

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE GAMA GLOBİN
EKSPRESYONU DEĞİŞİMİNE NEDEN OLAN SNP'LERİN
HEMOGLOBİNOPATİ KLİNİĞİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Yasemin ÖZKÜÇÜK

**TIBBİ BİYOKİMYA TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMANI
Prof. Dr. Abdullah TULİ**

ADANA-2022

T.C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ÇUKUROVA BÖLGESİNDE GAMA GLOBİN
EKSPRESYONU DEĞİŞİMİNE NEDEN OLAN SNP'LERİN
HEMOGLOBİNOPATİ KLİNİĞİNE ETKİSİNİN
İNCELENMESİ**

Yasemin ÖZKÜÇÜK

**TIBBİ BİYOKİMYA TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMANI

Prof. Dr. Abdullah TULİ

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından TYL-2020-13341 no'lu
proje ile desteklenmiştir.

ADANA-2022

KABUL VE ONAY

X X X X

ETİK BEYANI



TEŞEKKÜR

Çalışmalarım sırasında bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, eğitimim sürecinde büyük özveri ve sabrıyla yardımlarını esirgemeyen, tez danışmanım Prof. Dr. Abdullah TULİ'ye çok teşekkür ederim.

Ders aşamasında teorik bilgilerini aktaran, uygulamalarımda yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Nurten DİKMEN'e, Prof. Dr. M. Akif ÇÜRÜK'e, Prof. Dr. Tamer C. İNAL'a, Prof. Dr. Özlem GÖRÜROĞLU ÖZTÜRK'e, Doç Dr. Zafer YÖNDEN'e ve pozitif enerjisi ile desteğini hiç esirgemeyen Öğretim Görevlisi Dr. Ebru DÜNDAR YENİLMEZ'e eğitimime kattıkları artı değerden dolayı teşekkür ederim.

Yüksek Lisans eğitim sürecinde manevi desteklerinden ötürü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Doktora Öğr. Duygu Düzgünce BOĞA'ya, Arş. Gör. Başak GÜNAŞTI'ya, Arş.Gör. Yusuf DÖĞÜŞ'e, Arş.Gör. Kezban KARTLAŞMIŞ'a ve dara düştüğüm konularda abla şevkatiyle imdadıma koşan Arş.Gör. Ü. Fulden BOZKAYA AYDIN'a çok teşekkür ederim.

Tez çalışmam sürecinde maddi, manevi desteklerini esirgemeyen dayım Halil YÜZGEÇ ve yengem Hülya YÜZGEÇ'e teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca en büyük destekçim olan, sabretmeyi ve insan sevmeyi öğreten sevgili annem Saadet YÜZGEÇ, babam Mehmetali ÖZKÜÇÜK ve canım kardeşim Halilcan ÖZKÜÇÜK'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamı TYL-2020-13341 No'lu proje ile maddi olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Eritropoez	4
2.2. Hemoglobin Molekülü'nün Yapısı ve İşlevi	2
2.3. İnsan Hemoglobin Genleri	6
2.3.1. α -globin gen kümesi (HBA)	6
2.3.2. β -globin gen kümesi (HBB)	4
2.4. Globin Genlerinin Gelişimsel İfadesi ve Globin Değişimi	5
2.5. Hemoglobinopatiler	6
2.5.1. β -Talasemi	7
2.5.1.1. β -Talasemi'nin Moleküler ve Hücresel Patolojisi	7
2.5.1.2. β -Talasemi'nin Epidemiyolojisi	9
2.5.1.3. β -Talasemi'nin Klinik Fenotipleri	10
2.5.2. Orak Hücre Anemisi (OHA)	11
2.5.2.1. OHA Mekanizmasının Patofizyolojisi	13
2.5.2.2. OHA'nın Yaygın Klinik Komplikasyonları	13
2.6. Fetal Hemoglobin Düzeyini Etkileyen Mekanizmalar	14
2.6.1. Xmn1-HBG2 Polimorfizmi	15
2.6.2. Kromozom 6q23 Üzerinde HMIP Lokusu	17
2.6.3. BCL11A Polimorfizmi	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM	21

3.1. Gereç ve Kimyasal Maddeler	23
3.1.1. Gereçler	23
3.1.2. Kimyasal Maddeler	23
3.2. Yöntem	22
3.2.1. Örnek Toplanması ve İş Akış Şeması	22
3.2.2 Kan Örneklerinden DNA Eldesi	22
3.2.3. HbF Ölçümü	22
3.2.4. Tetra-primer ARMS Yöntemi ile BCL11A ve Xmn1 SNP'lerinin Belirlenmesi	23
3.2.5. PCR Protokolü	25
3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi	26
3.2.7. Yöntem	26
3.3. RT-PCR Yöntemi ile HMIP SNP'sinin Belirlenmesi	27
3.3.1. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması	28
4. BULGULAR	30
4.1. Hastalarda BCL11A, Xmn1 ve HMIP Polimorfizmlerinin (SNP) Dağılımları ...	30
5. TARTIŞMA	38
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	44
KAYNAKLAR	45
EKLER	52
Ek-1. Bilgilendirme Ve Rıza Olur Formu	52
ÖZGEÇMİŞ	53

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil no:

Sayfa no:

Şekil 1.	(A) Hb molekülünü yapısı (25). (B) Hem'in yapısı ve proksimal, distal Histidin kalıntılarına bağlanması (26). (C) Hb'nin α alt biriminin α -sarmal yapısı (25). (D) Hb'nin β alt ünitesinin α -sarmal yapısı (25).....	5
Şekil 2.	α -globin gen kümesinin genomik yapısı (31).....	4
Şekil 3.	β -globin genlerinin ve LCR'nin fiziksel temsili (32). (OR: Olfactory Receptor)	7
Şekil 4.	Fetüste ve bebekte eritropoez gelişimi (28).	6
Şekil 5.	β -talaseminin patofizyolojisi. (A) β -talasemide anormal globin sentezi. (B) Bir eritroblast (solda) ve olgun bir kırmızı hücrede (ortada) α -globin zincirlerinin çökmesini gösteren elektron mikrografları. Şiddetli β -talasemili hastanın (sağda) tipik kan filmi (18).	8
Şekil 6.	β -talasemi komplikasyonları (53).....	10
Şekil 7.	OHA genetik aktarımı (62).	12
Şekil 8.	Deoksijene HbS polimerizasyonu ve oraklaşmış KKH (66).	13
Şekil 9.	OHA'nın çeşitli komplikasyonları (68).....	14
Şekil 10.	Kromozom 11p15.4 HBB gen kümesi. Farklı polimorfik restriksiyon enzim bölgeleriyle HBB kümesinin genomik organizasyonu. Çeşitli bölgelerden β s geni ile ilişkili haplotipler gösterilmiştir. HbS Senegal, HbS-Arab/Indian haplotipleri Xmn1-HBG2 varyantını taşır (71).	16
Şekil 11.	Kromozom 6q23 üzerindeki HMIP lokusu. HBS1L ve MYB genlerinin 5'kısımlarını kapsayan 126 kb'lık HMIP bölgesinin genomik organizasyonu (71).	17
Şekil 12.	Avrupalılarda HMIP'da HbF ile ilişkili varyantları içeren 2 ana haplotipin birleşimi (82).	18
Şekil 13.	BCL11A'nın transkript varyantları (83).....	19
Şekil 14.	BCL11A ile etkileşime giren moleküllerin gösterimi (A) γ -globin gen ekspresyonunun BCL11A tarafından baskılanmasını gösteren diyagram (B) Popülasyon çalışmalarında Kromozom 2 ile en çok ilişkilendirilen SNP'ler (84,85,86).....	20
Şekil 15.	Tetra-primer ARMS-PCR prosedürü (91).....	23
Şekil 16.	Xmn1 ve BCL11A polimorfizmlerinin agaroz jel görüntüleri.	27
Şekil 17.	HMIP polimorfizmi için RT-PCR grafiği.	29
Şekil 18.	Örneklerin gelişim dönemlerine göre HbF düzeylerinin kıyaslanması	34
Şekil 19.	BCL11A polimorfizmine ait allellerin HbF düzeyleriyle ilişkisi bakımından karşılaştırması.	35

- Şekil 20.** Soldaki grafik Xmn1 polimorfizminin OHA'lı ve β -talasemili hastalarda HbF düzeylerine etkisinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Sağdaki grafik BCL11A polimorfizminin OHA'lı ve β -talasemili hastalarda HbF düzeylerine etkisinin karşılaştırılmasını göstermektedir (grup1: HbS C/C genotipi, grup 2: HbS C/T genotipi, grup 3: β -talasemi C/C genotipi grup 4: β -talasemi C/T genotipi, grup 5: β -talasemi T/T genotipi temsil etmektedir.....36
- Şekil 21.** Her üç polimorfik noktaya ait bireysel baz değişimlerinin HbF düzeyleriyle ilişkisinin karşılaştırması.37
- Şekil 22.** Xmn1 ve BCL11A C/T heterozigotlarının HbF düzeylerine etkisinin karşılaştırılması38



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo no:</u>	<u>Sayfa no:</u>
Tablo 1. ARMS yönteminde kullanılan kimyasal bileşenler.	26
Tablo 2. rs7482144 (XmnI) ve rs11886868 (BCL11A) SNP'leri için kullanılan primer dizileri (91).	26
Tablo 3. BCL11A ve XmnI için PCR protokolleri.....	27
Tablo 4. HMIP için PCR koşulları.....	30
Tablo 5. Örneklem grubunun 3 polimorfik nokta için sahip oldukları alleler ve HbF değerleri.....	32
Tablo 6. Her üç polimorfik noktanın yüzdesel allel dağılımları.	36
Tablo 7. Örneklem grubunda XmnI, BCL11A ve HMIP polimorfizmlerinin allel dağılımları, allel frekansları.....	36

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

OHA	: Orak Hücre Anemisi
SNP	: Single Nucleotide Polymorphism
QTL	: Quantitative Trait Loci
HbF	: Fetal Hemoglobin
Hb	: Hemoglobin
AGM	: Aorta Gonad Menefroz
HKH	: Hematopoetik Kök Hücreler
MEP	: Megakaryositik/Eritrosit Progenitör
HBA	: α -globin Gen Kümesi
HBB	: β -globin Gen Kümesi
LCR	: Lokus Kontrol Bölgesi
TM	: β -Talasemi Majör
TI	: β -Talasemi Intermedia
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
MCV	: Ortalama Hücre Hacmi
HPFH	: Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin
HMIP	: HBS1L-MYB İntergenik Polymorphism
EVI9	: Ekotropik Viral Entegrasyon Bölgesi 9 Homoloğu
CTIP1	: COUP-TF Etkileşimli Protein 1
SWI/SNF	: SWItch/Sucrose Non-Fermentable
NuRD	: Nucleosome Remodelling Deacetylation
ARMS	: Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
TBE	: Tris Borat EDTA
UV	: Ultraviole
RT-PCR	: Real-Time PCR

ÖZET

Çukurova Bölgesi'nde Gama Globin Gen Ekspresyonuna Neden Olan SNP'lerin Hemoglobinopati Kliniğine Etkisinin İncelenmesi

β -talasemiler β -globin zincirlerini kodlayan genlerde mutasyonlar veya delesyonlar ile karakterize, Orak hücre anemisi ise β -globin zincirinin 6. pozisyonunda tek bir aminoasidin yer değiştirmesi (β 6Glu→Val) sonucu HbS olarak isimlendirilen orak şeklindeki hemoglobin üretimiyle karakterize genetik hastalıklardır. Son yıllarda kompleks hastalıklarda bireylerin ilaçlara yanıtlarındaki genetik çeşitliliğin belirlenmesinde, hastanın genotipine göre bireysel tedavi seçeneklerinin geliştirilmesi ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesinde tekli gen polimorfizmleri (SNP'ler) artan bir ilgiyle kullanılmaktadır.

β -talasemi ve orak hücreli anemi (HbS) gibi hemoglobinopatilerde Fetal Hemoglobin (HbF) düzeyi değişik miktarlarda yükselir. Erişkin dönemde HbF'in değişen düzeylerde devam etmesi genetik faktörlerle kontrol edilir. Bu faktörler arasında HBG2 lokusunda Xmn1 (C→T), SNP'si ve kromozom 2 üzerindeki BCL11A, kromozom 6 üzerindeki HMIP SNP'lerini içeren QTL (Quantitative Trait Loci)'ler yer almaktadır.

Çalışmamızda Pediatrik Hematoloji Anabilim Dalı'na başvuran 90 β -talasemi ve 10 orak hücre anemili toplam 100 hastada HbF sentezini arttırarak fenotipi iyileştiren rs7482144 (Xmn1), rs11886868 (BCL11A) ve rs9399137 (HMIP) SNP'leri tetra-primer ARMS ve RT-PCR yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Hastalar Xmn1 polimorfizminde sırasıyla %74 "C/C", %26 "C/T" allellerini, BCL11A polimorfizminde 54'ü "C/C", 30'u "C/T" ve 16'sı "T/T" allellerini ve HMIP polimorfizminde hastaların %100'ünün "T/T" alleli taşıdıkları saptanmıştır. Hastalarda taranan üç SNP'nin allel frekansları incelenmiş olup Xmn1 "C", BCL11A "C" ve HMIP "T" allelleri majör alleler olarak saptanmışlardır. Xmn1, BCL11A ve HMIP polimorfizmleri birlikte incelendiğinde Xmn1 "C/T", BCL11A "T/T" ve HMIP "T/T" allellerini birlikte taşıyan bireylerde HbF sentezinin yüksek oranda ($p<0,01$) olduğu saptanmıştır.

Anahtar Sözcükler: SNP analizi, polimorfizm, hemoglobinopati, orak hücre anemisi, β -talasemi, tetra-primer ARMS, RT-PCR.

ABSTRACT

Investigation of the Effect of SNPs Causing Gamma Globin Expression Changes on Hemoglobinopathy Clinic in Çukurova Region.

β -thalassemias are genetic diseases characterized by mutations or deletions in genes encoding β -globin chains, while sickle cell anemia is characterized by the production of sickle-shaped hemoglobin called HbS, as a result of substitution of a single amino acid (β 6Glu→Val) at the 6th position of the β -globin chain. In recent years, single gene polymorphisms (SNPs) have been used with increasing interest in determining the genetic variation in the response of individuals to drugs in complex diseases, developing individual treatment options according to the patient's genotype, and identifying new therapeutic targets.

Fetal Hemoglobin (HbF) level rises in varying amounts in hemoglobinopathies such as β -thalassemia and sickle cell anemia (HbS). The persistence of HbF at varying levels in adulthood is controlled by genetic factors. Among these factors are QTLs (Quantitative Trait Loci) containing Xmn1 (C→T) SNP in the HBG2 locus and BCL11A on chromosome 2 and HMIP SNPs on chromosome 6.

In our study, Xmn1, BCL11A and HMIP) SNPs, which improved the phenotype by increasing HbF synthesis in a total of 100 patients, 90 with β -thalassemia and 10 with sickle cell anemia, who applied to the Department of Pediatric Hematology, were tetra-primer ARMS-PCR and RT-PCR evaluated using methods. In the Xmn1 polymorphism, the patients had 74% “C/C” and 26% “C/T” alleles, 54 “C/C”, 30 “C/T” and 16 “T/T” alleles in the BCL11A polymorphism. In the polymorphism and HMIP, 100% of the patients were found to carry the “T/T” allele. Allele frequencies of three SNPs screened in patients were examined and Xmn1 “C”, BCL11A “C” and HMIP “T” alleles were determined as major alleles. When the Xmn1, BCL11A and HMIP polymorphisms were examined together, it was determined that HbF synthesis was high ($p<0,01$) in individuals carrying the Xmn1 “C/T”, BCL11A “T/T” and HMIP “T/T” alleles together.

Keywords: SNP analyze, polymorphism, haemoglobinopathy, sickle cell anemia, β -thalassemia, tetra-primer ARMS, RT-PCR.

1. GİRİŞ

Eritropoez, kırmızı kan hücrelerinin hematopoetik kök hücreler ve progenitör hücrelerin adım adım farklılaşmasıyla üretildiği süreçtir (1). Eritropoez süreci Eritropoetin hormonu tarafından uyarılırken, sıcaklık, oksijen basıncı gibi faktörler tarafından düzenlenmektedir. Eritrosit yapımı, fetal dönemde yolk kesesinde başlamaktadır. Gebeliğin 3. ayında eritropoez merkezi karaciğer olurken 7. aydan itibaren kemik iliği eritropoez merkezi haline gelmektedir (2). Eritrositler, *proeritroblast*, *bazofil eritroblast*, *polikromatofil eritroblast*, *ortokromatofil (asidofil) eritroblast* evrelerini izleyerek gelişimlerini tamamlarlar. Hemoglobinin yapımı polikromatofil evresinde başlamaktadır (3).

Hemoglobin (Hb), kırmızı kan hücrelerinde bulunan akciğerden dokulara oksijen taşımakla görevli bir proteindir. Hb molekülü iki α benzer globin zinciri ve iki β benzer globin zinciri içermektedir. Her alt birim, bir polipeptid zinciri ve moleküle oksijen bağlama yeteneği vermek için yapısında demir atomu bulunduran “heme” adlı prostetik gruptan oluşmaktadır (4). Hemoglobinin α - ve β -globin zincirleri sırasıyla 16. ve 11. kromozom üzerindeki iki gen kümesi tarafından kodlanmaktadır. Bu genler üzerinde meydana gelen çeşitli mutasyonlar ve delesyonlar hatalı/eksik globin zincir üretimine ya da Hb molekülünde yapısal anormalliklere neden olarak Dünya üzerinde en sık rastlanan genetik hastalıklar olan Hemoglobinopatilerin oluşumuna neden olmaktadır.

Hemoglobinopatiler, dünyada, özellikle de sıtmanın endemik olduğu bölgelerde, en sık görülen genetik hastalıklardır (5-7). Hemoglobinopatilerin patofizyolojisini hemoglobinin globin zincirlerindeki yapısal değişikliklerin neden olduğu anormal Hb’ler ya da globin zincir ekspresyon bozuklukları olan talasemiler oluşturmaktadır (8).

Talasemiler, Hb molekülünün iki globin zincirinden biri olan α - ve β -globin ekspresyonunun azalması ya da hiç olmaması sonucu oluşan hastalıklardır. β -talasemilerin %95’i, β -globinin anormal RNA transkripsiyonuna, işlenmesine ya da kararlılığına neden olan nokta mutasyonlarından ya da anormal proteinlerin üretilmesiyle sonuçlanan anlamsız mutasyonlardan kaynaklanır. β -talasemi, mutasyona uğramış alelden hiçbir β -globin zincirinin üretilmediği β^0 -talasemi ya da azaltılmış miktarlarda β -globin zincirinin üretildiği β^+ -talasemi gibi sınıflandırılabilir. İki β^0 aleli

olan bireyler (homozigot), β -talasemi majör olarak adlandırılan hastalığın en şiddetli formuna sahiptir ve sürekli kan transfüzyonu gerektirir. Sonuç olarak transfüzyona bağımlı β -talasemilerde, şelasyon tedavisi gerektiren, ciddi transfüzyonel demir yüklemesi ve kısalmış yaşam beklentisi görülür (7).

Orak hücre anemisi (OHA), β -globin genindeki tek bir mutasyonun neden olduğu Hemoglobin S (HbS) adı verilen anormal bir hemoglobin üretimine yol açan, oksijensiz ortamda polimerize olan ve kırmızı kan hücrelerinin oraklaşmasına neden olan genetik bir hastalıktır. Oraklaşmış eritrositler, çok kırılabilir ve katıdır. Bunun bir sonucu olarak hastalarda sık ve tekrarlayan vazo oklüsif kriz (VOK)'ler gelişir (9,10).

Fetal hemoglobin (HbF), 2α ve 2γ zincirinin tetrameridir. γ -globin zincirleri, 11. kromozomun *p* kolu içindeki hemen hemen özdeş 2 gen (HBG1 ve HBG2) tarafından kodlanır. HbF gebelikten doğum sonrası ilk 1 ila 2 aya kadar baskın hemoglobindir (11-13). Doğumdan sonra, γ -globin sentezi yerini β -globin sentezine bırakır ve HbF seviyeleri azalır, yetişkin çağlarda %1 seviyelerine iner. Ancak çoğu β -talasemili hastada γ -globinden β -globin ekspresyonuna gecikmeli bir geçiş vardır ve daha sonra HbF seviyeleri normalin üzerinde seyrederek (14). Çok sayıda klinik çalışma, yetişkinlerde HbF miktarındaki bireysel varyasyonların OHA ve β -talasemide düşük morbidite ve mortalite ile ilişkili olduğunu göstermiştir (11-13). Bu bakımdan yetişkinlerde HbF sentezinde rolü olan genetik varyasyonlar önem arz etmektedir. Günümüze kadar HbF ifadesiyle ilişkili bulunan çok sayıda tek nükleotid polimorfizmi (Single Nükleotid Polymorphism; SNP) varlığı belirlenmiş, bunların popülasyonlar arasında farklı dağılıma sahip olduğu gösterilmiştir. HbF ifadesiyle ilişkili olduğu bilinen polimorfik bölgeler arasında HBG2 lokusu üzerindeki Xmn1, kromozom 2 üzerindeki BCL11A (BRG1-Associated Factor (BAF) Chromatin Remodeling Complex Subunit) ve kromozom 6 üzerindeki HMIP (Hsp70 subfamily B suppressor 1 like gene (HBS1) Like Translational GTPase; HBS1L-MYB) SNP'lerini içeren QTL (Quantitative Trait Loci)'ler yer almaktadır (15).

