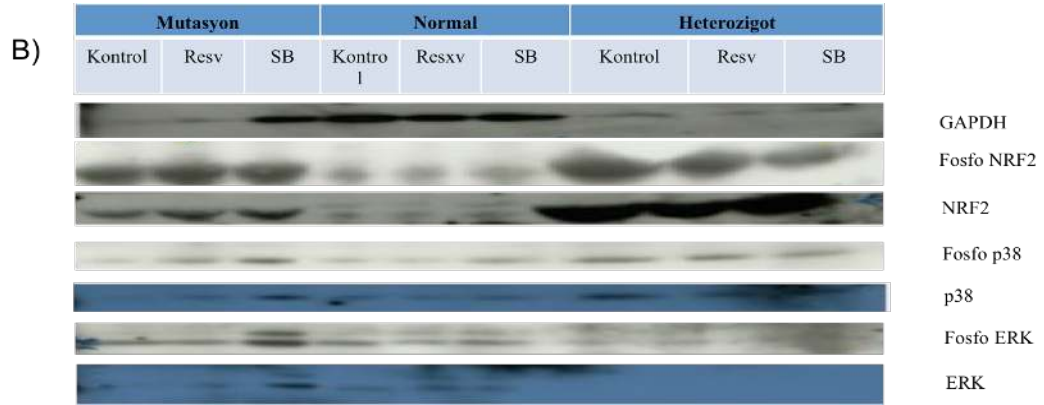
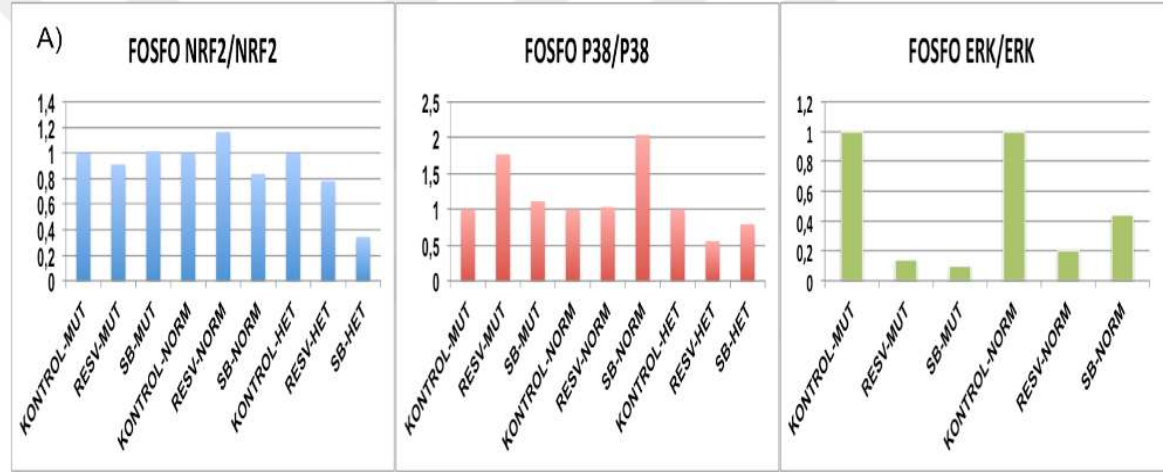
30 kişilik Beta Talasemi Majör hasta grubumuz içerisinde IVS-1.110 (G>A)/IVS-1.110 (G>A) mutasyonu taşıyan 13 kişilik grup içerisinde HbF miktarını regüle eden faktörler arasından, *KLF1* gen mutasyonları ve *XmnI* polimorfizmi bulunmayan sadece *BCL11A* rs11886868 varyasyonunu taşıma açısından farklı genotiplere sahip 3 bireyin kontrol grupları ile, 50 μ M resveratrol veya 600 μ M sodyum butirat uygulanmış primer eritroid hücre kültüründen elde edilen proteinlerde NRF-2 yolağı ile p38 ve ERK1/2 yolaklarının aktivasyonları değerlendirilmiştir (tablo 4.6).

Buna göre p38 yolağı aktivasyonu *BCL11A* rs 11886868 varyasyonu açısından mutasyonlu olan bireyin resveratrol uygulanmış hücrelerinde 1.7 kat artarken, aynı varyasyonu taşımayan diğer bireyin sodyum butirat uygulanmış hücrelerinde 2 kat artmıştır. ERK yolağı ise 3 farklı hastanın primer eritroid hücrelerinde azalmış olup sadece heterozigot *BCL11A* varyasyonu taşıyan bireyde hesaplanamamıştır (şekil 4.13).

Tablo 4.6: Primer Eritroid Hücrelerdeki Western Blot Sonuçları: Mut:Mutasyon Het:Heterozigot, Resv:Resveratrol, SB:Sodyum Butirat

	Kontrol Mut	Resv Mut	SB Mut	Kontrol Norm	Resv Norm	SB Norm	Kontrol Het	Resv Het	SB Het
NRF2	1,00	0,91	1,01	1,00	1,16	0,83	1,00	0,78	0,34
P38	1,00	1,77	1,11	1,00	1,03	2,04	1,00	0,56	0,79
ERK	1,00	0,14	0,10	1,00	0,20	0,44			

NRF-2 yolağı ise hiç bir grupta anlamlı bir şekilde değişmezken sadece heterozigot bireyin sodyum butirat uygulanmış hücrelerinde yaklaşık 3 kat azalmıştır.



Şekil 4.13: *BCL11A* rs11886868 Varyasyonuna Göre Farklı Genotipteki Hasta Örneklerinin Western Blot Sonuçları: A) Kat değişim grafiği B) Western Blot Film Görüntüsü

5.TARTIŞMA

Beta talasemi hem genetik hem de klinik heterojenite gösteren hemoglobinopatilerden biridir. Beta talaseminin en ağır klinik tablosu beta talasemi majör grubunda (BTM) gözlenmektedir. Bu grup transfüzyona ihtiyaç duyduğundan hastaların transfüzyon bağımsız hale gelmesi veya transfüzyon ihtiyaçlarının azaltılması ile ilgili araştırmalar açısından en önemli hedef grubu oluşturmaktadır. Günümüzde yapılan çalışmalarda HbF indüksiyonunun, BTM'li hastalarda ılımlı klinik seyire neden olduğu bilinmektedir. HbF indüksiyonu için gama globin promotorunu aktive etmek gerekmektedir. Beta globin lokusunda embriyonik dönemde eksprese edilen gama globin regülasyonu genetik ve epigenetik olarak çok komplike mekanizmalar ile gerçekleştirilmektedir.

Biz de bu bakış açısından yola çıkarak, çok fazla sayıda ve görevde transkripsiyon faktörü ve protein arasında gama globin regülasyonu için en önemli gördüğümüz genetik faktörler arasından *XmnI*, *BCL11A* ve *KLF1*'in etkilerini araştırmayı amaçladık.

Ayrıca sadece *BCL11A* rs11886868 varyasyonu açısından farklı genotiplere sahip 3 BTM hastasının primer eritroid hücre kültürlerinde, transkripsiyonel olarak globin genlerinin regülasyonu ile epigenetik olarak; HDAC inhibitörü olan sodyum butirat ve antioksidant bir molekül olan resveratrolün p38, ERK1/2 ve NRF2 yolları ile ilişkilerini araştırdık.

5.1 *XmnI* Polimorfizmi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Beta talasemi majör ve intermediya hastalarında *XmnI* polimorfizminin klinik etkisi değişik çalışmalarda gösterilmiştir. Pakistan'da yapılan bir çalışmada, BTM'li 30 hastanın sadece 1 tanesinde heterozigot varyasyon, BTI'lı 30 hastanın ise 12 (10 homozigot, 2 heterozigot) tanesinde *XmnI* polimorfizmi bulunmuştur (Hanif ve ark., 2015). Benzer olarak Hindistan'da yapılan diğer bir çalışmada ise 40 BTM hastasının 10'unda (8 heterozigot, 2 homozigot) ve 24 BTI hastasının 11'inde (8 heterozigot, 3 homozigot) *XmnI* polimorfizmi görülmüştür (Nadkarni ve ark., 2001). Bizim

çalışmamızda ise 30 hastanın 4 tanesinde (3 heterozigot, 1 homozigot) *XmnI* polimorfizmi görülmüştür. Buna göre *XmnI* polimorfizminin daha çok BTI'da görüldüğünü ve hastalığın klinik şiddetini azalttığını, farklı popülasyonlarda farklı sıklıklarda görüldüğünü söyleyebiliriz. IVS-II.1 mutasyonunu homozigot olarak bulunduran 103 kişilik bir İran kökenli talasemi hasta grubu içerisinde BTM'ye veya BTI'ya sebep olan faktörün *XmnI* polimorfizmi olmadığını gösteren bir çalışma da literatürde bulunmaktadır (Neishabury ve ark., 2010).

2010 yılında *HBB* mutasyon spektrumu geniş olan 57 BTI hastası üzerinde yapılan bir çalışmaya göre *XmnI* polimorfizmi, *BCL11A*'daki rs11886868, rs4671393 ve HBS1L-MYB'deki (rs28384513, rs9399137 ve rs4895441) varyasyonlar arasında sadece *XmnI* polimorfizminin yüksek HbF seviyesi ile ilişkisi olduğu ($p = 0.002$) bulunmuştur (Nguyen ve ark., 2010). Bizim hasta grubunda ise *XmnI* polimorfizimli vakaların hepsinde aynı zamanda *BCL11A*'daki rs11886868 varyasyonu bulunmaktadır. Yukarıdaki çalışma ile kıyasladığımızda, bu iki genetik faktörün HbF seviyesi üzerine etkisinin, yeni çalışmalar ile ortaya çıkarılabileceğini düşünmekteyiz.

Hemoglobinopatilerle ilişkili olarak *XmnI* polimorfizminin araştırıldığı diğer çalışmalar aşağıda özetlenmiştir. Diğer taraftan *XmnI* polimorfizminin doğum sonrası hemoglobin değişiminde (switch) gecikmeye neden olduğu gösterilmiştir (Peri ve ark., 1997). Türkiye'de ilk kez Fankoni Anemisi grubunda yüksek HbF seviyesi ile *XmnI* polimorfizmi arasında pozitif bir ilişki bulunmuştur (Rosatelli ve ark., 1992). *XmnI* polimorfizminin hala HbF miktarını direkt olarak etkileyen bir varyasyon olup olmadığı açıklığa kavuşturulamamıştır (Galarneau ve ark., 2010). Çalışmamızda, heterozigot *XmnI* polimorfizmi bulunan 3 hastanın HbF ortalaması varyasyon bulunmayan hastalara göre fazla olsa da istatistiksel olarak bulunan $p = 0.152$ değeri, olgu sayısının artırılması gerçeğini ortaya çıkarmıştır.

Literatürde aynı zamanda IVS.II.1 (G>A), FSC8 (-AA), Cod 39 (C>T), FSC6 (-A), IVS.I.1 (G>A), IVS.I.6 (T>C) ile beraber görülen *XmnI* polimorfizmi (Agouti ve ark., 2007; Neishabury ve ark., 2010) bizim hasta grubumuzda haplotip çalışması yapılmamakla birlikte, tablo 3.1'deki 4'üncü 5'inci ve 25'inci olgularda IVS.II.1

(G>A) değişimiyle aynı haplotipte olduğu görünürken, 12 numaralı olguda IVS.1.110 (G>A) ve Hb Knossos [Cod 27(G>T)] ile beraber görünmektedir.

On üç kişilik IVS.1.110 (G>A) homozigot hasta grubunda ise *XmnI* polimorfizmine hiç rastlanılmamış olması ilk defa Hb Knossos ile *XmnI* polimorfizminin birlikte aynı haplotipte olabileceğini düşündürmektedir.

5.2 *BCL11A* rs11886868 (C>T) Sonuçlarının Değerlendirilmesi

GWAS çalışmalarının birinde 2p15’de bulunan *BCL11A* genindeki varyasyonların HbF’i artırma potansiyeli %15.1 olarak değerlendirilmiştir (Menzel ve ark., 2007). Yine HBB’de 39. kodonda stop kodonu oluşturan homozigot mutasyona sahip ancak yüksek HbF seviyesi ile ilişkilendirilmiş *XmnI* (C>T) polimorfizmi bulunmayan 74 BTM ve 52 BTI olgusunda *BCL11A*’nın 2.intronunda yer alan rs11886868 C alelli taşıma ile yüksek HbF seviyesi arasında yüksek ilişki kurulmuştur. Aynı kodon 39 mutasyonunu taşıyan ve hastaları transfüzyon bağımlı BTM yerine daha ılımlı olan BTI fenotipi göstermelerini sağlayan faktörün rs11886868 varyasyonu ($p = 10^{-6}$) olduğu gösterilmiştir (Uda ve ark., 2008). Sadece rs11886868’nin etkisinin araştırıldığı güncel bir makalede de ilgili varyasyonun ($p < 0.001$) yüksek HbF ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (Dadheech ve ark., 2016). Ancak, beta talasemi hastalarındaki *XmnI* polimorfizmi ve *BCL11A* rs11886868 varyasyonlarının HbF zerindeki modifiye edici özelliklerinin anlamlı olmadığını, sadece HBE/ β -tal birleşik heterozigot hastalarda anlamlı bulunduğunu gösteren güncel bir çalışma da bulunmaktadır (Rujito ve ark., 2016).

Hasta grubumuz içerisinde *BCL11A* rs11886868 varyasyonu; 6 olguda normal, 14 olguda heterozigot ve 10 olguda homozigot olarak bulunmuştur. İstatistiksel olarak, homozigot varyasyon bulunan grupta (T risk aleli) HbF ortalamasının (8.36), heterozigot varyasyon bulunan gruba (15.09) ve varyasyon bulunmayan gruba (9.91) göre düşük olsa da Kruskal Wallis istatistiksel testine göre bu değer anlamlı bulunamamıştır ($p = 0.5395$). Bu da bize HbF değerinin ortaya çıkışında bireysel genetik yapının önemli olabileceğini işaret etmektedir. Yukarıdaki alışma ile kıyasladığımızda çalışma grubumuzda *BCL11A* rs11886868 varyasyonu 30 BTM hastasında değerlendirilmiş ve yüksek HbF seviyesi ile ilişkili bulunamamıştır. Bu

durum vaka sayımızın azlığı ve diğer faktörler (*BCL11A*'daki diğer SNP'ler vb) ile (Galarneau ve ark., 2010) açıklanabilir.

