

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

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DELESYONEL VE NONDELESYONEL FETAL HEMOGLOBİNİN
KALITSAL KALICILIĞINA (HPFH) NEDEN OLAN GENOTİPLERİN
BELİRLENMESİ**

AYŞE DALYAN

BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

2016

T.C.
ADİYAMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**DELESYONEL VE NONDELESYONEL FETAL HEMOGLOBİNİN KALITSAL
KALICILIĞINA (HPFH) NEDEN OLAN GENOTİPLERİN BELİRLENMESİ**

Ayşe DALYAN
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Bu tez 27/05/2016 tarihinde aşağıdaki jüri üyeleri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
BAŞKAN (DANIŞMAN)

Doç. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
ÜYE

Doç. Dr. Süleyman BAYRAM
ÜYE

Doç. Dr. Ramazan GÜRBÜZ
Enstitü Müdürü

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.
Proje No: FEFYL/2014-0003

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

DELESYONEL VE NONDELESYONEL FETAL HEMOGLOBİNİN KALITSAL KALICILIĞINA (HPFH) NEDEN OLAN GENOTİPLERİN BELİRLENMESİ

Ayşe DALYAN
Adıyaman Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
İkinci Danışman : Doç. Dr. Ahmet GENÇ
Yıl : 2016, Sayfa sayısı : 92

Jüri : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI
Doç. Dr. Ahmet KAYRALDIZ
Doç. Dr. Süleyman BAYRAM

Bu çalışmada Fetal hemoglobin (HbF) düzeyi % 1.5 ve daha yüksek olan toplam 62 kişinin hem $G\gamma$ (HBG2) ve hem de $A\gamma$ (HBG1) genlerinde delesyonel ve non delesyonel mutasyonlar taranmış ve bu genlerin yüksek HbF düzeylerinin kalıtsal kalıcılığı ile ilişkileri incelenmiştir. Hem $G\gamma$ (G gama) globin (HBG2) ve hem de $A\gamma$ (A gama) globin (HBG1) genlerinin promotör dizileri sekanslanmıştır. Ayrıca Chinese $G\gamma$ ($A\gamma$ $\delta\beta$) tip delesyonel mutasyon için tüm bireyler taranmıştır. İncelemeler sonucunda $G\gamma$ geninin promotör bölgesinde -158C/T, -309A/G, -369C/G ve -567T/G lokalizasyonlarında substitüsyon (baz değişimi) tip varyasyonlar saptanmıştır. Aynı şekilde $A\gamma$ geninin 5'-UTR /translasyona uğramayan bölge) ve promotör bölgelerinde de +25G/A, -369G/C, -499T/A ve -588G/A lokasyonlu baz değişimi tip varyasyonlar saptanırken, bir kişide -222/-225 homozigot ve 6 kişide de heterozigot AGCA delesyonu varyasyonlarına da rastlanmıştır. Çalışma sonucunda $G\gamma$ geni promotöründe iki (-309A/T ve -369C/G) ve $A\gamma$ geni promotöründe de iki (+25G/A ve -499T/A) varyasyon ile yüksek HbF düzeyleri arasında ilişki saptanmıştır. Ayrıca anılan bu varyasyonları barındıran kişilerde HbF düzeyi yüksek olarak ölçülmesi bu varyasyonların haplotipik etki gösterdikleri söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Hemoglobin, A gama, G gama, Kalıtsal fetal hemoglobin

ABSTRACT

MSc Thesis

DETERMINATION OF GENOTYPES CAUSE TO THE DELETIONAL AND NONDELETIONAL HEREDITARY PERSISTENCE OF FETAL HEMOGLOBIN (HPFH)

AYŞE DALYAN

Adıyaman University

Institute of Natural and Applied Sciences

Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Co-Supervisor : Assoc.Prof. Dr. Ahmet GENÇ

Year : 2016, Pages : 92

Jury : Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

Assoc. Prof. Dr. Ahmet KAYRALDIZ

Assoc. Prof. Dr. Süleyman BAYRAM

In the present study, totally 62 volunteers that have % 1.5 and upper level of fetal hemoglobin (HbF) were included to investigate the relation with HbF level and deletional and non-deletional mutations in both $G\gamma$ (G gamma) globin (HBG2) and A gamma ($A\gamma$) globin (HBG1) genes. The promotor sequences were analysed for both two genes and the Chinese $G\gamma(A\gamma\delta\beta)$ type deletional mutation was screened. It was observed four variations such as -158C/T, -309A/G, -369C/G and -567T/G in the promotor of $G\gamma$ gene. Otherwise, it was also observed four variations in 5'-UTR (untranslated regions) and promotor of $A\gamma$ gene such as +25G/A, -369G/C, -499T/A and -588G/A. It was also observed a -222/-225AGCA del homozigote and 6 variations as heterzigote in A gamma globin gene promotor region. To our results, there was a significant relationship between high HbF level and two variations in $G\gamma$ gene promotor (-309A/T and -369C/G) and between two variations in $A\gamma$ gene promotor (+25G/A ve -499T/A). The persons whose carry the mentioned variations with high levels of HbF showed that it might be existed a haplotipic effect between these variations.

Key Words: Hemoglobin, A gamma, G gamma, Hereditary fetal hemoglobin

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yürütülmesi ve bütün çalışmalarım boyunca bana rehber olan, ilgi ve yardımlarını esirgemeyen Sayın Hocam Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI'na ve ikinci danışman hocam Sayın Doç.Dr.Ahmet GENÇ'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

İstatistiksel analizlerde yardımlarından dolayı Sayın Doç. Dr. Süleyman BAYRAM teşekkür ederim.

Bu çalışmada kullanılan materyalin temin edilmesinde emeği geçen proje ekibine teşekkür ederim.

Biyolog Onur Bozkurt'a, biyolog Ferit Gikli'ye, biyolog Sevgi Başalan'a yardımlarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Projemizi maddi yönden destekleyen ADYÜ Araştırma Fonu çalışanlarına da teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

SAYFA

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xii
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hemoglobinlerin Yapısı.....	4
2.1.1. Globin gen kümesi.....	5
2.1.2. Hemoglobin dönüşümü.....	6
2.2. Fetal Hemoglobin.....	8
2.2.1. γ globin geni ve γ globin gen yapısı.....	8
2.2.2. HbF'nin fonksiyonel özellikleri.....	10
2.2.3. HbF içeren eritrositlerin fizyolojisi.....	11
2.2.4. Fetal hemoglobin dönüşümü.....	11
2.2.5. HbF'nin hücresele heterojenitesi.....	12
2.2.6. HbF laboratuvar algılama.....	14
2.2.7. γ -globin gen mutasyonları (HBG1 ve HBG2).....	15
2.3. Fetal Hemoglobinin Kalıtsal Kalıcılığı (HPFH).....	16
2.3.1. Delesyonel HPFH.....	16
2.3.2. Non-delesyonel HPFH.....	18
2.4. HbF Varyantları.....	21
2.4.1. $G\gamma$ zincir varyantları.....	22
2.4.2. $A\gamma$ zincir varyantları.....	24
2.4.3. HbF'nin istikrarını ve fonksiyonel özelliklerini etkileyen mutasyonlardan kaynaklı varyasyonlar.....	26
2.4.4. Diğer varyantlar.....	27
2.5. HPFH İle İlgili Yapılan Çalışmalar.....	27
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36

3.1. Gereçler.....	36
3.1.1. Alet ve cihazlar.....	36
3.1.2. Sarf malzemeler.....	36
3.2. Örnek Toplama.....	37
3.3. Yöntemler.....	37
3.3.1. Hematolojik incelemeler.....	37
3.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi.....	37
3.3.3. Tam kandan DNA izolasyonu.....	39
3.3.3.1. Ayıraçlar.....	39
3.3.3.2. Yöntem.....	40
3.3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	40
3.3.4.1. Delesyonel globin gen mutasyonlarını saptamak için yapılan amplifikasyon işlemleri ve kullanılan primerler.....	41
3.3.4.2. Non-delesyonel globin gen mutasyonlarını saptamak için yapılan amplifikasyon işlemleri ve kullanılan primerler	42
3.3.4.3. Yöntem.....	43
3.3.4.3.1. Delesyonel HPFH yöntemi.....	43
3.3.4.3.2. Nondelesyonel HPFH yöntemi.....	44
3.3.5. Agaroz jel elektroforezi.....	45
3.3.5.1. Çözeltiler.....	45
3.3.5.2. Yöntem.....	46
3.3.6. DNA dizi analizi.....	46
4. BULGULAR.....	50
4.1. Non Delesyonel Mutasyonların Taranması.....	50
4.1.1. $G\gamma$ geninin promotör bölgesinin sekans analizi.....	51
4.1.2. $A\gamma$ geninin promotör bölgesinin sekans analizi.....	58
4.1.3. Hem $G\gamma$ hem de $A\gamma$ gen varyasyonları için dominant genetik modele göre istatistiksel analizler.....	66
4.2. Delesyonel Mutasyonların Taranması.....	72
5. TARTIŞMA.....	73
6. SONUÇ.....	77
KAYNAKLAR.....	79

ÖZGEÇMİŞ.....	91
EKLER.....	92



Çizelge 2.1. Embriyonik, fetal ve erişkin dönemde sentezlenen insan Hemoglobinleri.....	5
Çizelge 2.2. Nondelesyonel HPFH promotör bölge mutasyonları.....	20
Çizelge 3.1. $A\gamma$ ve $G\gamma$ genlerinin Chinese $G\gamma(A\gamma \delta\beta)$ tip delesyonel mutasyonlarının saptanması için amplifikasyon işlemi sırasında kullanılan primerler.....	41
Çizelge 3.2. $A\gamma$ ve $G\gamma$ genlerinin nondelesyonel mutasyonlarının saptanması için amplifikasyon işlemi sırasında kullanılan primerler.....	42
Çizelge 3.3. Delesyonel çalışmalarda bir örnek için amplifikasyonda kullanılan kimyasallar.....	43
Çizelge 3.4. Chinese $G\gamma(A\gamma \delta\beta)$ tip delesyonel HPFH için PCR programı ve $MgCl_2$ miktarları.....	43
Çizelge 3.5. Non delesyonel çalışmalarda her bir örnek için amplifikasyonda kullanılan kimyasallar.....	44
Çizelge 3.6. $G\gamma$ geninin PCR protokolü.....	44
Çizelge 3.7. $A\gamma$ geninin PCR protokolü.....	44
Çizelge 4.1. $G\gamma$ promotörünün -158 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.....	53
Çizelge 4.2. $G\gamma$ promotörünün -309 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.....	54
Çizelge 4.3. $G\gamma$ promotörünün -369 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.....	55
Çizelge 4.4. $G\gamma$ promotörünün -567 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.....	55
Çizelge 4.5. Gen Bank kayıtlarına göre $G\gamma$ geninin promotör bölgesinde var olan varyasyonlar.....	56

Çizelge 4.6. $A\gamma$ promotörünün +25 bölgesinde incelenen varyasyonlar, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.....	61
Çizelge 4.7. $A\gamma$ promotörünün -369 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.....	62
Çizelge 4.8. $A\gamma$ promotörünün -499 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.....	63
Çizelge 4.9. $A\gamma$ promotörünün -588 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.....	64
Çizelge 4.10. $A\gamma$ genini promotörünün -22/-225 bölgesinde incelenen varyasyonlar lokasyonları, değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi	64
Çizelge 4.11. GenBank kayıtlarına göre $A\gamma$ geninin promotör bölgesinde var olan varyasyonlar.....	65
Çizelge 4.12. Dominant genetik modele göre $G\gamma$ promotörünün -158 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz.....	67
Çizelge 4.13. Dominant genetik modele göre $G\gamma$ promotörünün -309 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz.....	67
Çizelge 4.14. Dominant genetik modele göre $G\gamma$ promotörünün -369 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz.....	68
Çizelge 4.15. Dominant genetik modele göre $G\gamma$ promotörünün -567 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz.....	68
Çizelge 4.16. Dominant genetik modele göre $A\gamma$ promotörünün +25 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz.....	68
Çizelge 4.17. Dominant genetik modele göre $A\gamma$ promotörünün -369 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz.....	69
Çizelge 4.18. Dominant genetik modele göre $A\gamma$ promotörünün -499 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz.....	69
Çizelge 4.19. Dominant genetik modele göre $A\gamma$ promotörünün -588 bölgesinde	

saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz.....	69
Çizelge 4.20. Dominant genetik modele göre $\Lambda\gamma$ promotörünün -222/-225 bölgesinde saptanan AGCA delsyonu istatistiksel analizi.....	69
Çizelge 4.21. Gönüllülerin sahip oldukları varyasyon tipleri, hematolojik verileri ile HbA2 ve HbF değerlerinin karşılaştırılması	72



Şekil 2.1. Hem grubunun moleküler yapısı.....	4
Şekil 2.2. Hemoglobin molekülü.....	4
Şekil 2.3. İnsan hemoglobin oluşumuna göre özel kromozomlar.....	7
Şekil 2.4. Embriyonik ve fetal gelişimin farklı evrelerinde globin zincir sentezi.....	8
Şekil 2.5. Doğum sonrasında fetal hemoglobin artışına neden olan delesyonların HPFH- pozisyonlarının β globin gen kümesinde yerleşimleri.....	17
Şekil 3.1. Dizi analizinde kullanılan Sanger yöntemi.....	47
Şekil 3.2. DNA dizi analizi örneği.....	48
Şekil 3.3. Gen bankasında kayıtlı olan $G\gamma$ ve $A\gamma$ geninin varyasyonları ve orijinal dizinin kayıtlı olduğu web siteleri.....	49
Şekil 4.1. Sırasıyla $A\gamma$ ve $G\gamma$ genlerinin amplifikasyon ürünlerinin elektroforezi.....	50
Şekil 4.2. $G\gamma$ geninin -158 lokalizasyonunda C/C homozigot baz dizisi (a), -158 C/T heterozigotlar (b) ve -158 T/T homozigotlar (c).....	51
Şekil 4.3. $G\gamma$ geninde -309 lokalizasyonlu varyasyonlar, a)-309 A/G heterozigotlar, b)-309 A/A homozigotları.....	51
Şekil 4.4. $G\gamma$ geninde -369 lokalizasyonlu varyasyonlar, a)-369 C/G heterozigotlar, b)-369 C/C homozigotları, c)-369 G/G homozigotları.....	52
Şekil 4.5. $G\gamma$ geninde -567 lokalizasyonlu T/T homozigot (a) ve T/G heterozigot (b) varyasyonları.....	52
Şekil 4.6. $A\gamma$ geninde +25 lokalizasyonlu varyasyonlar, a)+25 A/A homozigotlar, b)+25 A/G heterozigotları, c)+25 G/G homozigotları.....	58
Şekil 4.7. $A\gamma$ geninde -369 lokalizasyonlu varyasyonlar, a)-369 G/G homozigotlar, b)-369 C/G heterozigotları.....	58
Şekil 4.8. $A\gamma$ geninde -499 lokalizasyonlu varyasyonlar, a)-499 T/T homozigotlar, b)-499 T/A heterozigotları ve c)-499 A/A homozigotları.....	59
Şekil 4.9. $A\gamma$ geninde -588 lokalizasyonlu varyasyonlar, a)-588 A/A homozigotlar, b)-588 A/G heterozigotları, c)-588 G/G homozigotları.....	59
Şekil 4.10. $A\gamma$ geninde -221 ile -225 bölgelerinde AGCA delesyonu (a) ve normal baz dizisi (b).....	59
Şekil 4.11. $A\gamma$ geninde -222 ile -225 bölgelerinde AGCA delesyonu sonucu çerçeve	

kayması mutasyonu (üstte), normal baz dizisi (altta).....	60
Şekil.4.12. Chinese $G_{\gamma}(\Lambda_{\gamma} \delta \beta)$ tip delesyonel HPFH.....	73



SİMGELER VE KISALTMALAR

α	: Alfa
β	: Beta
δ	: Delta
ϵ	: Epsilon
γ	: Gama
G_γ	: G gama
A_γ	: A gama
A_γ^I	: A gama I
A_γ^T	: A gama T
Ψ	: Pseudo
Z	: Zeta
RBC	: Eritrosit hücresi (Red Blood Cell)
Hb	: Hemoglobin
HbA	: Hemoglobin A
HbF	: Fetal Hemoglobin
HPFH	: Fetal Hemoglobinin Kalıtsal Kalıcılığı
BPG	: Bifosfogliserat
MCH	: Ortalama eritrosit hemoglobini
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
MCHC	: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu
Kb	: Kilo baz
IVS	: İntron dizileri
3'UTR	: 3'kodlanmayan bölge
5'UTR	: 5'kodlanmayan bölge
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
μ l	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar
nm	: Nanometre
Cl ⁻	: Klorür

NaCl : Sodyum Klorür
CO₂ : Karbon dioksit
O₂ : Oksijen
PCO₂ : Karbondioksitin kısmi basıncı
pKa: : Asitlik sabiti



1.GİRİŞ

Hemoglobin (Hb) kuaterner yapıda iki alfa zincir ve iki beta ($\alpha_2\beta_2$) zincirden oluşmuş ve ayrıca 4 hem grubu içeren bir moleküldür. Hb eritrosit içinde bulunur ve yüksek derecede oksijen bağlama yeteneğine sahiptir. Bundan dolayı Hb solunum sırasında akciğerden oksijeni alarak dolaşım yoluyla hücrelere ulaştırmakta, hücrelerde açığa çıkan karbondioksiti alarak akciğere taşımaktadır. Bu özelliği ile hemoglobin hücrede oksijen-karbondioksit değişimini sağlayarak hücresel solunuma katkı sağlamaktadır (Thompson ve vd. 1991, Lukens 1999, Klug ve vd. 2011).

Sağlam erişkin bir insanda $\alpha_2\beta_2$ yapısına sahip hemoglobin molekülü HbA olarak isimlendirilmektedir ve insandaki miktarı yaklaşık %97 civarındadır. Fakat fetal dönemde eritrositlerde bulunan hemoglobin molekülü HbF olarak isimlendirilen iki alfa ve iki gama ($\alpha_2\gamma_2$) zincirinden oluşan bir metalloprotein yapısındadır (Forget 2006).

Doğumdan sonra hayatın ilk iki yılında HbF miktarı azalarak HbA miktarı artmaktadır. Normal yetişkin bireylerde HbF miktarı %1 civarına gerilerken HbA miktarı ise %97 seviyelerine ulaşmaktadır. Halbuki HbF fetal yaşam boyunca ve doğumda toplam hemoglobinin %80'ini oluşturmaktadır.

Hemoglobinin yapısında bulunan globin zincirlerinin sentezindeki azalma veya yapılarındaki amino asit değişikliği ile karakterize olaylara hemoglobinopatiler denilmektedir. Daha sonraları globin zincir sentezindeki azalma veya yokluğu sonucu ortaya çıkan sendromlara talasemi adı verilmiştir. Talaseminin patofizyolojisini globin zincir oranında ortaya çıkan dengesizlik oluşturmaktadır. Normal oranda üretilen diğer zincir göreceli olarak fazladır; tetrameri oluşturmak için komplementer zincirinin yokluğunda prematür kırmızı kan hücresi içinde çökerek hücre zarında hasara neden olmaktadır. Ayrıca kırmızı hücre içinde Hb miktarı azalarak hipokromik mikrositer anemiye neden olmaktadır. Globin zincirindeki amino asit değişikliği sonucu ise anormal hemoglobinler veya Hb varyantları meydana gelmektedir (Genç 2005, Bahadır ve vd. 2009).

Fetal hemoglobinin kalıtsal kalıcılığı (HPFH), doğumdan sonra devam eden γ -globin gen ekspresyonu ve dolayısıyla yetişkin dönemde artmış HbF düzeylerine yol açan genetik bir durumdur. HPFH, genel olarak delesyonel ve non-delesyonel olmak üzere iki sınıfa ayrılır. Delesyonel HPFH, HbF artışına neden olan $G\gamma$ ve $A\gamma$ geninin yerleştiği β globin gen kümesinin bulunduğu kromozomda DNA dizilerinin delesyonları ile

ilişkilidir. Non-delesyonel olan HPFH, $G\gamma$ - veya $A\gamma$ -globin genlerinin promotörlerinde tek bir nokta mutasyonunun ya da küçük delesyonların varlığı ile karakterizedir. Bu durum eritrositlere spesifik olan veya diğer düzenleyici transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını etkilemektedir (Fucharoen ve vd. 2002).

Bugüne kadar HPFH fenotipi ile ilişkili β -globin gen kümesinde 6 adet delesyon tespit edilmiştir. HPFH-5 İtalyan bir ailede saptanmış olup yaklaşık olarak 3 kb (kilobaz) δ geninin 5' ucundan ve β -geninin 3' ucundan 0.7 kb'lık bir bölgenin delesyonu tespit edilmiştir. Diğer 5 HPFH delesyonları ise çok daha büyük delesyonları (yaklaşık 105 kb büyüklüğünde) kapsamaktadır (Lee ve vd. 2009).

Şu ana kadar $G\gamma$ ve $A\gamma$ globin zincirlerinin 79 tane varyantı tespit edilmiştir. Globin gen veri tabanında listelenmiş 79 varyanttan 45'i $G\gamma$ varyantı, 31'i $A\gamma$ varyantı olarak belirlenmiş ve üç tanesi de henüz belirli bir γ genine dahil edilememiştir. 31 $A\gamma$ varyantından 7 tanesi $A\gamma^T$ zincirinin varyantı olup 1'i kısa homolog delesyon ve biri de $A\gamma$ - β hibrid zincir mutasyonuna sahiptir (Huisman 1997, Manca ve vd. 2008). Hiçbir γ varyant taşıyıcısı, sağlığı etkileyecek kadar ağır değildir. Sadece bebeklerde hafif siyanoza neden olan birkaç varyantta fonksiyonel özellikler değişmektedir. Tespit edilmiş γ varyantların çoğunun görülme sıklığı oldukça düşük olmasına rağmen, HbF-Sardinia ($A\gamma^{T75Ile}\rightarrow Thr$) bütün toplumlarda tespit edilmiştir. Tespit edilen γ varyantı taşıyıcılarının çoğu DNA dizi analizi ile saptanmıştır. Tespit edilen bu varyantlar içerisinde Hb F-Poole ($G\gamma^{130Trp}\rightarrow Gly$) ve Hb F Xim Jin ($G\gamma^{130Gly}\rightarrow Arg$) stabil değil (unstable), HbF Onoda ise ($G\gamma^{146His}\rightarrow Tyr$) yüksek oksijen affiniteli varyanttır (Weatherall ve vd. 2001, Nager 2003, Genç 2005).

$A\gamma$ geninde tespit edilmiş 31 varyantın hiçbiri anormal fonksiyona sahip değildir. G-gama da olduğu gibi bu varyantlar nadir görülür. HbF-Mauritius ($A\gamma^{23Ala}\rightarrow 0$) diğer varyantlardan farklı olarak delesyon sonucunda oluşmuştur (Nager 2003, Genç 2005).

Ayrıca, $G\gamma$ -globin geninin -202, -175, -161, -158 nükleotidlerindeki belirgin nokta mutasyonları ile $A\gamma$ -globin genindeki -202, -198, -196, -195, -175, -117'deki nokta mutasyonları ile 4 bç (baz çifti)'lik delesyonlar ($A\gamma$ -225' den -222'ye kadar olan AGCA delesyonu) genin sürekli ekspresyonundan sorumludur. Bu mutasyonlar veya delesyonlar nadir olarak gözlenir ve normal bireylerde heterozigot durumda HbF düzeyinin artması ile ilişkilidir. Xmn I- $G\gamma$ polimorfizm olarak da adlandırılan $G\gamma$ -globin geninin -158. pozisyonundaki C $\rightarrow$ T yer değişimi, tüm popülasyonlarda sık olarak gözlenen polimorfik

bir varyanttır ve homozigot β -talasemi ile orak hücre anemisi gibi eritropoietik stres durumları altında γ -globin gen ekspresyonunu arttırmaktadır. Bunun aksine Xmn I- $G\gamma$ 'li normal kişilerde orta düzeyde F hücreleri ile HbF artışları gözlenir. *cis* Xmn I- $G\gamma$ varlığının moderatör bir faktör olmasına rağmen diğer *trans*-acting faktörleri veya QTLler (kantitatif özellik lokusları) kendi başlarına ya da Xmn I- $G\gamma$ ile etkileşimleri sonrasında HbF üretiminin kontrolünde önemli bir rol oynayabilirler (van der Padt ve vd. 2005, Bouva ve vd. 2006).

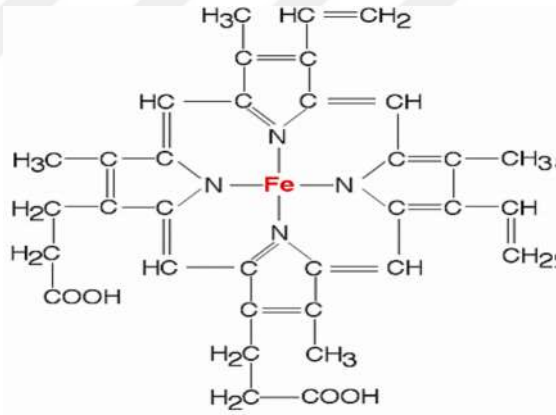
Ülkemizde, özellikle Akdeniz Bölgesi'nde sık olarak gözlenen orak hücre ve β -talasemi vakalarında HbF'i yüksek olanlarda hastalığın hafif seyrettiği gözlenmektedir. Ülkemizde bu kadar yüksek prevalansta hasta bulunmasına rağmen, bu konu ile ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Özellikle anormal hemoglobin ve β -talasemi hastalarında hastalığın seyrini hafifleten HbF miktarındaki bu artışın nedenini saptamak, gelecekte transkripsiyon faktörlerinin rolünü anlamaya katkı sağlayacaktır. Dolayısıyla bu çalışmadan amacımız Adıyaman illinde $\geq 1.5\%$ HbF'i olan örneklerde delesyonel ve nondelesyonel genotiplerin belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

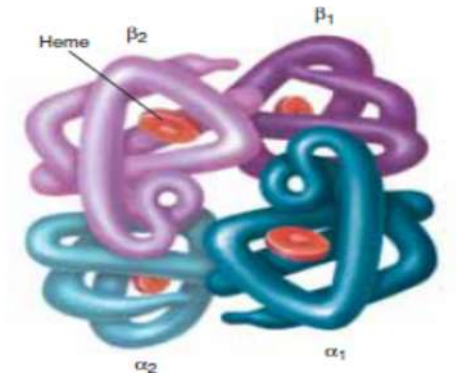
Bu bölümde hemoglobin molekülünün genel yapısı ile globin gen kümelerinin kromozomal lokalizasyonları ile ilgili bilgiler verildikten sonra, tez konusu olan fetal hemoglobinler ile fetal hemoglobinlerin kalıtsal kalıcılığına etki eden gen ve mutasyonları hakkında bilgiler verilmiştir. Daha sonra da HPFH ile ilgili yapılan çalışmalar ile ilgili bilgilendirmeler yapılmıştır.

2.1. Hemoglobinlerin Yapısı

Hemoglobin, 4 hem grubu ve 4 globin zincirinin birleşmesinden oluşan eritrositlere oksijen taşıyan tetramerik yapıda bir proteindir. Tüm hemoglobinlerde hem grubu aynı yapıda görülür. Bu grup, ortasında Fe^{+2} bulunduran yan zincirlere sahip, birbirlerine metil köprüleriyle bağlanmış 4 pirok halkasından oluşmaktadır (Şekil 2.1 ve Şekil 2.2). Yaklaşık 6,4 nm çapında ve sferik yapıda olan hemoglobinin moleküler ağırlığı 64.400 daltondur (Murray ve vd. 1988, Dönbak 2005, Weatherall ve vd. 2006).



Şekil 2.1. Hem grubunun moleküler yapısı (Tahiroğlu 2010)



Şekil 2.2. Hemoglobin molekülü (Ciesla 2007)

Normal yetişkinlerde hemoglobinin yaklaşık % 97'sini HbA molekülü (HbA; $\alpha_2\beta_2$) oluşturur. HbA molekülü 2 alfa (α) ve 2 beta (β) zincirinden oluşmaktadır. Erişkin hemoglobininin %2.5-3.5'ini HbA2 ($\alpha_2\delta_2$) oluşturur. HbA2 yapısında iki alfa (α) ve iki delta (δ) zincirleri bulundurmaktadır. Fetal ve yenidoğanlarda sentezlenen başlıca hemoglobin olan HbF($\alpha_2\gamma_2$) erişkin insanlarda %1'in altında bulunur. HbF 2 alfa (α) ve 2 gama (γ) zincirinden meydana gelmektedir. Embriyonik evrede ilk haftalarda sentezlenen globin zincirleri zeta (δ) ve epsilondur (ϵ). Gebeliğin ilk haftalarından başlayarak Hb Gower I ($\delta_2\epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$), Portland I ($\delta_2\gamma_2$) ve Portland II ($\delta_2\beta_2$) sentezlenir (Çizelge 2.1). (Hoffbrand ve vd. 1985, Lukens ve vd. 1999, Çürük 2004)

Çizelge 2.1. Embriyonik, fetal ve erişkin dönemde sentezlenen insan hemoglobinleri (Genç 2005)

Hb ADI	FORMÜLÜ	SENTEZLENDİĞİ DÖNEM
Hb Gower I	$\zeta_2\epsilon_2$	Embriyonik dönem
Hb Gower II	$\alpha_2\epsilon_2$	Embriyonik dönem
Hb Portland I	$\zeta_2\gamma_2$	Embriyonik dönem
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	Fetal dönem
Hb F	$\alpha_2\gamma_2$	Fetal dönem
Hb A	$\alpha_2\beta_2$	Yetişkin dönem
Hb A₂	$\alpha_2\delta_2$	Yetişkin dönem

2.1.1. Globin gen kümesi

Hemoglobinler, insanlarda sırasıyla 16 ve 11 nolu kromozomlar üzerinde yer alan α -benzer globin genler (ξ ve α) ve β -benzer globin genler ($\epsilon, \gamma, \delta, \beta$) tarafından kodlanır. α -benzer globin genleri (ξ ve α) 16. kromozomun kısa kolunun p13.3 bölgesinde, β -benzer globin genler ($\epsilon, \gamma, \delta, \beta$) 11. kromozomun kısa kolu üzerindeki p14 bölgesinde bulunmaktadır (Şekil 2.3) (Polat ve vd. 2000).

α -globin gen kümesi, iki alfa geni (α_1 ve α_2), bir embriyonik alfa benzeri geni (ζ_2), üç pseudogeni ($\psi\zeta_1, \psi\alpha_2, \psi\alpha_3$) ve bir de teta geni (θ) içerir. 5' uçtan başlayarak 3' ucuna doğru bu genler $\zeta_2, \psi\zeta_1, \psi\zeta_2, \psi\alpha_1, \alpha_2, \alpha_1$ ve θ şeklinde sıralanmaktadır. DNA'da yaklaşık 30 kb'lık yer tutarlar ve 141 amino asit kodlarlar. Bu globin kodlayan genler 3 ekzon ve 2 introndan oluşmaktadır. Globin zincirini şifreleyen diziye ekzon, proteine dönüşmeyen

dizilere ise intron denir. α -geninin ekzon1'inde ilk 31 amino asit (1-31), ekzon 2'de 68 amino asit (32-99) ve ekzon 3'de 42 amino asit (100-141) kodlanmaktadır (Vanin 1985, Polat ve vd. 2000, Dönbak 2005).

β -benzer globin genler; 5'- ϵ - γ - γ - $\Psi\beta_1$ - δ - β -3' ucuna doğru sıralanmaktadır, DNA'da yaklaşık 50 kb'lık yer tutar ve 146 amino asit kodlarlar. β -gen kümesinde ekzon1'de 30 amino asit (1-30), ekzon 2'de 74 amino asit (31-104) ve ekzon 3'de de 42 amino asit (105-146) kodlanmaktadır (Polat ve vd. 2000, Dönbak 2005).

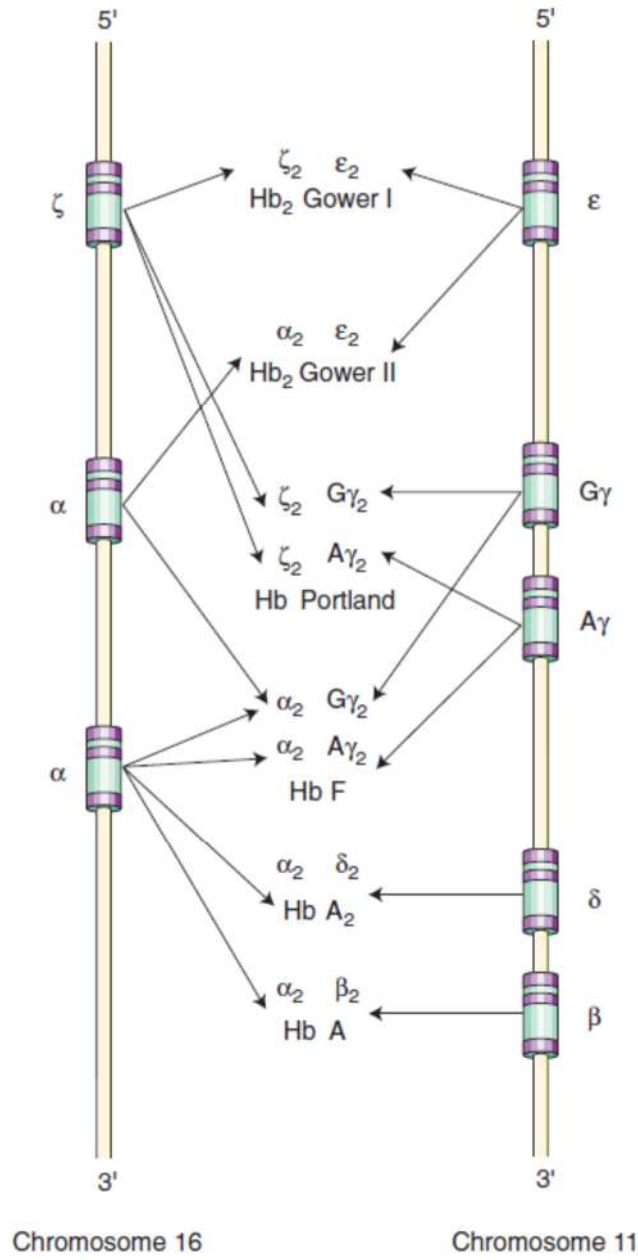
Alfa ve beta gen kümesinde yer alan psödo genlerin ($\Psi\zeta$ - $\Psi\alpha_2$ - $\Psi\alpha_1$ ve $\Psi\beta$) bilinen bir işlevi yoktur. Bu fonksiyonel olmayan genlerin evrimsel kalıntılar olduğu düşünülmektedir (Polat ve vd. 2000, Dönbak 2005). Vanin (1985), psödogenleri protein kodlama yeteneklerini kaybetmiş veya bir şekilde artık hücre içinde ifade edilmeyen genler olarak tanımlamıştır.