Ülkemizde kayıtlı olan β -talasemi majör ve HbS hastaları, Akdeniz bölgesinde özellikle Adana, Antalya ve Mersin illerinde yayılım göstermektedir. Ülke genelinde β -talasemi taşıyıcılığı ve HbS sıklığı sırasıyla %2,1, %0,03'tür (16). Bu bölgelerde dolayısıyla ülkemizde β -talasemi ve HbS sıklığının yüksek olması, hastaların erken tanı ve tedavi sürecine erken yaşlarda başlanması, bireylerin yaşam kalitesini korumak için

önem göstermektedir. Bölgemizde hastalıklara sık olarak rastlansa da henüz bu bölgedeki HbF varyasyonları ve bu varyasyonların HbF düzeyiyle ilgili yeterli çalışma yapılmamıştır. Verilen bilgiler ışığında, tasarladığımız bu çalışma ile bölgemizde kan transfüzyonuna bağımlı β -talasemi ile HbS'li hastalarda, BCL11A, Xmn1 ve HMIP SNP'lerinin HbF düzeyini ne yönde etkilediğini belirlemeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eritropoez

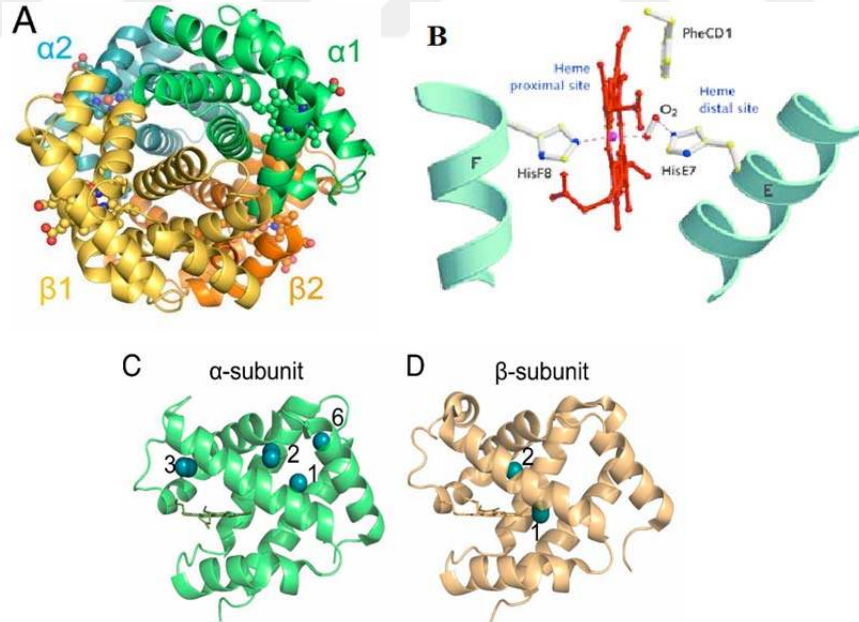
Eritropoez, eritropoietik kök hücrelerin, olgun çekirdekli kırmızı kan hücresi üretmek için farklılaştığı dinamik, çok aşamalı bir süreçtir (17). İnsan vücudu eritropoez süreci boyunca her saniye 2 milyon eritrosit üretmektedir.

Embriyonik dönemde eritrosit yapımı 3. haftada yolk (vitellus) kesesinde başlar. Bu eritroid hücreler çekirdekli ve kısa ömürlüdür. Sonrasında ventral mezodermin aorta-gonad-mezonefroz (AGM) bölgesinde fetal ve yetişkin yaşam boyunca kalıcı olan hematopoetik kök hücreler (HKH) ortaya çıkar. Bu hücreler, karın duvarından fetal karaciğere göç eder ve gebeliğin yaklaşık 60. gününde ilk fetal eritrositler, embriyonik eritrositlerin yerini almak üzere dolaşıma salınır (18). Fetal gelişim sırasında HKH'ler, normal yetişkin yaşamının geri kalanı için eritropoez bölgesi olan kemik iliğine göç eder. Doğum sonrası ilk aylarda, kemik iliğinde üretilen yetişkin kırmızı kan hücreleri, fetal hücrelerin yerini alır (19).

Postnatal dönemde eritropoez, eritroid öncül hücrenin eritropoetin, IL3, IL4 etkisiyle megokaryositik/eritrosit progenitör (MEP) hücreye dönüşümüyle başlar. MEP'ten, GATA1 transkripsiyon faktörünün etkisiyle proeritroblast oluşturulur. Proeritroblastlar mitoz ile bölünerek bazofilik eritroblastı oluşturur. Hemoglobin sentezi bu aşamada başlar. Bu evreden sonra hücre hem bazofilik hem de eozinofilik olarak izlendiği polikromatofilik eritroblast evresine girer. Bir sonraki aşamada hücre, daha fazla mitoz bölünme geçirmeyerek ortokromatofilik eritroblast (normoblast) olarak karşımıza çıkar. Bu aşamadan sonra hücre çekirdeği dışarı atılır ve Hb sentezine devam eden polikromatofilik eritrosit (retikülosit) oluşur. Retikülositler dolaşıma girerler ve olgunlaşma süreçleri devam eder. İnsanlarda retikülositlerin olgunlaşma sürecini tamamlaması yaklaşık 1 hafta sürer (20).

2.2. Hemoglobin Molekölü'nün Yapısı ve İşlevi

Hb, her biri 141 aminoasit kalıntısından oluşan iki α -globin zinciri ve her biri 146 aminoasit kalıntısından oluşan iki β -globin zinciri olmak üzere dört polipeptid zincirinden oluşan tetramerik yapıda bir proteindir (21). Memelilerde eritrositlerin kuru içeriğinin (ağırlıkça) yaklaşık %96'sını ve toplam içeriğin (su dahil) yaklaşık %35'ini oluşturur (22). Hb'nin temel işlevi oksijeni (O_2) akciğerlerden periferik dokulara ve karbondioksiti (CO_2) dokulardan akciğere taşımaktır. Hb molekülü, globin adı verilen protein katmanı ve hem halkasından oluşur (Şekil 1). Hb moleküler ağırlığının %96'sını oluşturan globin proteinleri, değişken miktarlarda amino asit dizisi içerseler de hepsi α sarmalından oluşan özdeş ikincil yapılara sahiptirler (23). α -globin ailesi üyeleri, yedi α -helix segmentine sahipken β -globin ailesi, sekiz α -helix segmentine sahiptir. Segmentler A'dan H'ye kadar olan harflerle isimlendirilir. $\alpha_1\beta_1$ arası 30 amino asit kalıntısından oluşurken, $\alpha_1\beta_2$ arası 19 amino asit kalıntısından oluşur. Katlanmış α -helix segmentleri birbirlerine β dönüşlerinin kısa bölümleriyle bağlanırlar. Tüm globin proteinlerindeki polipeptid zincirlerinin sarmal segmentleri, bir dizi hidrofobik etkileşim ve hidrojen bağları ile kararlı biçime getirilerek üçüncül yapıyı oluştururlar (24).



Şekil 1. (A) Hb molekülünü yapısı (25). (B) Hem'in yapısı ve proksimal, distal Histidin kalıntılarına bağlanması (26). (C) Hb'nin α alt biriminin α -sarmal yapısı (25). (D) Hb'nin β alt ünitesinin α -sarmal yapısı (25).

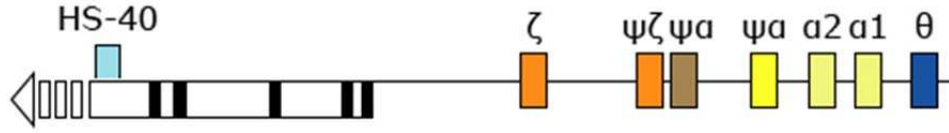
α - ve β -globin alt birimlerinin her biri hem prostetik grubuna bağlanırlar. Hem, yapısında bulunan demir (Fe^{+2}) atomu ile globin zincirlerinde F ve H sarmallar arasında proksimal Histidin kalıntıları arasındaki koordinasyon bağı ve kendi çevresinde bulunan bir dizi amino asit arasındaki çok sayıda non-kovalent etkileşimlerle yerinde tutulur (24). Hb molekülüne O_2 bağlanması için hem demirinin ferröz (Fe^{+2}) olması gerekmektedir (27). Erişkin bireylerde hem halkası aynı olup globin yapısı farklı olan 3 tip Hb (HbA_1 , HbA_2 ve HbF) bulunmaktadır.

2.3. İnsan Hemoglobin Genleri

Moleküler düzeyde Hb sentezi, 16. (α -benzer globinleri kodlayan) ve kromozom 11. (β -benzer globinleri kodlayan) kromozomlar üzerindeki iki multigen kümesi tarafından kontrol edilir. Bu genler, her kümede farklı Hb türleri üretmek için gelişim sırasında ifade edildikleri sırayla kromozom boyunca düzenlenir (28).

2.3.1. α -globin gen kümesi (HBA)

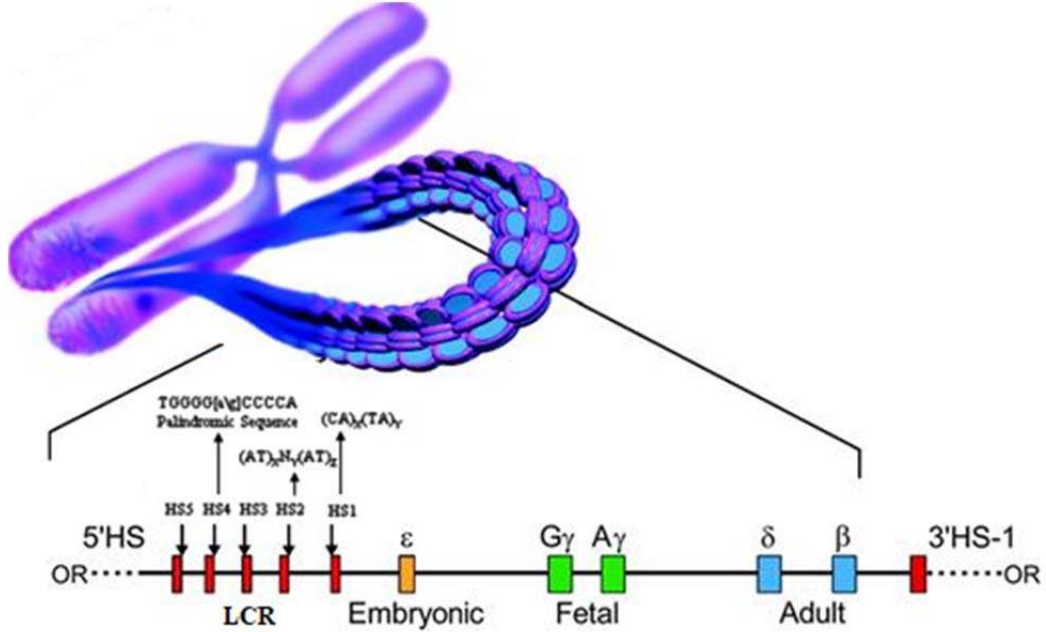
Telomerden sentromere doğru ζ , $\psi\zeta$, $\psi\alpha_2$, $\psi\alpha_1$, α_2 , α_1 ve θ_1 şeklinde sıralanmış 3 gen ve birkaç psödo gen içermektedir (Şekil 2). Her birey 2 kromozom 16'ya sahip olduğundan, toplam 4 işlevsel α -globin geni vardır. α_2 - ve α_1 -globin genleri, 141 amino asit kalıntısının aynı α -globin zincirlerini kodlarken α_2 -globin geni, muhtemelen kodlama dizilerine yakın farklı promotor dizilerinin etkisinden dolayı, α_1 -globin genine göre üretilen α -globin zincirlerinin iki katını oluşturur. Bunun bir sonucu olarak α_2 gen mutasyonları, genellikle α_1 globin geni üzerindeki aynı mutasyonlardan daha fazla yan etki ile ilişkilidir. α kümesi genlerinin gelişim evresine özgü ekspresyonlarını tanımlayan iki özelliği vardır; ζ -globin ekspresyonunun susturulması ve embriyonik dönemden fetal döneme geçişte α -globin ekspresyonunun indüklenerek fetal ve erişkin yaşam boyunca sürekli yüksek seviyede ekspresyonudur. α_1 ve α_2 genlerinin önünde, genlerin çalışma hızını belirleyen, transkripsiyon faktörleri için bir dizi DNaz'a aşırı duyarlı bölgeye ve bağlanma bölgesine sahip, yaklaşık 40 kb'lık HS40 bölgesi bulunmaktadır. α -globin gen kümesi, ortalama olarak %54 oranında GC bakımından zengindir (29,30).



Şekil 2. α-globin gen kümesinin genomik yapısı (31).

2.3.2. β-globin gen kümesi (HBB)

Kromozom 11'in kısa kolunda, 70 kb uzunluğunda, gelişimsel ekspresyon sırasına göre düzenlenen ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ , β ve $\psi\beta$ olmak üzere beş aktif gen ve bir psödo genden oluşmaktadır (30). Globin genlerinin her biri, geni uygun zamanda ve dokuda çalıştırmak için gerekli olan kendi düzenleyici proteinlere sahiptir. Bu düzenlemelere ek olarak, kümenin tamamının kontrolünü sağlayan ve gen kümesinin başlangıcında bulunan LCR (Lokus Kontrol Bölgesi) olarak adlandırılan DNA düzenleyici diziler bulunmaktadır (Şekil 3).



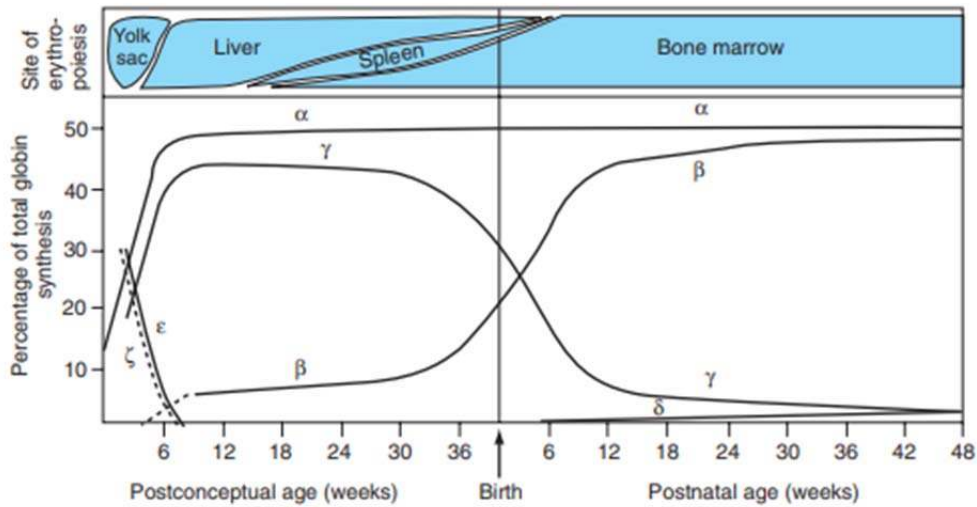
Şekil 3. β-globin genlerinin ve LCR'nin fiziksel temsili (32). (OR: Olfactory Receptor)

LCR, transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri için yüksek afiniteye sahip $(AT)_x N_y (AT)_z$ gibi palindromik diziler ve kusurlu tekrarlar içeren filogenetik olarak korunmuş çoklu aşırı duyarlı bölgelerden (HS1, HS2, HS3, HS4, HS5) oluşur. β-globin lokusu için önemli bir düzenleyicidir (33).

2.4. Globin Genlerinin Gelişimsel İfadesi ve Globin Değişimi

Fetal gelişim ve yenidoğan yaşamının ilk 6 ayı sırasında, “hemoglobin değişimi” adı verilen karmaşık bir globin gen ekspresyonu paterni oluşur (34). Bu süreçte çeşitli globin genlerinin, gelişim sırasında ekspresyonlarında değişiklik gözlenir. Embriyonik globin sentezi, gebeliğin 3.-8. haftaları arasında yolk kesesinde Hb Gower I ($\zeta 2\epsilon 2$), Hb Gower II ($\alpha 2\epsilon 2$) ve Hb Portland ($\zeta 2\gamma 2$) üretimiyle başlar (Şekil 4).

Beşinci gebelik haftasından itibaren ana hematopoez bölgesi fetal karaciğerdir. HbF ($\alpha 2\gamma 2$) fetal yaşam boyunca baskın hemoglobindir ve doğumda toplam hemoglobinin %70’ini oluşturur, ancak yetişkin yaşamında HbF toplam hemoglobinin %1’inden azını temsil eder. β zincirleri erken gebelikte tespit edilebilmesine rağmen, sentezleri ancak doğum zamanına yakın önemli hale gelir. Üç aylıkken, mevcut hemoglobinin neredeyse tamamı yetişkin tipindedir (HbA). δ zincirinin sentezi doğumdan sonra da devam eder, ancak HbA₂ ($\alpha 2\delta 2$) hiçbir zaman yetişkin hemoglobinin yaklaşık %2’sinden fazlasını oluşturmaz (28).



Şekil 4. Fetüste ve bebekte eritropoez gelişimi (28).

Bu süreç klinik olarak önemlidir, çünkü HbF üretiminin kalıcılığı ya da yeniden etkinleştirilmesi, β -talasemi ve orak hücre hastalığı gibi kalıtsal β -globin gen bozukluklarının semptomlarının şiddetini azaltmada oldukça faydalıdır (35-37).

2.5. Hemoglobinopatiler

Hemoglobinopati, Hb molekülünün yapısal bozukluğu ya da az üretimiyle karakterize dünya üzerindeki en yaygın kalıtsal tek gen hastalığıdır (38). “Hemoglobinopati” terimi tüm genetik Hb bozukluklarını içermektedir. Talasemi sendromları ve yapısal hemoglobin varyantları olmak üzere iki ana türü vardır. Doğal seçim nedeniyle sıtmanın endemik olduğu bölgelerde (Akdeniz, Asya ve Afrika) yaygın görülmekle birlikte göçler nedeniyle endemik olmayan Avrupa, Kuzey Amerika ve Avustralya’da giderek daha yaygın hale gelerek küresel bir sağlık sorunu haline gelmiştir (39). Dünya Sağlık Örgütü’ne göre, dünya nüfusunun yaklaşık %5,2’si ve gebe kadınların %7’sinden fazlası önemli bir varyant taşımakta ve çiftlerin %1,1’i Hb bozukluğu olan çocuklara sahip olma riski altındadır (40).

2.5.1.β-Talasemi

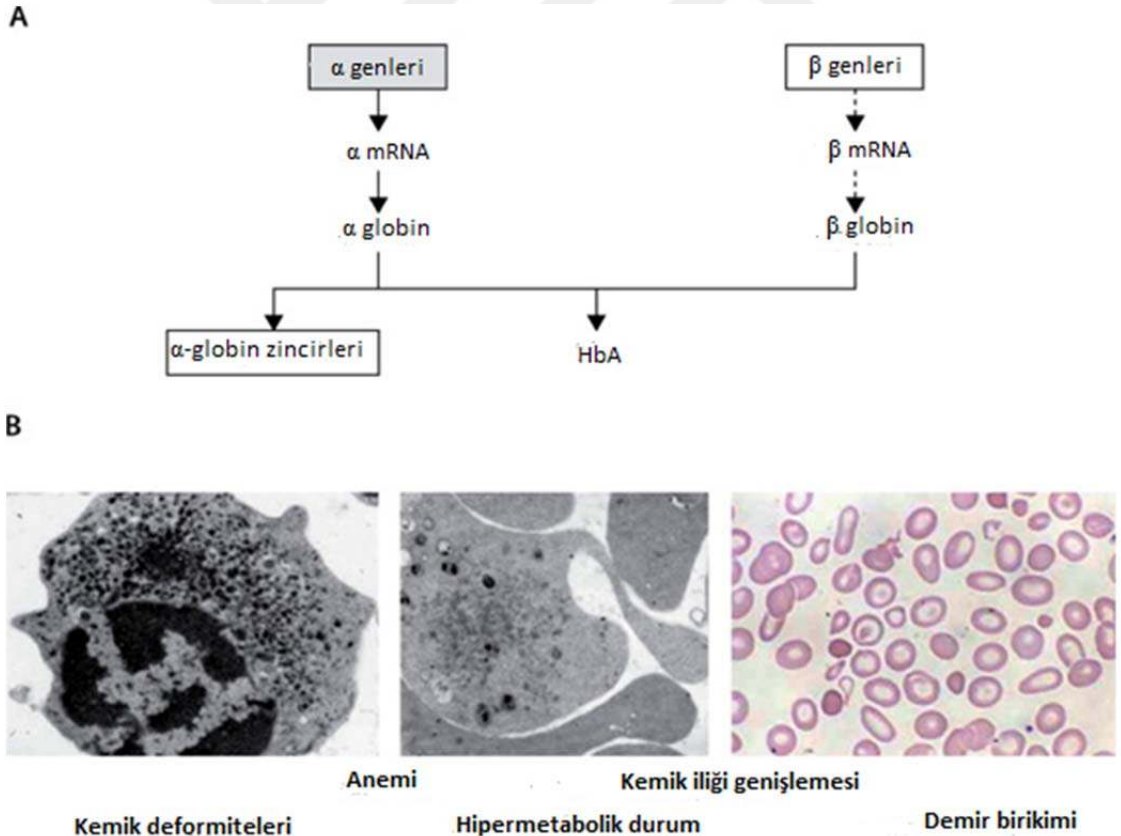
Talasemi (Akdeniz anemisi), ilk kez 1925 yılında, şiddetli anemi, karaciğer-dalak büyümesi, gelişme geriliği ve çocuk çağı ölümleri gözlenen İtalyan çocukları inceleyen Detroitli hekim Thomas Benton Cooley tarafından tanımlanmıştır. Daha sonraları bulan kişiye adanarak Cooley Anemisi olarak isimlendirilmiştir. Talasemi, Akdeniz’i çevreleyen bölgelerde yaşayan insanlarda baskın olarak görüldüğü için kapsayıcı bir terim olarak Yunanca “deniz” anlamına gelen -thalassa ve “kan” anlamına gelen -haemia kelimelerinin birleşiminden oluşan bir kelimedir (41). 1946 yılında talasemiye anormal Hb yapısının neden olduğu bulunmuştur. Her yıl yaklaşık 68.000 çocuk çeşitli talasemi sendromlarıyla doğmaktadır (42).

