

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

**β- TALASEMİ MOLEKÜLER TANISINDA
KLASİK YÖNTEMLERLE MİKROARRAY YÖNTEMİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Elçin ÖZKARALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**DANIŞMANI
Doç. Dr. Abdullah TULİ**

ADANA-2007

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

**β- TALASEMİ MOLEKÜLER TANISINDA
KLASİK YÖNTEMLERLE MİKROARRAY YÖNTEMİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

Elçin ÖZKARALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMANI

Doç. Dr. Abdullah TULİ

Bu tez, Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
TF2006YL6 nolu Proje Olarak Desteklenmiştir.

Tez No:

ADANA-2007

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans eğitimim süresince tez konumun belirlenmesi, şekillenmesi, yürütülmesi ve tez sürecinin organizasyonunda bilimsel çalışmaya yönlendiren ve destekleyen danışman hocam sayın Doç. Dr. Abdullah TULİ'ye ve diğer bölüm hocalarıma teşekkür ederim.

Tez çalışmamın deney aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen Biyokimya bölümü teknik elemanlarından Halil GÜLSEV, Mikail KALAYCI, Erdal ÖZDOLAP ve diğer çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tezimin basımı ve yürütülmesi aşamasında beni destekleyen Çukurova Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca beni her konuda destekleyen ve benim bu günlere gelmemi sağlayan aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Elçin ÖZKARALI

Adana-2007

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	x
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. Hemoglobinin Yapısı ve Özellikleri	3
2.2. β –Talasemi	7
2.2.1. β -Talasemik Mutasyon Tipleri	7
2.2.1.1. Gen Delesyonları	15
2.2.1.2. Transkripsiyonel Mutasyonlar	15
2.2.1.3. RNA İşleme Mutasyonları	15
2.2.1.3.1. Splice Kavşağındaki Mutasyonlar	15
2.2.1.3.2. Konsensus Dizi Değişikliklerine Neden Olan Mutasyonlar	16
2.2.1.3.3. İntronlardaki Değişiklikler	16
2.2.1.3.4. Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar	16
2.2.1.4. RNA Translasyon Mutasyonları	17
2.2.1.4.1. Anlamsız Mutasyonlar	17
2.2.1.4.2. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları	17
2.2.1.5. Dominant Geçen β -Talasemi ve Stabil Olmayan β Globin Varyantları	17
2.2.1.6. Başlık Bölgesi (CAP Site) Mutasyonları	17
2.2.1.7. Başlangıç Kodonu Mutasyonları	18
2.2.1.8. 3' UTR Mutasyonları	18
2.2.1.9. Poliadenilasyon Sinyal Mutasyonları	18
2.2.2. Türkiye’de β –Talasemi	18
2.3. β -Talasemi Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler	19
2.3.1. Klasik Moleküler Yöntemler	19
2.3.1.1. ARMS (Amplification Refractory Mutation System)	19
2.3.1.2. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	20
2.3.2. DNA Mikroarray Yöntemi	21
2.3.2.1. DNA Mikroarray Nedir?	21
2.3.2.2. Mikroarray Substratları	22
2.3.2.3. Mikroarray’in Kullanım Alanları	22
2.3.2.4. Mikroarray’in Avantajları	23
2.3.2.5. DNA Mikroarray’in Çalışma Prensipleri	24
2.3.2.5.1. Mutant ve Yabancı Tip İşaretleyici	25
2.3.2.5.2. Sabitleyici	26

3. GEREÇ VE YÖNTEM	27
3.1. Gereçler ve Kimyasal Maddeler	27
3.1.1. Gereçler	27
3.1.2. Kimyasal Maddeler	28
3.2. Örnek Toplama	28
3.3. Yöntemler	28
3.3.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu	28
3.3.1.1. Lökositten DNA İzolasyonu	29
3.3.2. ARMS Yöntemi ile Mutasyonların Belirlenmesi	30
3.3.2.1. Amplifikasyon Koşulları	31
3.3.3. DNA Mikroarray Yöntemi ile Mutasyonların Belirlenmesi	34
3.3.3.1. Amplifikasyon	34
3.3.3.2. Saflaştırma	36
3.3.3.3. Yükleme	37
3.3.3.4. Okutma	37
3.3.3.5. Analiz	37
4. BULGULAR	40
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇLAR	56
7. KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.	Hemoglobinin yapısı	3
Şekil 2.	Hem'in yapısı	4
Şekil 3.	Globin zincir sentezinin evreleri	6
Şekil 4.	İnsan hemoglobinlerinin genetik yapısı	7
Şekil 5.	Mikroarray çipi	24
Şekil 6.	Evrensel işaretleyici	25
Şekil 7.	Baz etkileşim enerjileri	26
Şekil 8.	Mikroarray analiz değerlendirmesinin şematik gösterimi	39
Şekil 9.	IVS I-110 mutasyon taraması için ARMS yöntemi ile yapılan amplifikasyonun %2'lik agaroz jeldeki görünümü	42
Şekil 10.	IVS I-1 mutasyon taraması için ARMS yöntemi ile yapılan amplifikasyonun %2'lik agaroz jeldeki görünümü	43
Şekil 11.	Oligo-mix 1 ile yapılan amplifikasyon kontrolünün %2'lik agaroz jeldeki görünümü	46
Şekil 12.	Oligo-mix 2 ile yapılan amplifikasyon kontrolünün %2'lik agaroz jeldeki görünümü	46
Şekil 13.	IVS I-110 için yapılan mikroarray analiz grafiği	47
Şekil 14.	IVS I-1 için yapılan mikroarray analiz grafiği	47

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.	Hemoglobin Tipleri	5
Çizelge 2.	Farklı etnik kökenlere özgü β talasemik mutasyon tipleri	8
Çizelge 3.	ARMS primerleri	32
Çizelge 4.	Amplikonlarda yer alan mutasyonlar	34
Çizelge 5.	Oligo-mix 1 ve Oligo-mix 2 çözeltilerinin içeriği	35
Çizelge 6.	Taq polimeraz stok çözelti dilüsyonları	36
Çizelge 7.	Olguların ARMS yöntemi sonucunda elde edilen β -talasemi mutasyon tipleri	40
Çizelge 8.	Olguların mikroarray çalışması sonucu elde edilen β -talasemi mutasyon tipleri	44
Çizelge 9.	Mutasyonlara ait allel sayıları	48

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ARMS	Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (Amplification Refractory Mutation System)
bç	Baz çifti
Cd	Kodon
cm	Santimetre
CO ₂	Karbondioksit
DGGE	Denatürasyon Gradient Jel Elektroforezi (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
dH ₂ O	Distile su
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotid Tri Fosfat
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
Fsc	Frameshift (Çerçeve Kayması)
Hb	Hemoglobin
<i>Hpa</i> I	Haemophilus parainfluenza I
mbar	Milibar
mRNA	Mesajcı Ribo Nükleik Asit
µL	Mikro litre
µM	Mikro Molar
µS	Mikro Siemens
nm	Nanometre
OD	Optik Dansite
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
RFLP	Restriksiyon Parçası Uzunluk Polimorfizmi (Restriction Fragment Length Polymorphism)
RNA	Ribo Nükleik Asit
SNP	Tekli Nükleotid Polimorfizmi (Single Nucleotide Polymorphism)
STR	Tekrar Eden Dizi Analizi (Short Tandem Repeat)
UV	Ultra Viole (mor ötesi)
pM	Piko Molar

ÖZET

β -Talasemi Moleküler Tanısında Klasik Yöntemlerle Mikroarray Yönteminin Karşılaştırılması

Talasemi, otozomal resesif olarak kalıtılan hematolojik bir hastalıktır. Çeşitli ülkelerde ve aynı ülkenin farklı bölgelerinde dağılım bakımından heterojenite göstermektedir. β talasemide, β geni üstünde veya etrafında meydana gelen mutasyonlar, beta globin zincir yapımının azalmasına ya da hiç sentez edilmemesine neden olur. β zincir yapımına göre β^0 ve β^+ olmak üzere iki tipi bulunmaktadır. β^0 talasemide hiç beta zinciri yapılmamaktadır. β^+ talasemi de ise az miktarda beta zinciri yapımı vardır. Türkiye’de en sıklıkla rastlanan β -talasemi mutasyonu IVS I-110’dur.

Bu çalışmada β -talasemi mutasyon tanısında kullanılan klasik yöntemlerle mikroarray yönteminin karşılaştırılması ve mikroarray teknolojisinin β -talasemi prenatal tanısında kullanımına yönelik bir ön çalışma yapılması amaçlanmıştır. Taşıyıcı ve hastalarda talasemi mutasyon tiplerinin saptanmasında ARMS ve DNA mikroarray yöntemleri kullanılmıştır. Örnekler toplam 52 kişiden sağlanmıştır. Tüm örnekler hem ARMS hem de mikroarray yöntemleri için ayrı ayrı çalışılmış ve mutasyon taraması sonucunda her iki yöntemle de aynı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışma sonucunda; 23 allelin IVS I-110, 13 allelin IVS I-1, 9 allelin IVS I-6, 9 allelin IVS II-1, 8 allelin Cd39 ve 6 allelin IVS II-745 mutasyonunu içerdiği gözlenmiştir. Ayrıca 13 olgunun homozigot, 3 olgunun da çift heterozigot özellik gösterdiği belirlenmiştir. Hiçbir olguda Cd6 ve -87 mutasyonları tespit edilememiştir.

