

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

**G6PD AKTİVİTESİ REFERANS DEĞERLERİ ALTINDA
OLAN BİREYLERDE GEN EKSPRESYONLARININ
KARŞILAŞTIRILMASI**

TIBBİ BİYOKİMYA TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Başak SANNA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Abdullah TULİ

ADANA-2015

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

G6PD AKTİVİTESİ REFERANS DEĞERLERİ ALTINDA OLAN BİREYLERDE GEN EKSPRESYONLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

TIBBİ BİYOKİMYA TEZLİ YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

Başak SANNA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Prof. Dr. Abdullah TULİ

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından
TF2011YL2 no'lu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No.....
ADANA-2015

KABUL VE ONAY

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Programı Çerçevesinde yürütülmüş olan

“G6PD Aktivitesi Referans Değerleri Altında Olan Bireylerde Gen Ekspresyonlarının
Karşılaştırılması”

adlı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tarihi: 26 / 01 / 2015

TEZ SINAV JÜRİSİ



Prof. Dr. Abdullah TULI
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Başkan



Prof. Dr. Nürten DİKMEN
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Üye



Prof. Dr. İlgem ŞAŞMAZ
Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Hematoloji Bilim Dalı
Üye

Yukarıdaki Tez, Yönetim Kurulunun / / tarih ve
edilmiştir.

sayılı kararı ile kabul

Prof.Dr. Şeref ERDOĞAN
Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince derslerimde ve tez konusunun belirlenmesinde bilimsel katkıları ile bana yardımcı olan, tez çalışmalarının planlanmasını ve yürütülmesini büyük özveri ve sabırla yönlendiren danışmanım Prof. Dr. Abdullah TULİ'ye teşekkür ederim.

Çalışmalarına bilgi ve deneyimleriyle büyük destek olan Prof. Dr. Levent KAYRIN'a ve Prof. Dr. Nurten DİKMEN'e, öğrenim sürecimde birikimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Kıymet AKSOY'a, Prof. Dr. M. Akif ÇÜRÜK'e, Doç. Dr. C. Tamer İNAL'a, Doç. Dr. Özlem GÖRÜROĞLU ÖZTÜRK'e, tüm çalışmalarında kuramsal ve deneysel bilgilerini esirgemeyen Uzm. Dr. Ebru DÜNDAR YENİLMEZ'e teşekkür ederim.

Örnek temininde yardımcı olan Çocuk Hematoloji Bilim Dalı Öğr. Üyesi Prof. Dr. İlgen ŞAŞMAZ'a teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarımda çok büyük yardımcım olan, özellikle Sağ. Tek. Halil GÜLSEV'e, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı asistanlarına, teknik ve diğer personellere desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Tüm hayatımda en büyük destekçim olan annem Filiz ANT'a sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamı TF2013YL2 No'lu proje ile maddi olarak destekleyen Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No:
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	x
ÖZET	xii
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD).....	3
2.2. G6PD Enziminin Tarihçesi	3
2.3. G6PD Enziminin Yapısal Özellikleri	4
2.4. Pentoz Fosfat Yolu	6
2.5. G6PD Enziminin Genetik Özellikleri	8
2.6. G6PD Enziminin Kalıtımı.....	10
2.7. G6PD Eksikliği	12
2.8. G6PD Varyantları	12
2.8.1. Türkiye’de Saptanan G6PD Varyantları.....	18
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	20
3.1. Gereçler.....	20
3.1.1. Kullanılan Cihazlar	20
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler	21
3.2. Örnek Toplama ve Deney Akışı	22
3.3. Yöntemler.....	23
3.3.1. Hematolojik Analiz	23
3.3.1.1. Prensip.....	23
3.3.1.2. Ayıraçlar	23
3.3.1.3. Yöntem.....	23

3.3.2. Kinetik Çalışma.....	23
3.3.2.1. G6PD Enzim Aktivitesinin Kantitatif Ölçümü	23
3.3.2.1.1. Prensip.....	23
3.3.2.1.2. Ayıraçlar	24
3.3.2.1.3. Yöntem	24
3.3.2.1.3.1. Hemolizat Hazırlanması.....	24
3.3.3. G6PD Enziminin Kısmi Olarak Saflaştırılması	25
3.3.3.1. Prensip.....	25
3.3.3.2. Ayıraçlar	25
3.3.3.3. Yöntem	26
3.3.3.3.1. Anyon Değiştirici Reçinenin (DE-52)	
Hazırlanması	26
3.3.3.3.2. Hemolizatın Reçineden Sökülmesi	26
3.3.3.3.3. Bağlanmayan Proteinlerin Reçineden Sökülmesi	26
3.3.3.3.4. Bağlanan Proteinlerin Reçineden Sökülmesi	26
3.3.4. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enziminin Kinetik	
Özelliklerinin İncelenmesi	27
3.3.4.1. Prensip.....	27
3.3.4.2. Ayıraçlar	27
3.3.4.3. Yöntem	27
3.3.4.3.1. Kısmi saflaştırılan G6PD Enzimine Ait K_{mNADP}	
Değerinin Hesaplanması	27
3.3.4.3.2. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enzimine Ait K_{mG6P}	
Değerinin Hesaplanması	28
3.3.4.3.3. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enziminin Analog	
Çalışması.....	29
3.3.4.3.4. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enziminin Sıcaklık	
Kararlılığının İncelenmesi.....	29
3.3.4.3.5. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enziminin Optimum	
pH'sinin Belirlenmesi	29
3.3.5. Moleküler Çalışma.....	30
3.3.5.1. DNA Eldesi	30

3.3.5.1.1. Prensip.....	30
3.3.5.1.2. Ayıraçlar	30
3.3.5.1.3. Yöntem	30
3.3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR).....	31
3.3.5.2.1. Prensip.....	31
3.3.5.2.2. Ayıraçlar	32
3.3.5.2.3. Yöntem	32
3.3.5.3. Amplifiye G6PD Gen Ürününün Restriksiyon Endonükleaz ile Kesimesi (RFLP).....	33
3.3.5.3.1. Prensip.....	33
3.3.5.3.2. Ayıraçlar	33
3.3.5.3.3. Yöntem	34
3.3.5.4. Dizi Analizi	34
3.3.5.4.1. Prensip.....	34
3.3.5.4.2. PCR Aşaması.....	35
3.3.5.4.2.1. Prensip.....	35
3.3.5.4.2.2. Ayıraçlar	35
3.3.5.4.2.3. Yöntem	35
3.3.5.4.3. “Cycle Sequencing” aşaması	36
3.3.5.4.3.1. Prensip.....	36
3.3.5.4.3.2. Ayıraçlar	36
3.3.5.4.3.3. Yöntem	36
3.3.5.5. Gen Ekspresyonu	37
3.3.5.5.1. Tam Kandan Lökosit İzolasyon	37
3.3.5.5.1.1. Prensip.....	37
3.3.5.5.1.2. Ayıraçlar	37
3.3.5.5.1.3. Yöntem	37
3.3.5.5.2. mRNA İzolasyonu.....	38
3.3.5.5.2.1. Prensip.....	38
3.3.5.5.2.2. Ayıraçlar	38
3.3.5.5.2.3. Yöntem	38
3.3.5.5.3. cDNA eldesi	39

3.3.5.5.3.1. Prensipt.....	39
3.3.5.5.3.2. Ayıraçlar	39
3.3.5.5.3.3. Yöntem	39
3.3.5.5.4. Gen Ekspresyonu Analizi.....	40
3.3.5.5.4.1. Prensipt.....	40
3.3.5.5.4.2. Ayıraçlar	40
3.3.5.5.4.3. Yöntem	40
3.3.5.5.5. β -Aktin Protokolü	42
3.3.5.5.5.1. Prensipt.....	42
3.3.5.5.5.2. Ayıraçlar	42
3.3.5.5.5.3. Yöntem	42
3.4. İstatistiksel Analiz	42
4. BULGULAR.....	43
4.1. Hematolojik Bulgular.....	43
4.2. Kinetik Bulgular.....	45
4.2.1. Z.K'ye Ait Kinetik Bulgular	47
4.2.1.1. G6PD Enzimine Ait K_{mNADP^+} ve K_{mG6P} Değerinin Saptanması	47
4.2.1.2. G6PD Enzimine Ait Analog Çalışma.....	49
4.2.1.3. G6PD Enziminin Sıcaklık Kararlılığı	50
4.2.1.4. G6PD Enziminin Optimum pH'si	51
4.2.1.5. G6PD Enziminin Optimum Çalışma Sıcaklığı	52
4.3. Moleküler Bulgular	52
4.3.1. PCR Bulguları	52
4.3.2. Dizi Analizi Sonuçları	54
4.3.3. Gen Ekspresyonu	55
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	65
KAYNAKLAR.....	66
EKLER.....	76
EK-1 Etik Kurul Onay Formu.....	76
EK-2 Denek Bilgilendirme ve Rıza Olur Formu	77
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. İnsan G6PD Enziminin Dimerik Yapısı	5
Şekil 2.2. Glukoz-6-fosfatın, Riboz-5-fosfata Katalizlenmesinde Rol Alan PFY'ye Genel Bakış	6
Şekil 2.3. PFY ve Diğer Sentez Yolları ile Bağlantısı	8
Şekil 2.4. G6PD Enziminin Kromozom Üzerindeki Konumu	9
Şekil 2.5. G6PD Geninin İntron ve Ekson Bölgeleri	9
Şekil 2.6. G6PD Enziminin Kalıtım Şeması	11
Şekil 2.7. G6PD Varyantlarının Dünyadaki Dağılımı	15
Şekil 2.8. G6PD Geninde Mutasyonların Gerçekleştiği Bölgeler ve Yaygın Görülen Mutasyonlar	16
Şekil 3.1. Çalışma Akış Şeması	22
Şekil 4.1. Z.K.'nin G6PD K_{mNADP} Analizi İçin Yararlanılan Lineweaver-Burk Grafiği	48
Şekil 4.2. Z.K.'nin G6PD K_{mG6P} Analizi İçin Yararlanılan Lineweaver-Burk Grafiği	49
Şekil 4.3. Z.K.'nin 47 °C'de Sıcaklık Kararlılığı Grafiği	51
Şekil 4.4. Z.K.'nin Optimum pH Grafiği	51
Şekil 4.5. Z.K.'nin Optimum Çalışma Sıcaklığı Grafiği	52
Şekil 4.6. G6PD Geninin Enzim Kesimi Öncesi % 2'lik Agaroze Jel Elektroforez Görüntüsü	53
Şekil 4.7. <i>Mbo</i> II Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kesim İşleminin Sonra % 3'lük Agaroze Jeldeki Görünümü	54
Şekil 4.8. G6PD Akdeniz Mutasyonu Gözlenmeyen Ş.S. Olgusunun DNA Dizi Analizi Görüntüsü	55
Şekil 4.9. G6PD Akdeniz Mutasyonu Gözlenen Z.K. Olgusunun DNA Dizi Analizi Görüntüsü	55
Şekil 4.10. Tüm olguların çift çalışılan G6PD Geninin Ekspresyonunun RT-PCR Görüntüsü	56
Şekil 4.11. Referans Genin Ekspresyonunun RT-PCR Görüntüsü	56

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa No</u>
Çizelge 2.1. G6PD'nin Moleküler Özellikleri	10
Çizelge 2.2. Yaygın Görülen G6PD Varyantları	13
Çizelge 2.3. G6PD Enzim Eksikliğinin Dünyada Yaygın Varyant ve Mutasyonlarının Dağılımı.	17
Çizelge 2.4. Türkiye'de Bulunmuş Olan G6PD Varyantları	19
Çizelge 3.1. G6PD Enzim Aktivitesinin Kantitatif Tayini İçin Gerekli Olan Çözeltiler ve Derişimleri	25
Çizelge 3.2. G6PD Enzimine Ait K_{mNADP} Değerinin Hesaplanması İçin Gerekli Olan Çözeltiler ve Derişimleri	28
Çizelge 3.3. G6PD Enzimine Ait K_{mG6P} Değerinin Hesaplanması İçin Gerekli Olan Çözeltiler ve Derişimleri	28
Çizelge 3.4. G6PD Enziminin Analog Çalışması İçin Gerekli Olan Çözeltiler ve Derişimleri	29
Çizelge 3.5. PCR Karışımı	33
Çizelge 3.6. RFLP İçin Gerekli Olan Çözeltiler	34
Çizelge 3.7. Light Cycler 480 RT-PCR Cihazı G6PD Gen Ekspresyon Programı	41
Çizelge 4.1. Olguların Hematolojik Verileri	44
Çizelge 4.2. Olguların Kinetik Özellikleri	46
Çizelge 4.3. Z.K.'nin Substrat Analoglarını Kullanma Oranı	50
Çizelge 4.4. Olguların mRNA Ekspresyonlarının $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Sonuçları	57
Çizelge 4.5. Olguların $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri ile K_{mG6P} ve K_{mNADP} 'nin Korelasyon Verileri	57

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

2dG6P	: 2-Deoksi-Glukoz-6-Fosfat
ARMS	: “Amplification Refractory Mutation System”
ATP	: Adenozin TriFosfat
bç	: Baz Çifti
β	: Beta
cDNA	: Komplementer DNA
°C	: Santigrat Derece
cm	: Santimetre
Da	: Dalton
dk	: Dakika
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNADP	: Deamino Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat
DTT	: DL-Dithiothreitol
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
FAD	: Flavın Adenin Dinükleotit
G6P	: Glukoz-6-Fosfat
G6PD	: Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz
Gal6P	: Galaktoz-6-Fosfat
Gd Med	: G6PD Akdeniz
GSH	: Redükte Glutasyon
GSSH	: Okside Glutasyon
K_m	: Michaelis Menten Sabiti
M	: Molar
mRNA	: Mesajcı RNA
NAD	: Nikotinamit Adenin Dinükleotit
NADP	: Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfat
nm	: Nanometre
PCR	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
PFY	: Pentoz Fosfat Yolu
RFLP	: “Restriction Fragment Length Polymorphism”
RNA	: Ribonükleik Asit
rpm	: Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PCR	: “Real Time Polymerase Chain Reaction”
s	: Saniye

SD : Standart Sapma
SF : Serum Fizyolojik
UV : Ultra Viole (mor ötesi)
WHO : Dünya Sağlık Örgütü
WHO-G6PD : Dünya Sağlık Örgütü - Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliği Çalışma Grubu
 $\bar{x}$: Ortalama

ÖZET

G6PD Aktivitesi Referans Değerleri Altında Olan Bireylerde Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz pentoz fosfat yolunun ilk basamağını katalizleyen kilit bir enzimdir. Eritrositlerde NADPH oluşumu için tek kaynak pentoz fosfat yolu olup, G6PD eksikliğinde NADPH üretimi önemli ölçüde azalmaktadır. G6PD enzim eksikliği enfeksiyonlar sırasında, bazı ilaçların kullanımıyla, yeni doğan dönemde, bakla tüketimiyle ve stres koşullarında hemolitik anemiyle sonuçlanabilir. Enzim aktivitesi düşük olan olguların oksidatif ajanlara maruz kalması durumunda bazılarının eritrositlerinin etkilendiği, bazılarının etkilenmediği görülmüştür. Bu duruma açıklık getirebilmek için G6PD aktivitesi referans değerleri altında olan bireylerde G6PD enziminin kinetik özellikleri, genotipi ve G6PD geninin mRNA ekspresyon seviyeleri arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamız, G6PD enzim aktivitesi referans aralığından düşük veya sıfır olan 3'ü kadın 7'si erkek 10 olgudan oluşmaktadır. G6PD aktivitesi Beutler yöntemi ile tayin edilmiştir. G6PD enzimi DE-52 anyon değiştirici reçine ile kısmi olarak saflaştırılarak kinetik özellikleri çalışılmıştır. Tüm olgularda *Mbo*II enzim kesimi ve sekans analizi ile Gd Akdeniz mutasyonu genotiplendirilmiştir. G6PD geninin ekspresyon seviyesi $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanmıştır. Elde edilen değişkenler Korelasyon testi ile değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda 4 hastada Gd Akdeniz mutasyonu belirlenmiş ve bunlardan 2 olgunun hemizigot, 2 olgunun da heterozigot olduğu bulunmuştur. Genin ekspresyon seviyeleri ile diğer değişkenler değerlendirilmiştir. Buna göre G6PD geninin ekspresyon düzeyi ile K_{mNADP} arasında yüksek düzeyde, anlamlı pozitif bir ilişki olduğu, K_{mG6P} arasında orta düzeyde, anlamlı pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Bu da G6PD enziminin substrat bağlanma bölgesinin post-transkripsiyonel veya post-translasyonel modifikasyon geçirmiş olabileceğini düşündürmüştür.

Anahtar Kelimeler: Glukoz-6-fosfat Dehidrogenaz, Gen Ekspresyonu, Enzim Kinetiği

ABSTRACT

Comparison of Gene Expressions in Subjects With G6PD Activity Below The Reference Values

Glucose 6-phosphate dehydrogenase is the key enzyme which catalyzes first step of pentose phosphate metabolic pathway. Unique source of NADPH in erythrocyte is the pentose phosphate metabolic pathway and synthesis of NADPH decreases in G6PD deficiency. The deficiency of G6PD deficiency may result in hemolytic anemia due to drug toxicities, infections during the neonatal period, consumption of beans and stress conditions. Reported that if exposed to these conditions, while some case has been affected, some of which has not been affected. In order to clarify this situation G6PD enzyme kinetics were studied from cases G6PD activity below the reference values. The aim of this study was to evaluate the relationship between G6PD gene expression and G6PD enzyme kinetics parameters and genotype.

Ten cases (7 male and 3 female) of low or null G6PD enzyme activity were enrolled in this study. Enzyme activity was determined with the Beutler method. G6PD was partially purified DE-52 anion exchange resin and then enzyme kinetics were studied. G6PD Mediterranean mutation was genotyped by sequencing analysis and *Mbo*II restriction enzyme. G6PD gene expression levels were analyzed by using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formula. Variables were evaluated by correlation test.

In this study G6PD Mediterranean mutation were identified in 4 cases two of hemizygote and two of heterozygote. We evaluated relationship of G6PD gene expression with other variables. There was statistically significant high positive correlation with G6PD gene expression levels and K_{mNADP} , statistically significant moderate positive correlation with G6PD gene expression levels and K_{mG6P} . This case is suggested to have different specifications in the substrate binding site as a result of post-translational or post-transcriptional modifications.

Key Words: Glucose-6-phosphate Dehydrogenase, Gene Expression, Enzyme Kinetic

1. GİRİŞ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD, EC: 1.1.1.49, β -D-Glukoz-6-Fosfat, NADP oksidoredüktaz) enzimi pentoz fosfat yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimidir. G6PD eksikliği bilinen en yaygın kalıtsal enzim hastalığıdır ve dünyada 500 milyondan fazla insanı etkilemektedir¹. Pentoz fosfat yolunun (PFY) temel görevi organizmaya NADPH ve riboz fosfatları sağlamaktır. PFY hücrenin sitozolünde gerçekleşir ve her bir G6PD'ye karşılık 2 mol NADPH üretilir¹.

G6PD geni insanda X kromozomunun uzun kolunun 28nci band bölgesinde (Xq28) bulunmaktadır. G6PD geni 13 ekson ve 12 introndan oluşmaktadır. Enzim 515 amino asit tarafından kodlanmaktadır. mRNA'sı 20.114 baz çifti (bç) uzunluğundadır. İnsan G6PD enziminin ağırlığı 59.265 daltondur (Da) ve 2 ya da 4 alt birimden oluşur².

Dünya Sağlık Örgütü Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliği Çalışma Grubu (WHO-G6PD) ölçütlerine göre (biyokimyasal, kinetik, klinik), 400'ün üzerinde G6PD varyantı tanımlanmıştır. G6PD enzim eksikliği dünya genelinde yaygın olduğu için en çok çalışılan kalıtsal hastalıklardan birisidir³. Çukurova bölgesinde yapılan tarama çalışmaları sonucunda bu bölgedeki G6PD eksikliğinin oranının % 8,2 olduğu bildirilmiştir⁴. Bölgemizden Adana, Balcalı ve Samandağ isimleriyle rapor edilen varyantlar elektroforezde kat ettikleri yol, optimum pH, K_m değerleri, substrat analoglarını kullanabilme yetenekleri, inhibitörleri ve sıcaklık kararlılıkları normal enzim ile karşılaştırılarak saptanmıştır⁴.

Enzimin tüm popülasyon gruplarında çalışılmış olan en genel tipi Gd B⁺'dir. Gd Akdeniz (Gd Mediterranean, Gd Med), % 0 ile 10 arasında bir aktivite gösteren ve Akdeniz bölgesindeki beyazlarda daha sık rastlanan bir varyanttır. Bu varyantın kinetik özellikleri Gd B⁺, Gd A⁺ ve Gd A⁻ varyantlarından büyük farklılık göstermektedir².

G6PD enzim eksikliği, salt enzim yokluğu anlamına gelmemektedir. Enzim sentezinde rol alan transkripsiyon veya post translasyonel kademelerde bozukluk söz konusu olmaktadır. Bu durum, G6PD enzim aktivitesinde azalma, kinetik ve elektroforetik verilerde değişiklik ile kendini göstermektedir⁵.

G6PD enzim eksikliği, enfeksiyonlar sırasında, bazı ilaçların kullanımıyla, yeni doğan döneminde, bakla tüketimiyle ve stres koşullarında hemolitik anemiyle sonuçlanabilir.

Enzim aktivitesi düşük olan hastaların, oksidatif ajanlara maruz kalması durumunda bazılarının etkilendiği, bazılarının etkilenmediği görülmüştür. Bu durumu açıklığa kavuşturabilmek amacıyla çalışmamızda, enzimin kinetik özellikleri belirlenmiş ve Gd Akdeniz mutasyonu açısından değerlendirilmiştir. Daha ileri bir çalışma olarak da genin mRNA'sının gen ifadesi düzeyleri belirlenmeye çalışılmıştır.

Bu tez ile G6PD enzim aktivitesi referans değerlerinden düşük olan kişilerde G6PD enziminin kısmi olarak saflaştırılmış ve enzim kinetiği çalışılmıştır. Daha sonra DNA'ları izole edilen olgularda Gd Akdeniz mutasyonu taranmıştır. Son aşama olarak tam kandan lökosit ayrılmış ve olguların mRNA ekspresyon düzeyleri arasındaki ilişki irdelenmiştir. Daha önce ülkemizde bu konuda yapılmış benzer bir çalışma olmaması, teze bir özgünlük kazandırmaktadır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Glukoz 6 Fosfat Dehidrogenaz (G6PD)

PFY'nin ilk ve kilit enzimi olan Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD; EC: 1.1.1.49, β -D-Glukoz-6-Fosfat, NADP oksidoredüktaz) bakteri, protozoa, mantar, sinek, balık ve memelileri içeren geniş bir canlı topluluğunda bulunmaktadır⁶. Bu nedenle, her canlıda var olan anlamına gelen “ubiquitous” enzim olarak tanımlanmaktadır. Buna ilaveten, üstlendiği biyokimyasal rol nedeniyle yaşam için gerekli olan anlamına gelen “housekeeping” enzim olarak da isimlendirilmektedir⁷. Enzimin doğal substratı glukoz-6-fosfattır (G6P). G6PD tarafından Nikotinamit Adenin Dinükleotit Fosfatlar (NADP) üretilmektedir. NADPH'ler hücre için çeşitli redüktif biyosentezlerde kullanılmaktadır. NADPH'nin eritrositlerdeki en önemli rolü, okside glutasyonu (GSSG) redükte glutasyon (GSH) haline dönüştürmektir⁸.

G6PD enzim eksikliği, dünyada en sık rastlanan enzim eksikliğidir. Eksikliği 1950'li yıllarda antimalaryal bir ilaç olan primakinin hemolitik etkisinin araştırılması sonucunda tanımlanmıştır. Bu yıllardaki çalışmalar, G6PD enzim eksikliğinin X'e bağlı kalıtıldığını ve yaşlı eritrositlerin enzim eksikliğinden daha çok etkilendiğini göstermiştir⁹.

2.2. G6PD Enziminin Tarihçesi

Milattan önceki dönemlerde Yunanlı matematikçi “Pythagoras”un bakla tarlasından geçerek kaçmayı reddettiği için öldürüldüğü düşünülmektedir. Bakla bitkisinin polenlerinin solunması bile bazı kişilerde hemolize yol açabilmektedir^{10, 11}.

G6PD ilk kez, 1931 yılında Warburg ve Christian tarafından at eritrositlerinde tanımlanmış ve “Zwischenferment” olarak isimlendirilmiştir^{12, 13}.

1936 yılında enzim kısmen saflaştırılmış ve çeşitli organizmalarda çalışmalar yapılmıştır. Daha sonra Lipman, Dickens, Horecker ve Racker tarafından PFY'de G6PD enziminin görevini tanımlamışlardır¹²⁻¹⁴.

1950'li yıllarda G6PD enziminin X kromozomuyla kalıtıldığı saptanmıştır. Yine aynı yıllarda G6PD enzim eksikliği primakin denen sıtma ilacının alımından sonra hemolitik kriz geçiren hasta grubunda ilk defa tanımlanmıştır¹⁵.

1960'lı yılların başlarında ise enzimin çeşitli elektroforetik varyantları gösterilmiştir. G6PD enziminin değişik özellikler gösteren 400'ün üzerinde varyantının olduğu bulunmuştur^{15, 16}.

1967 yılında toplanan Dünya Sağlık Örgütü - Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliği Çalışma Grubu (WHO - G6PD) eritrosit G6PD enzim aktivitesini, elektroforetik analiz ve inhibitörlere yanıt gibi değişkenlerin varyantlarını tanımlamada kullanılmasına karar vermiştir¹⁷⁻¹⁹.