Talasemiler, Hb molekülünün globin zincirlerinden α -globin ya da β -globin zincirlerinin üretimindeki kusurlardan kaynaklanmaktadır. Globin zincir sentezinin azalması ya da olmaması, α gen kaynaklı ise α -talasemi, β gen kökenli ise β -talasemi olarak adlandırılmaktadır.

β -talasemiler, heterojen otozomal resesif kalıtsal anemilerdir. Dünya genelinde 80 ila 90 milyon kişinin (küresel nüfusun %1,5’i) taşıyıcı olduğu rapor edilmiştir (43). “Cooley anemisi” ve “Akdeniz anemisi” olarak da adlandırılan β -talasemi, klinik olarak 3 sınıfa ayrılır: β -talasemi majör (TM), β -talasemi intermedia (TI) ve β -talasemi minör (44).

2.5.1.1. β -Talaseminin Moleküler ve Hücresel Patolojisi

Gelişimin her aşamasında α - ve β -benzer globin zincirlerinin sentezi denge halindedir. β -globin sentezi normalde iki gen (kromozom 11'in her bir kopyasında bir tane) tarafından kontrol edilir. Bir β genini etkileyen mutasyon (β -talasemi taşıyıcılığı) genellikle klinik olarak önemli bir soruna neden olmazken her iki β geninde zararlı mutasyonları kalıtsal olarak taşıyan hastalarda sıklıkla şiddetli anemi görülür (43). β -talasemideki ana patofizyoloji, yetişkin hemoglobini ($\alpha_2\beta_2$) oluşturmak için α -globin zinciriyle eşleşecek yetersiz β -globin zincirlerinin sentezinden kaynaklanır. Fazla α -globin zincirleri eritroid öncü hücrelerde çökerek diseritropoeze neden olur ve olgun eritrositlerde membran hasarına ve hemolize neden olur (45). Eritropoezdeki bu değişiklikler, uzun vadeli organ hasarına yol açan tüm ikincil bozukluklara (anemi, splenomegali, kemik iliği genişlemesi ve kemik iliği deformiteleri, hipermetabolik durum ve demir birikimi) neden olur (Şekil 5)



Şekil 5. β -talaseminin patofizyolojisi. (A) β -talasemide anormal globin sentezi. (B) Bir eritroblast (solda) ve olgun bir kırmızı hücrede (ortada) α -globin zincirlerinin çökmesini gösteren elektron mikrogramları. Şiddetli β -talasemili hastanın (sağda) tipik kan filmi (18).

β -talaseminin şiddeti, ilişkili olduğu moleküler kusurlar (β^0 - ve β^+ -talasemi kombinasyonları) tarafından belirlenir. Bununla birlikte uzun yıllardır, β -globin genlerinde homozigot olarak özdeş moleküler kusurlara sahip hastaların, neden bu kadar farklı fenotiplere sahip olabildikleri konusu araştırılmaktadır. Bazı hastalar düzenli kan transfüzyonuna ihtiyaç duyarken (β -talasemi majör), diğerleri (bazı β -talasemi intermedia olguları) transfüzyondan bağımsızdır (45). Bu nedenle bu doğal varyasyonun genetik temelini anlaşılmaması, hastalık kliniğinin iyileştirilmesi için önemlidir.

Klinik ve genetik çalışmalar, TM kliniğini hafifletici iki önemli noktayı vurgulamaktadır. Bu noktalardan ilki, α -talaseminin β -talasemi ile birlikte kalıtımı olup hafif fenotip ile ilişkilendirilmiştir. α -talasemi, serbest α -globin zincirlerinin havuzunu azaltarak α -globin zincir çökeltilerini engellemektedir. Bu şekilde eritrosit ve öncüllerine verilen hasar azaltılmaktadır (46). İkincisi ise yetişkinlerde artan fetal γ -globin zincir sentezini arttıracak herhangi bir bozukluğun birlikte kalıtımı, hafif bir fenotip ile ilişkilendirilmiştir. γ -globin zincirleri, fetal Hb ($\alpha_2\gamma_2$) oluşturmak için fazla α -globin zincirlerine ortak olarak tamamen işlevsel Hb üretimini arttırarak serbest α -globin zincirlerinin havuzunu azaltmaktadır (45).

2.5.1.2. β -Talaseminin Epidemiyolojisi

Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), dünya nüfusunun yaklaşık %1,5'inin β -talasemi taşıyıcısı olabileceğini ve her yıl yaklaşık 60.000 bebeğin ciddi β -talasemi hastası olarak doğduğunu belirtmiştir (47). Özellikle Akdeniz, Orta Doğu, Orta Asya, Hindistan ve Güney Çin'de yaygın olarak görülmesi, bu bölgelerde bu mutasyonu taşımanın bir üstünlük olabileceğini düşündürmektedir. Kapsamlı epidemiyolojik çalışmalar, *falciparum malaria* sıtmasının endemik olduğu bölgelerde β -talasemili bireylerin bir şekilde korunduğunu göstermiştir (48). Bu durum, hastalığın doğal seçim yoluyla yüksek taşıyıcı sıklığını açıklasa da sık akraba evliliğinin bu alanların çoğunda talasemi görülme sıklığına katkıda bulunduğu göz ardı edilmemelidir (49).

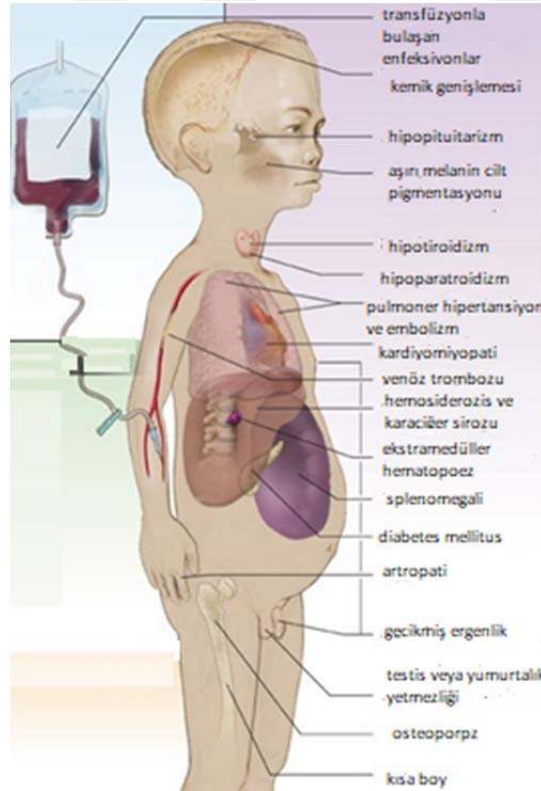
Kuzey Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika'da nadir görülen bu genetik hastalık, artan göç ve seyahatle birlikte yaygın olarak görülmeye başlamış olup bu bölgelerde genetik danışmanlık, doğum öncesi tanı ve yaşam boyu tıbbi bakım hizmetlerine gereksinim artmıştır. Bunlara ek olarak, tanı ve tedavi (çoğunlukla düzenli kan nakli) maliyetlerinin yüksek oluşu gelişmekte olan ülkelerin sağlık bütçelerini

aşmaktadır. Bu durum β -talaseminin mevcut klinik seyrinin hafifletilmesine yönelik çalışmaların önemini bir kez daha vurgulamaktadır (50).

2.5.1.3. β -Talaseminin Klinik Fenotipleri

β -talasemili hastalarda üç tip klinik fenotip bulunmaktadır; majör, intermedia ve minör. Bu fenotipler, etkilenen β -globin genlerinin ekspresyonunu azaltan (β^+ -talasemi) ya da ortadan kaldıran (β^0 -talasemi) 200'den fazla farklı mutasyonla ilişkilidir (51).

β -talasemi majör (TM), β -globin zincirinin, homozigot ya da çift heterozigot mutasyonlarına bağlı olarak yokluğu (β^0) veya azlığı (β^+) ile karakterize otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. Homozigot β^0 -talasemili bireylerin komplikasyonları genellikle yaşamın 3-4 ayı arasında ortaya çıkmaktadır. Bu hastalarda kan transfüzyonu ana tedavi yöntemidir. Ancak mutasyonun türüne ve HbF üretimine bağlı olarak transfüzyon ihtiyacı 2 yaşına kadar ertelenebilmektedir. Yeterli transfüzyon tedavisi almayan bireylerde büyüme geriliği, hepatosplenomegali, hipersplenizm, kemik iliği büyümesine bağlı kemik değişiklikleri, talasemik yüz (maksiller hiperplazi, frontal boşluk) gelişir (52).



Şekil 6. β -talasemi komplikasyonları (53).

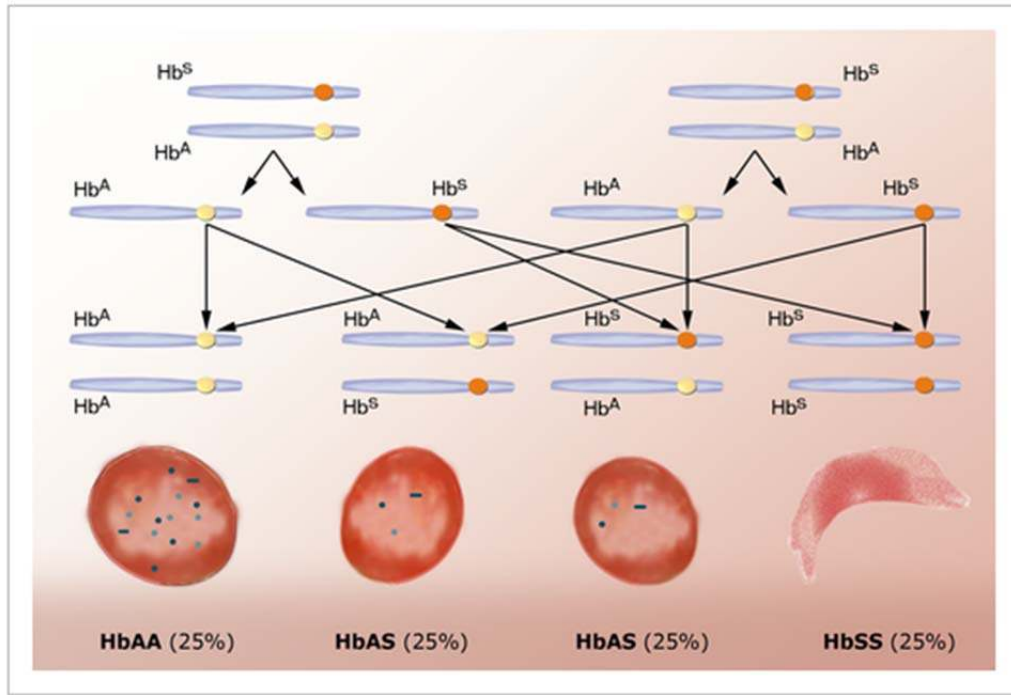
Hastalarda transfüzyon kaynaklı olarak, aşırı demir yüklemesine bağlı komplikasyonlar gelişebilmektedir (Şekil 6). Çocuklarda aşırı demir yüklemesinin komplikasyonları arasında büyüme geriliği ve gecikmiş cinsel olgunlaşma görülmektedir. Transfüzyonun devamıyla birlikte ilerleyen dönemlerde, aşırı demir yüklemesi ile ilgili komplikasyonlar arasında kalp (dilate miyokardiyopati veya nadiren aritmiler), karaciğer (fibrozis ve siroz) ve endokrin bezleri (diabetes mellitus, hipogonadizm ve paratiroid, tiroid, hipofiz ve daha sıklıkla adrenal bezlerin yetersizliği) tutulumu yer alabilmektedir (53).

β -talasemi intermedia, belirgin bir genetik ve klinik heterojenite ile karakterizedir. Klinik fenotip, şiddetli, transfüzyona bağlı TM ve asemptomatik taşıyıcılık durumu arasında değişmektedir. β -talasemi intermedia hastalarında bulunabilecek başlıca klinik komplikasyonlar arasında safra taşları ile birlikte eritroid iliğin hipertrofisi yer almaktadır (54).

β -Talasemi minör (taşıyıcı) hastalar genellikle klinik olarak asemptomatiktir (55).

2.5.2.Orak Hücre Anemisi (OHA)

Normal yetişkin Hb'nin yapısal bir varyantı olan OHA, β -globin zincirinin 6. pozisyonunda tek bir aminoasidin yer değiştirmesi (β 6Glu→Val) sonucu oluşan ve karakteristik HbS üretimiyle sonuçlanan kalıtsal bir hemoglobinopatidir (56). HbS yalnızca tek bir ebeveynden kalıtıldığında, heterozigot (AS) olarak doğan çocuk genellikle asemptomatik bir taşıyıcıdır. Her iki ebeveynden kalıtıldığında ise, homozigot (SS) olarak doğan çocuk OHA hastasıdır (Şekil 7).



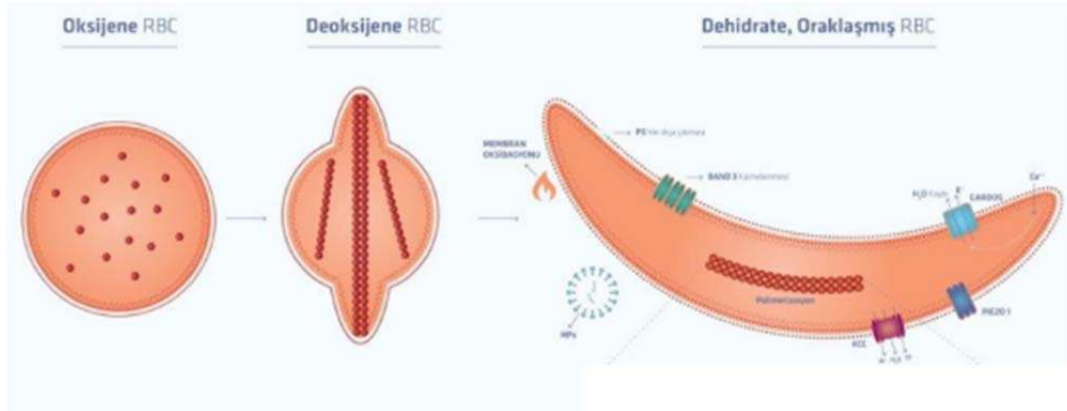
Şekil 7. OHA genetik aktarımı (62).

HbS dünya çapında en yaygın patolojik Hb varyantıdır (57). Bilinen tedavi yöntemleri maliyetli olduğundan, düşük gelirli ülkelerde OHA ile doğan çocukların büyük çoğunluğu 5 yaşından önce ölmektedir. Doğal seçilimin bu mutasyonu insan popülasyonundan temizleyebileceği düşünülse de beklentilerin aksine HbS'nin alel frekansları %15'in üzerinde gözlemlenmektedir (58). 1949 yılında Haldane ve arkadaşları, 1954 yılında Allison ve arkadaşları tarafından, bu tür hastalıkların, heterozigotlarda *Plasmodium falciparum* (sıtma) enfeksiyonuna karşı korunmada sağladığı seçici bir avantajdan kaynaklanabileceği öne sürülmüştür (59, 60). “Sıtma hipotezi” olarak adlandırılan bu hipotez, başlangıçta Akdeniz bölgesinde talasemi ve sıtmanın dağılımı arasındaki coğrafi uyumu açıklamak için önerilmiş, sonrasında Sardunya, Malezya ve Kenya dahil olmak üzere birçok bölgede doğrulanmıştır (61).

2.5.2.1. OHA Mekanizmasının Patofizyolojisi

Eritrositlerdeki oraklaşma, β -globin geninin amino (-NH₂) ucunun 6. konumundaki mutasyon sonucu Adenin bazının [GAG (Guanin-Adenin-Guanin)] Timin bazı [GTG (Guanin-Timin-Guanin)] ile yer değiştirmesiyle Glutamik asit yerine Valin gelmesi sonucu ortaya çıkar (62,63). Valin hidrofobik bir aminoasittir.

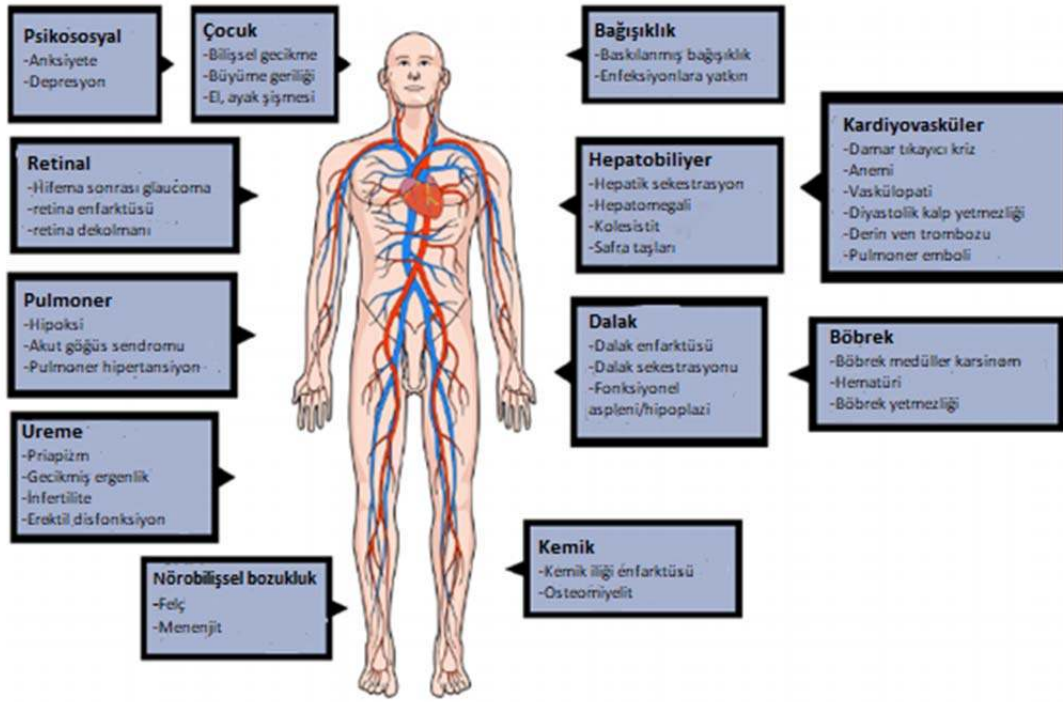
Deoksijenizasyon sırasında, Valin hidrofobikliği Hb molekülünün polimerizasyonunu kolaylaştıran β -zincirlerinin hidrofobik bölgelerini çeker. Sonuç olarak farklı deoksijenize HbS tetramerleri birbirlerine bağlanır. Böylece HbS polimerinin çekirdeklenmesini (kritik çekirdek olarak bilinen kritik kütle) başlatır. Oluşan HbS polimerleri, hücresel sertliği artıran ve eritrosit zarını bozan uzun lifler oluşturmak üzere hızla büyür, bu da eritrosit oraklaşmasına neden olur (64,65). Eritrosit, oksijen ile tekrar karşılaştığında bikonkav şekline geri döner. Ancak polimerizasyonun tekrarlanması, eritrosit membranının kalıcı olarak zarar görmesine neden olduğunda, oraklaşma geri dönüşümsüz olur ve yarı ömrü 12 güne düşer.



Şekil 8. Deoksijene HbS polimerizasyonu ve oraklaşmış eritrosit (66).

2.5.2.2. OHA'nın Yaygın Klinik Komplikasyonları

OHA, kardiyovasküler, üreme, pulmoner, renal, hepatobiliyer gibi vücudun çeşitli sistemlerinde çok çeşitli komplikasyonlara ve nörobilişsel işlev bozukluğuna neden olabilir. OHA'da hastane yatışlarının klinik özelliği ve birincil nedeni vazooklüsif krizlerdir. Bu krizlerin sebebi, oraklaşan hücrelerin artan adhezyonuyla birlikte damarlarda mikrovasküler tıkanıklıklara neden olarak iskemik/reperfüzyon hasarı ile kan akışını bloke etmesidir (67).



Şekil 9. OHA'nın çeşitli komplikasyonları (68).