2.1.2. Hemoglobin dönüşümü

Gelişim boyunca, globin genlerinin ifadelerinin düzenlenmesi globin değişikliği (globin switching) olarak adlandırılmaktadır. Hemoglobin molekülü alfa (α) globin zinciri ve beta (β) globin zinciri olmak üzere iki zincirden oluşmakta ve ürünleri dengeli miktarda üretilmektedir. İki globin zincirine ait genler, 5' ucundan 3' ucuna doğru gelişim süresince sırayla ifade edilmektedir. Hemoglobinler globin genleri sırayla ifade edilirken, eritropoezin gerçekleştiği organlarda ise farklılık göstermektedir. (Ciesla 2007)

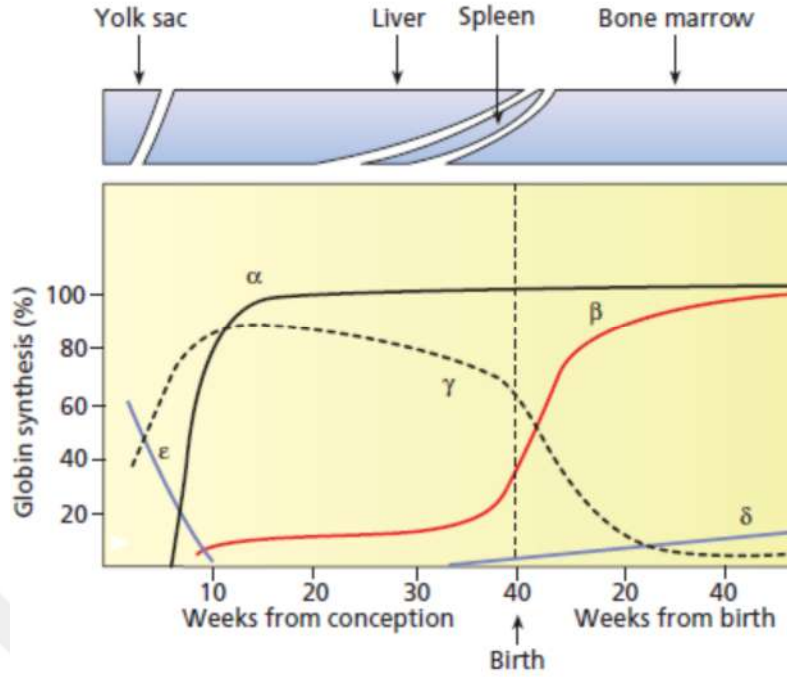
Döllenmenin başlangıcında alfa (α) ve beta (β) globin zincirlerinden ikisi de sentezlenemez (Murray ve vd. 1993). İlk sentezlenen zeta (δ) ve epsilon (ϵ) globin zincirleridir (Polat ve vd. 2000). Döllenmenin 3. ve 8. haftasında yolk salk (sarı kese)'da eritrositlerin içerisinde bulunurlar ve gebeliğin 20. haftasına kadar kalırlar. Bu dönem de sırasıyla Gower-I ($\delta_2\epsilon_2$), Gower-II($\alpha_2\epsilon_2$), Portland-I ($\delta_2\gamma_2$) ve Portland-II ($\delta_2\beta_2$) hemoglobinleri sentezlenmektedir (Şekil 2.4). Döllenmenin 5. haftasından itibaren eritropoezin sarı keseden çıkarak fetal karaciğere kaymaya başlamasıyla fetal eritrositlerde fetal hemoglobin (HbF) oluşur. Döllenmenin 18. haftasından itibaren doğuma kadar kırmızı hücre iletimi görevi fetal karaciğerden kemik iliğine geçmeye başlar. Doğumdan sonra HbF ($\alpha_2\gamma_2$) miktarı azalırken HbA üretimi de artmaktadır. Bu yer değiştirmeye rağmen doğumdan yedi-sekiz ay sonrasına kadar da fetal hemoglobin

sentezlenmeye devam etmektedir (Dover ve vd. 1980, Nussbaum ve vd. 2001, Ciesla 2007).



Şekil 2.3. İnsan hemoglobin oluşumuna göre özel kromozomlar (Ciesla 2007)

Normal yetişkinlerde HbF toplam hemoglobinin %1'inden daha azdır. Gama globin zincirinin 136. kodonu alanin (A) amino asitini içeriyorsa $A\gamma$, glisin amino asitini içeriyorsa $G\gamma$ olmak üzere iki farklı zincir içermektedir (Hoffbrand ve vd 1985; Weatherall ve vd. 2006). Doğumda, $G\gamma$ zincirinin, $A\gamma$ zincirine oranı yaklaşık olarak 3:1'dir (Weatherall ve vd. 2006).



Şekil 2.4. Embriyonik ve fetal gelişimin farklı evrelerinde globin zincir sentezi

2.2. Fetal Hemoglobin

Fetal hemoglobin (HbF) 2 alfa (α) ve 2 gama (γ) polipeptit zincirinden oluşmaktadır. Fetal hemoglobin fetal yaşam boyunca ve doğumda toplam hemoglobinin %80'ini oluşturur. Gebeliğin 6. haftasından itibaren başlar ve fetal hayatın geri kalanı boyunca HbF üretilir. Doğumdan sonra yaşamın ilk iki yılında HbF sentezi hızla azalır ve yavaş yavaş periferel kanda HbA ile yer değiştirir. Yetişkinlerde ise HbF toplam hemoglobinin %1'inden daha az olarak bulunur (Rochette ve vd. 1994).

2.2.1. γ globin geni ve γ globin gen yapısı

Her iki fetal globin genlerinin dizisi yaklaşık 1980'li yıllarda açıklanmıştır. İki gen yaklaşık olarak 35 milyon yıl önce meydana gelen tahmini 5 kilobaz çiftinin peş peşe çoğaltılması sonucu oluşmuştur (Manca ve vd. 2008).

HbF ve HbA yapısal ve işlevsel olarak birbirlerine benzerler. Ancak bazı önemli farklılıklar vardır. γ globin zincirinin amino asit sekansı β globin zincirinin amino asit dizisinden 39-40 residue farklıdır (Perutz 1974). HbF yapısal olarak heterojendir. γ -globin geninin iki yanından bağlantılı genler tarafından kodlanmaktadır. 136. pozisyonda

γ -globin geninin 5' ucundan glisin (Gly) amino asiti bağlandığında $G\gamma$ (HBG2), 3' ucundan alanin (Ala) amino asiti bağlandığında $A\gamma$ (HBG1) globin genleri oluşur (Schroeder ve vd. 1968). Ayrıca $A\gamma$ geni ortak bir polimorfizm oluşturur; burada treonin ($A\gamma^T$), izolösin ($A\gamma^I$), γ^{75} (HbF Sardinia) kodonunda yerini alır. Gözlemlenen bu protein dizisindeki ve yapısındaki benzerliğin nedeni globin genlerinin ortak evrimini yansıtan gen duplikasyonu ve gen konversiyonudur (Steinberg ve vd. 2009).

Protein konformasyonu γ ve β globin zincirlerini ayırt eden 39 amino asit residuesinde 22 molekül yüzeyinde bulunan yüzey yükü dışındaki tetramer özelliklere sahip olma olasılıkları düşüktür. İçteki yer değişimler benzer polariteli amino asitleri içerdiği süre boyunca korunurlar. Sadece bazı koşullarda $\alpha_1\beta_1$ arabiriminde 4 kritik farklılıkla ayrışmaktadır. Bunlarda ikisi $\alpha_1\gamma_1$ arabiriminde yer alan $\gamma^{112}\text{Thr}$ ($\beta^{112}\text{G13}$) ve $\gamma^{130}\text{trp}$ (T130H8) HbA ile karşılaştırıldığında alkalik ve asidik HbF direnişine katkı sağlayabilmekte ve alkali denatürasyonun yapısal temelini oluşturmaktadır. Liganda bağımlı konformasyon değişikliklerinin merkezi olan $\alpha_1\beta_2$ arabiriminde dizi farklılıkları mevcut değildir. 116. pozisyonunda $\alpha_1\beta_1$ arabiriminde, γ globin zinciri izolösin ve β globin zinciri histidin içerir. γ zincir yerleşmeleri ile rekombinant β zincirleri kullanılarak, non- α zinciri G-18 pozisyonundaki amino asit hidrofilite dönüştürmede HbA ve HbF tetramerlerinin derlenmesinde kritik bir rol oynar; sırasıyla homotetramer, dimer ve monomer formasyonunun oluşumunda da önemli bir rol oynar. Aynı zamanda γ -globin zincirlerinin sabit dimer formasyonu in vivo olarak meydana gelmemelidir. Çünkü HbF oluşturmak üzere α zincirleri ile bağlanmasını önler. HbA'ya kıyasla HbF'nin artan tetramer gücü kısmen, γ -globin zincirinde 18- amino asit, A sarmalının β arabirimleri ve tetramer güçlendirilmesine katkısı olan amino asit farklılıklarına neden olur. HbF'nin artan tetramer gücünün önemli fizyolojik etkisi sıtma parazitinin fetal kırmızı hücrelere karşı gösterdiği dirençtir, bir etkisi de maternal HbA, HbF'nin O_2 elde etmesi için olanak sağlamasıdır (Yagami ve vd. 2002, Adachi ve vd. 2003, Steinberg ve vd. 2009).

Genel olarak bakıldığında 2.5 Å çözünürlük ile yapılan HbF yapısının kristallografik çalışmalarında deoksi-HbF ve deoksi-HbA yapılarının birbirine çok benzer oldukları, aralarındaki tek farklılığın ise γ globin zincirinin N-ucunda olduğu görülür. Bu değişiklik, γ_2 histidin amino asitidir ve HbF'nin sergilediği 2,3 BPG (bifosfoglisarat) etkisinde azalma muhtemelen ikinci bir hemoglobin molekülünün

merkezi boşluğu içine yerleştirilen 2,3 BPG arasındaki mesafeyi arttırır (Manca ve vd. 2008, Steinberg 2009).

2.2.2. HbF'nin fonksiyonel özellikleri

Yenidoğan alvuyarlarındaki eritrositler yetişkinlerden daha yüksek oksijen affinitesine sahiptir, fakat hemolizatlar içerisinde HbF ve HbA'nın oksijen affinitesi aynıdır. Bu HbF ve HbA aynı intrinsic O₂-bağlama özelliklerine sahiptir, fakat hemoglobin fonksiyonunun heterotopik düzenleyiciler ile farklı etkileşim içinde olduğunu göstermektedir. Bu etkinin birincil yapısal temeli fosfat bağlayıcı merkezin orta boşluğunda bir amino asit residuesinin yer değiştirmesiyle $\beta 143$ (H21) His $\rightarrow$ γ Ser dönüşümü gerçekleşir ve tetramer başına 8-6 katyonik 2,3 BPG bağlama gruplarını azaltır (Manca ve vd. 2008). γ globin zinciri değiştirilirse, N-terminal kısmının γ_2 histidin ile birlikte onun bağlayıcı fosfatı γ globin zincirinin asetilasyonu da 2,3BPG bağlanmasını inhibe eder (Steinberg ve vd. 2009).

HbF eritrositlerinde bozulmuş klorür (Cl⁻) etkisi görülür. Klorür içindeki merkezi boşluğa 2,3 BPG bağlanır. Düşük NaCl konsantrasyonunda HbF'nin O₂ affinitesi HbA'dan daha düşüktür. Yüksek Cl⁻ konsantrasyonun da bu fark ortadan kalkar. Bu etki T durumu anyonları için bağlanma affinitesinde azalma ile, merkezi boşluğun içinde pozitif yüklü bir azalmaya bağlı olabilir. Pozitif yüklenen nötrale anyon yokluğunda indüklenen T-durumunun stabilitesinin artması, düşük ligand affinitesinin lehine olur.

Son olarak, HbF tarafından üçüncü bir allosterik etkileyici olarak CO₂ bağlanması, HbA ile karşılaştırıldığında büyük ölçüde azaltılmıştır. PCO₂ (Partial pressure of carbon dioxide, karbondioksitin kısmi basıncı) geniş bir aralığında, HbF, HbA'dan daha az oranda protein bağlı karbamat formuna dönüşür, bu durum γ zincirinin N-ucunun 8.1 pKa (asitlik sabiti) değerine sahip olmasından kaynaklandığı açıktır. Bu değer β zincirinin sahip olduğu değerden oldukça yüksektir (pKa 5-6.6). Böylece fizyolojik koşullar altında γ zincirinin N-terminal amino asit grupları %90 protonlanmıştır ve CO₂ bağlanamaz hale dönüşmüştür (Manca ve vd. 2008).

Hem HbA hem de HbF'nin her ikisi de 2,3 BPG ve CO₂ yokluğunda geliştirilmiş bir alkali Bohr etkisine sahiptir. HbF alkali Bohr etkisinin HbA'da olduğu gibi Cl₂'e bağlı olduğu görünmektedir. HbF'nin Bohr etkisi Cl⁻ konsantrasyonu ile artarken, düşük anyon

konsantrasyonunda HbA ve HbF’de özdeş Bohr etkisi görülür. Bu Cl⁻’ün etkisi ile olabilir. Bununla birlikte fizyolojik Cl₂ konsantrasyonunda HbF’nin Bohr etkisi HbA’ya göre yaklaşık %20 daha fazladır. Bunun mantıklı bir açıklaması HbA’nın düşük Bohr etkisinin, düşük pH’da protonlanmış β 143 histidin amino asitinin R yapısına Cl₂ bağlanır olmasıdır. Cl₂ ve protonun R yapısının stabilitesinde bu büyüme HbA’nın asit Bohr etkisine katkıda bulunabilir. HbF’de bu etkileşimin olmaması, asit bohr etkisini yarıya indirir ve böylece alkali Bohr etkisini arttırır. Fetal eritrositlerinde artan alkali bohr etkisi fizyolojik öneme sahiptir. Aslında bohr etkisi 2,3 BPG etkisi olmadan anne ve fetüs arasındaki toplam O₂ transferinin %40’ını oluşturmaktadır. Sonuç olarak HbF için alkali Bohr etkisi tercih edilir (Dumoulin ve vd. 1977, Manca ve vd. 2008).

HbA ile HbF’nin $\alpha_1\beta_1$ yapısı arasında 4 farklı substitüsyon (baz değişimi) mutasyonu ile HbS, HbF benzeri bir hale döndürüldüğünde, elde edilen hibrid molekül HbF gibi 2,3 BPG’ye zayıf bağlanmaktadır. Bu durum 2,3 BPG bağlama ve dimerizasyonunun bahsedilen basitçe kritik residüle bağlı olmadığı fakat bununla birlikte diğer etkileşimlerin de önemli olduğunu göstermektedir (Steinberg ve vd. 2009).

2.2.3. HbF içeren eritrositlerin fizyolojisi

Fetal dolaşımında O₂ taşıma doğumda bulunan gaz-sıvı arayüzü ile karşılaştırıldığında sıvı-sıvı arayüzü üzerinden yapılır. Fetal hemoglobinin oksijen affinitesi yetişkin hemoglobinkinden çok daha büyüktür. Anne kanındaki oksijenin parsiyel basıncı düşük olmasına rağmen, fetal eritrositlerin O₂ affinitesi plesentada O₂ alımını arttırır. Artan P50’ye rağmen HbF’nin 2,3 BPG yanıtı azalır, O₂ teslimi artan Bohr etkisi ile telafi edilir. Bunun nedeni 2,3 BPG’ye karşı affinitesinin az olmasıdır. 2,3 BPG hemoglobinin oksijen affinitesini azaltır ve kanda 2,3 BPG konsantrasyonu artarsa, oksijeni hemoglobinden ayrılmaya zorlar. HbF az miktarda 2,3 BPG’ye bağlandığından, daha çok oksijen bağlar ve böylece anne kanından fetüse daha çok oksijen geçmesi sağlanır (Garver ve vd. 1977, Brittain 2002, Steinberg ve vd. 2009).

2.2.4. Fetal hemoglobin dönüşümü

Yetişkinlerde HbF %1’den daha az olarak bulunur. Doğumda HbF konsantrasyonu %85 ile %55’e kadar geriler fakat %1’lere kadar gerileme yeni doğanlarda

yaklaşık bir yıl sürer. Yaşamın erken dönemlerinde ise $G\gamma$ (HBG2) ve $A\gamma$ (HBG1) globin genlerinin ifadeleri oluşur. Çoğu kişilerde $A\gamma$ globin zincirlerinde bir artış olmasına rağmen yaşamın ilk 3 ayında $G\gamma$ zincirlerinde bir azalma gerçekleşir, ancak bebeklerin az bir kısmında özellikle HBG2-158C→T SNP (tek nükleotid polimorfizmi)'de mevcut γ globin ifadelerini korurlar. Yenidoğan dönemi yaklaşırken, fetal HBG1 ve HBG2 genlerinden yetişkin HBB (β globin) geninine geçiş başlar. Bu geçiş normalde süt çocukluğu döneminde tamamlanır ve yaklaşık 6 ay kadar sürer. Non-anemik yetişkinlerde, düşük seviyelerdeki HbF, F hücreleri olarak adlandırılan eritrositlerin küçük bir yüzdesi olarak büyük ölçüde konsantre edilir. Zaman zaman, belirli patolojik koşullarda nadir mutasyonlara bağlı olarak HbF seviyesi yükselebilir (Sankaran ve vd. 2010).

Yapılan bir çalışmada ortalama hücre hacminin (MCV) azalması neticesinde fetal hücrelerin sayısının da doğumdan sonra hızlı bir şekilde düşmesine neden olmaktadır ki bunu F hücre sayısının da ciddi bir şekilde düşmesi takip etmektedir. Orak hücre anemili hastalar, γ globin gen ifadesinin β^s globin gen ifadesine dönüşümünü ve ayrıca HbF'nin HbS'ye de dönüşümünü sağlayan yetersiz bir düğmeye sahiptir. Bu hastalarda stabilize HbF düzeyine 20 yıl boyunca ulaşamamaktadır. γ globin gen ifadesinin düşmesinde bir gecikme olması anemiye neden olabilir çünkü çok hafif anemi ile talasemi taşıyıcılığı olan bireylerde orak hücre anemi hastalarında daha ılımlı olsa bile HbF dönüşümünde bir gecikme gösterirler (Steinberg ve vd. 2009).

2.2.5. HbF'nin hücresel heterojenitesi

Fetal hücrelerde, fetal eritrositler HbF hemoglobini %100'e yakın üretirler. Yaşamın ilk 10 günü içinde hemoglobin sentezi, fetal düzeylerini 10 misli azaltır ve bu azalma doğum sonrasında ilk 2-3 gün içinde olur. F hücrelerinde HbF nonfetal ya da yetişkin hemoglobinler arasında dengesiz dağılmıştır. Düşük pH değerinde HbF ayrılarak HbA'yı oluşturur.

Asit elüsyonu veya 'Betke' testi ile F hücrelerindeki HbF düzeyi ölçülebilir. Varolan birçok HbF, F hücrelerinin sayısını belirlemek için kullanılan yöntemin duyarlılığına bağlıdır. Bir ölçüde hassas olmayan, asit- elüsyon yöntemi ile hücre başına minimum 5-6 pg HbF miktarı tespit edilebilir. Radyal immunoprecipitation yöntemleri

ise hücre başına 3 pg HbF miktarına sahip hücreleri tespit edilebilir. Fakat akış sitometrisi, F hücrelerini numaralandırarak en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntem 6 pg HbF içeriğine sahip hücreleri algılayabilir (Boyer ve vd.1975, Dover ve vd.1981).

Kullanılan yöntemlere bağlı olarak, Kafkas yetişkin ırkında F hücreleri % 1.7±% 2.2 ile % 2.6±% 1.6 HbF içerirken, normal Afrikalı Amerikalılarda % 2.8±% 1.6 arasında HbF içermektedir. Bu durumda algılama sınırlarının altındaki HbF düzeyleri sayılmayacaktır. Olgun F hücreleri 4.4±0.3 pg HbF içermektedir. Afrikalı Amerikalı orak hücre anemisi olan kişilerde, F hücre aralığı %2-% 80 ve F hücre başına düşen HbF miktarı 6.4±1.6 pg arasında olduğu saptanmıştır (Amoyal vd. 2004). β talasemi hastalarında F hücrelerinin sayıları artmıştır. Orak hücre taşıyıcılığı ile ilgili bir çalışmada, HPLC ile belirlenen HbF düzeyi %1.4 olmuştur, F hücreleri ise %14.1±% 7.5 arasındadır (Italia ve vd. 2007, Steinberg ve vd. 2009).

Nadir olarak normal bireylerin kanlarında % 8' den daha fazla F hücresi vardır. Bu vakaların çoğunda, F hücreleri evebeynlerde benzerdirler. Bunların çoğu non-delesyonel fetal hemoglobinin kalıtsal kalıcılığına neden olurlar. Bu çalışmalar eksik çalışılmış olsa da F hücre sayıları, etkilenen yaşa ve etkisi artmış akut eritropez durumuna göre HbF ve F hücreleri sayısının geçici artışlarına neden olabilir. F hücrelerinde HbF dağılımı ve konsantrasyonu farklı olabilir. Orak hücre anemisi olan hastaların F hücre başına HbF'nin bireysel karakteristik dağılımları bulunmaktadır. Bu varyansın patofizyolojik etkileri, bazı hücrelerde HbF konsantrasyonları hastalığı etkileyerek HbS polimerizasyonunu geciktirebilir. Biotin ile etiketlenmiş otolog orak hücre eritrositlerinin infüze edilme zamanına bağlı olarak tüm bireylerde F hücrelerinin yüzdesi ile ters korelasyon ile non-F hücrelerinin daha uzun hayatta kalabildikleri saptanmıştır. Dolaşımda HbF içeriği yüksek hücrelerin, HbF içeriğinin artmasının hayatta kalma ile ilişkili olduğunu düşündürmüştür (Franco ve vd. 2006, Steinberg ve vd. 2009).

F hücreleri klonal değildir ama gelişim sırasında kendine özel bazı vasıflara sahip olduğu görülmektedir. Polisitemi vera, paroksimal gece hemoglobinüri, Philadelphia kromozom pozitif kronik granülositik lösemi dahil monoklonal bozukluklara sahip bireylerde F hücreleri normal oranda mevcuttur. Bu durum erişkin kırmızı hücrelerde, ilişkili F hücreleri ve i-antijeni, fetal benzeri hücreler için bir belirteç olarak kabul edilmektedir. HbF ve retikülositler için çift etiketleme tekniği kullanılarak yapılan analizlerde, orak hücre anemisi F retikülositleri % 10.6±% 7.0 olarak algılanır. Bu

gözlemler orak hücre anemili F hücrelerinin tercihi sorusunu gündeme getirir. Tercihli sağkalım F retikülositlerin fazla F hücreleri ile mümkündür. Artan F hücrelerinin hayatta kalması HbS polimerizasyon inhibisyonu sonucu olabilir. Çünkü F hücrelerinin fagositoz ve endotel hücre uyumu bulunmamaktadır (Steinberg ve vd. 2009).

2.2.6. HbF laboratuvar algılma

HbF'yi tespit etmek için en yaygın olarak kullanılan yöntem alkali denatürasyon direncidir. Singer ve arkadaşları (1951) tarafından geliştirilen bu yöntemde seyreltik hemolizat 1 dakika süre ile, pH 12-17 NaOH çözeltisine maruz bırakılmakta ve çözelti daha sonra nötralize edilmektedir. Oksihemoglobin A bu işlemde bütünüyle denatüre olmakta ve amonyum sülfat ile çöktürülmektedir, fakat HbF çözelti içinde kalır ve spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Yöntem, basit olduğu için avantajlıdır, hemoglobin düşük seviyelerde ise kesin sonuçlar vermektedir fakat HbF düzeyi yüksek olan hücrelerde çok düşük sonuçlar verebilmektedir. Daha kesin tahminleri standart koşullarda numunenin denatürasyonunun gerçek oranı ölçülerek elde edilebilir. Yöntem, embriyolarda küçük örnekleri okuyan bir mikro ölçeklere uyarlanmıştır. Betke ve arkadaşları (1959) en az 10°C'de HbF içeren numunelerin ölçülmesi için cyanmethaemoglobinin kullanıldığı singer yönteminde değişiklik yapmışlardır. Hücre içi HbF Kleihauer testi ile saptanabilir. Bu durumda HbF HbA'dan biraz daha zor bir şekilde pH 13-12 düzeyinde sitrat buffer içinde elüte edilir. Hemoglobin elüsyonunu takiben hücreler hematoksilin ve eozin ile boyanır. Boyama derecesi hücrelerde HbF miktarı ile doğru orantılıdır. HbA içeren hücreler zayıf boyanırken, kordon hücreleri gibi yüksek HbF içeren hücreler ise kuvvetli boyanırlar. HbF'nin hücresel dağılımı ise floresan işaretli anti-HbF antikoru kullanılarak tespit edilebilir. Her iki yöntem, bireysel eritrositlerin HbA ve HbF sentezleme yeteneğine sahip olduğunu göstermektedir (Lorkin 1973).

Aynı kan örneğinde HbF'nin farklı yöntemlerle ölçülmesi farklı sonuçlar verebilir. Dolayısıyla HbF'yi belirleyen en hassas yöntem kan HbF konsantrasyonuna göre değişir. HbF ölçümü için en fazla kullanılan yöntem HPLC ile yapılan analizdir. Normal yetişkinlerde, katyon değişimli HPLC ile ölçülmüş HbF konsantrasyonları % 0.1 ve % 0.4 arasında bulunmuştur (Leonova ve vd.1996). Miktarın düşük olması cinsiyete bağlı olabildiği gibi, β globin gen kümesinin polimorfizmleri veya γ globin gen promoter

mutasyonundan kaynaklanabilir, aksi takdirde tüm normal bireylerde HbF düzeyinde artış görülebilir.

2.2.7. γ -globin gen mutasyonları (HBG1 ve HBG2)

100'e yakın $G\gamma$ -globin gen, $A\gamma$ -globin gen ve $A\gamma^T$ -globin gen mutasyonu belirlenmiştir. γ -globin zincir varyantları, fetal ve neonatal yaşam boyunca sentezledikleri hemoglobin molekülünü değiştirmezler fakat yaşamın ilk yılından sonra genellikle mevcut olan HbF miktarı sadece eser miktarda üretilir ve bu nedenle nadiren tespit edilebilir. Mutasyonlar $G\gamma$ -globin, $A\gamma$ -globin ve $A\gamma^T$ -globin genlerinin lokuslarında veya regülasyon dizilerinde mevcut olabilir. Kromozomal γ -globin genlerinin düzenlenmesi ve diğer birçok faktöre bağlı olarak $G\gamma$ -globin gen varyantları oranı yaklaşık %5 ile %30 arasında olabilir, bu durum yenidoğan hemoglobinlerinde mevcuttur, toplam hemoglobindeki miktarı ise %25 civarındadır. $A\gamma$ -globin gen varyantları bu miktarın yaklaşık yarısı kadardır. Bu fark nedeniyle $G\gamma$ -globin gen fetal eritrositlerinde daha fazla ifade edilir. γ -globin gen varyantları ve γ talasemi varyantları yüksek veya düşük oksijen affinitesine sahip olabilirler (Wood 2001, Steinberg ve vd. 2009).

HbF-Sardinia (HBG1 (E19) ile 75thr) $A\gamma^T$ geninde mevcut fonksiyonel ve klinik anormallikler oluşturmayan en sık görülen polimorfizmdir. Birçok toplumlarda yüksek frekansta olmasına rağmen, Cameroon haplotipin taşıyıcıları hariç Afrikalılar ve Afrika kökenli bireyler arasında düşük frekansta mevcuttur. Bu polimorfizm modelinde, yüksek frekans için bir neden belirlenmemiştir, ancak düşük frekans oranının görüldüğü Afrikalıların çoğunda ve yüksek frekans oranlarına sahip başka Afrikalı insanlarda bu oranların selektif bir avantajdan ziyade basınçla ilişkili olduğu bildirilmiştir. HbF-Sardinia Afrikalı insanlarda görülen mutasyonları tanımlamaktadır. β talasemi ile ilgili nokta mutasyonlarını saptamak için zaman harcanmasından dolayı γ talasemi ilgili çalışmalar uzunca süre ihmal edilmiştir. Şu anda ise γ talasemi ile ilgili mutasyonların çoğunun delesyon şeklinde olduğu bilinmektedir ve $\gamma\delta\beta$ talasemi veya $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemi şeklinde sınıflandırılmaktadır (Steinberg ve vd. 2009).

$A\gamma^+$ talasemi fenotipi, $A\gamma$ ve $G\gamma$ globin genlerinin her ikisinde oluşan IVS II-115 A-G substitüsyonundan, ayrıca $G\gamma$ globin gen poliadenilasyon bölgesi 6.pozisyonunda yer alan bir A delesyonundan kaynaklandığı ileri sürülmüştür. Oysa IVS II substitüsyon mutasyonları yaygın polimorfizmleri olduklarını düşündüren $G\gamma$ geni için 0.86 ve $A\gamma$

globin geni için 0.73 gen frekanslarına sahip olduğu görülmektedir. Sadece bir γ talasemi vakası $G\gamma$ ve $A\gamma$ globin geni arasındaki eşit olmayan krossingoverden, etkilenen kromozom kaynaklı bir γ globin gen delesyonundan ve Hb Lepore tipi genlere benzerlik gösteren bir melez γ globin geninden kaynaklanmaktadır. Heterozigotlarda, iki homozigotta ve bu delesyona sahip yeni doğan homozigotlarda $A\gamma$ tipinin tamamında HbF oranı sadece %50 olarak bulunmuştur (Steinberg ve vd. 2009).

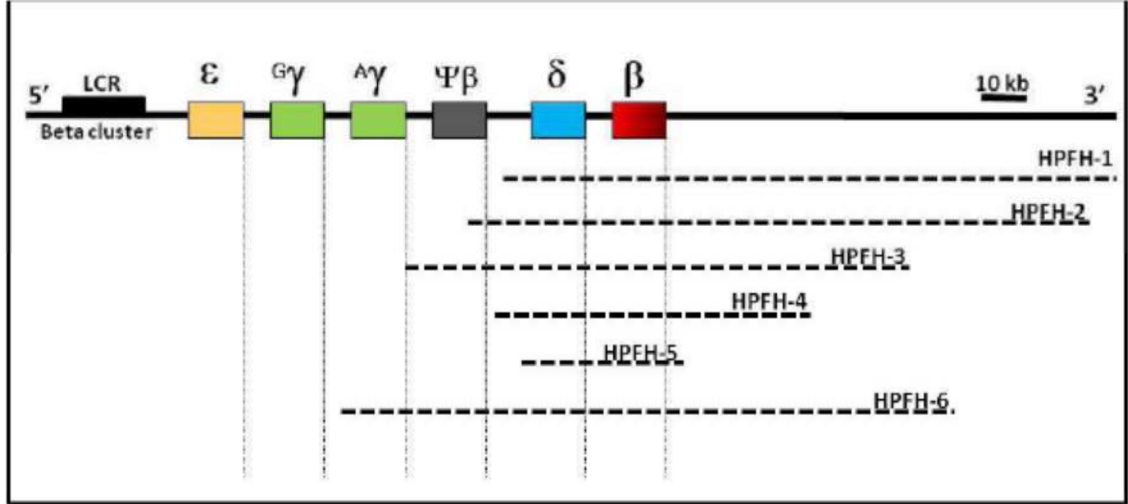
2.3. Fetal Hemoglobinin Kalıtsal Kalıcılığı (HPFH)

Fetal hemoglobinin kalıtsal kalıcılığı, herhangi bir hematolojik bozukluk olmaksızın yetişkin hayatta HbF üretilmesiyle belirlenen kalıtsal bozukluklar için bir dizi tanımlayıcı terimdir. HPFH genotipik ve fenotipik koşullara sahip heterojen bir grup içerir (Bollekens ve vd. 1991, Wood 2001).

2.3.1. Delesyonel HPFH

Delesyonel HPFH, HbF artışına neden olan $G\gamma$ ve $A\gamma$ geninin yerleştiği β globin gen kromozomunda DNA dizilerinin delesyonları ile ilişkilidir. Delesyonel HPFH heterozigot bireylerin eritrositlerinde toplam hemoglobinin %20-30'u kadar HbF artışı söz konusudur (Cunha vd. 2012). Delesyonel HPFH bazı etnik gruplarda oldukça yaygındır. Afrika kökenli Amerikalılardaki yaygınlığı yaklaşık 1/1000'dir (Landman ve vd. 1998, Wood 2001).

Bugüne kadar 6 farklı tip delesyonel HPFH karakterize edilmiştir (Şekil 2.5). HPFH-1 ve HPFH-2, δ ve β globin gen kümesinin DNA dizisinden yaklaşık olarak 105 kb büyük bir delesyon olarak karakterize edilir. HPFH-3 ve HPFH-4 delesyonları $\psi\beta$ ve β globin DNA dizilerinde yaklaşık 50 kb'lık delesyonlar ile kısalmaktadır. HPFH-5 β globin geninin 0.7 kb aşağısından δ globin geninin 3kb yukarısından delesyonuyla karakterize edilen küçük bir delesyon içermektedir. Son olarak HPFH-6 $A\gamma$ globin gen ile birlikte tip 1 ve 2 de görülen benzer delesyon profilleri içermektedir (Cunha ve vd. 2012).



Şekil 2.5. Doğum sonrasında fetal hemoglobin artışına neden olan delesyonların HPFH-pozisyonlarının β globin gen kümesinde yerleşimleri (Cunha ve vd. 2012).