G6PD'nin ilk defa primakin kullananlarda belirlenmesinden dolayı bu genetik eksiklik önceleri "primakin duyarlılığı" ismini almıştır. Daha sonra Fava fasulyesinin (Fava beans; *Vicia fava*) yenilmesi ile de ortaya çıktığı için de bu enzim eksikliğine "favizm"de denilmektedir^{2, 20, 21}.

G6PD geni 1986 yılında klonlanarak nükleotit ve amino asit dizisi tanımlanmıştır^{2, 22-24}. Chen ve arkadaşları 1991'de, G6PD geninin tam dizi analizini belirleyerek, insan G6PD geninin DNA'sındaki 20.114 kilobaz'dan (kb) oluştuğunu ortaya koymuşlardır²⁵.

Tang ve arkadaşları 1992'de, Çin'de G6PD eksikliklerinin moleküler temelini araştırmışlardır. Yine aynı tarihte Bautista ve ark. ile Maeda ve ark. tarafından G6PD enzimi farklı kaynaklardan değişik yöntemler kullanılarak birçok kez saflaştırılmıştır^{26, 27}.

Miwa ve Fujii 1996 yılında G6PD mutasyonlarından sorumlu 78 varyantı listelenmişlerdir. Dünya çapında 400 milyon kişinin G6PD eksikliğinin; kronik hemolitik anemi, uyuşturucu ya da enfeksiyonun neden olduğu akut hemolitik anemi ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir²⁸⁻³¹. Günümüzde ise 500 milyondan fazla insanın G6PD enzim eksikliğinden etkilendiği belirtilmiştir³².

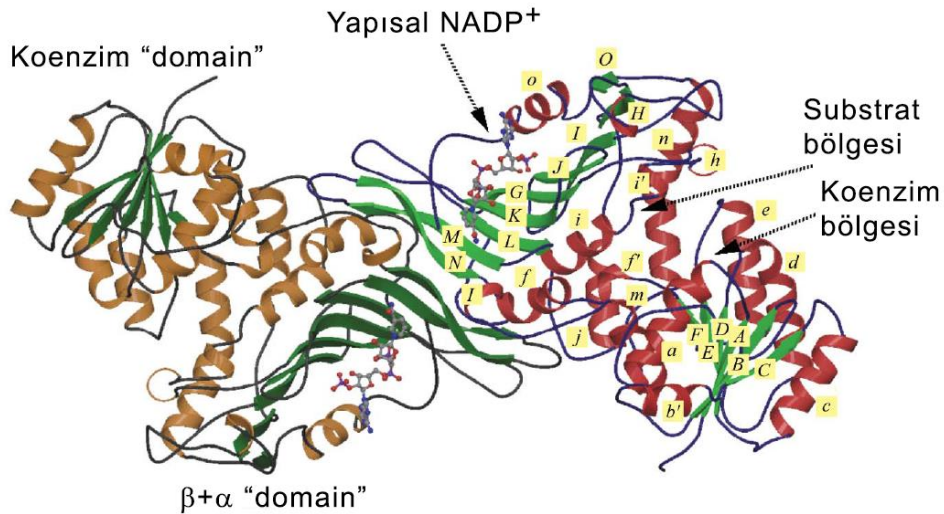
2.3. G6PD Enziminin Yapısal Özellikleri

İnsan G6PD enzimi monomeri 515 amino asitten oluşur. Molekül ağırlığı mikrobiyal türlerde 50.000 - 60.000 Da, memeli türlerinde ise 58.000 - 67.000 Da arasında değişiklik göstermektedir^{26, 33-35}.

Tüm dokularda bulunan enzim, aynı tip monomerlerin biraraya gelmesi ile oluşan, dimerik, tetramerik ve hekzamerik yapılar şeklinde bulunabilir. Bu yapıların oluşmasını;

pH, ortamdaki Mg^{+2} derişimi, protein derişimi ve iyonik kuvvet etkilemektedir^{33, 36, 37}. Enzim genellikle etkin olarak dimerik yapı gösterir (Şekil 2.1.). İnsan G6PD enzimi, her alt birim iki molekül $NADP^+$ ile bağlanmış şekilde yaklaşık 59.265 Da molekül ağırlığına sahiptir^{2, 38-40}.

Enzimin dimerik ya da tetramerik formunu sıcaklık, enzim, NADPH derişimi gibi çeşitli etmenler etkilemektedir. Yüksek pH ve iyonik kuvvet dimer, düşük pH ve iyonik kuvvet ise tetramer oluşumuna neden olur. Monomerlerin amino asit sıralarında türler arası benzerlik olmakla beraber birincil, ikincil ve üçüncül yapıları arasında farklılıklar vardır. G6PD'nin 515 amino asitten oluşan birincil yapısının 64 amino asiti, bakteriden insana kadar her türde aynıdır^{29, 41}. Enzimin karboksil ucunda hemolitik anemiye neden olan mutasyon bölgeleri (362. ve 446. amino asitler arası) bulunmaktadır. Klinik olarak hafif seyreden mutasyonlar ise enzimin amino ucuna yakın bölgelerde toplanmaktadır².



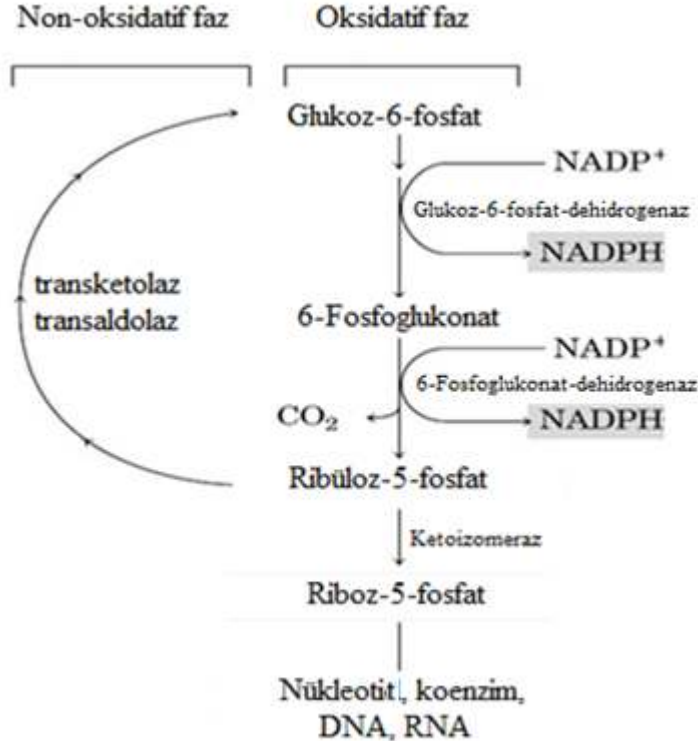
Şekil 2.1. İnsan G6PD enziminin dimerik yapısı³⁹

İnsan G6PD'sinin yapısında bulunan yapısal $NADP^+$ 'nin, enzimin kararlılığını sağlamak ve katalitik etkinlik için substrat olarak görev almak üzere 2 işlevi bulunmaktadır. Bu yapısal $NADP^+$ 'nin, enzimdeki 41inci amino asit olan Glisin ve 42nci amino asit olan Aspartik asit ile etkileşime girdiği tahmin edilmektedir. Yapısal $NADP^+$ 'deki Adenin molekülünün Tirozin 503 ve Arginin 487 arasında; nikotinamit molekülünün ise Triptofan 509 ile Tirozin 401 arasında enzime bağlandığı

düşünülmektedir. Bütün bu etkileşimler göz önünde bulundurulduğunda, yapısal NADP⁺'nin ortamdan ayrılmasıyla enzimin alt birimlerinin hepsinde yapısal bütünlüğün bozulabileceği düşünülmektedir^{42, 43}.

2.4. Pentoz Fosfat Yolu

PFY, heksoz monofosfat yolu veya fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da isimlendirilmektedir^{44, 45}. PFY, oksidatif ve non-oksidatif olarak 2 yolda gerçekleşir. Oksidatif fazın son ürünü riboz-5-fosfattır ve nükleotit sentezinde görev alır. Olgun eritrositlerde, antioksidan tamir sistemlerinin çalışması için gerekli olan NADPH'yi üreten seçeneksiz yol olmasından dolayı, bu yolağın sağlıklı işleyişi, eritrositlerin yaşamı açısından kritik öneme sahiptir^{15, 46, 47}. Temel gereksinimi NADPH olan eritrositlere benzer dokularda, non-oksidatif fazda riboz-5-fosfattan önceki ara ürün ribüloz-5-fosfat ise transketolaz ve transaldolaz enzimleriyle yeniden glukoz-6-fosfata katalizlenir^{48, 49}. Glukoz-6-fosfatın, riboz-5-fosfata katalizlenmesi şekil 2.2'de gösterilmektedir.



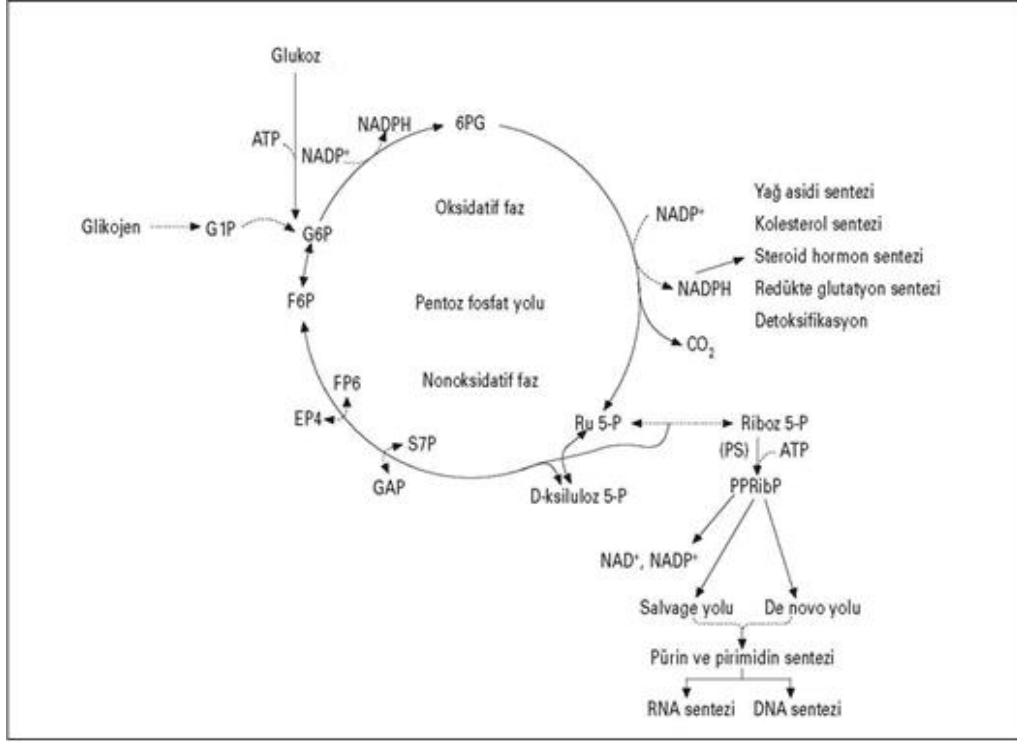
Şekil 2.2. Glukoz-6-fosfatın, riboz-5-fosfata katalizlenmesinde rol alan PFY'ye genel bakış⁴⁴.

PFY'nin temel görevi,

- Yağ asitlerinin biyosentezi ve zincir uzatma reaksiyonlarında,
- Steroitlerin biyosentezinde,
- Bazı aromatik amino asitlerin biyosentezinde,
- Okside glutatyonun (GSSG) indirgenmesinde,
- DNA sentezi sırasında ribonükleotitlerin deoksiribonükleotitlere dönüştürülmesinde,
- Nörotransmitter sisteminde,
- Peroksitlerin, ilaçların ve ksenobiyotiklerin detoksifikasyonunda,
- Methemoglobinin hemoglobine dönüşümünde,
- Glukuronik asit yolunda,
- L-askorbik asit sentezinde,
- Hücre zarının bütünlüğünün korunmasında, kullanılacak NADPH'leri üretmektir.

Bunlara ek olarak, nükleik asitlerin *de novo* sentezinde gerekli riboz-5-fosfatın eldesinde de önemli bir kaynaktır^{50, 51}.

Normal eritrositlerde glukozun % 90'ı glikolizle yıkılır iken, % 10'luk bir kısmı da PFY yoluyla NADPH elde edilmesinde kullanılır^{52, 53}. Glukoz-6-fosfatın 1 no'lu karbonunun dehidrogenasyonu PFY başlar. Bu tepkime G6PD enzimi tarafından katalizlenir. Tepkime sonucu 6-fosfoglukonolakton oluşur. PFY ve diğer sentez yolları ile bağlantısı şekil 2.2 ve şekil 2.3'de gösterilmektedir.



Şekil 2.3. PFY ve yolağın diğer sentez yolları ile bağlantısı⁵⁴.

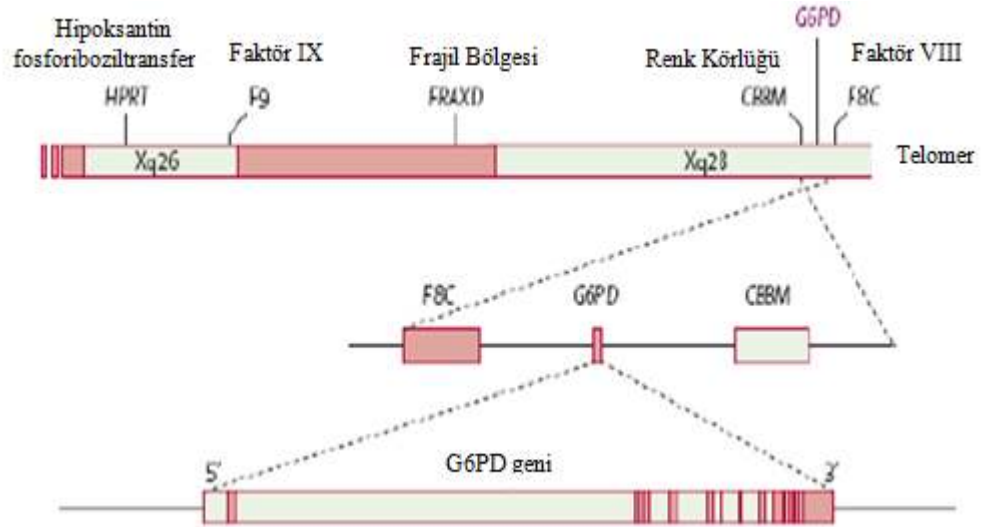
Sonuç olarak, PFY’de beş karbonlu karbohidratlar ve NADPH molekülü sentez edilir. Bunlar; karbohidrat, ATP, CoA, NAD, FAD, RNA ve DNA gibi önemli biyomoleküllerin yapıtaşı olarak kullanılır. Bu yolda üretilen NADPH molekülleri ise metabolizmadaki indirgeyici tepkimelere hidrojen sağlayıcı kaynaktır⁵⁵. Olgun eritrositlerde antioksidan tamir sistemlerinin çalışması için gerekli olan NADPH’yi üreten seçenezsiz yol olmasından dolayı, PFY’nin sağlıklı işleyişi, eritrositlerin yaşamı açısından kritik öneme sahiptir⁵⁶.

2.5. G6PD Enziminin Genetik Özellikleri

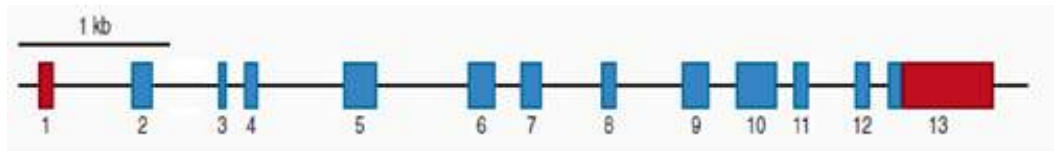
G6PD geni insanda X kromozomunun uzun kolunun 28inci band bölgesinde (Xq28) bulunmaktadır. G6PD geninden başka hemofili (faktör 8 ve 9), renk körlüğü, kırılğan X (FRAX) gen bölgeleri de bu kromozomal bölgededir (Şekil 2.4)⁶. G6PD geni 20,1 kb ve genin kodladığı mRNA ise 2.269 baz çifti (bç) uzunluğundadır. Gen, 13 ekson ve 12 intron içerir (Şekil 2.5)². En kısa ekson 38 bç’den oluşan 3üncü ekson, en uzun 771 bç’den oluşan 13üncü eksondur. İkinci intron dışındaki bütün intronların uzunluğu 300 bç’den kısadır. İkinci intron 11 kb uzunluğundadır. Ekson 1’in tamamı, ekson 2’nin

ilk 8 bç, ekson 13'ün ilk 88 bç ve 3' ucundan 608 bç proteine dönüştürülmez^{57, 58}. G6PD geninin promotörü, “housekeeping” genlerin promotörünün birçok karakteristik özelliklerini göstermektedir. Bunlar, çeşitli Sp1 bağlanma yöreleri, tanımlanamayan CAAT kutusu yanında, Martini ve arkadaşlarının numaralamasına göre -202’de atipik TATA (ATTAAAT) kutusudur⁵⁹. Genin -1.200 bç’den 1inci intronun içine kadar uzanan tüm bölge GC dizisinden çok zengindir ve HTF adaları (“Hpa II tiny fragments”) olarak tanımlanmıştır. Bu adaların transkripsiyonu düzenleyici dizilimler olduğu ve inaktif X kromozomundaki G6PD geninin sessizleşmesinin bu adaların tümünün metillenmesi sonucu olduğu düşünülmektedir^{3, 31, 60, 61}.

G6PD geninin nükleotit sayısı 20.114 bç’dir. Amino asitlere karşılık gelen nükleotit dizilerinin uzunluğu 1.545 bç olup, 515 amino asitlik bir polipeptit zincirini tanımlar^{58, 62, 63}. G6PD proteini sülfidril gruplarınca zengindir ve her alt birim 11 sülfidril grubu içerir^{64, 65}.



Şekil 2.4. G6PD enziminin kromozom üzerindeki konumu⁶



Şekil 2.5. G6PD geninin intron ve ekson bölgeleri²

G6PD'nin moleküler özellikleri çizelge 2.1'de belirtilmektedir^{4, 6}.

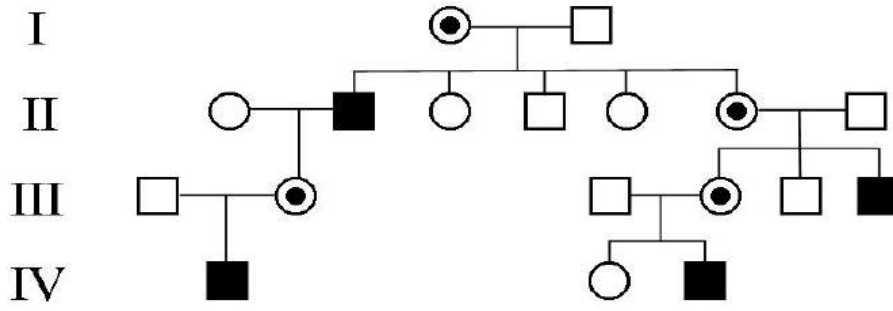
Çizelge 2.1. G6PD'nin moleküler özellikleri

DNA	
Gen uzunluğu (kb)	20,1
Ekson sayısı	13
Kodlanan eksonlar	12
mRNA	
Nükleotit sayısı (bç)	2.269
5' kodlanmayan bölge (bç)	69
Kodlanan bölge (bç)	1.545
3' kodlanmayan bölge (bç)	655
Protein	
Amino asit sayısı	515
Moleküler ağırlık (Da)	59.265
Aktif enzimin moleküllerinin alt birim sayısı	2 veya 4
Her alt birimdeki NADP'ye bağlanan molekül sayısı	1
Moleküler spesifik aktivite (Ü/g Hb)(Eritrositlerde)	7-13 ⁴ *8,3 ± 3,3

* WHO'ya göre

2.6. G6PD Enziminin Kalıtımı

G6PD enzimi X kromozomuna bağlı resesif geçiş göstermektedir. Dişi bireyler iki X kromozomu taşıdıklarından dolayı hastalığın ortaya çıkabilmesi için dişi bireylerin her iki mutant X kromozomunu da taşımaları gereklidir. Erkeklerde ise tek X kromozomu olduğundan resesif karakterli mutasyon fenotipik olarak kendini gösterebilmektedir. Bu nedenle X kromozomuna bağlı resesif hastalıklar genellikle erkeklerde görülür. Buna göre, G6PD enzim kalıtımı; erkeklerde hemizigot normal (Gd^+) veya hemizigot eksiklik (Gd^-), dişilerde ise homozigot normal (Gd^+/Gd^+), homozigot eksiklik (Gd^-/Gd^-) veya heterozigot eksiklik (Gd^+/Gd^-) biçiminde görülebilmektedir (Şekil 2.6)^{2, 31, 66}.



Şekil 2.6. G6PD Enziminin Kalıtım Şeması

X kromozomuna bağlı resesif kalıtımda kız çocuklarının hasta olabilmesi için, mutant geni hem anneden hem de babadan alması, bunun için de babanın hasta, annenin ise en azından taşıyıcı olması gereklidir. X kromozomuna bağlı resesif hastalığın kız çocuklarında görülmesini açıklayan diğer bir durum ise Lyon hipotezidir⁶⁷. Bu hipoteze göre;

- Dişi bireylerde bulunan iki X kromozomundan sadece biri aktif diğeri inaktiftir.
- Embriyonun erken gelişim aşamalarında iki X kromozomunun hangisinin aktif kalacağı rastgele tayin edilir.
- Aynı inaktif X kromozomu taşıyan her bir hücrenin çoğalmasında X kromozomu inaktif kalır.

Bu nedenle, G6PD geni bakımından kadınların iki ve erkeklerin bir kopya taşımalarına karşın, her iki cinstede G6PD enzim düzeyleri aynı bulunur. Babası normal enzim aktivitesi gösteren, hemizigot G6PD eksikliği olan bir erkek çocuğa sahip heterozigot dişiler, normal enzim aktivitesi gösterebilirler. Böyle bireylere zorunlu heterozigot adı verilir. G6PD eksikliği, hemizigot erkeklerde ve homozigot dişilerde ortaya çıkmaktadır^{2, 68}.

2.7. G6PD Eksikliği

G6PD enzim eksikliği en yaygın enzimopatilerden birisidir. G6PD enzim eksikliğinin sıklığı Akdeniz ülkelerinde, Afrika'da ve Çin'de daha yüksek olmakla birlikte bütün ırklarda ve etnik gruplarda tanımlanmıştır^{20, 69}. Bu eksikliğin tanımlanması için, enzim aktivitesinin kantitatif ölçümde referans aralığından (7-13 Ü/g Hb) düşük olması gerekmektedir⁴.

Enzim eksikliği; eritrositler, karaciğer ve lökositler gibi çeşitli dokularda görülebilmektedir. Karaciğerde enzim eksikliği daha çok yenidoğan sarılığına yol açmaktadır. Eritrositlerde enzim eksikliği çeşitli seviyelerde hemolitik tablolara yol açmaktadır. Epidemiyolojik ve *in vitro* çalışmalar, G6PD enzim eksikliğinin "*Plasmodium falciparum*" enfeksiyona karşı korunmada bir avantaj olduğunu göstermiştir^{66, 70, 71}. G6PD eksikliğinin olduğu eritrositlerdeki malaraya parazitinin gelişiminin normal eritrositlerden daha yavaş olduğu görülmüştür^{20, 72}. Bu enzim eksikliğinin en önemli belirtileri neonetal sarılık, favizm ve hemolitik anemi olduğu ve enzimin şiddetli eksikliğinde kronik nonsferositik hemolitik anemi görüldüğü bildirilmiştir^{16, 73}. G6PD eksikliğe sahip hastalarda bazı ilaçlar, yiyecekler ve enfeksiyon ile hücre için tehlikeli olan serbest radikallerin aşırı üretimi hemolitik krize neden olmaktadır^{46, 74, 75}.

2.8. G6PD Varyantları

Yapılan araştırmalarda yaklaşık 500 milyondan fazla kişinin G6PD enzim eksikliği taşıdığı saptanmıştır^{1, 26, 76, 77}. Dahası böyle bir yaygınlığa sahip olan G6PD'nin değişik kinetik özellikler gösteren 400'ün üzerinde varyantı olduğu bilinmektedir. Moleküler düzeyde çok farklı olmayan bu varyantların biyokimyasal özelliklerinin birbirinden farklı olduğu gözlenmiştir. Varyantların çoğu, dengeli bir polimorfizm göstermesi sebebiyle herhangi bir oksidan ajanla karşılaşp akut hemoliz atağı gösterinceye kadar asemptomatik olarak kalırlar^{78, 79}.

1967 yılında toplanan Dünya Sağlık Örgütü-Glukoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Eksikliği Çalışma Grubu (WHO-G6PD) eritrosit G6PD enzim aktivitesini, elektroforetik analiz ve inhibitörlere yanıt gibi değişkenlerin varyantlarını tanımlamada kullanılmasına karar vermiştir. WHO'nun amacı; değişik laboratuvarlarda tanımlanan çok sayıda

varyantın birbirleriyle karşılaştırma zorluğunu ortadan kaldırmak ve yeni varyant standartlarını oluşturmaktır⁸⁰.

WHO G6PD Çalışma Grubu, G6PD enzim eksikliklerini hemoliz düzeyine göre 5 sınıfa ayırmıştır⁸⁰.