BCL11A rs11886868 varyasyonu için heterozigot bulunan iki olgumuzun birisi olan 12 numaralı olguda ayrıca heterozigot *XmnI* polimorfizmi, diğeri olan 20 numaralı olgumuzda ise yine yüksek HbF ile ilişkilendirilen *KLF1* geni promotor bölge varyasyonu olan heterozigot rs79334031 gözlenmiştir. Bu iki olguda HbF seviyeleri sırasıyla 19.4 ve 61.4'tür. Homozigot *BCL11A* varyasyon grubunda bulunan 5 numaralı bireyde ise *KLF1* rs79334031 varyasyonu ve *XmnI* polimorfizmi aynı anda bulunmaktadır. Bu bireyin HbF seviyesi ise 4.9 olarak bulunmuştur. 20 numaralı olguda *BCL11A* ve *KLF1* varyasyonları HbF seviyesini artırırken, 5 numaralı olguda ayrıca *XmnI* polimorfizminin de bulunması beklenmedik bir şekilde görece daha düşük HbF seviyesi gözlenmesine sebep olmuştur. Oysa *XmnI* polimorfizminin varlığının HbF seviyesini yükseltmesi beklenmektedir. Olgularımız arasında en yüksek HbF seviyesi 20 numaralı bireyde 61.4 olarak ölçülmüştür. Bu bireyde *KLF1* promotor bölge mutasyonu ve *BCL11A* varyasyonu heterozigot olarak bulunmuştur. Yine beklenmedik bir şekilde hem *XmnI* polimorfizmini hem de *BCL11A* varyasyonunu homozigot olarak bulunduran 4 numaralı vakada HbF seviyesi görece daha düşük (7.6) olarak ölçülmüştür. Bu iki vaka kıyaslandığında, bu sonuçlar bize HbF indüksiyonunda *KLF1* promotor bölge değişiminin HbF artışında *XmnI* polimorfizmine göre daha kilit bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

5.3 *KLF1* Mutasyon Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Yüksek HbF seviyesi ile ilişkilendirilen HPFH, daha çok beta globin lokusu içerisinde yer alan gama globin genlerindeki delesyonel veya non-delesyonel promotor bölge mutasyonlarının sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, HPFH'nin 2013 yılında beta globin lokusu dışında yer alan *KLF1* genindeki bir promotor mutasyonu (-148G>A, rs79334031) sonucu da ortaya çıkabileceği gösterilmiştir (Radmilovic ve ark., 2013). Bu değişiklik, SP1 (Spesifik Protein1) isimli transkripsiyon faktörünün *KLF1* promotoruna bağlanma bölgesini ortadan kaldırmaktadır. *KLF1* ekspresyonunu yaklaşık %30 oranında azaltan bu değişiklik, *KLF1*'in *HBB* promotoruna yeterince bağlanamamasına ve yeteri kadar beta globin üretilmemesine sebep olmaktadır (McMorrow ve ark., 2000).

KLF1'in promotorundaki bu varyasyon, erişkin beta globin üretilmesi yönünde aktivite gösteren protein olan BCL11A'nın da etkilenmesine sebep olmaktadır. Bu sayede *KLF1* rs79334031 mutasyonu, çift yönlü olarak HBB üretimini azaltmakta ve represör etkisi üzerinden kalkmış HbF üretimine katkıda bulunmaktadır (Tallack ve Perkins, 2013; Zhou ve ark., 2010). rs79334031'den başka 65 civarında farklı *KLF1* geni değişiminin de KLF1 fonksiyon kaybına neden olarak yüksek HbF'i sağladığı son dönem yayınlanan bir derlemede belirtilmiştir (Perkins ve ark., 2016).

30 kişilik hasta grubumuz içerisinde *KLF1* geni promotor bölge varyasyonu rs79334031'i heterozigot olarak taşıyan yalnızca 2 olgu bulunmaktadır. Bunlardan birisi (5 numaralı olgu), *XmnI* polimorfizmi heterozigot ve *BCL11A* rs11886868 varyasyonu homozigot olup HbF seviyesi 4.9'dur. Diğer olan 20 numaralı olguda ise *BCL11A* rs11886868 varyasyonu heterozigot olup HbF seviyesi 61.4'tür. Burada da görüldüğü üzere *XmnI* polimorfizminin bulunmasının HbF'i düşürdüğü görülmektedir. Sadece -148 G>A promotor bölge mutasyonunu taşıyan izole vakalar bulunduğu takdirde bu varyasyonun HbF'i modifiye etme etkisi daha iyi anlaşılabilir.

Hasta grubumuzda, rs79334031 promotor bölge varyasyonundan başka klinik olarak anlamlı sayılabilecek hiç bir *KLF1* varyasyonu gözlenmemiştir. Kliniği etkilemediği bilinen (Arnaud ve ark., 2010) *KLF1* geninin 2. ekzonunda yer alan p.Ser102Pro değişikliği 9 olguda heterozigot olup bu grubun HbF ortalaması 7.86 olarak bulunmuştur. Sadece 13 numaralı olguda p.Ser102Pro değişikliği homozigot olarak bulunmuş olup bu olgunun HbF değeri 3.1 olarak ölçülmüştür. 13 numaralı olguda incelediğimiz HbF'i değiştiren diğer varyasyonların bulunmaması bireysel genetik faktörlerin rol oynayabileceğini düşünmektedir.

5.4 HbF indüksiyonunda Globin RNA Profili Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Beta talasemi majör hastalarında en genel tedavi yaklaşımları kan transfüzyonu, kemik iliği nakli ve HbF üretiminin farmakolojik ajanlarla indüklenerek yeniden aktive edilmesidir. Bu çerçevede hem hücre hattı çalışmalarında hemoglobinizasyonun gösterilmesi hem de hastalardan elde edilen primer eritroid hücrelerde, seçilmiş farmakolojik ajanlarla indüksiyon sağlanarak uygun dozda RNA transkripsiyonunun sağlanması temel hedefler arasındadır. HbF düzeyinin göstergesi

olan gama globin RNA düzeyinin belirlenmesi informatif bilgi vermektedir. Biz de bu çalışmamızın bir parçası olarak hem K562 hücre hattında hemoglobinizasyonu hem de hasta primer eritroid hücrelerinde globin RNA düzeylerini belirleyip, literatür ile kıyaslamayı ve bu yöndeki çalışmalara katkı sağlamayı amaçladık.

5.4.1 K562 Hücrelerinde Globin RNA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kontrol grubunda herhangi bir ajan ile muamele edilmemiş hücreler ile resveratrol veya sodyum butirat ile muamele edilmiş hücrelerin RNA profilleri, beta aktin kontrol RNA'sına kıyasla alfa ve gama globin genleri üzerinden yapıldığında; en fazla gama globin transkripsiyonu 600 μ M SB uygulanmış grupta görülmüştür (şekil 4.9). Daha sonra, resveratrolün sırasıyla 50 ve 100 μ M'lık dozları yüksek gama globin transkripsiyonu ile ilişkili bulunmuştur. Resveratrolün anti-kanser ve apoptotik özellikleri olduğu bilinmektedir (Lin ve ark., 2011; Wang ve ark., 2015). Yaptığımız toksisite (MTT) çalışmalarında resveratrolün artan dozlarının apoptotik olduğunun gösterilmesi ve sodyum butiratın bir HDAC inhibitörü olarak sağ kalım ve hücre proliferasyonunu sağlaması gibi nedenler göz önüne alındığında optimum resveratrol ve sodyum butirat dozlarının sırasıyla 50 ve 600 μ M olmaları (Şekil 4.11) beklenen bir sonuçtur.

5.4.2 Primer Eritroid Hücrelerde Globin RNA Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kan transfüzyonu sonrası barsaklarda artmış demir emilimine, stabil olmayan hemoglobin molekülünün parçalanması sonrası açığa çıkan serbest globin zincirleri ve demir molekülleri beta talasemide oksidatif strese neden olan başlıca sebeplerdir (Amer ve ark., 2008a).

BCL11A rs11886868 açısından homozigot mutasyonlu, normal ve heterozigot olan sırasıyla 23, 16 ve 18 numaralı BTM'li bireylerin, 50 μ M resveratrol veya 600 μ M sodyum butirat uygulanmış primer eritroid hücrelerinden gerçekleştirdiğimiz RNA izolasyonu, cDNA sentezi ve globin genleri Q-RT-PZR sonuçlarına göre en yüksek gama globin indüksiyonu *BCL11A* rs11886868 açısından normal olan bireyin 50 μ M resveratrol uygulanmış hücrelerinden elde edilmiştir (Tablo 4.5). Tablo 4.5 dikkatli bir şekilde incelendiğinde *BCL11A* rs11886868 açısından heterozigot olan birey dışında diğer resveratrol veya sodyum butirat uygulanmış gruplarda başarılı bir

şekilde gama globin indüksiyonu gerçekleştirilebilmiştir. Heterozigot genotipli bireyin gama globin transkripsiyonunda ise anlamlı bir azalma veya artış izlenmemiştir.

Hücre kültüründeki gama globin ekspresyonumuz RNA düzeyinde başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiş olup erişkin beta globin mRNA'sı miktarında da bazı değişiklikler izlenmiştir. *BCL11A* rs11886868 varyasyonu açısından homozigot mutasyonlu bireyin beta globin mRNA'sı, SB uygulandığında 9.3 kat artmış fakat RV uygulandığında ise yaklaşık 0.2 kat azalmıştır. *BCL11A* rs11886868 varyasyonu açısından normal olan bireyin beta globin mRNA'sı ise RV uygulandığında 6.6 kat artmış SB uygulandığında ise 5.2 kat artmıştır. Heterozigot bireyde ise gama globin transkripsiyonuna benzer bir profil izlenmiştir.

BTM'li hastalarda alfa globin zincirlerinin non-alfa globin zincirlerine oranı değerlendirilmektedir. Uygulanan tedavi protokollerinde alyuvar içerisindeki eşleşmemiş alfa globin proteinleri inefektif eritropoyeze neden olmaktadır. Bu yüzden kullanılan ajanların gama globin ekspresyonunu artırırken alfa globin ekspresyonunda bir artışa neden olmamaları gerekmektedir. Alfa globin zinciri sentezinde azalmayı sağlayacak terapötikler de BTM hastalarının tedavisi için ayrıca önem kazanmaktadır (Chaisue ve ark., 2007; Harteveld ve Higgs, 2010). Alfa globin ekspresyonunda %50'ye kadar meydana getirilebilecek azalmanın globin zincir dengesizliğini ortadan kaldırabileceği öngörülmektedir (Mettananda ve ark., 2015).

Hasta grubumuzda resveratrol uyguladığımız ve *BCL11A* rs11886868 varyasyonu açısından homozigot mutasyonlu bireyin hücrelerinde istenilen düzeyde alfa globin mRNA'sında azalma gerçekleştirilebildiği gibi gama globin ekspresyonu da artırılabilmiştir. Bu sayede sadece RNA düzeyindeki sonuçlarımız bize *BCL11A* mutasyonunu homozigot olarak taşıyan bireylerde resveratrol tedavisinin uygun dozlarda terapötik etki yaratabileceğini göstermektedir. Fetal hemoglobin üretiminde ve regülasyonunda önemli rolleri olan *BCL11A*, *KLF1* genleri ile *XmnI* polimorfizmi gibi genetik faktörlerin, bireylerdeki beta globin mutasyon profili belirlendikten sonra değerlendirilerek uygun ajanların etkili dozlarının araştırılması ve daha fazla

sayıda benzer genotipik profile sahip hastaların ön çalışmalarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Bu konuda önde giden çalışma gruplarından bir İtalyan talasemi grubu en yeni çalışmalarında 15 farklı beta globin mutasyon profiline sahip toplam 72 hastadan 731 eritroid hücre kültürü örneğini biobankalama sistemi ile araştırmacıların hemoglobinoziti çalışmalarında kullanımına hazır hale getirmiştir (Cosenza ve ark., 2016). Ülkemizde ise en fazla görülen beta globin mutasyonu olan IVS-1.110 (G>A)/ IVS-1.110 (G>A) genotipinden toplam 8 hastadan 81 örnek bulunmaktadır (Cosenza ve ark., 2016). Bizim hasta grubumuzda ise 13 adet aynı beta globin mutasyon profiline sahip hasta bulunmaktadır. *BCL11A*'nın globin promotorları üzerindeki etkisi düşünüldüğünde sadece *BCL11A* mutasyon profili farklı olan fakat aynı beta globin ve alfa globin genomik profiline sahip bireylerin primer eritroid hücre kültürlerindeki fetal hemoglobin indüksiyon çalışmalarının artması gerekmektedir. Bu sayede globin dengesizliğini ortadan kaldıracak ajanların terapötik etkisi daha iyi anlaşılacaktır.

5.5 HbF indüksiyonunda p38, ERK1/2 ve NRF2 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi

K562 hücreleri ile 30 hasta arasından sadece *BCL11A* rs11886868 açısından farklı genotiplere sahip 3 BTM hastasının primer eritroid hücre kültürlerindeki resveratrol ve sodyum butirat ajanlarının etkileri aşağıda değerlendirilmiştir.

5.5.1 K562 Hücre Hattında p38, ERK1/2 ve NRF2 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi

K562 hücrelerine 50 µM resveratrol uygulaması sonucu NRF2 yolağı aktivasyonunda 0.6 kat azalma, p38 ve ERK yolakları aktivasyonlarında ise sırasıyla 2.4 ve 4.7 kat artış görülürken; 600 µM sodyum butirat uygulaması sonucu NRF2, p38 ve ERK yolaklarında sırasıyla 2.1, 1.3 ve 1.8 kat artış meydana gelmiştir. Hücre canlılığı ile hedef proteinlerin sonuçları birlikte değerlendirildi. Beta globin ekspresyonu yapmayan K562 hücreleri, gama globin indüksiyonu yaparken 50 µM resveratrol uygulaması sonucu strese girmektedir. Apoptozisten kurtulabilen hücreler, MAPK yolaklarından daha çok ERK yolağını kullanmaktadır. Aynı zamanda p38 aktivasyonu ile yüksek gama globin ekspresyonu yapabilmektedir.

K562 hücrelerinde sodyum butiratın 600 μM 'lik dozu ise hücrelerde apoptoz yerine proliferasyona neden olarak daha çok NRF2 yolağını aktive ederek gama globin indüksiyonu gerçekleştirmektedir. Yapılan çalışmalarda K562 hücrelerinin BCL11A ekspresyonu gerçekleştirdiği gösterilmiş olup, 0.6 mM sodyum butirat uygulandığında, epigenetik olarak sınıf 3 HDAC inhibisyonu yapmaktadır. Bu sayede BCL11A ekspresyonundaki veya translasyonundaki azalmaya bağlı olarak hücrelerin yüksek gama globin ekspresyonu yaptıkları bildirilmiştir (Chen ve ark., 2009). Hemin, apicidin ve trichostatin A gibi HDAC inhibitörleri kullanarak yapılan bir araştırmada p38 MAPK yolağı kullanılarak gama globin ekspresyonu sağlandığı gösterilmiştir (Cao ve ark., 2004; Pace ve ark., 2003; Wei ve ark., 2007). Yine bir başka çalışmada sodyum butirat gibi kısa zincirli yağ asidi türevlerinin hem insan eritroid hücrelerde hem de K562 hücrelerinin özellikle gama globin promotorunda inaktivasyona neden olduğu bildirilmektedir. Burada HDAC3 ile onun adaptör proteini olan NCoR arasındaki bağlantının koparılması gama globin promotoru reaktivasyonu sağladıkları gösterilmiştir (Mankidy ve ark., 2006). Biz de benzer şekilde bir HDAC inhibitörü olarak sodyum butiratın p38 yolağı ile gama globin transkripsiyonunu artırdığını gösterdik.