2.6. Fetal Hemoglobin Düzeyini Etkileyen Mekanizmalar

Fetal Hemoglobin (HbF, $\alpha_2\gamma_2$), fetal hayatın baskın hemoglobini'dir. HbF, HBB gen kümesinin parçası olan iki gen (HBG1, HBG2) tarafından kodlanmaktadır. Bu genlerden embriyonik dönemde iki farklı gama zinciri sentezlenmektedir; 136. pozisyonda Glisin bulunduğu $G\gamma$, Alanin bulunduğu $A\gamma$ sentezlenir (69). Hem fetal hem de yetişkin Hb, α -globin zincirleri içerdiğinden fetalden yetişkin Hb üretimine geçiş, aslında γ -globinin β -globin ekspresyonu ile yer değiştirmesidir. Doğumdan 6 ay sonra HbA, başlıca Hb haline gelir ve HBB'yi etkileyen mutasyonlar, örneğin β -talasemi ve OHA, klinik olarak belirgin hale gelir. Bununla birlikte, yüksek HbF seviyelerinin, OHA ve β -talasemili hastalarda daha hafif hastalık seyri ve daha az komplikasyonla ilişkili klinik faydalar sağladığı bilinmektedir (45). HbF'nin iyileştirici etkisi, HbF sentezinin yeniden etkinleştirilmesi için farmakolojik ve gen transferine yönelik farklı yaklaşımları özendirmiştir. Mevcut olarak kullanılan terapötik ajanlar toksisite ile sınırlıdır ve gen tedavisi halen geliştirilme aşamasındadır (70). HbF üretiminin bu değişkenliğine katkıda bulunan genlerin ve genetik varyantların ve bunların rol aldıkları moleküler mekanizmaların tanımlanması, yeni terapötik hedefler belirlenmesine ve HbF üretimi için yeni farmasötik yaklaşımların geliştirilmesine katkı sağlayabilir (71).

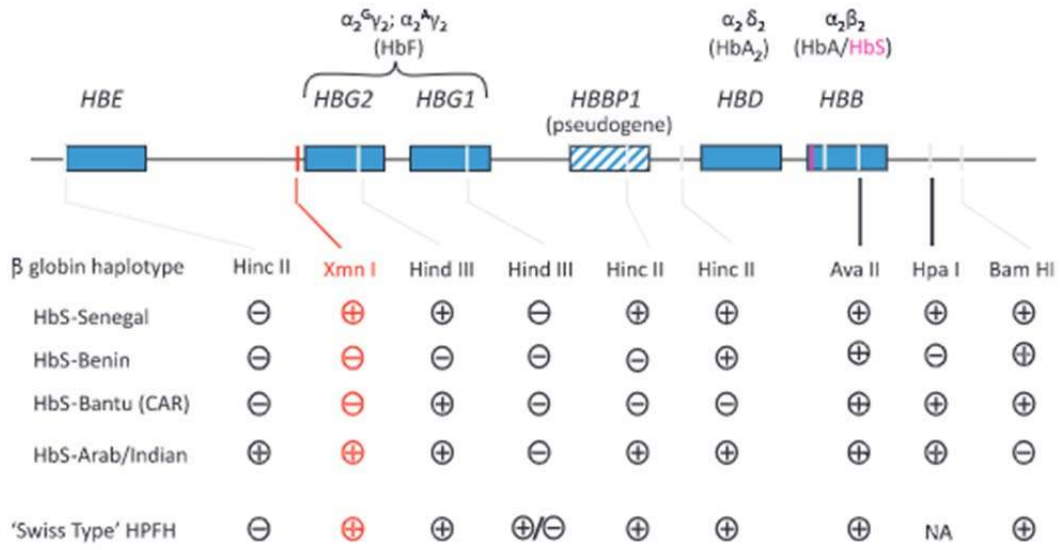
Tüm yetişkinler, hayatları boyunca %1'in altında HbF üretme yeteneğini korur (72). Yetişkinlerde kalan HbF miktarları, eritrositler arasında heterojen bir şekilde dağılır; ölçülebilir miktarlar içerenler F hücreleri olarak adlandırılır. F hücreleri, yetişkin ortalama hücre hacmine (MCV= 80-95 fL) sahip tipik yetişkin hücrelerdir, fetal hücreler ise çok daha büyüktür (MCV ~125 fL). HbF bir F hücresindeki toplam Hb'nin yalnızca bir kısmını oluşturur, Hb'nin çoğunluğu HbA'dır. İkizlerde yapılan çalışmalar, HbF ve F hücresi düzeylerinin 0,89 kalıtım derecesiyle yüksek oranda genetik olarak kontrol edildiğini göstermiştir. Ancak bu genetik kontrolün tek bir lokustan kaynaklanmadığı, bunun yerine farklı kromozomlardan gelen birden fazla gendeki varyasyondan kaynaklandığı düşünülmüştür (73,71). Yetişkin dönemde HbF üretiminin devamı ile betimlenmiş, HbF'in kalıtsal kalıcılığının (Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin: HPFH) bireysel farklılıklar gösterdiği bilinmektedir (73). HPFH'deki bireysel farklılıklar, HBB gen kümesindeki büyük delesyonlardan ya da HBG geninin promotörlerindeki mutasyonlardan kaynaklanır (73). Bu mutasyon ve delesyonlar arasında HBG2 lokusunda Xmn1, kromozom 2 üzerindeki BCL11A ve kromozom 6 üzerindeki HMIP SNP'lerini içeren QTL (Quantitative Trait Loci)'ler yer almaktadır.

2.6.1. Xmn1-HBG2 Polimorfizmi

1985 yılında, HBG2'nin promotorunda bulunan -158 pozisyonundaki C/T polimorfizmi (Xmn1-HBG2 ya da rs7482144 olarak da bilinir.) tanımlanmış olup, HBG2 ekspresyonunu destekleyerek HbF seviyesinin yükselmesine katkıda bulunduğu gösterilmiştir. Sonrasında farklı popülasyonlarla yapılan çalışmalar, Xmn1-HBG2 T alleli ile artan HbF arasındaki ilişkiyi doğrulayarak, OHA ve β -talasemili bireylerde bu polimorfizmin hastalık komplikasyonlarını hafiflettiği gösterilmiştir (74,75). İnsan eritroid progenitör hücreleri üzerinde yapılan çalışmalar, Hidroksiüre tedavisinin γ -globin geninin ekspresyonunu indükleyerek HbF seviyelerini arttırdığını göstermiştir. Ayrıca T allelinin İsviçre tipi HPFH ile ilişkili olduğu belirtilmiştir (76).

Xmn1-HBG2 polimorfizmindeki çoğu tek nokta mutasyonu (SNP), yüksek HbF seviyesi ile ilişkiliyken HbF'in Hidroksiüre tedavisine duyarlılığı, hematopoietik hücreleri stres kaynaklı ölümden koruyan ve eritroid farklılaşmasına iten seçeneysel yollarla düzenlenir (76).

Pansellüler HPFH'ye neden olan ve taşıyıcılarda artan HbF seviyeleri ile ilişkili olan HBG promotörlerindeki diğer SNP'lerin aksine, Xmn1-HBG2 SNP'si, β -talasemi ve OHA taşıyıcıları üzerinde minimum etkiye sahiptir. Ancak ağır anemili bireylerde HbF üretimini klinik şiddeti hafifletebilecek seviyelere önemli ölçüde arttırmada rol oynar (77). Xmn1-HBG2 bölgesi çok sık olduğu için (Avrupalılar, Afrika ve Asyalı Kızılderililer dahil çoğu popülasyon grubunun %30'unda bulunur.) HbF ve F hücreleri düzeylerindeki değişkenliğin önemli bir bölümünü oluşturur.



Şekil 10. Kromozom 11p15.4 HBB gen kümesi. Farklı polimorfik restriksiyon enzim bölgeleriyle HBB kümesinin genomik organizasyonu. Çeşitli bölgelerden β s geni ile ilişkili haplotipler gösterilmiştir. HbS Senegal, HbS-Arab/Indian haplotipleri Xmn1-HBG2 varyantını taşır (71).

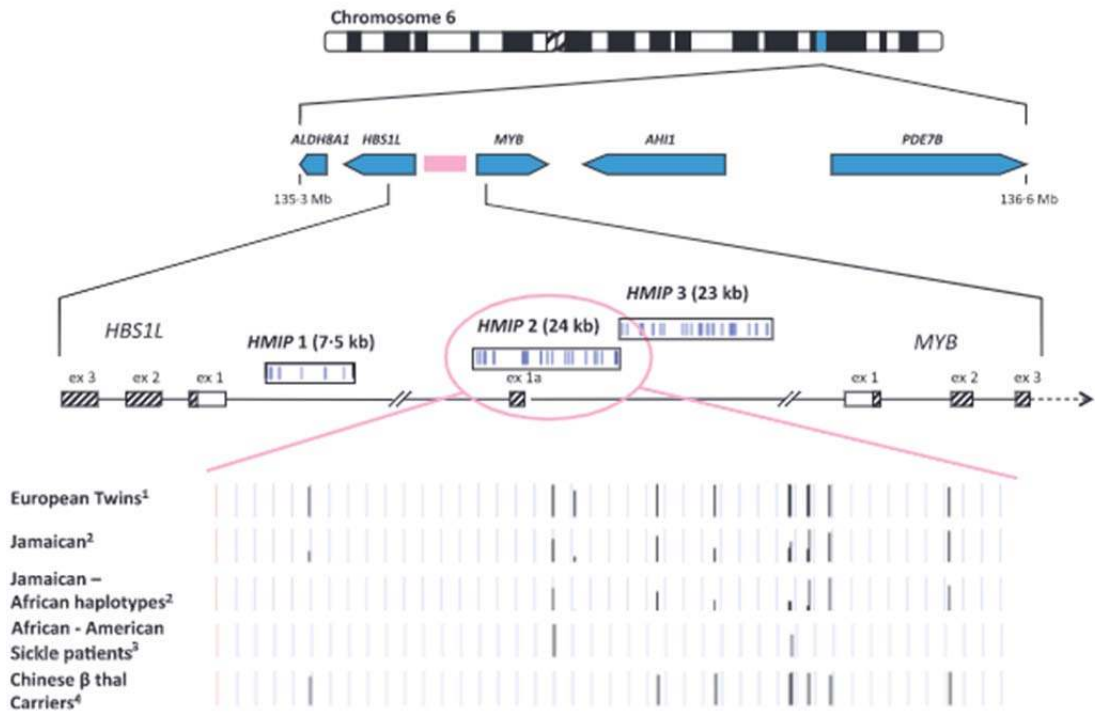
Genotipik analizler, Xmn1-HBG2 bölgesinin toplam F hücresi varyantının %13-32'sini oluşturduğunu göstermiştir (78).

2.6.2. Kromozom 6q23 Üzerinde HMIP Lokusu

Hematopoietik özelliklere sahip SNP'ler, kromozom 6q23'te HBS1L (Hsp70 subfamily B suppressor 1 like gene) ile MYB (MYB protoonkogeni) arasındaki 126 kb'lık intergenik bölgede bulunur (79). HBS1L ve MYB arasında bulunan anlamına gelen HMIP (HBS1L-MYB Intergenik Polimorphism) olarak da adlandırılmaktadır. HbF seviyelerindeki genetik varyasyonları araştıran çalışmalar, bu bölgedeki SNP'lerin bir kısmının, çeşitli etnik kökene sahip β -talasemi ve orak hücre anemili hastalar ve taşıyıcılarında artan HbF değerleriyle ilişkili olduğunu ortaya koymuştur. HMIP

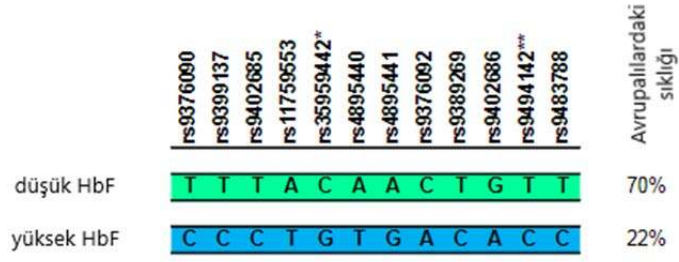
varyasyonları, eritrositlerin sayısını, boyutunu ve genel Hb içeriğini de etkilediği için önemli pleiotropik etkilere sahiptir.

Avrupalılarda yapılan çalışmalarda, HBS1L ve MYB arasındaki ~79 kb'lık bölgedeki farklı varyantların HbF düzeyiyle ilişkili olduğu gösterilmiş olup, bu bölgede HbF ile ilişkili üç ayrı bağıntı dengesizliği (linkage disequilibrium; LD) gösteren varyant blok (HMIP-1, HMIP-2, HMIP-3) tanımlanmıştır (80).



Şekil 11. Kromozom 6q23 üzerindeki HMIP lokusu. HBS1L ve MYB genlerinin 5'kısımlarını kapsayan 126 kb'lık HMIP bölgesinin genomik organizasyonu (71).

Lokusun etkisinin çoğu yaklaşık 24 kb'lık bir bölgeyi kaplayan HMIP-2 bloğundaki mutasyonlardan kaynaklanmaktadır (80). HMIP-2'nin Avrupa, Asya ve Afrika popülasyonlarında gerçekleştirilen çalışmalarında, yüksek HbF ile ilişkilendirilen SNP'lerin, varyasyonlarla tekrarlanan ortak bir SNP grubundan kaynaklandığı görülmüştür (81).



Şekil 12. Avrupalılarda HMIP-2’de HbF ile ilişkili varyantları içeren 2 ana haplotipin birleşimi (82).

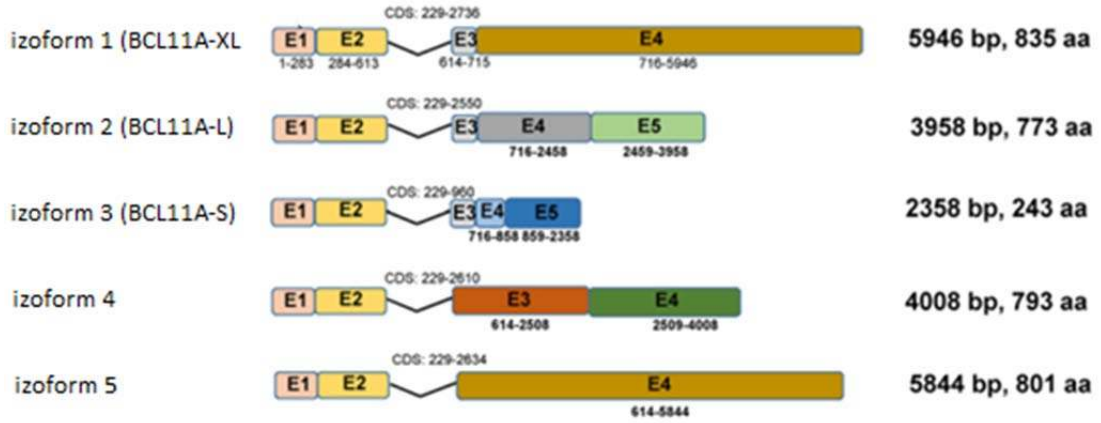
Avrupa popülasyonunda, HMIP-2 üzerine dağılmış 12 SNP alleli ile karakterize edilen tek bir ana haplotipin HbF’yi artıran etkilerden sorumlu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu SNP’ler Afrika kökenli sağlıklı bireylerdeki F hücrelerinin seviyeleri ile de ilişkilendirilmiştir (71).

2.6.3. BCL11A Polimorfizmi

Ekotropik Viral Entegrasyon Bölgesi 9 Homoloğu (EVI9) ya da COUP-TF Etkileşimli Protein 1 (CTIP1) olarak da bilinen BCL11A kromozom 2p16 üzerinde bulunmaktadır. Bu genin aynı ekzon 1 ve 2’yi paylaşan 5 izoformu (BCL11A-XL (izoform 1), BCL11A-L (izoform 2), BCL11A-S (izoform 3), izoform 4 ve izoform 5) rapor edilmiştir. Yetişkin eritroid hücrelerinde BCL11A-L ve BCL11A-XL olmak üzere 2 türü eksprese edilir (83).

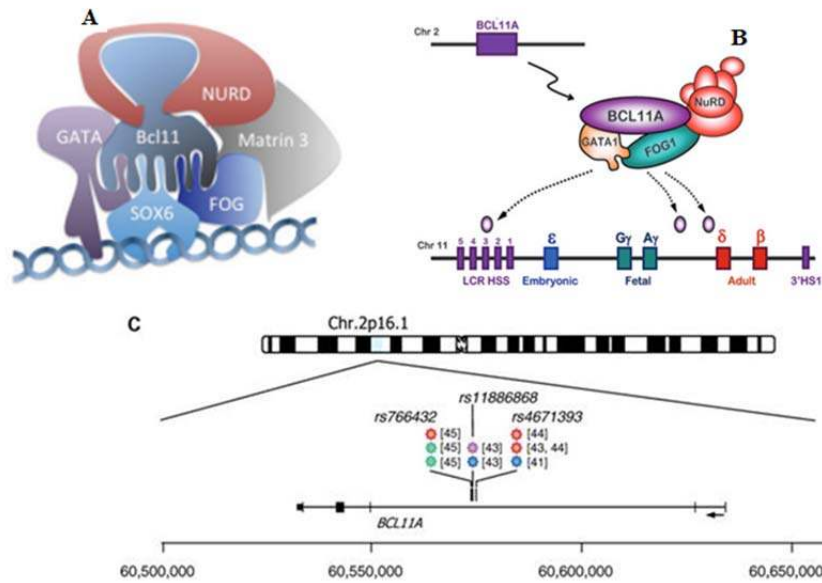
BCL11A geni, DNA’ya bağlanabilen düzenleyici bir C₂H₂ tipi çinko parmak proteini kodlar. Bu protein, kromotin yeniden modellenmesi yoluyla gen ekspresyonunu düzenleyen SWI/SNF (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) kompleksi ile birleşir. Organizma üzerinde pek çok işleve sahip olmasına karşın asıl ilgiyi fetal-yetişkin hemoglobin geçişinde kritik rolü nedeniyle görmektedir.

BCL11A, γ -globini güçlü bir şekilde eksprese eden hücrelerde (fetal karaciğer eritroid hücreleri) kısa varyant proteinler olarak, γ -globin geninin susturulduğu yetişkin dönemde uzun formlar olarak eksprese edilir. Bu bulgular BCL11A’nın insan γ -globin genlerinin baskılanmasında rolü olabileceğini düşündürmektedir (84).



Şekil 13. BCL11A'nın transkript varyantları (83).

BCL11A, iki histon deasetilaz (HDAC1) içeren NuRD (Nucleosome Remodelling Deacetylation) kompleksi, nükleer matris bileşeni Matrin-3, GATA-1 ve FOG-1 eritroid transkripsiyon faktörleri ve DNA'yı bağlayan kromatin bağlantılı bir protein olan SOX-6 ile oluşturduğu kompleks vasıtasıyla γ -globin geninin susturulmasında rol oynar (85).



Şekil 14. BCL11A ile etkileşime giren moleküllerin gösterimi (A) γ -globin gen ekspresyonunun BCL11A tarafından baskılanmasını gösteren diyagram (B) Popülasyon çalışmalarında Kromozom 2 ile en çok ilişkilendirilen SNP'ler (84,85,86).

BCL11A, GATA-1 transkripsiyon faktörünün çinko parmakları aracılığıyla etkileşime girmektedir. Sankaran ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, GATA-1'in N-terminal çinko parmağında mutasyon bulunan bir hastanın, beta talasemi ile oldukça

yüksek HbF seviyeleri fenotipine rastlanmıştır (87). Yine aynı çalışmada, BCL11A'nın yıkılmasının, γ -globin ekspresyonunda ve olgun HbF üretiminde güçlü yükselmelere yol açtığı gösterilmiştir (87).

BCL11A lokusu, bugüne kadar HbF/F hücre seviyeleri üzerinde en güçlü etkiyi göstermiştir. Özellikle Çin ve Taylan kökenli β -talasemili bireylerde HbF ya da F hücre düzeylerini etkilediği gösterilmiştir. Sardunya popülasyonunda, BCL11A lokusunda rs11886868 SNP'sinin C allelleri, yüksek HbF seviyeleri ile ilişkili olduğu bulunmuş olup bu popülasyonda transfüzyona bağlı talasemi majör hastalarına kıyasla talasemi intermedia hastalarının yüksek sıklıkta olduğu saptanmıştır (85-87).



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Gereçler

- Santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5810 R)
- Vorteks (VELP)
- Otomatik pipet (Gilson P-2, P-10, P-20, P-100, P-200, P-1000)
- Eppendorf tüpleri
- Mikroplaka Spektrofotometre (Epoch)
- Elektroforez güç kaynağı (Bio-Rad Power PAC 300)
- Elektroforez tankı (Bio-Rad Sub-Cell)
- UV Transilluminator (Vilber Lourmat)
- PCR (Eppendorf, Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9700)
- Lightcycler 480 II cihazı (Rohe Kat No:5015278)
- Lightcycler 480 multiwell plate 96 (Roche Kat No:4729692)
- Lightcycler 480 Sealing foil (Roche Kat No:4729757)
- Derin dondurucu (Bosch)
- Mikrodalga fırın (Arçelik)
- Saf su cihazı (Millipore)
- GML Spin Purification Column

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Taq Polimeraz (Vivantis, ABD)
- 100 bç “DNA Ladder” (Promega, ABD)
- 25 mM’lık dNTP karışımı (Vivantis, ABD)
- Agaroz (Vivantis, ABD)
- PCR tamponu (Biomers, Almanya)
- Pure Link Genomic DNA Mini Kit (Thermo Kat No: K182002)
- Etanol

- High Pure PCR Template Extraction Kit (Roche)
- Taqman SNP Genotyping MIF-AS1 rs9399137 Assay kit (Thermo Kat No: 4351379)
- Taqman Universal Master Mix II (Thermo Kat No: 4440038)
- rs11886868, 7482144 için tetra-primer ARMS primerleri (Sentebiolab)

3.2. Yöntem

3.2.1. Örnek Toplanması ve İş Akış Şeması

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi (ÇÜTF) Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı'nda takip edilen, yaş aralığı 2-18 olan toplam 100 β -talasemi ve orak hücre anemi tanısı konmuş gönüllü bireylerden EDTA'lı tüplere alınan 5 mL venöz kan soğuk zincir taşıma kurallarına uyularak Tıbbi Biyokimya AD. Laboratuvarına ulaştırılmıştır. Tam kan sayımı çalışılan örneklerde HbF düzeyleri Modifiye Betke yöntemi kullanılarak iki kez çalışılıp ortalama alınarak belirlenmiştir. Hemen ardından EDTA'lı kandan elde edilen DNA ile tetra-primer ARMS yöntemi ve RT-PCR yöntemiyle mutasyon analizleri yapılmıştır.