Sınıf I: G6PD aktivitesi normalin % 10 kadar altında ve kronik hemolitik anemiye neden olan varyantlar,

Sınıf II: Enzim aktivitesi % 10'un altında olan, şiddetli enzim eksikliği gösteren, fakat hemolitik anemi görülmeyen varyantlar,

Sınıf III: Enzim aktivitesi % 10 – 60 arası olan, ilaçlarla ve enfeksiyonla birlikte ılımlı hemoliz görülen varyantlar,

Sınıf IV: Enzim aktivitesi % 60 – 100 arası olan, bir enzim eksikliği göstermeyen veya çok hafif gösteren varyantlar,

Sınıf V: Enzim aktivitesi yüksek olan varyantlar.

Sınıf IV ve V varyantları biyologların, genetikçilerin ve antropologların ilgisini çekmiştir. Çünkü, hem 400'den fazla varyantı bulunan, hem de bu kadar fazla çeşitliliği olan G6PD eksikliğinin bu sınıfına giren varyantlarının çoğunda, klinik bozukluk veya hemolitik anemi görülmez.

En yaygın görülen G6PD varyantlarının kinetik özellikleri çizelge 2.2'de verilmiştir⁸¹⁻⁸³.

Çizelge 2.2. Yaygın Görülen G6PD Varyantları

Kinetik özellikler	Gd B ⁺	Gd A ⁺	Gd A ⁻	Gd Akdeniz
% Eritrosit Aktivitesi	100	90±10	14±6	<10
Elektroforetik Göç	100	110	110	100
K_{mNADP} (μM)	2,9-4,4	2,9-4,4	2,9-4,4	1,4±0,2
K_{mG6P} (μM)	60±10	60±10	60±10	22,5±3,5
Analog Kullanımı				
2dG6P	<4	<4	<4	25±2
Gal6P	7-15	–	–	20
dNADP	55-60	55	55	350
Sıcaklık kararlılığı	Normal	Normal	Normal	Düşük
K_{iNADP}	9	6,7	13	16
Optimum pH	Normal	Normal	Normal	Bifazik

G6PD B⁺: Enzimin doğal formudur ve diğer diğer varyantların belirlenmesinde kullanılır. G6PD B⁺’ye çoğunlukla Beyaz Irkta, Asyalılarda, ve Zencilerde rastlanmaktadır. Aktivitesi normal olup hemoliz görülmez^{84, 85}.

G6PD A⁺: Normal enzim aktivitesi gösterir ve G6PD B⁺’ye göre elektroforetik olarak daha hızlı göç eder. Bu varyantın oluşumunda 376ncı nükleotitteki A→G değişimi sonucu Aspartik asitin Asparajine dönüşümü neden olmaktadır^{54, 86, 87}.

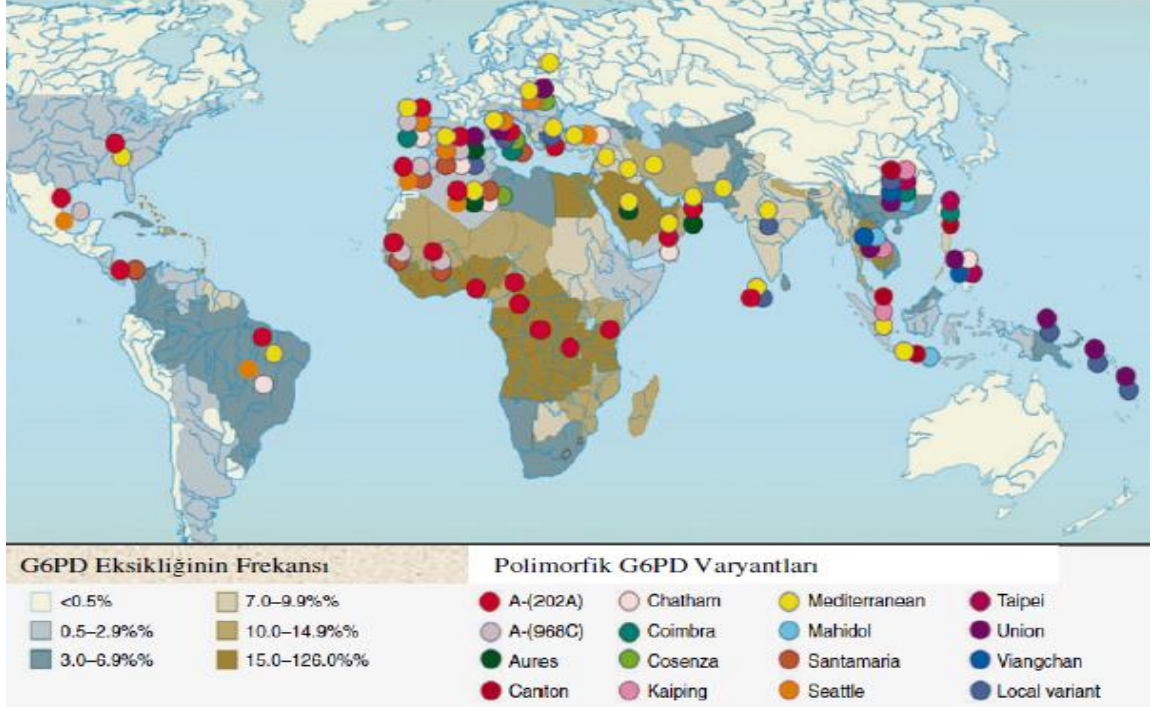
G6PD A⁻: G6PD’nin en çok görülen varyantıdır. Afrikalı zencilerde % 20-30 oranında görülür. Normal katalitik özelliklere sahiptir, hemolize neden olmaz. G6PD B⁺’den en önemli farkı elektroforetik olarak hızlı göç etmesidir. G6PD A⁺’dan ise yapısal olarak farklıdır. G6PD A⁺’nın 126ncı amino asiti asparajin yerine aspartat geçmiştir. Bu tip varyant zencilerde primakine karşı hassasiyet oluşturmuştur. İlimli hemoliz görülür. Afrika asıllı Amerikalılarda % 10-15 oranında görülür. Bu oran Orta ve Batı Afrika’da da aynıdır. Ayrıca İtalya, İspanya gibi Güney Avrupa, Güney Doğu Asya, Orta Doğu, ve Güney Amerika kökenli beyazlarda da görülmektedir. G6PD A⁻ varyantı taşıyan kişilerin kemik iliği hücreleri ve retikülositleri normal kişilere yakın olduğu halde yaşlı eritrosit sayıları azalmıştır. Hem enzim hem de aktivitesi sabit değildir^{65, 88-90}.

G6PD Akdeniz: G6PD Akdeniz varyantı 536ncı nükleotitteki C→T değişimi sonucu, Serinin Fenilalanin’e dönüşmesiyle meydana gelir. Beyaz Irkta ve Akdeniz kökenli insanlarda en çok rastlanan varyanttır. Enzim aktivitesi oldukça azalmıştır ve şiddetli hemolize neden olur. Elektroforetik hareketi normaldir. Kinetik özellikleri ise G6PD B⁺, A⁻ ve A⁺’dan oldukça farklıdır^{62, 89, 91}.

Bazı kişilerde tek bir B⁺ bandı, diğer bir grupta tek bir A⁺ bandı varken, bir kısmında da A⁺ ve B⁺ bandları birarada bulunmaktadır. 400’den fazla varyantı bulunan ve bu kadar çok olan çeşitliliğin, mutasyon nedeniyle ortaya çıkan G6PD eksikliğinin çoğunda, klinik bozukluk veya hemolitik anemi görülmez. En sık görülen varyant G6PD B⁺ tipidir ve “Wild-type” (doğal tip) allel olarak kabul edilir^{2, 70}.

Ayrıca G6PD A⁻’nın ilaca bağlı hemolitik anemiyle de yakın ilişkisi vardır. G6PD A⁺ ve A⁻ varyantları sıtma hastalığının yaygın olarak görüldüğü Afrika’ya has olarak tanımlanmasına rağmen, İtalya, İspanya, Güneydoğu Asya, Orta Doğu ve Güney Amerika kökenli beyazlarda da görülmektedir. Ayrıca enzim aktivitesi çok düşük olan Mahidol ve Union varyantları Güneydoğu Asya’da en yaygın varyantlardandır. Chicago varyantında ise ömür boyu oldukça şiddetli hemolitik anemi görülmektedir^{32, 66, 92, 93}.

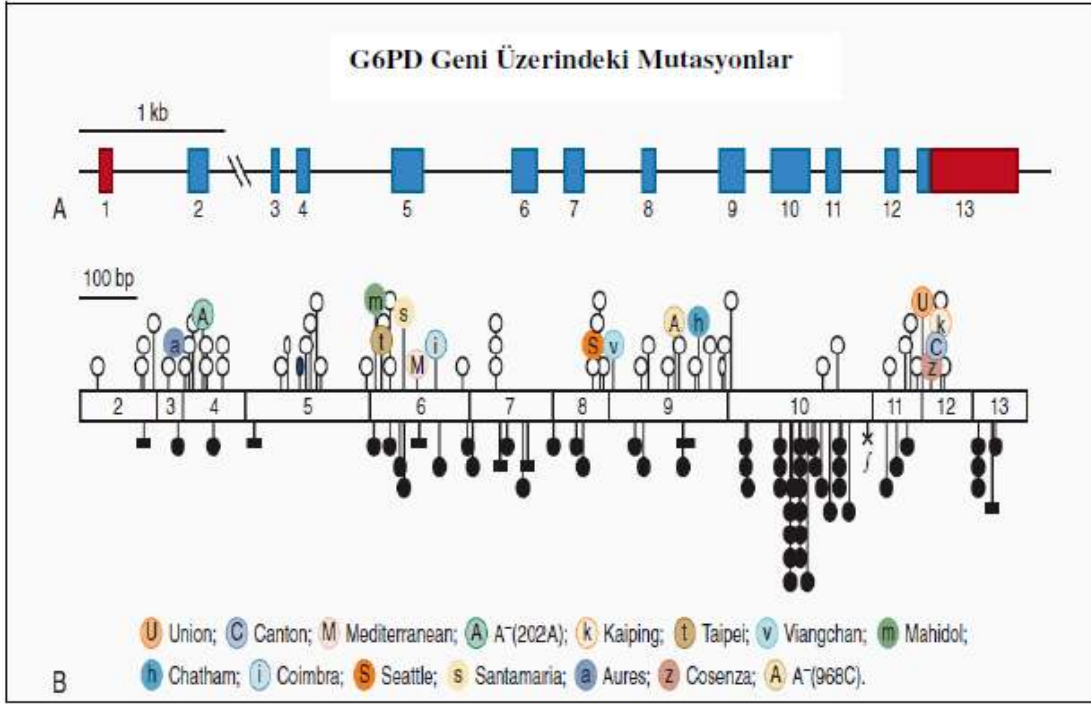
Sık görülen G6PD varyantlarının dünyadaki dağılımı şekil 2.7’de gösterilmiştir⁷⁷.



Şekil 2.7. G6PD Varyantlarının Dünyadaki Dağılımı

DNA düzeyinde meydana gelen çeşitli nokta mutasyonlar genelde G6PD enziminin substrat bağlanma bölgesinde yer alan amino asitleri etkilemekte ve enzimin aktivite göstermesi için protein katlanmalarına ve dimerizasyonuna engel olmaktadır⁹⁴. Afrika’da görülen G6PD A⁺ varyantında en çok 202A, 376G bölgesinde mutasyonlar görülmektedir. G6PD Akdeniz tipindeyse 563T, Güney Avrupa, Orta Doğu ve Hindistan’da da 563T bölgesinde mutasyonlar görülmektedir⁹⁵.

İnsan G6PD geni üzerindeki çeşitli intron ve ekson bölgelerinde nokta mutasyonlar meydana gelmektedir. Mutasyonların gerçekleştiği bölgeler ve yaygın görülen mutasyonlar şekil 2.8’de gösterilmiştir⁵⁹.



Şekil 2.8. G6PD Geninde Mutasyonların Gerçekleştiği Bölgeler ve Yaygın Görülen Mutasyonlar

G6PD enzim eksikliğinin dünyada yaygın varyant ve mutasyonlarının dağılımı, WHO'nun sınıflaması ve yaygın olan bölgeler çizelge 2.3'de verilmiştir. Bir takım mutasyonlar bulundukları yerlerde farklı isimlerle adlandırılmışlardır ve alt alta yazılmış isimler aynı mutasyonun değişik bölgelerindeki farklı isimlendirmelerinden oluşmaktadır^{95, 96}.

Çizelge 2.3. G6PD enzim eksikliğinin dünyada yaygın varyant ve mutasyonlarının dağılımı^{67, 95}.

Variyat ismi	Exon	Nükleotit	Amino asit	WHO	Yaygın yerler
Gaohe Gaozhou	Ex2	95 A>G	32 His>Arg	2	Çin
Sunderland	Ex2	105-107 del	35 Ile del	1	İngiltere
Aures	Ex3	143 T>C	48 Ile>Thr	2	Cezayir, Arabistan, İspanya
Asahi Castilla Alabama Ferrara	Ex4	202 G >A	68 Val>Met	3	Afrika, İtalya, İspanya, Kanarya Adaları, Meksika
Ube Konan	Ex4	241 C>T	81 Arj>Cys	3	Japonya
A	Ex5	376 A>G	126 Asn>Asp	4	Afrika, İspanya, Kanarya Adaları
Mahidol	Ex6	487 G>A	163 Gly>Ser	3	G.Asya, Çin, Tayvan
Chinese-3 Taipei	Ex6	493 A>G	165 Asn>Asp	2	Filipinler
Santamaria	Ex6	542 A>T	181 Asp>Val	2	Kosta Rika, İtalya, Kanarya Adaları
Mediterranean Dallas Birmingham Sassari Caglari Panama	Ex6	563 C>T	188 Ser>Phe	2	İtalya, Yunanistan, Arabistan, İran, Türkiye, Irak, İsraill, Mısır, Yahudiler, Yahudi Kürtleri
Seattle Modena Ferrarall Athenslike Mexico	Ex8	844 G>C	282 Asp>His	2	İtalya, İspanya, Sardinya, Kanarya Adanaları
Viangchan	Ex9	871 G>A	291 Val>Met	2	Hindistan, Çin, Filipinler, Laos
Kalyan	Ex9	949 G>A	317 Glu>Lys	3	Hindistan
S.Antioco	Ex11	1342 A>G	448 Ser>Gly	?	Sardinya
Union Maewo Chinese-2	Ex11	1360 C>T	454 Arg>Cys	2	Laos, Filifinler, Çin, Japonya, İspanya, İtalya
Canton	Ex12	1376 G>T	459 Arg>Leu	?	Çin, Taywan
Kaiping	Ex12	1388 G>A	463 Arg>His	2	Laos

2.8.1. Türkiye’de Saptanan G6PD Varyantları

G6PD enzim eksikliği dünya genelinde yaygın olduğu için en çok çalışılan kalıtsal hastalıklardan birisidir. Türkiye’de G6PD üzerine ilk çalışmalar 1949 yılında Demirağ, 1951 yılında Fakacelli ve Konstantinidu tarafından yapılmış ve favizm olguları olarak bildirilmiştir. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği ile ilgili tarama çalışmalarında Türkiye genelinde enzim eksikliği % 0,5 ve Eti Türklerinde ise % 8,2 olarak saptanmıştır. Sipahioğlu Ege bölgesinde enzim eksikliğin % 2 - 9 oranında olduğunu rapor etmiştir. Çukurova’da 1979 yılında sıtmanın yaygınlaşmasıyla 30.000 dolayında sıtma olgusu görülmesi sonucu, hastalığa karşı koruyucu bir ilaç olan primakinin kullanımıyla ortaya çıkan hemolitik anemili bireyler, dikkati G6PD enzimi üzerine çekmiştir. Bölgede yapılan kalitatif tarama çalışmalarında G6PD enzim eksikliğin yaygın olduğu gözlenmiştir. Bugüne kadar değişik araştırma gruplarının yaptığı tarama çalışmalarında enzim eksikliğin frekansı farklı olarak rapor edilmiştir. Yüreğir ve arkadaşlarının sayıca büyük bir grup üzerinde yaptığı çalışmada ise G6PD eksikliğin % 8,2 olduğunu bildirilmiştir. Tufanbeyli’de % 3,7 ve Ceyhan’da % 1,2 gibi düşük bir oranda olan enzim eksikliğin, Tarsus ve Antakya’da % 17’ye vardığı saptanmıştır. Akoğlu ve arkadaşları tarafından yürütülen çalışmalarda da benzer sonuçlar alınmıştır^{4, 97}.

Aksoy ve arkadaşları 1987’de Çukurova bölgesinde yaptıkları kinetik çalışmada Gd Adana, Gd Samandağ ve Gd Balcalı varyantlarını tarif etmişlerdir. Daha sonra Gd Adana varyantının Gd Akdeniz ve 1311 polimorfik yöre mutasyonu taşıdığını göstermişlerdir⁹⁸. Aynı çalışma grubu birisi ısıya dayanıklı üç yeni varyant daha tanımlamıştır⁴. Türkiye’de ve Türk ailelerinde saptanan varyantlar çizelge 2.4’te gösterilmiştir^{98, 100}.

Çizelge 2.4. Türkiye’de bulunmuş olan G6PD varyantları.

Varyant	Yıl	Yazar
G6PD B ⁺	1967	Berkal
G6PD B ⁻	1973	Altay
G6PD Ankara	1975	Kohn
G6PD Tarsus	1976	Gahr
G6PD Antalya	1979	Sipahioğlu
G6PD Mersin	1981	Akoğlu
G6PD Samandağ	1987	Aksoy
G6PD Balcalı	1987	Aksoy
G6PD Adana	1987	Aksoy
G6PD Antakya	1988	Aksoy
Isıya dayanıklı G6PD	1988	Aksoy
G6PD Hacettepe	1989	Kuş
G6PD Korkuteli	1989	Alıcıgüzel
G6PD Aksu	1989	Alıcıgüzel
G6PD Serik	1989	Yücel
G6PD Çorum	1989	Kuş
Gal6P kullanımı yüksek	1989	Dikmen
G6PD Siirt	1992	Dikmen

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Cihazlar

1. Kan Sayım Cihazı	Sysmex KX-21N
2. Santifüj	Eppendorf mini- <i>Spin</i> (plus)
3. pH Metre	WTW pH 525
4. Normal Terazi	METTLER P1210
5. Hassas Terazi	METTLER AJ100
6. Spektrofotometre	Shimadzu UV-260 ve EPOCH BioTek
7. DNA İzolasyon Cihazı	ROCHE MAGNA PURE LCPG 0747
8. Güç Kaynağı	BIO-RAD POWER PAC 300
9. Elektroforez Tankı	BIO-RAD SUB-CELL GT
10. Otomatik Pipetler	Gilson Pipetman
11. “Thermal Cycler”	AIB Applied Biosystems
12. “ Real Time Thermal Cycler”	Light Cycler 480 Roche
13. Etüv	Memert
14. Buz Makinesi	Scotsman AF-10
15. Derin Dondurucu	Bosch GSD30N12
16. Mikrodalga Fırın	Arçelik MD55I
17. Fotoğraf makinesi	Nikon 5100
18. UV Kaynağı	U2 LAMP
19. Yazıcı	HP Lazerjet 1080

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Malzemeler

1. DE-52 reçine	Whatman
2. Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Sigma
3. Nikotinamid adenin dinükleotid (NAD)	Sigma
4. Beta-Nikotinamid dinükleotid Fosfat (β -NADP)	Sigma
5. D-Glukoz-6-fosfat (G6P)	Sigma
6. deamino NADP (dNADP)	Sigma
7. D-Galaktoz-6-fosfat (Gal6P)	Sigma
8. 2-deoksi-glukoz-6-fosfat (2dG6P)	Sigma
9. Dijitonin	Sigma
10. 2-merkaptoetanol	Sigma
11. $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
12. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
13. $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Merck
14. Tris-HCl	Sigma
15. Tris-Baz	Sigma
16. NaCl	Merck
17. KCl	Merck
18. Ethidium Bromür	Sigma
19. <i>Taq</i> Polimeraz	Sigma
20. Primer	
21. <i>MboII</i> Enzimi	Thermo SCIENTIFIC
22. Agaroz	Sigma
23. G6PD Gen Ekspresyon Kiti	Roche

3.2. Örnek Toplama ve Deney Akışı

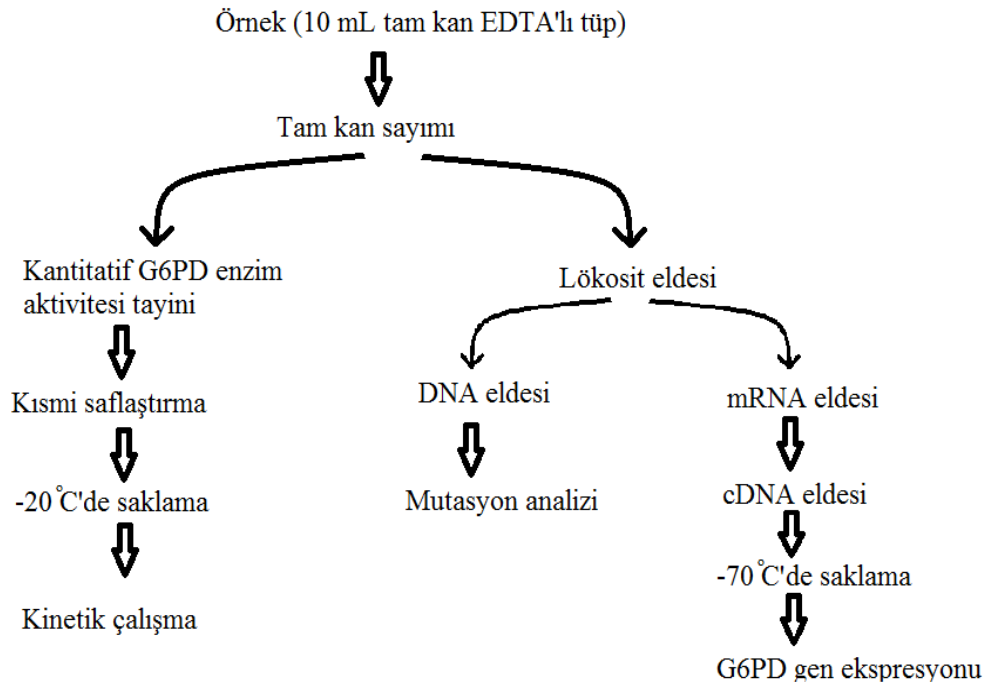
Kan örnekleri, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalından alındı. EDTA'lı tüplere alınan 10 mL kanlar, soğuk zincir kurallarına uyularak laboratuvara getirildi ve örnekler bekletilmeden kantitatif G6PD tayini yapıldı.

Değişik enzim aktivitesine sahip örnekler DE-52 iyon değiştirici kolondan kısmi olarak saflaştırıldı. Saflaştırılan enzimler, kinetik çalışma için -20°C 'de saklandı.

Örneklerin DNA'ları izole edilip moleküler düzeyde çalışılmak üzere buzdolabında bekletildi.

Gen ekspresyonu analizi için kanlardan yarım saat içinde lökositler ayrıldı. Hemen ardından gen ekspresyonu için mRNA'lar izole edilerek cDNA eldesine kadar -70°C 'de muhafaza edildi.

Enzimatik ve moleküler çalışmalarda izlenen deneysel basamakları şema göstermektedir. (Şekil 3.1)



Şekil 3.1. Çalışma Akış Şeması

3.3. Yöntemler

3.3.1. Hematolojik Analiz

3.3.1.1. Prensip

Ölçüm yapılacak otomatik kan sayım cihazına süspanse halde verilen parçacıklar, iletken sıvı bir ortamda bulunan iki elektrot arasında daralıp genişleyebilen lobül yardımıyla büyüklük ve yoğunluklarına göre genişletmeleri sonucu bir potansiyel enerji farkı oluşturmaktadırlar. Bu enerji farkının sonucu oluşan atomların büyüklüğü ve sayısı ile hücrelerin sayısı, tipi ve büyüklüğü arasında doğru orantı vardır. Bu prensibe göre sistemdeki parçacıkların tanınması ile oluşan değerlerin ya aynen ya da bir takım hesaplamaların otomatik olarak yapılmasından sonra istenen hematolojik değerler elde edilmektedir⁴.

3.3.1.2. Ayırıcılar

Deterjan (Cellclean)

Dilüyant (Cellpack)

“WBC/HGB lyse” ayırıcı (STROMATOLYSER)

3.3.1.3. Yöntem

EDTA'lı tüplere alınan 10 mL kanın hematolojik verileri Sysmex KX-21N otomatik kan sayım cihazı kullanılarak belirlenmiştir.

3.3.2. Kinetik Çalışma

3.3.2.1. G6PD Enzim Aktivitesinin Kantitatif Ölçümü

3.3.2.1.1. Prensip

Enzim aktivitesi tayininde Beutler yöntemi kullanılmıştır. Yöntem, G6P'nin G6PD enzimi varlığında 6-fosfoglukolaktone dönüşümü sırasında indirgen NADP⁺'nin 340 nanometre (nm)'deki absorbans artışının 5 dakika (dk) boyunca ölçümü temeline dayanmaktadır. Tepkime 37 °C'de, 1 cm ışık yoluna sahip kuvarz küvette

gerçekleşmektedir. Absorbans artışının 5 dk boyunca doğrusal olduğu zaman aralığındaki Optik Dansite (OD) değerleri dikkate alınarak hesaplama yapılır¹⁰¹.