Literatürde benzer şekilde stres altına giren hücrelerin apoptozisden kurtulabildikleri takdirde gama globin ekspresyonlarında artışlar gözlemlendiği de bildirilmiştir (Mabaera ve ark., 2008; Yan ve ark., 2014).

Literatürden farklı olarak deneylerimizde K562 hücrelerinde sodyum butirat uygulaması hem p38 hem de ERK1/2 aktivasyonuna neden olmuştur. Aynı miktar (0.6 mM) SB ile 72 saat sonunda elden edilen Western Blot sonuçları bize ERK yolağı aktivasyonunun p38 yolağı aktivasyonundan daha fazla olduğunu göstermiştir. Literatürde ise ERK yolağı aktivasyonunun 3 saatin sonunda azaldığını fakat p38 yolağı aktivasyonunun 4. günün sonunda da devam ettiğini (şekil 2.9) gösteren bir çalışma bulunmaktadır (Witt ve ark., 2000). ERK yolağı aktivasyonundaki bu farkın hücresel ve deneysel koşullardan kaynaklandığını söyleyebiliriz. Yaptığımız çalışmada, resveratrolün 50 μM 'lik dozunun K562 hücrelerinde antioksidant yolak olan NRF2 yolağı yerine daha çok MAPK

yolaklarını aktive ettiği gör÷lmektedir. Bu durum, ilgili dozun K562 hücreleri için stres ortamına neden olması ile açıklanabilir.

Ancak önemli bir nokta olarak, çalışmamızda bu stres koşulunda dahi K562 hücrelerinin yaklaşık 2.7 kat gama globin transkripsiyonu yaptığını gösterdik. Artan gama globin zincirlerinin HbF düzeyine olumlu katkısı olabileceği öngör÷lebilir.

5.5.2 Primer Eritroid Hücre Kültüründe p38, ERK1/2 ve NRF2 Western Blot Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Araştırmamızın bu kısmında, K562 hücre hattında benzidin boyaması ve hücre canlılık testi sonuçlarına göre resveratrol için 50 µM'lik ve sodyum butirat için 600 µM'lik dozlar optimum doz olarak belirlendikten sonra, BTM hastalarının primer eritroid hücre kültürlerinde aynı dozlar ile HbF indüksiyonunu gerçekleştirdik.

BCL11A rs11886868 varyasyonu için homozigot mutant (mut) veya normal (norm) bireylerde, resveratrol veya sodyum butirata verdikleri cevaplara net olarak bakılırsa, MAPK yolaklarından ERK yolağının azalışı ve p38 yolağının artışı yönünde düzenlendiği söylenebilir. En fazla artış; sodyum butirat uygulanmış ve mutasyon taşımayan grupta gözlenmiştir. En fazla azalma ise yine sodyum butirat uygulanmış fakat mutasyon taşıyan grupta gösterilmiştir. Bu sonuçlar bize, *BCL11A* rs11886868 varyasyonu için mutasyon taşımayan BTM hastalarında, HbF indüksiyonu için p38 yolağını aktive edici sodyum butirat gibi farmakolojik ajanların kullanılması gerektiğini işaret etmektedir.

BCL11A rs11886868 varyasyonu açısından mutasyon taşıyan veya taşımayan grupta NRF2 yolağının aktivasyonunda önemli değişimlerin gözlenmezken (tablo 4.6), heterozigot olan bireyin primer eritroid hücrelerinde 3 kat azalma gözlenmiştir. İlgili dozların heterozigot bireyin hücrelerinde p38 yolağı aktivasyonunda da bir azalma gözlenirken ERK yolağı ile ilgili fosfo ERK sinyali alınamadığı için bir kıyaslama yapılamamıştır.

Resveratrol veya SB uygulanmış *BCL11A* varyasyonu taşıyan birey ile aynı varyasyonu taşımayan birey karşılaştırıldığında, varyasyonu taşıyan bireyde p38 yolağındaki aktivasyon artışı resveratrole karşı verilen cevap iken, varyasyonu

taşımayan bireyde ise sodyum butirat uygulamasına karşı verilen cevaptır. *BCL11A* rs11886868 varyasyonunu primer eritroid hücrelerinde taşımayan BTM hastaları, gama globinin indüksiyonu için sodyum butirat ile, aynı varyasyonu taşımayanlar ise resveratrol ile p38 yolağı aktivasyonunu yapmaktadır.

Bu veriler bize, BTM’li hastalarda HbF indüksiyonu ile ilgili olarak, genetik ve epigenetik faktörler arasındaki ilişkiyi göstermektedir.

Sonuçlarımızın, HbF’i modifiye eden genlerin mutasyon profilleri açısından homojen olan, daha geniş serili BTM’li hastalarda tekrarlanarak değerlendirilmesi, geçerli terapötik yaklaşımların belirlenebilmesi için önem kazanmaktadır. Özellikle heterozigot *BCL11A* varyasyonu taşıyan grupta, resveratrol ve sodyum butirata verilen transkripsiyonel ve translasyonel cevap değişken olduğu için bu grupta HbF indüksiyon çalışmalarında heterozigot durumun göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bu da bize resveratrol veya sodyum butiratın terapötik olarak kullanılmasıyla aynı sonuç alındığında hasta için bir faydasının olmayacağı sonucunu gösterebilir.

Biz bu araştırmamızda ilk defa, bireysel genotipe bağlı indüklenebilir gama globin ekspresyonunu incelerken, genetik ve epigenetik faktörleri birarada değerlendirerek, iki farklı ajan olan resveratrol ve sodyum butiratu kullandık. Bir antioksidan molekül olarak resveratrolün yüksek dozlarının hem K562 hem de BTM’li hastaların primer eritroid hücre kültürlerinde, antioksidan yolak olan NRF2 yolağı yerine stres yolağı olan p38 yolağı aktivasyonunu gerçekleştirerek, gama globin ekspresyonunu artırdığını gösterdik. Sodyum butiratın ise bir HDAC3 inhibitörü olarak, K562 hücrelerinde bir antioksidan molekül gibi davranıp NRF2 aktivasyonu yapabileceğini ve sadece *BCL11A* rs11886868 varyasyonu taşımayan BTM’li hastaların primer eritroid hücrelerinde daha çok p38 yolağını aktive ederek gama globin indüksiyonunu artırabileceğini gösterdik.

Antioksidan veya stres; hangi yolakların daha fazla kullanıldığından bağımsız olarak kullandığımız resveratrol veya sodyum butiratın her ikisinin de gama globin ekspresyonu yapabildiğini literatürle uyumlu bir şekilde tespit ettik.

Farmakogenetik ve nutrigenetiğin önem kazanacağı çalışmaların hızla ilerlediği tıp dünyasında, bireysel genotipin dışlanmaması gerektiğini gösteren çalışmalara, beta talasemi major hastaları üzerinden bu araştırma ile literatüre katkı sunduk. Bu doğrultuda özetle; p38 yolağı ile gama globin ekspresyonu artırılmak istenildiğinde, antioksidan bir molekül olan resveratrolün *BCL11A* rs11886868 varyasyonu taşıyan BTM'li bireylerde kullanılması, HDAC inhibitörü olan sodyum butiratın ise aynı varyasyonu taşımayan bireylerde kullanılması gerektiği söylenebilir. Hücre içi yolların aktivasyonlarını göz ardı ettiğimizde ise sodyum butiratın veya resveratrolün her iki grupta da gama globin reaktivasyonu için kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- 1) Sonuç olarak, beta talasemi dünyada ve ülkemizde çok iyi bilinen bir tek gen hastalığı olmasına karşın, halen bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır.
- 2) Beta talaseminin tanı ve tedavisine yönelik moleküler genetik, farmakogenetik ve epigenetik yaklaşımlar öne çıkmaktadır. Bu çerçevede farklı HbF indüksiyonu yolları dikkat çekmektedir.
- 3) Yaptığımız projede genetik faktör olarak *KLF1*, *BCL11A* ve *XmnI* varyasyonlarına ait bulgular literatürle uyumlu bulunmuştur.
- 4) Hasta sayısı 30 olan çalışma grubumuzda yapılan Kruskal Wallis veya Mann Whitney U istatistiksel testleri ile yüksek HbF değerini birebir açıklayan anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır.
- 5) Örneklem sayısı artırılarak, incelenen her üç genetik faktörün HbF üzerine etkisi daha sağlıklı bir şekilde değerlendirilebilir. Kritik öneme sahip olan *BCL11A*'nın diğer genomik varyasyonları da değerlendirilmelidir.
- 6) Antioksidan bir molekül olan resveratrolün yüksek dozlarının hücreyi strese sokup apoptozise götürebileceği, apoptozisten kurtulan hücrelerin gama globin ekspresyonu yapabileceği gösterilmiştir.
- 7) Bir HDAC inhibitörü olan sodyum butiratin hem K562 hücrelerinde hem de BTM'li hastaların primer eritroid hücre kültürlerinde HbF indüksiyonu yapabildiği gösterilmiştir.
- 8) Daha etkili HDAC inhibitörleri kullanılarak HbF'i artırabilecek ajanlar seçilebilir.

- 9) İndüksiyon çalışmaları gerçekleştirilecek bireylerdeki alfa globin gen mutasyonu profili, indüksiyon sonrasında gerçekçi olmayan alfa globin/non-alfa globin oranı sonuçlarının elde edilmesine neden olabilir. Bu yüzden indüksiyon çalışmalarında genetik olarak daha homojen bireylerin seçilmesi daha net sonuçlar ortaya koyacaktır.
- 10) Aynı beta globin mutasyonu taşıyan fakat *BCL11A* rs11886868 varyasyonu açısından farklı genotipe sahip hastaların HbF indüksiyonu çalışmaları bize bir HDAC inhibitörü olarak sodyum butiratın normal genotipli bireylerde kullanılması, antioksidan bir molekül olarak resveratrolün ise mutasyonlu bireylerde kullanılması durumunda gama globin reaktivasyonundan sorumlu hücre içi yolağının p38 yolağı olduğunu göstermiştir.
- 11) Genetik faktörlere ilave olarak, HbF'in epigenetik olarak regülasyonunda görev aldığı gösterilen mikro RNA çalışmaları artırılmalıdır.
- 12) Beta Talaseminin tedavisinde HbF indüksiyonu için farmakolojik ajanların etkisini veya CRISPR-Cas9 sistemi gibi genom düzeltme tekniklerini daha hızlı bir şekilde uygulamak ve değerlendirmek adına farklı genotipe sahip BTM'li hastaların primer eritroid hücrelerine ait biyo-bankalama sistemi ülkemizde de kurulmalı ve bu konudaki araştırmacılara destek olunmalıdır.

7. KAYNAKLAR

Aerbajinai, W.; Zhu, J.; Kumkhaek, C.; Chin, K.; Rodgers, G.P. SCF induces gamma-globin gene expression by regulating downstream transcription factor COUP-TFII. *Blood*. 2009 Jul 2;114(1):187-194.

Aessopos, A.; Kati, M.; Farmakis, D. Heart disease in thalassemia intermedia: a review of the underlying pathophysiology. *Haematologica*. 2007 May;92(5):658-665.

Agouti, I.; Badens, C.; Abouyoub, A.; Khattab, M.; Sayah, F.; Barakat, A.; Bennani, M. Genotypic correlation between six common beta-thalassemia mutations and the XmnI polymorphism in the Moroccan population. *Hemoglobin*. 2007;31(2):141-149.

Amaya, M.; Desai, M.; Gnanapragasam, M.N.; Wang, S.Z.; Zu Zhu, S.; Williams, D.C., Jr.; Ginder, G.D. Mi2beta-mediated silencing of the fetal gamma-globin gene in adult erythroid cells. *Blood*. 2013 Apr 25;121(17):3493-3501.

Amer, J.; Atlas, D.; Fibach, E. N-acetylcysteine amide (AD4) attenuates oxidative stress in beta-thalassemia blood cells. *Biochim Biophys Acta*. 2008a Feb;1780(2):249-255.

Amer, J.; Goldfarb, A.; Rachmilewitz, E.A.; Fibach, E. Fermented papaya preparation as redox regulator in blood cells of beta-thalassemic mice and patients. *Phytother Res*. 2008b Jun;22(6):820-828.

Andersson, L.C.; Nilsson, K.; Gahmberg, C.G. K562--a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer*. 1979 Feb;23(2):143-147.

Angelucci, E. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:456-462.

Angelucci, E.; Barosi, G.; Camaschella, C.; Cappellini, M.D.; Cazzola, M.; Galanello, R.; Marchetti, M.; Piga, A.; Tura, S. Italian Society of Hematology practice guidelines for the management of iron overload in thalassemia major and related disorders. *Haematologica*. 2008 May;93(5):741-752.

Angelucci, E.; Matthes-Martin, S.; Baronciani, D.; Bernaudin, F.; Bonanomi, S.; Cappellini, M.D.; Dalle, J.H.; Di Bartolomeo, P.; de Heredia, C.D.; Dickerhoff, R.; Giardini, C.; Gluckman, E.; Hussein, A.A.; Kamani, N.; Minkov, M.; Locatelli, F.; Rocha, V.; Sedlacek, P.; Smiers, F.; Thuret, I.; Yaniv, I.; Cavazzana, M.; Peters, C.; Error, E.I.; Parties, E.P.W. Hematopoietic stem cell transplantation in thalassemia major and sickle cell disease: indications and management recommendations from an international expert panel. *Haematologica*. 2014 May;99(5):811-820.

Arnaud, L.; Saison, C.; Helias, V.; Lucien, N.; Steschenko, D.; Giarratana, M.C.; Prehu, C.; Foliguet, B.; Montout, L.; de Brevern, A.G.; Francina, A.; Ripoche, P.; Fenneteau, O.; Da Costa, L.; Peyrard, T.; Coghlan, G.; Illum, N.; Birgens, H.; Tamary, H.; Iolascon, A.; Delaunay, J.; Tchernia, G.; Cartron, J.P. A dominant

mutation in the gene encoding the erythroid transcription factor KLF1 causes a congenital dyserythropoietic anemia. *Am J Hum Genet.* 2010 Nov 12;87(5):721-727.

Asahara, T.; Murohara, T.; Sullivan, A.; Silver, M.; van der Zee, R.; Li, T.; Witzenbichler, B.; Schatteman, G.; Isner, J.M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997 Feb 14;275(5302):964-967.

Badens, C.; Joly, P.; Agouti, I.; Thuret, I.; Gonnet, K.; Fattoum, S.; Francina, A.; Simeoni, M.C.; Loundou, A.; Pissard, S. Variants in genetic modifiers of beta-thalassemia can help to predict the major or intermedia type of the disease. *Haematologica.* 2011 Nov;96(11):1712-1714.