3.2.2 Kan Örneklerinden DNA Eldesi

Çalışmada kullanılacak kan örneklerinin farklı zamanlarda elde edilmesinden dolayı alınan örnekler ÇÜTF Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda +4 °C'de saklanmıştır. DNA izolasyonu, High Pure PCR Template Extraction Kiti kullanılarak yapılmıştır. İzolasyon işlemi, üretici firmanın protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri -80°C'de bir sonraki işlem için saklanmıştır.

3.2.3. HbF Ölçümü

HbF ölçümünde Modifiye Betke yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemin prensibi, HbF'lerin alkali ortama olan dirençlerine dayanmaktadır. Ölçüm için 0,2 mL hemolizata 3,8 mL siyanür çözeltisi karıştırılıp 10 dakika bekletilir. Bu karışımdan başka bir tüpe 2,8 mL alınır. Üzerine 0,2 mL 1,2 N NaOH, 2 dakika sonra da 2 mL (NH₄)₂SO₄ konup 20 dakika bekletildikten sonra süzülür. Toplam Hb ölçümü için ise 0,4 mL Siyanür çözeltisinden alınıp üzerine 6,75 mL saf su konur. Tüpler 540 nm'de saf suya karşı

okunur. HbF değeri aşağıdaki formüle göre hesaplanır (88). Bu ölçüm her örnek için iki kez tekrarlanmış olup sonuçların ortalaması alınarak HbF düzeyleri belirlenmiştir.

$$\%HbF = \frac{OD_{süzüntü}}{OD_{toplam} \times 10,01} \times 100$$

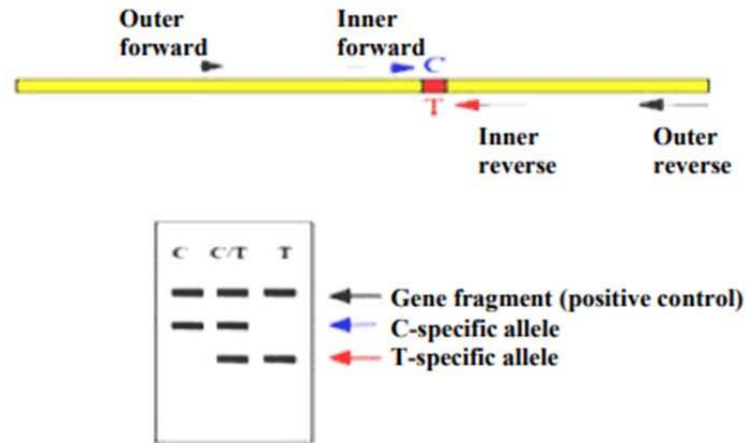
Referans Değerleri: Erişkinde %0,8-2,5

Yeni Doğan %60 kadar olabilir.

3.2.4. Tetra-primer ARMS Yöntemi ile BCL11A ve Xmn1 SNP'lerinin Belirlenmesi

ARMS (Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi), nokta mutasyonları ya da küçük delesyonlar içeren herhangi bir mutasyonu tespit etmek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemde, mutant (nokta mutasyonu bulunan) ve normal (nokta mutasyonu bulunmayan) allellere özgül primerler tasarlanır. İlk tepkimede, normal DNA dizisine özgül primer içerir ve mutant DNA'yı amplifiye edemez. İkinci tepkimede ise, mutant DNA'ya özgül primeri içerir ve normal DNA'yı amplifiye edemez. Sonuç olarak, normal birey yalnızca normal DNA dizisine özgül primerin olduğu tepkimede PCR ürünü oluştururken, homozigot bireyler yalnızca mutant DNA dizisine özgül primerin olduğu tepkimede PCR ürünü oluşturur (89,90).

Tetra-primer ARMS reaksiyonu, tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP) genotiplendirmek için basit ve ekonomik bir yöntemdir. Bu yöntemde, tek PCR tepkimesinde 4 primer kullanılır ve sonuç jel elektroforeziyle okunur (91).



Şekil 15. Tetra-primer ARMS-PCR prosedürü (92).

Tetra-primer ile ARMS yöntemi arasındaki fark, tetra-primer yönteminde biri ilk döngülerde daha yüksek, diğeri kalan döngülerde daha düşük olan 2 farklı “annealing” sıcaklığı ile tek tepkimede gerçekleşmesidir. Bir diğerk fark ise tetra-primer ARMS yönteminde mutasyon, allel spesifik primerlerin ortasında yer alır ve reaksiyonda 4 primer kullanılır iken, ARMS yönteminde mutasyon allel spesifik primerin 3' terminalinde yer alır (91).

ARMS yönteminde kullanılan kimyasal bileşenler Tablo 1’de verilmiştir.

Tablo 1. ARMS yönteminde kullanılan kimyasal bileşenler.

<u>Kimyasal</u>	<u>Miktar</u>
%100 Dimetil Sülfoksit	2,5 µL
pH 8,8 Tris HCl tamponu	2,5 µL
dNTP karışımı	1,0 µL
Forward primer	1,0 µL
Reverse primer	1,0 µL
Saf su	15,9 µL
gDNA	1,0 µL
Taq polimeraz (5 U/µL)	0,1 µL
Toplam hacim	25,0 µL

ARMS yönteminde kullanılan primer dizileri Tablo 2’de verilmiştir.

Tablo 2. Xmn1 ve BCL11A SNP’leri için kullanılan primer dizileri (92).

	Xmn1	BCL11A
“Forward Out”	TGGAGCTACAGACAAGAAGG	CAAAACCTTTTCTGTGTTCTCG
“Reverse Out”	GCCTCACTGGATACTCTAAGAC	ACGTCCACCAGTCTAGAAAG
“Forward In”	ATGCAAATATCTGTCTGAAACGTTT	AGAATCATTCTGCTCTGGGA
“Reverse In”	TGGGTGGAGTTTAGCCATGA	ATCGTCTTTTGTGTTTAATTCGTC

3.2.5. PCR Protokolü

ARMS yönteminde çoğaltılmak istenen bölgenin DNA uzunluğuna ve primer içeriğine bağlı olarak protokolde süre ve sıcaklık değişmektedir. Çalışmamızda uygulanan protokol Tablo 3'te gösterilmiştir.

Tablo 3. BCL11A ve Xmn1 için PCR protokolleri.

SNP'ler	Sıcaklık	Süre		Döngü Sayısı
BCL11A	94 °C	1 dk	Denatürasyon	1 döngü
	94 °C	30 sn	Denatürasyon	30 döngü
	61 °C	1 dk	Bağlanma	
	72 °C	3 dk	Uzama	
	+4 °C	Sonsuz		
Xmn1	94 °C	3 dk	Denatürasyon	1 döngü
	94 °C	30 sn	Denatürasyon	30 döngü
	57 °C	45 sn	Bağlanma	
	72 °C	30 sn	Uzama	
	+4 °C	Sonsuz		

3.2.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi, DNA moleküllerinin ayrımı, tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir yöntemdir. Destek maddesi olarak genellikle agaroz tercih edilir. Agaroz jelde DNA molekülleri, katottan anoda doğru göç ederler. Moleküllerin göç hızı, jele yüklenen kontrol DNA ile değerlendirilir.

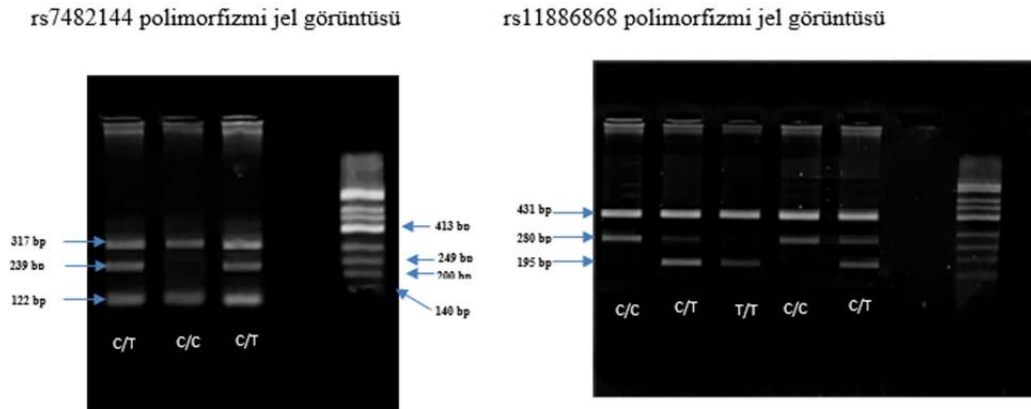
Çözeltiler

- 5x TBE tamponu pH 8,0 (Tris baz 54,0 gr, Borik asit 27,5 gr, EDTA [0,5 M, pH 8,0] 20 mL. Bir miktar saf suda çözülerek 1 L'ye tamamlanır.
- 0,5x TBE tamponu (elektroforez için) 5x TBE tamponundan 10 mL alınarak saf su ile 200 mL'ye tamamlanır.
- %1,5'luk Agaroz jel hazırlamak için 1,5 gr Agaroz, 100 mL 0,5xTBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritilir. Musluk altında hafif soğutulduktan sonra jel kaplarına dökülür.

- Yükleme tamponu için 0,25 gr bromfenol mavisi, 15 gr ficoll, 0,5x TBE tamponu ile 100 mL'ye tamamlanır.
- Etidyum Bromür çözeltisi: Etidyum bromür 5 µg/µL olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanır.

3.2.7. Yöntem

Yukarıda yapımı anlatılan %1,5'luk agaroz jel, elektroforez kaplarına baloncuk oluşturmayacak şekilde yavaşça dökülür, örnek yükleme kuyucuklarını oluşturmak için elektroforez tırağı yerleştirilir ve jel soğumaya bırakılır. Soğuduktan sonra 0,5x TBE tamponuyla doldurulmuş elektroforez tankına yerleştirilir. Jel içerisindeki tarak çıkarılır ve kuyucukların tamponla dolması sağlanır. Elde edilen PCR ürünlerinden 5 µL alınıp bir miktar yükleme tamponuyla karıştırılır ve teker teker kuyucuklara yüklenir. Yüklenen örnekler 150 V, 400 mA'da 40 dk yürütülür. Yürüme bittikten sonra jel elektroforez tankından alınır ve etidyum bromür ile 1 dk boyanır. Etidyum bromürden çıkarılan jel, saf suda 30 dk bekletilerek boya artıklarından arındırılır. UV ışık altında DNA fragmanlarının fotoğrafı çekilerek yorumlanır (Şekil 16).



Şekil 16. XmnI ve BclII polimorfizmlerinin agaroz jel görüntüleri.

3.3. RT-PCR Yöntemi ile HMIP SNP'sinin Belirlenmesi

RT-PCR (Real Time-PCR, Gerçek Zamanlı PCR), 1980'lerde Kary Mullis tarafından geliştirilen ve araştırmacıların belirli DNA parçalarını bir milyar kattan fazla amplifiye etmesine olanak tanıyan PCR yöntemine dayanmaktadır. RT-PCR'ın temel amacı, çok küçük bir miktar olsa bile bir numunedeki belirli nükleik asit dizilerini kesin olarak ayırt etmek ve ölçmektir. RT-PCR, bir numunedeki belirli bir hedef diziyi

çoğaltır ve ardından moleküler işaretleyiciler (problar) kullanarak amplifikasyon sürecini izler. Amplifikasyon sırasında, 5' ucunda bulunan floresan boyanın (reporter) yaptığı ışıma, 3' ucunda bulunan söndürücü boya (quencher) tarafından soğurulur. Amplifikasyon devam ederken reporter, polimeraz enziminin aktivitesiyle bulunduğu yerden koparılaraq quencher'dan uzaklaşır ve bu şekilde ışıma vermeye devam eder. Döngü sonunda yapılan ölçümle diziden koparılan reporter'ın yaptığı ışıma miktarı tespit edilerek oluşan ürün miktarı kantitatif olarak tayin edilir (93).

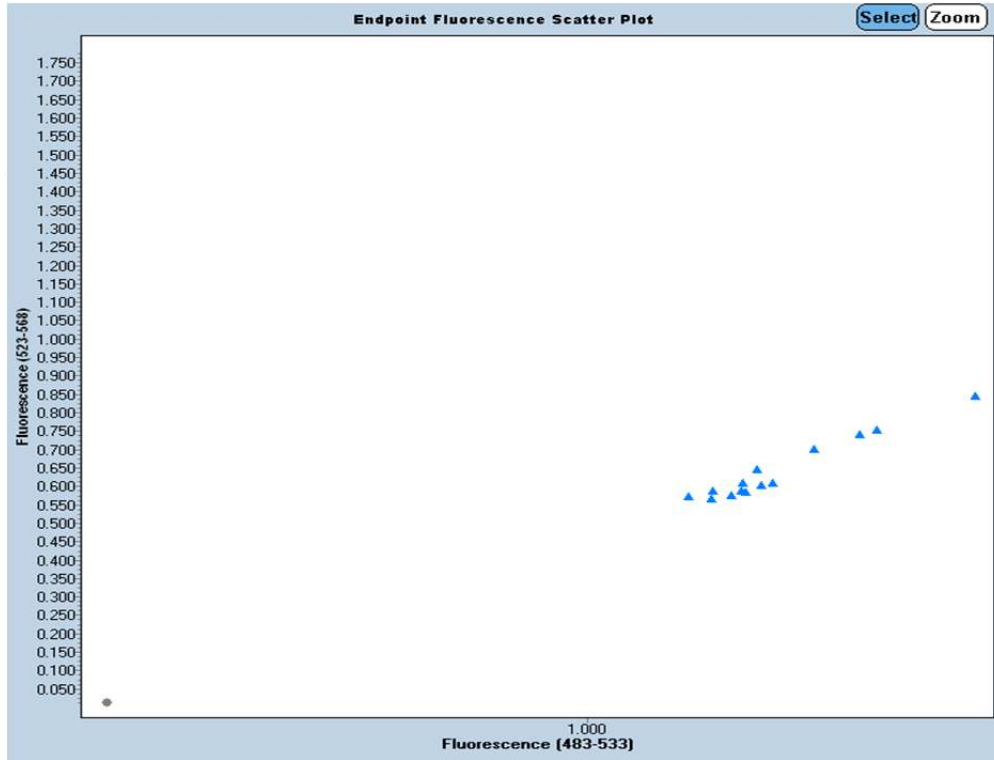
3.3.1. Reaksiyon Karışımının Hazırlanması

H ₂ O	4,5 µL	} karışım
Master Mix	10 µL	
Primer-prob Assay	0,5 µL	
DNA	5 µL	

Multiwell plate içerisine her bir örnek için 15 µL karışım ve karışımın üzerine 5 µL DNA eklenip RT-PCR cihazına yüklenmiştir. rs93399137 polimorfizm analizi için PCR koşulları Tablo 4'de verilmiştir.

Tablo 4. HMIP için PCR koşulları.

PCR aşamaları		Hedef ısı °C	Bekleme süresi (sn)
Denatürasyon		95	600
Amplifikasyon (40 döngü)	Denatürasyon	95	15
	Anneal/extend	60	60
Soğutma		40	30



Şekil 17. HMIP polimorfizmi için RT-PCR grafiği.

Allelik analiz için moleküler işaretleyici (prob) olarak Taqman prob (reporter: FAM, quencher: VIC) kullanılmıştır. HMIP polimorfizmi RT-PCR grafiği Şekil17’de gösterilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Hastalarda Xmn1, BCL11A ve HMIP Polimorfizmlerinin (SNP)

Dağılımları

Örneklem grubu, 10 OHA'lı ve 90 β -talasemili 2-18 yaş arasında toplam 100 çocuk hastadan oluşmakla birlikte bunların 30'u kız ve 70'i erkektir.

Çalışmamız için seçilen 100 örnekte üç polimorfik nokta için bireysel baz değişimleri belirlenmiş olup HbF değerleri ile birlikte Tablo 5'de verilmiştir.

Örneklem grubunun HbF değerlerine bakıldığında en yüksek %77,6 ve en düşük değer %0 olarak ölçülmüştür. Bu değerler hastalık bazında değerlendirildiğinde β -talasemilerde en düşük %0, en yüksek %77,6 olarak HbS'li hastalarda ise en düşük %0,7, en yüksek %12,2 olarak ölçülmüştür.

Yüzde cinsinden HbF miktarları yaşlarla birlikte ele alındığında β -talasemilerde 14 yaşındaki M.T.'nin %77,6 ile en yüksek HbF değerine sahip olduğu, 18 yaşındaki S.A. ve yine 18 yaşındaki S.G.'nin 0 ile en düşük HbF değerine sahip oldukları saptanmıştır. HbS'li hastalarda ise 11 yaşındaki İ.O.'nun %0,7 ile en düşük HbF değerine, 14 yaşındaki M.A.'nın ise %12,2 ile en yüksek HbF değerine sahip olduğu saptanmıştır (Tablo 5).

Tablo 5. Örneklem grubunun 3 polimorfik nokta için sahip oldukları alleler ve HbF değerleri (E: Erkek, K: Kadın).

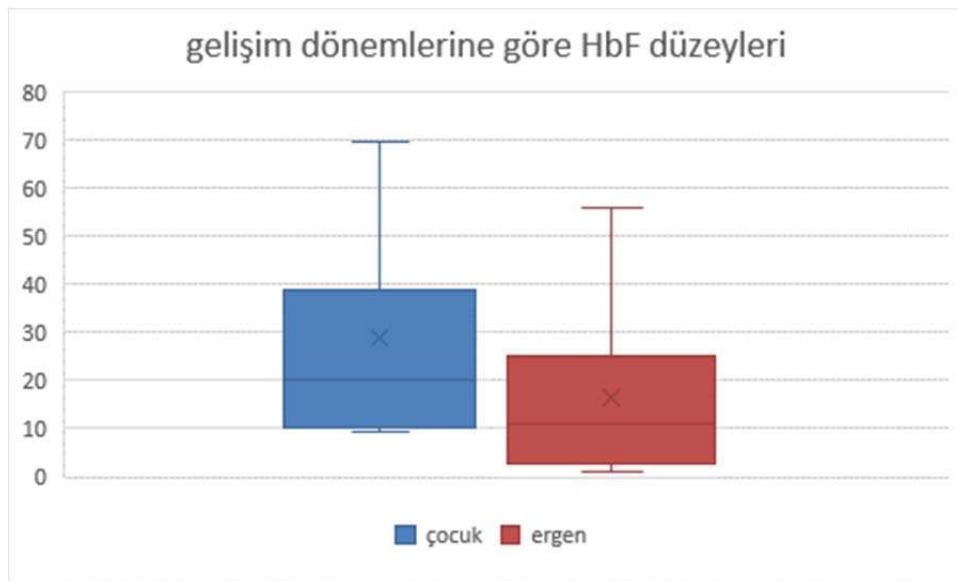
Hasta	Cinsiyet/Yaş	Hemoglobinopati Tipi	Xmn1	BCL11A	HMIP	HbF (%)
B.E.	E/2	β -Tal	C/C	T/T	T/T	18,46
H.A.	K/14	β -Tal	C/C	C/C	T/T	40,04
S.B.	E/10	β -Tal	C/C	C/T	T/T	1,8
S.M.	E/7	HbS	C/T	C/T	T/T	10,0
İ.B.	E/15	β -Tal	C/C	C/C	T/T	1,8
Z.C.	E/18	β -Tal	C/T	C/T	T/T	1,0
A.M.	K/6	β -Tal	C/T	C/T	T/T	69,4
H.T.	E/13	β -Tal	C/T	C/C	T/T	2,2
M.M.	E/6	HbS	C/C	C/C	T/T	6,7
S.M.	E/7	β -Tal	C/C	C/C	T/T	16,4
E.S.	K/12	β -Tal	C/C	C/C	T/T	3,8
Z.K.	E/9	β -Tal	C/T	C/T	T/T	15,5
B.Y.	K/15	β -Tal	C/C	C/C	T/T	13,6
Y.C.	K/5	β -Tal	C/T	T/T	T/T	38,8
B.A.	E/8	β -Tal	C/T	C/C	T/T	10,2
C.O.	E/7	β -Tal	C/C	C/C	T/T	6,1
B.İ.	K/7	β -Tal	C/C	C/C	T/T	1,7
U.Ş.	E/8	β -Tal	C/C	C/C	T/T	1,7
E.R.	K/3	β -Tal	C/T	T/T	T/T	38,1
D.Y.	K/14	β -Tal	C/C	C/C	T/T	1,8
K.Ç.	E/15	β -Tal	C/T	T/T	T/T	28,0
M.Y.	E/10	β -Tal	C/T	C/T	T/T	9,4
M.B.	E/11	β -Tal	C/C	C/T	T/T	16,3
S.E.	E/5	β -Tal	C/C	C/C	T/T	3,9
A.M.	E/4	β -Tal	C/C	C/C	T/T	24,2
O.A.	E/16	β -Tal	C/C	C/C	T/T	2,2
M.A.	E/14	HbS14	C/C	C/C	T/T	12,2
E.D.	E/10	β -Tal	C/C	C/T	T/T	1,4