3.3.2.1.2. Ayıraçlar

1. Sodyum Fosfat Tamponu	50 mM, pH 7,0 (Stok çözelti)
2. Sodyum Fosfat Tamponu	5 mM pH 7,0
Sodyum Fosfat Tamponu (Stok çözelti)	100 mL
Na-EDTA	0,372 g
β -NADP	0,0157 g
2-merkaptoetanol	0,07 mL
Son hacim 1 litre ve pH 7,0 olacak şekilde saf suda çözünür.	
3. Dijitonin	% 0,02
4. MgCl ₂	0,1 M
5. Tris Tamponu	1 M, pH 8,0
6. D-G6P	6 mM
7. β -NADP	2 mM

3.3.2.1.3. Yöntem

3.3.2.1.3.1. Hemolizat Hazırlanması

Santrifüj tüplerine, Na-EDTA'lı tüpten alınan 1 mL kan 3.000 devirde (rpm) 10 dk santrifüj edilerek plazması atılır. Eritrosit pelleti üzerine 1/5 oranında serum fizyolojik (SF) eklenir, yavaşça altüst edilir ve tekrar santrifüj edilip üst faz atılır. Bu işlem 3 defa tekrarlandıktan sonra hemolizat aşağıdaki gibi hazırlanır¹¹².

Eritrosit pelleti	50 μ L
Sodyum fosfat tamponu (5 mM, pH 7,0)	100 μ L
Dijitonin (% 0,02)	650 μ L

Taze hemolizattan G6PD aktivitesi tayin edilip; aktiviteyi hesaplamak için hemolizatın hemoglobin miktarı Sysmex KX-21N kan sayım cihazı ile ölçülür.

G6PD enzim aktivitesinin kantitatif tayini için gerekli olan çözeltiler ve derişimleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. G6PD enzim aktivitesinin kantitatif tayini için gerekli olan çözeltiler ve derişimleri

Ayır��lar	�rnek (mL)	K�r (mL)
Saf su	1,95	3,0
0,1 M MgCl ₂	0,3	–
1 M Tris Tamponu	0,3	–
6 mM D-G6P	0,3	–
2 mM �-NADP	0,3	–
Hemolizat	0,15	–
Toplam hacim	3,0	3,0

Hazırlanan  rnek tüpündeki tepkime, 1 cm ışık yollu kuvars küvetlerde, 37  C’de, spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda, 5 dk boyunca takip edilir. K r olarak saf su kullanılır. Oluşan NADPH’nin yarattığı OD farkından yola çıkarak her bir örnekte G6PD aktivitesi saptanır.

$$\text{Enzim Aktivitesi ( /mL)} = \frac{\Delta\text{OD}}{\text{Zaman (dk)}} \times \frac{\text{Toplam Hacim}}{\text{Hemolizat/Elüsyon Hacmi}} \times \frac{1}{6,22^*}$$

Yukarıdaki formülden hesaplanan G6PD enzim aktivitesi  /g Hb olarak bulunur.

* 1  M NADP; 1 cm ışık yoluna sahip küvette, 340 nm dalga boyu  l  m nde 6,22 OD değeri vermektedir.

3.3.3. G6PD Enziminin Kısım  Olarak Saflaştırılması

3.3.3.1. Prensip

 yon değiştirici reçine ile saflaştırma işlemi, iyonik yüklerin işaret ve büyüklükleri farkına dayanır. G6PD enziminin kısm  saflaştırılmasında kullanılan anyon değiştirici, dietilaminoetil (DEAE)’in işlevsel grubu CH₂CH₂NH(C₂H₅)₂ olup zayıf iyon değiştiricidir.^{102, 103}

3.3.3.2. Ayır  lar

1. Sodyum Fosfat Tamponu 50 mM pH 7,0 (Stok   zelti)
2. Sodyum Fosfat Tamponu 5 mM pH 7,0

Sodyum Fosfat Tamponu (Stok çözelti)	100 mL
Na-EDTA	0,372 g
β -NADP	0,0157 g
2-merkaptoetanol	0,07 mL
Son hacim 1 litre ve pH 7,0 olacak şekilde saf suda çözünür.	
3. NaCl	% 0,9
4. Dijitonin	% 0,02
5. Sodyum Fosfat + KCl Tamponu pH 7,0	
Sodyum Fosfat	5 mM pH 7,0
KCl	0,25 M

3.3.3.3. Yöntem

3.3.3.3.1. Anyon Değiştirici Reçinenin (DE-52) Hazırlanması

5 mM sodyum fosfat tamponunda bir gece şişirilen 25 g DE-52 anyon değiştirici reçine pH'si 7,0 olana kadar tamponla yıkanır.

3.3.3.3.2. Hemolizatın Reçineden Sökülmesi

Hazırlanan hemolizat ile anyon değiştirici reçine 1:3 oranında karıştırılarak +4 °C'de, bir gece boyunca düşük devirli çalkalayıcı ile karıştırılır.

3.3.3.3.3. Bağlanmayan Proteinlerin Reçineden Sökülmesi

Hemolizat ve anyon değiştirici reçine karışımına ait üst faz her defasında protein aktivitesi ölçülerek (280 nm'deki OD'si okunarak) süpernatant uzaklaştırılır. Protein aktivitesi sıfır olana kadar 5 mM sodyum fosfat tamponu ile devam edilir.

3.3.3.3.4. Bağlanan Proteinlerin Reçineden Sökülmesi

Hemolizat ve anyon değiştirici reçine karışımı, ucuna cam pamuğu yerleştirilmiş kolona aktarılır. Kolon 0,25 M KCl içeren 5 mM sodyum fosfat tamponuyla yıkanır. Elüsyonlar toplanarak protein derişimleri ölçülür. Protein derişimi yüksek olan elüsyonların G6PD aktiviteleri ölçülür. En yüksek aktiviteye sahip elüsyonun G6PD kinetiği çalışılır.

3.3.4. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enziminin Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi

3.3.4.1. Prensip

Glukoz-6-fosfatın, 6-fosfoglukonata dönüşümü sırasında oluşan NADPH miktarı, tepkimeyi katalizleyen G6PD aktivitesi ile doğru orantılıdır. Enzim aktivite ölçümü, *in vitro* koşullarda gerçekleştirilen tepkime sırasında oluşan NADPH'nin 340 nm dalga boyundaki OD farkının hesaplanması esasına dayanır^{95, 104}.

3.3.4.2. Ayıraçlar

1. MgCl ₂	0,1 M
2. Tris Tamponu	1 M, pH 8,0
3. β-NADP	2 mM
4. β-NADP	400 μM
5. D-G6P	6 mM
6. D-G6P	2 mM
7. deamino-NADP	2 mM
8. D-Gal6P	6 mM
9. NAD	2 mM

3.3.4.3. Yöntem

3.3.4.3.1. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enzimine Ait K_{mNADP} Değerinin Hesaplanması

G6PD enzimine ait K_{mNADP} değerinin hesaplanması için gerekli olan çözeltiler ve derişimleri Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. G6PD enzimine ait $K_{m\text{NADP}}$ değerinin hesaplanması için gerekli olan çözeltiler ve derişimleri

Ayrıraçlar (mL)	1	2	3	4	5	6	7	8
Saf su	1,75	1,80	1,85	1,90	1,95	1,975	2,0	2,025
0,1 M MgCl ₂	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
1 M Tris Tamponu	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
6 mM D-G6P	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
400 µM NADP	0,3	0,25	0,2	0,15	0,10	0,075	0,050	0,025
Elüsyon*	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05

* Elüsyon, kısmi saflaştırılan G6PD enzimidir.

Hazırlanan örnek tüpündeki tepkime, 1 cm ışık yollu kuvars küvetlerde, 37 °C’de, spektrofotometrede 340 nm dalga boyunda, 5 dk boyunca takip edilir. Kör olarak saf su kullanılır. Oluşan NADPH’nin yarattığı OD farkından yola çıkarak her bir örnekte G6PD aktivitesi saptanır. Hesaplanan enzim aktiviteleri arasındaki fark, her tüpün farklı NADP⁺ derişimine sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Lineweaver-Burke grafiğine dönüştürülen bu değerlerle $K_{m\text{NADP}}$ değeri saptanır.

3.3.4.3.2. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enzimine Ait $K_{m\text{G6P}}$ Değerinin Hesaplanması

G6PD enzimine ait $K_{m\text{G6P}}$ değerinin hesaplanması için gerekli olan çözeltiler ve derişimleri çizelge 3.3’te verilmiştir.

Çizelge 3.3. G6PD enzimine ait $K_{m\text{G6P}}$ değerinin hesaplanması için gerekli olan çözeltiler ve derişimleri

Ayrıraçlar	1	2	3	4	5	6	7	8
Saf su	1,75	1,80	1,85	1,90	1,95	1,975	2,0	2,025
0,1 M MgCl ₂	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
1 M Tris Tamponu	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
2 mM β-NADP	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
2 mM D-G6P	0,3	0,15	0,12	0,09	0,075	0,060	0,050	0,045
Elüsyon*	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050	0,050

* Elüsyon, kısmi saflaştırılan G6PD enzimidir.

Hazırlanan örnek tüpüne K_{mNADP} ölçüm yönteminin aynısı uygulanır.

3.3.4.3.3. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enziminin Analog Çalışması

G6PD enziminin analog çalışması için gerekli olan çözeltiler ve derişimleri çizelge 3.4'te gösterildiğı biçimde hazırlamıştır.

Çizelge 3.4. G6PD enziminin analog çalışması için gerekli olan çözeltiler ve derişimleri.

Ayıracılar (mL)	1	2	3	4
0,1M MgCl ₂	0,3	0,3	0,3	0,3
1M Tris Tamponu	0,3	0,3	0,3	0,3
2mM β-NADP	–	–	0,3	0,3
6mM D-G6P	0,3	0,3	–	–
2mM d-NADP	0,3	–	–	–
2mM NAD	–	0,3	–	–
6mM D-Gal-6-P	–	–	0,3	–
6mM 2-d-G6P	–	–	–	0,3
Elüsyon*	0,050	0,050	0,050	0,050

* Elüsyon, kısmi saflaştırılan G6PD enzimidir.

Hazırlanan örnek tüpüne K_{mNADP} ölçüm yönteminin aynısı uygulanır.

3.3.4.3.4. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enziminin Sıcaklık Kararlılığının İncelenmesi

Sıcaklık kararlılığı çalışılacak olan elüsyon, 46 °C'ye ayarlanmış su banyosunda bekletilir. Sıfırncı, 10uncu, 20nci ve 60ıncı dk'lerdeki elüsyonların G6PD aktivitesi saptanır. Sıfırncı dk'de enzim aktivitesi % 100 kabul edilir ve diğerk dk'lerdeki yüzde değışim, elüsyonun sıcaklık kararlılığını belirler.

3.3.4.3.5. Kısmi Saflaştırılan G6PD Enziminin Optimum pH'sinin Belirlenmesi

Optimum pH'si çalışılacak olan elüsyonun pH 7,5'deki enzim aktivitesi % 100 olarak kabul edilir. pH 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'daki aktiviteler % olarak hesaplanır.

3.3.5. Moleküler Çalışma

3.3.5.1. DNA Eldesi

3.3.5.1.1. Prensip

DNA'lar MagNA Pure LC otomatik DNA izolasyon cihazında izole edilmiştir. Örnekler, kaotropik tuz ve Proteinaz K içeren özel bir tampon ile inkübe edilip, parçalanmaktadır. Ortama manyetik cam parçacıklar eklenir ve örnekte bulunan total nükleik asitler, bu parçacıkların yüzeyine bağlanırlar. Bağlanmayan kısımlar çeşitli yıkama basamakları ile ortamdan uzaklaştırılırlar ve saflaştırılan nükleik asitler düşük derişimli tuz tamponu ile ayrıştırılır. Sistem, MagNA Pure LC Cihazı ve bilgisayar kısımları içermektedir^{105, 106}.

3.3.5.1.2. Ayıraçlar

1. Proteinaz K
2. Parçalayıcı Tampon
3. Manyetik cam parçacıklar
4. İzopropanol
5. Yıkama Çözeltileri
6. Elüsyon Tamponu

3.3.5.1.3. Yöntem

MagNA Pure LC DNA izolasyonu yöntemi aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

1. DNA izole edilecek örnekten 500 µL örnek kartuşuna yerleştirilir.
2. Lizis/bağlanma tamponu ilavesiyle hücreler parçalanarak DNA açığa çıkar, proteinler denatüre olur.
3. Örnekler Proteinaz K ilavesiyle hücresel proteinlerin parçalanması gerçekleşir.

4. Yüksek iyonik güçteki lizis/bağlanma tamponu, çeşitli tuz derişimleri ve izopropanol varlığında DNA, eklenen manyetik parçacıkların silika yüzeylerine bağlanır.
5. Manyetik parçacıklara bağlanan DNA manyetik olarak lize uğramış diğer kısımdan ayrılır.
6. Manyetik parçacığa bağlanmış DNA yıkama tamponlarıyla tekrar tekrar yıkanarak protein (nükleazlar), hücre membranları, heparin veya hemoglobin gibi PCR inhibitörlerinden uzaklaştırılır. Böylece tuz derişimi düşer.
7. DNA ile bağlı manyetik parçacıklar yıkama tamponundan manyetik olarak uzaklaştırılırlar.
8. Saflaştırılan DNA elüsyon kartuşunda 70°C’de 100 µL elde edilir.
9. Elde edilen DNA’ların derişimi EPOCH spektrofotometre ile ölçüldü.

3.3.5.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

3.3.5.2.1. Prensip

PCR, genel anlamda *in vitro* şartlarda DNA çoğaltma yöntemidir. PCR ile lökositlerden, değişik doku ve organizmalardan elde edilen DNA’nın kopyalanması sonucu *in vitro* olarak nükleik asitler çoğaltılır. Bu yöntemde istenilen DNA parçasının kopyalanarak çoğaltma işlemi, bu DNA parçasına komplementer 20 - 30 baz uzunluğunda sentetik olarak sentezlenmiş iki öncü DNA yani primer yardımı ile olmaktadır. Birinci aşamada, çoğalacak dizilimi içeren DNA parçasının zincirleri yüksek ısı ile birbirinden ayrılmaktadır (denatürasyon). Daha sonra ısının düşürülmesi ile de primerler kendine komplementer DNA parçasına yapışmaktadır (annealing). İkinci olarak, komplementer DNA parçasına yapışan primerlerin 3’ OH’sine, ortamda bulunan deosiknükleozit trifosfatlar (dNTP), ısıya dayanıklı bir bakteri türünden (*Thermus aquaticus*) elde edilen DNA polimeraz enzimi yardımıyla 3’–5’ fosfodiester bağı ile bağlanarak zincir uzamasını (extansion) sağlamaktadır. Bu şekilde denatürasyon, annealing ve extansion basamağından oluşan her bir döngü sonunda, istenen DNA parçası 2ⁿ olarak çoğalmaktadır (n; çoğaltma işleminde uygulanan döngü sayısıdır)³.

38, 43

3.3.5.2.2. Ayıraçlar

1. 20X Tris Tamponu, pH 8,8

Tris.HCl	680 mM
Amonyum sülfat	166 mM
MgCl ₂	68 mM
BSA	1.700 µg/mL olacak şekilde

10 mL hazırlanır.

2. dNTP Karışımı

6 mM

100 mM stok dATP, dCTP, dGTP, dTTP'den son derişim 6 mM olacak şekilde her dNTP'lerden eşit hacimde alınarak hazırlanır.

3. Dimetilsülfoksit (DMSO)

% 50

4. Genomik DNA

1 µg/100 µL

5. Primer

Primer F → 5'-ACTCCCCGAAGAGGGGTTCAAGG

Primer R → 5'-CCAGCCTCCCAGGAGCGCGGAAG

6. *Taq* Polimeraz Enzimi (5 Ü/mL)

3.3.5.2.3. Yöntem

Taq DNA polimeraz eklenmeksizin son hacim 100 µL olacak şekilde amplifikasyon tüpü içerisinde hazırlanan PCR karışımı vorteks yardımıyla karıştırılır ve santrifüj edilir. Bu karışım 6 dk 99 °C'de inkübe edilerek DNA'nın denatürasyonu sağlanır. Sıcaklık 56 °C'ye ulaşınca *Taq* DNA polimeraz ilave edilir. Her bir döngü 94 °C'de 45 saniye, 56 °C'de 45 saniye, 72 °C'de 45 saniye olacak şekilde uygulanır. PCR karışımı çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5. PCR karışımı

Ayıraç	Miktar (µL)	Son Derişim
20X Tris Tampon	5	1X Tris Tamponu
dNTP (6 mM)	2,8	0,6 mM
DMSO (% 50)	10	% 5
DNA	Değişken	1 µg/100 µL
Primer (150 ng/µL)	1	150 ng/100 µL
Primer (150 ng/µL)	1	150 ng/100 µL
Taq Polimeraz (5 Ü/µL)	0,4	2 Ü/100 µL
Steril saf su	100 µL'ye tamamlanır	

Amplifiye DNA; % 2'lik agaroz jelde, 150 miliAmper (mA) akımda, 30 dk yürütülür. Jel, etidiyum bromür (0,5 µg/mL) ile boyanarak fazla etidiyum bromür saf su ile yıkanarak jelden uzaklaştırılır. Boyanan jel, UV ışık altında incelenerek fotoğrafı çekilir.

3.3.5.3. Amplifiye G6PD Gen Ürününün Restriksiyon Endonükleaz ile Kesimesi (RFLP)

3.3.5.3.1. Prensip

Restriksiyon endonükleazlar, genom içinde var olan kesim yerlerini ortadan kaldırır veya yeni kesim yerleri oluştururlar. Bu değişim, agaroz jel elektroforezi ile gösterilir^{38, 96}.

3.3.5.3.2. Ayıraçlar

1. 10X Tris Tamponu, pH 7,5

Tris.HCl	6 mM
NaCl	50 mM
MgCl ₂	6 mM
DTT	1 mM

2. MboII Restriksiyon Enzimi

Enzimin son derişimi 0,5 Ü/20 µL olacak şekilde kullanılır. Enzimin tanıdığı özgün dizi ve kesim yeri aşağıdaki gibidir.

5'...GAAGA(N)₈...3'

3'...CCTTCT(N)₇...5'

3. Amplikon

3.3.5.3.3. Yöntem

G6PD geninin istenilen bölgesi PCR ile çoğaltıldıktan sonra, DNA ürünü mutasyon aranacak bölgeye özgü restriksiyon enzimi olan *Mbo*II ile kesilmiştir. RFLP için gerekli olan çözeltiler çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.6. RFLP için gerekli olan çözeltiler

Ayıraç	Miktar (µL)	Son Derişim
10X Tampon	2	1X tamponu
Amplikon	10	6 µg/20 µL
<i>Mbo</i> II Enzimi	1	0,5 Ü/20 µL
Steril saf su	7	

Çizelge'deki karışım 37 °C'de bir gece inkübe edilir. % 3'lik agaroz jelde, 150 mA akımda, 70 dk yürütülür. Daha sonra agaroz jel, 0,5 µg/mL derişimde etidyum bromür ile muamele edilir. Saf suda yıkanan jel UV ışık altında incelenilerek fotoğrafı çekilir.

3.3.5.4. Dizi Analizi

3.3.5.4.1. Prensip

Otomatize DNA dizi analizinde, Sanger ve Coulson'un zincir sonlandırılması prensibine dayalı yöntem kullanılmıştır. Bu yöntemde, DNA polimeraz enzimi dNTP'lerin yanında deoksiribozin 3' pozisyonunda OH grubu taşımayan ddNTP'leri de substrat olarak kullanmaktadır. Sentezlenen DNA iplikçığıne dNTP eklendiğinde uzama devam ederken, ddNTP'ler eklenince zincir uzaması durmaktadır. Otomatize DNA dizi analizinde reaksiyonların başlangıcında floresans veren madde ile işaretli primer veya nükleotidler kullanılarak baz dizilimi gözlenebilir hale getirilmektedir¹⁰³.

3.3.5.4.2. PCR Aşaması

3.3.5.4.2.1. Prensip

Dizi analizi için öncü şablon oluşturacak amplikonun sentezlenmesidir.

3.3.5.4.2.2. Ayıraçlar

1. 10X Tris Tamponu (3.3.5.3.2 başlığındaki gibi hazırlanır.)

2. dNTP Karışımı 6 mM

100 mM stok dATP, dCTP, dGTP, dTTP'den son derişim 6 mM olacak şekilde her bir dNTP'den eşit hacimde alınarak hazırlanır.

3. Dimetilsülfoksit (DMSO) % 50

4. Amplikon

5. Primer

Primer F → 5'-ACTCCCCGAAGAGGGGTTC AAGG

Primer R → 5'-CCAGCCTCCCAGGAGCGCGGAAG

6. *Taq* Polimeraz Enzimi (5 Ü/mL)

7. "ExoSAP"

3.3.5.4.2.3. Yöntem

10X Tris Tampon	2,5
dNTP (6 mM)	0,7
DMSO (% 50)	2,5
Amplikon	Değişken
Primer F (150 ng/μL)	2
Primer R (150 ng/μL)	2
<i>Taq</i> Polimeraz (5 Ü/μL)	0,1

Steril saf su ile 25 μL'ye tamamlanır.

Amplifikasyon kontrolü için, % 1,5'luk agaroz jel dökülür. 150 mA akımda, 30 dk yürütülür. Daha sonra agaroz jel, 0,5 μg/mL derişimde etidyum bromür ile muamele edilir. Saf suda yıkanan jel UV ışık altında incelenir. Amplifikasyon istenilen biçimde yapılmış ise pürifikasyon yapılır. Pürifikasyon işlemi; 8 μL amplifikasyon ürününe, 2 μL

“ExoSAP” eklenip vorteklenerek, 37 °C’de 30 dk, 85 °C’se 15 dk bekletilmesiyle gerçekleşir.

3.3.5.4.3. “Cycle Sequencing” Aşaması

3.3.5.4.3.1. Prensip

Çoğaltılmış DNA’nın, floresans veren madde ile işaretlenerek baz diziliminin gözlenebilir hale getirilmesine esasına dayanır.

3.3.5.4.3.2. Ayıraçlar

1. “BigDye ReadyReaction Mix”
2. 10X Sekans Tamponu
3. Primer (F veya R) (5 pmol/ µL)
Primer F→5’-ACTCCCCGAAGTTGGGTTCATTG
Primer R→5’-CCAGCCTCCTTGGAGCGCGGAAG
4. ExoSAP ile işlenmiş Amplikon

3.3.5.4.3.3. Yöntem

EksoSAP ile saflaştırılan G6PD geninin PCR ürünü tek iplikçik haline getirilerek kapiler elektroforezde dizinin okunması işlemidir.

Yöntemin aşamaları aşağıdaki gibidir:

“BigDye Ready Reaction” karışımı	2 µL
10X Sekans tamponu	1 µL
Primer (F veya R) (10 pmol/ µL)	1 µL
PCR Ürünü	2 µL
Saf su	4 µL
Toplam	10 µL

Hazırlanan PCR karışımına 96 °C’de 1 dk denatürasyonun ardından, 96 °C’de 10 dk ve 50 °C’de 5 s olacak şekilde 30 döngü, 60 °C’de 4 dk 1 döngü uygulandıktan sonra işleme kadar +4 °C’de bekletilir.

Elde edilen tek iplikçik DNA, sefadeks kolonla aşağı tanımlandığı gibi temizlenir:

1. Sefadeks kolonlarının içerisine 600 µL saf su konur, vortekslenip 30 dk bekletilir.
2. 5.400 rpm’de 2 dk santrifüj edilir.
3. Santrifüj sonrası sefadeksli kolonların alt kısmı çıkarılır ve süzüntüler dökölür, diplerine 5’er µL distile su konur.
4. 10 µL “Cycle Sequencing” ürünü sefadeks üzerine (kolona temas etmeden) bırakılır.
5. 5.400 rpm’de 1 dk santrifüj edilir.

Sefadeks protokolü ardından örnekler otomatik dizi analizi cihazı tabağına konularak yürütme başlatılır. Yürütme sonrası gen dizisinin okuma işlemleri sekans yazılım programı ile yapılır.

3.3.5.5. Gen Ekspresyonu

İstenen genin ekspresyon düzeyinin, uygun “housekeeping” gen ekspresyonu ile oranlanmasına dayanan yöntemdir. Çalışmamızda “housekeeping” gen olarak kullanılan referans gen β-Aktin’dir.

3.3.5.5.1. Tam Kandan Lökosit İzolasyon

3.3.5.5.1.1. Prensip

“Red Blood Cell Lysis Buffer” ile taze tam kandan eritrositlerin parçalanarak, lökositlerden mRNA’ların elde edilmesidir⁶².

3.3.5.5.1.2. Ayıraçlar

1. “Red Blood Cell Lysis” Tamponu
2. SF % 0,9

3.3.5.5.1.3. Yöntem

1. Tam kandan ne kadar alacağımızı hesaplamak için lökositleri ayıracağımız kan örneklerinin lökosit sayısı bulunmuştur (Sysmex KX 21N kan sayım cihazında ölçölerek). Elde edilen lökosit sayısı 1.000 ile çarpılır ve bulunan değeri

3.000.000'a bölünür. Alınacak kan miktarı = $[3.000.000 / (WBC \times 1.000)]$ formülünden μL olarak hesaplanır.

2. 1,5 mL eppendorf tüp içerisine bulduğumuz değer kadar kan örneği ve kan örneğinin 2 katı kadar "Red Blood Cell Lysis" ekleyip 15-25 °C ortamda çalkalayıcı ya da elimizde 10 dk boyunca altüst edilir.
3. Elde edilen kan ve "Red Blood Cell Lysis" karışımı 2.500 rpm de 5 dk veya 13.000 rpm de 30 s santrifüj edilir.
4. Steril bir pipetle dipteki beyaz pellete zarar vermeyecek bir şekilde kırmızı ve şeffaf olan üst faz atılır ve tekrar Red Blood Cell Lysis eklenir. 1 dk boyunca ters çevrilip inkübasyona bırakılır.
5. Tekrar 2.500 rpm de 5 dk veya 13.000 rpm de 30 s santrifüj edilir.
6. Üst faz tüpün dibindeki beyaz pellete zarar vermeyecek şekilde atılır.
7. Üst fazın üzerine 450 μL SF ekleyip, 1 dk boyunca elimizde ters çevrip 2.500 rpm de 5 dk veya 13.000 rpm de 30 s santrifüj edilir.
8. Steril bir pipet ile dikkatlice üst faz atılır.
9. Son aşamada 300 μL "Red Blood Cell Lysis" Tampon eklenir. Elde edilen lökositlerden mRNA izole edilene kadar örnekler -20 °C'de saklanır.