Bae, H.T.; Baldwin, C.T.; Sebastiani, P.; Telen, M.J.; Ashley-Koch, A.; Garrett, M.; Hooper, W.C.; Bean, C.J.; Debaun, M.R.; Arking, D.E.; Bhatnagar, P.; Casella, J.F.; Keefer, J.R.; Barron-Casella, E.; Gordeuk, V.; Kato, G.J.; Minniti, C.; Taylor, J.; Campbell, A.; Luchtman-Jones, L.; Hoppe, C.; Gladwin, M.T.; Zhang, Y.; Steinberg, M.H. Meta-analysis of 2040 sickle cell anemia patients: BCL11A and HBS1L-MYB are the major modifiers of HbF in African Americans. *Blood.* 2012 Aug 30;120(9):1961-1962.

Bank, A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood.* 2006 Jan 15;107(2):435-443.

Basak, A.N.; Ozcelik, H.; Ozer, A.; Tolun, A.; Aksoy, M.; Agaoglu, L.; Ridolfi, F.; Ulukutlu, L.; Akar, N.; Gurgey, A.; et al. The molecular basis of beta-thalassemia in Turkey. *Hum Genet.* 1992 May;89(3):315-318.

Bauer, D.E.; Kamran, S.C.; Orkin, S.H. Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the beta-globin disorders. *Blood.* 2012 Oct 11;120(15):2945-2953.

Bernaudin, F.; Socie, G.; Kuentz, M.; Chevret, S.; Duval, M.; Bertrand, Y.; Vannier, J.P.; Yakouben, K.; Thuret, I.; Bordigoni, P.; Fischer, A.; Lutz, P.; Stephan, J.L.; Dhedin, N.; Plouvier, E.; Margueritte, G.; Bories, D.; Verlhac, S.; Esperou, H.; Coic, L.; Vernant, J.P.; Gluckman, E.; Sfgm, T.C. Long-term results of related myeloablative stem-cell transplantation to cure sickle cell disease. *Blood.* 2007 Oct 1;110(7):2749-2756.

Bilgen, T.; Arikan, Y.; Canatan, D.; Yesilipek, A.; Keser, I. The association between intragenic SNP haplotypes and mutations of the beta globin gene in a Turkish population. *Blood Cells Mol Dis.* 2011 Mar 15;46(3):226-229.

Bollekens, J.A.; Forget, B.G. Delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hematol Oncol Clin North Am.* 1991 Jun;5(3):399-422.

Boosalis, M.S.; Bandyopadhyay, R.; Bresnick, E.H.; Pace, B.S.; Van DeMark, K.; Zhang, B.; Faller, D.V.; Perrine, S.P. Short-chain fatty acid derivatives stimulate cell proliferation and induce STAT-5 activation. *Blood.* 2001 May 15;97(10):3259-3267.

Borg, J.; Papadopoulos, P.; Georgitsi, M.; Gutierrez, L.; Grech, G.; Fanis, P.; Phylactides, M.; Verkerk, A.J.; van der Spek, P.J.; Scerri, C.A.; Cassar, W.; Galdies, R.; van Ijcken, W.; Ozgur, Z.; Gillemans, N.; Hou, J.; Bugeja, M.; Grosveld, F.G.; von Lindern, M.; Felice, A.E.; Patrinos, G.P.; Philipsen, S. Haploinsufficiency for the erythroid transcription factor KLF1 causes hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Nat Genet.* 2010 Sep;42(9):801-805.

Borgna-Pignatti, C.; Rugolotto, S.; De Stefano, P.; Zhao, H.; Cappellini, M.D.; Del Vecchio, G.C.; Romeo, M.A.; Forni, G.L.; Gamberini, M.R.; Ghilardi, R.; Piga, A.; Cnaan, A. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica.* 2004 Oct;89(10):1187-1193.

Bradner, J.E.; Mak, R.; Tanguturi, S.K.; Mazitschek, R.; Haggarty, S.J.; Ross, K.; Chang, C.Y.; Bosco, J.; West, N.; Morse, E.; Lin, K.; Shen, J.P.; Kwiatkowski, N.P.; Gheldof, N.; Dekker, J.; DeAngelo, D.J.; Carr, S.A.; Schreiber, S.L.; Golub, T.R.; Ebert, B.L. Chemical genetic strategy identifies histone deacetylase 1 (HDAC1) and HDAC2 as therapeutic targets in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jul 13;107(28):12617-12622.

Brand, M.; Ranish, J.A.; Kummer, N.T.; Hamilton, J.; Igarashi, K.; Francastel, C.; Chi, T.H.; Crabtree, G.R.; Aebersold, R.; Groudine, M. Dynamic changes in transcription factor complexes during erythroid differentiation revealed by quantitative proteomics. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Jan;11(1):73-80.

Brugger, W.; Mocklin, W.; Heimfeld, S.; Berenson, R.J.; Mertelsmann, R.; Kanz, L. Ex vivo expansion of enriched peripheral blood CD34⁺ progenitor cells by stem cell factor, interleukin-1 beta (IL-1 beta), IL-6, IL-3, interferon-gamma, and erythropoietin. *Blood.* 1993 May 15;81(10):2579-2584.

Cao, A.; Galanello, R. Beta-thalassemia. *Genet Med.* 2010 Feb;12(2):61-76.

Cao, H.; Stamatoyannopoulos, G.; Jung, M. Induction of human gamma globin gene expression by histone deacetylase inhibitors. *Blood.* 2004 Jan 15;103(2):701-709.

Cappellini, M.D.; Musallam, K.M.; Poggiali, E.; Taher, A.T. Hypercoagulability in non-transfusion-dependent thalassemia. *Blood Rev.* 2012 Apr;26 Suppl 1:S20-23.

Cardoso, G.L.; Diniz, I.G.; Silva, A.N.; Cunha, D.A.; Silva Junior, J.S.; Uchoa, C.T.; Santos, S.E.; Trindade, S.M.; Cardoso Mdo, S.; Guerreiro, J.F. DNA polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and Xmn1-HBG2 site loci associated with fetal hemoglobin levels in sickle cell anemia patients from Northern Brazil. *Blood Cells Mol Dis.* 2014 Dec;53(4):176-179.

Cassinero, E.; Roghi, A.; Pedrotti, P.; Brevi, F.; Zanaboni, L.; Graziadei, G.; Pattoneri, P.; Milazzo, A.; Cappellini, M.D. Cardiac iron removal and functional cardiac improvement by different iron chelation regimens in thalassemia major patients. *Ann Hematol.* 2012 Sep;91(9):1443-1449.

Castel, S.E.; Martienssen, R.A. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet.* 2013 Feb;14(2):100-112.

Chaisue, C.; Kitcharoen, S.; Wilairat, P.; Jetsrisuparb, A.; Fucharoen, G.; Fucharoen, S. alpha/beta-Globin mRNA ratio determination by multiplex quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction as an indicator of globin gene function. *Clin Biochem.* 2007 Dec;40(18):1373-1377.

Chaouch, L.; Moumni, I.; Ouragini, H.; Darragi, I.; Kalai, M.; Chaouachi, D.; Boudrigua, I.; Hafsia, R.; Abbes, S. rs11886868 and rs4671393 of BCL11A associated with HbF level variation and modulate clinical events among sickle cell anemia patients. *Hematology.* 2016 Mar 3:1-5.

Chen, Z.; Luo, H.Y.; Steinberg, M.H.; Chui, D.H. BCL11A represses HBG transcription in K562 cells. *Blood Cells Mol Dis.* 2009 Mar-Apr;42(2):144-149.

Choi, O.R.; Engel, J.D. Developmental regulation of beta-globin gene switching. *Cell.* 1988 Oct 7;55(1):17-26.

Cosenza, L.C.; Breda, L.; Breveglieri, G.; Zuccato, C.; Finotti, A.; Lampronti, I.; Borgatti, M.; Chiavilli, F.; Gamberini, M.R.; Satta, S.; Manunza, L.; De Martis, F.R.; Moi, P.; Rivella, S.; Gambari, R.; Bianchi, N. A validated cellular biobank for beta-thalassemia. *J Transl Med.* 2016;14:255.

Cottle, R.N.; Lee, C.M.; Bao, G. Treating hemoglobinopathies using gene-correction approaches: promises and challenges. *Hum Genet.* 2016 Jun 17.

Cousens, N.E.; Gaff, C.L.; Metcalfe, S.A.; Delatycki, M.B. Carrier screening for beta-thalassaemia: a review of international practice. *Eur J Hum Genet.* 2010 Oct;18(10):1077-1083.

Craig, J.E.; Barnetson, R.A.; Prior, J.; Raven, J.L.; Thein, S.L. Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood.* 1994 Mar 15;83(6):1673-1682.

Craig, J.E.; Rochette, J.; Fisher, C.A.; Weatherall, D.J.; Marc, S.; Lathrop, G.M.; Demenais, F.; Thein, S. Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach. *Nat Genet.* 1996 Jan;12(1):58-64.

Dadheech, S.; Madhulatha, D.; Jainc, S.; Joseph, J.; Jyothy, A.; Munshi, A. Association of BCL11A genetic variant (rs11886868) with severity in beta-thalassaemia major & sickle cell anaemia. *Indian J Med Res.* 2016 Apr;143(4):449-454.

De Maria, R.; Testa, U.; Luchetti, L.; Zeuner, A.; Stassi, G.; Pelosi, E.; Riccioni, R.; Felli, N.; Samoggia, P.; Peschle, C. Apoptotic role of Fas/Fas ligand system in the regulation of erythropoiesis. *Blood.* 1999 Feb 1;93(3):796-803.

Dissayabuttra, T.; Tosukhowong, P.; Seksan, P. The benefits of vitamin C and vitamin E in children with beta-thalassemia with high oxidative stress. *J Med Assoc Thai*. 2005 Sep;88 Suppl 4:S317-321.

DJ, W.; JB, C. The thalassemia syndromes. 4th ed. Oxford, England: Blackwell Science Ltd; 2001.

Donze, D.; Townes, T.M.; Bieker, J.J. Role of erythroid Kruppel-like factor in human gamma- to beta-globin gene switching. *J Biol Chem*. 1995 Jan 27;270(4):1955-1959.

Doroshov, J.H.; Locker, G.Y.; Myers, C.E. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest*. 1980 Jan;65(1):128-135.

Efstratiadis, A.; Posakony, J.W.; Maniatis, T.; Lawn, R.M.; O'Connell, C.; Spritz, R.A.; DeRiel, J.K.; Forget, B.G.; Weissman, S.M.; Slightom, J.L.; Blechl, A.E.; Smithies, O.; Baralle, F.E.; Shoulders, C.C.; Proudfoot, N.J. The structure and evolution of the human beta-globin gene family. *Cell*. 1980 Oct;21(3):653-668.

Eldor, A.; Rachmilewitz, E.A. The hypercoagulable state in thalassemia. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):36-43.

Evans, T.; Felsenfeld, G. The erythroid-specific transcription factor Eryf1: a new finger protein. *Cell*. 1989 Sep 8;58(5):877-885.

Falconer, D.S.; Mackay, T.F.C. Introduction to Quantitative Genetics. 4th ed. London: Prentice Hall; 1996.

Fanis, P.; Kousiappa, I.; Phylactides, M.; Kleanthous, M. Genotyping of BCL11A and HBS1L-MYB SNPs associated with fetal haemoglobin levels: a SNaPshot minisequencing approach. *BMC Genomics*. 2014;15:108.

Farrell, J.J.; Sherva, R.M.; Chen, Z.Y.; Luo, H.Y.; Chu, B.F.; Ha, S.Y.; Li, C.K.; Lee, A.C.; Li, R.C.; Li, C.K.; Yuen, H.L.; So, J.C.; Ma, E.S.; Chan, L.C.; Chan, V.; Sebastiani, P.; Farrer, L.A.; Baldwin, C.T.; Steinberg, M.H.; Chui, D.H. A 3-bp deletion in the HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23 is associated with HbF expression. *Blood*. 2011 May 5;117(18):4935-4945.

Fathallah, H.; Atweh, G.F. Induction of fetal hemoglobin in the treatment of sickle cell disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:58-62.

Fibach, E.; Prus, E. Differentiation of human erythroid cells in culture. *Curr Protoc Immunol*. 2005 Nov;Chapter 22:Unit 22F 27.

Fibach, E.; Prus, E.; Bianchi, N.; Zuccato, C.; Breveglieri, G.; Salvatori, F.; Finotti, A.; Lipucci di Paola, M.; Brognara, E.; Lampronti, I.; Borgatti, M.; Gambari, R. Resveratrol: Antioxidant activity and induction of fetal hemoglobin in erythroid cells from normal donors and beta-thalassemia patients. *Int J Mol Med*. 2012 Jun;29(6):974-982.

Fibach, E.; Rachmilewitz, E.A. The role of antioxidants and iron chelators in the treatment of oxidative stress in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2010 Aug;1202:10-16.

Filipe, A.; Li, Q.; Deveaux, S.; Godin, I.; Romeo, P.H.; Stamatoyannopoulos, G.; Mignotte, V. Regulation of embryonic/fetal globin genes by nuclear hormone receptors: a novel perspective on hemoglobin switching. *EMBO J.* 1999 Feb 1;18(3):687-697.

Flint, J.; Harding, R.M.; Boyce, A.J.; Clegg, J.B. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol.* 1998 Mar;11(1):1-51.

Forget, B.G. Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann N Y Acad Sci.* 1998 Jun 30;850:38-44.

Francis, G.L. Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology.* 2010 Jan;62(1):1-16.

Fucharoen, S.; Winichagoon, P. Haemoglobinopathies in southeast Asia. *Indian J Med Res.* 2011 Oct;134:498-506.

Fung, M.C.; Hapel, A.J.; Ymer, S.; Cohen, D.R.; Johnson, R.M.; Campbell, H.D.; Young, I.G. Molecular cloning of cDNA for murine interleukin-3. *Nature.* 1984 Jan 19-25;307(5948):233-237.

Galarneau, G.; Palmer, C.D.; Sankaran, V.G.; Orkin, S.H.; Hirschhorn, J.N.; Lettre, G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet.* 2010 Dec;42(12):1049-1051.

Gallienne, A.E.; Dreau, H.M.; Schuh, A.; Old, J.M.; Henderson, S. Ten novel mutations in the erythroid transcription factor KLF1 gene associated with increased fetal hemoglobin levels in adults. *Haematologica.* 2012 Mar;97(3):340-343.

Ganz, T. Hepcidin and iron regulation, 10 years later. *Blood.* 2011 Apr 28;117(17):4425-4433.

Gardenghi, S.; Ramos, P.; Marongiu, M.F.; Melchiori, L.; Breda, L.; Guy, E.; Muirhead, K.; Rao, N.; Roy, C.N.; Andrews, N.C.; Nemeth, E.; Follenzi, A.; An, X.; Mohandas, N.; Ginzburg, Y.; Rachmilewitz, E.A.; Giardina, P.J.; Grady, R.W.; Rivella, S. Hepcidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in beta-thalassemic mice. *J Clin Invest.* 2010 Dec;120(12):4466-4477.

Gaziev, J.; Sodani, P.; Polchi, P.; Andreani, M.; Lucarelli, G. Bone marrow transplantation in adults with thalassemia: Treatment and long-term follow-up. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054:196-205.