Sonuç olarak DNA mikroarray yönteminin kullanılması ile klasik yöntemlere oranla daha hızlı sonuç elde edilmiş ve tek seferde çok sayıda örneği çalışma imkanı sağlanmıştır. Bu durum prenatal tanı için de kolaylık sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: ARMS, mikroarray, moleküler tanı, talasemi

ABSTRACT

Comparing of Microarray Techniques with Classical Techniques for Molecular Diagnosis of β -Thalassemia

Thalassemia is an hereditary hematological disorder inherited autosomal recessively. The distribution of thalassemia shows heterogeneity not only in various countries but also different regions of the same country. In β -thalassemia, mutations located in or around of beta gene cause a decrease in the production of beta globin chain or lack of synthesis. There are two types of β -thalassemia, β^0 and β^+ , according to the production of beta globin chain. In β^0 thalassemia, no beta chain is produced. In β^+ thalassemia, a small amount of beta chain production is present. In Turkey the most common β thalassemia mutation is IVS I-110.

With this study, we aimed to compare microarray techniques with classical techniques and to establish a method for the use of microarray technologies in prenatal diagnosis of β thalassemia. ARMS and DNA microarray methods are used for the detection of β thalassemia mutations in carriers and patients. Our samples were obtained from total 52 individuals. All samples were separately studied with both ARMS and microarray methods and the same results were also obtained in both methods after the mutation detection. At the end of this study, it is observed that allele numbers of IVS I-110, IVS I-1, IVS I-6, IVS II-1, Cd39 and IVS II-745 mutations were 23, 13, 9, 9, 8 and 6, respectively. Moreover, it is determined that 13 and 3 of cases were homozygote and double heterozygote, respectively. Cd6 and -87 mutations couldn't be determined in any cases.

In conclusion, more rapid results were obtained by using DNA microarray according to conventional methods and prenatal diagnosis is not only simplified by this method but also an opportunity is given for studying much more samples in a single experiment.

Key words: ARMS, microarray, molecular diagnosis, thalassemia

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Talasemiler, dünyada en sık görülen genetik bozukluklardır^{1,2}. Hemoglobinin tetramerini oluşturan globin zincirlerinin bir ya da daha fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğuna bağlı olarak ortaya çıkarlar. Talasemi otozomal resesif geçiş gösteren bir genetik hastalıktır³. Talasemi ilk kez 1925 yılında Detroitli pediatrist Dr. Thomas Cooley ve Pearl Lee tarafından şiddetli anemisi, dalak büyüklüğü ve karakteristik kemik değişiklikleri olan bir çocuk hastada tanımlanmıştır⁴. Önceleri sadece Akdeniz ülkelerinde yaygın olduğu sanıldığından adı, Yunanca “Thalas” (Akdeniz) sözcüğünden gelmektedir. Günümüzde ise Kuzey Afrika, Ortadoğu, Hindistan, Çin, Güneydoğu Asya gibi malaryanın sık olduğu ülkelerde, Avrupa ve Amerika’da yüksek oranlarda gözlenmektedir^{5,6}.

Dünya Sağlık Örgütü’nün yayınlarına göre dünyada talasemi ve anormal hemoglobin taşıyıcı sıklığı %5,1’dir ve yaklaşık 266 milyon taşıyıcı vardır⁷. Dünya nüfusunun %4,5’i talasemi taşıyıcısıdır⁸. Talasemi çeşitli ülkelerde ve aynı ülkenin farklı bölgelerinde dağılım bakımından heterojenite göstermektedir. Akdeniz bölgesinde, batıya doğru gidildikçe talasemi insidansı düşmeye başlar. İspanya’nın Bask bölgesinde %3,5, Yugoslavya’da ise %4,7’dir. Bulgaristan’da hastalık her bölgede görülürse de güneyde daha sıktır ve taşıyıcı sıklığı %30’a ulaşmaktadır. Kuzeydoğu Bulgaristan’da ise talasemi taşıyıcılığı %0,5-2,1 arasında değişmektedir. Azerbaycan’da %6,3-7,8, Özbekler’de %0,2-15, Dağıstan’da %3,2-16,8 arasında değişmektedir. Kıbrıs’ta talasemi taşıyıcılığı %15 civarındadır. Kuzey ve Orta İtalya’da β talasemi sıklığı %0,5-2 arasında değişirken güney Sardinya’da oran %27-30’a kadar çıkmaktadır. Aynı durum Yunanistan’da da söz konusudur⁹.

Türkiye’de talasemi ile ilgili çalışmalar 1957 yılında Muzaffer Aksoy ile başlamıştır. Çavdar ve Arcasoy tarafından talasemi sıklığını gösteren ilk çalışmalar yapılmış ve Türkiye insidansı %2,1 olarak bildirilmiştir. Bazı bölgelerde ise insidansın %0,6-12 arasında olduğu gösterilmiştir⁷. β talasemi mutasyonlarının moleküler düzeyde incelenmesi sonucunda Türkiye’de 30’dan fazla mutasyon tipi tespit edilmiştir. Türkiye’nin bölgeleri mutasyon tipleri açısından bölgesel farklılıklar göstermektedir.

Son yıllarda moleküler genetik alanındaki gelişmeler birçok kalıtsal hastalığın gen düzeyinde anlaşılmasını sağlamış, bunun sonucunda da bu hastalıkların tanısı DNA

düzeyinde yapılır hale gelmiştir. En önemli ve hızlı gelişme hemoglobinopatilerin moleküler mekanizmalarının ve mutasyonlarının anlaşılmasında olmuştur. Kazanılan bilgi birikimi ile yeni DNA analiz ve tanı yöntemleri geliştirilmiş; bunlar sadece çocuk ve erişkine değil fetal DNA'ya da uygulanabilecek hale gelmiştir. DNA analiz ve tanısında gittikçe daha basit, kolay, tekrarlanabilen, tek aşamalı, radyoaktivite gerektirmeyen, ekonomik ve tanı laboratuvarı ortamında da uygulanabilen yöntemler tercih edilmektedir. Tümü PCR'a dayalı olan bu yöntemler, talasemi ve anormal hemoglobinlerin taşıyıcı ve doğum öncesi erken tanısında hızlı, ekonomik ve kolay uygulanabilir olmaları dolayısı ile bir çığır açmış ve özellikle bu hastalıkların yaygın olarak görüldüğü toplumlarda önem kazanmışlardır. Bu yöntemler arasında; bilinen mutasyonların tespitinde kullanılan ARMS, RFLP ve bilinmeyen mutasyonların tespitinde kullanılan DNA dizi analizi yöntemi sayılabilir¹⁰.

Ayrıca son yıllarda kullanılmaya başlanan “mikroarray” (mikroçip) teknolojisi; hematolojik malignitelerin ön bilgi olmadan sınıflandırılmasında, yeni alt grupların belirlenmesinde, hastalığın tanısının doğru olarak yapılmasında, tedaviye cevabın ve hastalığın ilerlemesinin önceden belirlenmesinde ve en önemlisi tedavi için yeni hedeflerin bulunmasında büyük önem taşımaktadır. Mikroarray'ler, birçok biyolojik sistemde olduğu gibi, hematolojide de yüksek çıktılı gen ifade incelemeleri için rutin araç olmaya yönelik bir teknolojidir. Bu yöntemle, aynı anda pek çok genin ifadesi ile ilgili bilgi almak mümkündür. Kullanım alanları; gen ifade profillerinin araştırılması, mutasyon taraması ve analizi, genotipleme, genlerin ve klonların haritalanması, mikrobelesyon ve kromozomal aberasyonların tespiti olarak sıralanabilir. Mikroarray'lerin en önemli avantajları, aynı anda birçok gen ile ilgili bilgi alınması, hızlı sonuç elde edilmesi, az sayıda deney yapılması, güvenilir olması ve sistem kurulduktan sonra ucuz olmasıdır. Bu yöntem sayesinde β -talaseminin moleküler tanısında daha kesin sonuçlar elde edilmesi hedeflenmektedir¹¹.

Bu çalışmada da β -talasemi moleküler tanısında kullanılan klasik yöntemlerle mikroarray yönteminin karşılaştırılması ve mikroarray teknolojisinin β -talasemi prenatal tanısında kullanımına yönelik bir ön çalışma yapılması amaçlanmıştır.

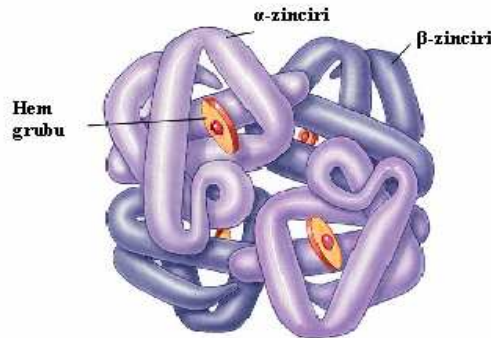
2.GENEL BİLGİ

Kalıtsal hemoglobin hastalıkları, insanlarda en yaygın olarak görülen tek gen bozukluklarıdır¹². Bunlar arasında oldukça geniş bir genetik yelpazeyi kapsayan talasemiler, hemoglobin tetramerini oluşturan globin zincirlerinin bir ya da daha fazlasının sentezindeki azalma veya tamamen yokluğuna bağlı olarak ortaya çıkarlar. Talasemiler sentezi bozulmuş olan globin zincirine göre α , β , γ , δ , $\delta\beta$, $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemi olarak adlandırılırlar. En sık görülen tipleri α ve β -talasemidir¹⁰. β talasemi otozomal resesif geçiş gösteren genetik hastalıklar arasında dünyada en sık görülenidir. Akdeniz, Orta Asya, Afrika'nın bazı bölümleri, Hindistan ve Asya başta olmak üzere dünyanın her yerinde yaygın olarak görülen hastalığa, karakteristik talasemi kuşağında bulunan ülkemizde de her bölgede rastlanabilmektedir. Türkiye prevalansı %2,1 olup yörelere göre değişiklik göstermektedir^{3,13-16}.