Delesyonel HPFH'nin tanımlanan ilk türü $\delta\beta^0$ türüydü ve bu Baltimore'da Afrika kökenli Amerikalı zenci bir çocukta tanımlanmıştı. Alternatif bir tanımlamayla $G\gamma^A\gamma \delta\beta^0$ HPFH şeklinde de isimlendirilmektedir. Şu an $\delta\beta^0$ HPFH olarak sınıflanan en az altı farklı delesyon bulunmaktadır. Bu tip mutasyonlardan ikisi Afrika kökenlilerde, birisi Hintlilerde, ikisi İtalyanlarda ve birisi de Vietnam/Güneydoğu Asyalılarda bulunmaktadır (Bollokens ve vd. 1991, Stamatoyannopoulos ve vd. 1994, Wood 2001). Bunların hepsinde δ ve β genleri delesyona uğramıştır fakat γ genlerinin ikisi de tamamen normaldir. Homozigotlar hiçbir δ veya β genlerine sahip olmadığı gibi, bunlar hemoglobin A veya A_2 de sentez edemezler. Hemoglobin F mevcut hemoglobinin %100'ünü oluşturur. Hem $G\gamma$ hem de $A\gamma$ zincirleri sentezlenir ama oranları farklı kişilerde değişiklik gösterir. γ zincir sentezini, β zincir sentezinin eksikliğini telafi eder, bu nedenle böyle kişilerde anemiye rastlanmaz (Forget 1998).

$\delta\beta^0$ HPFH genotipine sahip heterozigotların değişken bir hemoglobin F oranı vardır. Bazı taşıyıcılarda hemoglobin A_2 oranı ya biraz azalmış ya da bir çok kişide olduğu gibi normal düzeyin yaklaşık yarısı civarında ölçülmüştür. Hemoglobin konsantrasyonu ise normaldir, ancak MCV ve MCH biraz azalabilir. MCH ortalaması HPFH-1'de 26 pg'dan HPFH-3'te 28 pg'a kadar değişiklik gösterir. MCV, alt tipleri arasında olduğu gibi normalin alt sınırından normal bir ortalama kadar bir varyasyonu gösterir (Wood 2001). Kleihauer A testi yada akım sitometrisi, hemoglobin F'nin pancellular dağılımını gösterir, fakat hücreden hücreye biraz farklılaşma görülebilir. Globin zincir sentez oranı yaklaşık olarak normaldir. Homozigotlar anemik değildir,

aslında hemoglobin F, hemoglobin A'dan daha fazla oksijen affinitesine sahip olduğu için hafif polisitemi olabilir. Bazı homozigotlarda kırmızı hücre endeksleri, artan RBC (red blood cells, kırmızı kan hücreleri, eritrositler), azalan MCV (mean corpuscular volume, ortalama alyuvar hacmi) ve MCH (mean corpuscular hemoglobin, ortalama hemoglobin miktarı)'li talasemi özelliğindeki kırmızı hücre dizinlerine benzerler. Diğer bazı homozigotlarda RBC üst sınırlarda iken MCV ve MCH kendi normal değerlerinin altına doğru azalır. Retikülosit sayımı normaldir. Kan analizi hedef hücrelerde anizositoz, poikilocytosis, hafif hipokromi, hafif mikrositoz gösterebilir. Sferositlere benzeyen hücreler (muhtemelen düzensiz hücreler) tarif edilmiştir. Globin zincir sentezi, yaklaşık 1,4-3,0 $\alpha:\alpha$ olmayan β talasemi indeksine benzer bir dengesizlik gösterir. Kleihauer A testi hemoglobin F'nin kaçınılmaz bir özelliğinden dolayı pancellular dağılım gösterir (Wood 2001, Bain 2006).

Hemoglobin Kenya heterozigotlar da delesyonel pancellular HPFH'nin bir varyantını üretirler. Bir δ geni delesyona uğramış olduğundan hemoglobin A2 daha düşük bir oranda bulunur. Heterozigotlar hematolojik olarak normal veya hafif anemi gösterebilir. Globin zincir sentezi ise dengelidir. β geni için delesyonel HPFH yaklaşık %30 hemoglobin F'li ve yaklaşık %70 hemoglobin S'li şeklinde çok hafif bir oraklaşma bozukluğuna yol açar. Hemoglobin A2 düşük, normal veya azalmış olabilir (Wood 1993).

2.3.2. Non-delesyonel HPFH

Non-delesyonel HPFH G_γ ve A_γ genlerinin promotör bölgesinde bir nokta mutasyonu ile karakterize edilir (Cunha ve vd. 2012). Bununla birlikte, aynı zamanda G_γ ve A_γ genlerin fazla sentezlenmesinin olduğu heteroselüler nondelesyonel HPFH'nin daha az karakterize formları da bulunmaktadır. Çünkü γ globin gen ekspresyonunun kısıtlı deseninin nondelesyonel HPFH formlarında G_γ ve A_γ genlerinin mutasyonlardan etkilenen genin yakınında olmasının muhtemel olduğu varsayılmıştır (Forget 1998).

Non-delesyonel HPFH hastalıkların heterojen grubunu oluşturur. En sık görülen formu β globin gen kümesinin düzenleyici dizileri içinde polimorfizm ile ilişkilidir. G_γ geninden -158 pozisyonunda C→T değişimi vardır ki bu Xmn1 enzimi için hücre bölünmesi alanı oluşturduğundan zaten tespit edilmiştir. Burada kısa olsun diye, bu mutasyonu göstermek için -158 pozisyonunda G_γ C→T kullanılmış ve non-delesyonel HPFH ye yol açan diğer mutasyonlar için benzer kısaltmalar kullanılmıştır. Genellikle

HPFH'ler kategorize olmasa da bir başka polimorfizmde hemoglobin F yüzdesini etkiler. Bu durum β globin kümesinin 2 LCR hiperduyarlı alanında 2(HS₂) tekrar dizilerine dayanmaktadır. Dizi (AT)_xN₁₂GT(AT)_y olarak belirlenmiştir ki burada x ve y bir dizinin sekanslarının değişken sayılarıdır. (AT)₉N₁₂GT(T)₁₀ hemoglobin F'in artan sentezi ile ilişkilidir ve tekrarlanan dizilerinde en az sekiz farklı kombinasyonları vardır. -158 de hem (AT)₉N₁₂GT(AT)₁₀ hem de C→T normal bireylerde F hücrelerinin sayılarındaki artış ile ilişkilidir. Hemoglobin F'nin artan sentezi ile -158 ^Gγ C→T birlikteliği sadece (AT)₉N₁₂GT(AT)₁₀ ile ilişkilidir. Ancak bu çeşitli bağlamlarda hemoglobin F artışında -158 ^Gγ C→T ile bağlantısını gösteren diğer çalışmaların sayısı nispeten azdır (Bain 2006).

Hemoglobin F konsantrasyonu, trans-etkili faktörleri kodlayan genler tarafından etkilenir. Bir F hücresinin üretimini etkileyen genler Xp22 ,6q23 ve 8q kromozomlarında yerleşmişlerdir. Bunlar hem ^Gγ hem de ^Aγ globin zincirlerinin sentezi artırır ve ^Gγ^Aγ HPFH'ye neden olmaktadır (Rochette ve vd. 1994, Bain 2006).

Non-polimorfik nondelesyonel HPFH β globin gen kümesindeki çoğunlukla nokta mutasyonlarından, daha seyrek olarak küçük delesyon veya insersiyonlardan kaynaklanmaktadır. HPFH δ ve β globin genlerinin kendilerinden kaynaklanmamaktadır. ^Gγ ya da ^Aγ genlerinin 5' promotör bölgelerinde nondelesyonel HPFH mutasyonu yüksek oranda korunmuştur. Bu genlerin transkripsiyon başlatma alanları olan -202(^Gγ ve ^Aγ), -198(^Aγ), -196(^Aγ), -175(^Gγ ve ^Aγ), -161(^Gγ), -158(^Gγ), -117 (^Aγ) ve -114(^Gγ ve ^Aγ) pozisyonlarında mutasyonlar tanımlanmıştır (Çizelge:2.2) (Stoming ve vd. 1989, Rochette ve vd. 1994). Bu mutasyonlar promotöre trans- aktif faktörler bağlanmasını değiştirebilir. Bu tip nondelesyonel HPFH, ^Gγ veya ^Aγ zincirinin sentezinin artmış olup olmamasına göre kategorilendirilebilir. ^Gγ zincir sentezlerinin artması sonucunda ^Gγ zincirinin üst mutasyonlarında ve ^Aγ zincir sentezlerinin artması sonucunda da ^Aγ zincirinin üst mutasyonları da artar. İlginç bir şekilde genellikle bu genlerin 5' pozisyonunda aynı mutasyon tipi tespit edilmiştir (Bain 2006).

Mutasyonlar eritrosit-özel transkripsiyon faktörlerine özgü olası bağlanma yerleri olarak γ promotör bölgelerinde kümelenmiştir. Bu mutasyonlar ya inhibe edici transkripsiyon faktörü için affinite azalması, ya da bir pozitif düzenleyici faktörleri için affinite artışı ile sonuçlanan mutasyonlardır ki bu mutasyonlar protein yapısını değiştirmemektedirler. Mutasyonlar -202, -198, -196 ve -195 Spl faktörünün G+C zengin alanına transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını etkilemektedirler. -175 mutasyonları in

vitro OCT-I proteinin bağlanması engellerken GATA-I bağlanma modelini değiştirmemektedir. CCAAT kutuları, GATA-1 ve eritrosit-özgü protein genleri de dahil, NF-E3 için de bağlanma yerleri arasında yer almaktadır. Benzer şekilde, -117, -114 ve 13 bp delesyonu, CPL, CDP, GATA-1 ve NF-E3 de dahil olmak üzere çeşitli proteinlerin in vitro bağlanma şablonlarının değiştirebildikleri gösterilmiştir (Rochette ve vd. 1994, Forget 1998).

Çizelge 2.2. Non-delesyonel HPFH promotör bölge mutasyonları (Forget 1998)

Type and Racial Group	Mutation in Globin Gene	Percentage of Hb F in Heterozygotes
Pancellular $\alpha\gamma$ HPFH		
Black	$\alpha\gamma$: -202 (C→G)	15–25
Black	$\alpha\gamma$: 175 (T→C)	20–30
Sardinian	$\alpha\gamma$: -175 (T→C)	17–21
Japanese	$\alpha\gamma$: -114 (C→T)	11–14
Pancellular $\beta\gamma$ HPFH		
Southern Italian	$\beta\gamma$: -196 (C→T)	12–16
Chinese	$\beta\gamma$: -196 (C→T)	14–21
Black	$\beta\gamma$: -175 (T→C)	36–41*
Greek	$\beta\gamma$: -117 (G→A)	10–20
Sardinian	$\beta\gamma$: -117 (G→A)	12–16
Black	$\beta\gamma$: -117 (G→A)	11–16
Black	$\beta\gamma$: -114 to -102 deleted	30–32
Pancellular $\alpha\beta\gamma$ HPFH		
Chinese	Unknown	20–25
Heterocellular $\alpha\gamma$ HPFH		
Black (Atlanta)	$\alpha\gamma$: -158 (C→T)	2.3–3.8
Japanese	$\alpha\gamma$: -114 (C→T)	11–14
Heterocellular $\beta\gamma$ HPFH		
Black	$\beta\gamma$: -202 (C→T)	1.6–3.9
British	$\beta\gamma$: -198 (T→C)	3.5–10
Brazilian	$\beta\gamma$: -195 (C→G)	4.5–7
Black (Georgia)	$\beta\gamma$: -114 (C→T)	2.6–6
Heterocellular $\alpha\beta\gamma$ HPFH		
Swiss	Unknown	1–4
Black (Seattle)	Normal γ -gene promoters	3–8

Normal bireylerde HbF düzeylerindeki küçük artışlar ile karakterize başka nondelesyonel HPFH formları da bulunmaktadır. Çünkü HbF F hücreleri arasında düzensiz dağıtılır. Bu form genellikle heteroselüler HPFH ya da İsviçre modeli HPFH olarak adlandırılmaktadır ki İsviçreli bir grup askerde HbF düzeylerinde küçük artışlar olduğu saptanmıştır. β globin gen kümesi nondelesyonel HPFH türlerinde olduğu gibi sağlamdır ama etkilenen bireylerin γ promotörlerinde mutasyon bulunabilir. Heteroselüler HPFH genetik olarak heterojen olabilir, bazı ailelerde HPFH β gen kümesi ile ilişkilendirilmemiş olsa bile bazı ailelerde, bu β kompleks alleli olarak davranır. X'e bağlı

kalıtım, bazı durumlarda ve diğerlerinde otozomal kodominant olarak önerilmiştir (Rochette ve vd. 1994).

Nondelesyonel HPFH vakalarında hemoglobin F sentezi artmıştır, fakat α ve non- α zincir sentezi azaltılarak dengelenmesine rağmen A ve A₂ hemoglobin sentezi devam etmektedir (Bain 2006).

Pancellular $G\gamma$ tip HPFH'nin Afrika popülasyonundaki deneklerde gözlemlenen $G\gamma$ geninde -202 ve -175 lokalizasyonlarında iki nokta mutasyonu saptanmıştır. Hemoglobin F $G\gamma$ tiplerinin neredeyse tümünde sırasıyla %15-25 ve %17-30'unu oluşturmaktadır. Heterezigot kombinasyonlarda hemoglobin S'nin, HPFH determinantlarında cis β geninin ekspresyonu azaltılmış olsa da, ifade edilmeye devam ettiği görülmektedir. Bu mutasyonların ikincisi de aynı zamanda Sardinyalılarda ve Beyaz İngiliz bireylerde görülmüştür. Diğer $G\gamma$ gen mutasyonları ya heterosellüler ya da pancellular HPFH şeklinde siyahılar, Japonlar ve Yugoslavyalılarda gözlenmiştir (Bain 2006).

Pancellular $A\gamma$ HPFH tipik -117 $A\gamma$ G→A tipi mutasyon içermektedir. Başlangıçta Yunanlılarda gözlenmiştir, ancak daha sonra Sardinyalılar, Çin ve Afrika kökenlilerde de görüldüğü belirlenmiştir. Özellikle $A\gamma$ tipi hemoglobin F yüzdesi genellikle %10-20 civarında ölçülmüştür. Globin zincir sentezi dengelidir ve bireylerde hiçbir hematolojik anormallik gözlenmemektedir. İki homozigotta yaklaşık %75 hemoglobin A, %24 hemoglobin F ve %0.8 hemoglobin A₂ ölçülmüş, bu da HPFH belirleyici cis δ ve β genlerinin düşük seviyede de olsa ifade edildiklerini göstermektedir. Ya pancellular veya heterocellular HPFH şeklinde tanımlanan diğer $A\gamma$ promotör mutasyonları, beyaz, siyah, (İngiliz, Avustralya, İtalyan), Çin ve Brezilyalı gibi farklı etnik kökene sahip popülasyonlarda tarif edilmiştir. Bunlar genellikle nokta mutasyonların sonucunda görülse de bir mutasyon CCAAT kutusunda ve diğer bir mutasyonda -115 den -111'e kadar olan bölgede -13 baz çifti delesyonu şeklinde tanımlanmıştır (Forget 1998, Huang ve vd. 2000).

2.4. HbF Varyantları

Şu ana kadar $G\gamma$ ve $A\gamma$ globin zincirlerinin 79 tane varyantı tespit edilmiştir. HbA varyantlarına kıyasla gözlemlenmiş HbF varyantlarının oldukça düşük sayısı teknik

nedenlerden kaynaklanmaktadır bunlar doğumda hemoglobinopatilere yönelik protein artıkları ve toplanan kan miktarının genelde az olması sayılabilir. Ayrıca yaşamın ilk yılında HbF sentezinin azalması ek bir sınırlamayı da temsil eder. Aynı nedenlerden dolayı 2 düzeyinde karakterize edilmiş HbF varyantlarının sayısı hemen hemen ihmal edilmiştir. Bu sorunlara rağmen, nötr-nötr amino asit yer değiştirmelerinden dolayı ortaya çıkan HbF varyantlarının sayısı, elektroforetik ayırma yöntemlerinin benimsenmesi nedeniyle oldukça yükselmiştir. Bununla birlikte, özellikleri değiştirdiği rapor edilen mutantların sayısının göz ardı edilmemesi için birkaç γ geni varyantlarının fonksiyonel çalışmalara tabi tutulması da gerekmektedir (Manca ve vd. 2008).

Anormal HbF'ye yol açan mutasyonlar $G\gamma$ ve $A\gamma$ genlerini etkiler, bu HbF varyantlarının çoğu nokta mutasyonlarından kaynaklanır. Genel bir kural olarak doğum esnasında $G\gamma$ varyantının oranı 23-37% civarında olmalıdır. $A\gamma$ varyantının oranı ise kabaca 7.5-17% olmalıdır. Böylece yeni doğanlarda toplam $G\gamma:A\gamma$ oranı beklenen miktar olan 70:30 oranında ortaya çıkabilir. Yine de, mutasyona uğramış geni değerlendirirken γ -globin lokusuna özgü birkaç hususun göz önünde bulundurulması gerekir. İki genin şifreleme bölgesi, kodon 136'da farklılık gösterdiği için o düzeydeki bir yer değişimi, $G\gamma$ zincirini $A\gamma$ zincirine dönüştürebilir. İki lokusta gen dönüşümünden dolayı sık sık yeniden birleşime maruz kalır ki anormal γ - geni düzenlemelerine yol açan çaprazlamada geçiş, beklenenden oldukça farklı olarak mutasyona uğramış zincirler ile sonuçlanabilir. $A\gamma^T$ eşgeninin frekansı hemen hemen tüm etnik gruplarda yüksektir ki böylece o lokustaki ek mutasyonlar olağandışı çıkmazlar. Anormal globin düzeyi oranının belirlenmesi ve nihai olarak protein zincirinin DNA analizi ile birleşmesi gerekir (Huisman 1997).

Globin Gen veri tabanında listelenmiş 79 varyanttan 45'i $G\gamma$ varyantı, 31'i $A\gamma$ varyantı olarak belirlenmiş ve üç tanesi de henüz belirli bir γ genine dahil edilememiştir. 31 $A\gamma$ varyantından 7 tanesi $A\gamma^T$ zincirinin varyantı olup 1'i kısa homolog delesyon ve biri de $A\gamma$ - β hibrid zincir mutasyonuna sahiptir (Huisman 1997, Manca ve vd. 2008).

2.4.1. $G\gamma$ zincir varyantları

45 $G\gamma$ varyantlarının tümü tek bir amino asit yer değişiminden kaynaklanmaktadır. Mevcut $G\gamma$ tipinden dört tanesinin beklenenden %35'ten daha düşük olduğu dikkatlerden kaçmamalıdır. HbF-M-Osaka ($G\gamma63$ (E7) His→Tyr) ve M-Fort Ripley ($G\gamma92$ (F8)

His→Tyr) ikisi de fetal metHbs grubuna dahildirler ki bunlar düşük O₂ afinitesinde yeni doğan siyanozuna neden olmaktadır (Molchanova ve vd. 1992, Prehu ve vd. 2003). Bu yüzden bu anormal zincirler büyük bir istikrarsızlıktan kaynaklanır. Üç tanesinin tanımlanmasının yanı sıra, sonraki iki varyantın genlerinin genişletilmiş ardışıklık analizi, sadece protein düzeyindeki tanımlamanın genelde yeterli olmadığını kanıtlamaktadır. Bu varyantlar, γ^x 'nın α^x 'ya oranının öneminin daha iyi anlaşılması için bir paradigmayı temsil eder. $\gamma^{125}(H3)Glu \rightarrow Ala$ olarak listelenen HbF-Port Royal'ın %14-15 γ^x düzeyinde gerçekleştiği rapor edilmesine rağmen, birkaç varyantlı bebeğin detaylı γ ve α genlerinin dizi analizlerinin γ genlerinde hiçbir mutasyonun mevcut olmadığını göstermiştir. α geninde ise iki nükleotit değişiminin mevcut olduğunu göstermiştir. GAG→GCG, Glu→Ala yerdeğişimine karşılık gelen kodon 125 ve GCA→GGA, Ala→Gly yerdeğişiminden sorumlu kodon 136 değişime uğrar. Dolayısıyla, HbF-Port Royal'ın $\alpha^{125}(H3)Glu \rightarrow Ala; 136(H19)Ala \rightarrow Gly$ olarak doğru bir şekilde düşünülmesi gerekir. DNA düzeyinde yapılan çalışmada, bir bebekte %16.2 düzeyinde mevcut olan HbF-Marietta ($\gamma^{80}(EF4)Asp \rightarrow Asn$), α geninde gerçekleşen bir mutasyondan dolayı kodon 136'da Ala→Gly yerdeğişimi olarak da düşünülebilir. Diğer taraftan HbF-Charlotte ($\alpha^{75}(E19)Ile \rightarrow Thr; 136(H14)Ala \rightarrow Gly$ ya da $\alpha^T 136(H14)Ala \rightarrow Gly$) toplam HbF'nin %10'u düzeyinde gerçekleşmiştir (Plaseska vd. 1990). Çünkü α ve γ zincirlerinin seviyeleri yaklaşık olarak %28 ve %73 civarında çıkmıştır. γ^x zinciri, kodon 136 da GCA→GGA(Ala→Gly) değişimli α -gen (α^T) mutantının bir ara ürünü olarak doğru bir şekilde düşünülmüştür. Bu durum her iki DNA dizilemesiyle teyit edilmiştir. Aynı varyant zinciri, çok yüksek γ^x (%32.4) düzeyine rağmen HbF-Sassari ($\gamma^{75}(E19)Ile \rightarrow Thr$) varyantına sahip Sardinyalı yeni doğan bir bebekte gözlenmiştir. Bebek aynı zamanda α^T zincirine göre heterozigottur ve %37.1 seviyesinde düşük γ 'ya sahiptir. Kısa süre sonra siyahi bir bebek, aynı F-Sassari yapısına sahip olarak HbF-Waynesboro varyantına sahip olarak gözlenmiştir (Gu vd. 1995). Sardinyalı bebeğe benzer bir şekilde, yeni doğmuş çocuklar γ^x zincirinin %29.2'sini, γ zincirinin %43'ünü, α^I ve α^T 'nin beklenen miktarını göstermişlerdir. Özetle mutasyona uğramış globin zincirleri aynı yapıya sahip olmalarına rağmen α genindeki bir mutasyondan dolayı HbF-Charlotte düşük bir γ zincir düzeyindedir. HbF-Sassari ve F-Waynesboro ise γ geninin 75 pozisyonundaki bir mutasyondan kaynaklanmaktadır. HbF-Sassari ve F-Waynesboro'lu bebeklerde, α^T zincirinin mevcudiyeti genotipinin yorumlanmasını

önemli ölçüde kolaylaştırmıştır. HbF-Sassari daha sonradan Yunanlı bir bebekte de teşhis edilmiş ve HbF-Lesvos olarak nitelendirilmiştir. Dizileme, $G\gamma$ geninin 75 pozisyonunda mutasyonun ATA→ACA(İle→Thr) olduğunu doğrulamıştır (Papadakis ve vd. 1996, Huisman 1997, Manca ve vd. 2008).

Laboratuarlarda bulunan diğer $G\gamma$ varyantları ise F-Birleşik Arap Emirlikleri ($G\gamma 59(E3)Lys\rightarrow Glu$), HbF-Kolombiya-GA ($G\gamma 94(FG1)Asp\rightarrow Asn$), F-Karabya ($G\gamma 118(GH1)Phe\rightarrow Leu$) şeklindedir. HbF-Emirlikler ilk olarak Birleşik Arap Emirliklerinde bir bebekte, ve F-Columbus-GA ise Amerika Birleşik Devletlerinden Georgia Eyaletinden birkaç beyaz bebekte tanımlanmıştır (Manca ve vd. 2008).

2.4.2. $A\gamma$ zincir varyantları

31 tane $A\gamma$ varyantından 22 tanesi tek nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. Geri kalan varyantlardan 7 tanesi $A\gamma^T$ zincirinin, 1 tanesi $A\gamma$ - β hibrid zincirinin varyantlarıdır, diğer 1 tanesi de kısa delesyondan kaynaklanmaktadır (Grifoni ve vd. 1975). En yaygın varyant, kendisine kan nakli yapılmamış β -Thal hastalıklı Sardinyalı bir hastanın kanında gözlemlenen $A\gamma^T$ zinciridir. Bu varyant zinciri 75(E19) pozisyonunda İle→Thr yerdeğişimi ile karakterize edilmiş ve HbF Sardinia olarak adlandırılmıştır (Ricco ve vd. 1976). β -Thal'a yönelik olarak 32 homozigottan HbF'nin 29'unda aynı İle→Thr yerdeğişimi bulunmuştur ve varyant, $A\gamma$ geninin eşgeni olarak teşhis edilmiştir. $A\gamma$ -Sardinia allelik zinciri daha iyi bir şekilde $A\gamma^T$ olarak teşhis edilmiş; normali ise $A\gamma$ olarak belirlenmiştir. Farklı ülkelerde bebeklerdeki oluşumu ile ilgili olarak tetkikler yapılmıştır. Varyant, dünyanın tüm nüfuslarında yaygındır. En yüksek frekanslara Akdeniz çevresindeki ülkelerde (yenidoğan bebeklerin %30'u), Batı Avrupa, Hindistan ve Japonya'da rastlanmaktadır. Düşük frekanslar zencilerde, Avustralyalı Aborjinlerde ve Çinlilerde görülmektedir (Manca ve vd. 2008).

Masala ve vd. (1988) laboratuarda yaptıkları çalışmada, $A\gamma^T$ homozigot yenidoğanda bu allelik zincirinin oranının 29.3 ± 2.4 olarak ölçmüşlerdir. Bu oran $A\gamma^T$ homozigotlarınkinden daha düşük bulunmuştur ($\%31.4\pm 2.6$). $A\gamma^T$ heterozigotlarda ise 13.9 ± 1.3 civarında ölçülmüştür ve bu oranın $A\gamma$ 'ninkinden de daha düşük olduğu görülmüştür (15.8 ± 1.4). Aynı zamanda kendilerine kan nakli yapılmamış β -Thal hastaların HbF düzeylerinde de $A\gamma^T$ zincirinin düzeyi incelenmiştir (Masala ve vd. 1988).

β -Thal homozigotlarda β^{39} CAG→TAG mutasyonu nedeniyle HbF'lerinin γ -globin kompozisyonunda haplotip ilişkili farklılıklar gösterir. γ IVS2 de HindIII merkezi için pozitif olan II, III ve X gibi haplotipler γ^T globini ile ilişkilidir. I ve IX gibi diğer haplotipler ise γ^T ile ilişkilidir. HbF'nin zenginleştirilmesinden sonra γ zincirleri farklılıklarının düzeyleri aynı zamanda birtakım nakil yapılmış β -Thal'da incelenmiştir. Sonuç açıkça göstermiştir ki azalan γ ifadesiyle ilişkili olarak γ gen promoterinin -225 ile -222 deki (-AGCA) daha önceden saptanmış olan 4 bp delesyonu γ^T geni ile ilişkilidir. Haplotip II üzerinde γ^T geninin artan ifadesiyle 4 bp'nin güçlü bir ilişkisini gösteren γ varyantına nazaran γ^T zincir düzeyi %20 azaltılmıştır. -AGCA delesyonunun varlığı PCR tarafından yükseltile γ genlerinin Fnu 4HI sindirimi yoluyla rahatlıkla ve doğrudan tespit edilebilir. Aynı γ^T gen promoterlerinin -226 ile -223 pozisyonunda meydana gelen diğer 4 bp delesyonu (-AAGC) Çinli bir ailede gözlemlenmiştir. Denekler %80 γ zincirinden daha fazlasını içeren %3-5 artan HbF düzeyini göstermiştir. Bu da göstermiştir ki -226 ile -223 delesyonu muhtemel artan γ ifadesinden sorumludur. -223 bölgesindeki nükleotit, K562 ve Hela hücrelerinden nükleer ekstratlardaki DNazI'e aşırı duyarlıdır. Bu da göstermektedir ki bu bölgede normal kromozomlardaki gen ekspresyonunun düzenleyicisinde bir sınırlama ya da karşılıklı ortaklık olarak iş gören nükleer matriksli β globin gen kümesinin ilişki-bağlantı noktasını oluşturabilir. Böylece bu gözlemler, yetişkinlerdeki fetal globin gen ekspresyonu için önemli olan promoter elementlerin en az -225'te yukarı yöne doğru genişlediği hipotezini desteklemektedir (Manca ve vd. 2008).

Fetal genlerin ya da belirli bir genotipin (örneğin HPFH determinanı) anormal düzenlemelerine yönelik cis ya da transtaki γ^T geninin varlığı, diğer globin gen ifadelerinin daha iyi anlaşılmasına olanak sağlayan yararlı bir işaret olabilir. Yaygın bir şekilde meydana geliş sıklığından dolayı ek mutasyonların γ^T geni üzerine yerleşmesi şaşırtıcı değildir. Halihazırda tanımlanan HbF-Charlotte'nin yanı sıra, 6 tane γ^T varyantı daha tespit edilmiştir. Üç tanesi HbF-Xinjianing (γ^T 25(B7) Gly→Arg), HbF-Forest Park (γ^T 73 (E17) Asp→Asn) ve HbF-Porto Torres (γ^T 136 (H114) Ala→Ser), beklenen %12-%14 miktarlarında mevcuttur (Pirastru ve vd. 2004). Diğer üçü ise mutasyona uğramış zincirin yüksek düzeyleri tarafından karakterize edilmiştir. HbF-Porto Torres'in, tetramer IEF deki HbF Sardinya ile aynı hareketliliğe sahiptir. Anormal globin zinciri ise AUT-PAGE tarafından normal $G\gamma$ ve γ^T zincirleri tarafından ayrılabilir. $G\gamma$ 68.4, γ^T 14.0,

γ 17.6 oranların işaret eden RP-HPLC tarafından globin zincirlerinin analiz edilmesi sonucunda anormal zincirin kesinlikle $A\gamma$ globinin varyantı şeklinde olduğunu göstermektedir. γ genlerinin dizilimleri, mutasyona uğramış genin aslında iki nükleotit yer değişimi mutasyonlarından birisinin $A\gamma$ olduğunu ortaya çıkaran kodon 75'te ATA→ACA (Ile→Thr) olduğu, diğerinin ise kodon 136'da GCA→TCA (Ala→Ser) olduğu saptanmıştır(Chen ve vd. 1985, Hu ve vd. 1987).

$A\gamma^T$ zincirinin üç varyantı heterozigot yenidoğanlarda %31-36 düzeylerinde mevcuttur. Bunlar HbF-Yamaguchi ($A\gamma^T$ 80 (EF4) Asp→Asn), HbF-Fukuyama ($A\gamma^T$ 43 (CD2) Asp→Asn) ve HbF-Siena ($A\gamma^T$ 121 (GH4) Glu→Lys) varyantlarıdır. HbF-Yamaguchili bir bebeğin ayrıntılı gen haritalama analizi, $G\gamma$ ve $A\gamma^T$ genleri arasında yaklaşık 5.1 kb DNA segmenti delesyonun varlığını göstermiştir. Faz geninde ortaya çıkan sonuçlar γ -Thal için $GA\gamma^T$ -hibrid geni olduğu tanımlanmıştır. Böylece doğumda $G\gamma$ seviyesinde bir $A\gamma^T$ varyantın sentezlenmesi muhtemeldir çünkü $G\gamma$ geninin promoter dizilimine sahiptir. Sonuç olarak, bu bebeğin γ genlerinin oraganizasyonu $-GA\gamma^T/-G\gamma-A\gamma^T$ olabilir. Benzer bir şekilde DNA düzeyinde çalışılmamasına rağmen, HbF-Fukuyama ve HbF-Siena (%35) varyantlarında mutasyona uğramış $A\gamma^T$ zincirinin miktarı, $GA\gamma^T$ -hibrid geninin kontrolü altındaymış gibi yorumlanabilir (Huisman 1997; Manca ve vd. 2008).

2.4.3. HbF'nin istikrarını ve fonksiyonel özelliklerini etkileyen mutasyonlardan kaynaklı varyantlar

HbF varyantlarının moleküler düzeydeki teşhis ve tanımlama ile ilgili teknik sorunlar aynı zamanda fonksiyonel özellikleri ile ilgili çalışmalarını da etkiler. Ne yazık ki, O_2 seviyesinin doğum çalışmaları düzeyinde, karakterize edilmiş varyantların sayısı hemen hemen ihmal edilmiştir. α zincirleri düzeyindeki mutasyonlardan dolayı mutasyona uğramış yetişkin HbS hastasının aynı zamanda fetal biçimlerinin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Bunun nedeni yaklaşık olarak gebeliğin ilk ayından itibaren α zincirleri sentezinin zaten rahim içinde aktif olmasıdır. Öyle ki normal γ zincirleri ile etkileşimde olan mutant α zinciri, fetal hayat için tahammül edilemez hale gelebilir. Annelerin kanında mevcut yetişkin Hb Sassariinde, fetal varyantın artan O_2 afinitesi kısmi olarak O_2 'nin anneden kana transferini geri alır. Molekülün R durumunun istikrarını etkileyen kritik $\alpha 126$ Asp'nin yer değişiminden kaynaklanan fonksiyonel

farklılıkların moleküler temeli, $\alpha_1\alpha_2$ teması düzeyinde azalan interaksiyondan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bir diğer örnek, Kuzey Sardinyalılarda en yaygın olan Hb j-Sardegna ($\alpha 50$ (E58) His→Asp) varyantının fetal ve yetişkin biçimleri ile tutarlıdır. Bu varyant sadece 2,3-BPG'nin O_2 afinitesini göstermektedir. Buna karşılık fetal formun O_2 afinitesinin, 37°C'de gözlemlenmiş olan 2,3-BPG'nin varlığında ya da yokluğunda, 20°C de normal HbF'ninki ile özdeş olduğu bulunmuştur (Corda ve vd. 2000, Manca ve vd. 2008).

Bu gözlem, O_2 bağlayıcısının termodinamiklerini değerlendirmede $\alpha_1\beta_1$ arayüzü ana hatlarıyla çizilmiştir. Bu iki örnek, anne kanında yüksek oksijen affinitesi Hb varyantı varlığında HbF'nin farklı özelliklerinin telafi edici etki için yoğun çaba gösterdiklerini işaret eden önceki gözlemleri desteklemektedir ve döl yatağı içinde ek bir avantaj olarak değerlendirilmelidir.

2.4.4. Diğer Varyantlar

HbF-Mauritus, kodon 23'te (GCT) ekzon içi delesyondan dolayı sadece belirlenen γ zinciri varyantını temsil eder. Bu, hemolitik anemi ve siyanozla ilişkili olan β zinciri HbF-Freiburg varyantının benzer delesyonuna sahiptir. Son olarak, Hb Kenya, kodon 80 ($^A\gamma$) ve kodon 86 (β) arasındaki 22.5 kb delesyonundan türeyen çapraz bir geçiş sonucunda γ zincirinden alınmış 5' sonlu ve β zincirinden 3' sonlu bir $^A\gamma$ - β hibritidir. Üzerinde fazla çalışılmamış sıradışı varyantlı yenidoğan bebeklerin γ -globin sistemine DNA metadolojisinin uygulanması muhtemelen tek başına protein analizi ile karakterize edilemeyen ek anormalliklerin delesyonu ile sonuçlanacaktır (Manca ve vd. 2008).