3.3.5.5.2. mRNA İzolasyonu

3.3.5.5.2.1. Prensip

"High Pure" RNA İzolasyon Kit'i kullanılarak yapılan mRNA izolasyonu, oligo (dT) bağlı manyetik partiküllerle mRNA'nın saflaştırılması prensibine dayanmaktadır¹⁰⁷.

3.3.5.5.2.2. Ayıraçlar

Lökositlerden mRNA izolasyonu için, "High Pure" RNA İzolasyon Kit'i kullanıldı.

3.3.5.5.2.3. Yöntem

1. Hücre çözeltilisinden 200 μL steril bir eppendorf tüpüne alınır.
2. 400 μL "Lysis Binding" Tamponu eklenir. 15 s vortekslenir.
3. Karışım filtreli tüpe aktarılır.

4. 8.000 rpm de 15 s santrifüj edilir. Alttaki toplama tüpü atılır, yerine yenisi konur.
5. Steril bir tüpte, 90 µL DNAz İnkübasyon Tampon ve 10 µL DNAz I karışımı hazırlanır. Filtreli tüpe pipetlenir ve 15 dk inkübe edilir.
6. 500 µL Yıkama Tamponu I filtreli tüpe eklenir. 8.000 rpm de 15 s santrifüj edilir. Alttaki toplama tüpü atılır, yerine yenisi konur.
7. 500 µL Yıkama Tamponu II filtreli tüpe eklenir. 8.000 rpm de 15 s santrifüj edilir. Alttaki toplama tüpü atılır, yerine yenisi konur.
8. 200 µL Yıkama Tamponu II filtreli tüpe eklenir. 13.000 rpm de 2 dk santrifüj edilir. Alttaki toplama tüpü atılır, yerine yenisi konur.
9. Filtreli tüp steril bir eppendorf tüpüne alınır.
10. 100 µL Elüsyon Tampon eklenir. 8000 rpm de 1 dk santrifüj edilir. Alttaki toplama tüpündeki izole edilen mRNA'lar steril bir eppendorf rüpüne alınır.

3.3.5.5.3. cDNA eldesi

3.3.5.5.3.1. Prensip

mRNA'dan ters transkriptaz enzimi ile cDNA'ların sentezlenmesidir.

3.3.5.5.3.2. Ayıraçlar

cDNA eldesi "Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis" Kit ile yapıldı.

3.3.5.5.3.3. Yöntem

1. Aşama

mRNA	5 µL
Random Hexamer Primer	2 µL
Su	6 µL
Toplam	13 µL

PCR karışımı, 65 °C'de 10 dk inkübasyon programına konur. "Thermal Cycler" cDNA I programı uygulanır.

2. Aşama

5X “Transkriptor Reverse Transcriptase” Tamponu 4 µL

“Protector RNase Inhibitor” 0,5 µL

Deoksinükleotit karışımı 2 µL

“Transkriptor Reverse Transkriptase” 0,5 µL

Toplam 7 µL olacak şekilde 1inci aşamada elde edilen üründen cDNA

eldesi sağlanır. Bu aşamada karışıma, 25 °C’de 10 dk, 65 °C’de 60 dk, 85 °C’de 5 dk olacak şekilde cDNA 2 PCR programına uygulanır.

3.3.5.5.4. Gen Ekspresyonu Analizi

3.3.5.5.4.1. Prensip

Hücre yapı ve işlevlerinin temel elemanları olan proteinlerin ekspresyon düzeylerindeki değişiklikleri incelemek için mRNA düzeylerinin Gerçek Zamanlı Ters Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Real Time RT-PCR) ile kantifikasyonu ve profillenmesidir. RT-PCR’ın temel prensibi, izole edilen mRNA’ların ters transkriptaz enzimleri ile cDNA’ya çevrilmesiyle kantifiye edilir. RT-PCR’da normal PCR’ın aksine, amplikon birikimi, floresan bir boya yardımıyla her döngünün sonunda belirlenir¹⁰⁸.

3.3.5.5.4.2. Ayıraçlar

G6PD enziminin gen ekspresyonu “RealTime ready Singe Assay” kiti ile yapıldı.

3.3.5.5.4.3. Yöntem

RT-PCR’nin amplifikasyon aşamasında, reaksiyon karışımında denatüre DNA primerleri ve prob lar bulunmaktadır. Annealing aşamasında primerlerin ortamda bulunan hedef DNA komponenti ile birleşmesi ve tekrar ayrışması sonrasında, çok az boya molekülü çift zincire bağlanabilir. DNA’ya bağlanma sonucunda uyarıma bağlı olarak prob moleküllerinin ışığı yaymasında önemli bir artış olur. Elongasyon sürecinde, daha çok prob yeni sentezlenen DNA’ya bağlanır. Gelecek ısıtma döngüsü için DNA denatürasyonuna bağlı olarak prob molekülleri salınırlar ve flouresans ışımaya sinyali düşer. Her PCR döngüsünün elongasyon basamağının sonunda flouresans ışık şiddeti

ölçümü amplifiye olmuş. Her bir erime piki DNA ürün partikülünün karakteristik erime sıcaklığını (T_m) gösterir. T_m sıcaklığında DNA'nın % 50'si çift zincirli % 50'si tek zincirlidir.

cDNA'ları yapılan her bir örnek için aşağıdaki PCR karışımı hazırlandı:

Su	4 µL
LightCycler 480 Probes Master 2X	10 µL
RealTime ready Assay 20X	1 µL
Toplam hacim	15 µL

Pipetlemeler 96 kuyucuklu LightCycler tabağına yapıldı ve üzerine 5 µL cDNA eklendi. Tabağın üzeri plaka ile kapatılarak 4.000 rpm de 4 dk santrifüj edildi ve örnek tabağı RT-PCR'a yüklendi. LightCycler 480 (Roche, Germany) cihazına, çizelge 3.7'deki G6PD gen ekspresyon programı girildi.

Çizelge 3.7. Light Cycler 480 RT-PCR Cihazı G6PD Gen Ekspresyon Programı

Son hacimi 20 µL olan PCR karışımı 96'lık tabağa yüklenir.	
Programlar	
Program Adı	Döngü
İnkübasyon Öncesi	1
Amplifikasyon	45
Soğuma	1
Sıcaklık (°C)	Süre
İnkübasyon Öncesi	
95	10 dk
Amplifikasyon	
95	10 s
60	30 s
72	1 s
Soğuma	
40	30 s

3.3.5.5.5. β -Aktin Protokolü

3.3.5.5.5.1. Prensip

RT-PCR uygulamalarında, ilgilenilen genin ekspresyon düzeyinin incelenebilmesi için dokuda ekspresyonu değişmeyen bir diğer genin ürünü olan mRNA ile standardize edilmesi gereklidir (normalizasyon). Bu amaçla çeşitli doku ve hücre tiplerinde kullanılan ve ekspresyonu minimal farklılık gösteren “housekeeping” genler kullanılmaktadır. İlgilenilen genin ekspresyon düzeyi, referans gen olarak kullanılan “housekeeping” genin ekspresyon düzeyine oranlanır.

Hedef genlerin ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak “housekeeping” genin doğru seçilmesi gereklidir. Çalışmalarda kullanılacak “housekeeping” genin ekspresyon düzeyi, ne kadar az değişkenlik göstererek sabit kalırsa, hedef genin ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için o kadar güvenilir bir referans olacaktır.

3.3.5.5.5.2. Ayıraçlar

β -Aktin Primer	1 μ L
β -Aktin Prob	1 μ L
Master Karışımı	10 μ L
cDNA	5 μ L
Su	3 μ L

3.3.5.5.5.3. Yöntem

Hazırlanan β -Aktin karışımları RT-PCR tabağına 15'er μ L dağıtıldı ve üzerine 5 μ L cDNA'lar eklendi. Tabağın üzeri jelatin ile kapatılarak 4.000 rpm de 4 dk santrifüj edildi. Light Cycler 480 cihazına yerleştirilen tabağa β -Aktin programı uygulandı.

3.4. İstatistiksel Analiz

G6PD aktivitesi referans aralığından düşük veya sıfır olan olguların mRNA ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemine göre hesaplandı¹⁰⁹. Hesaplama sonucunda olguların ekspresyon seviyeleri ile; G6PD enziminin düşüklüğü, kinetiği ve Gd Akdeniz mutasyonu arasındaki ilişki SPSS 20.0 Windows Programı kullanılarak saptandı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda kan örnekleri, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Hematoloji Bilim Dalından sağlandı. Olguların hematolojik verileri, Sysmex KX-21N kan sayım cihazıyla belirlendi. Taze kandan G6PD enzim aktivitesi ölçülerek referans aralığından düşük veya sıfır olan örneklerden oluşan çalışma grubu 3'ü kadın 7'si erkek 10 olgudan oluştu. Çalışmamıza katılan örnekler, DE-52 anyon değiştirici reçine ile kısmi olarak saflaştırılarak kinetik çalışması yapıldı. "Red Blood Cell Lysis" tamponu ile ayrıştırılan lökositlerden, MagNA Pure LC cihazı ile DNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen DNA'lardan G6PD Akdeniz mutasyonuna bakıldı. Ayrıca Ekson 6'nın dizi analizi yapıldı. "High Pure RNA Isolation" kit ile lökositlerden mRNA izole edilip, "Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis" kit kullanılarak cDNA eldesi yapıldı. "LightCycler 480" cihazı kullanılarak, bu örneklerin G6PD gen ekspresyonu düzeyleri belirlendi. Sonuçlar $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüyle hesaplandı. Bulgular arasındaki istatistiksel ilişki SPSS 20.0 programı kullanılarak irdelendi.

4.1. Hematolojik Bulgular

G6PD enzim aktivitesi referans aralığından (7-13 Ü/g Hb) düşük veya sıfır olan 10 olgu incelendi. Çalışmanın ilk aşamasında, G6PD enzim aktivitesi referans aralığından düşük veya sıfır olduğu daha önce belirlenen 3'ü kadın 7'si erkek 10 olgudan EDTA'lı tüplere 10 mL kan alındı.

Olguların hematolojik verilerine kan sayım cihazında bakıldı. WBC $6,0 - 10,9 \times 10^9/L$, RBC $3,89 - 6,74 \times 10^{12}/L$, Hb 10,7 – 14,4 g/dL, Hct 28,5 – 43,3 %, MCV 75,4 – 95,6 fL, MCH 21,1 – 29,1 pg, MCHC 29,6 – 37,5 g/dL aralığında bulundu. Olgulara ait hematolojik bulgular çizelge 4.1'de toplu olarak gösterildi.

Çizelge 4.1. Olguların hematolojik verileri

Olgu	Cinsiyet	Yaş	WBC 10⁹/L	RBC 10¹²/L	Hb g/dL	Hct %	MCV fL	MCH pg	MCHC g/dL
E.S.	E	4 ay	10,9	4,06	11,2	32,2	79,3	27,6	34,8
C.Ö.	E	15	6,6	4,66	13,7	38,8	83,3	29,4	35,3
K.E.K.	E	12	5,4	4,74	13,3	37,0	78,1	28,1	35,9
Ş.S.	K	34	6,0	4,31	13,9	41,2	95,6	32,3	33,7
Z.K.	K	48	6,9	6,23	10,5	37,6	76,8	21,1	29,6
Ş.A.	K	41	8,8	4,15	11,7	39,8	75,4	27,8	31,7
M.E.	E	35	8,1	3,89	10,7	28,5	71,6	26,9	37,5
A.K.	E	17	7,9	6,73	13,0	37,7	79,1	22,3	30,5
F.F.A.	E	49	7,6	5,22	14,2	41,4	86,7	24,1	31,9
F.A.	E	58	10,4	4,89	14,4	43,3	88,5	29,4	33,3

4.2. Kinetik Bulgular

G6PD enzim aktivitesi referans aralığından düşük veya sıfır olan olgularda, kantitatif enzim aktivite tayini yapıldı. Ölçüm sonucunda tüm örneklerde enzim aktiviteyi 0 - 3,2 Ü/g Hb aralığında, $\bar{x} \pm SD$ değeri $1,62 \pm 1,27$ olarak bulundu. G6PD enzimi kısmi olarak saflaştırıldıktan sonra kinetik özellikleri çalışıldı.

DE-52 anyon değiştirici reçineden kısmi olarak saflaştırılan G6PD enzimi, K_m çalışmasında kullanıldı. Enzimin substratları olan $NADP^+$ ve G6P'ye ilgisine bakıldı. K_{mNADP^+} ve K_{mG6P} değerlerinin saptanmasında Lineweaver-Burk eğrisinden yararlanıldı. Farklı G6PD enzim aktivitesine sahip olguların, farklı substrat derişimlerinde değışen enzim aktivitesi esas alınarak, K_m değeri hesaplandı. Hesaplama sonuçlarına göre olguların K_{mNADP^+} 'leri 1,8 – 67,5 μM arasında, K_{mG6P} 'leri 16,8 – 106 μM arasında bulundu.

Analog kullanımları çalışmasında enzimin doğal substratları olan $NADP^+$ ve G6P ile verdiği aktivite % 100 olarak esas alındı. Diğer deney koşulları sabit tutularak, ortama enziminin substratları yerine analogları olan dNADP, NAD, Gal6P, 2dG6P eklendi. Enzim aktiviteyi % olarak değeriendirildi. Değeriendirme sonuçlarına göre substrat kullanım oranları; dNADP % 42,4 – 196, NAD % 4,3 – 36, Gal6P % 2,4 – 19,2, 2dG6P % 0 – 29 arasında bulundu.

Enzimin sıcaklık kararlılığı belirlenmesinde, G6PD enzimleri 47 °C'de 2 saat inkübe edilerek ve belirli aralıklarla aktivite tayini yapıldı. Enzimin başlangıç aktivitesi ile aralıklı ölçümlerin % olarak değışimi hesaplandı. Optimum sıcaklık çalışmasında ise yine enzimin başlangıç aktivitesi % 100 alınıp; 35, 45, 50, 55, 60, 65 ve 70 °C'deki enzimatik aktivite ile oranlandı. Bu orana göre G6PD enziminin optimum çalışma sıcaklığı 40-50 °C arasında bulundu.

Kinetik çalışma aşamasında son olarak enzimin aktivite gösterdiği optimum pH'sine bakıldı. G6PD enziminin pH 7,5'deki aktivitesi % 100 alınarak ve pH 5, 6, 7, 8, 9 ve 10'daki aktivitesi % olarak oranlandı. Çalışmada optimum pH, 6 - 8 arasında bulundu.

Tüm kinetik çalışma verileri çizelge 4.4'de verildi. Bu çizelgedeki kinetik çalışma değerielerinin; sonuçları, verileri ve hesaplamaları tek bir olgu (Z. K.) üzerinden gidirilerek görselleştirildi.

Çizelge 4.2. Olguların kinetik özellikleri ve diğer varyantlar ile karşılaştırılması

No	Olgu	G6PD aktivite (Ü/g Hb)	K_m (µM)		Analog Kullanımı (%)				Optimum pH	47 °C'de İlk 20 dak. Değişim (%)	Optimum Sıcaklık (°C)
			G6P	NADP	dNADP	NAD	Gal6P	2dG6P			
1	E.S.	0	93	2,8	61	12,7	19,2	18	7	1 ↓	45
2	C.Ö.	1,7	72	4,1	72,2	4,7	3,2	14,5	7	8 ↑	40
3	K.E.K.	0	16,8	1,8	96	16,3	11,8	20	6-8	12 ↓	40
4	Ş.S.	2,7	51,9	9,9	84	11,1	14,7	21,8	7	4 ↓	55
5	Z.K.	3,2	39,8	3,62	194	21	2,6	27,7	7-8	41 ↓	50
6	Ş.A.	1,6	105,3	16,6	103	13,5	9	29	8	16 ↓	50
7	M.E.	3,2	34,5	18,2	59	36	8,8	0	8	3 ↓	40
8	A.K.	2,3	106	67,5	97,4	8,5	2,4	4,7	7-9	10 ↑	40
9	F.F.A.	1,5	92,6	18,1	42,4	4,2	3,9	0	8	8 ↓	45
10	F.A.	0	44,9	3,4	86,7	4,3	17	16,2	6-8	30 ↓	45
	Gd B ⁺	7-13	50-70	2-4	55-60	<1	7-15	<4	–	–	–
	Gd Akdeniz	0-7	19-26	1,2-1,6	350	–	20	23-37	Bifazik	20 ↓	–

4.2.1. Z.K.'ye Ait Kinetik Bulgular

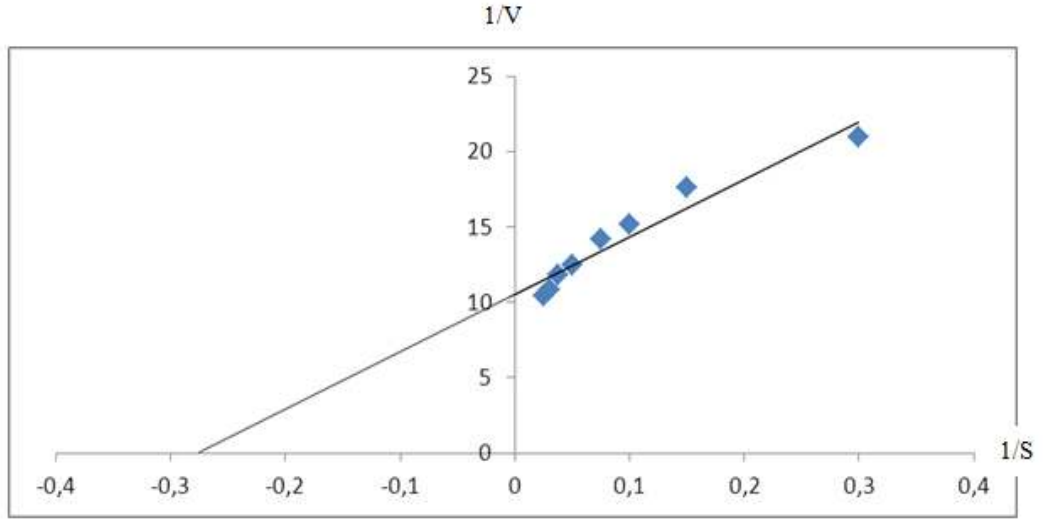
G6PD enzim aktivitesi: 0 Ü/g Hb olarak bulunan Z.K.'nin G6PD enzimi DE-52 reçine ile kısmi olarak saflaştırıldı ve kinetik çalışması yapıldı.

4.2.1.1. G6PD Enzimine Ait K_{mNADP^+} ve K_{mG6P} Değerinin Saptanması

K_m değeri Michaelis-Menten sabitidir. Her enzimin kendine özel K_m değeri vardır ve substratına özeldir. Bu da enzimin substrata olan ilgisini yansıtır. K_m sayısal olarak, reaksiyon hızının $\frac{1}{2}$ V_{max} 'a eşit olduğu noktadaki substrat derişimidir. K_m , enzim derişimi ile değişmez ve enzimin substratına karşı gösterdiği ilgiyi ifade eder. Sayısal olarak küçük K_m , enzimin substratına karşı ilgisinin yüksek olduğunu gösterir. Çünkü $\frac{1}{2}$ V_{max} hızına erişmek için düşük derişimde substrat yeterli olmaktadır¹¹⁰.

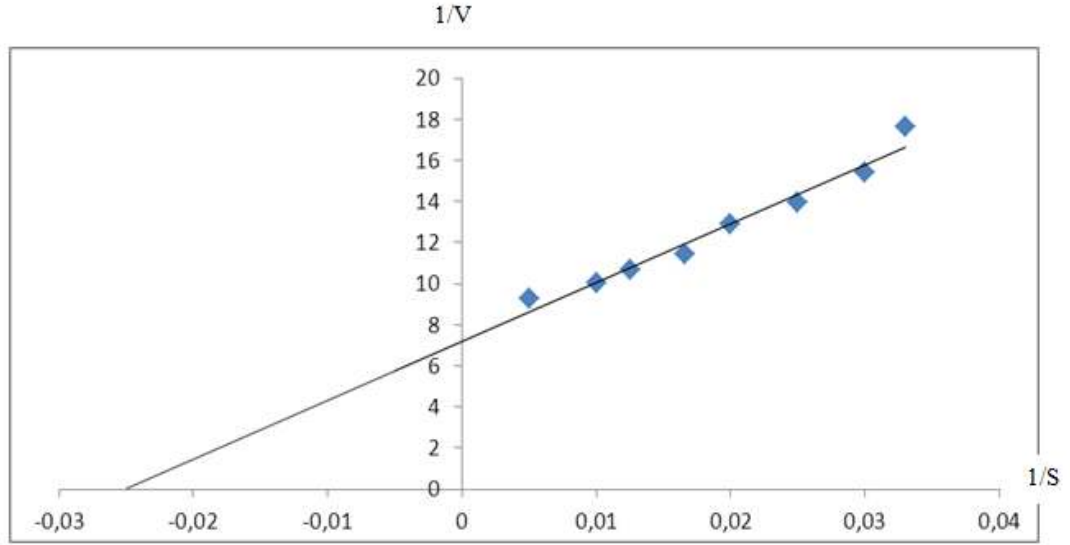
G6PD enziminin substratları olan $NADP^+$ ve G6P'ye karşı ilgisini değerlendirmek için K_m değerleri ölçümünde Lineweaver-Burk grafiğinden yararlanıldı.

K_{mNADP^+} değerleri, değişik $NADP^+$ derişimlerinde değişen G6PD enzimatik aktivite esas alınarak hesaplandı. Farklı substrat derişimlerinde 5 dk doyunca elde edilen G6PD aktivitelerinin doğrusal olarak arttığı aralık hesaba katıldı. G6PD enziminin $NADP^+$ ye ilgisini belirlemek için, elde edilen hız (V) ve substrat (S) derişimleri $1/V$ ve $1/S$ 'ye çevrilip Lineweaver-Burk grafiğine dönüştürüldü. Tüm çalışma grubunun K_{mNADP} değerleri; $\bar{x} \pm SD$ değeri $14,6 \pm 19,75 \mu M$ 'dir. En düşük K_{mNADP} değeri $1,8 \mu M$ olarak K.E.K. olgusunda, en yüksek K_{mNADP} değeri $67,5 \mu M$ olarak A.K. olgusunda görüldü. Z.K. olgusunun K_{mNADP} değeri, matematiksel olarak eğriden elde edilen $y = 38,152x + 10,53$ formülünden $y = 0$, $x = -1/K_m$ değerlerinin yerine konulmasıyla $K_m = 3,6 \mu M$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.1. Z.K.'nin G6PD K_{mNADP} Analizi İçin Yararlanılan Lineweaver-Burk Grafiği

K_{mG6P} değerleri, değişik G6P derişimlerinde değişen enzimatik aktivite esas alınarak hesaplandı. Farklı substrat derişimlerinde 5 dk doyunca elde edilen G6PD aktivitelerinin doğrusal olarak arttığı aralık hesaba katıldı. G6PD enziminin G6P'ye ilgisini belirlemek için, elde edilen hız (V) ve substrat (S) derişimleri 1/V ve 1/S'ye çevrilip Lineweaver-Burk grafiğine dönüştürüldü. Tüm çalışma grubunun K_{mG6P} değerleri; $\bar{x} \pm SD$ değeri $65,68 \pm 32,25 \mu M$ 'dür. En düşük K_{mG6P} değeri $34,5 \mu M$ olarak M.E. olgusunda, en yüksek K_{mG6P} değeri $105,3 \mu M$ olarak Ş.A. olgusunda görüldü. Z. K. olgusunun K_{mNADP} değeri, matematiksel olarak eğriden elde edilen $y = 287,05x + 7,2012$ formülünden $y = 0$, $x = -1/K_m$ değerlerinin yerine konulmasıyla $K_m = 39,86 \mu M$ olarak hesaplandı.



Şekil 4.2. Z.K.'nin G6PD K_{mG6P} Analizi İçin Yararlanılan Lineweaver-Burk Grafiği

4.2.1.2. G6PD Enzimine Ait Analog Çalışma

G6PD enziminin doğal substratları olan $NADP^+$ ve G6P ile verdiği aktivite % 100 kabul edilerek, G6PD enziminin substratları yerine substrat analogları aynı derişimde verildi. Diğer deney koşulları aynı tutulup enzim aktiviteleri % olarak hesaplandı.

Tüm olguların; dNADP kullanma oranları % 42,4 ile 194 arasında olup, $\bar{x} \pm SD$ değeri % $89,57 \pm 41,5$ 'dir. dNADP kullanma oranı en düşük % 42,4 ile F.F.A.'da, en yüksek % 194 ile Z.K.'de bulundu.

Olguların NAD kullanma oranları % 4,2 ile 36 arasında olup $\bar{x} \pm SD$ değeri % $13,23 \pm 9,71$ 'dir. NAD kullanma oranı en düşük % 4,2 olarak F.F.A. olgusunda saptanır iken, en yüksek % 36 olarak M.E. olgusunda saptandı.

Gal6P kullanma oranları % 2,6 ile 19,2 arasındadır. $\bar{x} \pm SD$ değeri % $12,77 \pm 10,97$ olup, Gal6P kullanma oranı en düşük % 2,4 olarak A.K. olgusundaydı, en yüksek % 19,2 olarak K.E.K. olgusunda görüldü.

2dG6P kullanma oranları % 0 ile 29 arasında olup $\bar{x} \pm SD$ değeri % $15,19 \pm 10,51$ olarak bulundu. M.E. ve F.F.A. olgularının 2dG6P'yi analog olarak kullanmadığı, en yüksek de % 29 olarak Ş.A. olgusunun kullandığı görüldü.