2.1.Hemoglobinin Yapısı ve Özellikleri

Hemoglobin, akciğerlerden çevre dokulara oksijen taşımaya ek olarak CO₂'nin dışarı atılmak üzere dokulardan akciğerlere taşınmasını da sağlayan bir proteindir¹⁷. En yüksek oranda akciğerden doku kapillerlerine oksijen taşınması fonksiyonu gördüğü eritrositlerde bulunur¹⁸.

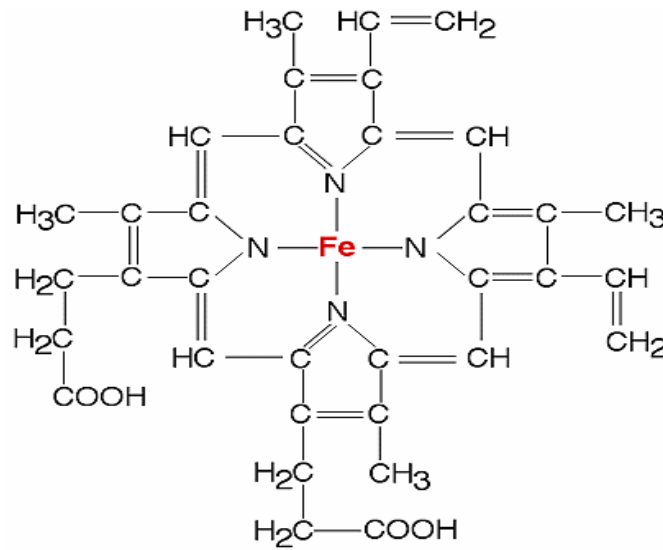
Hemoglobin, iki çift özdeş olmayan polipeptid zinciri ve dört molekül hem'den oluşan tetramer yapıda bir protein olup peptid zincirleri arasındaki etkileşimler ile bir arada tutulur¹⁹ (Şekil 1).



Şekil 1. Hemoglobinin yapısı²⁰

Moleküler ağırlığı 64500 dalton olan hemoglobin kabaca küresel yapıda olup yaklaşık 5,5 nm çapındadır²¹. Prostetik grup olarak halkalı bir tetrapirrol olan hem içerir¹⁷. Globüler hemoglobin molekülünün kompleks yapısındaki hem molekülü tüm insan hemoglobin tiplerinde aynı olup hidrofobik bir ortam oluşturan hem cepleri içerisinde yerleşmiştir¹⁹. Hem'in konjuge çift bağlardan oluşan yoğun ağ yapısı, görünür ışık spektrumunun alt ucundaki ışınları yutarak moleküle koyu kırmızı renk verir¹⁷.

Tetrapiroller düzlemsel bir halka içinde dört α -metenil köprüsü ile birbirine bağlanmış dört pirol molekülünden oluşmaktadır. Bu düzlemsel halkanın merkezinde bir ferruz demir atomu (Fe^{2+}) yer alır¹⁷. Demir, porfirin halkasının dört azotuyla bağlanarak hem molekülünün ortasında tutulur. Hemin Fe^{2+} 'i her biri düzlemsel porfirin halkasının ayrı tarafında olan iki bağ daha yapar (Şekil 2). Bu pozisyonlardan biri globin molekülünün bir histidin kalıntısının yan zinciri ile olurken, diğeri oksijen bağlamaya uygun olarak bulunur¹⁸. Oksijenin kanda taşınması O_2 'nin hemoglobinle geri dönüşümlü kombinasyonlar yapmasıyla sağlanır¹⁹.



Şekil 2. Hem'in yapısı²²

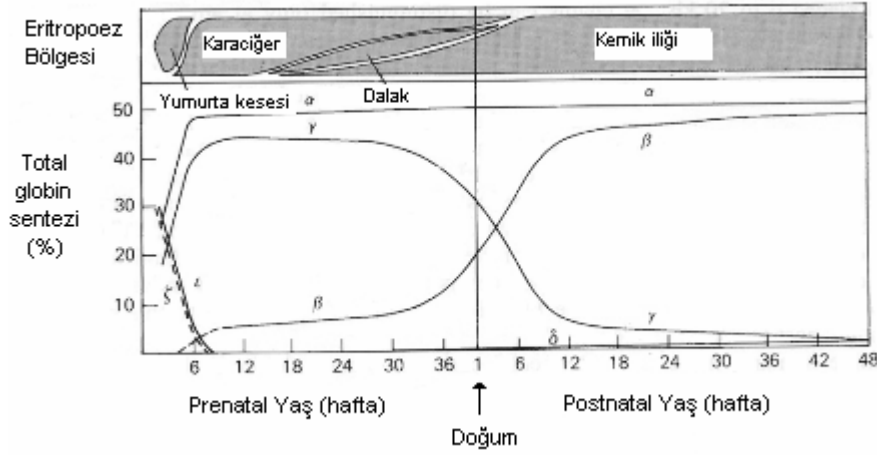
İnsanlarda α ve β olmak üzere iki gen kümesi, gelişim sırasında hemoglobinlerin sentezini yönetir. Bunlardan α gen lokusu; embriyonik ζ geni ve iki tane yetişkin α geninden oluşur iken, β gen lokusu ϵ , $G\gamma$, $A\gamma$, δ ve β genlerinden oluşmaktadır²³. Yetişkin hemoglobininin yaklaşık %96'sını oluşturan HbA, iki α ve iki β ($\alpha_2\beta_2$) olmak üzere 4 globin zincirinden oluşur. Minör erişkin hemoglobini olan HbA₂, iki α ve iki δ ($\alpha_2\delta_2$) zincirinden, fetal hemoglobin olan HbF ise iki α ve iki γ ($\alpha_2\gamma_2$) zincirinden oluşur²⁴⁻²⁸. Normal erişkin hemoglobinlerindeki α zinciri 141 aminoasit; β , γ , δ zincirleri ise 146 aminoasit içermektedir. Embriyonik gelişim sırasında tanımlanan hemoglobinler ise Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) ve Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$)'dır^{19, 27, 29} (Çizelge 1).

Çizelge 1. Hemoglobin Tipleri²⁹

İsim	Dönem	Formül	Erişkin Değeri
Hb Gower I	Embriyonik Hb	$\zeta_2\epsilon_2$	-
Hb Gower II	Embriyonik Hb	$\alpha_2\epsilon_2$	-
Hb Portland	Embriyonik Hb	$\zeta_2\gamma_2$	-
Hb F	Fetal Hb	$\alpha_2\gamma_2$	%1'den az
Hb A	Erişkin Hb	$\alpha_2\beta_2$	~ %96
Hb A ₂	Erişkin Hb	$\alpha_2\delta_2$	%2,5-3,5

Embriyonik hemoglobinler yumurta kesesinde eritrositler içerisinde bulunurlar ve gebeliğin 20. haftasına kadar kalırlar. Eritropoezin karaciğerde başlamasıyla fetal eritrositler oluşur^{30,31} (Şekil 3). Eritrosit içindeki hemoglobinin kompozisyonu, gebeliğin devrelerine bağlı olarak değişkenlik gösterir. Hemoglobin kompozisyonundaki bu değişiklik α ve β gen kümelerindeki bir dizi aktivasyon ve inaktivasyona bağlı olarak oluşur. Globin gen transkripsiyonundaki mekanizma henüz tam olarak açıklanamamıştır. Gebeliğin erken evrelerinde Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), Hb Gower I ($\zeta_2\epsilon_2$) ve Hb Gower II ($\alpha_2\epsilon_2$) baskın olarak tespit edilen embriyonik hemoglobinlerdir. Ancak çok az miktarda HbF ve HbA da vardır. Gebeliğin 10-11. haftalarında eritropoezin karaciğer ve dalakta başlaması ile embriyonik hemoglobinler azalarak kaybolur ve HbF ($\alpha_2\gamma_2$) yapımı başlar. HbF, gama