2.5. HPFH İle İlgili Yapılan Çalışmalar

Collins ve vd. (1985), bir Yunan HPFH allelinden beta-globin gen kümesinin 40 kb bölgesini klonlamışlar ve analizler sonucunda A gama globin geninin 5'-UTR bölgesinde lokalize olan 117 baz çiftinden oluşan (G→A) nokta mutasyonu saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu bölge distal CCAAT dizisinin hemen yukarı bölgesinde bulunmaktadır.

Tate ve vd.(1986), $\Delta\gamma$ nondelesyonel HPFH için homozigot olan İngiliz bireylerde $G\gamma$ ve $\Delta\gamma$ genlerini klonlamışlar ve kısmen sekanslanmışlardır. $G\gamma$ geninin normal olduğunu fakat $\Delta\gamma$ geninin 5'-UTR bölgesine komşu olan -198 pozisyonunda tek bir baz değişikliğinin (T→C) var olduğu bulmuşlardır.

Ottolenghi ve vd. (1988), Kuzey Sardunya'da Hemoglobinopatiler ile ilgili yapılan bir araştırmada $G\gamma$ HPFH yeni bir türü için iki heterozigot denek belirlemişlerdir. Çalışma sonucunda γ -globin genlerinin 5'-UTR bölgesinin 175 nükleotit yukarısında T →C baz değişimi varlığını saptamışlardır. Bu durumda mutasyonun aslında çeşitli genlerin diğer düzenleyici elemanlarında mevcut olduğu bilinen bir korunmuş oktomer dizisinin 3' ucunu etkilediği sonucuna varılmıştır.

Martin ve vd. (1989), non-delesyonel HPFH çeşidinde γ -geninin artan ekspresyonunu dikkate almak için, insan eritrolösemi hücrelerinin nüklear proteinlerini çalışmışlardır. Eritro-spesifik faktörlerden birisi (GF-1) -195 ile -170 arasındaki bölgeye tek bir molekül olarak bağlanmıştır. Bağlanma sonucunda bu molekül iki tane olan TATCT(AGATA) motifleriyle ilişki kurmuştur. Çalışmalar sonucunda araştırmacılar, HPFH geninin -175 bölgesinde tek bir nokta mutasyonunun (T→C) sadece eritroid hücrelerinde promotör aktivitesini artırdığını gözlemlemişlerdir.

Fucharoen ve vd. (1990) tarafından tek bir Japon ailede iki farklı non-delesyonel HPFH formları ile çalışmalar yapılmıştır. $G\gamma$ -HPFH fenotipi gösteren bireylerin genlerinin PCR karakterizasyonu sonucunda iki bireyin $G\gamma$ -globin geninin distal CCAAT kutusu içinde -114 nükleotitinde C→T transisyonuna rastlamışlardır. Çeşitli nüklear özütlerde jel retardasyon testleri kullanılarak yapılan analizlerde araştırmacılar, gama globin geninin CCAAT motifi distaline CCAAT bağlanma faktörü olan CP1'in bağlanmasını engelleyen yeni bir mutasyonun varlığını saptamışlardır. Ayrıca araştırmacılar bu mutasyonun eritroid spesifik faktörünün bağlayıcılığı etkilemediğini dolayısıyla fetal globin ekspresyonunun gelişimsel regülasyonunda CP1'in olası rolüne de işaret etmişlerdir.

Gottardi ve vd. (1990), sentetik oligonükleotit analizi ile γ globin gen promotörlerinin PCR ile kombinasyonu analizleri ile akraba olmayan iki İtalyan ailede non-delesyonel $\Delta\gamma$ HPFH geninde -196 C→T ve -117 G→A yerdeğiştirmesi heterozigot taşıyıcılarını saptamışlardır. Bu çalışma sonucunda -196 $\Delta\gamma$ HPFH/beta talasemi için kombine heterozigot beta-talasemili defektin tanımlanmış olması globin zincirinin

sentetik paterni üzerindeki gama promotör mutasyonlarının etkisini ve -117 pozisyonundaki mutasyon ile karşılaştırma yapılmasına imkan vermiştir.

Indrak ve vd. (1991), yeni keşfedilen β^0 -talasemi için heterozigot (38 ve 39 kodonları; A→C) veya yeni tanımlanan non delesyonel HPFH'ye sahip ($G\gamma$ geninin 5'Cap bölgesinde -100 nükleotitde A→C mutasyonuna sahip HPFH'li İsviçreli bir kişi) ya da bu iki durum için heterozigot bileşimine sahip bireylerde HbF'nin bileşimini ve seviyesini çalışmışlardır. Çalışma sonucunda HbF düzeyini, β^0 -talasemili heterozigotlarda düşük $G\gamma$ (~%28) değeri ve nispeten yüksek $A\gamma^T$ değerleri (%50) ile ortalama ~%0.3, iki İsviçreli heterozigotlarda ~%95 $G\gamma$ değeri ile ortalama %0.8 ve heterozigot bileşimine sahip bireylerde de ~%95 $G\gamma$ değeri ile %3.1 şeklinde ölçmüşlerdir. Gottardi ve vd. (1992), DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) yöntemini kullanarak γ globin geninin 5'bölgelerindeki nokta mutasyonlarını saptayan yeni ve hızlı bir strateji geliştirdiklerini rapor etmişlerdir. Çalışmaların sonucunda daha önce nondelesyonel HPFH taşıyıcısı olduğu saptanan bireylerde her iki γ globin gen promotörlerindeki farklı nokta mutasyonların saptanabildiğini göstermişlerdir. Bunun için araştırmacılar 327 bç DNA bölgesini amplifiye etmişler ve DGGE yöntemini kullanmışlardır. $A\gamma$ globin geninin -225 ve -222 pozisyonunda yer alan 4 bp delesyonun incelenen örneklerin çoğunda bulunduğu ve kısmi polimorfizm özelliği gösterdiği saptanmıştır. Aynı genin 5' bölgesine spesifik 681 bç'lik bölge analiz edildiğinde bu bölgenin kromozomun haplotipinin analizinde de kullanılabileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak araştırmacılar, bu tekniğin fizyolojik ve patolojik durumlarda yüksek HbF ifadesi ile ilişkili dizi varyasyonlarının çalışmasında yararlı olabileceğini bildirmişlerdir.

Craig ve vd. (1993) tarafından yapılan çalışmaların sonucunda, fetal $G\gamma$ ve $A\gamma$ globin genlerinin doğrudan 5' cap bölgesinde tek baz yer değiştirmeleri non-delesyonel HPFH ile ilişkilendirilmiştir. Daha önce, İngiliz bireylerde HPFH ile ilişkilendirilen promoter mutasyonlarının $A\gamma$ globin geni 5'-UTR bölgesinde -198 pozisyonunda görülen T ile C yer değiştirmesi olduğu bildirilmişti. Aynı araştırmacılar $G\gamma$ HPFH ile ilişkilendirilmiş bir İngiliz ailede yaptıkları çalışmada $G\gamma$ globin geninin -175 pozisyonunda T ile C yer değiştirmesi olduğunu bulmuşlardır. Mutasyon ilk olarak hidrolink jel elektroforezinden sonra heterodubleks formasyonu için her iki $G\gamma$ ve $A\gamma$ globin genlerinin 5' bölgesininin amplifikasyonu sonucu incelenerek saptanmıştır.

Coleman ve vd. (1993), HPFH'nin her iki tipine sahip karakteristik bir aile ile çalışmışlardır. Proband 30 yaşında sağlıklı siyah bir kadındır. Analiz sonucunda kadının hemoglobin değerleri % 40.4 HbS, % 40.9 HbF, % 16.8 HbA ve % 1.9 HbA₂ olarak saptanmıştır. Tüm hemolitik değerler normaldir ve kırmızı hücrelerde HbF'nin dağılımı da pancellular (dairese, homojen) tiptedir. Aile çalışmaları, probandın 11. kromozomunun birisinde β^s -globin genine, homologunda ise βA -globin genine cis konumunda olan $G_\gamma A_\gamma(\beta^+)$ HPFH genine sahiptir. Gen haritalama çalışmaları G_γ ile βA -globin arasındaki bölgenin normal olduğunu göstermiştir. Halbu ki, A_γ ve G_γ promotörleri PCR ile amplifiye edilip sekanslandığında A_γ gen promotöründe -175'te T→C mutasyonu ve G_γ promotöründe -158'de C→T varyasyonu tespit edilmiştir. Her ne kadar böyle etkinin sebebi bilinmese de -158'de C→T varyasyonu indüklenmiş G_γ ve hemolizde yüksek HbF seviyeleri ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda araştırmacılar varyasyonun, hemoliz yokluğunda ve cis -175 T→C varyasyonunun γ -globin ifadesini artırdığını düşündüklerini, dolayısıyla varyasyonun $G_\gamma A_\gamma(\beta^+)$ HPFH ile bağlantılı olabileceğini önermişlerdir.

Motum ve vd. (1993), gama-globin gen promotörlerini içeren -198 T→C ve -175 T→C transisyonlarının HPFH ile ilişkili olduğunu geçici veya kararlı transfeksiyon sistemleri kullanılarak eritroid hücrelerde promotör aktivitesini artırdığını bildirmişlerdir. Proksimal γ -globin promotörün diğer bir varyasyonu olan -158 C→T tipi, HPFH fenotipi ile bağlantısı zayıf olmakla birlikte G_γ aktivitesinin artışı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar bu çalışmalarında -198 T→C , -175 T→C ve -158 C→T mutasyonlarını hem tek başına hem de çeşitli kombinasyonlarla bir invitro deney ile değerlendirilmişlerdir. γ -globin promotörleri K562 insan eritrolösemi hücrelerine elektroporasyon ile transfekte edilmiştir ve aktivitesi bir insan büyüme hormonunun raportör gen deneyi ile ölçülmüştür. Transfeksiyon etkinliğini değerlendirmek için yeni bir kontrantektant kullanılmıştır. Sonuçlar, daha önce bildirilen -198 T→C , -175 T→C HPFH mutasyonları ile gama globin aktivitesinin yükseltildiğini ve bu iki varyasyonun cis konumunda olması durumunda promotör aktivitesi üzerinde kooperatif etkiye sahip olduğunu teyit etmiştir. -158 C→T varyasyonunun tek başına veya -198 T→C ve -175 T→C varyasyonları ile beraber herhangi bir etkisinin olmadığı görülmüştür.

Motum ve vd. (1994), yaptıkları çalışmalar sonucunda $G\gamma$ -HPFH ile ilişkili -114 pozisyonunda C→G transversiyonuna sahip yeni bir mutasyon tanımlanmışlardır. Pissard ve vd.(1996) tarafından yapılan çalışmada, şu ana kadar görülen en yüksek HbF düzeyi (%49'un üzerinde) ile yeni bir non-delesyonel HPFH ilişkisini açıklamışlardır. $G\gamma$ promotörlerinin sekansı sonuçlarında 5'-UTR bölgesine -200 ve -203 bp arasında yer alan dört sitidin grubu içerisine bir sitidin bazının eklendiğini saptamışlardır. Bu insersiyon üçlü sarmal yapısının poliprimidin-polipurin bölgesi içinde yer almaktadır ve bu nedenle hemogloblin döngü mekanizmasında özellikle önemlidir.

Craig ve vd. (1994), HbF düzeyleri %5 ile %20 arasında olan bireylerden örnekler alarak çalışmalar yapmışlardır. Karakterize edilmemiş HPFH ve $\delta\beta$ talasemi hastalarında moleküler tanı çalışmaları için, oligonükleotid primerleri bilenen dokuz delesyon için tasarlanmıştır. Bu delesyonlar, HPFH-1, HPFH-2, HPFH3, İspanya talasemi, Lepore, Sicilyan ($\delta\beta^0$) talasemi, Çin $G\gamma(A\gamma\delta\beta)^0$ talasemi, Asya-Hint inversiyon-delesyon $G\gamma(A\gamma\delta\beta)^0$ talasemi ve Türk inversiyon-delesyon ($\delta\beta^0$) talasemidir. Bu yaklaşım kullanılarak farklı etnik kökenli 16 farklı aileden 23 bireyde $\delta\beta$ talasemi moleküler temeli bulunmuştur. Bu gruptan 13 birey 13.4 kb Sicilyan delesyonu için heterozigot, ikisi 100 kb Çin delesyonu için heterozigot, dördü Türk inversiyon-delesyonu için heterozigot ve üçü de Asya-Hint inversiyon delesyonu için heterozigot bulunmuştur. Vietnamlı bir kişi tam olarak moleküler düzeyde tanımlanmış ve 12.6 kb Delesyon için heterozigot olduğu saptanmıştır. Çin delesyon ve Türk yeniden düzenlenmesi çalışmaları sonucunda mutasyonların tek bir bölgeden çıkmış olma ihtimalini göstermektedir. Bu çalışma sonucunda burada anlatılan çeşitli delesyonların belirgin coğrafi kümelemeyi sonucunu desteklediği görülmektedir.

Patrinos ve vd. (1997) yeni tür non-delesyonel HPFH ile ilişkili insan $A\gamma$ -globin geninin Cap bölgesinde lokalize olmuş -158 pozisyonunda bir C→T transisyon tipi mutasyon saptadıklarını bildirmişlerdir. Bu mutasyon fetal hemoglobin düzeyi 2,9-5,1% düzeyinde olan ve normal hematolojik veriye sahip olan 3 erişkin bireyde saptanmıştır. Araştırmacılar, PCR amplifikasyonu ve DNA fragmanlarını klonlanarak yaptıkları sekanslama sonucunda çalışılan 3 vakanın ikisinde $A\gamma-158C\rightarrow T$ mutasyonunu saptadıklarını bildirmişlerdir.

Lui ve vd. (1999), Çin de HPFH'nin moleküler patolojisini incelemek ve nondelesyonel HPFH'ye neden olan nokta mutasyonlarını tanımlamak amacıyla, PCR-

bazlı CCM (chemical cleavage of mismatch) metodunu kullandıkları çalışmalarında CCM metodunun nondelesyonel HPFH mutasyonlarının tespiti için basit ve güvenilir bir moleküler tanı yöntemi olduğunu kanıtlamıştır.

Takashahi ve vd. (2003), brezilya tipi HPFH'ye neden olan ve $\Lambda\gamma$ -globin gen promotörlerinde $\Lambda\gamma$ -195 lokalizasyonunda C→G mutasyonunu içeren gende in vitro ekspresyon çalışmaları yapmışlardır. Promotör kuvvetinde artışa neden olan bu mutasyonun açıklamak için araştırmacılar, mutant promotörü hipersensitif site-2 lokus kontrol bölgesi ve lusiferaz raportör geni sistemi ile birleştirirerek analiz etmişler ve elektroforetik mobilite değişim deneyiyle protein etkileşimlerini incelemişlerdi. K562, HEL ve 293 adı verilen üç hücre hattında transient ekspresyon çalışılmış ve tüm hücre hatlarında Brezilya mutasyonunu içeren promotör aktivitesinin artması sağlanmıştır. DNA-protein etkileşimi çalışmaları SP1 protein için afinite sağlayan $\Lambda\gamma$ -198 C→G mutasyonunun aksine Brezilyan HPFH mutasyonu Sp1 proteini afinitesini azalttığını ve bir CACCC motifi olarak görev yapmadığını göstermiştir. Bu sonuçlar, bu mutasyonun $\Lambda\gamma$ -globin zincir üretimini artırmak için görev yapabileceğini göstermiştir. Buna ek olarak, bu artan üretimin mekanizmasının da -198 mutasyondan farklı olduğu görülmektedir.

Panyası ve vd. (2004) tarafından, HPFH-6 delesyonu için 273 akraba olmayan HbF düzeyleri $24.6 \pm 4.4\%$ arasında olan Taylandlı bireylerden alınan örnekler ile çalışmışlardır. DNA analizinde sonucunda 273 kişiden 148'inin (%54.2) $G\gamma\Lambda\gamma(\delta\beta)^0$ -talasemi tipi mutasyonuna, 83'ünün (%30.4) HPFH-6 delesyonuna ve 22'sinin (% 8.1) $G\gamma(\Lambda\gamma\delta\beta)^0$ -talasemi tipi delesyon-inversiyon mutasyonuna sahip olduğu tespit edilmiştir.

Tasiopoulou ve vd. (2007), Fetal hemoglobinin kalıtsal kalıcılığında artmış fetal hemoglobin seviyesi, $G\gamma$ ya da $\Lambda\gamma$ globin genlerinin her ikisinin promoter (başlatıcı) bölgesinde çok sayıda tek baz yer değiştirmesi ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada, $G\gamma$ -158 C→T baz değişimi mutasyonu için pozitif ve yüksek HbF üretimine sahip (sırasıyla %8.6 ve %10.2) akraba olmayan iki Yunan yetişkinde non-delesyonel HPFH'ye dayalı iki yeni model ropar edilmiştir. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analizi ile γ -globin geninin 5' promoter (başlatıcı) bölgesinin doğrudan sekanslanması ilk durumda bir $G\gamma$ -196 C→T ve ikinci durumda bir $\Lambda\gamma$ -201 C→T varlığını meydana çıkarmıştır. Bu mutasyonlar γ - genlerinin yeniden etkinleştirilmesinde ve erişkin dönemdeki yüksek ifadesinin nedeni gibi görünmektedir

Nadkarni ve vd. (2008), 55 akraba olmayan bireyden HbF düzeyleri 29.0 ± 5.30 arasında olan örnekler üzerinde çalışmışlardır. 55 bireyin 26'sında (% 47.2) HPFH-3 (Hindistan delesyonu), 15 bireyde (% 27) $G\gamma(A\gamma\delta\beta)^0$ -talasemi tipi delesyon-inversiyon, 5 bireyde (% 9) Viyetnam/Çin tipi (27 kb delesyon) mutasyonu belirlenmiştir. Bu çalışma ile HPFH determinantlarının Hindistan'da yaygın olduğu vurgulanmıştır.

Chassanidis ve vd. (2009), yaptıkları bu çalışmada HBG2 gen promotöründe (HBG2:g.-109G→T) yer alan yeni bir non-delesyonel HPFH mutasyonu bulmuşlardır. Bu mutasyon Yunan orijinli yetişkin bir bayanda bulunmuş ve HBG2 3' distalindeki CCAAT kutusun lokalize olduğu ve HbF değerinin %4.1, $G\gamma$ -globin zincir üretimi önemli ölçüde artmış (%79.2) olduğu tespit edilmiştir.

Mereu ve vd. (2009), hemoglobinopatiler için elektroforetik tarama sırasında Kuzey Sardinya bölgesi Sassari'de iki sağlıklı yenidoğanda, γ globin zinciri için iki farklı heterozigot mutasyon gözlemişlerdir. İki anormallikten biri $A\gamma$ zincir varyantıdır ve tetrameri Hb F-Osilo [$A\gamma119(GH2)Gly\rightarrow Ser$] olarak adlandırılmıştır. Diğeri ise Afrika kökenli Brezilyalı bebekte gözlenen $G\gamma$ zincir varyantıdır ve Hb F-Paulinia [$G\gamma80(EF4)Asp\rightarrow Tyr$] olarak adlandırılmıştır.

Liao ve vd. (2010), $G\gamma$ globin geninde 479 pozisyonunda bir G→C baz değişimi tipi mutasyon belirlemişlerdir. Bu mutasyon 101 kodonu glutamik asitten glutamin amino asidine değiştirmektedir. Araştırmacılar saptadıkları bu yeni mutasyonu Hb F-Zhejiang [$G\gamma101(G3)Glu\rightarrow Gln$] olarak adlandırmışlardır.

Carrocini ve vd. (2011), Brezilya popülasyonunda iki HPFH mutasyonu (HPFH-1 ve HPFH-2), Afrikalı ve iki $\delta\beta$ -talasemi mutasyonunu, Sicilya ve İspanya mutasyonlarının sıklığını çalışmışlardır. Tüm bireyler normaldir ve anemiye sahip değildir fakat HbF değerleri yüksektir. Moleküler analizlerde, 60 kişiden 16'sı HPFH mutasyonları için heterozigot profil göstermiş, 2 kişi HPFH-1 ve 14 kişi de HPFH-2 mutasyonu göstermişlerdir. Ayrıca 3 kişinin de İspanyol $\delta\beta$ -talasemi oldukları fakat hiç kimsenin Sicilyan tip $\delta\beta$ -talasemi olmadığı saptanmıştır. HbF değerleri HPFH-2 heterozigotlarında bu mutasyon için önceden rapor edilenlerden farklı çıkmıştır. Bu grupta HPFH mutasyonları $\delta\beta$ talasemi mutasyonlarından daha sık görülmüştür.

Cui ve vd. (2012), dört yenidoğandan alınan numunelerde üç yeni γ globin zincir mutasyonu tespit etmişlerdir. Varyantlar amplifiye edilmiş DNA'nın dizi analizleri sonucu karakterize edilmiştir. Bu üç yeni mutasyon varyantı sırasıyla Hb F-Hayward

[^Gγ1(NA1)Gly→Asp, GGT→GAT], Hb F-Chori-I [^AγT16(A13)Gly→Asp, GGC→GAC] ve Hb F-Chori-II [^AγI29(B11)Gly→Glu, GGA>GAA] olarak adlandırılmıştır.

Baer ve vd. (2012), HBG2:c.308G olarak adlandırmış olan yeni bir ^Gγ-globin varyantı bulmuşlar ve bunu HbF-Sarejova şeklinde adlandırmışlardır. Bu çalışma siyanozlu olarak doğan ve oksijen tedavisine alınan bir kız çocuğunda gerçekleştirilmiştir. Bu tipte cis ^Aγ^T konumunda A ile C transversiyonu mevcuttur. Bu durum düşük oksijen afinitesine sebep olmaktadır. Bu mutasyon β-globinde Hb Kansas [β102 (G4) Asn → Thr, AAC→ACC] olarak tanımlanan mutasyona analogtur

Amato ve vd. (2013), HbA2 değerleri ve tüm hematolojik verileri normal iken HbF değerleri % 5.9 ile % 6.5 arasında olan üç İtalyan hastada iki yeni mutasyon bulunmuşlardır. ^Aγ genin CCAAT kutusu distalinde, iki bireyde (anne ve oğulda) -197 C→T transisyon mutasyonu saptanırken bir bireyde -113 A→G transisyonunun mevcut olduğu gösterilmiştir.

Camaschella ve vd. (2014), HPFH'li Sardunyalı ailelerde ile yapılan çalışmada, iki akraba olmayan hastada beklenmedik bir şekilde yüksek HbF değeri (^Aγ türünde %24'den daha çok) tespit etmişlerdir. Sentetik oligonükleotit hibridizasyon ve ^Aγ gen promotörü selektif amplifikasyonu analizinde bu bireylerin -117^Aγ G→A baz değişimi mutasyonu için homozigot oldukları bildirilmiştir.

Gelinas ve vd. (2014), HPFH'nin moleküler temelini nondelesyonel ^Aγ-HPFH formu için heterezigot olan Çinli bir bireyde çalışmışlardır. ^Aγ globin genlerinin her iki allel moleküler yöntemlerle klonlanmış ve sekans analizi yapılmıştır. ^Aγ genlerinden birisinin promotörü -196 pozisyonunda C→T baz değişimi mutasyonu içerirken diğer allelinin promotörünün normal olduğu saptanmıştır. -196 pozisyonunda bu mutasyon ayrıca akraba olmayan ve ^Aγ-HPFH fenotipili İtalya, Sardunya ve Çin'de yaşayan bireylerde tanımlanmıştır.

Toma ve vd. (2014), siyah Afrikalı 30-40'lı yaşlar arasında HbF değerleri yüksek (%8,7-%21,8) olan 3 bireyden örnekler alarak yaptıkları çalışmalarda iki yeni nondelesyonel HPFH mutasyonu saptadıklarını, bu mutasyonların her iki HBG1 ve HBG2 globin gen promotörlerinde c.-250 lokalizasyonunda C→T baz değişimi tipi mutasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Stoming ve vd. (2014), $\Lambda\gamma$ promotörünün -175 pozisyonunda T→C mutasyonu keşfettiklerini bildirmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca bu mutasyonun trans β genine sahip bir siyahi heterozigotta HbA düzeyinin azalması ve HbF düzeyinin artması ile ilişkili olduğunu da bildirmişlerdir. Aynı mutasyon siyahi bir heterozigotun γ promotöründe de bulunmuştur. Bu iki mutasyonun detaylı incelemesi sonunda araştırmacılar, γ promotörünün -158 pozisyonunda ilave mutasyonlar neticesinde HbF ve HbA seviyelerindeki farklılıkların arttığını belirlemişlerdir.

Mayuranathan ve vd. (2014), Hindistan'da akraba olmayan $\delta\beta$ - talasemi veya HPFH'li 51 ailede yaptıkları araştırmalarda 6 farklı delesyon tespit ettiklerini bildirmişlerdir. Hindistan popülasyonunda yapılan kapsamlı analizlerde iki yeni HPFH mutasyonları olan 49.98kb (HPFH-9) ve 86.7 kb (HPFH-10) delesyonları tespit edilmiştir.

Pirastru ve vd. (2014), elektroforetik ve kromatografik teknikleri kullanarak sarılığa yakalanmış yeni doğan bir bebekte yeni bir fetal hemoglobin varyantı gözlemişlerdir. Hb varyantının izopropanol stabilite testi ile stabil olmadığı görülmüştür. HBG2 gen sekanslanmasından sonra kodon 64 kodonda G→A transversiyon tipi mutasyon saptanmış ve bu değişikliğin Gly→Asp değişimine neden olduğu gösterilmiştir. Araştırmacılar bu yeni varyanta HbF-Turritana [γ 64(E8)Gly→Asp, HBG2:c.194G→A] ismini vermişlerdir. Aspartik asit amino asitinin yapıya girmesinin hacimsel ve negatif yük değişimine neden olarak hem sterik konfigürasyonu değiştirdiği ve dolayısıyla istikrarsızlığa neden olduğu söylenebilir. Yeni anormal HBG2 geni Hb F-Sardinia [γ (E19)Ile→Thr, HBG1:c.227T→C] olarak karakterize edilen mutant HBG1 gen ile cis ilişkili olduğu bulunmuştur.

Francis ve vd. (2015) Pulsed-field jel elektroforezi ve Sfil enzimi kullanılarak normal ve HPFH'li DNA'ya sahip β globin kümesinin büyük çaplı restriksiyon haritasını oluşturdukları çalışmalarında Amerikan siyahilerinde HPFH1 delesyonunun ve Ganalı siyahilerde HPFH2 delesyonlarının gözlemlendiğini, ve bu delesyonun 105 kb boyutunda olduğunu saptamışlardır.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

Bu çalışmada deney süresi boyunca aşağıda adları yazılı cihazlar ile sarf malzemeleri kullanılmıştır.

3.1.1. Alet ve cihazlar

1. Kan sayım cihazı (Coulter AC.T 5diff AL)
2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
3. Santrifüj (Hettich)
4. Mikro santrifüj (Hettich Mikro 20)
5. Etüv (Heraeus)
6. Derin dondurucu (-20°C Arçelik)
7. Thermal cycler (Applied Biosystems 9600)
8. Mikrodalga fırın (Arçelik MD 564)
9. Jel elektroforez cihazı (Thermo OWL A2)
10. Fotograf bağlantılı UV translüminatör (Vilber Lourmat)
11. Su banyosu (Wisd)
12. Hassas terazi (Scout Pro SPU 6001)
13. Vorteks (MS1 minshaker)
14. Magnetik karıştırıcı (Nüve MK 390)
15. Otomatik pipet (20, 100, 200 µl) (axygen)
16. Orbital shaker (Gerhardt Laboshake)

3.1.2. Sarf malzemeler

1. Tris
2. Borik asit
3. Etidyum bromür
4. Taq polimeraz
5. dNTP
6. Spermidin

7. Agaroza
8. Bromfenol mavisi
9. Gene Amp Tüp
10. Whatman Kağıdı

3.2. Örnek Toplama

Bu çalışmada kullanılan örnekler GAP Eylem Planı kapsamında GAP Bölge Kalkınma İdaresi'nin GAP Kırsal Kalkınma Projelerini Destekleme Programı çerçevesinde yürütülmüş ve sonuçlandırılmış olan “Adıyaman İlinde Talasemi Sıklığının Belirlenmesi ve Eğitimi” adlı proje için toplanmış olan kanlar kullanılmıştır. Bu çalışma, Fırat Üniversitesi, Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulunun 16.09.2014 tarih ve 06 nolu kararı ile etik kurallara uygun olduğuna karar verilmiştir. Bu örneklerin HPLC ve tam kan sayım sonuçlarından HbF düzeyleri saptanmış ve dolayısıyla HbF düzeyi >%1.5 olan HPFH şüphesi taşıyan örnekler çalışmaya dahil edilmiştir.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hematolojik incelemeler

Hematolojik analizlerden Hemogloblin (Hb), Hematokrit (Hct), Eritrosit sayısı (RBC), Ortalama Eritrosit Hacmi (MCV), Ortalama Eritrosit Hemoglobini (MCH) ve Ortalama Eritrosit Hemogloblin Konsantrasyonu (MCHC) Coulter Counter cihazı ile yapılmıştır (Huisman ve vd. 1977).

3.3.2. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high performance liquid chromatography)

Güvenilir, tekrarlanabilir ve hızlı olan HPLC yöntemi, hemogloblin moleküllerinin ayrıştırılması ve miktarlarının belirlenmesi için kullanılmaktadır (Kutlar ve vd. 1984, Kutlar ve vd. 1986, Çürük 2004). Hemogloblinlerin analizinde zayıf iyon değiştirici kolonlar yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca globin zincirlerinin ayrıştırılmasında ve miktarlarının belirlenmesinde reverse faz kolonu kullanılarak analiz edilmektedir. Bu işlem globinlerin hidrofobik özelliklerinden yararlanılarak yapılmaktadır (Kutlar ve vd.

1986, Çürük 2004). Yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde analizlerin yapılmasına imkan veren ve önemli olarak kabul edilen bazı parçalar ve görevleri aşağıda özetlenmiştir:

- İki adet pompa: Yüksek basınç sağlar
- Gradient kontrolör: İki farklı tamponun karışım oranını ve akış hızını kontrol eder
- Kolon: Basınca dayanması için çelikten yapılmış bir boru içerisine değişik kimyasal maddeler (anyon veya katyon değiştirici) doldurulmuştur.
- Enjektör: Sisteme numune tatbik etmek için kullanılır.
- Dedektör: Kolonda ayrıştırılan fraksiyonların absorpsiyonunu ölçer
- Recorder-integratör: Dedektörden gelen sinyalleri kaydeder ve her fraksiyonun yüzde değerlerini hesaplar
- Tamponlar: Konsantrasyonları farklı ama pH'ları aynı iki çözelti kullanılır.

HPLC'de hemoglobin ve globin analizleri için farklı kolon ve tamponlar kullanılır. Ayrıştırılacak hemoglobinin özelliğine göre zayıf katyon veya anyon değiştirici kolonlar seçilir (Genç 2005).

Açık sistemli klasik kolon kromatografisinde hareketli faz, durgun faz içinden düşük basınçla geçerken, HPLC'de hareketli faz ve kolon içine yüksek basınç ile pompalanmaktadır. Durgun faz, hareketli faz ve örnek arasındaki etkileşimlerin tipine bağlı olarak, HPLC'de farklı ayırıştırma özellikleri kullanılabilir. (Huisman ve vd. 1977, Huisman 1987, Aksoy ve vd. 2006). HPLC'nin klasik kromatografik sistemlere göre üstünlüğü aşağıdaki gibi özetlenebilir:

1. Duyarlılık
2. Analiz süresinin kısa oluşu
3. Tekrarlanabilirlik
4. Seçiciliğinin yüksek olması
5. Uygulama kolaylığı
6. İstenilen fraksiyonların saflaştırılması
7. Mikrogram düzeyinde az örnek ile çalışılması

Oldukça geniş kullanım alanlarına sahip olan bu sistem, kimyasallar, ilaçlar, peptidler, hormonlar, nükleik asitler, proteinler, yiyecekler, amino asitler ve vitaminler gibi konsantrasyonu düşük kimyasalları ayırıştırabilme kabiliyetine sahiptir (Huisman ve vd. 1977, Huisman 1987, Aksoy ve vd. 2006). Ayrıca bu sistem aşağıda özetlenen birçok özelliğe de sahiptir:

1. Sabit akım hızı sağlar, bu nedenle birikme zamanları analizden analize değişim göstermez.
2. Kompüterize gradyan kontrollü çözelti kompozisyonunun tekrarlanabilirliğini sağlar
3. Enjeksiyon valfi sayesinde enjekte edilen madde miktarı sabit tutulur ve istenilen miktarda örnek enjekte edilir.
4. Saptayıcılar istenilen duyarlılığı sağlar.

3.3.3. Tam kandan DNA izolasyonu

DNA izolasyonu için Axygen DNA izolasyon kiti kullanılmıştır. Bu method, özel bir hücre olan lizis ve hem/protein çökelme tampon maddesi (tampon madde AP1)'nin genomik DNA'nın seçici emmesiyle birlikte pıhtılaşması önlenmiş bütün kanın özel bir AxpPrep kolonuna etkili salınımına dayalıdır. Arıtılmış genomik DNA, yüksek moleküler DNA ağırlığını sonraki nükleaz ayrışmasına karşı korumaya yardım eden ve DNA çözünürlüğünü artıran 0.5mm EDTA içeren düşük tuz içerikli Tris tampon maddesi içerisinde ayrıştırılır. Kan genomik DNA'sı önceden kırmızı kan hücrelerinin (RBCs) çıkarılmasına gerek duyulmadan, tüm kanın bileşeni olan beyaz kan hücrelerinden (WBC) doğrudan doğruya izole edilmiştir. Bu aygıt DNA'yı kurumuş kandan çıkarmak için de kullanılabilir. Virüsel DNA, virüsel RNA ve mitokondrial DNA genomik DNA ile birlikte bu işlemle arıtılır. Tampon madde AP1 kan hücrelerinde mevcut olan virüs ve herhangi bakteriyi etkili bir şekilde yok eder, böylelikle bu bulaşıcı etmenlerin olası riskini azaltır.