Hasta	Cinsiyet/Yaş	Hemoglobinopati Tipi	Xmn1	BCL11A	HMIP	HbF (%)
A.H.	E/10	β-Tal	C/C	C/T	T/T	2,1
A.D.	K/17	β-Tal	C/C	C/T	T/T	1,3
N.S.	K/6	HbS	C/T	C/T	T/T	3,6
U.A.	E/8	HbS	C/T	C/T	T/T	11,2
Z.M.	K/8	β-Tal	C/C	C/C	T/T	0,9
E.Y.	K/13	β-Tal	C/C	C/C	T/T	10,2
C.A.	E/15	β-Tal	C/C	C/C	T/T	1,7
S.D.	K/12	β-Tal	C/C	C/C	T/T	1,1
S.E.	E/11	β-Tal	C/C	C/T	T/T	3,2
F.G.	E/18	β-Tal	C/C	C/C	T/T	9,7
S.A.	K/18	β-Tal	C/C	C/C	T/T	0,0
İ.O.	K/11	HbS	C/C	C/C	T/T	0,7
S.S.	K/17	β-Tal	C/C	C/C	T/T	0,5
V.A.	E/13	β-Tal	C/C	C/T	T/T	3,7
A.E.	E/5	β-Tal	C/C	T/T	T/T	5,7
M.Ç.	E/14	β-Tal	C/C	T/T	T/T	8,9
S.A.	E/16	β-Tal	C/C	T/T	T/T	37,0
O.K.	E/13	β-Tal	C/C	T/T	T/T	11,4
E.Z.	K/12	HbS	C/C	C/T	T/T	6,4
M.T.	E/14	β-Tal	C/T	T/T	T/T	77,6
A.H.	E/6	β-Tal	C/C	C/C	T/T	4,4
A.Ş.	E/3	β-Tal	C/T	T/T	T/T	76,2
R.M.	E/8	β-Tal	C/C	C/T	T/T	32,6
F.C.	E/11	β-Tal	C/C	C/T	T/T	2,8
G.Y.	K/18	β-Tal	C/T	C/T	T/T	18,8
H.M.	E/17	β-Tal	C/T	C/T	T/T	3,0
O.S.	E/16	HbS	C/C	C/C	T/T	1,4
N.D.	E/11	β-Tal	C/C	C/C	T/T	3,6
B.O.	K/16	β-Tal	C/C	C/C	T/T	3,6
S.Ö.	K/12	β-Tal	C/T	C/C	T/T	4,4

Hasta	Cinsiyet/Yaş	Hemoglobinopati Tipi	Xmn1	BCL11A	HMIP	HbF (%)
E.P.	E/11	β-Tal	C/T	T/T	T/T	56,0
K.M.	E/8	β-Tal	C/C	T/T	T/T	17,8
A.G.	E/14	β-Tal	C/C	C/C	T/T	3,4
M.K.	E/13	β-Tal	C/C	C/C	T/T	7,6
U.Ö.	E/18	β-Tal	C/C	C/C	T/T	3,4
M.T.	E/16	β-Tal	C/C	C/T	T/T	2,6
H.T.	E/6	β-Tal	C/C	C/C	T/T	27,2
M.G.	K/2	β-Tal	C/C	C/C	T/T	13,4
A.Y.	E/15	β-Tal	C/T	C/C	T/T	20,4
F.M.	K/12	β-Tal	C/C	C/C	T/T	12,2
K.Y.	E/15	β-Tal	C/T	C/T	T/T	60,4
S.E.	K/10	β-Tal	C/C	C/T	T/T	3,6
R.A.	K/7	β-Tal	C/C	C/C	T/T	3,4
N.Y.	E/7	β-Tal	C/C	C/C	T/T	1,0
D.H.	E/5	β-Tal	C/T	C/T	T/T	20,0
M.D.	E/17	β-Tal	C/C	C/C	T/T	3,6
C.S.	E/17	β-Tal	C/C	C/T	T/T	4,2
İ.G.	E/10	β-Tal	C/T	C/T	T/T	2,0
E.D.	E/10	β-Tal	C/C	C/C	T/T	19,3
M.G.	E/16	β-Tal	C/C	C/C	T/T	7,8
A.S.	E/2	β-Tal	C/C	C/C	T/T	48,4
E.G.	K/3	β-Tal	C/C	C/C	T/T	24,4
H.Ü.	E/14	β-Tal	C/T	C/T	T/T	7,2
E.E.	E/14	β-Tal	C/T	C/T	T/T	22,4
S.M.	K/5	HbS	C/C	C/C	T/T	1,8
H.K.	E/13	β-Tal	C/C	C/C	T/T	20,4
H.C.	K/17	β-Tal	C/C	C/C	T/T	2,2
Ç.A.	E/10	β-Tal	C/C	C/T	T/T	7,4
H.H.	E/7	β-Tal	C/C	C/C	T/T	40,0
S.G.	E/18	β-Tal	C/C	C/C	T/T	0,0

Hasta	Cinsiyet/Yaş	Hemoglobininopati Tipi	Xmn1	BCL11A	HMIP	HbF (%)
M.N.	E/15	β -Tal	C/C	T/T	T/T	17,8
M.Ş.	E/5	HbS	C/C	C/C	T/T	3,4
A.H.	E/10	β -Tal	C/C	C/T	T/T	3,6
İ.A.	E/13	β -Tal	C/C	C/C	T/T	1,4
M.H.	E/14	β -Tal	C/T	C/C	T/T	4,5
N.G.	K/10	β -Tal	C/T	C/T	T/T	18,0
H.H.	E/8	β -Tal	C/C	C/C	T/T	1,0
F.K.	E/12	β -Tal	C/C	T/T	T/T	15,0
B.T.	E/8	β -Tal	C/C	T/T	T/T	5,2
N.C.	K/18	β -Tal	C/C	T/T	T/T	7,2
A.A.	E/14	β -Tal	C/C	C/C	T/T	4,0
E.D.	K/2	β -Tal	C/C	C/C	T/T	10,2

Örneklem grubunda ergenlik çağında olan (DSÖ'ye göre 10-19 yaş aralığı) (109) 65 çocuğun HbF değerleri cinsiyetlerine göre kıyaslandığında erkeklerin HbF değerlerinin kadınlardan yüksek olduğu görülmüş olup en yüksek değerler 14-16 yaş aralığında izlenmiştir. Gelişim dönemlerine göre HbF düzeyleri kıyaslandığında çocukluk çağı HbF düzeyleri daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 18. Örneklerin gelişim dönemlerine göre HbF düzeylerinin kıyaslaması.

Üç bölgenin allelerine bakıldığında Xmn1 bölgesi rs7482144 SNP sonucuna göre hastaların 74’ü “C/C” ve 26’sı “C/T” alleli, BCL11A bölgesi rs11886868 SNP sonucuna göre, hastaların 54’ü “C/C”, 30’u “C/T” ve 16’sı “T/T” alleli, HMIP lokusu rs9399137 SNP sonucuna göre çocukların 100’ü (tamamı) “T/T” alleli taşımaktadır. Her üç polimorfik noktanın bireylere göre yüzdesel dağılımı Tablo 6’da verilmiştir.

Tablo 6. Her üç polimorfik noktanın yüzdesel allel dağılımları

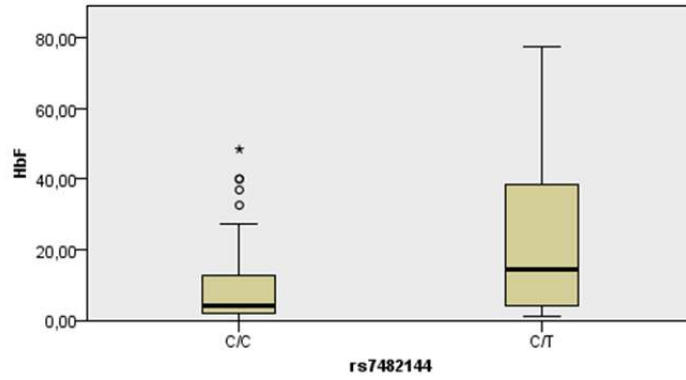
Polimorfizmler	Allel	Yüzde dağılım
Xmn1	C/C	%74
	C/T	%26
	T/T	–
BCL11A	C/C	%54
	C/T	%30
	T/T	%16
HMIP	C/C	–
	T/C	–
	T/T	%100

Her üç polimorfik noktaya ait allel frekansları ve ortalama HbF değerleri Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7. Örneklem grubunda Xmn1, BCL11A ve HMIP polimorfizmlerinin allel dağılımları, allel frekansları.

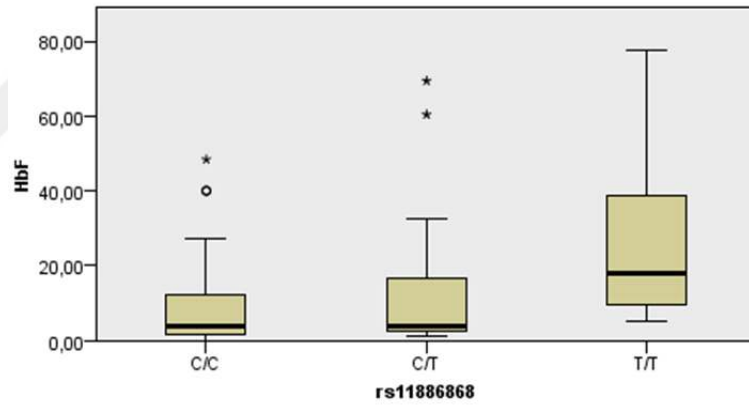
Polimorfizmler	Mutasyon	Allel frekansları	%HbF Ort±SD
Xmn1	C/C	C: 0,87 T: 0,13	9,12 ± 10,9
	C/T		23,6 ± 24,7
	T/T		–
BCL11A	C/C	C: 0,69 T: 0,31	8,9 ± 11,05
	C/T		11,7 ± 16,5
	T/T		33,2 ± 24,06
HMIP	C/C	C: – T: 1	–
	T/C		–
	T/T		13,08 ± 17,03

Xmn1 polimorfizmi için “C/C”, “C/T” ve “T/T” allellerinin HbF düzeyleri Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır (Şekil 18). Bunun sonucunda C/T alleli taşıyan bireylerin HbF seviyelerinin yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).



Şekil 18. Xmn1 polimorfizmine ait allelerin HbF düzeyleriyle ilişkisi bakımından karşılaştırması.

BCL11A polimorfizmi için “C/C” alleli “C/T” ve “T/T” allelerinin HbF düzeyleri Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırılmıştır (Şekil 19). Bunun sonucunda “T/T” alleli taşıyan bireylerin HbF seviyelerinin “C/C” ve “C/T” allelerine kıyasla yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,05$).



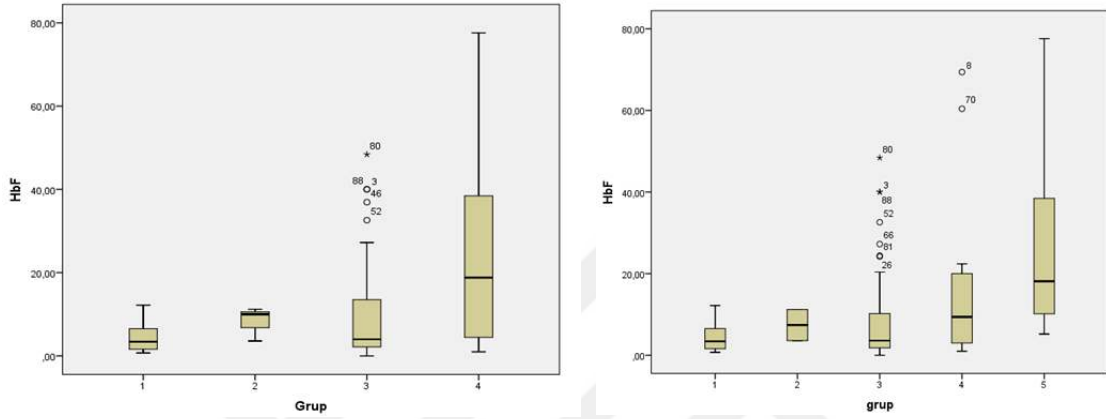
Şekil 19. BCL11A polimorfizmine ait allellerin HbF düzeyleriyle ilişkisi bakımından karşılaştırması.

HMIP polimorfizminde örneklem grubunda sadece “T/T” alleli taşımaktadır.

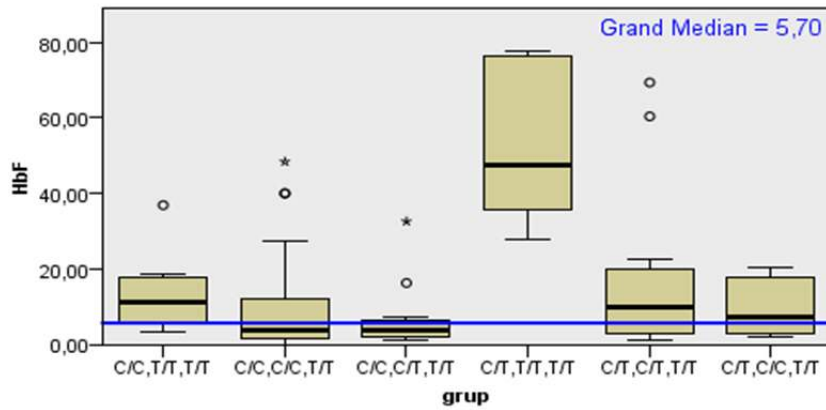
β -talasemili ve OHA’lı bireylerde Xmn1 bölgesinin HbF düzeylerine etkisi Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldığında β -talasemi C/T genotipine sahip bireylerin HbF düzeyleri OHA hastası bireylerden daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,01$) (Şekil 20).

β -talasemili ve OHA’lı bireylerde BCL11A bölgesinin HbF düzeylerine etkisi Kruskal-Wallis testi kullanılarak karşılaştırıldığında β -talasemi T/T genotipine sahip bireylerin HbF düzeyleri OHA hastası bireylerden daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0,01$) (Şekil 20).

Xmn1, BCL11A ve HMIP polimorfizmlerinin farklı alleleri Kruskal-Wallis testi kullanılarak kendi aralarında kıyaslandığında Xmn1 polimorfizminin “C/T” allelini, BCL11A polimorfizminin “T/T” allelini ve HMIP polimorfizminin “T/T” allelini bir arada taşıyan hastalarda HbF seviyelerinin yüksek oranda ($p<0,01$) bulunduğu saptanmıştır (Şekil 21).

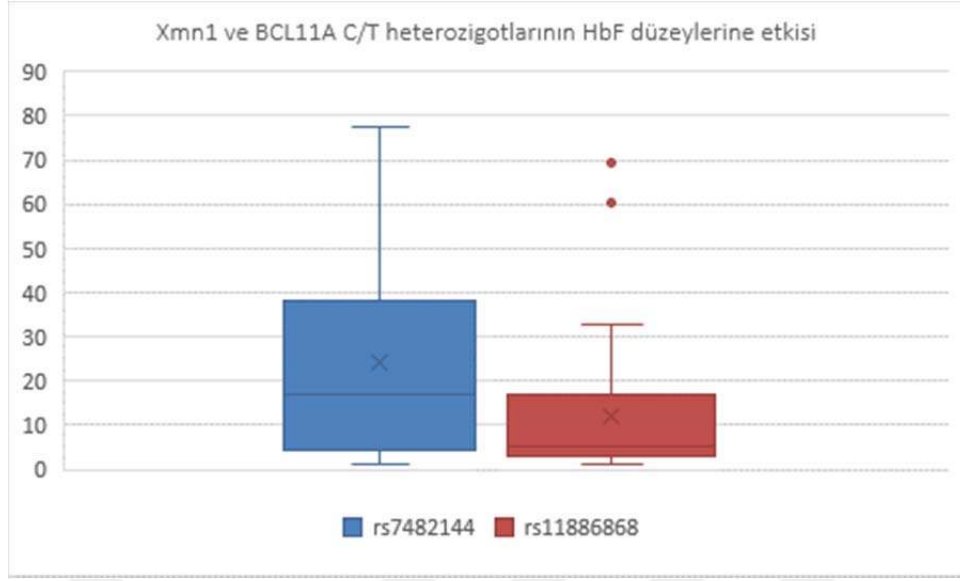


Şekil 20. Soldaki grafik Xmn1 polimorfizminin OHA’lı ve β -talasemili hastalarda HbF düzeylerine etkisinin karşılaştırılmasını göstermektedir. Sağdaki grafik BCL11A polimorfizminin OHA’lı ve β -talasemili hastalarda HbF düzeylerine etkisinin karşılaştırılmasını göstermektedir (grup1: HbS C/C genotipi, grup 2: HbS C/T genotipi, grup 3: β -talasemi C/C genotipi grup 4: β -talasemi C/T genotipi, grup 5: β -talasemi T/T genotipi temsil etmektedir.)



Şekil 21. Her üç polimorfik noktaya ait bireysel baz değişimlerinin HbF düzeyleriyle ilişkisinin karşılaştırması.

Xmn1 ve BCL11A bölgelerinin %HbF Ort $\pm$ SD değerlerine bakıldığında her iki grupta ortak olarak bulunan C/T heterozigotlarının HbF değerlerine etkisinin yüksek olduğu görülmüştür (Tablo 7). Bu iki bölgenin C/T heterozigotlarının HbF düzeyine etkileri kıyaslandığında Xmn1 bölgesinin HbF düzeyine daha yüksek etki ettiği saptanmıştır (Şekil 22).



Şekil 22. Xmn1 ve BCL11A C/T heterozigotlarının HbF düzeylerine etkisinin karşılaştırması.

5. TARTIŞMA

β -talasemi, β -globin zincirlerinin sentezinde azalma (β^+) veya yokluğuyla (β^0) karakterize olan ve dünyada yaygın olarak görülen genetik bir hastalıktır. β -talasemi majör, Türkiye'yi de içine alan Akdeniz Ülkeleri, Orta Doğu, Orta Asya, Hindistan, Güney Çin, Uzak Doğu, Kuzey Afrika kıyıları ve Güney Amerika'da yaygındır. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2004 yılı verilerine göre Dünya'da β -talasemi taşıyıcılık oranı ülkelere göre değişmekle birlikte %5,1 olup göç ve evliliklerle dünyanın hemen her ülkesinde görülmektedir. Türkiye'de β -talasemi majörün bölgelere göre ortalama insidansı %2,1'dir (42-44). β -globin gen bölgesinde şimdiye kadar 200'den fazla mutasyon bildirilmiş olup bunların büyük çoğunluğunu nokta mutasyonları oluşturmaktadır.

β -talasemi klinik şiddetine göre; β -talasemi majör, β -talasemi taşıyıcı ve β -talasemi minör olarak üç gruba ayrılır. β -talasemi taşıyıcıları genellikle klinik olarak asemptomatik iken transfüzyon bağımlısı β -talasemi majörlü hastalarda ciddi anemi görülür. β -talasemi' de klinik şiddet α -ve β -globin zincirleri arasındaki dengesizliğin ölçüsüyle ilişkilidir (45,46). Bu hastalar transfüzyona bağlı aşırı demir birikimini önlemek için şelasyon tedavisi almaktadır. Özellikle çocuklarda büyüme ve gelişmenin normal seyirde olması için, Hb derişimi minumum 9,5-10,5 g/dL seviyede tutulması önerilmektedir. Bazı çocuklarda kemik iliği nakli kûratif tedavi sağlayabilmekle birlikte bunun dışında kalıcı tedavisi yoktur.

Orak hücre anemisi, beta globin zincirinin amino (-NH₂) ucunda altıncı pozisyondaki glutaminin valin aminoasidi ile yer değıştirmesiyle; GAG (Guanin-Adenin-Guanin) bazlarının yerine GTG (Guanin-Timin-Guanin) baz dizisinin gelmesiyle oluşur (61,63). Bu hastalığa sahip bireylerde yeterli oksijen olmadığı durumlarda eritrositlerin orak şeklini alarak polimerize olduğu ve katı kristal halinde çöktüğü gözlemlenir. Orak şeklini alan hücreler kan akışkanlığını azaltır ve özellikle küçük damarlarda tıkanıklığa sebebiyet vererek çeşitli doku ve organlarda hasar meydana gelmesine neden olur (64,65).

β -globin gen kümesinin bir parçası olan neredeyse aynı iki γ -globin geni (HBG1, HBG2) tarafından kodlanan HbF yenidoğanlarda %70-90 aralığında bulunur ve 12 ay sonra %1'in altına düşerek yetişkin dönemde bu oranı korur. 1958 yılında

tanımlanmış olan normalin üzerinde HbF seviyelerinin yetişkinliğe kadar devam etmesine neden olan HPFH, HBB gen kümesindeki delesyonlar veya nokta mutasyonları ile tanımlanmaktadır (73). Farklı noktalarda tanımlanan mutasyonlar, γ -globin genleri ve bunların lokus kontrol bölgeleri (LCR) ve transkripsiyon faktör kompleksleri gibi düzenleyici elemanları arasındaki etkileşimleri farklı şekilde değiştirebilmektedir. Bu durum, bu mutasyonların heterozigot taşıyıcılarında ve HbS geni ile bileşik heterozigotlarda HbF seviyelerindeki geniş varyasyonu açıklayabilir. Nedenleri bilinmemekle birlikte, yüksek HbF ile ilişkili olan ve HbF üretimini modüle eden QTL'lerin minör allellerinin kalıtımının bir sonucu olabileceği düşünülmektedir (94). Bu QTL'ler arasında HBG2 lokusunda XmnI (-158 C-T polimorfizmi) bölgesindeki rs7482144, kromozom 2 üzerinde BCL11A bölgesindeki rs11886868 ve kromozom 6 üzerinde HMIP bölgesindeki rs9399137 SNP'leri yer almaktadır.