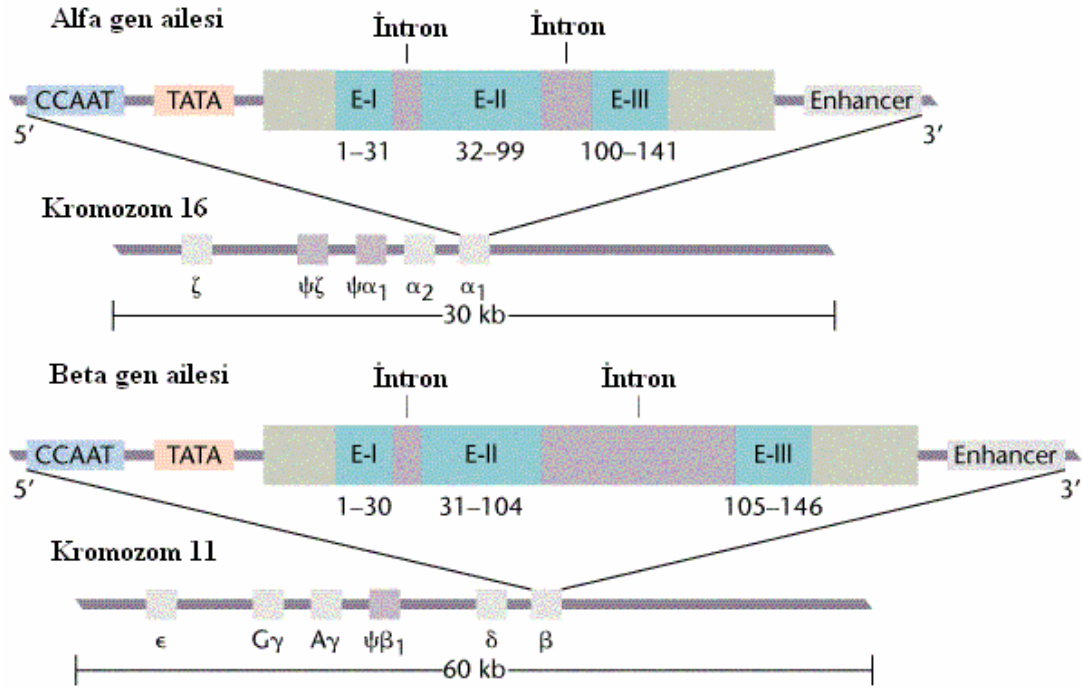
zincirinin 136. pozisyonunda Alanin içeren A γ veya Glisin içeren G γ olmak üzere iki farklı gama zincirine sahiptir. G γ /A γ oranı doğumda 3/1 iken beş aylıkken 2/3'e iner^{27, 29, 30}.



Şekil 3. Globin zincir sentezinin evreleri³¹

Hemoglobinin α ve β zincirlerinin genetik kontrolü iki ayrı gen kümesi tarafından yapılır. Bunlardan α gen kümesi 16. kromozomun kısa kolu, β gen kümesi ise 11. kromozomun kısa kolu üzerinde yer alır. Alfa gen kümesinde teta, $\alpha 1$, $\alpha 2$, psödo $\alpha 1$, psödo zeta ve zeta geni vardır. Beta gen kümesinde ise 5' bölgesinden itibaren bir adet embriyonik epsilon, G γ , A γ genleri, psödobeta, delta ve beta genleri bulunmaktadır^{19,32,34} (Şekil 4).

Her bir globin geninde 3 ekson ve 2 intron bulunmaktadır. Globin zincirini şifreleyen dizilerin olduğu gen bölgelerine ekson, proteine dönüşmeyen dizileri içeren bölgelere ise intron denilmektedir^{30,33}. Translasyona uğramamasına rağmen 5' ve 3' bölgelerindeki diziler oldukça önemli olup gen ekspresyonunda rol oynarlar. Promotor bölge ise transkripsiyonun başladığı bölgenin önünde 100 baz çiftlik bir alanı kaplar^{27, 32}.



Şekil 4. İnsan hemoglobinlerinin genetik yapısı³⁴

2.2. β –Talasemi

β talasemi, β zincir yapımının azalması veya yokluğu ile karakterize olan kalıtsal hematolojik bir hastalıktır. β globin sentezinin azalması β^+ talasemi, yokluğu ise β^0 talasemi olarak adlandırılır^{6,8}. Günümüzde β -talasemiye yol açan moleküler bozukluklar oldukça iyi bir şekilde incelenmiş ve hastalığın en önemli nedeninin, β -talasemide görülen büyük delesyonlar değil, gen içindeki nokta mutasyonları olduğu anlaşılmıştır. Bu mutasyonların ilk 40'ı β -globin geninin klonlanmasını takiben, DNA dizi analizi ile tanımlandıktan sonra 1987 yılında rutin kullanıma giren PCR yöntemi ve direkt DNA dizi analizi ile belirlenmiştir. Son 20 yılda ise β -talasemiye yol açtığı bilinen mutasyonların sayısı büyük bir hızla artmış ve 200'ü geçmiştir¹⁰.

2.2.1. β -Talasemik Mutasyon Tipleri

Talasemi, β globin genindeki mutasyonlar sonucu oluşan bir hastalıktır. Bunların büyük bir kısmını nokta mutasyonları oluştururken daha az oranda delesyonlar

oluşturmaktadır. Nokta mutasyonları RNA transkripsiyonunun başlamasını, RNA işlenmesini ve RNA stabilitesini önleyerek normal RNA globin sentezini önler. Buna karşın frameshift veya zincir mutasyonları translasyonu bloke eder³⁵. Mutasyonlar genellikle coğrafik ve etnik bir dağılım göstermektedir¹⁰. Farklı etnik kökenlere özgü β -talasemi mutasyon tiplerinin dağılımı Çizelge 2’de gösterilmiştir³⁶.

Hastalık genellikle transfüzyona bağımlı ağır hemolitik anemi (Cooley’s anemisi) şeklinde homozigotlarda ortaya çıkmaktadır. β globin geninde β talasemiye neden olan en az 90 mutasyonun tespit edilmesine rağmen, hastalığın yaygın olarak görüldüğü her bir etnik grupta bu mutasyonların bir grubu bulunmaktadır³⁷.

β zincir yapımına göre β^0 ve β^+ olmak üzere iki tipi vardır. β^0 talasemide hiç beta zinciri yapılmamaktadır. Homozigot hastalarda HbA₂ ve HbF vardır. β^+ talasemi de ise anormal de olsa az miktarda beta zinciri yapımı vardır. Homozigot hastalarda normalin altında HbA yapımı vardır³⁸.

Çizelge 2. Farklı etnik kökenlere özgü β talasemik mutasyon tipleri³⁶

Mutasyon	Fenotip	Etnik köken
Transkripsiyonel Mutasyonlar		
-101 (C→T)	β^+	Türkler, Bulgarlar,İtalyanlar
-92 (C→T)	β^+	Akdenizliler
-90 (C→T)	β^+	Portekizliler
-88 (C→T)	β^+	Zenci popülasyonu
-88 (C→A)	β^+	Kürtler
-87 (C→G)	β^+	Akdenizliler
-87 (C→A)	β^+	Amerikalı zenciler
-87 (C→T)	β^+	Almanlar, İtalyanlar
-86 (C→A)	β^+	İtalyanlar
-86 (C→G)	β^+	Lübnanlılar, Thai
-32 (C→A)	β^+	Tayvanlılar
-31 (A→C)	β^+	İtalyanlar

-31 (A→G)	β^+	Japonlar
-30 (T→A)	β^+	Türkler, Bulgarlar, Makedonlar
-30 (T→C)	β^+	Çinliler
-29 (A→G)	β^+	Amerikalı zenciler, Çinliler
-28 (A→C)	β^+	Kürtler
-28 (A→G)	β^+	Çinliler
+10, -T	β^+	Yunanlılar
+22, (G→A)	β^+	Türkler, Bulgarlar, İtalyanlar
+33, (C→G)	β^+	Kıbrıslı Yunanlılar
+43'den +40'a -AAAC	β^+	Çinliler
RNA İşlenmesi ile İlgili Mutasyonlar / Splice Kavşağındaki Mutasyonlar		
IVS I (-3), (C→T) (Kodon29; Gly→Gly)	β^+	Lübnanlılar
IVS I (-2), (A→G) (Kodon30; Arg→Gly)	β^0	İspanyol Museviler
IVS I (-1), (G→A) (Kodon30; Arg→Lys)	β^0	Bulgarlar
IVS I (-1), (G→C) (Kodon30; Arg→Thr)	β^0	Amerikalı zenciler, Tunuslular, BAE, Hintliler
IVS I-1, (G→A)	β^0	Akdenizliler, Asya Hintlileri
IVS I-1, (G→T)	β^0	Asya Hintlileri
IVS II-1, (G→A)	β^0	Akdenizliler, Amerikalı zenciler, Tunuslular
IVS II-1, (G→C)	β^0	İranlılar
IVS I-2, (T→A)	β^0	Cezayirliler
IVS I-2, (T→C)	β^0	Amerikalı zenciler
IVS I-2, (T→G)	β^0	Tunuslular
IVS II-2,3, +11bp, -2bp	β^0	İranlılar
IVS I, -17 nts (3' end)	β^0	Kuveytliler
IVS I-130, (G→A)	β^0	Mısırlılar
IVS I-130, (G→C)	β^0	Türkler, Japonlar
Kodon 30, G→C [IVS I-130 (+1)]	β^0	Ortadoğulular
IVS II-849, (A→C)	β^0	Amerikalı zenciler