Ghedira, E.S.; Lecerf, L.; Faubert, E.; Costes, B.; Moradkhani, K.; Bachir, D.; Galacteros, F.; Pissard, S. Estimation of the difference in HbF expression due to loss of the 5' delta-globin BCL11A binding region. *Haematologica.* 2013 Feb;98(2):305-308.

Giardini, O.; Cantani, A.; Donfrancesco, A.; Martino, F.; Mannarino, O.; D'Eufemia, P.; Miano, C.; Ruberto, U.; Lubrano, R. Biochemical and clinical effects of vitamin E administration in homozygous beta-thalassemia. *Acta Vitaminol Enzymol.* 1985;7(1-2):55-60.

Gilman, J.G.; Huisman, T.H. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. *Blood.* 1985 Oct;66(4):783-787.

Ginder, G.D. Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells. *Transl Res.* 2015 Jan;165(1):115-125.

Gonzalez-Redondo, J.M.; Stoming, T.A.; Kutlar, A.; Kutlar, F.; Lanclos, K.D.; Howard, E.F.; Fei, Y.J.; Aksoy, M.; Altay, C.; Gurgey, A.; et al. A C----T substitution at nt--101 in a conserved DNA sequence of the promotor region of the beta-globin gene is associated with "silent" beta-thalassemia. *Blood.* 1989 May 1;73(6):1705-1711.

Hafner, J.; Haenseler, E.; Ossent, P.; Burg, G.; Panizzon, R.G. Benzidine stain for the histochemical detection of hemoglobin in splinter hemorrhage (subungual hematoma) and black heel. *Am J Dermatopathol.* 1995 Aug;17(4):362-367.

Halliwell, B.; Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* 1990;186:1-85.

Hanif, T.B.; Ahmed, S.; Anwar, J.; Kazmi, S.K. XmnI POLYMORPHISM AND DISEASE SEVERITY IN PATIENTS WITH BETA THALASSEMIA FROM NORTHERN PAKISTAN. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2015 Jan-Mar;27(1):13-16.

Harteveld, C.L.; Higgs, D.R. Alpha-thalassaemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2010;5:13.

He, Y.; Rank, G.; Zhang, M.; Ju, J.; Liu, R.; Xu, Z.; Brown, F.; Cerruti, L.; Ma, C.; Tan, R.; Jane, S.M.; Zhao, Q. Induction of human fetal hemoglobin expression by adenosine-2',3'-dialdehyde. *J Transl Med.* 2013;11:14.

Heo, I.; Joo, C.; Cho, J.; Ha, M.; Han, J.; Kim, V.N. Lin28 mediates the terminal uridylation of let-7 precursor MicroRNA. *Mol Cell.* 2008 Oct 24;32(2):276-284.

Hsieh, M.M.; Fitzhugh, C.D.; Weitzel, R.P.; Link, M.E.; Coles, W.A.; Zhao, X.; Rodgers, G.P.; Powell, J.D.; Tisdale, J.F. Nonmyeloablative HLA-matched sibling allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for severe sickle cell phenotype. *JAMA.* 2014 Jul 2;312(1):48-56.

Inui, K.; Oreffo, R.O.; Triffitt, J.T. Effects of beta mercaptoethanol on the proliferation and differentiation of human osteoprogenitor cells. *Cell Biol Int.* 1997 Jul;21(7):419-425.

Kantarjian, H.; Issa, J.P.; Rosenfeld, C.S.; Bennett, J.M.; Albitar, M.; DiPersio, J.; Klimek, V.; Slack, J.; de Castro, C.; Ravandi, F.; Helmer, R., 3rd; Shen, L.; Nimer, R.

S.D.; Leavitt, R.; Raza, A.; Saba, H. Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer*. 2006 Apr 15;106(8):1794-1803.

Kantarjian, H.M.; O'Brien, S.; Cortes, J.; Giles, F.J.; Faderl, S.; Issa, J.P.; Garcia-Manero, G.; Rios, M.B.; Shan, J.; Andreeff, M.; Keating, M.; Talpaz, M. Results of decitabine (5-aza-2'deoxyctidine) therapy in 130 patients with chronic myelogenous leukemia. *Cancer*. 2003 Aug 1;98(3):522-528.

Keser, I.; Sanlioglu, A.D.; Manguoglu, E.; Guzeloglu Kayisli, O.; Nal, N.; Sargin, F.; Yesilipek, A.; Simsek, M.; Mendilcioglu, I.; Canatan, D.; Luleci, G. Molecular analysis of beta-thalassemia and sickle cell anemia in Antalya. *Acta Haematol*. 2004;111(4):205-210.

Kode, A.; Rajendrasozhan, S.; Caito, S.; Yang, S.R.; Megson, I.L.; Rahman, I. Resveratrol induces glutathione synthesis by activation of Nrf2 and protects against cigarette smoke-mediated oxidative stress in human lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Mar;294(3):L478-488.

Kohne, E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Aug;108(31-32):532-540.

Krivega, I.; Byrnes, C.; de Vasconcellos, J.F.; Lee, Y.T.; Kaushal, M.; Dean, A.; Miller, J.L. Inhibition of G9a methyltransferase stimulates fetal hemoglobin production by facilitating LCR/gamma-globin looping. *Blood*. 2015 Jul 30;126(5):665-672.

Labie, D.; Pagnier, J.; Lapoumeroulie, C.; Rouabhi, F.; Dunda-Belkhodja, O.; Chardin, P.; Beldjord, C.; Wajcman, H.; Fabry, M.E.; Nagel, R.L. Common haplotype dependency of high G gamma-globin gene expression and high Hb F levels in beta-thalassemia and sickle cell anemia patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Apr;82(7):2111-2114.

Lampronti, I.; Bianchi, N.; Borgatti, M.; Fibach, E.; Prus, E.; Gambari, R. Accumulation of gamma-globin mRNA in human erythroid cells treated with angelicin. *Eur J Haematol*. 2003 Sep;71(3):189-195.

Lawn, R.M.; Efstratiadis, A.; O'Connell, C.; Maniatis, T. The nucleotide sequence of the human beta-globin gene. *Cell*. 1980 Oct;21(3):647-651.

Lee, Y.T.; de Vasconcellos, J.F.; Yuan, J.; Byrnes, C.; Noh, S.J.; Meier, E.R.; Kim, K.S.; Rabel, A.; Kaushal, M.; Muljo, S.A.; Miller, J.L. LIN28B-mediated expression of fetal hemoglobin and production of fetal-like erythrocytes from adult human erythroblasts ex vivo. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):1034-1041.

Leonova, J.; Kazanetz, E.G.; Smetanina, N.S.; Adekile, A.D.; Efremov, G.D.; Huisman, T.H. Variability in the fetal hemoglobin level of the normal adult. *Am J Hematol*. 1996 Oct;53(2):59-65.

Lettre, G.; Sankaran, V.G.; Bezerra, M.A.; Araujo, A.S.; Uda, M.; Sanna, S.; Cao, A.; Schlessinger, D.; Costa, F.F.; Hirschhorn, J.N.; Orkin, S.H. DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Aug 19;105(33):11869-11874.

Levings, P.P.; Bungert, J. The human beta-globin locus control region. *Eur J Biochem*. 2002 Mar;269(6):1589-1599.

Ley, T.J.; DeSimone, J.; Anagnou, N.P.; Keller, G.H.; Humphries, R.K.; Turner, P.H.; Young, N.S.; Keller, P.; Nienhuis, A.W. 5-azacytidine selectively increases gamma-globin synthesis in a patient with beta+ thalassemia. *N Engl J Med*. 1982 Dec 9;307(24):1469-1475.

Ley, T.J.; DeSimone, J.; Noguchi, C.T.; Turner, P.H.; Schechter, A.N.; Heller, P.; Nienhuis, A.W. 5-Azacytidine increases gamma-globin synthesis and reduces the proportion of dense cells in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1983 Aug;62(2):370-380.

Lin, H.Y.; Tang, H.Y.; Davis, F.B.; Davis, P.J. Resveratrol and apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2011 Jan;1215:79-88.

Liu, G.; Loraine, A.E.; Shigeta, R.; Cline, M.; Cheng, J.; Valmeekam, V.; Sun, S.; Kulp, D.; Siani-Rose, M.A. NetAffx: Affymetrix probesets and annotations. *Nucleic Acids Res*. 2003a Jan 1;31(1):82-86.

Liu, P.; Keller, J.R.; Ortiz, M.; Tessarollo, L.; Rachel, R.A.; Nakamura, T.; Jenkins, N.A.; Copeland, N.G. Bcl11a is essential for normal lymphoid development. *Nat Immunol*. 2003b Jun;4(6):525-532.

Locatelli, F.; Kabbara, N.; Ruggeri, A.; Ghavamzadeh, A.; Roberts, I.; Li, C.K.; Bernaudin, F.; Vermynen, C.; Dalle, J.H.; Stein, J.; Wynn, R.; Cordonnier, C.; Pinto, F.; Angelucci, E.; Socie, G.; Gluckman, E.; Walters, M.C.; Rocha, V.; Eurocord; European, B.; Marrow Transplantation, g. Outcome of patients with hemoglobinopathies given either cord blood or bone marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Blood*. 2013 Aug 8;122(6):1072-1078.

Lockhart, D.J.; Dong, H.; Byrne, M.C.; Follettie, M.T.; Gallo, M.V.; Chee, M.S.; Mittmann, M.; Wang, C.; Kobayashi, M.; Horton, H.; Brown, E.L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol*. 1996 Dec;14(13):1675-1680.

Lulli, V.; Romania, P.; Morsilli, O.; Cianiulli, P.; Gabbianelli, M.; Testa, U.; Giuliani, A.; Marziali, G. MicroRNA-486-3p regulates gamma-globin expression in human erythroid cells by directly modulating BCL11A. *PLoS One*. 2013;8(4):e60436.

Lyman, S.D.; Brasel, K.; Rousseau, A.M.; Williams, D.E. The flt3 ligand: a hematopoietic stem cell factor whose activities are distinct from steel factor. *Stem Cells*. 1994;12 Suppl 1:99-107; discussion 108-110.

Mabaera, R.; West, R.J.; Conine, S.J.; Macari, E.R.; Boyd, C.D.; Engman, C.A.; Lowrey, C.H. A cell stress signaling model of fetal hemoglobin induction: what doesn't kill red blood cells may make them stronger. *Exp Hematol*. 2008 Sep;36(9):1057-1072.

Macari, E.R.; Lowrey, C.H. Induction of human fetal hemoglobin via the NRF2 antioxidant response signaling pathway. *Blood*. 2011 Jun 2;117(22):5987-5997.

Maggio, A.; Vitrano, A.; Lucania, G.; Capra, M.; Cuccia, L.; Gagliardotto, F.; Pitrolo, L.; Prossomariti, L.; Filosa, A.; Caruso, V.; Gerardi, C.; Campisi, S.; Cianciulli, P.; Rizzo, M.; D'Ascola, G.; Ciancio, A.; Di Maggio, R.; Calvaruso, G.; Pantalone, G.R.; Rigano, P. Long-term use of deferiprone significantly enhances left-ventricular ejection function in thalassemia major patients. *Am J Hematol*. 2012 Jul;87(7):732-733.

Makani, J.; Menzel, S.; Nkya, S.; Cox, S.E.; Drasar, E.; Soka, D.; Komba, A.N.; Mgya, J.; Rooks, H.; Vasavda, N.; Fegan, G.; Newton, C.R.; Farrall, M.; Thein, S.L. Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. *Blood*. 2011 Jan 27;117(4):1390-1392.

Mankidy, R.; Faller, D.V.; Mabaera, R.; Lowrey, C.H.; Boosalis, M.S.; White, G.L.; Castaneda, S.A.; Perrine, S.P. Short-chain fatty acids induce gamma-globin gene expression by displacement of a HDAC3-NCoR repressor complex. *Blood*. 2006 Nov 1;108(9):3179-3186.

Mardini, L.; Gasiorek, J.; Derjuga, A.; Carriere, L.; Schranzhofer, M.; Paw, B.H.; Ponka, P.; Blank, V. Antagonistic roles of the ERK and p38 MAPK signalling pathways in globin expression, haem biosynthesis and iron uptake. *Biochem J*. 2010 Nov 15;432(1):145-151.

Marina Cavazzana; Ribeil, J.-A.; Emmanuel Payen; Felipe Suarez; Yves Beuzard; Fabien Touzot; Resy Cavalleco; Francois Lefrere; Stany Chretien; Philippe Bourget; Fabrice Monpoux; Corinne Pondarre; Benedicte Neven; Manfred Schmidt; Christof von Kalle; Frans A. Kuypers; Laura Sandler; Sandeep Soni; Olivier Hermine; Stephane Blanche; Mariane De Montalembert; Salima Hacen-Bey-Abina; Leboulch, P. Outcomes of Gene Therapy for Severe Sickle Disease and Beta-Thalassemia Major Via Transplantation of Autologous Hematopoietic Stem Cells Transduced Ex Vivo with a Lentiviral Beta AT87Q-Globin Vector. *ASH, 57th Annual Meeting Exposition*. Orlando, FL; 2015.

Masuda, T.; Wang, X.; Maeda, M.; Canver, M.C.; Sher, F.; Funnell, A.P.; Fisher, C.; Suci, M.; Martyn, G.E.; Norton, L.J.; Zhu, C.; Kurita, R.; Nakamura, Y.; Xu, J.; Higgs, D.R.; Crossley, M.; Bauer, D.E.; Orkin, S.H.; Kharchenko, P.V.; Maeda, T. Transcription factors LRF and BCL11A independently repress expression of fetal hemoglobin. *Science*. 2016 Jan 15;351(6270):285-289.

Maurano, M.T.; Humbert, R.; Rynes, E.; Thurman, R.E.; Haugen, E.; Wang, H.; Reynolds, A.P.; Sandstrom, R.; Qu, H.; Brody, J.; Shafer, A.; Neri, F.; Lee, K.; Kuttyavin, T.; Stehling-Sun, S.; Johnson, A.K.; Canfield, T.K.; Giste, E.; Diegel, M.; Bates, D.; Hansen, R.S.; Neph, S.; Sabo, P.J.; Heimfeld, S.; Raubitschek, A.; Ziegler,

S.; Cotsapas, C.; Sotoodehnia, N.; Glass, I.; Sunyaev, S.R.; Kaul, R.; Stamatiouanopoulos, J.A. Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA. *Science*. 2012 Sep 7;337(6099):1190-1195.

McMahon, M.; Itoh, K.; Yamamoto, M.; Chanas, S.A.; Henderson, C.J.; McLellan, L.I.; Wolf, C.R.; Cavin, C.; Hayes, J.D. The Cap'n'Collar basic leucine zipper transcription factor Nrf2 (NF-E2 p45-related factor 2) controls both constitutive and inducible expression of intestinal detoxification and glutathione biosynthetic enzymes. *Cancer Res*. 2001 Apr 15;61(8):3299-3307.