Kromozom 11 üzerinde bulunan γ -globin geninin promotöründeki XmnI polimorfizmi, yüksek HbF ile ilişkili olup HbF varyansının ~%13-32'sinden sorumlu olduğu çalışmalarda gösterilmiştir (73,95). Etki mekanizması kesin olarak bilinmemekle birlikte, yetişkin hücrelerde γ -globin gen ekspresyonunu susturan transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını azaltarak sürece dahil olduğu düşünülmektedir (96). Svalingam ve ark. Malezya popülasyonunda XmnI polimorfizmi için yaptıkları çalışmada, β -talasemi majörlü bireylerde C/T allelinin yüksek HbF değerleriyle ilişkili olduğunu hatta o popülasyonda C/T polimorfizmine sahip bireylerin kan transfüzyonuna ihtiyaç duymadıklarını saptamışlardır (97). Örneklem grubumuzda Svalingam'ın çalışmasına benzer şekilde C/T allelinin HbF düzeylerini arttırdığı saptanmıştır. Ancak bizim örneklemlerimiz sürekli transfüzyona ihtiyaç duymaktadır. Bu fark, HbF düzeyiyle ilişkilendirilen farklı bölgelerdeki SNP'lerin sürece dahil olduğunu düşündürmektedir. Belki de popülasyonumuzda Malezya'dan farklı olarak BCL11A dışında ya da belki ona eşlik eden farklı γ -globin susturucu mutasyonların bulunabileceğini düşündürmektedir. Bashir ve ark. Pakistanlı β -talasemi intermedialı hastalarda, β -talasemi majörlü hastalara kıyasla "T" allelinin ve dolayısıyla ilişkili HbF düzeyinin (~%8) daha yüksek olduğunu belirtmektedir (98). Dadheech ve ark. β -talasemi majör ve OHA'lı hastalarda yaptıkları çalışmada, her iki grupta da "T/T" genotipine sahip bireylerin HbF düzeylerini "C/T" ve "C/C" genotipine sahip bireylere kıyasla daha yüksek bulmuştur. Ayrıca yine aynı çalışmada OHA hastalarında, yüksek

oranda HbF taşıyan “TT” genotipine sahip bireylerin sıklığının, β -talasemi hastalarına kıyasla önemli ölçüde yüksek olduğu, sonuç olarak da Xmn1 bölgesinin HbF ekspresyonu üzerindeki etkisinin, OHA durumunda β -talasemiden daha fazla olduğu gösterilmiştir (99). Örneklem grubumuzdaki β -talasemili ve OHA’lı hastalarda “T/T” alleli hiç saptanmazken, “C/T” alleli 10 hastada 3 gibi düşük bulunmuştur. Her iki genotipin, HbF düzeyiyle ilişkisine bakıldığında ise heterozigot “C/T” genotipine sahip bireylerin HbF düzeyinin homozigot “C/C” alleleline (wild type) kıyasla daha yüksek olduğu saptandı ($p<0,05$). Bu veriler Svalingam ve ark. çalışmasına uyumlu olmakla birlikte Xmn1 bölgesinde “T” allelinin HbF artışına etki ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte Bashir’in çalışmasının aksine Xmn1 bölgesinin HbF düzeyi üzerindeki etkisinin, β -talasemide OHA’dan daha fazla olduğu saptanmıştır ($p<0,01$).

Bashir ve ark. hidroksiüre ile tedavi edilen β -talasemi hastalarında, Xmn1 polimorfik bölgesinde T allelinin varlığı ile daha iyi tedavi yanıtı arasında anlamlı bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir (98). Çalışmamıza katılan 90 β -talasemili hastadan 26’sında “T” alleli bulunmasına karşın bu hastaların ilaç kullanım bilgilerine sahip olunmadığı için ilaç yanıtları hakkında çıkarımda bulunulamamaktadır. Ancak örneklem grubumuzda “T” alleleline sahip bireylerin bu mutasyona sahip olmayan bireylerle benzer şekilde (ayda 1 kez) transfüzyona ihtiyaç duymaları hastalığın klinik seyrine hiç ya da çok az katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

Xmn1 polimorfizmi popülasyonlarda yüksek HbF ile ilişkilendirilmiş olsa da bazı bireyler, Xmn1 polimorfizminin doğal tipi (wild type) olan “C/C” genotipini taşıdıkları halde HbF düzeylerinin yüksek seyrediyor oluşu bu sürece farklı gen bölgelerinin de dahil olduğu fikrini akla getirmektedir. Kromozom 6q23 üzerindeki HMIP lokusu ve kromozom 2 üzerindeki BCL11A bölgesinde tanımlanan SNP’lerin de, sürece dahil olduğunu gösteren çalışmalar bu üç bölgenin birlikte HbF seviyelerindeki varyansın %50’sine etki ettiğini göstermektedir.

BCL11A geni kromozom 2p16 üzerinde bulunur ve eritroid transkripsiyon faktörlerine bağlanarak γ -globin geninin baskılanmasında rol oynar (100). Pek çok çalışma, eritroid hücrelerde BCL11A’nın baskılanmasının, HbF ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (101). β -globin gen lokusundaki bazı delesyonlar, HPFH olarak adlandırılan bir durumda güçlü HbF üretimine izin vermektedir. BCL11A bölgesinde küçük delesyonlara sahip hastalarda yapılan son çalışmalar, bu tür hastaların tipik

olarak %15-30 arasında değişen önemli HbF kalıcılığına sahip olabileceğini göstermiştir (102). KLF1'in *in vivo* olarak baskılanmasının, yetişkin eritroid progenitörlerinde BCL11A ekspresyonunda azalmaya neden olduğu ve dolaylı olarak β -talasemi ve OHA hastalarında HbF üretimini aktive ettiği gösterilmiştir (103). Ayrıca BCL11A'nın γ -globin ifadesinin bastırılmasıyla eksprese edildiği bilinmektedir. BCL11A bölgesinde pek çok SNP tanımlanmış olup, çalışmamızda da araştırdığımız, yüksek HbF ile ilişkilendirilen rs11886868 yüksek ilgi görmektedir.

Dadheec ve ark. β -talasemi majörlü ve OHA'lı hastalarda BCL11A polimorfizmine yönelik çalışmalarında her iki grupta da BCL11A gen polimorfizminin genotipik ve allelik frekansları arasındaki anlamlı farkla birlikte ortalama HbF seviyelerinde de önemli farklılıklar saptamışlardır (99). Ayrıca BCL11A SNP "CC" alleli taşıyan bireylerin HbF değerlerinin, her iki grupta da diğer allel frekanslarına kıyasla yüksek olduğu saptanmıştır. Çalışmamızda ise hem β -talasemili hem de OHA'lı hastalarda allelik frekansları karşılaştırıldığında, her iki grupta da "C" allel frekansı yüksek bulundu. Ayrıca Dadheec ve ark. aksine "T" allele sahip bireylerin HbF düzeylerinin daha yüksek olduğu görüldü ($p < 0,05$). Ancak çalışmamızda şaşırtıcı şekilde BCL11A bölgesinde aynı mutasyona sahip olup HbF düzeyleri arasında ciddi farklar (örnek Z.C.'nin HbF'si 1 iken örnek A.M.'nin HbF'si 69,4) olan örneklerin mevcut olduğu görülmüştür. Bu hastaların HMIP ve Xmn1 bölgelerindeki mutasyonların da aynı olması bu bölgelerde farklı SNP'lerin de sürece dahil olabileceğini düşündürmüştür. Bu nedenle BCL11A bölgesindeki farklı polimorfizmlere bakılıp birlikte yorumlanması önem arz etmektedir. HbF'i yüksek olan "T" alleleline sahip bireylerde ise HbF düzeylerinin yüksekliği, Xmn1 ve HMIP bölgelerindeki nokta mutasyonlarından da kaynaklanıyor olabilir. Chen ve ark. Çin popülasyonunda BCL11A polimorfizmi için yaptıkları çalışmada β -talasemili hastalarda sırasıyla $4,47 \pm 3,42$ "CC" ve $2,79 \pm 2,21$ "CT" allellerini saptamış ve "CC" allelini taşıyan bireylerde HbF seviyelerini daha yüksek bulmuştur (104). Bizim bulgularımız ise sırasıyla $8,9 \pm 11,05$ "CC" ve $11,7 \pm 16,5$ "CT" olmakla birlikte Chen ve ark. aksine "CT" polimorfizminin yüksek HbF değerleriyle ilişkili olduğu saptanmıştır.

HMIP, kromozom 6q'da 126 kb'lık bir intergenik bölgedir ve eritroid özellik ile ilişkili SNP'leri içermektedir. HBS1L'nin eritrosit gelişimindeki rolü tanımlanamamış olsa da MYB'nin eritroid hücrel proliferasyon/farklılaşma dengesinin kontrolünde ve

HbF seviyelerini düzenlemede rol aldığı bilinmektedir (98). MYB modülasyonu yoluyla HbF ekspresyonu için iki olası mekanizma önerilmiştir: İlki, düşük MYB seviyelerinin eritroid farklılaşmasını hızlandırarak, ağırlıklı olarak HbF'yi sentezleyen eritroid progenitör hücrelerin salgılanmasına yol açan eritroid farklılaşma kinetiğinin değiştirilmesi yoluyla dolaylı etki. İkincisi, γ -globin genlerinin KLF1 ve diğer represörlerinin aktivasyonu yoluyla doğrudan etki (106).

Cardoso ve ark. Kuzey Brezilya'da yaptıkları çalışmada, HMIP lokusunda bulunan rs9399137 polimorfizminde 'C' allelinin HbF düzeyini etkileyen majör allel olduğunu bildirmiştir (107). Buna karşın Rujito ve ark. β -talasemili bireylerde HMIP polimorfizmiyle yüksek HbF düzeyleri arasında ilişki saptamamıştır (108). Çalışmamızda "T" (wild type) allel majör olarak saptanmıştır. Bu durum hem düşük hem de yüksek HbF düzeyine sahip bireylerde aynı olarak saptanan bu allelin HbF düzeyiyle ilişkisinin bulunmadığını düşündürmektedir. Gruplardaki HbF seviyesinin yüksekliği/düşüklüğü, Xmn1 ve BCL11A bölgelerinin biri ya da her ikisinin ortak etkisinden kaynaklanıyor olabilir.

Xmn1, BCL11A ve HMIP QTL'lerine ait SNP bölgelerini birlikte değerlendirdiğimizde yüksek oranda "T" alleli taşıyan bireylerin HbF düzeylerinin yüksek olduğunu söyleyebiliriz. Ancak HMIP lokusu "T" allelinin doğal tip oluşu ve örneklerin tamamında aynı allelin bulunmasından dolayı farklı allellerle karşılaştırma yapılamaması, "T" allelinin HbF seviyelerine olan etkisine ilişkin yorum yapmayı zorlaştırmaktadır. BCL11A bölgesinde literatüre uyumlu şekilde "T" majör allel olarak saptanmış olup HbF düzeylerine Xmn1 bölgesiyle birlikte etki ettiğini söyleyebiliriz. Ayrıca BCL11A bölgesindeki mutasyonlar gama-globine doğrudan değil de bir kompleks vasıtasıyla etki ettiğinden bu bölgeyle ilgili yorum yapabilmek için daha detaylı araştırma yapmak gerekmektedir. Xmn1 bölgesi γ -globin üzerine direkt etki ettiğinden kendi örneklem grubumuz için HbF düzeylerinin yüksek oluşuyla majör olarak ilişkili olduğu yorumunu yapabiliriz.

Yenidoğan dönemde HbF düzeyleri %60-95 iken yetişkin dönemde bu oran %1'in altına düşmektedir. Örneklem grubumuz yaşları bakımından kıyaslandığında 14 yaşındaki M.T.'nin %77,6, 11 yaşındaki E.P.'nin %56,0 ve 15 yaşındaki K.Y.'nin %60,4 gibi yaşlarına göre yüksek HbF düzeylerine sahip oldukları görülmüştür (Tablo 5). Her üç örneğin mutasyonları incelendiğinde 3 polimorfik noktada da T alleli

bulundurduğu saptanmış olup Dadheec ve ark., Svalingam ve ark., Bashir ve ark. çalışmalarını destekleyerek özellikle Xmn1 ve BCL11A lokuslarında “T” allelinin bulunmasının yetişkin dönemde HbF düzeyinin yükselmesinde önemli etkilere sahip olabileceğini düşünmekteyiz (97-99).

Örneklem grubumuzda ergenlik döneminde bireylerin de bulunduğunu göz önüne alarak HbF değerleri kıyaslandığında erkeklerin (özellikle 14-16 yaş aralığı) HbF düzeylerinin daha yüksek olduğunu saptadık. Ancak cinsiyet faktörünün HbF düzeyine olan etkisiyle ilgili bir çalışma bulunmadığından örneklem grubumuzda bu sonucun rastgele olduğunu düşünmekteyiz.

Şekil 18’e bakıldığında çocukluk dönemindeki örneklerin HbF değerlerinin ergenlik dönemindeki bireylere kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Bu farkın araştırdığımız lokus bölgelerindeki mutasyonların dışında sürece dahil olan çeşitli transkripsiyon faktörlerinden veya BCL11A’nın farklı moleküllerle birlikte oluşturduğu NURD kompleksinden kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz. Sankaran ve ark. BCL11A’nın bağlandığı GATA-1’in N-terminal çinko parmağında bulunan bir mutasyonun HbF değerlerini yükselttiğini göstermişlerdir (85). Belki de buna benzer şekilde örneklem grubumuzdaki çocukluk çağındaki bireylerde HbF değerinin yüksekliği böyle bir mutasyondan kaynaklanıyor olabilir.

Tablo 5’de yaşı, hastalığı, BCL11A ve HMIP mutasyonları aynı olup Xmn1 mutasyonları farklı olan bireyler incelendiğinde Xmn1 bölgesinde C/T alleli bulunduran bireylerin C/C alleli bulunduran bireylere kıyasla HbF değerlerinin yüksek olduğu saptanmıştır. Bu örnekler bize bölgemizde Xmn1 bölgesindeki mutasyonun HbF değerleri üzerinde majör etkiye sahip olduğunu düşündürmektedir.

Şekil 22’de de görüldüğü gibi Xmn1 ve BCL11A mutasyonları birlikte incelendiğinde her ikisinde de C/T allelerini taşıyan bireylerin C/C allellerini taşıyan bireylere kıyasla daha yüksek HbF seviyelerine sahip olduğu görülmüştür. Ayrıca Şekil 21’de BCL11A ve Xmn1 bölgesindeki mutasyonları aynı olan grup 3 ve grup 5 kıyaslandığında Xmn1 bölgesinde “C/T” alleli bulunduran bireylerin HbF değerlerinin daha yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Buradan hareketle aslında örneklem grubumuzda Xmn1 bölgesindeki mutasyonun BCL11A ve HMIP bölgelerindeki mutasyonlara kıyasla HbF düzeylerine majör etkide bulunduğunu düşünmekteyiz.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, β -talasemi ve OHA hastalarının kliniğini iyileştiren HbF düzeylerine etki ettiği düşünülen Xmn1, BCL11A ve HMIP SNP'lerindeki mutasyonlar taranarak bu hastaların HbF düzeylerine etkisine bakılmıştır. Çalışmamıza ÇÜTF Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı polikliniğine başvuran 10 OHA ve 90 β -talasemili 100 çocuk dahil edildi. Bireylerden alınan venöz kanlardan DNA elde edilip Xmn1, BCL11A ve HMIP polimorfizmleri incelendi.

1. Xmn1 bölgesi rs7482144 SNP'si "C/C" genotipi %74, "C/T" genotipi ise %26 oranında bulundu. Xmn1 bölgesinde "C" alleli (allel frekansı 0,87) majör allel olarak, "T" alleli ise (allel frekansı 0,13) minör allel olarak saptandı.
2. Örneklem grubunda BCL11A SNP'si "C/C" genotipi %54, "C/T" genotipi %30 ve "T/T" genotipi %16 olarak bulundu. BCL11A bölgesinde "C" alleli (allel frekansı 0,69) majör allel olarak "T" alleli ise (allel frekansı 0,31) minör allel olarak saptandı.
3. HMIP lokusunda örneklem grubumuzun tamamı "T/T" (wild type) genotipinde tespit edildi. Bu bölgede başka alleler tespit edemediğimiz için HbF düzeylerine olan etkisini tek başına yorumlamak zorlaşmaktadır. İleriki çalışmalarda bu bölgenin HbF düzeyine etkisini tartışabilmek için lokus üzerindeki farklı SNP'ler de çalışılmalıdır.
4. Xmn1 polimorfizminin β -talasemili "C/T" genotipli hastaların HbF düzeylerini OHA'lı bireylere kıyasla daha çok etkilediği saptandı ($p<0,01$)
5. BCL11A polimorfizminin β -talasemili "T/T" genotipli hastaların HbF düzeylerine OHA'lı bireylere kıyasla daha çok etkilediği bulundu ($p<0,01$).
6. Örneklem grubumuzda üç bölge polimorfizmleri bir arada değerlendirildiğinde Xmn1 "C/T" BCL11A "T/T" ve HMIP "T/T" allelerini birlikte taşıyan bireylerin HbF düzeylerinin daha yüksek olduğu bulundu ($p<0,01$).
7. Üç nokta birlikte değerlendirildiğinde bölgemizde Xmn1'in HbF değerleri üzerinde majör etkiye sahip olduğu görülmüştür.
8. Tezde çalışılan her üç bölgedeki polimorfizmler dışında var olan diğer polimorfizmlerin çalışılamaması önemli eksikliğimizdir. Özellikle HMIP

lokusunda birden fazla polimorfizmin incelenmesi, bu bölgedeki polimorfizmlerin HbF düzeyiyle ilişkisini kavramak açısından önem taşımaktadır. Bu nedenle çalışmamızın bir sonraki aşamasında, her polimorfizm bölgesi için birden çok SNP bölgesine bakılması, bölgemizde HbF düzeyini etkileyen mutasyonların aydınlatılması açısından önemli katkı sağlayacaktır.

9. İleriki çalışmalarda bu bölgelerdeki SNP mutasyonlarıyla sürece dahil olan farklı transkripsiyon faktörlerinin birlikte incelenmesi bölgemizde HbF değerlerine etki eden mekanizmaların aydınlatılması açısından önem arz etmektedir.



KAYNAKLAR

- 1 **Koury M J, Ponka P.** New Insights into Erythropoiesis: The Roles of Folate, Vitamin B12 and Iron. *Annual Review of Nutrition*, **2004**;24:105-31.
- 2 **Dzierzak E, Philipsen S.** Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2013**;3(4):a011601.
- 3 **Thompson M, Mcinnes R R, Willard H F.** Genetics in Medicine. 5th.Ed., Philadelphia: Sauenders Comp., **1991**:247-270.
- 4 **Duman A A.** Anemiye Multidisipliner Yaklaşım. İstanbul: Akademisyen Yayınevi, **2020**:1-5.
- 5 **Dong A C, Rivella S.** Gene Addition Strategies for β -Thalassemia and Sick Cell Anemia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **2017**;1013:155-176.
- 6 **Mosca A, Paleari R, Leone D, Ivaldi G.** The Relevance of Hemoglobin F Measurement in the Diagnosis of Thalassemias and Related Hemoglobinopathies. *Clinical Biochemistry*, **2009**;42:1797-1801.
- 7 **Sabath D E.** Molecular Diagnosis of Thalassemias and Hemoglobinopathies. *American Journal of Clinical Pathology*, **2017**;148(1):6-15.
- 8 **Ferreira T D.** A Model of Genetic Guidance for Hemoglobinopathy Patients and Laboratory Diagnosis of Family Members as Educational and Preventive Measures. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*, **2012**;34(5):339-44
- 9 **Carden M A, Fasano R M, Meier E R.** Not All Red Cell Sick The Same: Contributions of the Reticulocyte to Disease Pathology in Sick Cell Anemia. *Blood Reviews*, **2020**;40:100637.
- 10 **Nader E, Romana M, Connes P.** The Red Blood Cell-Inflammation Vicious Circle in Sick Cell Disease. *Frontiers in Immunology*, **2020**;11:454.
- 11 **Musallam K M, Sankaran V G, Cappellini M D, Duca L, Nathan D G, Taher A T.** Fetal Hemoglobin Levels and Morbidity in Untransfused Patients with β -thalassemia Intermedia. *Blood*, **2012**;119(2):364-7
- 12 **Lettre G, Bauer D E.** Fetal Hemoglobin in Sick Cell Disease: from Genetic Epidemiology to new Therapeutic Strategies. *Lancet*, **2016**;387(10037):2554-64.
- 13 **Sripichai O, Fucharoen S.** Fetal Hemoglobin Regulation in β -thalassemia: Heterogeneity, Modifiers and Therapeutic Approaches. *Expert Review of Hematology*, **2016**;9(12):1129-1137.
- 14 **Cao A, Moi P, Galanello R.** Recent Advances in β -thalassemias. *Pediatric Reports*, **2011**;3(2):e17.
- 15 **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. *Natural Genetic*, **2010**; 42(12):1049-1051.
- 16 **Söylemez G D, Kayaaltı Z.** Türkiye’de Orak Hücreli Anemi Dağılımı, Patofizyolojisi ve Demir Toksisitesi. *Marmara Pharmaceutical Journal*, **2016**;20:92-99.
- 17 **Orkin S H, Zon L I.** Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*, **2008**;132(4):631-44.
- 18 **Higgs D R, Engel J D, Stamatoyannopoulos G.** Thalassemia. *Lancet*, **2012**;379(9813):373-83.