IVS II-849, (A→G)	β^o	Amerikalı zenciler
IVS II-850, -G	β^o	İtalyanlar
IVS II-850, (G→A)	β^o	İngilizler, İskoçlar
IVS II-850, (G→C)	β^o	Yugoslavlilar
IVS II-850, (G→T)	β^o	Japonlar
RNA İşlemlenmesi ile İlgili Mutasyonlar: Konsensus Dizilerdeki Mutasyonlar		
IVS I-5, (G→A)	β^+	Cezayirliler, Akdenizliler
IVS I-5, (G→C)	β^+	Asya Hintlileri, Çinliler, Malezyalılar
IVS I-5, (G→T)	β^+	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
IVS II-4,5, -AG	$\beta^o?$	Portekizliler
IVS II-5, (G→C)	β^+	Çinliler
IVS I-6, (T→C)	β^+	Akdenizliler
IVS I-128, (T→G)	β^+	Suudi Arabistanlılar
IVS II-837, (T→G)	?	Asya Hintlileri
IVS II-843, (T→G)	β^+	Cezayirliler
IVS II-844, (C→G)	β^+	İtalyanlar
IVS II-848, (C→A)	β^+	Amerikalı zenciler, Mısırlılar, İranlılar
IVS II-848, (C→G)	β^+	Japonlar
RNA İşlemlenmesi ile İlgili Mutasyonlar: IVS-I ya da IVS-II'deki Değişiklikler		
IVS I-110, (G→A)	β^+	Akdenizliler
IVS I-116, (T→G)	β^o	Akdenizliler
IVS II-654, (C→T)	β^+	Çinliler
IVS II-705, (T→G)	β^+	Akdenizliler
IVS II-745, (C→G)	β^+	Akdenizliler
RNA İşlemlenmesi ile İlgili Mutasyonlar: Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar		
Kodon10 (C→A) (Ala→Ala)	β^+	Asya Hintlileri
Kodon19 (A→G) (Hb Malay; Asn→Ser)	β^+	Malezyalılar
Kodon24 (T→A) (Gly→Gly)	β^+	Amerikalı zenciler, Japonlar
Kodon26 (G→A) (HbE; Glu→Lys)	β^+	Güneydoğu Asyalılar

Kodon27 (G→T) (Hb Knossos; Ala→Ser)	β^+	Akdenizliler
RNA Translasyon Mutasyonları: Anlamsız Mutasyonlar		
Kodon15, T <u>G</u> G→T <u>A</u> G	β^o	Asya Hintlileri, Türkler
Kodon15, TGG→TGA	β^o	Portekizliler
Kodon17, (A→T)	β^o	Çinliler
Kodon22, (G→T)	β^o	Reunion Adalılar
Kodon26, (G→T)	β^o	Tayvanlılar
Kodon35, (C→A)	β^o	Tayvanlılar
Kodon37, (G→A)	β^o	Suudi Araplar, İspanyollar
Kodon39, (C→T)	β^o	Akdenizliler
Kodon43, (G→T)	β^o	Çinliler
Kodon61, (A→T)	β^o	Zenciler
Kodon90, (G→T)	β^o	Japonlar
Kodon112, (T→A)	β^o	Slovaklar
RNA Translasyon Mutasyonları: Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonlar		
Kodon1, -G	β^o	Akdenizliler
Kodon2,3,4, -9bp; +31bp	β^o	Cezayirliler
Kodon5, -CT	β^o	Akdenizliler
Kodon6, -A	β^o	Akdenizliler, Amerikalı zenciler
Kodon8, -AA	β^o	Akdenizliler
Kodon8/9, +G	β^o	Asya Hintlileri
Kodon9/10, +T	β^o	Yunanlılar
Kodon11, -T	β^o	Meksikalılar
Kodon14/15, +G	β^o	Çinliler
Kodon15, -T	β^o	Malezyalılar
Kodon16, -C	β^o	Asya Hintlileri
Kodon22/23/24 -AAGTTGG	β^o	Türkler
Kodon24, -G; +CAC	β^o	Mısırlılar
Kodon25/26, +T	β^o	Tunuslular
Kodon26, +T	β^o	Japonlar

Kodon27/28, +C	β^o	Çinliler
Kodon28, -C	β^o	Mısırlılar
Kodon28/29, -G	β^o	Japonlar, Mısırlılar
Kodon31, -C	β^o	Çinliler
Kodon35, -C	β^o	Malezyalılar
Kodon36/37, -G	β^o	İranlılar, Kürtler
Kodon37/38/39 -GACCCAG	β^o	Türkler
Kodon38/39, -C	β^o	Çekler
Kodon38/39, -CC	β^o	Belçikalılar
Kodon40, -G	β^o	Japonlar
Kodon40/41, +T	β^o	Çinliler
Kodon41, -C	β^o	Tayvanlılar
Kodon41/42, -TTCT	β^o	Çinliler
Kodon42/43, +G	β^o	Japonlar
Kodon42/43, +T	β^o	Japonlar
Kodon44, -C	β^o	Kürtler
Kodon45, -T	β^o	Birleşik Arap Emirlikleri
Kodon47, +A	β^o	Surinamlılar
Kodon47/48, +ATCT	β^o	Pencaplılar
Kodon51, -C	β^o	Macarlar
Kodon53/54, +G	β^o	Japonlar
Kodon54, -T	β^o	Cezayirliler, İsveçliler
Kodon54/55, +A	β^o	Hintliler
Kodon56-60, +14bp	β^o	-
Kodon57/58, +C	β^o	Pencaplılar
Kodon59, -A	β^o	İtalyanlar
Kodon64, -G	β^o	İsviçreliler
Kodon67, -TG	β^o	Filipinliler
Kodon71/72, +A	β^o	Çinliler
Kodon71/72, +T	β^o	Çinliler
Kodon72/73 -AGTGA; +T	β^o	Britanyalılar

Kodon74/75, -C	β^o	Türkler
Kodon76, -C	β^o	İtalyanlar
Kodon82/83, -G	β^o	Azerbaycanlılar, Çekler, Hırvatlar
Kodon84/85, +C	β^o	Japonlar
Kodon84/85/86, +T	β^o	Japonlar
Kodon88, +T	β^o	Asya Hintlileri
Kodon89/90, -GT	β^o	Koreliler
Kodon95, +A	β^o	Tayvanlılar
Kodon106/107, +G	β^o	Amerikalı zenciler
Dominant Geçen Beta-Talasemi ve Stabil Olmayan Beta Zincir Varyantları		
Kodon24/25, -GTT	β^o	Japonlar
Kodon28, <u>CTG</u> → <u>C$\bar{G}$G</u>	β^o	(Hb Chesterfield)
Kodon31/32, +CGG	β^o	İspanyollar
Kodon32, <u>CTG</u> → <u>C$\bar{A}$G</u> (Leu→Gln) Kodon98, <u>GTG</u> → <u>A$\bar{T}$G</u> (Val→Met)	β^o	(Hb Medicine Lake)
Kodon33/34, -GTG	β^o	(Hb Korea) Koreliler
Kodon60, <u>GTG</u> → <u>G$\bar{A}$G</u> (Val→Glu)	β^o	(Hb Cagliari) İtalyanlar
Kodon94, +TG	β^o	(Hb Agnana) İtalyanlar
Kodon100, -CTT, +TCTGAGA $\bar{A}$ CTT	β^o	Güney Afrikalılar
Kodon108/109/110/111/112, -12bp	β^o	İsviçreliler
Kodon109, -G	β^o	(Hb Manhattan) Askenazi Yahudileri
Kodon110, -TC	β^o	(Hb Showa-Yakushiji) Japonlar
Kodon114, -CT; +G	β^o	(Hb Geneva) İsviçreli Fransızlar
Kodon114, T→C	β^o	(Hb Durham-N.C.; Hb Brescia) İtalyanlar
Kodon115, C→A	β^o	[Hb Hradec Kralove (Hb HK)] Çekler
Kodon120/121, +A	β^o	Filipinliler
Kodon121, G→T	β^o	Polonyalılar, İsviçreliler, Japonlar, İngilizler, Çekler
Kodon123, -A	β^o	(Hb Makabe) Japonlar
Kodon123/124/125, -ACCCCACC	β^o	Tayvanlılar
Kodon124, -A	β^o	Ruslar

Kodon124/125/126, +CCA	β^0	Ruslar
Kodon125, -A	β^0	Japonlar
Kodon126, -T	β^0	(Hb Vercelli) İtalyanlar
Kodon126, <u>G</u> TG→G <u>G</u> G	β^0	(HbNeapolis) İtalyanlar, Almanlar, Tayvanlılar
Kodon126/127/128/129/130/131, -17 bp	β^0	Pakistanlılar
Kodon127, <u>C</u> AG→ <u>T</u> AG (Gln→stop kodon)	β^0	İngilizler
Kodon127, <u>C</u> AG→C <u>C</u> G (Gln→Pro)	β^0	(Hb Houston) Britanyalılar
Kodon127, <u>C</u> AG→C <u>G</u> G (Gln→Arg)	β^0	Fransızlar
Kodon127/128, -AGG (Gln Ala→Pro)	β^0	(Hb Gunma) Japonlar
Kodon128/129, -4 bp, +5 bp ve Kodon 132/133/134/135, -11 bp	β^0	İrlandalılar
Kodon 134/135/136/137, -10 bp, +4 bp	β^0	Portekizliler
Başlık Bölgesi (CAP Site) Mutasyonları		
Cap +1, A→C	β^+	Asya Hintlileri
Başlangıç Kodonu Mutasyonları		
<u>A</u> TG→ <u>G</u> TG	β^0	Japonlar
A <u>T</u> G→A <u>C</u> G	β^0	Yugoslavlilar
A <u>T</u> G→A <u>G</u> G	β^0	Çinliler, Koreliler, Kuzey Avrupalılar
A <u>T</u> <u>G</u> →A <u>T</u> <u>A</u>	β^0	İtalyanlar, İsveçliler
A <u>T</u> <u>G</u> →A <u>T</u> <u>C</u>	β^0	Japonlar
A <u>T</u> <u>G</u> →A <u>T</u> <u>T</u>	β^0	İranlılar
3' UTR Mutasyonları		
3' UTR +6, +1,480; C→G	β^+	Yunanlılar (+6, C→G olarak da bilinir)
3' UTR +1,565'den +1,577'e; -13 bp	$\beta^{+?}$	Türkler
3' UTR +1,570; T→C	$\beta^{+?}$	İrlandalılar
Poliadenilasyon (poly A) ile İlgili Mutasyonlar		
AAT <u>A</u> AAA→AA <u>C</u> AAA	β^+	Amerikalı zenciler
AAT <u>A</u> AAA→AAT <u>G</u> AA	β^+	Akdenizliler

AATAAA→AATAGA	β^+	Malezyalılar
AATAAA→AATAAG	β^+	Kürtler
AATAAA→AAAA (-AT veya -TA)	β^+	Fransızlar
AATAAA→A (-AATAA)	β^+	Araplar

2.2.1.1. Gen Delesyonları

α -talasemilerin aksine β -talasemide gen delesyonları çok sık gözlenmez. Bugüne kadar yaklaşık 17 tane gen delesyonu tanımlanmıştır. β geninin 3' ucundaki 619 bç delesyonu Pakistan ve Hindistan'daki, Sind ve Gujarati popülasyonunda görülen β -talasemilerin %50'sinden sorumludur^{4,6, 25, 29}.