3.3.3.1. Ayrıçlar

- Buffer AP1: Hücre lizis tamponudur. oda sıcaklığında bekletilir.
- Buffer AP2: protein tüketen tamponudur. Oda sıcaklığında bekletilir.
- Buffer W1A konsantrasyonu: yıkama tamponudur. Oda sıcaklığında bekletilir. İçerisine 17ml etanol eklenir
- Buffer W2 konsantrasyonu: tuz gideren tampondur. İçerisine 56ml etanol eklenip oda sıcaklığında bekletilir.
- Buffer TE: elüsyon tamponudur. Oda sıcaklığında bekletilir.

3.3.3.2. Yöntem

Eppendorf tüpe 500 µl buffer AP1 eklenip, üzerine 200 µl tam kan eklenmiş ve 10 sn. yüksek hızda vortex edilmiştir. Daha sonra, buffer AP2 eklenip 10 sn. yüksek hızda vortex edilmiştir. 12000 g'de 10 dk. santrifüj edilip, başka bir filtre tüpüne süpernatant aktarılıp pellet atılmıştır. Daha sonra, tekrar 12000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. İşlem sonunda, tüpte kalan sıvı atılmıştır (bu işlem her solüsyon eklenmesinden sonra tekrarlanmıştır). Ardından, 700 µl buffer W1A eklenip oda sıcaklığında 2 dk. bırakılmış ve 12000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra, 800 µl buffer W2 eklenip 12000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjden sonra, tekrar 500 µl buffer W2 eklenip 12000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Bu işlemin sonunda, solüsyon eklemekten 12000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. En son, 200 µl buffer TE eklenip oda sıcaklığında 1 dk. bekletilmiş ve 12000 g'de 1 dk. santrifüj edilmiştir. Böylece kandan, DNA izole edilmiştir.

3.3.4. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit in vitro DNA sentezi yöntemidir. Polimeraz zincir reaksiyonu Kary Mullis tarafından 1985'te bulunmuştur. PCR, ilk defa aynı yıl Saiki, Mullis ve arkadaşları tarafından orak hücre anemisi tanısının ortaya konulmasında kullanılmıştır (Saiki ve vd. 1988, Atalay ve vd. 1993).

PCR, farklı sıcaklıklardaki üç olayın döngüler halinde tekrarına dayanır. PCR ile DNA parçaları çoğaltılabilir ve çok küçük örneklerden incelemek için yeterli örnekler elde edilebilir.

PCR için gerekli olan materyaller;

1. Kalıp DNA (genomik DNA)
2. İki tane tek iplikli sentetik DNA oligonükleotidi (primerler), PCR yapılmak istenen gen dizisini belirler.
3. Deoksiribonükleotid trifosfat (dNTPs), DNA sarmalının sentezi için dATP, dTTP, dGTP, dCTP (hepsi dNTPs) olarak adlandırılan dört farklı deoksinükleotid trifosfata gereksinim vardır.

4. DNA polimeraz (Taq DNA pol.), tek zincirli DNA dizisinin saptanmasında tercih edilir. Sıcağa dayanıklı olduğu için yaygın kullanılan enzim türüdür.
5. Mg^{++} iyonu, primer bağlanması, kalıp DNA ve PCR ürünlerindeki çift sarmal yapının ayrılma ısısı, primer-dimer yapısı ve enzim aktivitesi üzerine etkisi bulunmaktadır (Özkınay 2014).

Polimeraz zincir reaksiyonu üç aşamada gerçekleşir:

- 1. Denatürasyon:** 94°C (201.2 F), çift iplikli DNA'ların ayrılması
- 2. Primer bağlanması:** 54°C (129.2F), primerlerin kalıp DNA'ya bağlanması
- 3. Zincir uzaması:** 72°C (161.6 F), Taq polimerazın DNA zincirini sentezlemesi

Bu üç aşamanın hepsi bir döngü olarak adlandırılmaktadır. Bu üç aşama daha sonra birçok kez tekrar edilmekte ve her tekrarda ürün yaklaşık iki katı kadar artmaktadır.

Bu çalışmada HbF değeri % 1.5 ve üstünde olan toplam 62 bireyin DNA'ları izole edilmiştir. Bu bireylerde HPFH'ye neden olan $A\gamma$ ve $G\gamma$ globin genlerinin delesyonel ve non delesyonel mutasyonları çalışılmıştır.

3.3.4.1. Delesyonel globin gen mutasyonlarını saptamak için yapılan amplifikasyon işlemleri ve kullanılan primerler

DNA'nın belli bir bölgesinin birçok kez replikasyona uğratarak çoğaltılması olarak tanımlanan amplifikasyon işleminde aşağıdaki ayıracılar kullanılmaktadır:

1. 10× Buffer $((NH_4)_2SO_4)$
2. 25 mM $MgCl_2$
3. 2 mM dNTPs
4. Taq polimeraz
5. 25 pM Primer

Bu çalışmada, $A\gamma$ ve $G\gamma$ globin genlerinin HPFH'ye neden olan Chinese $G\gamma(A\gamma \delta\beta)$ tip non-delesyonel mutasyonlarını saptamak için primerler kullanılmıştır. Craig vd. (1994)'nin yapmış olduğu çalışmaya göre G1, G2 ve G3 nolu 3 primer dizayn edilerek, her birey için normal ve mutant primerleri kullanılmıştır (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1. $A\gamma$ ve $G\gamma$ genlerinin Chinese $G\gamma(A\gamma \delta\beta)$ tip delesyonel mutasyonlarının saptanması için amplifikasyon işlemi sırasında kullanılan primerler

Primerler	Baz dizisi (5'-3')	Gen Koordinatları
G1	5'-GGCATATATTGGCTCAGTCA-3'	40286-40305
G2	5'-CTTGCAGAATAAAGCCTATC-3'	40966-40947
G3	5'-TCAACAATTATCAACATTACACC-3'	N/A

3.3.4.2. Non-delesyonel globin gen mutasyonlarını saptamak için yapılan amplifikasyon işlemleri ve kullanılan primerler

DNA'nın belli bir bölgesinin birçok kez replikasyona uğratılarak çoğaltılması olarak tanımlanan amplifikasyon işleminde aşağıdaki ayıracılar kullanılmaktadır:

1. 10× Buffer ((NH₄)₂SO₄)
2. 25 mM MgCl₂
3. 2 mM dNTPs
4. Taq polimeraz
5. 25 pM Primer

Bu çalışmada, $A\gamma$ ve $G\gamma$ genlerinin sırasıyla 680 ve 666 bp uzunluğunda olan ve olası mutasyonları içeren bölgelerin amplifikasyonu yapılmıştır. Bunun için her gen bölgesi için ileri (F, forward) ve geri (R, reverse) primerler dizayn edilerek kullanılmıştır (Çizelge 3.2.). Amplifikasyon gerçekleştirildikten sonra amplifikasyon ürünü DNA'ların hizmet alımı yoluyla sekans analizi yapılmıştır.

Çizelge 3.2. $A\gamma$ ve $G\gamma$ genlerinin nondelesyonel mutasyonlarının saptanması için amplifikasyon işlemi sırasında kullanılan primerler

Gen	Primer	Baz dizisi (5'-3')	PCR ürünü (bp)
GAMA-1	5-AGI F	5'-TCTATTACTGCGCTGAACTGTG-3'	680
A-GAMA	3-AGI R	5'-GTCTGGACTAGGAGCTTATTGAT-3'	
GAMA-2	5-GGI F	5'-AACTGTTGCTTTATAGGATTTTCA-3'	666
G-GAMA	3-GGI R	5'-GTCTGGACTAGGAGCTTATTGAT-3'	

3.3.4.3. Yöntem

3.3.4.3.1. Delesyonel HPFH yöntemi

Bu çalışmada $A\gamma$ ve $G\gamma$ globin genlerinde tüm bireyler için Chinese $G\gamma(A\gamma \delta\beta)$ delesyonel mutasyon tipi çalışılmıştır. Bunun için PCR koşulları ve kullanılan kimyasallar aşağıdaki gibi hesaplanmıştır (Craig ve vd. 1994) (Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4). PCR 35 döngü olarak gerçekleştirilmiştir. Her bireyin DNA'sı iki farklı tüpe paylaştırılmıştır. Delesyonun olmadığı normal geni saptamak için tüplerden birisine G1 ve G2 primerlerini, delesyonun varlığını saptamak için ise diğer tüpe G1 ve G3 primerlerini ilave ederek amplifikasyon gerçekleştirilmiştir. Delesyon varlığında G2 primerinin bağlanma noktası kaybolacak fakat yaklaşık 100 kb uzaklıkta bulunan G3 primerinin bağlanması sonucunda G1 ve G3 arasında kalan 508 bp uzunluğunda bir bölge amplifiye olacaktır. Bu durumda yaklaşık 100 kb büyüklüğünde bir delesyonun var olduğu anlaşılmaktadır.

Çizelge 3.3. Delesyonel çalışmalarda bir örnek için amplifikasyonda kullanılan kimyasallar.

10X Buffer ((NH ₄) ₂ SO ₄)	2,5 µL
25mM MgCl ₂	2,5
2 mM dNTPs	2,5 µL
Taq polimeraz	0,5 µL
5'Forward primer	1 µL
3'Reverse primer	1 µL
Genomik DNA	5 µL
Steril distile su	10 µL
Toplam hacim	25 µL

Çizelge 3.4. Chinese $G\gamma(A\gamma \delta\beta)$ tip delesyonel HPFH için PCR programı ve MgCl₂ miktarları

				PCR Döngüsü					
				Denaturation		Annealing		Extention	
Delesyon	Primerler	PCRürünü(bp)	MgCl ₂ (mmol/L)	Sıcaklık (°C)	Süre (min)	Sıcaklık (°C)	Süre (min)	Sıcaklık (°C)	Süre (min)
Chinese $G\gamma(A\gamma \delta\beta)$	G1-G3 G1-G2	508(mutant) 682(normal)	2.5	94	1	58	1	72	2

3.3.4.3.2. Nondelesyonel HPFH yöntemi

Bu çalışmada $A\gamma$ ve $G\gamma$ globin genlerinin HPFH'ye neden olan non-delesyonel mutasyonlarını saptamak için gerekli PCR şartları, kimyasallar ve miktarları Craig ve vd.(1993)'nin yapmış olduğu çalışmadaki yöntemlere göre minör değişiklikler ile birlikte ayarlanmıştır (Çizelge 3.5.)

Çizelge 3.5. Non delesyonel çalışmalarda her bir örnek için amplifikasyonda kullanılan kimyasallar

10X Buffer ((NH ₄) ₂ SO ₄)	2,5 µL
25mM MgCl ₂	2,5 µL
2 mM dNTPs	2,5 µL
Taq polimeraz	0,5 µL
5'Forward primer	1 µL
3'Reverse primer	1 µL
Genomik DNA	5 µL
Steril distile su	10 µL
Toplam hacim	25 µL

PCR protokolünün ısı ve süreleri $G\gamma$ ve $A\gamma$ globin genlerinin optimize olması için annealing sıcaklıkları farklı verilmiştir (Craig ve vd. 1993). PCR protokolü ile bir ön çalışma yaptığımızda $G\gamma$ globin genini en iyi optimize eden annealing sıcaklığı 57°C iken, $A\gamma$ globin geninin annealing sıcaklığı 63°C olarak bulunmuştur (Çizelge 3.6. ve Çizelge 3.7.).

Çizelge 3.6. $G\gamma$ geninin PCR protokolü.

95°C	5dk	30 döngü
95°C	1dk	
57°C	1dk	
72°C	2dk	
72°C	10dk	

Çizelge 3.7. $\Lambda\gamma$ geninin PCR protokolü

95°C	5dk	30 döngü
95°C	1dk	
63°C	1dk	
72°C	2dk	
72°C	10dk	

3.3.5. Agaroz jel elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi; izole edilmiş DNA molekülünün tanımlanması ve saflaştırılması için kullanılan standart bir yöntemdir. Agaroz jelde DNA molekülleri içerdikleri nükleotid sayısının logaritması ile ters orantılı olarak anoda doğru göç ederler, bu göç hızı jele eş zamanlı uygulanan kontrol DNA ile birlikte değerlendirilir.

3.3.5.1. Çözeltiler

1) 5×Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu pH 8.0:

Tris baz 54.0 g

Borik asit 27.5 g

EDTA [0.5 M, pH:8.0] 20 mL

Bir miktar saf suda çözünerek 1 L'ye tamamlanır.

2) Elektroforez için 0.5X TBE Tamponu:

5×TBE'den 10 mL alınarak saf su ile 200 mL'ye tamamlanır.

3) %2'lik Agaroz jel:

2 g Agaroz 100 mL 0.5×TBE tamponu içerisinde mikrodalga fırında eritilir. Hafif soğuyunca jel kaplarına dökülür.

4) Yükleme tamponu

Brom fenol Mavisi %0.05

Gliserol %10

Ficoll %15

0.5×TBE tamponu ile 100 mL'ye tamamlanır.

5) Etidyum Bromür çözeltisi:

Etidyum Bromür 5 µg/µL olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanır.

3.3.5.2. Yöntem

0.5×TBE tamponu içinde mikrodalga fırında çözölen %2'lik NuSieve-Agaroz jel elektroforez kapları içine dökölür. Soğuduktan sonra 0.5×TBE tamponuyla dolu elektroforez tankı içine yerleştirilir. Jel içindeki tarak çıkarılıp aplikasyon kuyucukları tampon ile doldurulur. Amplifiye örnekten 5 µL ile yükleme tamponu karıştırılarak kuyucuklara applike edilir. Bu jel 150 voltta 60 dakika yürütölüp elektroforez sonrası jel, etidyum bromür ile 20 saniye boyanır ve saf suda yarım saat bekletilerek boya atıklarından temizlenir. UV ışığı altında DNA fragmanlarının fotoğrafı çekilerek değeriendirilir.

3.3.6. DNA dizi analizi

DNA dizi analizi, DNA birincil yapılarının ve nükleotit baz dizilerinin belirlenmesinde kullanılan yöntemdir. DNA'nın nükleotit dizilerinin saptanması anlamına gelir.

İlk DNA dizi analiz çalışmaları 1960'lı yılların başında 75-80 nükleotitlik tRNA'larla başlanmıştır. Nükleotit dizilerinin belirlenmesinde iki temel teknik kullanılır.

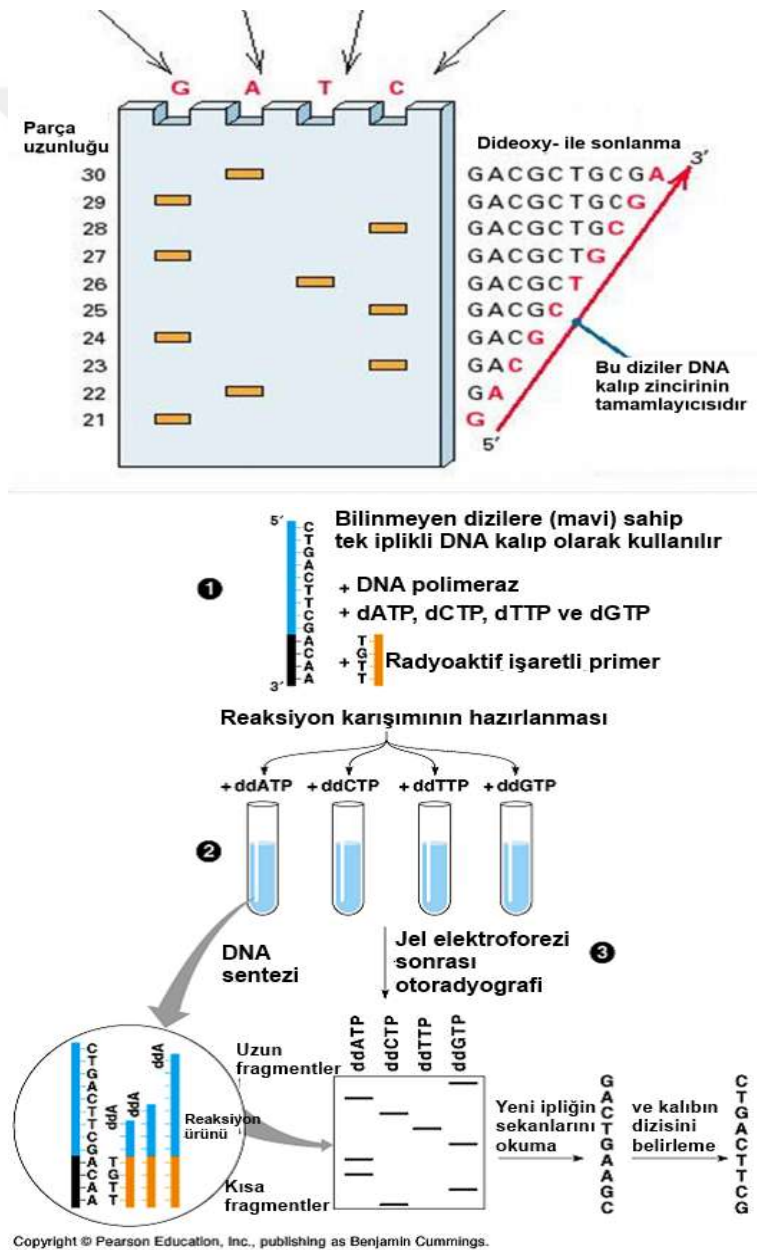
-Sanger dideoksi yöntemi

-Maxam-Gillbert kimyasal degradasyon yöntemi

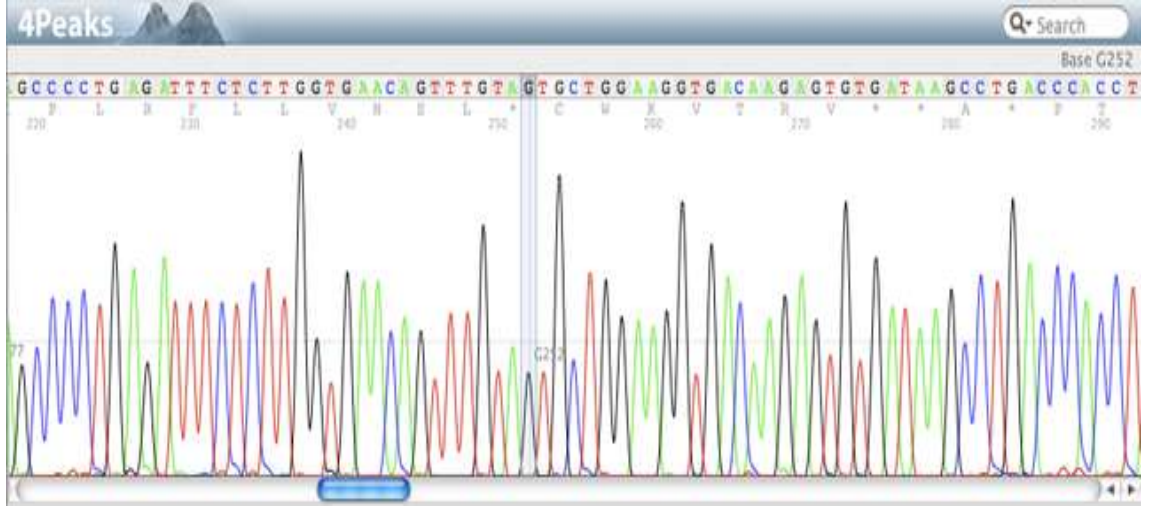
DNA dizi analizinde en sık Sanger'in dideoksi terminasyon reaksiyonu prensibine dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Tehlikeli kimyasallardan uzak ve daha hızlı bir yöntem olduğı için Sanger yöntemi tercih edilir. Bu yöntemde dizisi saptanacak olan DNA ipliğı yeni sentezlenecek iplik için kalıp olarak kullanılır. DNA sentezini sağlamak için Klenov, Taq DNA polimeraz, ters transkriptaz ya da sekuenaz enzimlerinden birisi kullanılabilir. Yöntemin temeli DNA polimerazın, dört çeşit deoksinükleozit trifosfatın yanı sıra deoksiribozun 3'-OH grubu taşımayan dideoksinükleotid trifosfat (ddNTP)'ları da substrat olarak kullanabilmesine dayanır. Polimerizasyon işlemi sırasında, son bağlanan nükleotidin 3'-OH ucuna yeni bir nükleotid bağlanarak zincir uzamaktadır. Dideoksi terminasyon metodunda kullanılan sentetik oligonükleotidlerin yapısında yer alan deoksiribozun 3. karbonunda OH yerine H bulunmaktadır. Sentez sırasında yapıya dNTP eklendiğı zaman sentez devam etmekte ama zincire bir ddNTP eklenmesi durumunda zincir uzaması

sonlanmaktadır. Bu nedenle zincir sonlandırma metodu (dideoksi terminasyon reaksiyonu) olarak da adlandırılır (Sanger ve vd. 1977, Klug ve vd. 2000, Genç 2005) (Şekil 3.1 ve 3.2)

Geçmişte radyoaktif madde ^{35}S , ^{33}P yada ^{32}P ile işaretleme işlemi yapılırken günümüzde ddNTP'lerin her biri farklı flüoresans maddelerle işaretlenmektedir. Otomatik DNA dizi analizi cihazlarında kapiller elektroforez tekniği kullanılarak kısa süre içinde sekanslama işlemi yapılmaktadır. Bu cihazlarda elektroforez esnasında lazer okuyucu ile renkli flüoresans işaretli DNA fragmentleri uzunluklarına göre ayrılmakta ve bilgisayar programı ile değerlendirilmektedir (Genç 2005).



Şekil 3.1. Dizi analizinde kullanılan Sanger yöntemi



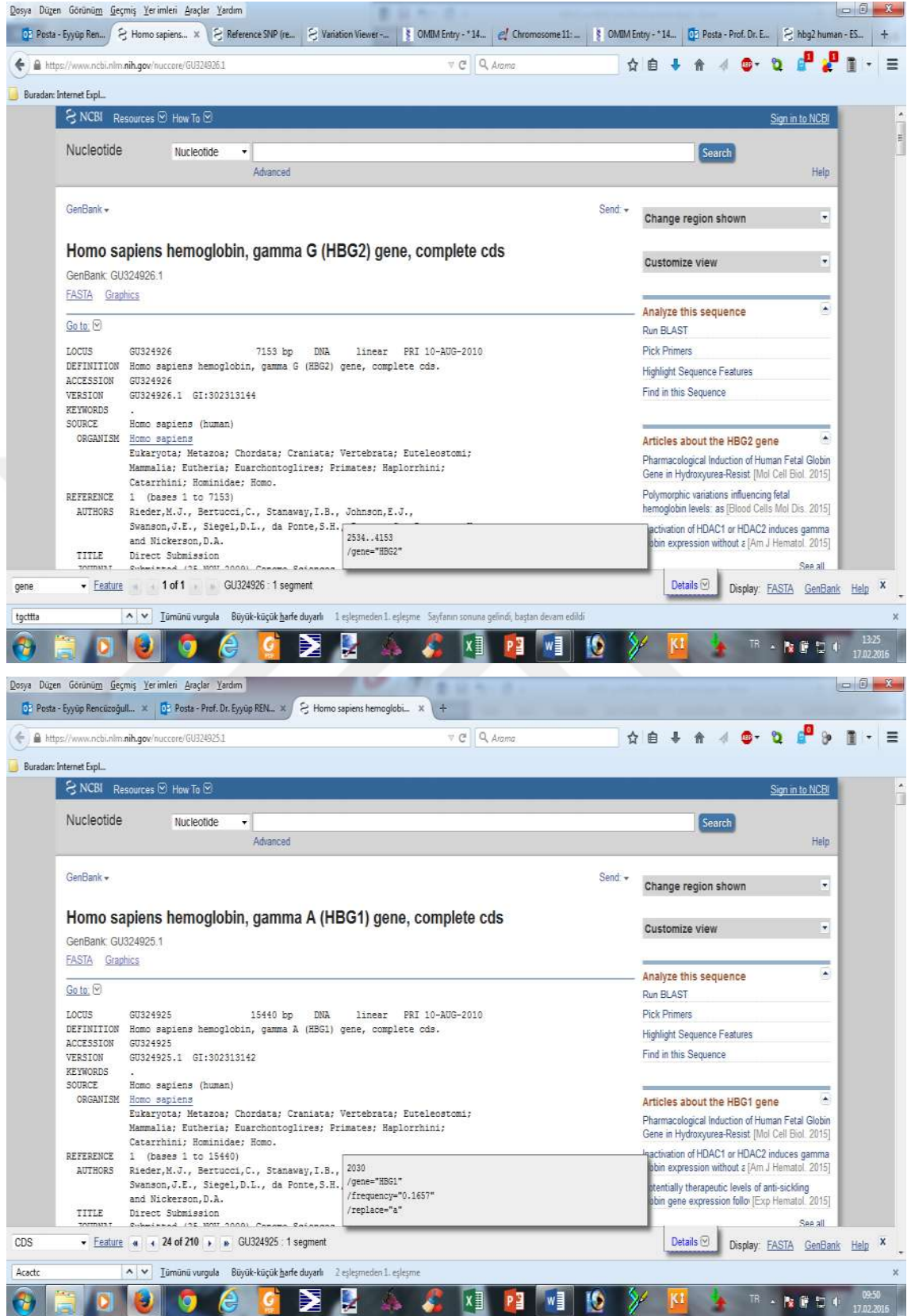
Şekil 3.2. DNA dizi analizi örneği

Bu çalışmada amplifikasyon görüntüleri iyi olan örneklerin DNA dizi analizi hizmet alımı yoluyla otomatik DNA dizi analizi Sanger'in enzimatik DNA sentezine dayanan zincir sonlanma yöntemi kullanılarak yapılmıştır.

Otomatik DNA dizi analiz cihazları basit olarak sabit bilgisayarda yüklü programlar ile bu programların yönettiği elektroforez sistemini içerir. Elektroforetik ünitelerde bulunan lazer ışık kaynağı ile monokromatik bir ışık oluşturulur. Söz konusu DNA'nın bulunduğu jelmatriks bu monokromatik ışık ile taranır. Elektroforez süresince DNA'ya bağlanan floresan boya ışık ile taranan bölgeye geldiğinde uyarılır. Uyarılan boya kendi için karakteristik olan dalga boyunda ışığı geri yansıtır. Yansıyan bu ışık demeti bir dedektör tarafından kaydedilir. Kaydedilen veriler bilgisayar programları ile değerlendirilerek sonuçlar grafiksel ya da matematiksel olarak bilgisayar ekranına aktarılır. DNA dizi analizi cihazlarında 6 bazdan 1000 baza kadar güvenli okuma yapılabilmektedir.

İstatistiksel analiz SPSS paket program ile (version 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL) gerçekleştirilmiştir.

Sekans analizleri sonucunda bu çalışmada saptanan genetik değişimler gen bankası kayıtlarında daha önce saptanmış $G\gamma$ ve $A\gamma$ geninin dizileri ile karşılaştırılmıştır (GenBank: GU324926 ve GU324925) (Şekil 3.3).



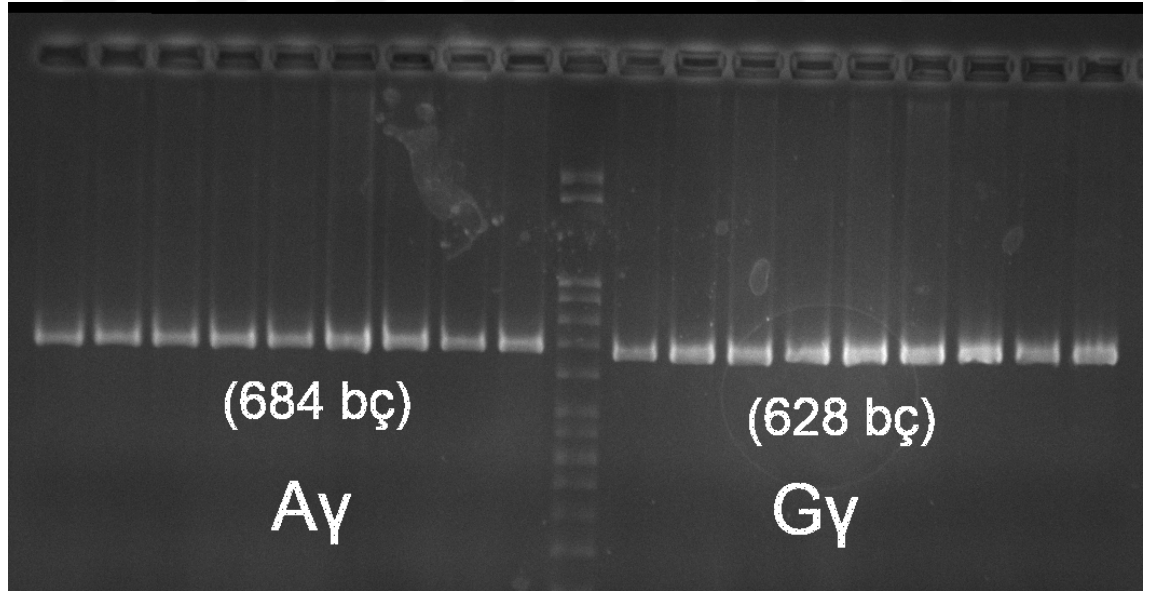
Şekil 3.3. Gen bankasında kayıtlı olan γ_G ve γ_A geninin varyasyonları ve orijinal dizinin kayıtlı olduğu web siteleri <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU324926.1>
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/GU324925.1>.

4. BULGULAR

Bu çalışmada HbF düzeyi % 1.5 ve daha yüksek olan toplam 62 kişinin hem $G\gamma$ ve hem de $A\gamma$ genlerinde (HBG2 ve HBG1) delesyonel ve non delesyonel mutasyonlar taranmıştır.

4.1. Non Delesyonel Mutasyonların Taranması

Non delesyonel mutasyonların taranması için her iki genin promotör dizilerinin sekansları saptanmıştır. Bunun için genin yukarı kısmında bulunan ve promotör dizilerini içeren yaklaşık 600 bç'lik bölge her iki yönden sekanslanmıştır. Sekanslama işleminden önce sekanslanacak bölgenin amplifiye olup olmadığı elektroforez ile izlenmiştir (Şekil 4.1). $G\gamma$ geninin promotör bölgesinde yaklaşık 628 bç, $A\gamma$ geninin promotör bölgesinde de yaklaşık 684 bç amplifiye edilerek iki yönden sekanslanmıştır. Sekans sonuçları $G\gamma$ ve $A\gamma$ genin orijinal dizileriyle hem 5' yönünden hem de 3' yönünden karşılaştırılarak kontrol edilmiştir.

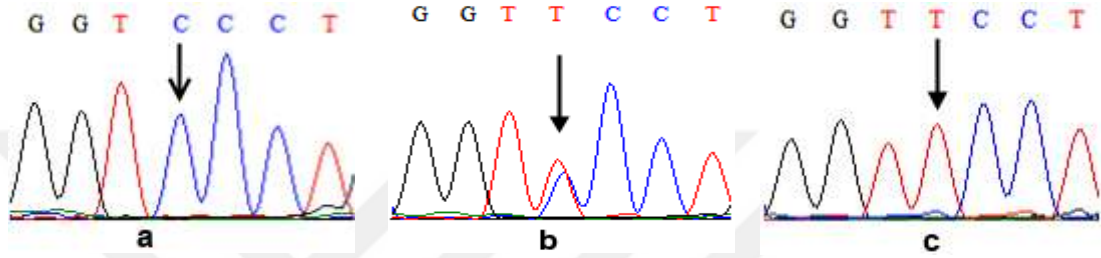


Şekil 4.1. Sırasıyla $A\gamma$ ve $G\gamma$ genlerinin amplifikasyon ürünlerinin elektroforezi

4.1.1. $G\gamma$ geninin promotör bölgesinin sekans analizi

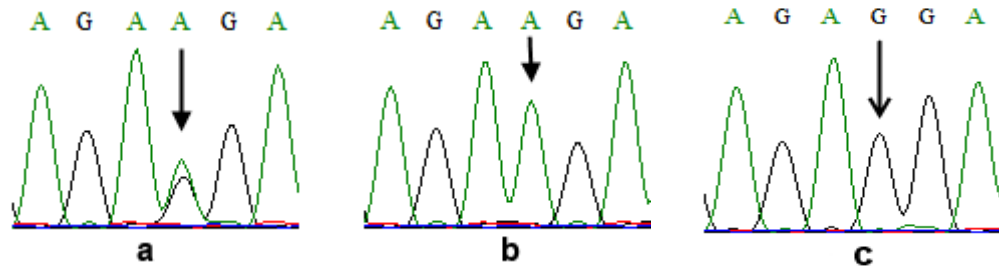
$G\gamma$ geninin promotör bölgesinin sekans analizlerine göre -158, -309, -369 ve -567 lokalizasyonunda varyasyonlara rastlanmıştır.

-158 lokalizasyonunda 27 kişi C için homozigot (C/C) olarak saptanmıştır (Şekil 4.2a). Bununla birlikte 29 kişinin C/T heterozigot ve 6 kişinin de T/T homozigot oldukları belirlenmiştir (Şekil 4.2, b,c).



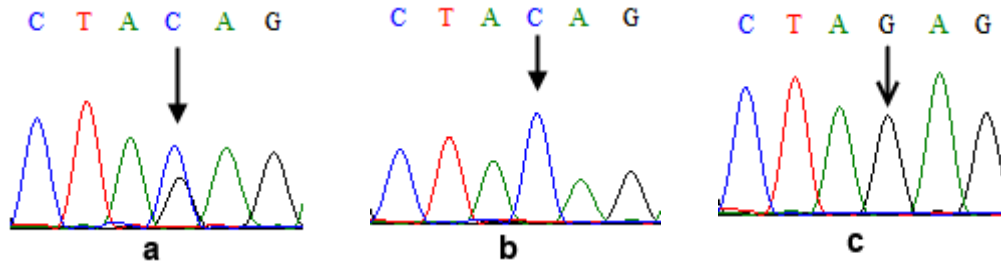
Şekil 4.2. $G\gamma$ geninin -158 lokasyonunda C/C homozigotlar (a), -158 C/T heterozigotlar (b) ve -158 T/T homozigotlar (c)

Sekans analizleri sonucunda $G\gamma$ geni promotör bölgesinde sadece bir kişinin -309 lokalizasyonunda A/G heterozigot ve yine sadece bir kişinin G/G homozigot olduğu saptanırken (Şekil 4.3a ve c), 60 kişinin A/A homozigot olduğu bulunmuştur (Şekil 4.3b).