Z.K. olgusunun substrat analoglarını kullanma oranı çizelge 4.3'te verildiği gibi aktiviteleri dNAD, NAD, Gal6P, 2dG6P için sırasıyla % 196, 21, 2,6 ve 27,7 bulundu.

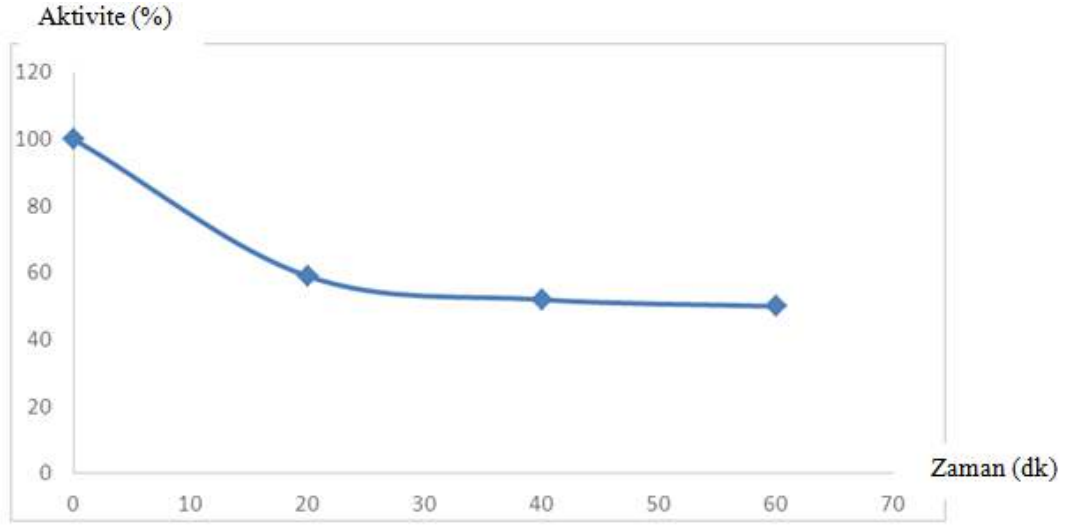
Ayrıca Z.K.'nin dNADP analogunu diğerlerine göre daha yüksek oranda kullandığı saptandı.

Çizelge 4.3. Z.K.'nin Substrat Analoglarını Kullanma Oranı

	% Aktivite
Elüsyon	100
dNADP	196
NAD	21
Gal6P	2,6
2dG6P	27,7

4.2.1.3. G6PD Enziminin Sıcaklık Kararlılığı

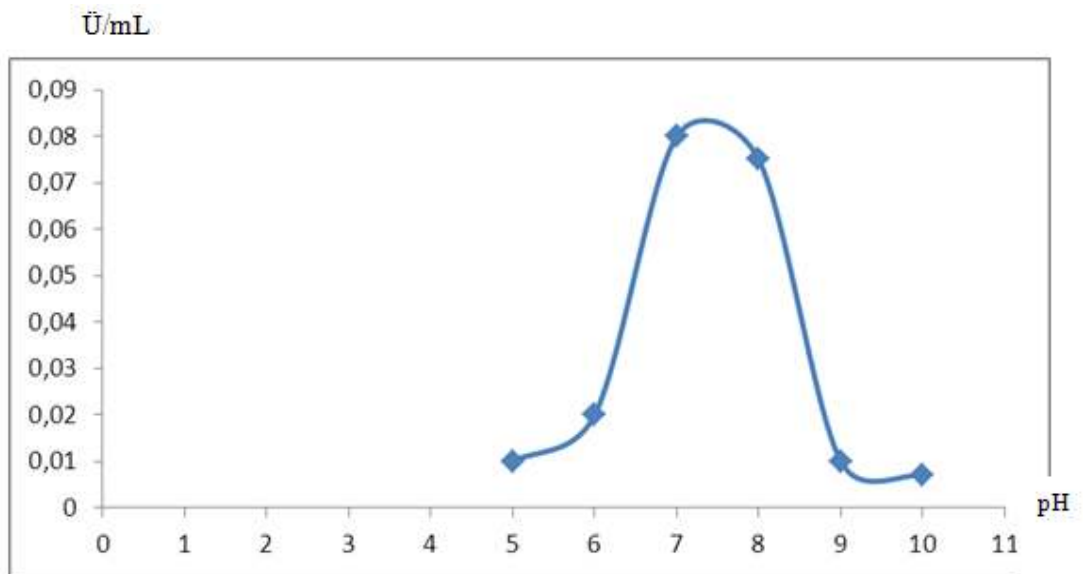
G6PD enzimi 47 °C'de iki saat inkübe edildi. Farklı sürelerde enzimlerin aktivitesi ölçülüp başlangıç aktiviteleri % 100 olarak alınıp aktivite değişimleri % olarak oranlandı. İlk 20 dk'deki değişim esas alındı. Olgulardan ilk 20 dk'da en fazla değişim oranı % 41 azalan Z.K., en az değişim ise % 1 ile E.S. olduğu gözlemlendi. Z.K.'nin G6PD enziminin sıcaklık kararlılığı deneyinde G6PD aktivitesini ilk 20 dk'de % 41 oranında kaybettiği gözlemlendi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Z.K.'nin 47°'de sıcaklık kararlılığı grafiği

4.2.1.4. G6PD Enziminin Optimum pH'si

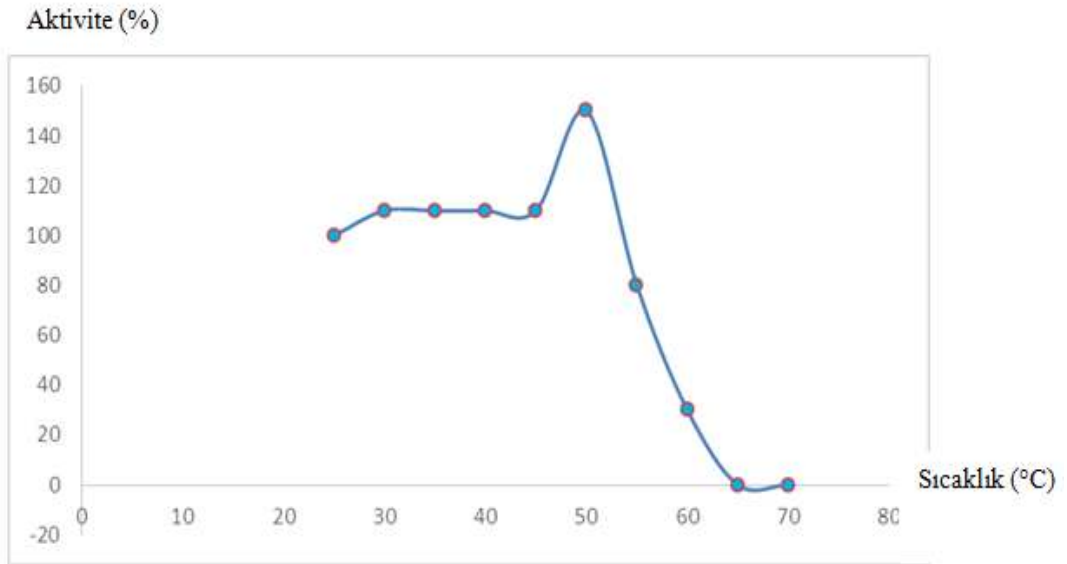
G6PD enziminin farklı pH'lerdeki aktivite değişimleri incelenerek, G6PD enziminin optimum çalışma pH'si bulundu. Olgularda optimum çalışma pH'si 6-9 arasında bulundu. Z.K.'nin G6PD enziminin optimum çalışma pH'si grafiği şekil 4.4'te görüldüğü gibi bifazik özellik gösterdiği, pH 8 ve 9'da en yüksek aktiviteyi gösterdiği saptandı.



Şekil 4.4. Z.K.'nin Optimum pH Grafiği

4.2.1.5. G6PD Enziminin Optimum Çalışma Sıcaklığı

Kısmi saflaştırılan G6PD enziminin optimum çalışma ısısının belirlenmesi için, enzimin 25 °C ve pH 8,0'deki aktivitesi % 100 olarak alındı. Daha sonra 37, 45, 50, 60, 65 ve 70 °C'deki aktiviteleriyle % olarak oranlanıp enzimin optimum çalışma sıcaklığı belirlendi. Olguların optimum çalışma sıcaklığı 40 - 55 °C arasında bulunmuştur. En yüksek optimum çalışma sıcaklığı 55 °C olarak Ş.S. olgusunda gözlemlendi. Z.K.'nin G6PD enziminin optimum çalışma sıcaklığı şekil 4.5.'te görüldüğü gibi 50 °C olduğu bulundu.



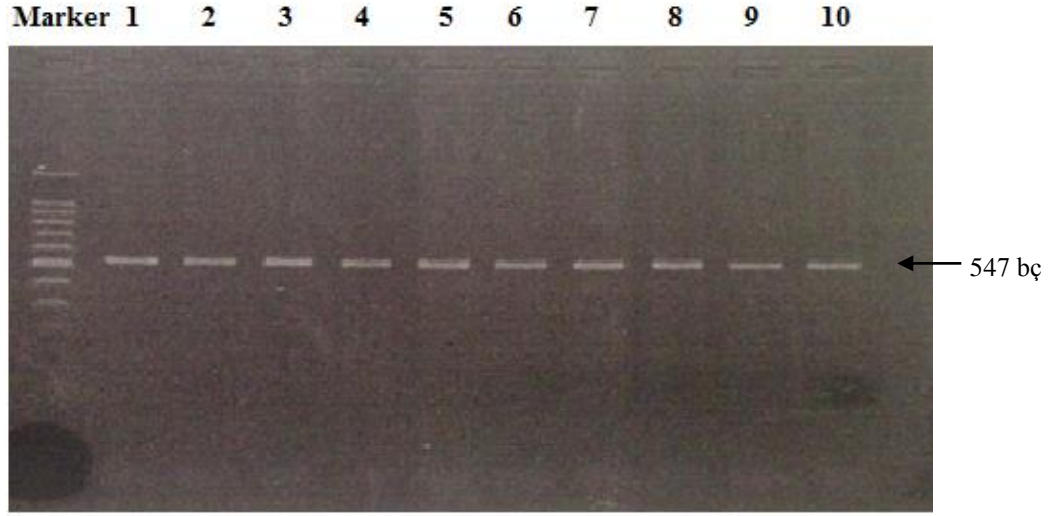
Şekil 4.5. Z.K'nin Optimum Çalışma Sıcaklığı Grafiği

4.3. Moleküler Bulgular

G6PD enziminin geninin moleküler düzeyde çalışılması için, tam kandan izole edilen DNA'lar ve lökositlerden elde edilen mRNA'ların cDNA'ları kullanıldı.

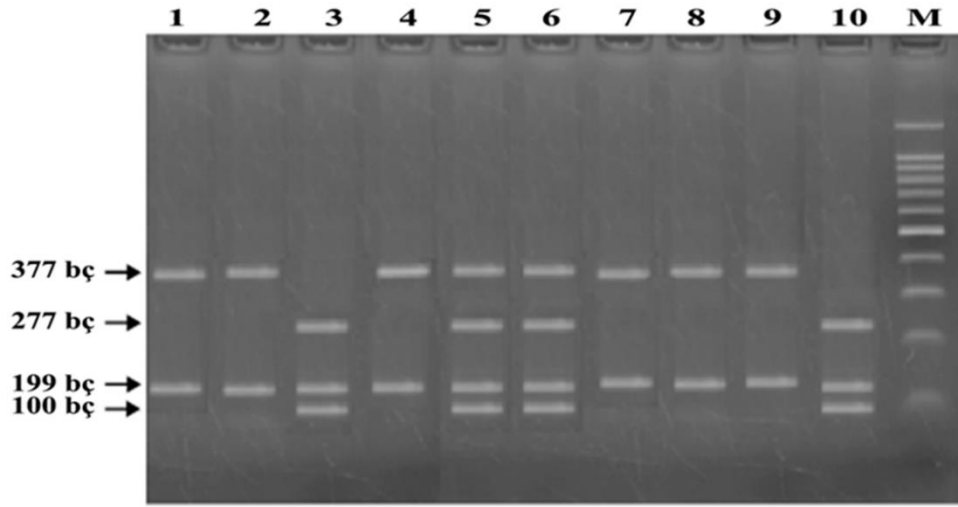
4.3.1. PCR Bulguları

In vitro şartlarda çoğaltılan G6PD geni, % 2'lik agaroz jel elektroforezi ile görüntülendi (Şekil 4.6). Çoğaltılmış gen, *Mbo*II restriksiyon enzimi ile kesilerek olgularda G6PD Akdeniz mutasyonu bulunup bulunmadığına bakıldı (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. G6PD Geninin Enzim Kesimi Öncesi % 2'lik Agaroz Jel Elektroforez Görüntüsü. Marker olarak Φ X174 *Hae*III Markeri kullanıldı. Örneklerin ampikon büyüklüğü 547 bp uzunluğundaydı.

G6PD geninin 6ncı eksonunda 563üncü nükleotidin C→T değişimi sonucu oluşan Gd Akdeniz mutasyonunu saptamak için ekson 6 - 7 bölgesi çoğaltılmış, örnekler *Mbo*II restriksiyon enzimi ile kesilmiştir. *Mbo*II restriksiyon endonükleaz enzimiyle kesim işleminden sonra % 3'lük agaroz jelde görüntülendi (şekil 4.7). Enzim ile kesim sonucu örnek C→T değişimi içermiyor ise amplifiye DNA'da 377 ve 119 bp'lik iki bant görülecektir. 563 mutasyonu yönünden hemizigot ya da homozigot bir genotipe sahip ise amplifiye DNA enzim ile kesildiğinde 277, 119, 100 bp'lik bant verecektir. Eğer örnek mutasyonu heterozigot olarak taşıyor ise bir X geni normal bir X geni de mutant olduğundan jelde 377, 277, 119 ve 100 bp'lik 4 bant halinde görülecektir; (Şekil 4.7).

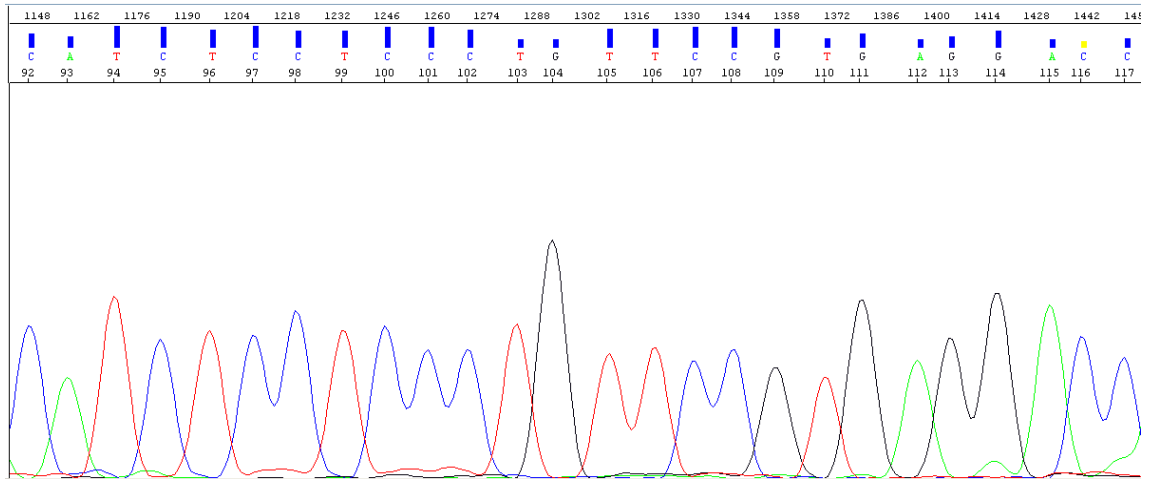


Şekil 4.7. *Mbo*II Restriksiyon Endonükleaz Enzimiyle Kesim İşleminde Sonra % 3'lük Agaroz Jeldeki Görünümü. Marker olarak Φ X174 *Hae*III Markeri kullanıldı (M: "Marker").

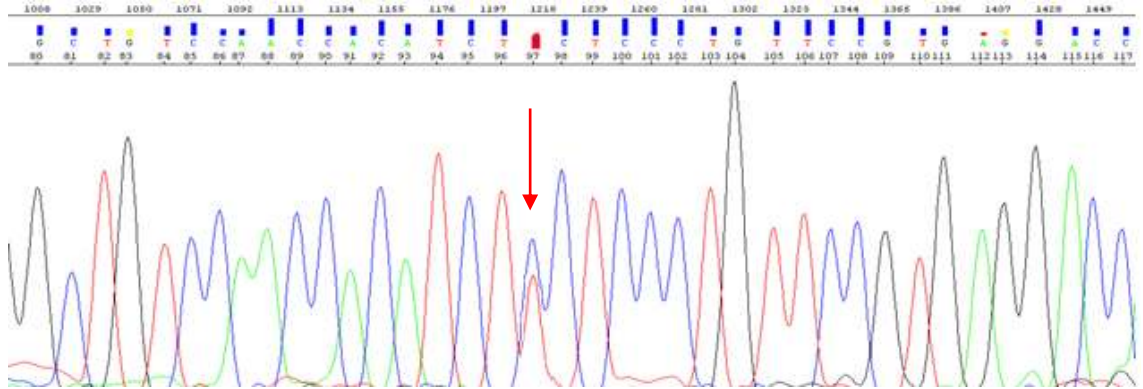
Çalışma sonucunda 3ncü, 5inci, 6ncı ve 10uncu örneklerin G6PD Akdeniz mutasyonunu; 3 ve 10 numaralı olguların hemizigot, 5 ve 6 numaralı olguların ise heterozigot olarak taşıdığı belirlendi.

4.3.2. Dizi Analizi Sonuçları

Gd Akdeniz'e neden olan, G6PD enziminin 6. eksonunun 563. nükleotidindeki C→T dönüşümü dizi analiziyle gösterildi. Böylece, enzim kesimiyle tanımlanan 4 olgunun G6PD Akdeniz mutasyonu taşıdığı bir ileri aşamayla doğrulandı.



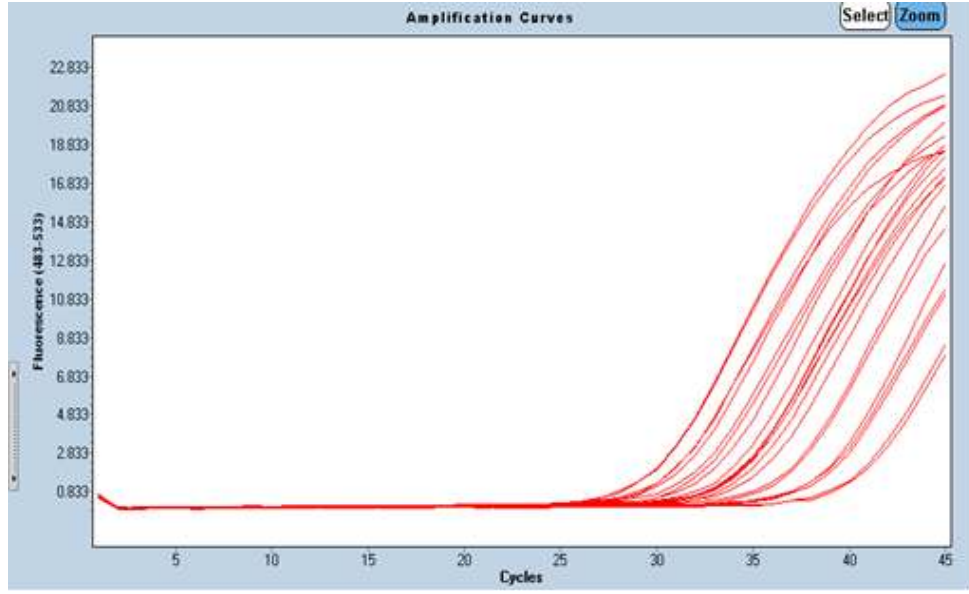
Şekil 4.8. G6PD Akdeniz mutasyonu gözlenmeyen Ş.S. olgusunun DNA Dizi Analizi görüntüsü



Şekil 4.9. G6PD Akdeniz mutasyonu gözlenen Z.K. olgusunun DNA Dizi Analizi görüntüsü.
Ok, 563üncü nükleotiddeki C→T değişimini göstermektedir.

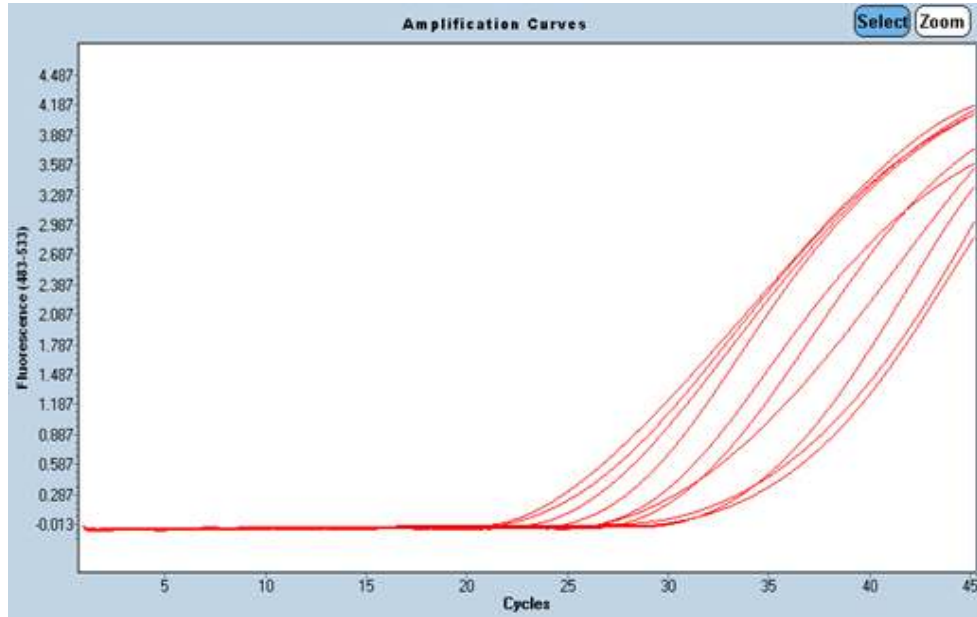
4.3.3. Gen Ekspresyonu

Tüm olguların G6PD geninin mRNA ekspresyonları çalışıldı. Daha sonra kontrol amaçlı iki tekrar daha yapıldı. Olguların mRNA'larının Cp değerleri 30,15 – 40 arasında, $\bar{x} \pm SD$ değeri $34,2 \pm 3,7$ bulundu. Toplamda üç kez çalışılan mRNA ekspresyonlarının ortalaması alınarak değerlendirme yapıldı. İkili olarak çalışılan mRNA ekspresyonlarının RT-PCR görüntüsü şekil 4.10'da verildi.



Şekil 4.10. Tüm olguların çift çalışılan G6PD Geninin Ekspresyonunun RT-PCR Görüntüsü

G6PD geninin ekspresyon düzeyinin kantitatif olarak belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda, önce referans olarak kullanılacak “housekeeping” genin doğru seçilmesi gereklidir. Çalışmada referans gen olarak β -Aktin kullanıldı. Referans genin ekspresyon görüntüsü şekil 4.11’de verildi.



Şekil 4.11. Referans Genin Ekspresyonunun RT-PCR Görüntüsü

G6PD enzim aktivitesi referans aralığından düşük veya sıfır olan olguların mRNA ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülüne göre hesaplanmıştır. $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri 0,2 – 17,02 arasında, $\bar{x} \pm SD$ değeri $3,33 \pm 5,39$ bulundu. Hesaplama sonunda elde edilen veriler çizelge 4.4’te verildi.

Çizelge 4.4. Olguların mRNA Ekspresyonlarının $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Sonuçları.

Olgu	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$2^{-\Delta\Delta C_t}$	1,09	0,32	0,2	0,26	0,31	5,06	0,82	17,02	7,01	0,63

Korelasyon analizi ile, G6PD enzim aktivitesi referans aralığından düşük veya sıfır olan olguların; enzim aktivitesi, doğal substratlarına olan ilgileri (K_m), analog kullanımları ile gen ekspresyonları arasındaki ilişki irdelendi.

Buna göre, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri ile K_{mNADP} arasında yüksek düzeyde, anlamlı pozitif bir ilişki olduğu, $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri ile K_{mG6P} arasında orta düzeyde, anlamlı pozitif bir ilişki olduğu belirlendi. Korelasyon tablosu (Çizelge 4.5) ve Regresyon grafiği (Şekil 4.12 ve şekil 4.13) aşağıda verildi.

Çizelge 4.5. Olguların $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri ile; K_{mG6P} ve K_{mNADP} ’nin korelasyon verileri

		K_{mG6P}	K_{mNADP}
$2^{-\Delta\Delta C_t}$	Pearson Correlation	,682*	,947**
	Sig. (2-tailed)	,030	,000
	N	10	10

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

5. TARTIŞMA

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD; EC 1.1.1.49), PFY'nin ilk ve düzenleyici enzimi olup, glukoz-6-fosfatın 6-fosfoglukonalaktona dönüşümünü NADP^+ varlığında geri dönüşümsüz olarak kataliz etmektedir. PFY'nin iki temel işlevi bulunur: birincisi yağ asidi ve steroid biyosentezleri (adipoz doku, karaciğer, adrenal korteks ve süt veren meme bezi) gibi indirgeyici özellikteki sentezler için NADPH üretmek, ikincisi ise nükleotit ve nükleik asit biyosentezi için riboz sağlanmaktır⁴⁴.