2.2.1.2. Transkripsiyonel Mutasyonlar

β geninin promotör bölgesinde birçok baz değişimi tanımlanmıştır. CAP bölgesinde CCAAT ve ATA kutusunda görülen mutasyonlar RNA polimerazın, β genine bağlanma ve transkripsiyonu başlatma yeteneğini azaltır. β mRNA transkripsiyonu bu durumdan etkilenir ve β mRNA miktarı azalır²⁵. Bütün olguların fenotipi, β^+ talasemidir²⁹.

2.2.1.3. RNA İşlemlenme Mutasyonları

mRNA'nın çekirdeğe girmesini engelleyen tek baz mutasyonudur. Ekson ve intronun bağlanma noktasında 5' GT (donor) 3' AG (receptör) bölgesinde gözlenir. Bu splice noktasındaki tek baz değişikliği splicingi bozar ve β^0 talasemi fenotipini oluşturur^{4,25,29}. β -talaseminin farklı tipleri IVS I konsensus sekansındaki tek baz değişimine bağlıdır⁴.

2.2.1.3.1. Splice Kavşağındaki Mutasyonlar

Bu sekanstaki mutasyonlar splicingi farklı oranlarda etkiler ve kriptik bölge çevresinde alternatif bir splicing oluşturur. IVS I-5'deki bir mutasyonla G→C veya T değişimi; β zincir üretiminde orta derecede bir azalma ve şiddetli β^+ talasemi ile sonuçlanır. Diğer taraftan IVS I-6'da T'nin C ile değişimi β yapımında orta derecede bir azalmaya neden olur. Bu mutasyon Akdeniz bölgesinde görülen β talaseminin Portekiz formu olarak adlandırılmaktadır⁴.

2.2.1.3.2. Konsensus Dizi Değişikliklerine Neden Olan Mutasyonlar

Ökaryotik hücre genlerindeki intron-ekson bağlanma bölgelerinde yer alan konsensus dizilerde meydana gelen değişiklikler de β talasemiye neden olmaktadır. Bu diziler donör bölgelerdeki eksonların son üç nükleotidi ile intronun ilk altı nükleotidini, akseptör bölgede ise intronun son 10 nükleotidi ile eksonun ilk nükleotidinden oluşur. Bu mutasyonlar β talasemiye sebep olurlar².

2.2.1.3.3. İntronlardaki Değişiklikler

β geninin içinde GT ve AG dinükleotidleri splice kavşakları dışında birçok yerde bulunabilir. Ancak bunlar normal splicing işleminde donör ve akseptör olarak kullanılmazlar. Kriptik bölgeler olarak adlandırılan bu yerlerde oluşan bazı mutasyonlar yeni splice bölgelerini oluştururlar. En yaygın görüleni IVS I-110'daki baz değişimidir. Bu bölge 3' akseptör splice bölgesinde A-G yokmuş gibi işlem görür. 110. pozisyondaki G→A değişikliği β^+ talasemi fenotipine neden olur^{2,4}.

β globin geninin ikinci intronunda da mutasyon saptanmıştır. IVS 2'de pozisyon 654'de A→G değişimi anormal β globin zincir sentezine neden olur. Fenotipi ise β^0 talasemidir⁴.

2.2.1.3.4. Kodlanan Bölgedeki Mutasyonlar

β globin geninin ekson 1'de kodon 24-27 IVS 1 donör bölgesinde gizli mutasyon bölgesi vardır. Bu bölge G→T dinükleotidini içerir ve komşu değişimler bu bölgenin aktivasyonunu sağlar. Normal ekson/intron bağlantı bölgesi yerine burada anormal splicing oluşur ve şiddetli β^+ talasemi oluşur⁴.

Kodon 19 (A→G), 26 (G→A) ve 27 (G→T) mutasyonları mRNA azalması ve anormal splicing ile sonuçlanır⁴.

2.2.1.4. RNA Translasyon Mutasyonları

2.2.1.4.1. Anlamsız Mutasyonlar

Tek bir nükleotidin yer değiştirmesi sonucu normalde bir aminoasidi kodlayan kodon, translasyonun durdurulması sinyalinin veren durdurucu kodon (stop kodon: UAA, UAG veya UGA) haline gelir. Mutasyonun olduğu kodondan itibaren globin zincir üretimi normalden önce durur. En yaygın görüleni Kodon 39 C→T (CAG→TAG) mutasyonudur. Akdeniz Bölgesi'nde yüksek sıklıkta görülen bu mutasyon sonucu β^0 talasemi fenotipi ortaya çıkar³⁹.

2.2.1.4.2. Çerçeve Kayması (Frameshift) Mutasyonları

Bir veya birden fazla nükleotidin delesyonu veya insersiyonu sonucu öne veya arkaya doğru (5'→3' veya 3'→5' yönünde) oluşan nükleotid kayması ile mutasyon bölgesinden sonraki kodonların şifreleri değişerek farklı aminoasitlerin şifreleri ortaya çıkar. Bu mRNA β^0 talasemi fenotipine neden olur³³.

2.2.1.5. Dominant Geçen β -Talasemi ve Stabil Olmayan β Globin Varyantları

Son 20 yılda ağır β talasemiden ayrılamayan sporadik vakalar tanımlanmıştır. Bu tip vakalarda eritrosit prekürsörlerinde inklüzyon cisimcikleri çokça gözlenmektedir. Dizi analizleri moleküler düzeyde heterojenite göstermektedir. Fakat çoğu β globin geninde ekson 3'de mutasyon içermektedir. Çerçeve kayması veya prematür zincir sonlanması gözlenir. Bu düzensizlik uzamış stabil β globin gen ürünlerini oluşturur. En sık görülen mutasyon ise kodon 121'de GAA→TAA değişikliğidir^{35, 40}.

Bazı β globin zincir varyantları oldukça unstabildir ve tetramer yapma eğilimi gösterirler. Oluşan unstabil hemoglobinler eritrosit prekürsörlerinde ve kanda birikirler. Dominant geçen β talasemiden hemolitik anemiye kadar değişik klinik gösterirler. Buna örnek olarak hemoglobin Indianapolis verilebilir^{4, 40}.

2.2.1.6. Başlık Bölgesi (CAP Site) Mutasyonları

β^+ talasemi fenotipi ile sonuçlanan +1 A→C yer değişimi sonucu transkripsiyon azalır, başlıklanma yavaşlar ve mRNA kararlılığı bozulur. Homozigot olarak bulunması halinde bile kişide heterozigot gibi bulgu veren bir fenotiptir³⁹.

2.2.1.7. Başlangıç Kodonu Mutasyonları

Başlangıç kodonu olan ATG'deki nükleotid değişiklikleri sonucu transkripsiyon başlatılamaz ve bunun sonucunda β^0 talasemi fenotipi oluşur².

2.2.1.8. 3' UTR Mutasyonları

3' UTR bölgesinde +1565'den +1577 nükleotidine kadar olan kısmın delesyonu sonucu β^+ talasemi fenotipi ortaya çıkar².

2.2.1.9. Poliadenilasyon Sinyal Mutasyonları

β^0 globin mRNA'nın 3' untranslated bölgesinde AAUAAA dizisi β gen transkripsiyonunun kırılma ve poliadenilasyonu için uygundur. Örneğin β globin geninin bu bölgesinde TC değişimi orta şiddette β^+ talasemi ile sonuçlanmaktadır⁴.

2.2.2. Türkiye'de β -Talasemi

β -talasemi taşıyıcılığı oranı Türkiye genelinde %2,1 olmakla birlikte, bu sayı Türkiye'nin bazı yörelerinde %10'a kadar çıkmaktadır. Akraba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye'de beklenilenin de üzerinde β -talasemili çocuk doğmasının nedenidir. Hastalık, hafif klinikli β -talasemi intermedia ile transfüzyona bağımlı β -talasemi majör arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmekle birlikte, Türkiye'de β -talasemi majör olguları ağır basmaktadır. Halen Türk toplumunda 30'dan fazla mutasyon tanımlanmıştır. Bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde güçlendirmektedir. IVS-I-110 Türkiye'de en sıklıkla rastlanan β -talasemi mutasyonudur. IVS-I-110'un Türkiye genelinde %40 olan sıklığı, Orta Anadolu'da %50'yi aşmakta, buna karşılık Doğu ve Güney Doğu Anadolu'da %25'lere düşmektedir. Türkiye'nin coğrafi bölgeleri, mutasyon sıklığı ve çeşitliliği açısından kıyaslandığında, ülke nüfusunun %50'sini barındıran Batı Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin, Türkiye genelindeki dağılımla uyumlu olduğu ve Kuzey, Güney ve Doğu Anadolu bölgelerinin daha az heterojen olduğu ve kendilerine özgü mutasyonlar (-30, -87, FSC8/9, IVS II-745 gibi) içerdiği görülmektedir¹⁰. Bölgemizde de en sık rastlanan mutasyon IVS I-110 (%48,1) olup bunu Cd39 (%9,8), IVS I-1 (%6,4), Cd 8 (%5,5), -30 (%5,1), Fsc5 (%5,1), IVS II-745 (%4,2), IVS I-6 (%4,2), IVS

II-1 (%2,1), Fsc74/75 (%2,1), Fsc 8-9 (%0,8) ve IVS I-5 (%0,4) mutasyonları izlemektedir⁴¹.