- 19 **Palis J.** Ontogeny of Erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology*, **2008**;15(3):155-61.
- 20 **Dzierzak E, Philipsen S.** Erythropoiesis: Development and Differentiation. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, **2013**;3(4):a011601.
- 21 **Imamura T.** Human Hemoglobin Structure and Respiratory Transport. *Nihon Rinsho*, **1996**;54(9):2320-5.
- 22 **Weed R I, Reed C F, Berg G.** Is Hemoglobin An Essential Structural Component of Human Erythrocyte Membranes. *The Journal of Clinical Investigation*, **1963**;42(4):581-588.
- 23 **Royer W E, Knapp J R E, Strand K, Heaslet H A.** Co-operative Hemoglobins: Conserved Fold, Diverse Quaternary Assemblies and Allosteric Mechanisms. *Trends In Biochemical Sciences*, **2001**;26(5):297–304.
- 24 **Brittain T.** Molecular Aspects of Embryonic Hemoglobin Function. *Molecular Aspects of Medicine*, **2002**;23:293-342.
- 25 **Shibayama N, Tomita A S, Ohki M, Ichiyanagi K, Park S Y.** Direct Observation of Ligand Migration Within Human Hemoglobin at Work. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2020**;117(9):4741-4748.
- 26 **Pesce A, Bolognesi M, Ascenzi P, Moens L, Hankeln T, Burmester T.** et.al. Neuroglobin and Cytochrome b5. *EMBO Reports*, **2002**;3(12):1146-1151.
- 27 **Abbaspour N, Hurrell R, Kelishadi R.** Review on Iron And Its Importance for Human Health. *Journal of Research in Medical Science : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, **2014**;19(2):164-174.
- 28 **Thompson M, McInnes R R, Willard H F.** Genetics in Medicine. 5th Ed., Philadelphia: B. Saunders Company, **1991**:328.
- 29 **Waye J S, Chui D H.** The Alpha-Globin Gene Cluster: Genetics and Disorders. *Clinical and Investigative Medicine*, **2001**;24(2):103-9.
- 30 **Cao A, Moi P.** Regulation of the Globin Genes. *International Pediatric Research Foundation*, **2002**;51(4):415-21.
- 31 **Cao A, Galanello R.** Beta-Thalassemia. *Genetics in Medicine*, **2010**;12(2):61-76.
- 32 **Bank A.** Regulation of Human Fetal Hemoglobin: New Players, New Complexities. *Blood*. **2006**;107(2):435-443.
- 33 **Kukreti S, Kaur H, Kaushik M, Bansal A, Saxena S, Kaushik S, Kukreti R.** Structural Polymorphism at LCR and its Role in Beta-Globin Gene Regulation. *Biochimie*, **2010**;92(9):1199-206.
- 34 **Wilber A, Nienhuis A W, Persons D A.** Transcriptional Regulation of Fetal to Adult Hemoglobin Switching: New Therapeutic Opportunities. *Blood*, **2011**;117:3945-53.
- 35 **Bauer D E, Kamran S C, Orkin S H.** Reawakening Fetal Hemoglobin: Prospects for New Therapies for the β -Globin Disorders. *Blood*, **2012**;120(15):2945-53.
- 36 **Cantu I, Philipsen S.** Flicking the Switch: Adult Hemoglobin Expression in Erythroid Cells Derived from Cord Blood and Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Haematologica*, **2014**;99(11):1647-9.

- 37 **Forget B G.** Progress in Understanding the Hemoglobin Switch. *Massachusetts Medical Society*, **2011**;365(9):852-4.
- 38 **Goonasekera H W, Paththinige C S, Dissanayake V H W.** Population Screening for Hemoglobinopathies. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, **2018**;19:355-380.
- 39 **Taylor S M, Parobek C M, Fairhurst R M.** Haemoglobinopathies and the Clinical Epidemiology of Malaria: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Infectious Diseases*, **2012**;12:457-68.
- 40 **Modell B, Darlison M.** Global Epidemiology of Haemoglobin Disorders and Derived Service Indicators. *Bulletin of the World Health Organisation*, **2008**;86:480-487.
- 41 **Nathan D G.** Thalassemia: A Look to The Future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2016**;1368(1):11-5.
- 42 **Modell B, Darlison M.** Global Epidemiology of Haemoglobin Disorders and Derived Service Indicators. *Bulletin of the World Health Organisation*, **2008**;86:480-487.
- 43 **Origa R.** β -Thalassemia. *Genetics in Medicine*, **2017**;19(6):609-619.
- 44 **Muncie H L, Campbell J.** Alpha and Beta Thalassemia. *American Family Physician*, **2009**;80(4):339-44.
- 45 **Weatherall D J, Clegg J B.** The Thalassemia Syndromes. 4th Ed., Oxford:Blackwell Science, **2001**.
- 46 **Voon J H P, Vadolas J.** Controlling Alpha-Globin: A Review of Alpha-Globin Expression and its Impact on Beta-Thalassemia. *Haematologica*, **2008**;93(12):1868-76.
- 47 **Modell B, Darlison M.** Global Epidemiology of Haemoglobin Disorders and Derived Service Indicators. *Bulletin of the World Health Organisation*, **2008**;86:480-487.
- 48 **Weatherall D J, Williams T N, Allen S J, O'Donnell A.** The Population Genetics and Dynamics of the Thalassemias. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, **2010**;24:1021-1031.
- 49 **Bittles A H, Mason W M, Greene J, Rao N A.** Reproductive Behavior and Health in Consanguineous Marriages. *Science*, **1991**;252:789-794.
- 50 **Weatherall D J.** The Inherited Diseases of Hemoglobin are An Emerging Global Health Burden. *Blood*, **2010**; 115:4331-4336.
- 51 **Shawky R M, Kamal T M.** Thalassemia Intermedia: An Overview. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, **2012**;13:245-255.
- 52 **Aksu T, Ünal Ş.** Thalassemia. *Trends in Pediatrics*. **2021**;2(1):1-7.
- 53 **Rund D, Rachmilewitz E.** Beta Thalassemia. *The New England Journal of Medicine*, **2005**;353(11):1135-46.
- 54 **Galanello R, Origa R.** Beta Thalassemia. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, **2010**;5:11.
- 55 **Origa R, Galanello R, Ganz T.** Liver Iron Concentrations and Urinary Hcpidin in Beta-Thalassemia. *Haematologica*, **2007**;92:583-588.
- 56 **Ware R E, de Montalembert M, Tshilolo L, Abboud M R.** Sick Cell Disease. *Lancet*, **2017**;390:311-323.
- 57 **Jaminson D T, Breman J G, Measham A R, Alleyne G, Claeson M, Evans D B.** In Disease Control Priorities in Developing Countries. 2nd Ed., Washington DC: Oxford University Press, **2006**: 663-680

- 58 **Livingstone F B.** Frequencies of Hemoglobin Variants: Thalassemia, the Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency, G6PD Variants and Ovalocytosis in Human Populations. Washington DC: Oxford University Press, **1985**.
- 59 **Haldane J B S.** The Rate of Mutation of Human Genes. *Proceedings of the Eighth International Congress of Genetics*,**1949**;35:267-273.
- 60 **Allison A C.** Polymorphism and Natural Selection in Human Populations. *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology*, **1964**;29:137-149.
- 61 **Williams T N.** Both Heterozygous and Homozygous α^+ -Thalassemias Protect Against Severe and Fatal Plasmodium Falciparum Malaria on Coast of Kenya. *Blood*, **2005**; 106:368-371.
- 62 **Piccin A, Murphy C, Eakins A, Rondinelli M B, Daves M, Vecchiato C.** et al. Insight into the Complex Pathophysiology of Sickle Cell Anemia and Possible Treatment. *Haematology*, **2019**;102(4):319-330.
- 63 **Gökyer S D, Kayaaltı Z.** Türkiye’de Orak Hücreli Anemi Dağılımı, Patofizyolojisi ve Demir Toksisitesi. *Marmara Pharmaceutical Journal*, **2016**;20:92-99.
- 64 **Ferrone F A, Hofrichter J, Eaton W A.** Kinetics of Sickle Hemoglobin Polymerization II. A Double Nucleation Mechanism. *Journal of Molecular Biology*, **1985**;183(4):611-631.
- 65 **Ross P D, Hofrichter J, Eaton W A.** Calorimetric and Optical Characterization of Sickle Cell Hemoglobin Gelation. *Journal of Molecular Biology*,**1975**;96(2):239-253.
- 66 **İnal G, Arpacı A.** Orak Hücre Anemisinin Moleküler ve Hücresel Patofizyolojisi. *Türk Klinik Biyokimya Dergisi*, **2021**;19(1):89-98.
- 67 **De Franceschi L, Cappellini M, Olivieri O.** Thrombosis and Sickle Cell Disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, **2011**;37:226-236.
- 68 **Cortabarría A S V, Makhoul L, Strouboulis J, Lombardi G, Oteng-Ntim E, Shangaris P.** In Utero Therapy for the Treatment of Sickle Cell Disease: Taking Advantage of the Fetal Immune System. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, **2021**;8:624-477.
- 69 **Uygun V, Karasu G T.** Hemoglobin F ile İlişkili Klinik Durumlar. *Van Tıp Dergisi*, **2016**;23(2):229-234.
- 70 **Steinberg M H, Rodgers G P.** Pharmacologic Modulation of Fetal Hemoglobin. *Medicine*, **2001**;80(5):328-44.
- 71 **Thein S L, Menzel S.** Discovering the Genetics Underlying Foetal Haemoglobin Production in Adults. *British Journal of Hematology*, **2009**;145(4):455-67.
- 72 **Rutland P C, Pembrey M E, Davies T.** The Estimation of Foetal Haemoglobin in Healthy Adults by Radioimmunoassay. *British Journal of Haematology*, **1983**;53:673-682.
- 73 **Garner C, Tatu T, Reittie J E, Littlewood T, Darley J, Cervino S et al.** Genetic Influences on F Cells and Other Haematologic Variables: A Twin Heritability Study. *Blood*, **2000**; 95:342-346.
- 74 **Efremov G D, Gjorgovski I, Stojanovski N, Chico D, Harano T, Kutlar F.** Et al. One Haplotype is Associated with the Swiss Type of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin in the Yugoslavian Population. *Human Genetics*, **1987**;77:132-136.
- 75 **Sivalingam M, Looi M, Zakaria S Z S, Hamidah N, Alias H, Latiss Z A.** Et al. Molecular Study and Genotype/Phenotype Correlation of β -Thalassemia in Malaysia. *International Journal of Laboratory Hematology*, **2012**;34:377-382.

- 76 **Pourfarzad F, von Lindern M, Azarkeivan A, Hou J, Kia S K L, Esteghamat F. Et al.** Hydroxyurea Responsiveness in β -Thalassemic Patients is Determined by the Stress Response Adaptation of Erythroid Progenitors and Their Differentiation Propensity. *Haematologica*, **2013**;98:696-704.
- 77 **Sampietro M, Thein S L, Contreras M, Pazmany L.** Variation of HbF and F-Cell Number with the G-gamma Xmn1 (C-T) Polymorphism in Normal Individuals. *Blood*, **1992**;79(3):832-3.
- 78 **Garner C, Tatu T, Reittie J E, Littlewood T, Darley J, Cervino S. et al.** Genetic Influences on F Cells and Other Hematologic Variables: A Twin Heritability Study. *Blood*, **2000**;95(1):342-6.
- 79 **Sivalingam M, Looi M, Zakaria S Z S, Hamidah N, Alias H, Latiss Z A. Et al.** Molecular Study and Genotype/Phenotype Correlation of β -Thalassemia in Malaysia. *International Journal of Laboratory Hematology*, **2012**;34:377-382.
- 80 **Stadhouders R, Thein S L, Soler E.** HBS1L-MYB Intergenic Variants Modulate Fetal Hemoglobin via Long Range MYB Enhancers. *The Journal of Clinical Investigation*, **2014**;124(4):1699-1710.
- 81 **Creary E L, Ulug P, Menzel S, McKenzie C A, Hanchard N A, Taylor V. et al.** Genetic Variation on Chromosome 6 Influences F Cell Levels in Healthy Individuals of African Descent and HbF Levels in Sickle Cell Patients. *PloS One*, **2009**;4(1):e4218.
- 82 **Menzel S, Rooks H, Zelenika D, Mtatiro S N, Gnanakulasekaran A, Drasar E. et al.** Global Genetic Architecture of an Erythroid Quantitative Trait Locus, HMIP-2. *Annals of Human Genetics*, **2014**;78(6):434-51.
- 83 **Yin J, Xie X, Ye Y, Wang L, Che F.** BCL11A: A Potential Diagnostic Biomarker and Therapeutic Target in Human Diseases. *Biomarkers in Oncology*, **2019**;39(11).
- 84 **Sankaran V G, Xu J, Orkin S H.** Transcriptional Silencing of Fetal Hemoglobin by BCL11A. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **2010**;1202:64-8.
- 85 **Cao A, Moi P, Galanello R.** Recent Advances in β -Thalassemia. *Pediatric Reports*, **2011**;3(2):e17.
- 86 **Thein S L, Menzel S, Lathrop M, Garner C.** Control of Fetal Hemoglobin: New Insights Emerging from Genomics and Clinical Implications. *Human Molecular Genetics*, **2009**;18(2):216-223.
- 87 **Phillips J D, Steensma D P, Pulsipher M A.** Congenital Erythropoietic Porphyria due to a Mutation in GATA1: the First Trans-Acting Mutation Causative for a Human Porphyria. *Blood*, **2007**; 109:2618-2621.
- 88 **Singer K, Chernoff AA, Singer L.** Studies on Abnormal Hemoglobins Alkali Denaturations. *Blood*, **1951**;6:413-423.
- 89 **Yari D, Ehsanbakhsh Z, Validad M H, Langroudi F H.** Association of TIMP-1 and COL4A4 Gene Polymorphisms with Keratoconus in an Iranian Population. *Journal of Ophthalmic & Vision Research*, **2020**;15(3):299-307
- 90 **Şahin G.** Hipertansif ve Normotansif Bireylerde Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim ve G Proteinini Sinyal Düzenleyici 2 Genlerindeki Polimorfizmlerin İncelenmesi. Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Adana, **2013**
- 91 **Felipe R, Medrano V, Oliveira C A.** Guidelines for the Tetra-Primer ARMS-PCR Technique Development. *Molecular Biotechnology*, **2014**;56(7):599-608.

- 92 **Motovali-Bashi M, Ghasemi T.** Role of XmnI Polymorphism in Hydroxyurea Treatment and Fetal Hemoglobin Level at Isfahanian Intermediate β -Thalassemia Patients. *Iranian Biomedical Journal*, **2015**;19(3):177-182.
- 93 **Avuah G B, Ramaswamy H S, Economides A.** Thermal Processing and Quality : Principles and Overview. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **2007**; 46(6):584-602.
- 94 **Steinberg M H.** Fetal Hemoglobin in Sickle Hemoglobinopathies: High HbF Genotypes and Phenotypes. *Journal of Clinical Medicine*, **2020**;9(11):3782.
- 95 **Thein S L, Menzel S.** Discovering the Genetics Underlyin Foetal Haemoglobin Production in Adults. *British Journal of Haematology*, **2009**;145(4):455-67.
- 96 **Bashi M M, Ghasemi T.** Role of XmnI γ^G Polymorphism in Hydroxyurea Treatment and Fetal Hemoglobin Level at Isfahanian Intermediate β -Thalassemia Patients. *Iranian Biomedical Journal*. **2015**;19(3):177-182.
- 97 **Sivalingam M, Looi M L, Zakaria S Z S, Hamidah N H, Alias H, Latiff Z A.** Molecular Study and Genotype/Phenotype Correlation of β -Thalassemia in Malaysia. *International Journal of Laboratory Hematology*, **2012**; 34(4):377-82.
- 98 **Bashir S , Mahmood S, Mohsin S, Tabassum I, Ghafoor M, Sajjad O.** Modulatory Effect of Single Nucleotide Polymorphism in XmnI, BCL11A and HBS1L-MYB Loci on Foetal Haemoglobin Levels in β -thalassemia major and Intermedia Patients. *Journal of Pakistan Medical Association*, **2021**;71:1394–1398.
- 99 **Dadheech S, Jain S, Madhulata D, Sharma V, Joseph J, Jyothy A. Et al.** Association of XmnI - 158 γ^G Variant with Severity and HbF Levels in β -thalassaemia major and Sickle Cell Anaemia. *Molecular Biology Reports*, **2014**;41(5):3331-7.
- 100 **Sankaran V G, Menne T F, Xu J, Akie T E, Lettre G, Van Handel B. Et. al.** Human Fetal Hemoglobin Expression is Regulated by the Developmental Stage-Specific Repressor BCL11A. *Science*. **2008**;322:1839–1842.
- 101 **Li J, Lai Y, Shi L.** BCL11A Down-Regulation Induces γ -globin in Human β -thalassemia major Erythroid Cells. *Hemoglobin*. **2018**;42:225–230.
- 102 **Basak A, Sankaran V G.** Regulation of the Fetal Hemoglobin Silencing Factor BCL11A. *Annals of the New York Academy of Sciences*. **2016**;1368(1):25-30.
- 103 **Zhou D, Liu K, Sun C W, Pawlik K M, Townes T M.** KLF1 Regulates BCL11A Expression and γ - to β -globin gene Switching. *Natural Genetic*, **2010**;42:742–744.
- 104 **Chen Q, Sun S C, Peng Y S, Wang Q, Mo B M.** Correlation Between Hemoglobin F Levels and Single Nucleotide Polymorphism at BCL11A Gene rs11886868 Locus in β -talasemi Patients. *Journal of Experimental Hematology*, **2012**;20(3):650-3.
- 105 **Stadhouders R, Aktuna S, Thongjuea S, Aghajanirefah A, Pourfarzad F, van IJcken W. Et al.** HBS1L-MYB Intergenic Variants Modulate Fetal Hemoglobin via Long-Range MYB Enhancers. *Journal of Clinical Investigation*, **2014**;124:1699–1710.
- 106 **Thein S L.** Molecular basis of β thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **2018**;70:54–65.
- 107 **Cardoso G L, Diniz I G, SiLva A, Cunha D A, Junior J, Uchoa C. et. al.** DNA Polymorphisms at BCL11A, HBS1L-MYB and XmnI-HBG2 Site Loci Associated with Fetal Hemoglobin Levells in Sickle Cell Anemia Patients from Nothern Brazil. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, **2014**;53(4):176-9.

- 108 **Rujito L, Basalamah M, Siswandari W, Setyono J, Wulandari G, Mulatsih S. et al.** Modifying Effect of Xmn1, BCL11A and HBS1L-MYB on Clinical Apperances: A Study on β -Thalassemia and Hemoglobin E/ β -Thalassemia Patients in Indonesia. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*,**2016**;9(2):55-63.
- 109 **Demirezen E, Coşansu G.** Adölesan Çağı Öğrencilerde Beslenme Alışkanlıklarının Değerlendirilmesi. *Academia*, **2005**;14(8):174-178.



EKLER

Ek-1- Bilgilendirme Ve Rıza Olur Formu

AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

(Hasta Grubu)

‘Çukurova Bölgesi’nde β -Talasemi Majörlü Hastalarda HbF Düzeyine Etki Eden SNP’lerin Hemoglobinopati Kliniğine Etkisinin İncelenmesi.’

Başlıklı tez çalışmasında 2 ml tam kanınızı bilimsel çalışmada kullanmak istemekteyiz. Çalışmamız hastalığın klinik şiddetinin tahmin edilebilmesi ve tedaviye yönelik güvenilir kararlar alınmasına izin verecektir.

Sonuçlar öncelikle bilimsel amaçla kullanılacak, kişisel bilgileriniz gizli tutulacak, sorun saptanması halinde durum size bildirilecek ve alınması gereken önlemler konusunda ayrıntılı bilgilendirme yapılacaktır. Parasal bir bedel ödemenizi gerektirmeyen ve size de bir ödeme yapılması söz konusu olmayan bu çalışmaya katılmama ve katıldıktan sonra çekilme hakkınız bulunmaktadır. Ek bilgi talebiniz olursa sözlü olarak karşılanacaktır.

Araştırmamıza katılmayı kabul ediyorsanız, lütfen aşağıdaki bölüme adınızı-soyadınızı yazıp tarih ve imza atınız. Teşekkür ederiz.

Yük. Lis. Öğr. Yasemin Özküçük

SÖZ KONUSU ARAŞTIRMAYA, YUKARIDA BELİRTİLEN KOŞULLAR ÇERÇEVESİNDE HİÇBİR BASKI VE ZORLAMA OLMAKSIZIN KENDİ RIZAMLA KATILMAYI KABUL EDİYORUM.

TARİH
AD-SOYADI

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza

ÖZGEÇMİŞ