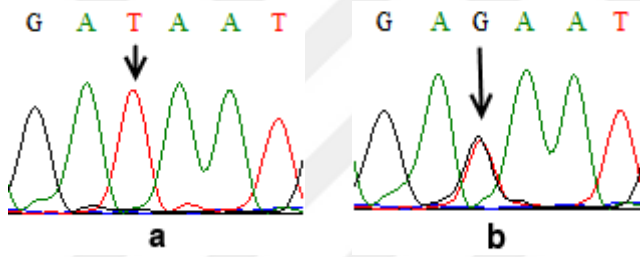
Şekil 4.3. $G\gamma$ geninde -309 lokasyonlu varyasyonlar, a)-309 A/G heterozigotlar, b)-309 A/A homozigotları, c) G/G homozigotları

Yine sadece bir kişinin -369 lokalizasyonunda C/G heterozigot olduğu ve bir kişinin G/G homozigot olduğu (Şekil 4.4a ve c), geri kalan 60 kişinin ise -369 C/C homozigot baz dizisine sahip olduğu, belirlenmiştir (Şekil 4.4b).



Şekil 4.4. $G\gamma$ geninde -369 lokasyonlu varyasyonlar, a)-369 C/G heterozigotlar, b)-369 C/C homozigotları, c)-369 G/G homozigotları

Yapılan analizler sonucunda sadece bir kişi de -567 lokalizasyonunda T/G heterozigot varyasyonuna rastlanmıştır. Analiz edilen diğer 61 kişinin ise T/T homozigot olduğu saptanmıştır. -567 lokalizasyonunda G/G homozigotlarına rastlanmamıştır (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. $G\gamma$ geninde -567 lokasyonlu T/T homozigot (a) ve T/G heterozigot (b) varyasyonları

$G\gamma$ promotör bölgesinde incelenen mutasyonlar, lokasyonları her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi Çizelge 4.1, 4.2, 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.1 incelendiğinde $G\gamma$ promotör bölgesinin -158 lokasyonunda ortalama değer bakımından en yüksek HbF değerinin normal olan C/C (2,20) homozigotlarında, en düşük HbF değerinin ise T/T (1.83) homozigotlarında saptanmıştır. Fakat değerler arasında istatistiki bakımında önemli bir fark saptanamamıştır. Ortalama HbA2 değerleri arasında da istatistiksel bakımından anlamlı bir fark görülmemiştir.

Çizelge 4.1. G_γ promotörünün -158 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi

Lokasyon -158	N	Ortalama	Standart sapma	Std. hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
HbA2 CC	27	2,8852	,28515	,05488	2,7724	2,9980	2,40	3,40
CT	29	2,8517	,29835	,05540	2,7382	2,9652	2,00	3,50
TT	6	2,9667	,31411	,12824	2,6370	3,2963	2,50	3,40
Total	62	2,8774	,29108	,03697	2,8035	2,9513	2,00	3,50
HbF CC	27	2,2074	1,13508	,21845	1,7584	2,6564	1,50	7,10
CT	29	2,0241	,50544	,09386	1,8319	2,2164	1,50	3,80
TT	6	1,8333	,36697	,14981	1,4482	2,2184	1,50	2,50
Total	62	2,0855	,83191	,10565	1,8742	2,2968	1,50	7,10

ANOVA

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Sig.P
HbA2 Gruplar arası varyans	,069	2	,034	,397	,674
Grup içi varyans	5,100	59	,086		
Total	5,168	61			
HbF Gruplar arası varyans	,892	2	,446	,637	,533
Grup içi varyans	41,325	59	,700		
Total	42,217	61			

G_γ promotörünün -309 bölgesinde de A/A homozigotlar normal olarak kabul edilirken, G/G homozigotlarında en yüksek HbF değerine rastlanmıştır (7.10), en düşük değer ise A/A homozigotlarında saptanmıştır (1.97). Ortalama HbF değerleri arasında istatistiksel anlamda önemli bir farkın var olduğu ve G/G homozigot tip varyasyonun HbF değerini önemli ölçüde artırdığı görülmektedir. Fakat HbA2 değerleri arasında istatistiksel bakımından önemli bir farklılık saptanmamıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. γ promotörünün -309 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi

Lokasyon -309	N	Ortalama	Standart sapma	Std. hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
HbA2 AG	1	2,8000	.	.	.	.	2,80	2,80
AA	60	2,8733	,29278	,03780	2,7977	2,9490	2,00	3,50
GG	1	3,2000	.	.	.	.	3,20	3,20
Total	62	2,8774	,29108	,03697	2,8035	2,9513	2,00	3,50
HbF AG	1	3,8000	.	.	.	.	3,80	3,80
AA	60	1,9733	,47617	,06147	1,8503	2,0963	1,50	3,50
GG	1	7,1000	.	.	.	.	7,10	7,10
Total	62	2,0855	,83191	,10565	1,8742	2,2968	1,50	7,10

ANOVA

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Sig.P
HbA2 Gruplar arası varyans	,111	2	,056	,648	,527
Grup içi varyans	5,057	59	,086		
Total	5,168	61			
HbF Gruplar arası varyans	28,840	2	14,420	63,59	,000
Grup içi varyans	13,377	59	,227		
Total	42,217	61			

Yukarıda saptanan durum aynı -369 lokalizasyonunda da gözlenmiştir (Çizelge 4.3). Normal genotip olan C/C homozigot genotipine sahip bireylerde en düşük HbF değerine rastlanırken (1.97), G/G homozigotlarda en yüksek HbF değeri ölçülmüştür (7.10). Ortalama HbF değerleri arasında da istatistiksel anlamda önemli fark bulunmuştur. HbA2 değerlerin ise herhangi bir farkın var olmadığı görülmektedir.

Çizelge 4.3. G_{γ} promotörünün -369 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi

Lokasyon -369	N	Ortalama	Standart sapma	Std. hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
HbA2 CG	1	2,8000	.	.	.	.	2,80	2,80
CC	60	2,8733	,29278	,03780	2,7977	2,9490	2,00	3,50
GG	1	3,2000	.	.	.	.	3,20	3,20
Total	62	2,8774	,29108	,03697	2,8035	2,9513	2,00	3,50
HbF CG	1	3,8000	.	.	.	.	3,80	3,80
CC	60	1,9733	,47617	,06147	1,8503	2,0963	1,50	3,50
GG	1	7,1000	.	.	.	.	7,10	7,10
Total	62	2,0855	,83191	,10565	1,8742	2,2968	1,50	7,10

ANOVA

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Sig.P
HbA2 Gruplar arası varyans	,111	2	,056	,648	,527
Grup içi varyans	5,057	59	,086		
Total	5,168	61			
HbF Gruplar arası varyans	28,840	2	14,420	63,59	,000
Grup içi varyans	13,377	59	,227		
Total	42,217	61			

Çizelge 4.4. G_{γ} promotörünün -567 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi

Lokasyon -567	N	Ortalama	Standart sapma	Std. hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
HbA2 TT	61	2,8820	,29127	,03729	2,8074	2,9566	2,00	3,50
TG	1	2,6000	.	.	.	.	2,60	2,60
Total	62	2,8774	,29108	,03697	2,8035	2,9513	2,00	3,50
HbF TT	61	2,0951	,83535	,10696	1,8811	2,3090	1,50	7,10
TG	1	1,5000	.	.	.	.	1,50	1,50
Total	62	2,0855	,83191	,10565	1,8742	2,2968	1,50	7,10

ANOVA

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Sig.P
HbA2 Gruplar arası varyans	,078	1	,078	,922	,341
Grup içi varyans	5,090	60	,085		
Total	5,168	61			
HbF Gruplar arası varyans	,348	1	,348	,499	,483
Grup içi varyans	41,869	60	,698		
Total	42,217	61			

$G\gamma$ promotörünün -567 bölgesinde sadece bir kişinin T/G varyasyonuna sahip olduğu görülmüştür (Çizelge 4.4). Hem HbF hem de HbA2 değerleri arasında istatistiksel bakımından herhangi bir fark görülmemiştir.

GenBank kayıtlarına göre $G\gamma$ geninin promotör bölgesinde var olan varyasyonlar Çizelge 4.5'te verilmiştir. Genin promotör bölgesinde 10 varyasyonun saptandığı bunun bir tanesinin (-392/-397 lokalizasyonunda) CTTTAA delesyonu olduğu diğer 9 varyasyonun ise baz değişimi şeklinde gerçekleştiği kaydedilmiştir.

Yukarıdaki çizelgelerde belirtilen varyasyonlar (Çizelge 4.1-4.4) ile Çizelge 4.5 karşılaştırıldığında bu çalışmada $G\gamma$ geninin promotör bölgesinde saptanan varyasyon bölgelerinin -567 lokalizasyondaki varyasyon hariç diğerlerinin tamamının (-158, -309 ve -369 lokalizasyonları) daha önce saptanarak GenBank kayıtlarına girmiş olduğu görülmektedir. Bu çalışmada -567 T/G varyasyonu ilk defa saptanmıştır.

Çizelge 4.5. Gen Bank kayıtlarına göre $G\gamma$ geninin promotör bölgesinde var olan varyasyonlar.

Gen bankasında kayıtlı varyasyon numarası	Promotör bölgesindeki lokalizasyonu	Varyasyon tipi Orijinal/değişmiş	Frekansı
2029	-505	C/T	0,0169
2134/2142	-392/-397	CTTTAA del	0,0881
2156	-378	C/T	0,0056
2165	-369	C/G	0,2905
2185	-349	G/T	0,0084
2225	-309	A/G	0,3457
2227	-307	A/G	0,0085
2279	-255	G/A	0,0028
2376	-158	C/T	0,1747
2518	-16	C/G	0,0027

γ promotör bölgesinde sekanslanan bölgede daha önce saptanan ve bizim bu çalışmada saptadığımız varyasyonlar aşağıda görülmektedir.

ctgaaactgt Primer bağlanma ileri	tgctttatag	gatttttcac	tacactaatg -590	agaacttaag -580	agataatggc -570 **									
ctaaaaccac -560	agagagtata -550	ttcaaagata -540	agtatagcac -530	ttcttatttg -520	gaaacc <u>aatg</u> -510 *									
cttactaaat -500	gagactaaga -490	cgtgtcccat -480	caaaaatcct -470	ggacctatgc -460	ctaaaacaca -450									
tttcacaatc -440	cctgaacttt -430	tcaaaaattg -420	gtacatgctt -410	taa <u>ctttaaa</u> -400 *	ctacaggcct -390									
cactggagct -380 *	acagacaaga -370 */**	aggtgaaaaa -360	cggctgacaa -350 *	aagaagtcct -340	ggtatcttct -330									
atggtgggag -320	aa <u>g</u> aaaaacta -310 * *	gctaaaggga -300	agaataaatt -290	agagaaaaat -280	tggaatgact -270									
gaatc <u>g</u> gaac -260 *	aaggcaaagg -250	ctataaaaaa -240	aattaagcag -230	cagtatcctc -220	ttgggggccc -210									
cttccccaca -200	ctatctcaat -190	gcaaatatct -180	gtctgaaacg -170	gt <u>c</u> cctggct -160 */**	aaactccacc -150									
catgggttgg -140	ccagccttgc -130	cttga <u>ccaat</u> -120 ***	agccttgaca -110	aggcaaactt -100	ga <u>ccaat</u> agt -90 ***									
cttagagtat -80	ccagtgaggc -70	ca <u>ggggccgg</u> -60 ***	cggctggcta -50	gggatgaaga -40	<u>ataaaa</u> aggaa -30 ***									
gcac <u>c</u> ttca -20 *	gcagttccac -10	<u>acactcgctt</u> -1	ctggaacgtc	tgaggttatc	aataag <u>ctcc</u> Primer									
tagtcagac bağlanma geri	<i>gcc</i> M	<i>ATG</i> G	<i>GGT</i> H	<i>CAT</i> F	<i>TTC</i> T	<i>ACA</i> E	<i>GAG</i> E	<i>GAG</i> D	<i>GAC</i> K	<i>AAG</i> A	<i>GCT</i> T	<i>ACT</i> I	<i>ATC</i> T	<i>ACA</i> T
Ekzon 1 amino asitler														

*Daha önce saptanan varyasyonlar (GenBank, GU324926.1)

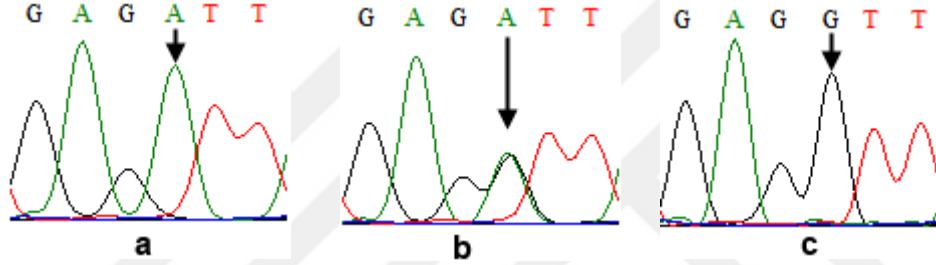
**Bu çalışmada saptanan varyasyonlar

***Promotör bölgeleri (Langdon ve Kaufman, 1998): -26/-30 TATA Kutusu, -51/-58 GC Kutusu, -84/-88 CAAT Kutusu, -111/-115 CAAT Kutusu

4.1.2. $\Lambda\gamma$ geninin promotör bölgesinin sekans analizi

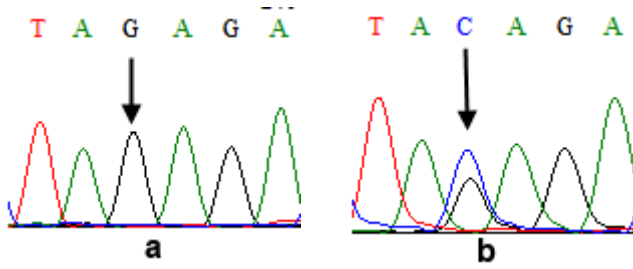
$\Lambda\gamma$ geninin promotör bölgesinin sekans analizlerine göre ise -222/-225 lokasyonlu delesyon tip varyasyonlar ile birlikte +25, -369, -499 ve ayrıca -588 lokalizasyonlarında baz dizisi değişimlerine rastlanmıştır.

$\Lambda\gamma$ geninin promotör bölgesi sekans analizine tabi tutulan 53 kişinin 7'sinin 5'-UTR bölgesi +25 lokalizasyonunda homozigot A/A dizisine rastlanırken (Şekil 4.6a), 19 kişinin +25A/G heterozigot (Şekil 4.6b) ve 25 kişinin de +25G/G homozigot (Şekil 4.6c) baz dizisine sahip olduğu saptanmıştır. +25 bölgesi primer bağlanma bölgesine yakın olmasından dolayı 11 kişinin +25 bölgesi sekans analizleri değerlendirilememiştir.



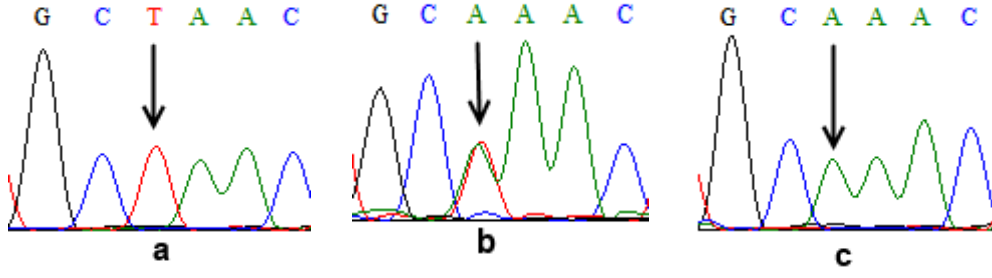
Şekil 4.6. $\Lambda\gamma$ geninde +25 lokasyonlu varyasyonlar, a)+25 A/A homozigotlar, b)+25 A/G heterozigotları, c)+25 G/G homozigotları

$\Lambda\gamma$ geninin -369 lokalizasyonunda saptanan G/G homozigotluğun 57 kişide bulunduğu (Şekil 4.7a), 5 kişinin ise G/C heterozigot olduğu saptanmıştır (Şekil 4.7b). -369 lokalizasyonunda ise C/C homozigotlarına rastlanmamıştır.



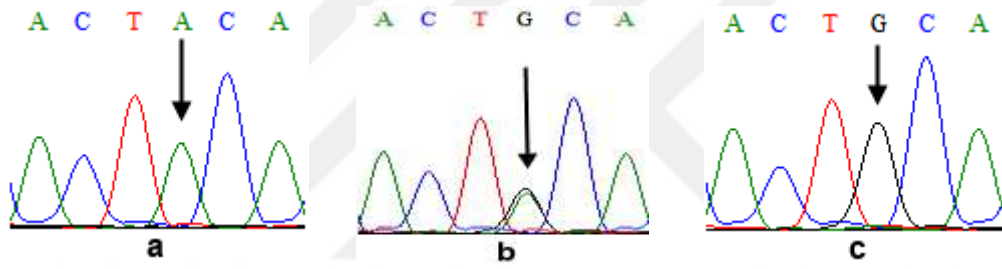
Şekil 4.7. $\Lambda\gamma$ geninde -369 lokasyonlu varyasyonlar, a)-369 G/G homozigotlar, b)-369 G/C heterozigotları

İncelenen 62 kişinin 58'i -499 lokalizasyonunda T/T homozigotu iken 1 kişide T/A ve 3 kişide de A/A varyasyonlarına rastlanmıştır (Şekil 4.8).



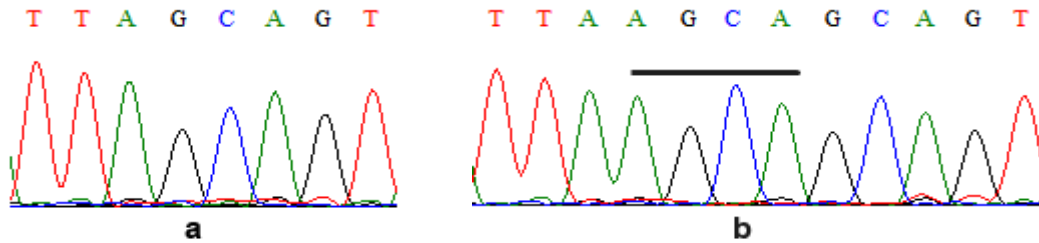
Şekil 4.8. $\alpha\gamma$ geninde -499 lokasyonlu varyasyonlar, a)-499 T/T homozigotlar, b)-499 T/A heterozigotları ve c)-499 A/A homozigotları

$\alpha\gamma$ geni promotör bölgesi -588 lokalizasyonunda 5 kişinin A/A homozigot (Şekil 4.9a), 23 kişinin G/A heterozigot (Şekil 4.9b) ve yine 23 kişinin de G/G homozigot (Şekil 4.9c) oldukları saptanmıştır. Aynı şekilde -588 bölgesi primer bağlanma bölgesine yakın olmasından dolayı 11 kişinin -588 bölgesi sekans analizleri değerlendirilememiştir.



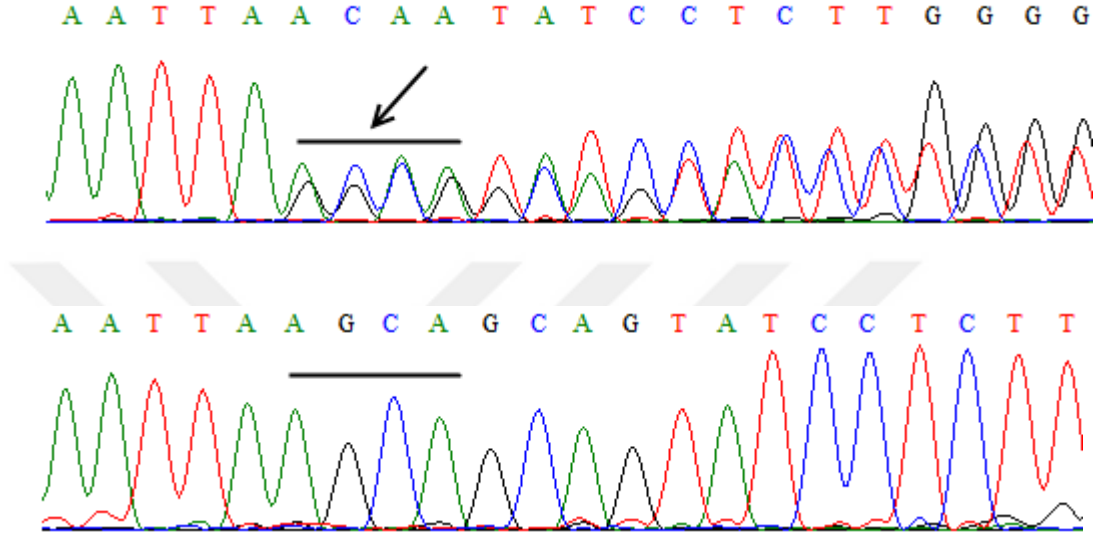
Şekil 4.9. $\alpha\gamma$ geninde -588 lokasyonlu varyasyonlar, a)-588 A/A homozigotlar, b)-588 A/G heterozigotları, c)-588 G/G homozigotları

$\alpha\gamma$ geninde sadece bir kişide -222 ile -225 bazları arasında homozigot AGCA delesyonuna rastlanmıştır. Bu bölgeyi içine alan normal baz dizisi TTAAGCAGCAGT şeklinde iken bu kişide TTAGCAGT şekline dönüşmüştür (Şekil 4.10a ve b).



Şekil 4.10. $\alpha\gamma$ geninde -222 ile -225 bölgelerinde AGCA delesyonu (a) ve normal baz dizisi (b)

Ayrıca yine $\Lambda\gamma$ geninde aynı mutasyon (-222 ile -225 bölgelerinde AGCA delesyonu) toplam 6 kişide heterozigot halde oluşmuş ve bu noktadan sonra çerçeve kayması mutasyonunun varlığı saptanmıştır (Şekil 4.11). Normal DNA dizisi TTAAGCAGCAGTAT şeklinde iken anılan 6 kişide TTA----GCAGTAT şeklinde olduğu ACAG delesyonu sonucu çerçevenin kaydığı görülmektedir.



Şekil 4.11. $\Lambda\gamma$ geninde -222 ile -225 bölgelerinde AGCA delesyonu sonucu çerçeve kayması mutasyonu (üstte), normal baz dizisi (altta)

+25 bölgesinde normal G/G genotipinde ortalama HbF değeri % 2.25 ölçülürken, A/A genotipinde % 1.68 ve G/A genotipinde ise % 1.94 olarak belirlenmiştir. İstatistiksel analiz sonuçları incelendiğinde saptanan tüm varyasyonlar ile hem HbF değerleri arasında hem de HbA2 değerleri arasında anlamlı ilişkinin olmadığı görülmüştür (Çizelge 4.6).

-369 bölgesinde gözlenen değişimlerde ise en fazla HbF değeri G/C heterozigotlarında ölçülürken (% 2.26), normal genotip olan G/G homozigotlarında ise HbF değeri daha düşük olduğu (% 2.07) değerlendirilmiştir. Ortalama HbF değerleri arasında istatistiksel bakımından bir fark saptanamamıştır (Çizelge 4.7). Aynı durum HbA2 değerleri için de geçerlidir.

-499 lokalizasyonunda ise normal olan T/T genotipinde olanların ortalama HbF düzeyleri % 1.97, T/A heterozigotların HbF düzeyleri % 3.80 iken A/A genotipinde olanların HbF değerleri ise % 3.60 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.8). Ortalama HbF değerleri arasında anlamlı bir farkın var olduğu saptanmıştır. Fakat HbA2 değerleri arasında istatistiksel bakımından her hangi bir fark görülememiştir.

Çizelge 4.6. $\Lambda\gamma$ promotörünün +25 bölgesinde incelenen varyasyonlar, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.

Lokasyon +25*	N	Ortalama	Standart sapma	Std. hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
HbA2 AA	7	2,9500	,32711	,13354	2,6067	3,2933	2,50	3,40
GA	19	2,8158	,33873	,07771	2,6525	2,9791	2,00	3,50
GG	25	2,9280	,26851	,05370	2,8172	3,0388	2,40	3,40
Total	51	2,8880	,30280	,04282	2,8019	2,9741	2,00	3,50
HbF AA	7	1,6833	,17224	,07032	1,5026	1,8641	1,50	2,00
GA	19	1,9421	,32714	,07505	1,7844	2,0998	1,50	2,60
GG	25	2,2560	1,20142	,24028	1,7601	2,7519	1,50	7,10
Total	51	2,0680	,88972	,12583	1,8151	2,3209	1,50	7,10

ANOVA

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Sig.P
HbA2 Gruplar arası varyans	,162	2	,081	,880	,422
Grup içi varyans	4,331	47	,092		
Total	4,493	49			
HbF Gruplar arası varyans	2,073	2	1,036	1,327	,275
Grup içi varyans	36,716	47	,781		
Total	38,789	49			

*:Toplam 51 kişi incelenebilmiştir.

Çizelge 4.7. $\Lambda\gamma$ promotörünün -369 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.

Lokasyon -369	N	Ortalama	Standart sapma	Std. hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
HbA2 GG	57	2,8807	,29727	,03937	2,7828	2,9560	2,00	3,50
GC	5	2,8400	,23022	,10296	2,5541	3,1259	2,60	3,20
HbF GG	57	2,0702	,86168	,11413	1,8205	2,1264	1,50	3,80
GC	5	2,2600	,34351	,15362	1,8335	2,6865	1,80	2,60

ANOVA

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Sig.P
HbA2 Gruplar arası varyans	,592	9	,04070	,514	,476
Grup içi varyans	4,576	52	,04070		
Total	5,168	61			
HbF Gruplar arası varyans	28,129	9	-,18982	,528	,470
Grup içi varyans	14,088	52	-,18982		
Total	42,217	61			

Çizelge 4.8. $\Lambda\gamma$ promotörünün -499 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.

Lokasyon -499	N	Ortalama	Standart sapma	Std. hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
HbA2 TT	58	2,8810	,29466	,03869	2,8036	2,9585	2,00	3,50
TA	1	2,8000	.	.	.	.	2,80	2,80
AA	3	2,8333	,32146	,18559	2,0348	3,6319	2,60	3,20
Total	62	2,8774	,29108	,03697	2,8035	2,9513	2,00	3,50
HbF TT	58	1,9776	,47942	,06295	1,8515	2,1036	1,50	3,50
TA	1	3,8000	.	.	.	.	3,80	3,80
AA	3	3,6000	3,05123	1,76163	-3,9797	11,1797	1,50	7,10
Total	62	2,0855	,83191	,10565	1,8742	2,2968	1,50	7,10

ANOVA

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Sig.P
HbA2 Gruplar arası varyans	,013	2	,006	,072	,931
Grup içi varyans	5,156	59	,087		
Total	5,168	61			
HbF Gruplar arası varyans	10,496	2	5,248	9,761	,000
Grup içi varyans	31,721	59	,538		
Total	42,217	61			

-588 bölgesinde normal genotip olan G/G için homozigot olanlar en yüksek HbF değerine sahiptirler (% 2.12). % 2.02 HbF değerine G/A heterozigotlarda ve % 1.70 HbF değerine de A/A homozigotlarda rastlanmıştır (Çizelge 4.9). Fakat istatistiksel anlamda fark bulunamamıştır. HbA2 değerleri arasında da istatistiksel fark saptanamamıştır.

Bu çalışmada $\Lambda\gamma$ promotörün de yukarıda belirtilen varyasyonlar dışında bir kişide -222/-225 lokalizasyonunda homozigot AGCA delesyonuna 6 kişide ise heterozigot AGCA varyasyonuna rastlanmıştır. AGCA delesyonunun homozigot olarak taşıyan kişinin HbF değeri 2.0 olarak ölçülmüştür. Aynı mutasyonu heterozigot olarak taşıyan 6 kişide ortalama HbF değeri de % 1.98 olarak ölçülmüştür (Çizelge 4.10). Fakat fark istatistiksel bakımından anlamlı bulunamamıştır.

Çizelge 4.9. A_γ promotörünün -588 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, her bir grupta değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi.

Lokasyon -588	N	Ortalama	Standart sapma	Std. hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
HbA2 AA	5	3,0000	,33912	,15166	2,5789	3,4211	2,50	3,40
GA	23	2,8609	,26924	,05614	2,7444	2,9773	2,40	3,50
GG	23	2,9174	,27741	,05784	2,7974	3,0374	2,40	3,40
Total	51	2,9000	,27713	,03881	2,8221	2,9779	2,40	3,50
HbF AA	5	1,7000	,18708	,08367	1,4677	1,9323	1,50	2,00
GA	23	2,0696	,50492	,10528	1,8512	2,2879	1,50	3,80
GG	23	2,1261	1,17598	,24521	1,6176	2,6346	1,50	7,10
Total	51	2,0588	,85934	,12033	1,8171	2,3005	1,50	7,10

ANOVA

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Sig.P
HbA2 Gruplar arası varyans	,092	2	,046	,590	,558
Grup içi varyans	3,748	48	,078		
Total	3,840	50			
HbF Gruplar arası varyans	,750	2	,375	,498	,611
Grup içi varyans	36,173	48	,754		
Total	36,924	50			

Çizelge 4.10. A_γ genini promotörünün -222/-225 bölgesinde incelenen varyasyonlar, lokasyonları, değerlendirilen kişi sayısı, ortalama HbA2 ile HbF değerleri ve önem testi

Lokasyon -222/-225 AGCA delesyonu	N	Ortalama	Std. sapma	Std. hata	Ortalama için %95 güven aralığı		Min.	Max.
					Alt sınır	Üst sınır		
HbA2 Normal	55	2,8727	,28897	,03896	2,7946	2,9508	2,00	3,50
del homozigot	1	3,4000	.	.	.	.	3,40	3,40
del heterozigot	6	2,8333	,27325	,11155	2,5466	3,1201	2,40	3,20
Total	62	2,8774	,29108	,03697	2,8035	2,9513	2,00	3,50
HbF Normal	55	2,0982	,86634	,11682	1,8640	2,3324	1,50	7,10
del homozigot	1	2,0000	.	.	.	.	2,00	2,00
del heterozigot	6	1,9833	,56716	,23154	1,3881	2,5785	1,50	2,80
Total	62	2,0855	,83191	,10565	1,8742	2,2968	1,50	7,10

ANOVA

	Kareler toplamı	Serbestlik derecesi	Kareler ortalaması	F	Sig.P
HbA2 Gruplar arası varyans	,286	2	,143	1,728	,187
Grup içi varyans	4,882	59	,083		
Total	5,168	61			
HbF Gruplar arası varyans	,079	2	,039	,055	,946
Grup içi varyans	42,138	59	,714		
Total	42,217	61			

Bu çalışmada $\Lambda\gamma$ geninin sekanslanan bölgesi gen bankası kayıt numarasına göre 1381 ile 2040 bölgeleri arasındadır. $\Lambda\gamma$ geninin promotör bölgesinde var olan ve gen bankasında kayıtlı olan, bu çalışmada sekanslanan bölgeyi de kapsayan varyasyonlar çizelge 4.11’de görülmektedir. İlk kodon olan AUG’nin A bazı +1 olarak kabul edildiğine göre bu bölge -674 ile +25 bazları arasındadır. Daha önceki çalışmalarda 13 varyasyon saptanmış ve bunların tamamının baz süstitüsüyonu şeklinde olduğu bildirilmiştir.

$\Lambda\gamma$ geni promotöründe yukarıda tanımlanan varyasyonlar ile (Çizelge 4.6-4.10) GenBank kayıtlarında (Çizelge 4.11) var olan varyasyonlar karşılaştırıldığında bu çalışmada saptanan +25 G/A, -369 G/C, -499 T/A ve -588 G/A tipi varyasyonların daha önce saptanarak GenBank kayıtlarına girmiş olduğu görülmektedir. GenBank kayıtları dışında yapılan taramalarda -222/-225 AGCA delesyonunun sadece 1 kişide görüldüğü bildirilmiştir (Cui ve vd. 2012). Bizim bu çalışmada toplam 7 kişide görülen AGCA varyasyonu saptanmıştır.

Çizelge 4.11. GenBank kayıtlarına göre $\Lambda\gamma$ geninin promotör bölgesinde var olan varyasyonlar

Gen bankasında kayıtlı varyasyon numarası	Promotör bölgesindeki lokalizasyonu	Varyasyon tipi Orijinal/değişim	Frekansı
1418	-588	G/A	0,1818
1507	-499	T/A	0,2527
1522	-484	A/G	0,0027
1608	-398	G/A	0,0211
1637	-369	G/C	0,0395
1650	-356	A/G	0,0211
1682	-324	C/T	0,0211
1689	-317	A/G	0,0211
1697	-309	A/G	0,0211
1699	-307	G/A	0,0211
1735	-271	C/T	0,0816
1990	-16	C/G	0,0027
2030	+25	G/A	0,1657

^Aγ promotör bölgesinde sekanslanan bölgede daha önce saptanan ve bizim bu çalışmada saptadığımız varyasyonlar aşağıda görülmektedir.

attaggtctt	atattatgta	acactaatct	attactgcgc	tgaaactgtg	gctttataga
			Primer bağlanma ileri		
aattgttttc	actgcactat	tgagaaatta	agagataatg	gcaaaagtca	caaagagtat
-601	-591	-581	-571	-561	-551
	*/**				
attcaaaaag	aagtatagca	cttttcctt	agaaaccact	gctaaactgaa	agagactaag
-541	-531	-521	-511	-501	-491
				*/**	*
atttgccccg	tcaaaaatcc	tggacctatg	cctaaaacac	atttcacaat	ccctgaactt
-481	-471	-461	-451	-541	-431
ttcaaaaatt	ggtacatgct	ttagctttaa	actacaggcc	tcactggagc	tagagacaag
-421	-411	-401	-391	-381	-371
		*			*/**
aaggtaaaaa	acggctgaca	aaagaagtcc	tggtatcctc	tatgatggga	gaaggaaact
-361	-351	-341	-331	-321	-311
*			*	*	**
agctaaaggg	aagaataaat	tagagaaaaa	ctggaatgac	tgaatcggaa	caaggcaaag
301	-291	-281	-271	-261	-251
			*		
gctataaaaa	aaattaagca	gcagtatcct	cttggggggc	ccttccccac	actatctcaa
-241	-231	-221	-211	-201	-191
	*/**				
tgcaaatatc	tgtctgaaac	ggccctggc	taaactccac	ccatgggttg	gccagccttg
-181	-171	-161	-151	-141	-131
ccttga ccaa	tagccttgac	aaggcaaact	tga ccaat ag	tcttagagta	tccagtgagg
-121	-111	-101	-91	-81	-71
***			***		
cca ggggccg	gcggttgct	agggatgaag	a ataaaa agga	agcaccttc	agcagttcca
-61	-51	-41	-31	-21	-11
***			***	*	
c acactcgct	tctggaacgt	ctgaggttat	caataagctc	ctagtccaga	cgcc
-1	+1	Transkripsiyon başlangıcı	*/**	Primer bağlanma geri	

ATG GGT CAT TTC ACA GAG GAG GAC AAG GCT ACT ATC ACA AGC CTG
M G H F T E E D K A T I T S L
Ekzon-1 amino asitler

*Daha önce saptanan varyasyonlar (GenBank, GU324925.1)

**Bu çalışmada saptanan varyasyonlar

***Promotör bölgeleri (Langdon ve Kaufman, 1998): -26/-30 TATA Kutusu, -51/-58 GC Kutusu, -84/-88 CAAT Kutusu, -111/-115 CAAT

4.1.3. Hem $G\gamma$ hem de $A\gamma$ gen varyasyonları için dominant genetik modele göre istatistiksel analizler

Normal genotip dışında varyasyon gösteren diğer homozigot ve heterozigot genotipler birleştirilerek yapılan ve dominant genetik model olarak tanımlanan istatistiksel analiz sonuçları, hem $G\gamma$ hem de $A\gamma$ genlerindeki saptanmış olan varyasyonlar için aşağıda verilen tablolarda görülmektedir.