McMorrow, T.; van den Wijngaard, A.; Wollenschlaeger, A.; van de Corput, M.; Monkhorst, K.; Trimborn, T.; Fraser, P.; van Lohuizen, M.; Jenuwein, T.; Djabali, M.; Philipsen, S.; Grosveld, F.; Milot, E. Activation of the beta globin locus by transcription factors and chromatin modifiers. *EMBO J*. 2000 Sep 15;19(18):4986-4996.

Menzel, S.; Garner, C.; Gut, I.; Matsuda, F.; Yamaguchi, M.; Heath, S.; Foglio, M.; Zelenika, D.; Boland, A.; Rooks, H.; Best, S.; Spector, T.D.; Farrall, M.; Lathrop, M.; Thein, S.L. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet*. 2007 Oct;39(10):1197-1199.

Mettananda, S.; Gibbons, R.J.; Higgs, D.R. alpha-Globin as a molecular target in the treatment of beta-thalassemia. *Blood*. 2015 Jun 11;125(24):3694-3701.

Miller, I.J.; Bieker, J.J. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol*. 1993 May;13(5):2776-2786.

Modell, B.; Khan, M.; Darlison, M.; Westwood, M.A.; Ingram, D.; Pennell, D.J. Improved survival of thalassaemia major in the UK and relation to T2* cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2008;10:42.

Moi, P.; Faa, V.; Marini, M.G.; Asunis, I.; Ibba, G.; Cao, A.; Rosatelli, M.C. A novel silent beta-thalassemia mutation in the distal CACCC box affects the binding and responsiveness to EKLF. *Br J Haematol*. 2004 Sep;126(6):881-884.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Nadkarni, A.; Gorakshakar, A.C.; Lu, C.Y.; Krishnamoorthy, R.; Ghosh, K.; Colah, R.; Mohanty, D. Molecular pathogenesis and clinical variability of beta-thalassemia syndromes among Indians. *Am J Hematol*. 2001 Oct;68(2):75-80.

Nairz, M.; Schroll, A.; Moschen, A.R.; Sonnweber, T.; Theurl, M.; Theurl, I.; Taub, N.; Jamnig, C.; Neutrauer, D.; Huber, L.A.; Tilg, H.; Moser, P.L.; Weiss, G. Erythropoietin contrastingly affects bacterial infection and experimental colitis by inhibiting nuclear factor-kappaB-inducible immune pathways. *Immunity*. 2011 Jan 28;34(1):61-74.

Neishabury, M.; Azarkeivan, A.; Najmabadi, H. Frequency of positive XmnI/Ggamma polymorphism and coinheritance of common alpha thalassemia mutations do not show statistically significant difference between thalassemia major and intermedia cases with homozygous IVSII-1 mutation. *Blood Cells Mol Dis.* 2010 Mar-Apr;44(2):95-99.

Neishabury, M.; Zamani, F.; Keyhani, E.; Azarkeivan, A.; Abedini, S.S.; Eslami, M.S.; Kakroodi, S.T.; Vesiehsari, M.J.; Najmabadi, H. The influence of the BCL11A polymorphism on the phenotype of patients with beta thalassemia could be affected by the beta globin locus control region and/or the XmnI-HBG2 genotypic background. *Blood Cells Mol Dis.* 2013 Aug;51(2):80-84.

Neishabury, M.; Zamani, S.; Azarkeivan, A.; Abedini, S.S.; Darvish, H.; Zamani, F.; Najmabadi, H. The modifying effect of XmnI-HBG2 on thalassemic phenotype is associated with its linked elements in the beta globin locus control region, including the palindromic site at 5'HS4. *Blood Cells Mol Dis.* 2012 Jan 15;48(1):1-5.

Newsholme, P.; Procopio, J.; Lima, M.M.; Pithon-Curi, T.C.; Curi, R. Glutamine and glutamate--their central role in cell metabolism and function. *Cell Biochem Funct.* 2003 Mar;21(1):1-9.

Nguyen, T.K.; Joly, P.; Bardel, C.; Moulisma, M.; Bonello-Palot, N.; Francina, A. The XmnI (G)gamma polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 beta-thalassemia intermedia patients. *Blood Cells Mol Dis.* 2010 Aug 15;45(2):124-127.

Niu, X.; He, W.; Song, B.; Ou, Z.; Fan, D.; Chen, Y.; Fan, Y.; Sun, X. Combining single-strand oligodeoxynucleotides and CRISPR/Cas9 to correct gene mutations in Beta-thalassemia-induced Pluripotent Stem Cells. *J Biol Chem.* 2016 Jun 10.

Noh, S.J.; Miller, S.H.; Lee, Y.T.; Goh, S.H.; Marincola, F.M.; Stroncek, D.F.; Reed, C.; Wang, E.; Miller, J.L. Let-7 microRNAs are developmentally regulated in circulating human erythroid cells. *J Transl Med.* 2009;7:98.

Nuez, B.; Michalovich, D.; Bygrave, A.; Ploemacher, R.; Grosveld, F. Defective haematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature.* 1995 May 25;375(6529):316-318.

Nuinoon, M.; Makarasara, W.; Mushiroda, T.; Setianingsih, I.; Wahidiyat, P.A.; Sripichai, O.; Kumasaka, N.; Takahashi, A.; Svasti, S.; Munkongdee, T.; Mahasirimongkol, S.; Peerapittayamongkol, C.; Viprakasit, V.; Kamatani, N.; Winichagoon, P.; Kubo, M.; Nakamura, Y.; Fucharoen, S. A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in beta0-thalassemia/hemoglobin E. *Hum Genet.* 2010 Mar;127(3):303-314.

O'Neill, D.; Bornschlegel, K.; Flamm, M.; Castle, M.; Bank, A. A DNA-binding factor in adult hematopoietic cells interacts with a pyrimidine-rich domain upstream from the human delta-globin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Oct 15;88(20):8953-8957.

- Olivieri N, W.D. Disorders of hemoglobin, genetics, pathophysiology, and clinical management. In: MH, S.; BG, F.; DR, H.; RL, N., editors, *Clinical aspects of β -thalassemia*. Cambridge, England: Cambridge University; 2001. p. 277-341.
- Olivieri, N.F.; Brittenham, G.M.; McLaren, C.E.; Templeton, D.M.; Cameron, R.G.; McClelland, R.A.; Burt, A.D.; Fleming, K.A. Long-term safety and effectiveness of iron-chelation therapy with deferiprone for thalassemia major. *N Engl J Med*. 1998 Aug 13;339(7):417-423.
- Olivieri, N.F.; Sauntharajah, Y.; Thayalasuthan, V.; Kwiatkowski, J.; Ware, R.E.; Kuypers, F.A.; Kim, H.Y.; Trachtenberg, F.L.; Vichinsky, E.P.; Thalassemia Clinical Research, N. A pilot study of subcutaneous decitabine in beta-thalassemia intermedia. *Blood*. 2011 Sep 8;118(10):2708-2711.
- Olson, B.J. Assays for Determination of Protein Concentration. *Curr Protoc Pharmacol*. 2016;73:A 3A 1-A 3A 32.
- Orkin, S.H.; Harosi, F.I.; Leder, P. Differentiation in erythroleukemic cells and their somatic hybrids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975 Jan;72(1):98-102.
- Ottolenghi, S.; Giglioni, B.; Taramelli, R.; Comi, P.; Mazza, U.; Saglio, G.; Camaschella, C.; Izzo, P.; Cao, A.; Galanello, R.; Gimferrer, E.; Baiget, M.; Gianni, A.M. Molecular comparison of delta beta-thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin DNAs: evidence of a regulatory area? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Apr;79(7):2347-2351.
- Ozdemir, Z.C.; Koc, A.; Aycicek, A.; Kocyigit, A. N-Acetylcysteine supplementation reduces oxidative stress and DNA damage in children with beta-thalassemia. *Hemoglobin*. 2014;38(5):359-364.
- Pace, B.S.; Qian, X.H.; Sangerman, J.; Ofori-Acquah, S.F.; Baliga, B.S.; Han, J.; Critz, S.D. p38 MAP kinase activation mediates gamma-globin gene induction in erythroid progenitors. *Exp Hematol*. 2003 Nov;31(11):1089-1096.
- Pangjit, K.; Udomsuk, L.; Upanan, S.; Pongjanta, A.; Chansiw, N.; Srichairatanakool, S. Iron-Chelating and Anti-Hemolytic Properties of Ethanolic Extract of Lotus (*Nelumbonucifera Gaertn*) Leaves. *J Med Assoc Thai*. 2016 Jan;99 Suppl 1:S58-66.
- Peri, K.G.; Gagnon, J.; Gagnon, C.; Bard, H. Association of -158 (C-->T) (XmnI) DNA polymorphism in G gamma-globin promoter with delayed switchover from fetal to adult hemoglobin synthesis. *Pediatr Res*. 1997 Feb;41(2):214-217.
- Perkins, A.; Xu, X.; Higgs, D.R.; Patrinos, G.P.; Arnaud, L.; Bieker, J.J.; Philipsen, S.; Workgroup, K.L.F.C. Kruppeling erythropoiesis: an unexpected broad spectrum of human red blood cell disorders due to KLF1 variants. *Blood*. 2016 Apr 14;127(15):1856-1862.
- Perrine, S.P.; Castaneda, S.A.; Boosalis, M.S.; White, G.L.; Jones, B.M.; Bohacek, R. Induction of fetal globin in beta-thalassemia: Cellular obstacles and molecular progress. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1054:257-265.

Perrine, S.P.; Ginder, G.D.; Faller, D.V.; Dover, G.H.; Ikuta, T.; Witkowska, H.E.; Cai, S.P.; Vichinsky, E.P.; Olivieri, N.F. A short-term trial of butyrate to stimulate fetal-globin-gene expression in the beta-globin disorders. *N Engl J Med*. 1993 Jan 14;328(2):81-86.

Perrine, S.P.; Greene, M.F.; Faller, D.V. Delay in the fetal globin switch in infants of diabetic mothers. *N Engl J Med*. 1985 Feb 7;312(6):334-338.

Perrine, S.P.; Miller, B.A.; Faller, D.V.; Cohen, R.A.; Vichinsky, E.P.; Hurst, D.; Lubin, B.H.; Papayannopoulou, T. Sodium butyrate enhances fetal globin gene expression in erythroid progenitors of patients with Hb SS and beta thalassemia. *Blood*. 1989 Jul;74(1):454-459.

Perrine, S.P.; Olivieri, N.F.; Faller, D.V.; Vichinsky, E.P.; Dover, G.J.; Ginder, G.D. Butyrate derivatives. New agents for stimulating fetal globin production in the beta-globin disorders. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 1994 Feb;16(1):67-71.

Perseu, L.; Satta, S.; Moi, P.; Demartis, F.R.; Manunza, L.; Sollaino, M.C.; Barella, S.; Cao, A.; Galanello, R. KLF1 gene mutations cause borderline HbA(2). *Blood*. 2011 Oct 20;118(16):4454-4458.

Phillips, J.D.; Steensma, D.P.; Pulsipher, M.A.; Spangrude, G.J.; Kushner, J.P. Congenital erythropoietic porphyria due to a mutation in GATA1: the first trans-acting mutation causative for a human porphyria. *Blood*. 2007 Mar 15;109(6):2618-2621.

Pope, S.H.; Fibach, E.; Sun, J.; Chin, K.; Rodgers, G.P. Two-phase liquid culture system models normal human adult erythropoiesis at the molecular level. *Eur J Haematol*. 2000 May;64(5):292-303.

Prus, E.; Fibach, E. Effect of iron chelators on labile iron and oxidative status of thalassaemic erythroid cells. *Acta Haematol*. 2010;123(1):14-20.

Rachmilewitz, E.A.; Weizer-Stern, O.; Adamsky, K.; Amariglio, N.; Rechavi, G.; Breda, L.; Rivella, S.; Cabantchik, Z.I. Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia: Can it be prevented by inhibition of absorption and by antioxidants? *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1054:118-123.

Radmilovic, M.; Zukic, B.; Petrovic, M.S.; Bartsakoulia, M.; Stankovic, B.; Kotur, N.; Dokmanovic, L.; Georgitsi, M.; Patrinos, G.P.; Pavlovic, S. Functional analysis of a novel KLF1 gene promoter variation associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Ann Hematol*. 2013 Jan;92(1):53-58.

Renneville, A.; Van Galen, P.; Canver, M.C.; McConkey, M.; Krill-Burger, J.M.; Dorfman, D.M.; Holson, E.B.; Bernstein, B.E.; Orkin, S.H.; Bauer, D.E.; Ebert, B.L. EHMT1 and EHMT2 inhibition induces fetal hemoglobin expression. *Blood*. 2015 Oct 15;126(16):1930-1939.

Ristaldi, M.S.; Murru, S.; Loudianos, G.; Casula, L.; Porcu, S.; Pigheddu, D.; Fanni, B.; Sciarratta, G.V.; Agosti, S.; Parodi, M.I.; et al. The C-T substitution in the distal CACCC box of the beta-globin gene promoter is a common cause of silent beta thalassaemia in the Italian population. *Br J Haematol*. 1990 Apr;74(4):480-486.

Rodrigue, C.M.; Arous, N.; Bachir, D.; Smith-Ravin, J.; Romeo, P.H.; Galacteros, F.; Garel, M.C. Resveratrol, a natural dietary phytoalexin, possesses similar properties to hydroxyurea towards erythroid differentiation. *Br J Haematol*. 2001 May;113(2):500-507.

Rosatelli, M.C.; Altay, C.; Oner, R.; Leoni, G.B.; Moi, B.; Atzori, G.; Cao, A. Beta-globin haplotype and XmnI polymorphism at position G (gamma)-158 and HbF production in Fanconi's anemia. *Haematologica*. 1992 Mar-Apr;77(2):106-109.

Rujito, L.; Basalamah, M.; Siswandari, W.; Setyono, J.; Wulandari, G.; Mulatsih, S.; Sofro, A.S.; Sadewa, A.H.; Sutaryo, S. Modifying effect of XmnI, BCL11A, and HBS1L-MYB on clinical appearances: A study on beta-thalassemia and hemoglobin E/beta-thalassemia patients in Indonesia. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*. 2016 Jun;9(2):55-63.

Rund, D.; Rachmilewitz, E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med*. 2005 Sep 15;353(11):1135-1146.

Rutherford, T.; Clegg, J.B.; Higgs, D.R.; Jones, R.W.; Thompson, J.; Weatherall, D.J. Embryonic erythroid differentiation in the human leukemic cell line K562. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981 Jan;78(1):348-352.

Rutherford, T.R.; Clegg, J.B.; Weatherall, D.J. K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature*. 1979 Jul 12;280(5718):164-165.

Sampietro, M.; Thein, S.L.; Contreras, M.; Pazmany, L. Variation of HbF and F-cell number with the G-gamma Xmn I (C-T) polymorphism in normal individuals. *Blood*. 1992 Feb 1;79(3):832-833.