G6PD enzim eksikliğinin sıklığı coğrafi bölgelere göre değişmekte olup, Akdeniz ülkelerinde görülme oranı yüksektir. G6PD enzim eksikliği dünyada yaygın olmakla birlikte en sık Afrika ve Akdeniz çevresi ülkelerde % 12,8 oranında görülmektedir. Türkiye'de özellikle Akdeniz kıyılarında yer alan Arap, Kürt, Eti Türkü, Türkmen ve Bulgar göçmenlerinde daha sık rastlanmaktadır. Ülkemizde Çukurova bölgesinde bu oran % 5,8 ile % 8,5 arasında değişmektedir^{111, 112}. Yapılan bir çalışmada G6PD eksikliği oranı % 12, uzamış sarılıkları inceleyen bir başka çalışmada ise % 1,2 olarak saptanmıştır. Kanada'da yapılan çalışmada ise G6PD eksikliği % 5,4 oranında saptanmıştır¹¹³.

Bu çalışmada, G6PD enzim eksikliği referans aralığından düşük veya sıfır olan bireylerin, herhangi bir oksidatif ajanla karşılaştırılması durumunda bir kısmının etkilenip bir kısmının etkilenmemektedir. Bu çerçevede, eksikliği olan bireylerde görülen kısmi etkilenmeye, G6PD gen ekspresyonu düzeyleri irdelenerek yorum getirilmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızda G6PD enzim aktivitesi eritrositlerde çalışılmıştır. Ölçüm sonucunda tüm örneklerde enzim aktiviteleri 0 - 3,2 Ü/g Hb aralığında, $\bar{x} \pm \text{SD}$ değeri $1,62 \pm 1,27$ Ü/g Hb olarak bulunmuştur.⁹⁵ İki olguda G6PD aktivitesinin 0 Ü/g Hb olduğu belirlenmiştir. Elde edilen değerlerin, WHO'nun belirlediği Gd B⁺ enzim aktivitesinin referans değerlerinden düşük olduğu belirlenmiştir.

Gd B⁺ ve Gd Akdeniz aktivitesi üzerine Homosistein, Sistein ve N-Asetil Sistein etkilerinin *in vitro* koşullarda incelendiği çalışmada Homosistein'in normal enzim aktivitesini etkilemediği fakat çok düşük derişimlerde dahi Gd Akdeniz mutant enzimini % 50 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir. Sistein ise normal enzim aktivitesini

etkilemezken, çok yüksek derişimlerde mutant enzimi % 80 inhibe etmiştir. Homosistein ve benzieri tiyol bileşiklerindeki derişim artışlarının, Gd Akdeniz mutant enzimi inhibe etmesi, eritrositlerde hemolize kadar giden yoğun oksidan etkiye bu moleküllerin de katkıda bulunabileceğini düşündürmüştür¹¹⁴.

G6PD enziminin varyant analizi için birçok değışken kullanılmaktadır. Bunlardan; kısmi saflaştırılan G6PD enziminde kinetik çalışmalar, substrat analoglarının kullanımı, optimum pH, sıcaklık kararlılığı ve optimum sıcaklık en çok kullanılan kriterlerdir^{52,115}.

WHO tarafından, G6PD enziminin substatlarına ilgisini ölçmek için K_m değerlerinin ölçülmesi önerilmiş ve Gd B⁺'nin normal değerlerinin K_{mNADP^+} 2 – 4 μ M, K_{mG6P} 50 – 70 μ M arasında olduğu bildirilmiştir¹¹⁶. İtalya'da yapılan bir çalışmada K_{mG6P} 60 – 95 μ M, K_{mNADP^+} 2,9 – 4,4 μ M bulunmuştur¹¹⁷. Hindistan'da K_{mG6P} normal sınırları 60 – 75 μ M olduğu bildirilmiştir¹¹⁸. Almanya'da yapılan bir çalışmada, K_{mG6P} 62,3 $\pm$ 13,2 μ M, K_{mNADP^+} 5,2 $\pm$ 2,1 μ M olarak verilmiştir¹¹⁹. Japonya'daki bir çalışmada belirtilen değerler K_{mG6P} 31 – 71 μ M, K_{mNADP^+} 2 – 3,2 μ M arasındadır¹²⁰. Çukurova'da yapılan çalışma sonucunda ise K_{mG6P} 67 μ M, K_{mNADP^+} 6 μ M olarak bulunmuştur⁹⁷.

Çalışmamızda G6PD enziminin doğal substratlarına karşı ilgisini değerlendirmek için K_m değerleri ölçüldüğünde, olguların K_{mNADP} değerleri 1,8 – 67,5 μ M arasında $\bar{x} \pm SD$ değeri 14,6 $\pm$ 19,75 μ M, K_{mG6P} değerleri K_{mG6P} 'leri 16,8 – 106 μ M arasında $\bar{x} \pm SD$ değeri 65,68 $\pm$ 32,25 μ M bulundu. Gd Akdeniz mutasyonunun belirtilen değerleri K_{mNADP^+} 1,2 – 1,6 μ M, K_{mG6P} 19 – 26 μ M'dür. Gd Akdeniz mutasyonu saptanan 4 olgudan sadece K.E.K.'nin K_{mNADP^+} ve K_{mG6P} değerlerinin referans değerlerde olduğu görüldü. K_{mG6P} ve K_{mNADP^+} değeri, K.E.K dışındaki tüm olgularda Gd Akdeniz'den yüksek olarak saptandı. Diğer tüm olguların K_{mG6P} ve K_{mNADP^+} kullanımı, Gd B⁺'ya daha fazla yakınlık gösterdi. G6PD enzim aktivitesi sıfır olan A.K.'nin G6P'yi yüksek oranda kullandığı görülmüştür. Yine diğer Gd Akdeniz mutasyonu olduğu bilinen 3 olgunun K_{mNADP^+} kullanımı, Gd Akdeniz mutasyonun kullanım aralığına uymadığı görüldü. Bu durum, Gd Akdeniz mutasyonunun moleküler incelemede nokta mutasyonu sonucu oluştuğunu belirtse de, Gd Akdeniz'in moleküler heterojeniteye sahip olduğunu göstermektedir.

G6PD enziminin kinetik özelliklerinin belirlenmesinde ayrıca substrat analogları olarak dNADP, NAD, Gal6P ve 2dG6P kullanıldı. Bu kinetik özellikler, WHO'nun Gd

B⁺ ve Gd Akdeniz ile ve diğ er G6PD enzim eksikliğı saptanan çalışmalarda belirlenen kinetik özellikler ile karşılaştırıldı.

Gd B⁺'nin dNADP kullanım yüzdesinin % 55-60 ve Gd Akdeniz'de % 350 olduğu bildirilmiřtir¹²⁰. Çalışmamızda dNADP kullanım oranı dNADP % 42,4 – 196 arasında bulundu. dNADP'nin analog kullanımını Gd Akdeniz'li 4 olguda referans değerden düşük olduğu belirlendi. Ayrıca, G6PD enzim aktivitesi 1,5  /g Hb olan F.F.A.'nın dNADP'yi düşük oranda (% 42,4) kullandığı gözlendi.

WHO tarafından, Gd B⁺'nin NAD kullanım oranı % 1'in altında olduğu belirtilmiřtir¹¹⁵. Gd Akdeniz'in NAD'yi kullanımını ile ilgili referans bildirilmemiştir. Papua Yeni Gine'deki  alışmalar, G6PD enzim eksikliğı olan olguların NAD substratının kullanım oranının % 3 olduğunu g stermiřtir¹²¹. Çalışmamızda NAD kullanım oranı % NAD 4,3 – 36 arasında bulunmuştur. Substrat analogu olarak NAD'yi, M.E. olgusunun yüksek oranda (% 36) kullandığı belirlendi

WHO tarafından, Gd B⁺'nin Gal6P kullanım oranı % 7 – 15, Gd Akdeniz'in ise % 20 olarak belirtilmiřtir¹¹⁶. Enzim eksikliğı olan kişilerde, Hindistan'da yapılan bir çalışmada G6PD enziminin Gal6P kullanım oranı % 5 olarak bildirilmiřtir¹²³. Japonya'daki çalışmada ise Gal6P kullanımını % 4,3 – 12,7 arasında bulunmuřtur¹²⁰. Eber ve ark.'nın Almanya'da referans değerlerden düşük bireylerde yaptıkları çalışmada enzimin Gal6P'yi % 10,6 ± 3,1 oranda kullandığını g stermiřlerdir¹²⁴. Çalışmamızda Gal6P kullanım oranı Gal6P % 2,4 – 19,2 arasında bulunup genel dağılıma uyduğu gözlenmiştir. Gd Akdeniz mutasyonu olan olguların Gal6P'yi düşük oranda kullandığı gözlendi.

WHO tarafından Gd B⁺'nin 2dG6P kullanım oranı % 4' n altında, Gd Akdeniz'in ise % 23-37 arasında olduğu belirtilmiřtir¹¹⁵. Bu analogun kullanımının Gd Akdeniz varyatının tanımlanmasında önemli olduğu ve 2dG6P kullanımının Gd Akdeniz'in  n tanısını belirlemede önemli bir belirteç olduğu Ferraris ve ark. tarafından öne s r lm řtir¹²¹. Çalışmamızda 2dG6P kullanım oranı 2dG6P % 0 – 29 arasında bulundu. Substart analogu olarak 2dG6P'yi en fazla oranda kullanan olgu, % 29 ile Gd Akdeniz mutasyonu olan ř.A. olduğu, M.E. ve F.F.A. olgularının % 0 ile hiç kullanmadığı görüldü. Gd Akdeniz mutasyonu olan 4 olgunun 2dG6P'yi substrat analogu olarak kullanma oranı, WHO'nun belirlediği aralıklara uyum göstermekteydi. Gd Akdeniz mutasyonu olmadığı halde ř.S. olgusunun 2dG6P'yi analog olarak % 21,8 oranında kullandığı gözlendi.

Çalışmamızda olgular, yalnız Gd Akdeniz mutasyonu yönünden değerlendirildiğinden diğer olguların substrat analoglarını kullanma oranı G6PD genlerindeki mutasyonların, mutasyonlarının özelliğine göre değişiklik göstermektedir.

Sıcaklık kararlılığı, eritrosit G6PD özelliklerinin araştırılmasında kullanılan diğer bir değişkendir. WHO, sıcaklık kararlılığı çalışmalarında 20 dk'de, aktivitede % 20 kayba neden olan sıcaklık derecesinin saptanmasını önermiştir^{116, 120}. Bunun yanında araştırmacılar tarafından, G6PD enzim eksikliği referans değerden düşük olan bir grupta yaptığı çalışmalarda, 47 °C'de inkübasyon ile enzim aktivitesinin % 50 azaldığı belirtilmiştir¹²⁴. Bir kısım araştırmacılar ise G6PD enzimini 46 – 52 °C arasındaki belirli bir ısıda 20 dk beklettikten sonra enzimdeki aktivite değişimini % olarak kaydetmişlerdir¹²⁰. Japonya'da 47 °C'de yapılan çalışmalarda, normal G6PD enziminin 20nci dk'de aktivitesinin % 77,5, 60ıncı dk'de ise % 59 olarak aktivitesinin devam ettiğini belirtmişlerdir¹²⁰.

Bizim çalışmamızda, olguların G6PD enzimlerinin sıcaklık kararlılığının % 1 ile 41 arasında olup, oldukça değişken olduğu gözlemlendi. İlk 20 dk'de Z.K. olgusu, % 41 ile en çok aktivite düşüşü gösterdi. En az değişiklik gösteren olgu ise ilk 20 dk'de enzim aktivitesinde sadece % 1'lik bir düşüş olan E.S.'dir.

G6PD enziminin optimum çalışma sıcaklığı ile ilgili literatürde herhangi bir deneysel çalışma bulunamamıştır. Olgularımızın optimum sıcaklıkları 40 - 55 °C arasında bulundu. Gd Akdeniz mutasyonunu taşıyan Z.K.'nin sıcaklık kararlılığının düşük olmasına rağmen, 50 °C sıcaklıkta en iyi aktivite gösterdiği görüldü.

WHO tarafından G6PD enziminin aktivite gösterdiği optimum pH, Gd B⁺'lerde belirtilmemiş olup, Gd Akdeniz'lerde bifazik özellikte olduğu bildirilmiştir¹²³. Luzzatto ve Battistuzzi tarafından varyant analizinde optimum pH'nin G6PD enziminin K_m ve analog çalışmaları kadar önemli olmadığı belirtilmiştir⁶. Fakat çalışmamızda Gd Akdeniz mutasyonu bulunan 4 olgunun, bifazik olarak optimum pH gösterdiği belirlendi⁶. Bizim çalışmamızda bifazik özelliğin Gd Akdeniz mutasyonun bir özelliği olduğu ve Gd Akdeniz olduğu belirlenen olguların WHO'nun belirttiği optimum pH'ye uyduğu gözlemlendi¹¹⁶. Gd Akdeniz mutasyonu bulunmayan diğer olguların optimum pH'lerinin 6 - 9 arasında olduğu bulundu.

Bildirilen Gd Akdeniz kinetik özellikleri ile çalışmamızda saptanan Gd Akdeniz olguları bazı farklılık gösterse de moleküler analizler ile 4 olgunun G6PD genetik yapısının Gd Akdeniz olduğunu gösterildi.

Kinetik ve moleküler özellikleri irdelenen olgulara ait bulgular, G6PD enziminin geçirmiş olabileceği post-transkripsiyonel veya post-translasyonel modifikasyonlar sonucu farklı özellikler kazandığını düşündürmektedir. Bu olgularda diğer bir olasılık da Gd Akdeniz dışında başka bir mutasyonun taranması sonucu farklı bir sense ya da missense mutasyonlarının olabileceğini düşündürmektedir. Daha fazla olgu çalışılması yanında, genin diğer bölgelerindeki SNP ("Single Nükleotide Polymorphism")'lerin varlığının saptanmasına ek olarak, genin düzenlenmesinde bir katkısı olup olmadığının araştırılması, G6PD eksikliği olan olgularda klinik izlemdeki farklılıklara açıklık getirecektir.

G6PD enzim eksikliği, ilk kez 1950'li yılların ortasında keşfedildiğinde, niçin bazı insanların antimalarial bir ilaç olan primakinin etkisine hassas olduğu merak edilmiştir. Daha sonra etkilenenlerin çoğunun asemptomatik olduğu görülmüştür. Bununla beraber eksiklik, bireylerde bazı ilaçların alımında, bazı enfeksiyonlar esnasında, favizmde, yenidoğan sarılığı ile akut hemolitik anemi şeklinde ortaya çıkmaktadır. G6PD enzim eksikliği dünya genelinde en yaygın enzimopati olma özelliği ile hemoglobinopatilerden sonra ikinci sıklıkla görülen kalıtsal bir hastalıktır ve daha çok sıtmanın endemik olduğu bölgelerde saptanmaktadır^{4, 121}.

140'ın üzerindeki bu mutasyonu bulunan G6PD geninin bugüne kadar en detaylı ve en fazla üzerinde çalışılanı Gd Akdeniz'dir. İlk kez Vulliamy ve arkadaşları tarafından Gd Akdeniz varyantına enzimin 6ncı eksonunda 563üncü nükleotitteki C→T dönüşümünün neden olduğu bildirilmiştir⁶⁷. Dünya'da en yaygın olarak gözlenen Gd Akdeniz varyantının Türkiye'de de, Çukurova ve Antalya bölgesinde yaygın olduğu moleküler düzeydeki çalışmalar ile gösterilmiştir¹²⁶.

İtalya'da yapılan G6PD mutasyon araştırmalarında Gd Akdeniz (563 C→T) mutasyonu tüm mutasyonlara oranla % 84, San Antioco (1342 A→G) % 2,8, Union (1360 C→T) ise % 8,5 olarak tespit edilmiştir. Bununla birlikte Gd Akdeniz (563 C→T) mutasyonu Kuzey İtalya'da % 66,6, Güney İtalya'da % 41,5, Suudi Arabistan, Irak, İran, Ürdün, Lübnan ve İsrail kökenli ailelerde yapılan çalışmalarda bütün varyasyonlara oranla % 95,2 oranında bulunmuştur^{15,65,68,83}.

Bu çalışmamızda, *MboII* restriksiyon enzimi ile kesilerek olgularda Gd Akdeniz mutasyonu bulunup bulunmadığına bakıldı. G6PD geninde 10 olgunun 4'ünde (% 40) Gd Akdeniz mutasyonu tespit edildi. Gd Akdeniz mutasyonunu, 3 ve 10 numaralı olguların hemizigot, 5 ve 6 numaralı olguların ise heterozigot olarak taşıdığı belirlendi. Bulduğumuz mutasyonların Gd Akdeniz mutasyonu olduğu, dizi analiziyle doğrulandı. Elde edilen bu veriler Tuli ve ark. Çukurova yöresinde yaptığı çalışmaların sonuçlarıyla karşılaştırıldığında; Tuli, Gd Akdeniz mutasyonunu tüm mutasyonlar içerisinde % 53 oranında bulmuştur^{84, 4}. Açıkbaş ve ark. Antalya'da 50 G6PD enzim eksikliği olan olgu üzerinde yapmış oldukları çalışmada % 70 oranında Gd Akdeniz mutasyonu tespit etmişler⁸⁵. Keskin ve ark. Denizli'de 1950 olgudan 24'ünde G6PD enzim eksikliği (% 1,23) ve PCR-RFLP yöntemiyle yaptıkları çalışmada Gd Akdeniz mutasyonunun tüm mutasyonlara oranının % 79 olduğunu bulmuşlardır¹²⁷. Bu verileri kendi sonuçlarımızla karşılaştırdığımızda farklılık olduğu görülmektedir. Bunun sebebi araştırmacıların farklı bölgelerde çalışması ve farklı sayılarda olgular üzerinde sonuçlar elde etmesidir. Ancak, çalışmamızda elde edilen sonuçlar Türkiye'nin farklı bölgelerindeki verilerle paralellik göstermektedir. Türkiye'de en sık görülen Gd Akdeniz mutasyonunun bizim çalışmamızda da en sık görülen mutasyon olduğu tespit edildi.

Elde edilen bulgular, bulunan mutasyonların Türkiye'de görülen mutasyonlarla özgülük gösterdiğine ve Gd Akdeniz'in ülkemizde en sık bulunan varyant olduğuna işaret etmektedir.

Kalıtsal metabolik hastalıklar, insan yaşamında doğrudan veya koşullara bağlı olarak değişik düzeylerde sağlık sorunlarına yol açmaktadır. Ancak, kalıtsal hastalıklarla ilgili güncel bilimsel bilgi ve teknolojinin doğru birleşimi oluşturulup uygulandığında, bu sağlık sorunlarının ortaya çıkması önlenmektedir. G6PD eksikliği bu tür kalıtsal metabolik hastalıklardan biridir. G6PD enzimi eksik olan kişilerin büyük bir kısmı asemptomatiktir. Klinik bulgu saptananlarda, en sık karşılaşılan yenidoğan sarılığı dışında hemolitik anemidir. Bazı ilaçların ve besinlerin alınımıyla ölümcül olabilen akut hemolitik krize yol açar. Ayrıca doğum sonrası gelişen ciddi yenidoğan sarılığının nedenlerinden biridir. Bununla beraber G6PD enzim eksikliğinin yol açtığı bu sağlık sorunları, risk altındaki aileler doğum öncesinde veya sonrasında erken tanı ile saptandığında önlenabilmektedir^{95, 116}.

Gelişen moleküler tanı yöntemleri sonucu DNA düzeyindeki çalışmalar çok hızlı kullanım alanı bulmuştur. G6PD enzim eksikliği genetik olarak heterojeniteye sahiptir. Aynı mutasyon farklı kişilerde farklı klinik belirti gösterdiği için bazı mutasyonlar hemolitik anemiye neden olurken, bazı olgularda ise hemoliz görülmemektedir^{27, 128}.

PFY kilit enzimi olan G6PD geni X kromozomunun q28 bölgesinde yer almakta ve 13 eksondan oluşmaktadır. Genin transkripsiyon veya translasyona bağlı hatalı sentezi veya posttranslasyonel dönemdeki bozukluğu enzim eksikliğine neden olmaktadır. Bu durum özellikle eritrositlerde oksidan ilaç ve maddelere maruz kalındığında hemolitik anemiye neden olmaktadır^{44, 68}. G6PD enzim aktivitesi düşük olan hastaların oksidan ajanlara maruz kalması durumunda bazılarının etkilendiği, bazılarının etkilenmediği görülmüştür. Bu durumu açıklığa kavuşturabilmek amacıyla tetikleyici faktörler olan mRNA'ların gen ekspresyon düzeyleri irdelenmiştir.

Çalışmamızda G6PD enzim aktivitesi referans değerlerden düşük veya sıfır olan olgularda gen ekspresyonu yapıldı ve mRNA ekspresyon seviyeleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ formülüne göre hesaplandı. Buna göre bu değerler 0,2 – 17,02 arasında, $\bar{x} \pm SD$ değeri $3,33 \pm 5,39$ bulundu. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda ise, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ile K_{mNADP} arasında yüksek düzeyde, anlamlı pozitif bir ilişki olduğu, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ile K_{mG6P} arasında orta düzeyde, anlamlı pozitif bir ilişki olduğu belirlendi¹⁰⁹. Bu durum, G6PD enziminin substrat bağlanma bölgelerinde meydana gelebilecek değişikliğin, genin ekspresyonda da birtakım farklılığa neden olduğunu düşündürmektedir.

Tüm bu bilgiler, bize G6PD enziminin canlılar için hayati bir önem taşıdığını ve inhibisyonu durumunda çok ciddi sağlık problemleri ortaya çıktığını gösterir. Bu durum yaptığımız çalışmanın önemini ortaya koymaktadır.

Bizim çalışmamızdaki sonuçlarla diğer çalışmaların sonuçlarındaki farklılıklar hasta seçim kriterlerine bağlı olabileceği gibi bölgemize spesifik mutasyonların da olabileceğini düşündürmektedir. Bu sebeple çalışmamızın devamında olgularımızın G6PD genlerinde mutasyonlarını belirleyip daha sonra gen ekspresyonu yapılması düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. G6PD enzim aktivitesi referans değerlerden düşük veya sıfır olan olgularda yapılan Gd Akdeniz mutasyonu tarama sonucunda 10 olgudan 4'ünde Gd Akdeniz mutasyonu bulunmuştur.
2. Gd Akdeniz mutasyonu olan olguların kinetik bulgularının WHO-G6PD tarafından verilen referans aralığına yakın değerlerde olduğu gözlenmiştir. Gd Akdeniz'in bildirilen kinetik özelliklerine, Gd Akdeniz mutasyonu olup G6PD aktivitesi 0 olan K.E.K. olgusu uyum sağlamıştır.
3. Olguların; enzim aktivitesi, doğal substratlarına olan ilgileri (K_m), analog kullanımları ile gen ekspresyonları arasındaki ilişki incelenmiştir.
4. Olguların G6PD enzim aktivitesi ile kinetik özellikleri arasında bir ilişki bulunamamıştır.
5. G6PD gen ekspresyonu sonucu elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri ile, enzimin doğal substratı olan $NADP^{+}$ 'ye ilgisi olan K_{mNADP} arasında yüksek düzeyde, anlamlı pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir.
6. G6PD gen ekspresyonu sonucu elde edilen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değeri ile enzimin diğer bir doğal substratı olan G6P'ye ilgisi olan K_{mG6P} arasında orta düzeyde, anlamlı pozitif bir ilişki olduğu belirlenmiştir. Bu ilişki Korelasyon analizi ile bize neden sonuç bilgisi vermeyip, değişkenlerimiz arasındaki ilişkinin miktarı ve yönü hakkında bilgi vermektedir. Daha ileri çalışma olarak daha fazla örnek sayısı ile G6PD gen ekspresyonları irdelenecektir.
7. Oksidatif ajanlara maruz kalma durumunda, bir kısım G6PD enzim eksikliği olan kişilerin etkilenip, bir kısmının etkilenmemesi durumunu G6PD geninin mRNA'larının ekspresyonu boyutunda inceleyerek farklı bir bakış açısı kazandırılmıştır. G6PD enziminin substrat bağlanma bölgesinin post-transkripsiyonel veya post-translasyonel modifikasyon geçirmiş olabileceğini düşündürmektedir.
8. Daha ileri çalışma olarak daha fazla olguda önce G6PD mutasyon tayini yapıp daha sonra G6PD gen ekspresyonları arasındaki ilişki incelenmelidir.

KAYNAKLAR

1. **Minucci, A., et al.**, Description of a novel missense mutation of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene associated with asymptomatic high enzyme deficiency. Clin Biochem, 2007. 40(12): **856-8**.
2. **Vives-Corrons, J.L., et al.**, Molecular genetics of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) Mediterranean variant and description of a new G6PD mutant, G6PD Andalus1361A. Am J Hum Genet, 1990. 47(3): **575-9**.
3. **Farez-Vidal, M.E., et al.**, Multi-mutational analysis of fifteen common mutations of the glucose 6-phosphate dehydrogenase gene in the Mediterranean population. Clin Chim Acta, 2008. 395(1-2): **94-8**.
4. **Yuregir, G.T., et al.**, Studies on red cell glucose-6-phosphate dehydrogenase: evaluation of reference values. Ann Clin Biochem, 1994. 31 (Pt 1)**50-5**.
5. **Egesie, O.J., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) activity and deficiency in a population of Nigerian males resident in Jos. Niger J Physiol Sci, 2008. 23(1-2): **9-11**.
6. **Luzzatto, L.**, Glucose 6-phosphate dehydrogenase: genetic and haematological aspects. Cell Biochem Funct, 1987. 5(2): **101-7**.
7. **Pamba, A., et al.**, Clinical spectrum and severity of hemolytic anemia in glucose 6-phosphate dehydrogenase-deficient children receiving dapsone. Blood, 2012. 120(20): **4123-33**.
8. **Costa, S., et al.**, Severe hyperbilirubinemia in a glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient preterm neonate: could prematurity be the main responsible factor? Fetal Diagn Ther, 2008. 24(4): **440-3**.
9. **Riskin, A., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and borderline deficiency: association with neonatal hyperbilirubinemia. J Pediatr, 2012. 161(2): **191-6 e1**.
10. **Ohara, N., et al.**, Different effects of 26-week dietary intake of rapeseed oil and soybean oil on plasma lipid levels, glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and cyclooxygenase-2 expression in spontaneously hypertensive rats. Food Chem Toxicol, 2008. 46(7): **2573-9**.
11. **Shin, E.S., et al.**, Catechin gallates are NADP⁺-competitive inhibitors of glucose-6-phosphate dehydrogenase and other enzymes that employ NADP⁺ as a coenzyme. Bioorg Med Chem, 2008. 16(7): **3580-6**.
12. **Kohan, A.B., et al.**, A role for AMPK in the inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase by polyunsaturated fatty acids. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 388(1): **117-21**.