β -talasemi Türkiye’de önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Bu hastalığın henüz kesin tedavisi yoktur, dolayısı ile moleküler tanı ve doğum öncesi erken tanı riskli aileler için büyük önem taşımaktadır. β -talaseminin moleküler düzeyde çok heterojen olması, bundan beş sene önce hastalık tanısı ve önlenmesinde Türkiye için çok önemli bir engel olarak nitelendirilirdi. Bugün otomatizasyona yönelik, tek aşamalı ve kit yapısında yöntemlerin devreye girmesi ile bu zorluk büyük oranda aşılmıştır¹⁰.

2.3. β -Talasemi Tanısında Kullanılan Moleküler Yöntemler

2.3.1. Klasik Moleküler Yöntemler

β -talasemi sendromları genetik olarak heterojendir. Bu hastalıkların şiddeti, öncelikli olarak gen üzerindeki hasarların tipine göre belirlenmektedir⁴². Bu nedenle hassas ve güvenilir tanısal yöntemlerin kullanılması, β -talaseminin takibi ve önlenmesinde kritik bir role sahiptir. Bunlar arasında ARMS ve RFLP yöntemleri tanı için temel teknikler olarak kullanılmaktadır⁴³.

2.3.1.1. ARMS (Amplification Refractory Mutation System)

ARMS, allel-spesifik primerler kullanan PCR’a dayalı bir yöntemdir⁴³. Nokta mutasyonlarının ve küçük delesyon veya insersiyonların doğrudan belirlenmesini sağlar. Tipik bir ARMS yöntemi iki tamamlayıcı tepkimeden oluşur. Birinci tepkime, normal DNA dizisine özgü ARMS primeri içerir ve belirli bir yerdeki mutant DNA’yı amplifiye edemez. Benzer olarak ikinci tepkime, mutanta özgü primer içerir ve normal DNA’yı amplifiye edemez. Bir bireyin genotipi amplifikasyon ürünlerinin analiziyle tanımlanabilmektedir. Normal bir birey yalnızca normal tepkimede PCR ürünü oluştururken heterozigot her iki tepkimede, homozigot mutant birey ise yalnızca mutant tepkimede PCR ürünü oluşturur⁴⁴.

Klasik PCR’dan farklı olarak mutasyona özgü amplifikasyon yapılarak mutant β globin allelleri saptanır. Mutant β globin alleleline özgü primer sadece mutasyonun olduğu bölgeyi tanıırken, mutasyonun olmadığı bölgeye yapışmayacak ve amplifikasyon sonuçsuz kalacaktır. Böylece bir tane mutant allele özgü, bir tane bunun zıt bölgesini

karşılayan, iki tane de genin herhangi bir bölgesini çoğaltarak koşulların doğruluğunu kontrol etmeye yarayacak toplam dört primerin tek bir tüpte kullanılmasıyla β geninin bilinen mutasyonları saptanabilir^{8,45-48}.

ARMS yöntemi PCR'a dayalı diğer yöntemlerden farklı olarak birçok avantaja sahiptir. Yöntem hızlı ve güvenilir olup radyoaktif madde içermez. İnternal kontrollü iki tepkimenin kullanımı yalancı pozitif sonuçların elde edilmesini önlemektedir. Yöntem genelde herhangi bir mutasyon için geliştirilebilmesinin yanında, mevcut olan çeşitli genetik polimorfizmlerin saptanmasında da kullanılabilir⁴⁴.

2.3.1.2. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

İnsan genomu çok heterojendir. İnsan genomunda hastalığa yol açan mutasyonlara ve iyi huylu genetik varyasyonlara ek olarak fenotipi etkilemeyen yüzlerce polimorfizm'e de rastlanır. Moleküler düzeyde polimorfizm (çok çeşitlilik) kişiden kişiye nükleotid dizelerinin farklı şekillerde bulunması demektir. Polimorfik bir gende varyant alleller bulunur. Bunlar genetik gösterge olarak kullanılabilirler. Polimorfizme genellikle genler arası bölgede veya protein kodlamayan gen içi dizelerde rastlanmaktadır. RFLP bir genetik varyanttır ve DNA'yı bir restriksiyon enzimi ile parçalara ayırarak incelenebilir. Eğer genetik varyant restriksiyon endonükleaz'ın kırma bölgesinde değişiklik yapmışsa (normal kırma bölgesi kaybolabilir veya yeni bir kırma bölgesi ortaya çıkmış olabilir), restriksiyon parçalarının uzunluğu normalden farklı olacaktır¹⁸.

Restriksiyon endonükleazlar, çift iplikli DNA molekülünü spesifik dizelerden tanıyıp kesen enzimlerdir. DNA üzerindeki bu dizeler genellikle 4-6 baz çifti uzunluğundadır. Birbirinden çok az farklılık gösteren üç farklı sınıfı tanımlanmıştır. Bunlar TipI, TipII ve TipIII'dür. TipII restriksiyon endonükleaz, kesme işleminde en sık kullanılan ve en önemli olanıdır. Bu enzimler genellikle kendilerinin bakteriyel orijinlerini belirleyen üç-harfli kısaltma ile isimlendirilirler. Aynı orijine sahip olan enzimler arasındaki ayırımı yapmak için Roman rakamları eklenir. Örneğin; *HpaI*, *Haemophilus parainfluenza*'dan sağlanmaktadır⁴⁹.

2.3.2. DNA Mikroarray Yöntemi

Önceden tanımlanmış tekli nükleotid değişimlerinin (SNP) güvenilir, kısa ve verimli bir yöntem ile tespisi özellikle rutin tanı ve genetik epidemiyoloji çalışmaları açısından büyük önem taşımaktadır. Bu amaçla bugüne kadar geliştirilen yöntemler PCR teknolojisinin sunduğu olanaklardan yararlanmışlardır. SNP'lerin teşhisinde yaygın olarak kullanılan yöntemler arasında RFLP, allel spesifik PCR sayılabilir. Bu yöntemler arasında RFLP her SNP için uygulanamaz oluşu, allel spesifik PCR'nin ise kesin güvenilirlikle optimizasyonunun özellikle bazı SNP'lerin bulunduğu bölgeler için ciddi zorluklar çıkarması açısından yaygın uygulamalarında güçlükler yaşanan tekniklerdir. Son yıllarda keşfedilen array teknolojisinin otomasyona uyarlanabilir yapısı nedeniyle rutin analizlerde kullanılma imkanı teknolojinin keşfinden bu yana ifade edilen bir husus olmuştur. Mikroarray platformu cam bazlı array'lerden farklı olarak kullanıcının tasarımına açık, elektronik array teknolojisine sahip olan ve rutin SNP analizlerinde yüksek güvenilirlik arz eden bir sistemdir. Mikroarray; SNP analizlerinin yanısıra STR, gen ifadenmesi analizlerinde ve bilinmeyen mutasyonların saptanmasında da güvenilirlikle kullanılabilmektedir⁵⁰.

2.3.2.1. DNA Mikroarray Nedir?

Watson ve Crick'in DNA'nın moleküler yapısını aydınlatmalarının üzerinden 50 yıldan fazla zaman geçmiştir. DNA'nın moleküler yapısının anlaşılmasının ardından biyoteknolojik araştırmalar da hız kazanmıştır. Son yıllarda, yeni bir teknoloji olan DNA mikroarray teknolojisi biyologlar ve biyomedikal araştırmacılar arasında oldukça büyük ilgi çekmiştir. Moleküler biyoloji alanındaki araştırmaların hızını önemli derecede arttıran yeni ve güçlü bir teknolojidir. DNA mikroarray kavramı 1995 yılında Brown tarafından tanımlanmış olup oldukça yüksek verimde nükleik asit analizi sağlama kapasitesinden dolayı birçok araştırmanın konusu olmuştur. DNA mikroarray analizleri şu anda tek bir uygulama ile binlerce hatta milyonlarca farklı DNA dizisini analiz etme imkanı sağlamaktadır. Mikroarray'lerin hassasiyeti, diğer moleküler yöntemlerle belirlenmesi çok zor olan küçük farklılıkların tespit edilmesini de mümkün kılmaktadır⁵¹⁻⁵³.

İki nükleotid zincirinden oluşan DNA'nın çift iplikli sarmal yapısının belirlenmesi modern moleküler biyolojide bir dönüm noktası olmuştur. DNA karakterizasyonu yapan yöntemlerin çoğu, DNA'nın iki koplementer tek iplikten kısmen veya tamamen

komplementer olan çift sarmala şekillenme yeteneği olan hibridizasyona dayanmaktadır⁵⁴. Hibridizasyon tepkimeleri çözeltideki iki komplementer molekül arasında veya çözeltideki bir molekül ve katı bir destek üzerindeki hareketsiz bir komplementer molekül arasında meydana gelebilir. DNA çip yöntemleri de tek iplikli floresan moleküller ve çip yüzeyindeki tek iplikli dizeler arasındaki hibridizasyon tepkimelerinden yararlanır. Hibridizasyon, tüm DNA mikroarray endüstrisinin temel aldığı biyokimyasal bir yöntemdir⁵⁵.