Sankaran, V.G.; Joshi, M.; Agrawal, A.; Schmitz-Abe, K.; Towne, M.C.; Marinakis, N.; Markianos, K.; Berry, G.T.; Agrawal, P.B. Rare complete loss of function provides insight into a pleiotropic genome-wide association study locus. *Blood*. 2013 Nov 28;122(23):3845-3847.

Sankaran, V.G.; Menne, J.; Heller, R. Heterozygous disruption of human SOX6 is insufficient to impair erythropoiesis or silencing of fetal hemoglobin. *Blood*. 2011a Apr 21;117(16):4396-4397.

Sankaran, V.G.; Menne, T.F.; Scepanovic, D.; Vergilio, J.A.; Ji, P.; Kim, J.; Thiru, P.; Orkin, S.H.; Lander, E.S.; Lodish, H.F. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011b Jan 25;108(4):1519-1524.

Sankaran, V.G.; Menne, T.F.; Xu, J.; Akie, T.E.; Lettre, G.; Van Handel, B.; Mikkola, H.K.; Hirschhorn, J.N.; Cantor, A.B.; Orkin, S.H. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 2008 Dec 19;322(5909):1839-1842.

Sankaran, V.G.; Orkin, S.H. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013 Jan;3(1):a011643.

Sankaran, V.G.; Xu, J.; Orkin, S.H. Advances in the understanding of haemoglobin switching. *Br J Haematol*. 2010 Apr;149(2):181-194.

Sankaran, V.G.; Xu, J.; Ragoczy, T.; Ippolito, G.C.; Walkley, C.R.; Maika, S.D.; Fujiwara, Y.; Ito, M.; Groudine, M.; Bender, M.A.; Tucker, P.W.; Orkin, S.H. Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature*. 2009 Aug 27;460(7259):1093-1097.

Satta, S.; Perseu, L.; Moi, P.; Asunis, I.; Cabriolu, A.; Maccioni, L.; Demartis, F.R.; Manunza, L.; Cao, A.; Galanello, R. Compound heterozygosity for KLF1 mutations associated with remarkable increase of fetal hemoglobin and red cell protoporphyrin. *Haematologica*. 2011 May;96(5):767-770.

Schultheis, B.; Carapeti-Marootian, M.; Hochhaus, A.; Weisser, A.; Goldman, J.M.; Melo, J.V. Overexpression of SOCS-2 in advanced stages of chronic myeloid leukemia: possible inadequacy of a negative feedback mechanism. *Blood*. 2002 Mar 1;99(5):1766-1775.

Shariati, L.; Khanahmad, H.; Salehi, M.; Hejazi, Z.; Rahimmaesh, I.; Tabatabaiefar, M.A.; Modarressi, M.H. Genetic disruption of the KLF1 gene to overexpress gamma-globin gene using CRISPR/Cas9 system. *J Gene Med*. 2016 Sep 26.

Shi, L.; Cui, S.; Engel, J.D.; Tanabe, O. Lysine-specific demethylase 1 is a therapeutic target for fetal hemoglobin induction. *Nat Med*. 2013 Mar;19(3):291-294.

Singal, R.; Wang, S.Z.; Sargent, T.; Zhu, S.Z.; Ginder, G.D. Methylation of promoter proximal-transcribed sequences of an embryonic globin gene inhibits transcription in primary erythroid cells and promotes formation of a cell type-specific methyl cytosine binding complex. *J Biol Chem*. 2002 Jan 18;277(3):1897-1905.

Singleton, B.K.; Burton, N.M.; Green, C.; Brady, R.L.; Anstee, D.J. Mutations in EKLF/KLF1 form the molecular basis of the rare blood group In(Lu) phenotype. *Blood*. 2008 Sep 1;112(5):2081-2088.

Solovieff, N.; Milton, J.N.; Hartley, S.W.; Sherva, R.; Sebastiani, P.; Dworkis, D.A.; Klings, E.S.; Farrer, L.A.; Garrett, M.E.; Ashley-Koch, A.; Telen, M.J.; Fucharoen, S.; Ha, S.Y.; Li, C.K.; Chui, D.H.; Baldwin, C.T.; Steinberg, M.H. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genome-wide association studies suggest a regulatory region in the 5' olfactory receptor gene cluster. *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1815-1822.

Stamatoyannopoulos, G. Control of globin gene expression during development and erythroid differentiation. *Exp Hematol*. 2005 Mar;33(3):259-271.

Succar, J.; Musallam, K.M.; Taher, A.T. Thalassemia and venous thromboembolism. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2011;3(1):e2011025.

Suthutvoravut, U.; Hathirat, P.; Sirichakwal, P.; Sasanakul, W.; Tassaneeyakul, A.; Feungpean, B. Vitamin E status, glutathione peroxidase activity and the effect of vitamin E supplementation in children with thalassemia. *J Med Assoc Thai.* 1993 Oct;76 Suppl 2:146-152.

Taher, A.T.; Musallam, K.M.; Karimi, M.; El-Beshlawy, A.; Belhoul, K.; Daar, S.; Saned, M.S.; El-Chafic, A.H.; Fasulo, M.R.; Cappellini, M.D. Overview on practices in thalassemia intermedia management aiming for lowering complication rates across a region of endemicity: the OPTIMAL CARE study. *Blood.* 2010 Mar 11;115(10):1886-1892.

Tallack, M.R.; Perkins, A.C. Three fingers on the switch: Kruppel-like factor 1 regulation of gamma-globin to beta-globin gene switching. *Curr Opin Hematol.* 2013 May;20(3):193-200.

Tanabe, O.; Shen, Y.; Liu, Q.; Campbell, A.D.; Kuroha, T.; Yamamoto, M.; Engel, J.D. The TR2 and TR4 orphan nuclear receptors repress Gata1 transcription. *Genes Dev.* 2007 Nov 1;21(21):2832-2844.

Tanimoto, K.; Liu, Q.; Grosveld, F.; Bungert, J.; Engel, J.D. Context-dependent EKLF responsiveness defines the developmental specificity of the human epsilon-globin gene in erythroid cells of YAC transgenic mice. *Genes Dev.* 2000 Nov 1;14(21):2778-2794.

Telen MJ; RE, K. The mature erythrocyte. In: Lee GR; Paraskevas F; Foerster J; J, L., editors, *Wintrobe's Clinical Hematology.* Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins; 1999. p. 207.

Telfer, P.; Coen, P.G.; Christou, S.; Hadjigavriel, M.; Kolnakou, A.; Pangalou, E.; Pavlides, N.; Psiloinis, M.; Simamonian, K.; Skordos, G.; Sitarou, M.; Angastiniotis, M. Survival of medically treated thalassemia patients in Cyprus. Trends and risk factors over the period 1980-2004. *Haematologica.* 2006 Sep;91(9):1187-1192.

Tepakhan, W.; Yamsri, S.; Sanchaisuriya, K.; Fucharoen, G.; Xu, X.; Fucharoen, S. Nine known and five novel mutations in the erythroid transcription factor KLF1 gene and phenotypic expression of fetal hemoglobin in hemoglobin E disorder. *Blood Cells Mol Dis.* 2016 Jul;59:85-91.

Thein, S.L.; Craig, J.E. Genetics of Hb F/F cell variance in adults and heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hemoglobin.* 1998 Sep-Nov;22(5-6):401-414.

Thein, S.L.; Menzel, S.; Peng, X.; Best, S.; Jiang, J.; Close, J.; Silver, N.; Gerovasilli, A.; Ping, C.; Yamaguchi, M.; Wahlberg, K.; Ulug, P.; Spector, T.D.; Garner, C.; Matsuda, F.; Farrall, M.; Lathrop, M. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23

influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Jul 3;104(27):11346-11351.

Thomas, E.D.; Buckner, C.D.; Sanders, J.E.; Papayannopoulou, T.; Borgna-Pignatti, C.; De Stefano, P.; Sullivan, K.M.; Clift, R.A.; Storb, R. Marrow transplantation for thalassaemia. *Lancet*. 1982 Jul 31;2(8292):227-229.

Trowbridge, J.J.; Snow, J.W.; Kim, J.; Orkin, S.H. DNA methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells. *Cell Stem Cell*. 2009 Oct 2;5(4):442-449.

Uda, M.; Galanello, R.; Sanna, S.; Lettre, G.; Sankaran, V.G.; Chen, W.; Usala, G.; Busonero, F.; Maschio, A.; Albai, G.; Piras, M.G.; Sestu, N.; Lai, S.; Dei, M.; Mulas, A.; Crisponi, L.; Naitza, S.; Asunis, I.; Deiana, M.; Nagaraja, R.; Perseu, L.; Satta, S.; Cipollina, M.D.; Sollaino, C.; Moi, P.; Hirschhorn, J.N.; Orkin, S.H.; Abecasis, G.R.; Schlessinger, D.; Cao, A. Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Feb 5;105(5):1620-1625.

Ungvari, Z.; Bagi, Z.; Feher, A.; Recchia, F.A.; Sonntag, W.E.; Pearson, K.; de Cabo, R.; Csiszar, A. Resveratrol confers endothelial protection via activation of the antioxidant transcription factor Nrf2. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Jul;299(1):H18-24.

van Dijk, T.B.; Gillemans, N.; Pourfarzad, F.; van Lom, K.; von Lindern, M.; Grosveld, F.; Philipsen, S. Fetal globin expression is regulated by Friend of Prmt1. *Blood*. 2010 Nov 18;116(20):4349-4352.

van Meerloo, J.; Kaspers, G.J.; Cloos, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011;731:237-245.

Wadman, I.A.; Osada, H.; Grutz, G.G.; Agulnick, A.D.; Westphal, H.; Forster, A.; Rabbitts, T.H. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J*. 1997 Jun 2;16(11):3145-3157.

Walters, M.C.; Storb, R.; Patience, M.; Leisenring, W.; Taylor, T.; Sanders, J.E.; Buchanan, G.E.; Rogers, Z.R.; Dinndorf, P.; Davies, S.C.; Roberts, I.A.; Dickerhoff, R.; Yeager, A.M.; Hsu, L.; Kurtzberg, J.; Ohene-Frempong, K.; Bunin, N.; Bernaudin, F.; Wong, W.Y.; Scott, J.P.; Margolis, D.; Vichinsky, E.; Wall, D.A.; Wayne, A.S.; Pegelow, C.; Redding-Lallinger, R.; Wiley, J.; Klemperer, M.; Mentzer, W.C.; Smith, F.O.; Sullivan, K.M. Impact of bone marrow transplantation for symptomatic sickle cell disease: an interim report. Multicenter investigation of bone marrow transplantation for sickle cell disease. *Blood*. 2000 Mar 15;95(6):1918-1924.

Wang, B.; Liu, J.; Gong, Z. Resveratrol induces apoptosis in K562 cells via the regulation of mitochondrial signaling pathways. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8(9):16926-16933.

Waters, V.; Sokol, S.; Reddy, B.; Soong, G.; Chun, J.; Prince, A. The effect of cyclosporin A on airway cell proinflammatory signaling and pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005 Aug;33(2):138-144.

Weatherall, D.J. Commentary on "The modifying effect of Xmn1-HBG2 on thalassemic phenotype is associated with its linked elements in the beta globin locus control region, including the palindromic site at 5' HS4" by M. Neishabury et al. *Blood Cells Mol Dis*. 2012 Jan 15;48(1):6.

Wegner, M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res*. 1999 Mar 15;27(6):1409-1420.

Wei, G.H.; Zhao, G.W.; Song, W.; Hao, D.L.; Lv, X.; Liu, D.P.; Liang, C.C. Mechanisms of human gamma-globin transcriptional induction by apicidin involves p38 signaling to chromatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Nov 30;363(4):889-894.

Whipple, G.H. Anemias, Experimental and Clinical. *Cal West Med*. 1935 Jul;43(1):1-4.

Wijgerde, M.; Gribnau, J.; Trimborn, T.; Nuez, B.; Philipsen, S.; Grosveld, F.; Fraser, P. The role of EKLF in human beta-globin gene competition. *Genes Dev*. 1996 Nov 15;10(22):2894-2902.

Wilber, A.; Hargrove, P.W.; Kim, Y.S.; Riberdy, J.M.; Sankaran, V.G.; Papanikolaou, E.; Georgomanoli, M.; Anagnou, N.P.; Orkin, S.H.; Nienhuis, A.W.; Persons, D.A. Therapeutic levels of fetal hemoglobin in erythroid progeny of beta-thalassemic CD34+ cells after lentiviral vector-mediated gene transfer. *Blood*. 2011 Mar 10;117(10):2817-2826.

Witt, O.; Sand, K.; Pekrun, A. Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Blood*. 2000 Apr 1;95(7):2391-2396.

Wonkam, A.; Ngo Bitoungui, V.J.; Vorster, A.A.; Ramesar, R.; Cooper, R.S.; Tayo, B.; Lettre, G.; Ngogang, J. Association of variants at BCL11A and HBS1L-MYB with hemoglobin F and hospitalization rates among sickle cell patients in Cameroon. *PLoS One*. 2014;9(3):e92506.

Wood, W.G. Haemoglobin synthesis during human fetal development. *Br Med Bull*. 1976 Sep;32(3):282-287.

Wu, X.P.; Xiong, M.; Xu, C.S.; Duan, L.N.; Dong, Y.Q.; Luo, Y.; Niu, T.H.; Lu, C.R. Resveratrol induces apoptosis of human chronic myelogenous leukemia cells in vitro through p38 and JNK-regulated H2AX phosphorylation. *Acta Pharmacol Sin*. 2015 Mar;36(3):353-361.

Xu, J.; Bauer, D.E.; Kerenyi, M.A.; Vo, T.D.; Hou, S.; Hsu, Y.J.; Yao, H.; Trowbridge, J.J.; Mandel, G.; Orkin, S.H. Corepressor-dependent silencing of fetal

hemoglobin expression by BCL11A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Apr 16;110(16):6518-6523.

Xu, J.; Sankaran, V.G.; Ni, M.; Menne, T.F.; Puram, R.V.; Kim, W.; Orkin, S.H. Transcriptional silencing of {gamma}-globin by BCL11A involves long-range interactions and cooperation with SOX6. *Genes Dev*. 2010 Apr 15;24(8):783-798.

Xu, W.; Wang, F.; Yu, Z.; Xin, F. Epigenetics and Cellular Metabolism. *Genet Epigenet*. 2016;8:43-51.

Yan, H.W.; Hu, W.X.; Zhang, J.Y.; Wang, Y.; Xia, K.; Peng, M.Y.; Liu, J. Resveratrol induces human K562 cell apoptosis, erythroid differentiation, and autophagy. *Tumour Biol*. 2014 Jun;35(6):5381-5388.

Zhou, D.; Liu, K.; Sun, C.W.; Pawlik, K.M.; Townes, T.M. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma- to beta-globin gene switching. *Nat Genet*. 2010 Sep;42(9):742-744.

Zsebo, K.M.; Wypych, J.; McNiece, I.K.; Lu, H.S.; Smith, K.A.; Karkare, S.B.; Sachdev, R.K.; Yuschenkoff, V.N.; Birkett, N.C.; Williams, L.R.; et al. Identification, purification, and biological characterization of hematopoietic stem cell factor from buffalo rat liver--conditioned medium. *Cell*. 1990 Oct 5;63(1):195-201.