13. **Cyphert, T.J., et al.**, Starvation actively inhibits splicing of glucose-6-phosphate dehydrogenase mRNA via a bifunctional ESE/ESS element bound by hnRNP K. *Biochim Biophys Acta*, 2013. 1829(9): **905-15**.
14. **Walsh, C.M., et al.**, Serine arginine splicing factor 3 is involved in enhanced splicing of glucose-6-phosphate dehydrogenase RNA in response to nutrients and hormones in liver. *J Biol Chem*, 2013. 288(4): **2816-28**.
15. **Gupta, S., A.T. Cordeiro, and P.A. Michels**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase is the target for the trypanocidal action of human steroids. *Mol Biochem Parasitol*, 2011. 176(2): **112-5**.
16. **Wang, X.T. and P.C. Engel**, Clinical mutants of human glucose 6-phosphate dehydrogenase: impairment of NADP(+) binding affects both folding and stability. *Biochim Biophys Acta*, 2009. 1792(8): **804-9**.
17. **Lin, X.L., et al.**, [Investigation of Coptis chinensis on jaundice of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficient neonates from Guigang, Guangxi province]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2007. 32(23): **2543-6**.
18. **Ko, C.H., et al.**, Oxidative challenge and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity of preterm and term neonatal red blood cells. *Neonatology*, 2009. 96(2): **96-101**.
19. **Kotwal, R.S., et al.**, Central retinal vein occlusion in an Army Ranger with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J Spec Oper Med*, 2009. 9(3): **59-63**.
20. **Nkhoma, E.T., et al.**, The global prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a systematic review and meta-analysis. *Blood Cells Mol Dis*, 2009. 42(3): **267-78**.
21. **Badejoko, B.O., et al.**, Early neonatal bilirubin, hematocrit, and glucose-6-phosphate dehydrogenase status. *Pediatrics*, 2014. 134(4): **e1082-8**.
22. **das Neves, L.C., A. Pessoa, Jr., and M. Vitolo**, Fed-batch production of glucose 6-phosphate dehydrogenase using recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007. 137-140(1-12): **711-20**.
23. **Chien, Y.H., et al.**, Changes in incidence and sex ratio of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency by population drift in Taiwan. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2008. 39(1): **154-61**.
24. **de Gurrola, G.C., et al.**, Kernicterus by glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a case report and review of the literature. *J Med Case Rep*, 2008. **2146**.
25. **Chao, L.T., et al.**, A to G substitution identified in exon 2 of the G6PD gene among G6PD deficient Chinese. *Nucleic Acids Res*, 1991. 19(21): **6056**.

26. **Tang, T.K., et al.**, Diverse point mutations result in glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) polymorphism in Taiwan. *Blood*, 1992. 79(8): **2135-40**.
27. **van Bruggen, R., et al.**, Deletion of leucine 61 in glucose-6-phosphate dehydrogenase leads to chronic nonspherocytic anemia, granulocyte dysfunction, and increased susceptibility to infections. *Blood*, 2002. 100(3): **1026-30**.
28. **Fujii, H., et al.**, Hematologically important mutations: Molecular abnormalities of glucose phosphate isomerase deficiency. *Blood Cells Molecules and Diseases*, 1996. 22(9): **96-97**.
29. **Yang, Y., et al.**, A cytosolic glucose-6-phosphate dehydrogenase gene, ScG6PDH, plays a positive role in response to various abiotic stresses in sugarcane. *Sci Rep*, 2014. **47090**.
30. **Fujii, H., et al.**, Hematologically important mutations: molecular abnormalities of glucose phosphate isomerase deficiency. *Blood Cells Mol Dis*, 1996. 22(2): **96-7**.
31. **Kanno, H., et al.**, Molecular analysis of glucose phosphate isomerase deficiency associated with hereditary hemolytic anemia. *Blood*, 1996. 88(6): **2321-5**.
32. **Hassan, K.S., et al.**, Methemoglobinemia in an elderly patient with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a case report. *Oman Med J*, 2014. 29(2): **135-7**.
33. **Ahmadi, A.H. and Z. Ghazizadeh**, Evaluation of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency without hemolysis in icteric newborns at Mazandaran province, Iran. *Pak J Biol Sci*, 2008. 11(10): **1394-7**.
34. **Ozbay Hosnut, F., et al.**, Etiology of hemolysis in two patients with hepatitis A infection: glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency or autoimmune hemolytic anemia. *Eur J Pediatr*, 2008. 167(12): **1435-9**.
35. **Ortega-Camarillo, C., et al.**, Changes in the glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in granulosa cells during follicular atresia in ewes. *Reproduction*, 2009. 137(6): **979-86**.
36. **Cao, A., et al.**, Thalassaemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase screening in 13- to 14-year-old students of the Sardinian population: preliminary findings. *Community Genet*, 2008. 11(3): **121-8**.
37. **Chan, D.K.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: correlation between the genotype, biochemistry and phenotype. *Ann Acad Med Singapore*, 2008. 37(12 Suppl): **81-3**.
38. **Tuli, A.**, Çukurova'da Saptanan G6PD Varyantlarının Mutasyon Noktalarının Moleküler Düzeyde Saptanması. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya AD Doktora Tezi, 1994.

39. **Kotaka, M., et al.**, Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase, *Biological Crystallography*, 2005. 10(2). **0907-4449**
40. **Ozlu, F., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity, structure, molecular characteristics and role in neonatal hyperbilirubinemia in cord blood in Cukurova region. *Turk J Pediatr*, 2011. 53(2): **130-6**.
41. **Zhang, C., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a biomarker and potential therapeutic target for cancer. *Anticancer Agents Med Chem*, 2014. 14(2): **280-9**.
42. **Wang, X.T., et al.**, What is the role of the second "structural" NADP⁺-binding site in human glucose 6-phosphate dehydrogenase? *Protein Sci*, 2008. 17(8): **1403-11**.
43. **Chen, X.W., et al.**, [Genetic diagnosis for female carriers of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency by RT-PCR-DGGE]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*, 2009. 11(8): **613-6**.
44. **Uyama, T., et al.**, Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in the Pentose Phosphate Pathway Is Localized in Vanadocytes of the Vanadium-Rich Ascidian, *Ascidia sydneiensis samea*. *Zoolog Sci*, 1998. 15(4): **441-6**.
45. **Gupte, S.A.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a novel therapeutic target in cardiovascular diseases. *Curr Opin Investig Drugs*, 2008. 9(9): **993-1000**.
46. **Man, A.K. and N.Y. Woo**, Upregulation of metallothionein and glucose-6-phosphate dehydrogenase expression in silver sea bream, *Sparus sarba* exposed to sublethal levels of cadmium. *Aquat Toxicol*, 2008. 89(4): **214-21**.
47. **Zhang, Z., et al.**, Increasing glucose 6-phosphate dehydrogenase activity restores redox balance in vascular endothelial cells exposed to high glucose. *PLoS One*, 2012. 7(11): **e49128**.
48. **Doherty, A.N., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity levels in white newborn infants. *J Pediatr*, 2014. 164(6): **1416-20**.
49. **von Fricken, M.E., et al.**, Performance of the CareStart glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) rapid diagnostic test in Gressier, Haiti. *Am J Trop Med Hyg*, 2014. 91(1): **77-80**.
50. **Gao, L., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Parkinson's disease. *J Neurol*, 2008. 255(11): **1850-1**.
51. **Yego, E.C., et al.**, Differential regulation of high glucose-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation in Muller cells by IL-1 β and IL-6. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. 50(4): **1920-8**.

52. **Obiol-Pardo, C., et al.**, Design of an interface peptide as new inhibitor of human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J Mol Graph Model*, 2014. 49**110-7**.
53. **Ozcicek, F., et al.**, The investigation of plasma glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6-phosphogluconate dehydrogenase, glutathione reductase in premenopausal patients with iron deficiency anemia. *Pak J Med Sci*, 2014. 30(4): **809-913**.
54. **Paglialunga, F., et al.**, G6PD is indispensable for erythropoiesis after the embryonic-adult hemoglobin switch. *Blood*, 2004. 104(10): **3148-52**.
55. **Gupte, R.S., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase is a regulator of vascular smooth muscle contraction. *Antioxid Redox Signal*, 2011. 14(4): **543-58**.
56. **Lei, S., et al.**, Alterations in energy/redox metabolism induced by mitochondrial and environmental toxins: a specific role for glucose-6-phosphate-dehydrogenase and the pentose phosphate pathway in paraquat toxicity. *ACS Chem Biol*, 2014. 9(9): **2032-48**.
57. **Ho, H.Y., M.L. Cheng, and D.T. Chiu**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase--beyond the realm of red cell biology. *Free Radic Res*, 2014. 48(9): **1028-48**.
58. **Yang, H., et al.**, Incidence and molecular characterization of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase deficiency among neonates for newborn screening in Chaozhou, China. *Int J Lab Hematol*, 2014
59. **Martini, G., et al.**, Structural analysis of the X-linked gene encoding human glucose 6-phosphate dehydrogenase. *EMBO J*, 1986. 5(8): **1849-55**.
60. **Alfinito, F., et al.**, Molecular characterization of G6PD deficiency in Southern Italy: heterogeneity, correlation genotype-phenotype and description of a new variant (G6PD Neapolis). *Br J Haematol*, 1997. 98(1): **41-6**.
61. **Cai, W., et al.**, [Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Han and Li nationalities in Hainan, China and identification of a new mutation in human G6PD gene]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2001. 18(2): **105-9**.
62. **Persico, M.G., et al.**, Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region. *Nucleic Acids Res*, 1986. 14(6): **2511-22**.
63. **Wu, T., et al.**, [Molecular epidemiology analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene mutations among infertile patients in Shenzhen]. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi*, 2014. 31(5): **641-5**.
64. **Mazieres, S., et al.**, Subtle adjustments of the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutation database and reference sequence. *Blood Cells Mol Dis*, 2014. 52(1): **55-6**.

65. **Shah, S.S., et al.**, Genetic determinants of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity in Kenya. *BMC Med Genet*, 2014. 15(1): **93**.
66. **Filosa, S., et al.**, Molecular basis of chronic non-spherocytic haemolytic anaemia: a new G6PD variant (393 Arg----His) with abnormal K_m G6P and marked in vivo instability. *Br J Haematol*, 1992. 80(1): **111-6**.
67. **Vulliamy, T., et al.**, Independent origin of single and double mutations in the human glucose 6-phosphate dehydrogenase gene. *Hum Mutat*, 1996. 8(4): **311-8**.
68. **Filosa, S., et al.**, G6PD haplotypes spanning Xq28 from F8C to red/green color vision. *Genomics*, 1993. 17(1): **6-14**.
69. **Akkemik, E., H. Budak, and M. Ciftci**, Effects of some drugs on human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase: an in vitro study. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2010. 25(6): **871-5**.
70. **Cai, W., S. Filosa, and G. Martini**, DNA haplotypes in the G6PD gene cluster studied in the Chinese Li population and their relationship to G6PDCanton. *Hum Hered*, 1994. 44(5): **279-86**.
71. **Al-Abdi, S.Y., et al.**, Hyperbilirubinemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient male newborns in Al-Ahsa, Saudi Arabia. *Saudi Med J*, 2010. 31(2): **175-9**.
72. **Sahin, A., et al.**, The effects of chemical and radioactive properties of Tl-201 on human erythrocyte glucose 6-phosphate dehydrogenase activity. *Nucl Med Biol*, 2010. 37(3): **389-94**.
73. **Abdel Fattah, M., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase and red cell pyruvate kinase deficiency in neonatal jaundice cases in egypt. *Pediatr Hematol Oncol*, 2010. 27(4): **262-71**.
74. **Bashiri, G., et al.**, Crystal structures of F420-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase FGD1 involved in the activation of the anti-tuberculosis drug candidate PA-824 reveal the basis of coenzyme and substrate binding. *J Biol Chem*, 2008. 283(25): **17531-41**.
75. **Brandt, O., et al.**, Peas, beans, and the Pythagorean theorem - the relevance of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2008. 6(7): **534-9**.
76. **Ravi Kumar, G.V., et al.**, Sequencing, characterization and genetic variation of the Bos indicus glucose-6-phosphate-dehydrogenase gene. *DNA Seq*, 2008. 19(1): **37-43**.
77. **Wang, J., et al.**, Nine different glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) variants in a Malaysian population with Malay, Chinese, Indian and Orang Asli (aboriginal Malaysian) backgrounds. *Acta Med Okayama*, 2008. 62(5): **327-32**.

78. **Suga, Y., et al.**, A new glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency variant, G6PD Mizushima, showing increases in serum ferritin and cytosol leucine aminopeptidase levels. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2011. 33(1): **15-7**.
79. **Al-Sweedan, S.A. and N. Awwad**, Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among Jordanians. *Acta Haematol*, 2012. 128(4): **195-202**.
80. Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group. *Bull World Health Organ*, 1989. 67(6): **601-11**.
81. **Kempinska-Podhorodecka, A., et al.**, Analysis of the genetic variants of glucose-6-phosphate dehydrogenase in inhabitants of the 4th Nile cataract region in Sudan. *Blood Cells Mol Dis*, 2013. 50(2): **115-8**.
82. **Santana, M.S., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants are associated with reduced susceptibility to malaria in the Brazilian Amazon. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2013. 107(5): **301-6**.
83. **Tian, P.L., et al.**, [Identification of glucose-6-phosphate dehydrogenase gene variants in Guangdong populations]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, 2013. 34(8): **719-21**.
84. **Al-Azzam, S.I., et al.**, An audit of the precipitating factors for haemolytic crisis among glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient paediatric patients. *J Med Screen*, 2009. 16(4): **167-9**.
85. **Albertsen, J., et al.**, Fatal haemolytic crisis with microvascular pulmonary obstruction mimicking a pulmonary embolism in a young African man with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *BMJ Case Rep*, 2014. 2014
86. **Millimono, T.S., et al.**, High prevalence of hemoglobin disorders and glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the Republic of Guinea (West Africa). *Hemoglobin*, 2012. 36(1): **25-37**.
87. **Topal, A., et al.**, Apoptotic effects and glucose-6-phosphate dehydrogenase responses in liver and gill tissues of rainbow trout treated with chlorpyrifos. *Tissue Cell*, 2014. 46(6): **490-496**.
88. **von Fricken, M.E., et al.**, Prevalence of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the Ouest and Sud-Est departments of Haiti. *Acta Trop*, 2014. 135**62-6**.
89. **Garcia-Magallanes, N., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in northern Mexico and description of a novel mutation. *J Genet*, 2014. 93(2): **325-30**.
90. **Yanola, J., C. Kongpan, and S. Pornprasert**, Prevalence of anemia, iron deficiency, thalassemia and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among hill-tribe school children in Omkoi District, Chiang Mai Province, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2014. 45(4): **920-5**.

91. **Verma, A., et al.**, Molecular cloning and characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Brugia malayi*. *Parasitology*, 2013. 140(7): **897-906**.
92. **Rochford, R., et al.**, Humanized mouse model of glucose 6-phosphate dehydrogenase deficiency for in vivo assessment of hemolytic toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013. 110(43): **17486-91**.
93. **Eziefula, A.C., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase status and risk of hemolysis in *Plasmodium falciparum*-infected African children receiving single-dose primaquine. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014. 58(8): **4971-3**.
94. **Elyassi, A.R. and H.H. Rowshan**, Perioperative management of the glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patient: a review of literature. *Anesth Prog*, 2009. 56(3): **86-91**.
95. **Beutler, E. and T.J. Vulliamy**, Hematologically important mutations: glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells Mol Dis*, 2002. 28(2): **93-103**.
96. **Xu, W. and E. Beutler**, The characterization of gene mutations for human glucose phosphate isomerase deficiency associated with chronic hemolytic anemia. *J Clin Invest*, 1994. 94(6): **2326-9**.
97. **Akoglu, T., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Cukurova Province, Turkey. *Int J Epidemiol*, 1981. 10(1): **27-9**.
98. **Aksoy, K., et al.**, 3 New G6pd Variants, G6pd Adana, G6pd Samandag, and G6pd Balcali in Cukurova, Turkey. *Human Genetics*, 1987. 76(2): **199-201**.
99. **Yuregir, G.T., et al.**, Studies on Red-Cell Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase - Evaluation of Reference Values. *Annals of Clinical Biochemistry*, 1994. 31**50-55**.
100. **Turan, Y.**, Prevalence of erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency in the population of western Turkey. *Arch Med Res*, 2006. 37(7): **880-2**.
101. **Beutler, E., O. Duron, and B.M. Kelly**, Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med*, 1963. 61**882-8**.
102. **Rendon, J.L., et al.**, Glucose 6-phosphate dehydrogenase from larval *Taenia crassiceps* (cysticerci): purification and properties. *Parasitol Res*, 2008. 102(6): **1351-7**.
103. **Olavarria, K., D. Valdes, and R. Cabrera**, The cofactor preference of glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Escherichia coli*--modeling the physiological production of reduced cofactors. *FEBS J*, 2012. 279(13): **2296-309**.
104. **Theodorou, A.A., et al.**, Comparison between glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient and normal individuals after eccentric exercise. *Med Sci Sports Exerc*, 2010. 42(6): **1113-21**.

105. **Budak, H., et al.**, Expression of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in oxidative stress induced by long-term iron toxicity in rat liver. *J Biochem Mol Toxicol*, 2014. 28(5): **217-23**.
106. **Yenilmez, E.D.**, Anne Kanında Fetal Nükleik Asitlerle Prenatal Tanı Uygulaması. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya AD Doktora Tezi, 2010.
107. **Hu, H., et al.**, Changes in glucose-6-phosphate dehydrogenase expression results in altered behavior of HBV-associated liver cancer cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014. 307(6): **G611-22**.
108. **Chettimada, S., et al.**, Hypoxia-induced Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Over-Expression and -Activation in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells: Implication in Pulmonary Hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2014 **ajplung 00229 2014**.
109. **Arocho, A., et al.**, Validation of the 2-DeltaDeltaCt calculation as an alternate method of data analysis for quantitative PCR of BCR-ABL P210 transcripts. *Diagn Mol Pathol*, 2006. 15(1): **56-61**.
110. **Wilkinson, G.N.**, Statistical estimations in enzyme kinetics. *Biochem J*, 1961. 80 **324-32**.
111. **Al-Allawi, N., et al.**, Prevalence and molecular characterization of Glucose-6-Phosphate dehydrogenase deficient variants among the Kurdish population of Northern Iraq. *BMC Blood Disord*, 2010. 106.
112. **Al-Musawi, B.M., et al.**, Molecular characterization of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient variants in Baghdad city - Iraq. *BMC Blood Disord*, 2012. 124.
113. **Leong, A.**, Is there a need for neonatal screening of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in Canada? *McGill J Med*, 2007. 10(1): **31-4**.
114. **Sanna B., Durmaz A., Tuli A., Dikmen N.**, Gd B⁺ ve Gd Akdeniz Aktivitesi Üzerine Homosistein, Sistein ve N-Asetil Sistein Etkilerinin *in vitro* Koşullarda İncelenmesi. XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, 2011.
115. **Cossio-Gurrola, G., et al.**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) molecular variant deficiency: identification in Panama pediatric population. *Blood Cells Mol Dis*, 2010. 44(2): **115-6**.
116. **Mysore, V. and A.R. Al-Suwaid**, Efficacy of WHO regimens in the management of leprosy patients with G6PD deficiency. *International Journal of Leprosy and Other Mycobacterial Diseases*, 1999. 67(2): **159-161**.
117. **Aksoy, M., et al.**, Survey on haemoglobin variants, beta thalassaemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and haptoglobin types in Turks from western Thrace. *J Med Genet*, 1985. 22(4): **288-90**.

118. **Chalvam, R., et al.**, Molecular heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency among the tribals in Western India. *Blood Cells Mol Dis*, 2009. 43(2): **156-7**.
119. **Efferth, T., R. Osieka, and E. Beutler**, Molecular characterization of a German variant of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD Aachen). *Blood Cells Mol Dis*, 2000. 26(1): **101-4**.
120. **Hirono, A., H. Fujii, and S. Miwa**, Molecular abnormality of G6PD Konan and G6PD Ube, the most common glucose-6-phosphate dehydrogenase variants in Japan. *Hum Genet*, 1993. 91(5): **507-8**.
121. **Gaetani, G.F. and A.M. Ferraris**, Recent developments on Mediterranean G6PD. *Br J Haematol*, 1988. 68(1): **1-2**.
122. **Wagner, G., K. Bhatia, and P. Board**, Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency mutations in Papua New Guinea. *Hum Biol*, 1996. 68(3): **383-94**.
123. **Dikmen, N.**, Kordon Kanında G6PD Varyantlarının Araştırılması ve Kinetik Özelliklerinin İncelenmesi. Çukurova Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya AD Doktora Tezi, 1988.
124. **Eandi Eberle, S., et al.**, [Glucose 6 phosphate dehydrogenase deficiency: a case series]. *Arch Argent Pediatr*, 2011. 109(4): **354-6**.
125. **Arenas, A., et al.**, Chemical modification of lysozyme, glucose 6-phosphate dehydrogenase, and bovine eye lens proteins induced by peroxy radicals: role of oxidizable amino acid residues. *Chem Res Toxicol*, 2013. 26(1): **67-77**.
126. **Aksoy, M., G. Dincol, and S. Erdem**, Survey on haemoglobin variants, beta-thalassaemia, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and haptoglobin types in Turkish people living in Manavgat, Serik and Boztepe (Antalya). *Hum Hered*, 1980. 30(1): **3-6**.
127. **Keskin, N., et al.**, Incidence and molecular analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the province of Denizli, Turkey. *Med Sci Monit*, 2002. 8(6): **CR453-6**.
128. **Maffi, D., et al.**, Identification of G6PD Mediterranean mutation by amplification refractory mutation system. *Clinica Chimica Acta*, 2002. 321(1-2): **43-47**.

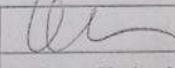
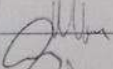
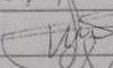
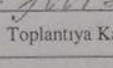
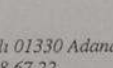
EKLER

Ek-1 Etik Kurul Onay Formu

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Tarih
14	6 Aralık 2012

KARAR NO 5- Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, Prof. Dr. Abdullah Tuli yönetiminde, Başak Sanna tarafından yürütülmesi öngörülen, "G6PD Aktivitesi Referans Değerleri Altında Olan Bireylerde Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması" başlıklı yüksek lisans tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi.

BAŞKAN	Doç Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Mülkiye Kasap Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Mehmet Kanadaşı Kardiyoloji Anabilim Dalı	
	Doç Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	
	Doç Dr Gülşah Seydaoğlu Biyoistatistik Anabilim Dalı	
	Doç Dr Suat Gezer Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	Toplantıya Katılmadı

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

Ek-2 Denek Bilgilendirme ve Rıza Olur Formu

Araştırmanın Yürütücüleri:

Prof. Dr. Abdullah TULİ

Yüksek Lisans Öğrencisi Başak SANNA

Prof. Dr. Abdullah TULİ ve Yüksek Lisans Öğrencisi Başak SANNA tarafından yürütülen “**G6PD Aktivitesi Referans Değerleri Altında Olan Bireylerde Gen Ekspresyonlarının Karşılaştırılması**” başlıklı çalışmamızda katılımcı olarak yer alacaksınız.

Bu çalışma çerçevesinde sizden alınacak kanların G6PD aktivite tayini yapıp G6PD gen ekspresyon düzeyleri RT-PCR yöntemi ile belirlenecektir. Sizden alınacak kan yukarıda bahsedilen amaçların dışında bir amaç için kullanılmayacaktır. Çalışma bilimsel bilgi birikimine katkı sağlamayı amaçlamakta olup, katılımcıya doğrudan bir yarar sağlamayacaktır. Elde edilen sonuçlar sadece bilimsel amaç için kullanılacak, kişisel bilgiler gizli tutulacaktır. Çalışmaya katılmama hakkınız ve istediğiniz zaman çalışmadan çekilme hakkınız bulunmaktadır.

Yukarıda, bana araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri gösteren metni okudum. Araştırma hakkında yeterli yazılı ve sözlü açıklama yapıldı. Bu koşullarda söz konusu Klinik Araştırma’ya rızamızla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyoruz.

Gönüllünün:

Adı Soyadı :

İmzası :

Adresi :

Tel :

Açıklamayı yapan araştırmacının:

Adı Soyadı :

İmzası :

ÖZGEÇMİŞ

30.07.1987 Adana doğumlu olup, ilk ve orta öğretimini burada yapmıştır. 2004-2009 yılları arasında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Lisans eğitimi yapmıştır. 2011 yılında Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başlamıştır.