Dominant modele göre $G\gamma$ promotöründe -158 lokalizasyonlu varyasyon hariç diğer saptanan tüm varyasyonlarda HbF değerlerinin istatistiksel bakımından anlamlı derecede artmış olduğu görülmektedir (Çizelge 4.12, 4.13 ve 4.14). -158 lokalizasyonda HbF değeri normal homozigotlar ile karşılaştırıldığında düşmüştür. -567 lokalizasyonunda sadece bir kişi T/G varyasyonuna sahip olmasından dolayı HbF değeri artmış olsa da istatistiki analiz yapılamamıştır (Çizelge 4.15). Tüm varyasyonların HbA2 değerlerinde istatistiksel bakımdan her hangi bir değişim saptanamamıştır.

Çizelge 4.12. Dominant genetik modele göre $G\gamma$ promotörünün -158 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz

Lokasyon -158		N	Ortalama	Stdandart sapma	Standart hata	Varyansların eşitliği için Levene's Testi	
						F	Önem derecesi
HbA2	CC	27	2,8852	,28515	,05488	,074	,787
	CT+TT	35	2,8714	,29958	,05064		
HbF	CC	27	2,2074	1,13508	,21845	4,654	,035
	CT+TT	35	1,9914	,48530	,08203		

Çizelge 4.13. Dominant genetik modele göre $G\gamma$ promotörünün -309 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz

Lokasyon -309		N	Ortalama	Stdandart sapma	Standart hata	Varyansların eşitliği için Levene's Testi	
						F	Önem derecesi
HbA2	AA	60	2,8733	,29278	,03780	,043	,837
	AG+GG	2	3,0000	,28284	,20000		
HbF	AA	60	1,9733	,47617	,06147	37,439	,000
	AG+GG	2	5,4500	2,33345	1,65000		

Çizelge 4.14. Dominant genetik modele göre $G\gamma$ promotörünün -369 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz

Lokasyon -369		N	Ortalama	Stdandart sapma	Standart hata	Varyansların eşitliği için Levene's Testi	
						F	Önem derecesi
HbA2	CC	60	2,8733	,29278	,03780	,043	,837
	CG+GG	2	3,0000	,28284	,20000		
HbF	CC	60	1,9733	,47617	,06147	37,439	,000
	CG+GG	2	5,4500	2,33345	1,65000		

Çizelge 4.15. Dominant genetik modele göre $G\gamma$ promotörünün -567 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz

Lokasyon -567		N	Ortalama	Stdandart sapma	Standart hata	Varyansların eşitliği için Levene's Testi	
						F	Önem derecesi
HbA2	TT	61	2,8820	,29127	,03729		
	TG	1	2,6000	.	.		
HbF	TT	61	2,0951	,83535	,10696		
	TG	1	1,5000	.	.		

Dominant genetik modele göre yapılan analizlerde $A\gamma$ promotörünün +25 ve -499 lokasyonlardaki varyasyonlarda HbF değerinin istatistiki anlamda arttığı (Çizelge 4.16 ve 4.18) fakat diğer iki varyasyonda (-369 ve -588) HbF değerinin istatistiki anlamda önemli derecede yükselmediği saptanmıştır (Çizelge 4.17 ve 4.19). Halbuki bu iki varyasyonda da homozigot dominant olanlar ile karşılaştırıldığında HbF değerinin artmış olduğu görülmektedir. -222/-225 bölgesinde saptanan AGCA delesyonunu homozigot ve heterozigot taşıyan bireylerdeki HbF değeri ile bu varyasyon için normal olan bireylerin HbF değerleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Çizelge 4.16. Dominant genetik modele göre $A\gamma$ promotörünün +25 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz

Lokasyon +25		N	Ortalama	Stdandart sapma	Standart hata	Varyansların eşitliği için Levene's Testi	
						F	Önem derecesi
HbA2	AA+GA	26	2,8480	,33432	,06686	,465	,499
	GG	25	2,9280	,26851	,05370		
HbF	AA+GA	26	1,8800	,31491	,06298	7,809	,007
	GG	25	2,2560	1,20142	,24028		

Çizelge 4.17. Dominant genetik modele göre $A\gamma$ promotörünün -369 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz

Lokasyon -369		N	Ortalama	Stdandart sapma	Standart hata	Varyansların eşitliği için Levene's Testi	
						F	Önem derecesi
HbA2	GG	57	2,8807	,29727	,03937	,514	,476
	GC	5	2,8400	,23022	,10296		
HbF	GG	57	2,0702	,86168	,11413	,528	,470
	GC	5	2,2600	,34351	,15362		

Çizelge 4.18. Dominant genetik modele göre $A\gamma$ promotörünün -499 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz

Lokasyon -499		N	Ortalama	Stdandart sapma	Standart hata	Varyansların eşitliği için Levene's Testi	
						F	Önem derecesi
HbA2	TT	58	2,8810	,29466	,03869	,159	,692
	TA+AA	4	2,8250	,26300	,13150		
HbF	TT	58	1,9776	,47942	,06295	42,724	,000
	TA+AA	4	3,6500	2,49332	1,24666		

Çizelge 4.19. Dominant genetik modele göre $A\gamma$ promotörünün -588 bölgesinde saptanan varyasyonlarda istatistiksel analiz

Lokasyon -588		N	Ortalama	Stdandart sapma	Standart hata	Varyansların eşitliği için Levene's Testi	
						F	Önem derecesi
HbA2	AA+GA	28	2,8857	,28115	,05313	,001	,978
	GG	23	2,9174	,27741	,05784		
HbF	AA+GA	28	2,0036	,48342	,09136	2,366	,130
	GG	23	2,1261	1,17598	,24521		

Çizelge 4.20. Dominant genetik modele göre $A\gamma$ promotörünün -222/-225 bölgesinde saptanan AGCA delesyonu istatistiksel analizi

Lokasyon -222/-225 AGCA delesyonu		N	Ortalama	Stdandart sapma	Standart hata	Varyansların eşitliği için Levene's Testi	
						F	Önem derecesi
HbA2	Normal	55	2,8727	,28897	,03896	,086	,770
	Delesyonlu	7	2,9143	,32878	,12427		
HbF	Normal	55	2,0982	,86634	,11682	,146	,704
	Delesyonlu	7	1,9857	,51778	,19570		

Bu çalışmada sadece bir kişide HbF değeri % 7.1 ve A2 değeri de % 3.2 olarak ölçülmüştür (62 nolu kişi, Çizelge 4.21). Bu kişinin $G\gamma$ geni promotör bölgesinde saptanan 4 mutasyon lokalizasyonunun ikisinde aynı şekilde $A\gamma$ geninde de saptanan 4 mutasyon

lokalizasyonunun üçünde homozigot mutant olduğu saptanmıştır ($G\gamma$: -309 G/G, -369 G/G; $A\gamma$: +25 G/G, -588 G/G, -499 A/A). Diğer yandan bu çalışmada ölçülebilen ikinci yüksek HbF değeri % 3.8'dir ve yine sadece bir kişide saptanmıştır (7 nolu kişi, Çizelge 4.20). Bu kişinin A2 değeri de % 2.8 olarak saptanmıştır. Bu kişinin $G\gamma$ geni promotör bölgesinde saptanan 4 mutasyon lokalizasyonunun üçünde, aynı şekilde $A\gamma$ geninde de saptanan 4 mutasyon lokalizasyonunun üçünde homozigot veya heterozigot varyasyon gösterdiği saptanmıştır ($G\gamma$: -158 C/T, -309 A/G, -369 C/G; $A\gamma$: +25 G/G, -588 G/A, -499 T/A). Bu durum HbF değerinin artışında bazı varyasyonlar arasında haplotipik etkinin var olduğunun göstergesi olarak kabul edilebilir.

Çizelge 4.21'de ayrıca çalışılan bireylerin sahip oldukları varyasyon tipleri dekarşılaştırmalı olarak verilmiştir. Çizelge incelendiğinde en yüksek HbF değerine sahip 7 ve 62 nolu donörlerde $G\gamma$ -309 ve -369 lokasyonlu varyasyonlar ile $A\gamma$ -499 lokasyonlu varyasyonlara sahip oldukları görülmektedir. Bu varyasyonlar tek başlarına HbF değerini artırırken beraber aynı bireylerde bulunduklarında haplotipik etki göstererek HbF değerini daha fazla indüklemiş oldukları görülmektedir. Aslında $A\gamma$ -499 lokasyonunda AA homozigot tip varyasyona sahip 55 ve 56 nolu donörlerde diğer lokasyonlarda homozigot normal olduklarından dolayı HbF çok yüksek seviyelere çıkmamıştır.

Çizelge 4.21. Gönüllülerin sahip oldukları varyasyon tipleri, hematolojik verileri ile HbA2 ve HbF değerlerinin karşılaştırılması.

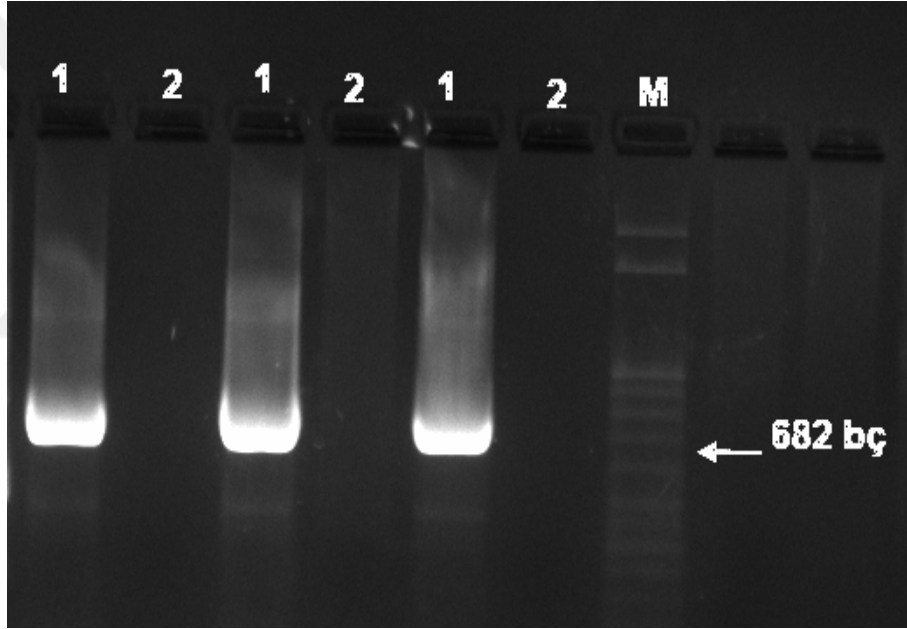
Donör no	G _γ				A _γ					RBC	HGB	HCT	MCV	MCH	MCHC	A2	F
	-158 C/T	-309 A/G	-369 C/G	-567 T/G	+25 G/A	-369 G/C	-499 T/A	-588 G/A	-222/-225 AGCA del								
01	CC	AA	CC	TT	*	GG	TT	*	Normal	4,73	14,6	38,4	81,1	30,9	38,2	2,6	3,1
02	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,50	12,6	33,5	74,4	28,0	37,7	3,1	1,6
03	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,51	13,7	37,0	81,9	30,4	37,1	3,4	1,7
04	CT	AA	CC	TT	*	GC	TT	GA	Normal	4,20	11,7	32,3	76,8	27,8	36,2	2,6	2,5
05	TT	AA	CC	TT	AA	GG	TT	AA	Normal	4,22	13,4	36,1	85,5	31,7	37,0	3,2	1,7
06	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,57	13,1	35,2	77,1	28,6	37,2	2,7	2,0
07	CT	AG	CG	TT	GG	GG	TA	GA	Normal	4,35	13,1	35,9	82,6	30,1	36,5	2,8	3,8
08	CT	AA	CC	TT	*	GG	TT	*	Normal	4,11	12,2	33,7	82,1	29,8	36,2	3,0	1,6
09	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,66	14,6	41,9	90,0	31,3	34,8	2,9	1,6
10	CT	AA	CC	TT	*	GC	TT	GA	Normal	4,93	14,9	41,8	84,7	30,2	35,6	3,2	2,4
11	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,08	12,3	34,4	84,3	30,2	35,8	3,0	1,5
12	TT	AA	CC	TT	AA	GG	TT	AA	Normal	5,29	14,8	40,4	76,4	28,0	36,7	3,4	1,5
13	TT	AA	CC	TT	AA	GG	TT	AA	Normal	4,91	14,9	38,9	79,2	30,4	38,4	3,0	1,7
14	CT	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GA	Normal	5,20	13,3	37,3	71,7	25,7	35,8	3,0	2,1
15	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	*	Normal	4,49	12,9	35,8	79,7	28,7	36,0	2,0	1,7
16	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,56	13,9	37,2	81,6	30,5	37,3	2,9	2,8
17	CT	AA	CC	TT	GA	GC	TT	GA	Normal	4,70	13,9	37,1	78,8	29,6	37,6	2,7	2,0
18	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,28	12,8	33,9	79,3	29,9	37,6	2,8	1,5
19	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,28	12,2	33,5	78,3	28,5	36,4	3,0	1,7
20	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,81	15,2	42,5	88,2	31,5	35,7	2,4	2,2
21	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,45	11,4	34,5	77,6	25,6	33,0	3,5	2,4
22	CT	AA	CC	TT	AA	GG	TT	*	Del heter.	4,43	13,5	37,6	84,9	30,5	35,9	3,2	1,5
23	CT	AA	CC	TT	AA	GG	TT	GA	Normal	4,35	14,0	36,4	83,6	32,2	38,5	2,7	1,6
24	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,44	13,5	36,0	81,0	30,5	37,7	3,0	1,5
25	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,57	12,4	33,8	73,9	27,2	36,7	2,7	2,0
26	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,50	13,9	35,6	79,2	30,9	39,0	2,9	1,8
27	CT	AA	CC	TT	*	GG	TT	*	Del heter.	5,32	15,8	45,1	84,9	29,6	34,9	3,0	1,8
28	CC	AA	CC	TT	*	GG	TT	GG	Normal	4,93	13,1	36,5	74,1	26,6	35,9	2,8	1,9
29	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,95	15,0	41,3	83,5	30,3	36,3	2,9	1,8
30	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,27	12,4	33,2	77,8	29,2	37,5	2,7	2,0

31	CT	AA	CC	TT	*	GG	TT	*	Del heter.	5,20	16,3	41,8	80,4	31,3	38,9	2,8	2,6
32	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,58	13,4	35,3	77,0	29,2	38,0	2,9	1,9
33	CT	AA	CC	TT	GA	GC	TT	GA	Normal	4,25	13,0	38,7	91,0	30,7	33,8	2,9	2,6
34	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Del homoz.	4,50	13,0	35,2	78,3	29,0	37,1	3,4	2,0
35	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,93	15,3	41,2	83,4	31,0	37,2	3,0	1,7
36	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,56	13,6	37,0	81,1	29,9	36,9	2,4	2,1
37	CT	AA	CC	TT	*	GG	TT	*	Del heter.	4,06	12,5	33,0	81,2	30,8	37,9	2,7	1,6
38	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,94	14,2	45,0	91,2	28,7	31,5	3,0	1,8
39	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,97	14,8	48,5	97,5	29,8	30,5	3,0	2,1
40	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	5,01	14,2	39,8	92,0	28,6	34,1	3,1	1,7
41	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	5,62	15,3	48,8	86,8	27,3	31,5	2,6	2,9
42	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	5,58	16,2	50,5	90,3	28,9	32,0	3,0	1,5
43	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,83	13,9	37,3	77,3	28,7	37,2	2,4	1,6
44	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,71	13,3	36,1	76,5	28,2	36,8	2,5	1,6
45	CC	AA	CC	TT	*	GG	TT	*	Del heter.	4,34	12,5	31,9	73,7	28,8	39,1	2,4	1,6
46	TT	AA	CC	TT	AA	GG	TT	AA	Normal	4,92	14,8	37,7	76,6	30,1	39,3	2,5	2,0
47	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,89	13,7	36,8	75,3	28,1	37,3	3,3	2,1
48	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	4,88	11,9	32,2	65,9	24,4	37,1	2,5	1,5
49	TT	AA	CC	TT	*	GG	TT	*	Normal	4,42	13,4	35,7	80,8	30,3	37,5	2,8	2,5
50	CT	AA	CC	TT	*	GG	TT	*	Del heter.	4,02	12,7	34,3	85,2	31,5	37,0	2,9	2,8
51	CC	AA	CC	TT	GG	GC	TT	*	Normal	4,58	13,2	36,8	80,3	28,8	35,9	3,1	3,5
52	TT	AA	CC	TT	AA	GG	TT	AA	Normal	4,36	11,8	31,8	72,9	27,0	37,1	2,9	1,6
53	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	4,25	11,7	33,6	78,9	27,5	34,8	2,8	1,9
54	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	5,29	16,17	50,4	95,2	31	32,1	2,8	1,8
55	CT	AA	CC	TT	GA	GG	AA	GA	Normal	4,77	14,94	47,1	98,5	31	31,7	2,7	2,2
56	CC	AA	CC	TG	GG	GG	AA	GG	Normal	4,64	12,32	39,0	84,0	27	31,6	2,6	1,5
57	CC	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	6,10	17,47	52,6	86,3	29	33,2	2,7	2,5
58	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	5,81	17,53	54,8	94,2	30	32,0	3,1	1,5
59	CT	AA	CC	TT	GA	GG	TT	GA	Normal	5,43	14,90	47,4	87,4	27	31,4	3,4	1,6
60	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	5,10	14,88	44,3	86,8	29	33,6	2,9	1,8
61	CC	AA	CC	TT	GG	GG	TT	GG	Normal	5,28	15,80	44,6	84,6	30	35,4	3,0	3,1
62	CC	GG	GG	TT	GG	GG	AA	GG	Normal	3,32	10,70	30,0	90,3	32	35,9	3,2	7,1

*Değerlendirilememiştir.

4.2. Delesyonel Mutasyonların Taranması

Chinese $G_\gamma(A_\gamma \delta\beta)$ tip delesyonel HPFH için tüm bireyler tarandığında tamamının delesyon tipi mutasyon içermedikleri saptanmıştır (Şekil 4.12). Çalışma sonucunda G1 ve G2 primerlerinin amplifikasyon gerçekleştirdiği ve yaklaşık 682 bç bir amplifikasyon ürünü oluşturduğu görülmektedir. G1 ve G3 primerlerinin kullanıldığı durumlarda hiçbir amplifikasyona rastlanmamıştır. Bu da bireylerin delesyonel tip mutasyon taşımadıklarını göstermektedir. Şayet homozigot delesyon durumu olsaydı sadece 2 nolu sütunda 508 bç boyutunda bandın olması, heterozigot durumda da 1 nolu sütunda 682 bç ve 2 nolu sütunda 508 bç boyutlarında iki bandın gözlenmesi gerekirdi.



Şekil.4.12. Chinese $G_\gamma(A_\gamma \delta\beta)$ tip delesyonel HPFH. 1: G1 ve G2 primerleri, 2: G1 ve G3 primerleri kullanılmış. M: Marker (100 bç). 1 nolu sütünlarda 682 bç amplifikasyon görülmesi delesyonun olmadığını gösterir, 2 nolu sütünlarda amplifikasyon olmaması da delesyonun olmadığını teyid eder.

5.TARTIŞMA

Bu çalışmada HbF düzeyi % 1.5 ve daha yüksek olan toplam 62 kişinin hem $G\gamma$ ve hem de $A\gamma$ genlerinde delesyonel ve non delesyonel mutasyonlar taranmış ve bu genlerin yüksek HbF düzeylerinin kalıtsal kalıcılığı ile ilişkileri incelenmiştir. Hem $G\gamma$ ve hem de $A\gamma$ genlerinin promotör dizileri sekanslanmıştır. Ayrıca Chinese $G\gamma(A\gamma \delta\beta)$ tip delesyonel mutasyon için tüm bireyler taranmıştır. İncelemeler sonucunda $G\gamma$ geninin promotör bölgesinde -158C-T, -309A-G, -369C-G ve -567T-G lokalizasyonlarında baz değişimi tip varyasyonlar saptanmıştır. Aynı şekilde $A\gamma$ geninin 5'-UTR (untranslated region, translasyona uğramayan bölge) ve promotör bölgelerinde de +25G-A, -369G-C, -499T-A ve -588G-A lokasyonlu baz değişimi tip varyasyonlar saptanırken, bir kişide -222/-225 homozigot AGCA delesyonu ve 6 kişide heterozigot -222/-225 bölgelerinde AGCA delesyonu varyasyonlarına da rastlanmıştır. Fakat Chinese $G\gamma(A\gamma \delta\beta)$ tip delesyonel mutasyonlara rastlanmamıştır.

$G\gamma$ geninin promotör dizilerinde saptanan -309A/T ve -369C/G tip varyasyona sahip kişilerde HbF değerlerinin istatistiksel anlamda yüksek olduğu, dominant modelinde de bu iki varyasyonda HbF değerinin yine aynı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır.

Ayrıca $A\gamma$ geninin promotör dizilerinde saptanan -499T/A varyasyonunda HbF düzeyinde önemli bir artışın var olduğu, dominant modelinde de hem +25G/A hem de -499T/A varyasyonlarında da HbF miktarının arttığı saptanmıştır.

Dolayısıyla bu çalışmada $G\gamma$ geni promotöründe iki ve $A\gamma$ geni promotöründe de iki varyasyon ile yüksek HbF düzeyleri arasında ilişki saptanmıştır.

$G\gamma$ globin (HBG2) ve $A\gamma$ globin (HBG1) genleri fetal dönemde fetal hemoglobini oluşturmak amacıyla gama globin zinciri sentezlemektedirler. İkisinin arasındaki tek farkın 136. kodonda $G\gamma$ geni gly amino asidini içerirken $A\gamma$ geninin ise ala amino asidini içermesi olarak saptanmıştır (Schroeder vd. 1968).

Yapılan sekanslama çalışmaları sonucunda hem $G\gamma$ hem de $A\gamma$ genlerinin 5' promotör bölgelerinde bu genlerin transkripsiyonlarının başlatılmasında etkin olan bölgeler tanımlanmış ve bu bölgelerde oluşan mutasyonların genlerin transkripsiyonunu etkiledikleri rapor edilmiştir (Stoming vd. 1989, Rochette vd. 1994). Her iki gen için saptanan olası promotör varyasyonları -202 ($G\gamma$ ve $A\gamma$), -198 ($A\gamma$), -196 ($A\gamma$), -175 ($G\gamma$ ve

$\Lambda\gamma$), -161($G\gamma$), -158($G\gamma$), -117 ($\Lambda\gamma$) ve -114 ($G\gamma$ ve $\Lambda\gamma$) pozisyonlarında yer almaktadır. Bizim bu çalışmada her iki genin promotör dizileri için saptadığımız varyasyon bölgelerinin -158($G\gamma$) tipi dışında daha önce saptanan ve yukarıda belirtilen varyasyon bölgelerinden farklı olduğu görülmektedir. Forget (1998) de yayınladığı derleme çalışmasında $\Lambda\gamma$ ve $G\gamma$ globin genlerinin promotör dizilerinde genlerin aşırı ekspresyonlarına neden olan varyasyonları açıklamıştır (Çizelge 2.2). Çizelge incelendiğinde araştırmacı, $G\gamma$ promotör varyasyonlarını -114 ile -202 bölgeleri arasında 5 bölge olarak belirlemiştir. Aynı şekilde $\Lambda\gamma$ promotör dizisinde de 6 bölge saptamıştır.

Langdon ve Kaufman (1998) yayınladıkları makalelerinde hem $G\gamma$ hem de $\Lambda\gamma$ globin genlerinin promotör bölgelerindeki cis etkili diziler tarafından düzenlendiklerini bildirmiş ve bu dizilerin $G\gamma$ globin geni için -30 ATAAA, -50 GGGGCCGG, -85 ve -112 CCAAT, -145 CACCC, -170 ve -190 GATA, -180 ATGCAAAT ve -200 CCCGGG şeklinde olduğunu saptamıştır. Aynı araştırmacılar, transkripsiyon faktörlerinin bu 9 bölge ile ekileşerek genin transkripsiyon hızını etkilediklerini fakat -30 TATA ve -85 ile -112 lokalizasyonunda iki CAAT kutusunun temel promotörler olduğunu belirtmişlerdir. Biz bu çalışmada G gama geninin cis etkili promotör dizilerini -26/-30 TATA kutusu, -51/-58 GC kutusu, -84/-88 ile -111/-115 bölgelerinde iki CAAT kutusu şeklinde olduğunu belirledik. $\Lambda\gamma$ geni için de promotör dizilerin -26/-30 TATA kutusu, -51/-58 GC kutusu, -84/-88 ile -111/-115 iki CAAT kutusu şeklinde olduğu saptanmıştır. Yaptığımız bu çalışmada bu bölgelerde herhangi bir varyasyona rastlanmamış olması da elde ettiğimiz sonucu desteklemektedir. Zira bizim çalışmamızda HbF düzeyleri yüksek bireyler dikkate alınmıştır. Temel promotör bölgelerinde olası varyasyon çoğunlukla genin ekspresyon düzeyini düşürmektedir.

Cui ve vd. (2012) yaptıkları çalışmada bir kişide $\Lambda\gamma$ geninde -225/-222 AGCA delesyonuna rastladıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada da -222/-225 bölgesinde homozigot AGCA delesyonuna sahip bir genotip saptanmıştır. Bu kişinin HbF düzeyi ise % 2.0 olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada ayrıca aynı mutasyonu heterozigot halde taşıyan 6 kişiye de rastlanılmıştır. Bunların ortalama HbF düzeyleri de % 1.98 olarak ölçülmüştür. Bu değerler erişkin bireyler için yüksek değerler olarak kabul edilmektedir fakat normal kişilerin HbF düzeyleri arasında istatistiksel anlamda bir fark bulunamamıştır. Bouva ve vd. (2006) $\Lambda\gamma$ -globin genindeki 4 bp'lik delesyonların ($\Lambda\gamma$ - 225' den -222'ye kadar olan AGCA delesyonu) genin sürekli ekspresyonundan sorumlu

olduklarını belirtmişlerdir. Bu durum bizim bu çalışmada saptadığımız ve delesyon tipi varyasyona sahip 7 kişinin yüksek HbF değerleri ile uygun olduğunun göstergesidir. Buna rağmen Manca ve Masala (2008) bu tip mutasyonun $A\gamma^T$ globin zincir varyantının sentezine sebep olduğu ve bu mutasyonun ekspresyon düzeyini %20 azalttığını saptamışlardır. Bu durum HbF miktarının düşmesine neden olmaktadır. Görüldüğü gibi aynı tip varyasyonun yüksek HbF düzeyleri ile ilgili farklı araştırmacıların sonuçları arasında bile farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu farklı sonuçların aslında aynı bireylerde diğer varyasyonların olup olmamasına bağlı olarak açıklanabileceği yani aslında diğer varyasyonların haplotipik etkili olmasından kaynaklı olabileceği söylenebilir (Motum ve vd. 1993; Tasiopoulou ve vd. 2007).

Bouva ve vd. (2006) HbF değeri % 2.3 Hollandalı bir hastada $G\gamma$ globin geni promotöründe baz değişimi varlığını saptamışlar ($G\gamma -37A \rightarrow T$) ve bu değişimin ılımlı da olsa HbF düzeyinin artışında etkili olabileceğini rapor etmişlerdir. Aynı araştırmacılar $G\gamma$ -globin geninin -202, -175, -161, -158 nükleotidlerindeki belirgin nokta mutasyonları, $A\gamma$ -globin genindeki -202, -198, -196, -195, -175, -117'deki nokta mutasyonları ile 4 bç'lik delesyonlar ($A\gamma -225'$ den -222'ye kadar olan AGCA delesyonu) genin sürekli ekspresyonundan sorumlu olduklarını belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar özellikle $G\gamma$ -globin geninin -158. pozisyonundaki $C \rightarrow T$ yer değişimi, tüm popülasyonlarda sık olarak gözlenen polimorfik bir varyant olduğunu ve homozigot β -talasemi ile orak hücre anemisi gibi eritropoietik stres durumları altında γ -globin gen ekspresyonunu arttırdığını rapor etmişlerdir. Başka araştırmacılar da -158. pozisyonundaki $C \rightarrow T$ yer değişimi tipi varyasyonu yüksek HbF ile ilişkilendirmişlerdir (Coleman ve vd. 1993; Stoming ve vd. 2014; Pereira ve vd. 2015). Halbuki Motum ve vd. (1993) $G\gamma -158C/T$ tip varyasyonu diğer tip varyasyonlarla beraber (-198T/C ve -175T/C) in vitro kombine deneylerde gerçekleştirdikleri çalışmalar sonucunda -158C/T varyasyonunun HbF ile herhangi bir ilişkisinin olmadığını saptamışlardır. Aynı sonuç Tasiopoulou ve vd. (2007) tarafından da bildirilmiştir. Bu araştırmacılar HbF düzeyi yüksek iki kişide -158C/T tipi varyasyona rastladıklarını fakat detaylı analizlerde aynı kişilerde -196C/T ve -201C/T tipi diğer iki varyasyona daha rastladıklarını bildirmişlerdir. Dolayısıyla HbF düzeyinin yüksek olmasının bu tip varyasyonlarla ilişkisinin olduğu sonucuna varmışlardır.

Bu çalışmada $G\gamma -158$ tipi varyasyonun HbF düzeyine bir etkisinin olmadığı sonucuna varılmıştır. Bu durum $G\gamma -158$ tipi varyasyona sahip bireylerde yukarıda

belirtilen diğ er tip varyasyonlara rastlanmamış olmas ı ile açıklanabilir. Motum ve vd. (1993) ile Tasiopoulou ve vd. (2007) tarafından yapılan çalışmalar bu sonucu desteklemektedir.

ş u ana kadar yapılan çalışmalardan her iki genin promotör bölgelerinde bir dizi varyasyonun var olduğu ve bunların bir kısmının insan gen bankasına kaydedildiği görülmektedir. Yine aynı çalışmalardan bazı varyasyonların HbF düzeyini artırdığı anlaşılırken bazı varyasyonların HbF düzeyi ile ilişkilendirilemediği sonucu çıkmaktadır. Bu çalışmada da aynı şekilde her iki genin promotör dizilerinde birçok varyasyona rastlanmıştır.

GenBank kayıtlarına göre daha önce saptanmamış bazı varyasyonların bu çalışmada hem $G\gamma$ hem de $A\gamma$ gen promotörleri için saptandığı ve bu çalışmada ortaya çıkan varyasyonlar olduğu görülmektedir. Bu  alışmada -567T/G varyasyonu ilk defa saptanmıştır.

Ayrıca bu çalışmada saptanan ve daha önce saptanmış olan $G\gamma$ geninin -309A/T ve -369C/G tip varyasyonları ile $A\gamma$ geninin +25G/A ve -499T/A varyasyonlarının HbF ile ilişkileri ilk defa bu çalışmada araştırılmış ve bu varyasyonların yüksek HbF ile ilişkilerinin olduğu belirlenmiştir.

Bu çalışmaya dahil edilen ve en yüksek HbF değerlerine sahip iki kişide birden fazla lokasyonlarda varyasyonlara sahip oldukları saptanmıştır ($G\gamma$: -309G/G, -369G/G; $A\gamma$: +25G/G, -588G/G, -499A/A). Bu durum varyasyonların bir birleri üzerine haplotipik etki oluşturdukları sonucunu doğurmaktadır. Zira bu varyasyonlardan bazılarının tek başına bulunması durumunda HbF seviyesini artırmazken aynı bireyde beraber bulunmaları sebebiyle HbF seviyesini artırdıkları görülmektedir. Özellikle bu çalışmada nadir görülen $G\gamma$ -309 ve -369 lokasyonlu varyasyonlar ile $A\gamma$ -499 lokasyonlu varyasyonlara sahip iki donörün en yüksek HbF değerini göstermesi haplotipik etkiyi doğrulamaktadır. Bu yüksek HbF değerine $G\gamma$ -309 ve -369 lokasyonlu varyasyonların etkin bir şekilde katkı sağladığı düşünülmektedir. Bilhassa bu lokasyonların ikisinde GG tipi homozigot varyasyonu taşıyanlarda HbF değeri maksimum düzeye ulaşmıştır. $A\gamma$ -499 lokasyonlu varyasyonun TA veya AA homozigot tip olması $G\gamma$ genindeki bu iki varyasyonun HbF  zerindeki etkisini sadece artırmaktadır. Çünkü $A\gamma$ -499 lokasyonunda AA homozigot olan iki don rde $G\gamma$ -309 ve -369 lokasyonlarında varyasyon içermemeleri dolayısıyla HbF değeri çok yüksek seviyelerde artmamıştır.

6.SONUÇ

Bu çalışmada hem $G\gamma$ hem de $A\gamma$ genlerinin promotör dizileri sekanslanarak yüksek HbF değeri ile varyasyonlar arasındaki ilişki saptanmaya çalışılmıştır. $G\gamma$ geninin promotör bölgesinde -158C/T, -309A/G, -369C/G ve -567T/G lokalizasyonlarında baz değişimi tip varyasyonlar saptanmıştır. Aynı şekilde $A\gamma$ geninin 5'-UTR (untranslated region, translasyona uğramayan bölge) ve promotör bölgelerinde de +25G/A, -369G/C, -499T/A ve -588G/A lokasyonlu baz değişimi tip varyasyonlar saptanırken, bir kişide -2228/-225 homozigot AGCA delesyonu ve 6 kişide heterozigot -222/-225 bölgelerinde AGCA delesyonu varyasyonlarına da rastlanmıştır.