EK-1

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı Beta Talasemi Major Hastalarında HbF İndüksiyonu için Genetik ve Epigenetik Çalışmalar'dır.

Bu araştırmanın amacı beta talasemi majörlü hastaların kan transfüzyonu veya kemik iliği transferine alternatif tedavi yöntemleri geliştirilmesine katkıda bulunmaktır. Bu araştırmada sizden bir defaya mahsus 10 ml periferik kan alma işlemi gerçekleştirilecektir. Bu araştırmada yer alacak gönüllülerin sayısı 30'dur. Bu araştırma ile ilgili olarak sizden bir sorumluluk beklenmemektedir. Kan transfüzyonu alıp almadığınızı veya hangi aralıklarla aldığınızı biliyor olmanız yeterli olacaktır.

Bu araştırmada sizin için, kan alımı sırasında iğne batması acısı dışında bir risk söz konusu değildir. Araştırmadan elde edeceğimiz sonuçlarla hastaların kullanılan ilaçlara neden farklı cevaplar verdiği hakkında ve hangi tür ilaçların kullanılması gerektiği hakkında bilgi edinilecektir.

Araştırmaya bağlı bir zarar söz konusu olduğunda, bu durumun tedavisi sorumlu araştırmacı tarafından yapılacak, ortaya çıkan masraflar Prof. Dr. İbrahim KESER tarafından karşılanacaktır. (Sağlık Bakanlığı'ndan izin alınması gerekli olmayan araştırmalar için zorunlu değildir). Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0 242 249 69 73 numaralı telefondan Prof.Dr. İbrahim KESER'e başvurabilirsiniz. Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu araştırma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmektedir.

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya yol amayacaktır. Araştırıcı bilginiz dâhilinde veya isteğiniz dışında, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız vb. nedenlerle sizi araştırmadan çıkarabilir. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırıcıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün,

Adı-Soyadı:

Tarih ve İmza:

Adresi:

Telefon:

Açıklamaları yapan araştırmacının,

Adı-Soyadı:

Tarih ve İmza:

Görevi:

Adresi:

Telefon:

Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının,

Adı-Soyadı:

Tarih ve İmza:

Görevi:

Adresi:

Telefon:

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Yunus	Uyruğu	TC
Soyadı	ARIKAN	Tel no	05058414335
Doğum tarihi	15.10.1984	e-posta	yns_arikan@yahoo.com

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Antalya Lisesi	2001
Lisans	Hacettepe Üniversitesi	2007
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2010
Doktora	Akdeniz Üniversitesi	2016

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Öğretim Elemanı	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2007-2016
Asistan Temsilciliği	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD	2015-2016
Temel Tıp Bilimleri Asistan Temsilciliği	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi	2015-2016
ÖGESEN Temsilcisi	Akdeniz Üniversitesi	2015-2016
Asistan Temsilcisi Yardımcısı	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD	2014-2015 2009-2010
Stajyer	Radboud University-Netherland	2013 (6 ay)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	ÜDS	80.00
İngilizce	YDS	78.75

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Mental Retardasyonlu Bireylerde ARX Gen Mutasyonlarının Araştırılması	BAP	2008-2010
Beta Talasemi Majörlü Hastalarda HbF İndüksiyonu İçin Genetik ve Epigenetik Çalışmalar	BAP	2014-devam ediyor.
Beta Talasemi Major Hastalarında Modifiye Edici <i>SALL2</i> Geni Bağlanma Motifinde Mutasyon Taranması	BAP	2015-devam ediyor.
Antalya’da Alfa Globin Mutasyon Tipleri ve Sıklıklarının Belirlenmesi ve Genotip-Fenotip İlişkisinin Araştırılması	BAP	2014-2016
Antalya’da Beta Talasemi Minör, İntermediya, Majörlü Hastaların Beta Globin Genindeki Nadir Delesyonel Tip Mutasyonların MLPA ile Araştırılması.	TUBİTAK	2014-2016

Yayınlar ve Bildiriler:

SCI,SSCI,AHCI İndekslerine Giren Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Comak E, Sema Akman, Mustafa Koyun Cagla Serpil Dogan, Arife Uslu Gokceoglu, **Yunus Arikan**, İbrahim Keser "Clinical Evaluation of R202Q alteration of genes in Turkish Children", Clinical Rheumatology, vol.33, pp.1765-1771, 2014
2. **Arikan Y.**, Bilgen T., Koken R., Turan S., Mihçı E. , Keser İ., "c.428_451 dup(24bp) MUTATION OF THE ARX GENE DETECTED IN A TÜRKISH

FAMILY", GENETIC COUNSELING, vol.23, pp.367-373, 2012

3. Mendilcioğlu İ., Bilgen T., **Arikan Y.**, Keser İ., Şimşek M., Timuragaoglu A., "The association between inherited thrombophilias and pregnancy-related hypertension recurrence", ARCHIVES OF GYNECOLOGY AND OBSTETRICS, vol.284, pp.837-841, 2011
4. Bilgen T., Canatan D., **Arikan Y.**, Yesilipek A., Keser I. "The effect of HBB:c.+96TC (3UTR 1570 TC) on the mild b-thalassemia intermedia phenotype", Turkish Journal of Hematology, vol.28, pp.219-222, 2011
5. Bilgen T., **Arikan Y.**, Canatan D., Yesilipek A., Keser İ., "The association between intragenic SNP haplotypes and mutations of the beta globin gene in a Turkish population", BLOOD CELLS MOLECULES AND DISEASES, vol.46, pp.226-229, 2011
6. **Arikan Y.**, Bilgen T., Keser İ., "COMPLEMENT FACTOR H Y403H POLYMORPHISM IN THE TURKISH POPULATION", BALKAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS, vol.13, pp.41-45, 2010

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

1. I.Keser, Y.Arikan, T.Karaman, T.Bilgen, D.Canatan, A. Kupesiz "Alpha globin gene mutations and rare variants in Antalya Province, Turkey.", ESHG Conference in Barcelona 21-24 May 2016, p18.055, pp.537-537
2. Arikan Y., Bilgen T. , Karaman T. , Canatan D. , Keser İ., "Antalya ve Çevresinde Alfa Globin Gen Mutasyonlarının Araştırılması", 14.ULUSAL TIBBİ BİYOLÖJİ ve GENETİK KONGRESİ, MUĞLA, TÜRKİYE, 26-30 Ekim 2015, ss.346-346
3. Keser İ., Bilgen T., Arikan Y., Yesilipek A. , Canatan D. , "Twelve different abnormal hemoglobins in Antalya province, Turkey", 6.ULUSLAR ARASI TALASEMİ KONGRESİ VE YAZ OKULU, ANTALYA, TÜRKİYE, 18-23 Nisan 2013, pp.266-266
4. Bilgen T., Altıok Clark Ö., Arikan Y., Canatan D., Yesilipek A., Keser İ., "Gap PCR Screening for Common Deletional Mutation of the Beta Globin Gene in the Antalya Province of Turkey", 6.ULUSLAR ARASI TALASEMİ KONGRESİ VE YAZ OKULU, ANTALYA, TÜRKİYE, 18-23 Nisan 2013, pp.264-264
5. Arikan Y., Bilgen T., Yesilipek A., Canatan D., Keser İ., "HbG Coughatta [Beta22(B4)Glu-Ala] ve Cod 2 C>T SNP arasındaki ilişki ", 6.ULUSLAR ARASI TALASEMİ KONGRESİ VE YAZ OKULU, ANTALYA, TÜRKİYE, 18-23 Nisan 2013, pp.263-263

6. Arikan Y., Bilgen T., Yesilipek A., Canatan D., Keser İ., "ANTALYA'DA BETA GLOBİN GENİNDE GÖRÜLEN NADİR MUTASYONLAR", 6.ULUSLAR ARASI TALASEMİ KONGRESİ VE YAZ OKULU, ANTALYA, TÜRKİYE, 18-23 Nisan 2013, pp.262-262
7. Bilgen T., Altıok Clark Ö., Arikan Y., Mendilcioğlu İ.İ., Sakinci M., Şimşek M., et al., "Prenatal Screening of Beta Thalassemia in Antalya, Turkey", 6.ULUSLAR ARASI TALASEMİ KONGRESİ VE YAZ OKULU, ANTALYA, TÜRKİYE, 18-23 Nisan 2013, pp.264-264
8. Keser İ., Bilgen T. , Arikan Y., Canatan D., Yesilipek A., Cornelis H., "Molecular characterization of deletional forms of beta-thalassemia in Antalya, Turkey", EUROPEAN HUMAN GENETICS CONFERENCE 2013, PARIS, FRANSA, 8-11 Haziran 2013, pp.563-564
9. Arikan Y., Bilgen T., Çomak E., Akman S., Altıok Clark Ö., Artan R., et al., "Evaluation of R202Q alteration of Pyrin Protein onto Familial Mediterrenan Fever (FMF) in Antalya Province ", The EMBO Meeting 2013, Amsterdam, AMSTERDAM, HOLLANDA, 21-24 Eylül 2013, pp.78-78
10. Bilgen T., Arikan Y., Canatan D., Yesilipek A. , Keser İ., "The Association Between the Intragenic SNP Haplotypes and Mutations of Beta Globin Gene in Turkey Population", 12th International Conference on Thalassemia and Other Haemoglobinopathies, 14th TIF Conference for Patients and Parents, ANTALYA, TÜRKİYE, 4-7 Eylül 2011, pp.134-134
11. Arikan Y., "Two Rare Mutations in 3' UTR Region of Beta-Globin Gene in Antalya Province, Turkey", 12th International Conference on Thalassemia and Other Haemoglobinopathies, 14th TIF Conference for Patients and Parents, ANTALYA, TÜRKİYE, 11-14 Mayıs 2011, pp.86-86
12. Keser İ., Bilgen T. , Arikan Y., Yeşilipek A., Canatan D. , "Two Rare Mutations: IVS-I (-3) (C>T) and Codon 69 (G>A) in Antalya Population ", 12th International Conference on Thalassemia and Other Haemoglobinopathies, 14th TIF Conference for Patients and Parents, ANTALYA, ANTALYA, TÜRKİYE, 4-7 Eylül 2011, pp.85-85
13. Arikan Y., "Non-Sendromik Mental Retardasyonlu Olguda Aristaless Related Homeobox (ARX) gen mutasyonu: c.428_451dup(24bp)", 12.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 27-30 Ekim 2011, ss.166-166
14. Keser İ., Bargic G. , Bilgen T., Arikan Y., Yesilipek A. , Canatan D., "Abnormal Hemoglobins Detected in Antalya Population, Turkey", 12th International Conference on Thalassemia and Other Haemoglobinopathies, 14th TIF Conference for Patients and Parents, ANTALYA, TÜRKİYE, 4-7 Eylül 2011, pp.105-105

15. Bilgen T., Phylipsen M., Arikan Y., Mendilcioğlu İ.İ., Yeşilipek M.A., Hartevelde C.L., et al., "Detection of the Turkish Inversion-Deletion (Delta Beta) (0) Thalassemia in a Family Seeking Prenatal Diagnosis and Prevention", 12th International Conference on Thalassemia and Other Haemoglobinopathies, 14th TIF Conference for Patients and Parents, ANTALYA, TÜRKİYE, 4-7 Eylül 2011, pp.84-84
16. Arikan Y., "7. Screening of 370 mentally retarded Turkish patients for the most common Aristaless related X (ARX) gene mutations, c.428_451 dup(24bp) and c.333ins (GCG)7.", 15th International Workshop on Fragile X and other early-onset cognitive disorders, BERLİN, ALMANYA, 4-7 Eylül 2011, pp.x-x
17. Keser İ., Bilgen T., Arikan Y., Canatan D., Yeşilipek A., Cornelis L.H., "Antalya'da beta globin geninde delesyonel tip mutasyonların tanımlanması", 12.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, ANTALYA, TÜRKİYE, 27-30 Ekim 2011, ss.172-172
18. Mendilcioğlu İ.İ., Bilgen T., Arikan Y., Keser İ., Şimşek M., "The Association Between Inherited Thrombophilias And Pregnancy-Related Hypertension Recurrence", 30th Annual Meeting Society for Maternal-Fetal Medicine, Chicago, ABD, 1-6 Şubat 2010, pp.283-283
19. Bilgen T., Arikan Y., Mihçi E., Duman Ö., Yesilipek A., Haspolat Ş., et al., "Co-Inheritance of Beta Thalassemia and Fragile –X Syndrome in Turkish Family", 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Genetics Society with International participation, İSTANBUL, TÜRKİYE, 1-5 Ekim 2010, pp.48-48
20. Keser İ., Bilgen T., Arikan Y., Ozturk Z., Kurt P., Yesilipek A., "A RARE AND NEW SPLICE SITE MUTATION LEADING BETA-THALASSEMIA MAJOR: CODON 29 (C > T)", 9th National Medical Congress, İSTANBUL, TÜRKİYE, 1-5 Aralık 2010, ss.83-83
21. Arikan Y., Bilgen T., Mihçi E., Duman Ö., Haspolat Ş., Keser İ., "Molecular Diagnosis of Fragile X Syndrome and distribution of CGG repeats number in 5'UTR of FMR1 Gene in Antalya Province", 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Genetics Society with International participation, İSTANBUL, TÜRKİYE, 1-5 Ekim 2010, pp.97-97
22. Keser İ., Bilgen T., Arikan Y., Mihçi E., Duman Ö., Yeşilipek A., et al., "Co-Inheritance of beta-thalassemia and fragile X syndrome in a Turkish family", ASHG-2010, WASHINGTON, ABD, 2-6 Kasım 2010, pp.2362-2362
23. Arikan Y., Bilgen T., Keser İ., "Complement Factor H Y402H Polymorphism in Turkish Population", 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Genetics Society with International participation, İSTANBUL,

TÜRKİYE, 1-5 Ekim 2010, pp.52-52

24. Keser İ., Bilgen T., Arikan Y., Yesilipek A., Canatan D. , "The Relationship Between the 3-UTR +1570 (T>C) Mutation in the Beta Globin Gene and Mild Beta-Thalassemia Intermedia", 9th National Medical Genetics Congress of Turkish Medical Genetics Society with International participation, İSTANBUL, TÜRKİYE, 1-5 Ekim 2010, pp.125-125
25. Arikan Y., "ABCB1/MDR1 ve OPRM1 polimorfizmlerinin morfin tüketimi ve ağrı şiddeti üzerine etkileri. XI.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi", XI.Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, MUĞLA, TÜRKİYE, 28-31 Ekim 2009, ss.103-103
26. Keser İ., Bilgen T., Arikan Y., Mendilcioğlu İ.İ., Yeşilipek A. , Lülecı G., "Homozygous promotor mutation [-30/-30] of beta-globin gene caused by maternal uniparental isodisomy of chromosome 11 in a fetus", American Society of Human Genetics, 59th Annual Meeting, HONOLULU, ABD (HAVAİ), 20-24 Ekim 2009, pp.152-152