$G\gamma$ geninin promotör dizilerinde saptanan -309A/T ve -369C/G tip varyasyona sahip kişilerde HbF değerlerinin istatistiksel anlamda yüksek olduğu, dominant genetik modelinde de bu iki varyasyonda HbF değerinin yine aynı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca $A\gamma$ geninin promotör dizilerinde saptanan -499T/A varyasyonunda HbF düzeyinde önemli bir artışın var olduğu, dominant modelinde de hem +25G/A hem de -499T/A varyasyonlarında HbF miktarının arttığı saptanmıştır. Dolayısıyla bu çalışmada $G\gamma$ geni promotöründe iki ve $A\gamma$ geni promotöründe de iki varyasyon ile yüksek HbF düzeyleri arasında ilişki saptanmıştır.

Bu çalışmada $G\gamma$ geninin promotör bölgesinde saptanan -567T/G varyasyonuna ilk defa rastlanmıştır. Bu kişinin HbF değeri ise % 1.5 olarak değerlendirilmiştir. Bununla birlikte bu çalışmada saptanan ve daha önce saptanmış olan $G\gamma$ geninin -309A/T ve -369C/G tip varyasyonları ile $A\gamma$ geninin +25G/A ve -499T/A varyasyonlarının HbF ile ilişkileri ilk defa bu çalışmada araştırılmış ve bu varyasyonların yüksek HbF ile ilişkilerinin olduğu belirlenmiştir.

Bununla birlikte yüksek HbF değerlerine sahip kişilerde birden fazla lokasyonlarda varyasyonların varlığı ($G\gamma$: -309G/G, -369G/G; $A\gamma$: +25G/G, -588G/G, -499A/A) bu varyasyonların haplotipik etki sonucu HbF düzeyini artırdıkları sonucunu doğurduğu söylenebilir.

Sonuç olarak genlerin ekspresyonlarının düzenlenmesinde birçok mekanizmanın var olduğu söylenebilir. Bu mekanizmalar arasında promotör veya daha yukarı kısımda yerleşmiş olan ve kuvvetlendirici (enhancer) olarak tanımlanan dizilerde yer alan modüller

bazılar sayılırken bu dizilere bağlanan transkripsiyon faktörleri gibi regülatör proteinlerin de etkin olabileceği söylenebilir.



KAYNAKLAR

- Adachi, K., Yang, Y., Lakka, V., Wehrli, S., Reddy, K.S. and Surrey, S.,(2003). Significance of $\beta 116$ His (G18) at $\alpha 1\beta 1$ contact sites for $\alpha\beta$ assembly and autoxidation of hemoglobin, *Biochemistry*, 42;10252-10259.
- Aksoy, K., Kayrın, L., Tuli, A., Çürük, M.A. ve Atilla, G.,(2006). Anormal Hemoglobinler ve Talasemi Tanısında Kullanılan Yöntemler, 8. Biyokimya Yaz Okulu, Adana.
- Amato, A., Cappabianca, M.P., Perri, M., Zaghıs, I., Grisanti, P., Ponzini, D. and Biagio, P., (2014). Interpreting elevated fetal hemoglobin in pathology and health at the basic laboratory level: new and known γ -gene mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin, *Int. Jnl. Lab. Hem.*, 36: 13–19.
- Amoyal, I. and Fibach, E., (2004). Flow cytometric analysis of fetal hemoglobin in erythroid precursors of β -thalassemia, *Clin. Lab. Haem.*, 26: 187-193.
- Atalay, EO., Çırakoğlu, B., Dinçol, G., Kılınç, Y., Aytekin, H., Yüreğir, GT., Arpacı, A., Bermek, E. ve Aksoy, M.,(1993). Regional distributions of beta talasemi mutations in turkey, *Int J Hematol*, 57(3): 207-211.
- Bahadır A, Köşeler A, Atalay A, Koyuncu H, Akar E, Akar N, Atalay EÖ.(2009).HbD-Los Angeles [$\beta 121(\text{GH}4)\text{Glu}>\text{Gln}$] and HbBeograd [$\beta 121(\text{GH}4)\text{Glu}>\text{Val}$]: implications for their laboratory diagnosis and genetic origins, *Turk J Hematol.*, 26(1):17-20.
- Bain, BJ.,(2006). Haemoglobinopathy Diagnosis, 2nd ed., Published by Blackwell Publishing Ltd., Australia, 86-146.
- Bear, U., Capalo, R., Dutly, F., Saller, E., Troxler, H., Kohler, M. and Frischknecht, H., (2012). Neonatal Cyanosis due to A New γ -Globin Variant Causing Low Oxygen Affinity: Hb F-Sarajevo [$\gamma 102(\text{G}4)\text{Asn}\rightarrow\text{Thr}$, AAC>ACC], *Hemoglobin*, 36(2): 109-113.
- Betke, K., Marti, HR. and Schlicht, I., (1959). Estimation of small percentages of foetal haemoglobin, *Nature*, 184: 1877-1878.
- Bollekens, JA. and Forget, BG.,(1991). Deltabeta Thalessemia and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin, *Hematol Oncol Clin North Am.*, 5(3):399-422.

- Bouva, MJ., Hartevelde, C. L., Bakker-Verweij, G., van Delft, P. and Giordano, P.C.,(2006). γ -37 (A-T): A New Nondeletional Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin Determinant Associated with the Rare Codon 91 (+T) d α -Thalassemia Hemoglobin, 30 (3):371–377,
- Boyer, SH., Belding, TK., Margolet, L. and Noyes, AN.,(1975). Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. Science., 188(4186):361–363.
- Brittain, T.,(2002). Molecular aspects of embryonic hemoglobin Function, Molecular Aspects of Medicine 23: 293–342.
- Carrocini, GCS., Ondeï, LS., Zamaro, PJA. and Domingos, CR., (2011). Evaluation of HPFH and $\delta\beta$ -thalassemia mutations in a Brazilian group with high Hb F levels, Genet. Mol. Res., 10 (4): 3213-3219.
- Chassanidis, C., Kalamaras, A., Phylactides, M., Pourfarzad, F., Likousi, S., Maroulis, V., Papadakis, MN., Vamvakopoulos, NK., Marinou, V., Patrinos, GP. and Kollia, P., (2009). The Hellenic type of nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin results from a novel mutation (g.-109G>T) in the HBG2 gene promoter, Ann Hematol., 88:549–555.
- Chen, S S., Webber, BB., Wilson, J B. and Huisman, TH J., (1985). Hb F-Forest Park, a new Ac variant with two amino acid substitutions, 75(E19)Ile→Thr and 73(E17)Asp→Asn, which can be identified in adults by gene-mapping analysis, Biochim. Biophys. Acta. 832,242–247
- Ciesla, B., (2007). Hematology inPractise, F.A. Davis Company, Phadelphia,50-60.
- Coleman, MB., Adams III, JG., Steinberg, MH., Plonczynski, MW., Harrel, AH., Castro, O. and Winter, WP., (1993). γ γ (β^+) Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin: The γ -158 C→T Mutation in *cis* to the -175 T→C Mutation of the γ -Globin Gene Results in Increased γ -Globin Synthesis, American Journal of Hematology, 42: 186-190.
- Collins, FS., Cole, JL., Lockwood, WK. and Lannuzzi, MC., (1987). The deletion in both common types of hereditary persistence of fetal hemoglobin is approximately, Blood., 70(6): 1797-1803. Comment To cite this work please use: NHLBI Resequencing and Genotyping Service (RSG),UW HV48194, Department of Genome Sciences, Seattle, WA 98195-7730.

- Corda, M., De Rosa, MC., Pellegrini, M G., Sanna, MT., Olinas, A., Fais, A., Manca, L., Masala, B., Zappacosta, B., Ficarra, S., Castagnola, M., and Giardina, B. (2000). Adult and fetal haemoglobin JSardegna [$\alpha 50(\text{CE8})\text{His} \rightarrow \text{Asp}$]: functional and molecular modelling studies, *Biochem. J.* 346, 193–199.
- Craig, JE., Barnetson, RA., Prior, J., Raven, JL. and Thein, SL., (1994). Rapid detection of deletions causing delta beta thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification, *Blood.*, 83(6): 1673-1682.
- Craig, JE., Sheerin, SM., Barnetson, R. and Thein, SL.,(1993). The molecular basis of HPFH in a British family identified by heteroduplex formation, *Br J Haematol.*, 84(1):106-110.
- Cui, J., Baysdorfer, C., Azimi, M., Vichinsky, EP. and Hoppe, CC., (2012). Identification of three novel HbF variants: HbF-Hayward [$^G\gamma 1(\text{NA1})\text{Gly} \rightarrow \text{Asp}$, GGT>GAT], Hb F-Chori-I [$^A\gamma \text{T16}(\text{A13})\text{Gly} \rightarrow \text{Asp}$, GGC>GAC] and Hb F-Chori-II [$^A\gamma \text{I29}(\text{B11})\text{Gly} \rightarrow \text{Glu}$, GGA>GAA], *Hemoglobin*, 36(3): 305-309.
- Cunha, AF, Malavazi, I, Romanello, KS. and Mascarenhas, CC.,(2012). Correlations with Point Mutations and Severity of Hemolytic Anemias: The Example of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin with Sickle Cell Anemia and Beta Thalassemia, Edit: Logie, C., Point Mutation, University Campus Stepri, China, 226-254.
- Çürük, MA.,(2004). Hemoglobinopatilerde Tarama ve Tanı Yöntemleri Neler Olmalı?, Edit. by: Canatan, D. Aydınok Y. 3. Uluslararası Talasemi Yaz Okulu ve Avrupa Transfüzyon Tıbbi Okulu, İstanbul, 157-168
- Dover, G.J. and Boyer, S.H.,(1980). Quantitation of hemoglobins within individual red cells: asynchronous biosynthesis of fetal and adult hemoglobin during erythroid maturation in normal subjects, *Blood Journal*, 56:1082-1091
- Dover, GJ., Boyer, SH. and Pembrey, ME.,(1981). F cell production in sickle cell anemia: regulation by genes linked to beta-hemoglobin locus, *Science*, 211(4489):1441–1444.
- Dönbak, L., (2005). İnsan hemoglobin(Hb) Varyantları, KSÜ. Fen ve Mühendislik Dergisi, 8(2): 13-16.
- Dumoulin, A., Manning, LR., Jenkins, WT., Winslow, RM. and Manning, JM., (1997). Exchange of subunit interfaces between recombinant adult and fetal hemoglobins.

- Evidence for a functional inter-relationship among regions of the tetramer, *J. Biol. Chem.*, 272:31326-31332.
- Forget, BG.(2006) Molecular Basis of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin. Vol 850, Issue Cooley's Anemia: Seventh Symposium Pages: 38-44, Published online: 7 Feb.
- Forget, BG., (1998). Molecular basis of hereditary persistence of fetal hemoglobin, *Ann NY Acad Sci* 850, 38–44.
- Franco, RS., Yasin, Z., Palascak, MB., Ciraolo, P., Joiner, CH. and Rucknagel, DL., (2006). The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells, *Blood.*, 108(3): 1073-1076.
- Fucharoen S, Pengjam Y, Surapot S, Fucharoen G, Sanchaisuriya K.,(2002). Molecular and hematological characterization of HPFH-6/Indian deletion-inversion G gamma(A gammadeltabeta)0-thalassemia and Ggamma(Agammadeltabeta)0-thalassemia/HbE in Thai patients. *Am J Hematol.*, Oct;71(2):109-13.
- Fucharoen, S., Shimizu, K. and Fukumaki, Y., (1990). A novel C-T transition within the distal CCAAT motif of the G gamma-globin gene in the Japanese HPFH: implication of factor binding in elevated fetal globin expression, *Nucleic Acids Res.*, 18(17):5248-5253).
- Garver, FA., Baker, MB., Jones, CS., Gravely, M., Altay, G. and Huisman, TH.,(1977). Radioimmunoassay for Abnormal Hemoglobins, *Science* 196;1334-1336.
- Gelinas, R., Bender, M., Lotshaw, C., Waber, P., Kazazian, H., Stamatoyannopoulos, G., (1986). Chinese A gamma fetal hemoglobin: C to T substitution at position-196 of the A gamma gene promoter, *Blood.*, 67: 1777-1779.
- Genç, A., (2005). Hemoglobin Varyantlarının DNA Dizi Analizi ile Belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Adana, s 108.
- Gottardi, E., Alfarano, A., Serra, A., Sciarratta, G., Bertero, MT., Saglio, G. and Camaschella, C.,(1990). Molecular diagnosis of A gamma hereditary persistence of fetal hemoglobin using polymerase chain reaction and oligonucleotide analysis, *Haematologica.*, 75(1): 17-20.
- Gottardi, E., Losekoot, M., Fodde, R., Saglio, G., Camaschella, C. and Bernini, LF., (1992). Rapid identification by denaturing gradient gel electrophoresis of mutations

- in the γ -globin gene promoters in non-deletion type HPFH, *British Journal of Haematology*, 80: 533-538.
- Grifoni, V., Kamuzora, H., Lehmann, H., and Charlesworth, D.,(1975). A new Hb variant: Hb F Sardinia γ 75(E19) isoleucine leads to threonine found in a family with HbG Philadelphia, β -chain deficiency and a Lepore-like haemoglobin indistinguishable from HbA₂, *Acta Haematol.* 53, 347–355.
- Gu, L.H., Öner, C. and Huisman, THJ.,(1995). The $G\gamma^T$ chain ($G\gamma 75\text{Thr}; 136\text{Gly}$) in Hb F-Charlotte is the product of an $A\gamma$ gene with a limited gene conversion and that in Hb F-Waynesboro of a mutated $G\gamma$ gene, *Hemoglobin* 19, 413–418.
- Hoffbrand, A.V. and Petit, J.E., (1985). *Genetic Defects of Haemoglobin*, Oxford Blackwel Scientific Publications, London, 94-120.
- Hu, H. and Ma, M., (1987). Hb F-Xinjiang or $A\gamma$ T25(B7) $\text{Gly}\rightarrow\text{Arg}$: a new slow-moving unstable fetal hemoglobin variant, *Hemoglobin* 11, 465–472.
- Huang, X-D., Yang, X.O., Huang, R-B., Zhang, H-Y., Zhao, H-L., Zhao, YJ., Huang, C-L., Hou, C-J. and Zhang, J-W.,(2000). A novel four basepair deletion within the $A\gamma$ -globin gene promoter associated with slight increase of $A\gamma$ expression in adult, *American Journal Hematology* 63, 16-19.
- Huisman, THJ., (1987). .High Performance Liquid Chromatography as a method to identify Haemoglobin abnormalities, *Acta Haemat.*, 78-123.
- Huisman, THJ., (1997). Gamma Chain Abnormal Human Fetal Hemoglobins Variants, *American Journal of Hematology*, 55:159-163.
- Huisman, THJ., Jonxis, JHP., (1977). *The Hemoglobinopathies, Techniques of Identification*, Marcel Dekker Inc., New York,
- Huisman, THJ., Scroeder, W.A., Brodie, A.N., Mayson, M. and Jakway, J.,(1975). Microchromatography of hemoglobin. III. A simplified procedure for determination of hemoglobin A₂, *J Lab Clin Med.*, 86: 700-702.
- Indrak, K., Indrakova, J., Kutlar, F., Pospisilova, D., Sulovska, I., Baysal, E. and Huisman, THJ., (1991). Compound heterozygosity for a β^0 -thalassemia (frameshift codons 38/39; -C) and a nondeletional swiss type of HPFH ($A\rightarrow C$ at NT -110, $G\gamma$) in a Czechoslovakian family, *Annals of Hematology*, 63: 111-115.

- Italia, KY., Colah, R. and Mohanty, D.,(2007). Evaluation of F cells in sickle cell disorders by flow cytometry – comparison with the Kleihauer-Betke’s slide method. *Intl J Lab Hematol.*,29(6):409–414.
- Klug, SW. and Cummings, WR., (2000). *Concept of Genetics*, Prentice Hall, New Jersey, 745.
- Klug, W.S., Cummings, M.R., Spencer, C.A., *Genetik Kavramlar (Çev.Ed. Öner, C.)*, 8.baskı, Palme Yayınları, 2011: 485-515.
- Kutlar, A., Kutlar, F., Wilson, JB., Headlee, MG. and Huisman, THJ.,(1984). Quantitation of hemoglobin components by high-performance cation-exchange liquid chromatography: its use in diagnosis and in the assessment of cellular distribution of hemoglobin variants, *Am J Hematol.*, 17(1): 39-53.
- Kutlar, F., Kutlar, A. and Huisman, THJ.,(1986). Separation of normal and abnormal hemoglobin chains by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J Chromatogr.*, 357(1): 147-153.
- Landman, H. and Huisman, TH., (1998). Persistent iron and folate deficiency in a patient with deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin: the effect of the relative levels of Hb F and G γ chains and the corresponding mRNAs. *Hemoglobin* **22**, 53–63.
- Langdon, SD. and Kaufman, RE., (1998). Gamma-globin gene promoter elements required for interaction with globin enhancers, *Blood*, 91 (1): 309-318 .
- Lee S-T, Yoo E-H, Kim J-Y, Kim J-W, Ki C-S., (2009). Multiplex ligation-dependent probe amplification screening of isolated increased HbF levels revealed three cases of novel rearrangements/deletions in the β -globin gene cluster. *British Journal of Haematology*, 148: 154-160.
- Leonova, JY., Kazanetz, EG., Smetanina, NS., Adekile, AD., Efremov, GD. and Huisman, THJ., (1996). Variability in the fetal hemoglobin level of the normal adult. *Am J Hematol.*, 53:59–65.
- Liao ,C., Zhou, J-Y., Xie, X-M. and Li, D-Z., (2010). HbF-Zhejiang: A HbF Variant Due to A Novel G γ Mutation [G γ 101(G3) Glu→Gln, GAG>CAG] Detected in A Chinese Newborn, *Hemoglobin*, 34(1): 107-109.
- Lorkin, PA., (1973). Fetal and Embryonic Haemoglobins, *Journal of Medical Genetics*, 10: 50-65.

- Lui, J-W. and Xu, X-M., (1999). Detection of α -HPFH mutations by using chemical cleavage of mismatch technique (Article), *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 26(3): 279-280.
- Lukens, J N.,(1999). The abnormal hemoglobins: General principles. In: Lee G R, Foerster J, Lukens J, Poraskev F, Greer J, Rodgers G M. Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10th ed., Eygpt: Mass Publishing Co., 1329-1343.
- Manca, L. and Masala, B., (2008). Disorders of the Synthesis of Human Fetal Hemoglobin, *IUBMB Life*, 60(2): 94-111.
- Martin, DIK., Tsai, S-F. and Orkin, SH., (1989). Increased γ -globin expression in a nondeletion HPFH mediated by an erythroid-specific DNA-binding factor, *Nature* 338: 435-438.
- Masala, B., Manca, L., Gallisai, D., Stangoni, A., Lanclos, KD., Kutlar, F., Yang, K. G., and Huisman, T H J., (1988) Biochemical and molecular aspects of β -thalassemia types in northern Sardinia, *Hemoglobin* 12, 661–671.
- Mayuranathan, T., Rayabaram, J., Das, R., Arora, N., Edison, ES., Chandy, M., Srivasta, A. and Valayudhan, SR., (2014). Identification of rare and novel deletions that cause $(\delta\beta)^0$ -thalassaemia and hereditary persistence of foetal haemoglobin in Indian population, *Eur J Haematol.*, 92(6):514-520.
- Mereu, P., Multineddu, C., Sannai, M., Piratru, M., Manca, L. and Masala, B.,(2009). Two Abnormal Fetal Hemoglobins Found in the Sardinian Population: The New Hb F-Osilo [$A\gamma 119(\text{GH}2)\text{Gly}\rightarrow\text{Ser}$, $\text{GGC} > \text{AGC}$] and Hb F-Paulinia [$\text{G}\gamma 80(\text{EF}4)\text{Asp}\rightarrow\text{Tyr}$, $\text{GAT} > \text{TAT}$] Already Described in the Brazilian Population, *Hemoglobin*, 33(6): 480-485.
- Molchanova, T P., Wilson, JB., Gu, L H., Hain, RD., Chang, L S., Poon, A O. and Huisman, THJ., (1992) A second observation of the fetal methemoglobin variant Hb F-M-Fort Ripley or $\alpha_2 \text{G}\gamma 292 (\text{F}8)\text{His}\rightarrow\text{Tyr}$, *Hemoglobin* 16, 389–398.
- Motum, PI., Deng, ZM., Huong, L. and Trent, RJ., (1994). The Australian type of nondeletional G gamma-HPFH has a C $\rightarrow$ G substitution at nucleotide -114 of the G gamma gene, *Br J Haematol.*, 86(1): 219-221.
- Motum, PI., Lindeman, R., Harvey, MP. and Trent, RJ.,(1993). Comparative studies of nondeletional HPFH gamma-globin gene promoters, *Exp Hematol.*, 21(7): 852-858.

- Murray, R.K., Granner D.K., Mayes, P.A. and Radwell, V.W., (1988). Harper's Biochemistry, 21th ed., Long Medical Book, London.
- Nadkarni, A., Wadia, M., Gorakshakar, A., Kiyama, R., Colah, RB. and Mohanty, D., (2008). Molecular Characterization of $\delta\beta$ -Thalassemia and Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin in the Indian Population, *Hemoglobin*, 32(5): 425-433.
- Nagel R L. Disorder of Hemoglobin Function and Stability. Handin R I, Lux S E and Stossel T P.,(2003). *Blood: Principles and Practice of Hematology*. Philadelphia: Lippincott Williams&Wilkins, 1597-1654.
- Nussbaum,RL., McInnes, RR. and Willard, HF.,(2001). *Principle of Molecular Disease Lessons Hemoglobinopathies*, Thompson and Thompson Genetics in Medicine 6th Edition, PA: W.B. Saunders Company, Philadelphia, 181-201.
- Ojwang, P J., Nakatsuji, T., Gardiner, M B., Reese, A.L., Gilman, J G. and Huisman TH J., (1983). Gene deletion as the molecular basis for the Kenya-G γ -HPFH condition. *Hemoglobin* 7, 115–123.
- Ottolenghi, S., Nicolis, S., Taramelli, R., Margaretti, N., Mantovani, R., Comi, P., Giglioni, B., Longinotti, M., Dore, F. and Oggiano, L., (1988). Sardinian G gamma-HPFH: a T----C substitution in a conserved "octamer" sequence in the G gamma-globin promoter, *Blood.*, 71:815-817.
- Özkınay, F., (2014). Hemoglobinopatilerde Genetik Patoloji ve Moleküler Tanı Yöntemleri, *Hematolog*, 4-1:30-45.
- Panyasi, S., Fucharoen, S., Surapot, S., Fucharoen, G. and Sanchaisuriya, K., (2004). Molecular basis and hematologic characterization of $\delta\beta$ -thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin in Thailand, *Haematologica*, 89: 777-781.
- Papadakis, M., Patrinos, GP., Drakoulakou, O. and Loutradi-Anagnostou, A.,(1996). HbF-Lesvos: an HbF variant due to a novel Gc mutation (G γ 75 ATA→ACA) detected in a Greek family, *Hum.Genet.* 97; 260–262
- Patrinos, GP., Kollia, P., Loukopoulos, D. and Papadakis, MN., (1997). The Cretan type of non-deletional hereditary persistence of fetal hemoglobin [$A\gamma$ –158C→T] results from two independent gene conversion events, *Hum Genet.*, 102: 629-634.

- Pereira, C., Relvas, L., Bento, C., Abade, A., Ribeiro, M. L. and Manco, L.,(2015). Polymorphic variations influencing fetal hemoglobin levels: Association study in beta-thalassemia carriers and in normal individuals of Portuguese origin *Blood Cells, Molecules and Diseases* 54;315–320
- Perutz, MF.,(1974). Mechanism of denaturation of haemoglobin by alkali, *Nature* Vol., 247:341-343.
- Pirastu, M., Manca, L., di Suni, MP., Speziga, SM. and Masala, B. (2004).Hb F-Porto Torres [$\text{A}\gamma 75(\text{E}19)\text{Ile}\rightarrow\text{Thr}, 136(\text{H}14)\text{Ala}\rightarrow\text{Ser}$]: a novel variant of the $\text{A}\gamma$ chain having two substitutions, one being that of Hb F-Sardinia, *Hemoglobin* 28, 297–303.
- Pirastu, M., Mereu, P., Trova, S., Manca, L. and Masala, B.,(2014). A new unstable variant of the fetal hemoglobin HBG2 gene: Hb F-Turritana [$\text{G}\gamma 64(\text{E}8)\text{Gly}\rightarrow\text{Asp}$, HBG2:c.194G>A] found in cis to the Hb F-Sardinia gene [$\text{A}\gamma(\text{E}19)\text{Ile}\rightarrow\text{Thr}$, HBG1: c.227T>C], *European Journal of Haematology*, 92: 510-513.
- Pissard, S., M'rad, A., Beuzard, Y. and Romeo, PH., (1996). A new type of hereditary persistence of fetal haemoglobin (HPFH): HPFH Tunisia β^+ (+C-200)G gamma, *British Journal of Haematology*, 95(1): 67-72.
- Plaseska, D., Kutlar, F., Wilson, JB., Fei, YJ. and Huisman, THJ.,(1990).Hb F-Charlotte, an $\text{A}\gamma$ variant with a threonine residue in position γ 75 and a glycine residue in position γ 136, *Hemoglobin* 14, 617–625.
- Polat, G., Tamer, L., Eskandari, G. ve Atik, U.,(2000). Hemoglobin Yapısı ve İşlevi, *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*,1:71-77.
- Prehu, C., Rhabbour, M., Netter, JC., Denier, M., Riou, J., Galecteros, F. and Wajcman, H., (2003). Hb F-M-Osaka [$\text{G}\gamma 63(\text{E}7)\text{His}\rightarrow\text{Tyr}$] in a newborn from southwest France, *Hemoglobin* 27, 27-30.
- Ricco G., Mazza, U., Turi, RM., Pich, PG., Camaschella, C., Saglio, G. and Bernini, LF., (1976). Significance of a new type of human fetal hemoglobin carrying a replacement isoleucine replaced by threonine at position 75 (E19) of the gamma chain, *Hum. Genet.* 32, 305–313.
- Rieder, M.J., Bertucci, C., Stanaway, I.B., Johnson, E.J., Swanson, J.E., Siegel, D.L., da Ponte, S.H., Igarua, C., Patterson, K. and Nickerson, D.A.,(2009). Direct Submission

Submitted (25-NOV-2009) Genome Sciences, University of Washington, 1705 NE Pacific, Seattle, WA 98195, USA

- Rochette, J., Craig, JE. and Thein, SL., (1994). Fetal Hemoglobin Levels in Adults, *Blood Rev.*, 8(4): 213-24.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, AR., (1977). DNA Sequencing With Chain Terminating Inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA*, 5463-5467.
- Sankaran, VG., Xu, J. and Orkin, SH., (2010). Advances in the Understanding of Haemoglobin Switching, *Br J Haematol.*, 149(2): 181-194.
- Schroeder, WA., Huisman, TH., Shelton, JR., Shelton, JB., Kleihauer, EF., Dozy AM. and Robberson, B., (1968). Evidence for multiple structural genes for the gamma chain of human fetal hemoglobin, *Proc Natl Acad Sci USA*, 60(2):537-544.
- Singer, K., Chernoff, AI. and Singer L., (1951). Studies on abnormal hemoglobins I. Their demonstration in sickle cell anemia and other hematological disorders by means of alkaline denaturation, *Blood*, 6: 413-428.
- Stamatoyannopoulos, G. and Nienhuis, AW., (1994). Hemoglobin switching, Edit: Stamatoyannopoulos G, Nienhuis AW, Majerus PW and Varmus H, eds. *The Molecular Basis of Blood Diseases*, 2nd edn, W.B. Saunders, Philadelphia, PA, 107-156.
- Steinberg, MH. and Nagel, RL., (2009). *The Molecular, Cellular and Genetic Basis of Hemoglobin Disorders*, Edit: Steinberg, MG., Forget, BG., Higgs, DR., Weatherall, DJ., Disorders of Hemoglobin, 2nd Ed., Cambridge University Press, Cambridge/ New York, 119-139.
- Stoming, TA., Stoming, GS., Lanclos, KD., Fei, YJ., Altay, C., Kutlar, F. and Huisman, THJ., (1989). An A γ type of nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin with a T $\rightarrow$ C mutation at position -175 to the cap site of the A γ globin gene, *Blood* 73, 329-333.
- Tahiroğlu, M., (2010). Hatay-Samandağ Yöresindeki Liselerde Hemoglobinopati Tiplendirilmesi ve Bilgilendirilmesi Çalışması, Ç.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Uzmanlık tezi, Adana.
- Takashashi, T., Schreiber, R., Krieger, JE., Saad, STO. and Costa, F., (2003). Analysis of the mechanism of action of the Brazilian type (A γ -195 C $\rightarrow$ G) of hereditary persistence of fetal hemoglobin, *European Journal of Haematology*, 71(6): 418-424.

- Tasiopoulou, M., Boussiou, M., Sinopoulou, K., Moraitis, G., Loutradi-Anagnostou, A. and Karababa, P., (2008). G γ -196 C→T, A γ -201 C→T: Two novel mutations in the promoter region of the γ -globin genes associated with nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin in Greece, *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 40: 320-332.
- Tate, VE., Wood, WG. and Weatherall, DJ., (1986). The British form of hereditary persistence of fetal hemoglobin results from a single base mutation adjacent to an S1 hypersensitive site 5' to the A gamma globin gene, *Blood Journal*, 68: 1389-1393.
- Thompson M, Mcinnes R R, Willard H F. *Genetics in Medicine*. 5th ed., Philadelphia: B. Saunders Comp., 1991: 247-270.
- Toma, S., Tenorio, M., Oakley, M., Thein, SL. and Clark, BE., (2014). Two Novel Mutations (HBG1: c.-250C>T and HBG2: c.-250C>T) Associated With Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin, *Hemoglobin*, 38(1): 67-69.
- Van der Padt A¹, Bouva M, Auwerda JJ, Dees A, Harteveld CL, Giordano PC.,(2005). Adult onset of a Thalassemia intermedia genotype in association with a -alpha-3.7 homozygosity. Hb G-Accra [beta73(e17)Asp-->Asn] in combination with beta- and alpha-thalassemia in the same family. *Hemoglobin*. 29(4):269-76.
- Vanin, E.F.,(1985). Processed pseudogenes: characteristics and evolution, *Annu Rev Genet.*, 19:253-272.
- Weatherall D J, Clegg J B, Higgs D R and Wood W G. *The Hemoglobinopathies*. Scriver C R, Beaudet A L, Sly W S, Valle D.,(2001). *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, Volume III. Eighth edition, U.S.A: International Edition, 4571-4627.
- Weatherall, DJ., (2006). *Disorders of Globin Synthesis*, Edit: Kaushansky, K., Litchman, MA., Beutler, E., Kipps, TJ., Seligsohn, U., Prchal, JT., Williams Hematology, eight edition, McGraw-Hill, 633-641.
- Wood, WG., (1993). Increased HbF in adult life, *Baillieres's Clin Haematol* 6, 177-213.
- Wood, WG., (2001). Hereditary persistence of fetal hemoglobin and $\delta\beta$ thalassemia, Edit: Steinberg, MH., Forget, BG., Higgs, DR., Nagel, RL., *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management*, Cambridge University Press, Cambridge, 356-388.

Yagami, T., Ballard, BT., Padovan, JC., Chait, BT., Popowicz, AM. and Manning, JM., (2002). N- terminal contributions of the gamma subunit of fetal hemoglobin to is tetramer strenght: remote effects at subunit contacts, Protein Sci., 11(1):27-35.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Ayşe Dalyan
Doğum Yeri : Nurhak
Doğum Tarihi : 07/09/1988
Medeni Hali : Evli
Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Mersin Cemile Hamdi Ogun Lisesi, 2006
Lisans : Adıyaman Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Fen Bilgisi
Öğretmenliği Bölümü, 2007-2011
Yüksek Lisans : Adıyaman Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Ana Bilim Dalı, 2013-2016

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

1-Nizip Polat Akın Ortaokulu, 2013-2014
2-Girne Ortaokulu, 2014-2016
3-TOBB Yavuz Selim Ortaokulu, 2016-

Yayınları (SCI ve diğer) :

EKLER

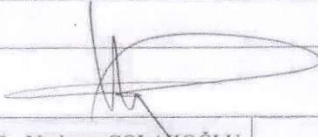
T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

ETİK KURUL KARARI

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR NO	ÇALIŞMACININ ADI SOYADI
16.09.2014	15	06	Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI

KARAR

“Delesyonel ve Nondelesyonel Fetal Hemoglobinin Kalıtsal Kalıcılığı (HPFH)’na Neden Olan Genotiplerin Belirlenmesi” konulu çalışma etik kurulumuzda görüşülmüş olup; çalışmanın etik kurallara uygun olduğuna oybirliğiyle karar verilmiştir.

Prof. Dr. Mustafa KAPLAN (Başkan)			
Prof. Dr. Engin ŞAHNA (Üye)	Bulunmadı	Prof. Dr. Neriman ÇOLAKOĞLU (Üye)	Bulunmadı
Prof. Dr. Sefa KAZANÇ (Üye)	Bulunmadı	Prof. Dr. Süleyman Serdar KOCA (Üye)	İmza
Doç. Dr. Erdal TAŞKIN (Üye)	İmza	Doç. Dr. Demet ÇİÇEK (Üye)	İmza
Doç. Dr. Fatih FIRDOLAŞ (Üye)	İmza	Doç. Dr. Yalın Kılıç TÜREL (Üye)	İmza
Doç. Dr. Ertan EVİN (Üye)	İmza	Doç. Dr. Alper Osman ÖĞRENMİŞ (Üye)	İmza
Doç. Dr. Murat SUNKAR (Üye)	İmza	Doç. Dr. Yüksel SAVUCU (Üye)	Bulunmadı
Yrd. Doç. Dr. Funda GÜLCU (Üye)	Bulunmadı	Yrd. Doç. Dr. Nurhan HALİSDEMİR (Üye)	İmza