DNA mikroarray yöntemi, mRNA düzeylerinin çalışılmasında en çok kullanılan teknoloji olmuştur. Tek seferde, çok sayıda genin ekspresyon düzeyinin incelenmesine olanak sağlayan genel bir yöntem olarak gelişen bir teknolojidir⁵⁶.

2.3.2.2. Mikroarray Substratları

Geleneksel hibridizasyon yöntemlerinde nitroselüloz ve naylon gibi esnek membranlardan yararlanılmıştır. Bunun aksine mikroarray veya biyoçip yöntemlerinde katı yüzeyler kullanılmaktadır. Çip formatlarının avantajı katı yüzeyin gözeneksiz olması ve böylece belirlenen bölgede biyokimyasal materyalin küçük miktarlarının depolanabilir olmasıdır. Bunun yanı sıra naylon ve nitroselüloz gibi gözenekli substratlar, uygulanan materyalin difüze olmasına neden olurlar. Gözeneksiz substrat ise biyoçip üretimi ve kullanımı sırasında organik ve floresan bileşiklerin hızlı uzaklaştırılmasını sağlayarak substrat matriks içindeki çözeltilerin ve örneğin absorpsiyonunu önlemektedir. Gözeneksiz yüzey, yüksek örnek derişimleri ve hızlı hibridizasyon kinetiği sağlayarak küçük örnek hacimlerinin kullanılmasına olanak sağlar. Ayrıca katı bir substrat mikroarray elementlerinin kalitesini arttıran değişmez bir yapışma yüzeyi de sağlamaktadır⁵⁵.

2.3.2.3. Mikroarray'in Kullanım Alanları

Mikroarray'ler biyolojik araştırmalarda birçok soruya yanıt bulmak için kullanılmaktadır⁵⁶. Biyoçiplerin yani mikroarray'lerin ilk uygulama alanları gen ekspresyon analizleridir. Buna ek olarak hibridizasyona dayalı yöntemler; mutasyon taraması, polimorfizm analizleri, haritalama ve evrimsel çalışmalarda da kullanılabilir. Mikroarray'ler ayrıca proteinlerin nükleik asitlere, küçük moleküllere ve diğer proteinlere bağlanmasının izlenmesinde de kullanım alanı bulmuşlardır. Ancak bu uygulamalar henüz geliştirilmemiştir. Hibridizasyon analizleri genomik DNA'nın hem

kodlanan hem de kodlanmayan bölgelerindeki tek baz değişimleri, delesyonlar ve insersiyonların belirlenmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda DNA dizisinin miktarının ölçülmesinde de kullanılabilir⁵⁵.

Genlerdeki mutasyonlar sonucu oluşan ve genetik hastalıklar olarak adlandırılan birçok hastalık bulunmaktadır. Değişikliğe uğrayan gen mutant gen olarak adlandırılır. Bu genlerin uygun olmayan ekspresyonu veya hiç eksprese olmaması da hastalıkla sonuçlanmaktadır. Mikroarray çalışmaları, normal hücrelere karşı hastalıklı hücrelerde hangi genlerin farklı şekilde eksprese olduğunu belirlemek için kullanılmakta ve böylece hastalıklarla ilgili olan genlerin belirlenmesiyle normal ve hasta hücreler arasındaki farka hedeflenen ilaçların geliştirilmesi de sağlanmış olmaktadır⁵⁶.

Klinik olarak ayırt edilemeyen alt tipleri olan fakat genetik bakımdan heterojen olan birçok hastalık (talasemi ve orak hücre anemisi gibi) bulunmaktadır. Bu hastalıklar farklı alt tiplere sahip oldukları için çoğunlukla farklı tedaviler gerektirmektedirler. Bu nedenle doğru klinik tanı ve tedavi oldukça kritik bir önem taşımaktadır. Mikroarray uygulamaları bu hastalıklarda hangi genlerin eksprese olduğunun belirlenmesinde de kullanılabilir⁵⁶.

2.3.2.4. Mikroarray'in Avantajları

Nükleik asit moleküllerinin işaretlenmesi ve bunların katı yüzeye yapışan diğer nükleik asitleri analiz etmek için kullanılmaları ilk defa yaklaşık 25 yıl önce uygulanmıştır. Southern blotting olarak adlandırılan bu teknik, radyoizotop veya floresan kuyruk ile işaretlenmiş bir DNA probu kullanılarak gerçekleştirilir. DNA veya RNA fragmentine uygulanan prob, kendine komplementer olan dize ile eşleşerek uygun yere yapışmaktadır.

Teknolojideki ilerlemeler DNA analizleri için kullanılan bu yöntemlerin minimize edilmesini sağlamış ve böylelikle binlerce DNA veya RNA dizisinin tek bir inceleme ile analiz edilmesine olanak vermiştir. Birçok araştırma grubu çeşitli klinik problemleri çözmek için DNA mikroarray yöntemini kullanmaktadır⁵¹. Mikroarray'lerin hassasiyeti, diğer moleküler yöntemlerle belirlenmesi çok zor olan küçük farklılıkların saptanmasını da sağlamaktadır⁵².

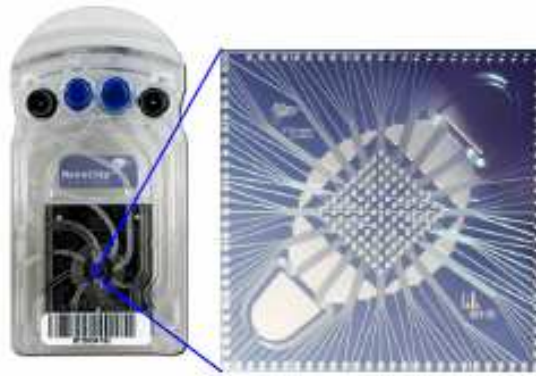
Mikroarray yöntemlerinde kullanılan substratlar, geleneksel filtre yöntemlerinde kullanılan hacimden (5-50 mL) daha küçük tepkime hacimlerinin (5-200 µL) kullanılmasını sağlamaktadır. Küçük tepkime hacimleri; çözelti tüketimi ve maliyetini

azaltırken kullanılan nükleik asit ayıraçlarının derişimini arttırmaktadır. Geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında mikroarray yöntemlerinde derişim bundan 100.000 kat daha fazladır⁵⁵.

Mikroarray'de geleneksel filtreleme yöntemlerinde kullanılan radyoizotoplar yerine floresan işaretlemenin kullanılması; hız, veri kalitesi ve kullanıcı güvenliği açısından büyük bir avantaj sağlamıştır. Mikroarray yöntemlerinde kullanılan çoklu renk floresansı, tek bir çalışmada iki veya daha çok biyolojik örneğin aynı anda analizine veya çoğaltılmasına olanak sağlamaktadır. Çoğaltma işlemi, hem gen ekspresyonu hem de mutasyon tespiti çalışmalarında sonuçların doğruluğunu büyük ölçüde arttırmaktadır. Ayrıca floresana dayalı bu yöntem; charge-coupled device (CCD) kameralar ile görüntüleme gibi gelişmiş veri elde etme teknolojilerinden de yararlanmayı mümkün kılmaktadır⁵⁵.

2.3.2.5. DNA Mikroarray'in Çalışma Prensibi

DNA mikroarray 100 tane test alanına sahip olan elektronik bir mikrodizin platformudur. Çip yapısında DNA test alanlarına ek olarak bulunan kanal sistemi örneklerin test alanlarına gönderilmesine, hibridizasyon ve yıkama işlemlerinin yapılmasına olanak sağlamaktadır⁵⁰ (Şekil 5). Çip yüzeyindeki DNA test alanları streptavidin molekülleri ile kaplıdır.



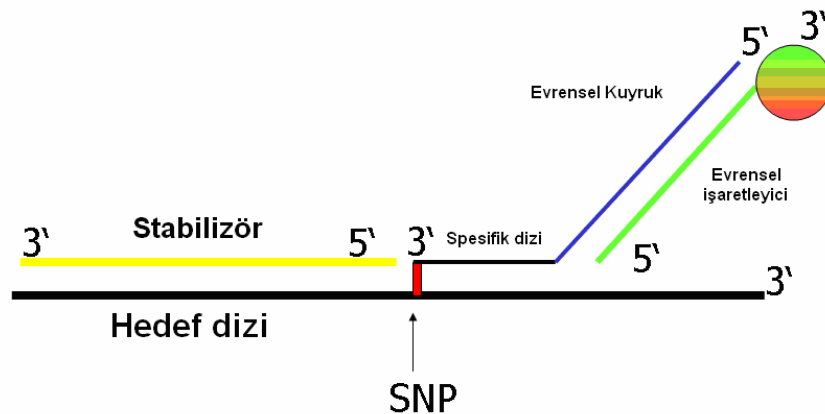
Şekil 5. Mikroarray çipi⁵⁰

Test alanlarına gönderilecek DNA molekülleri 5' uçlarından biotin ile işaretlenirler. DNA molekülleri sahip oldukları negatif elektrik yükü sayesinde çip yüzeyindeki test alanlarına elektronik olarak gönderilirken ulaştıkları test alanlarına sabitlenebilmeleri için 5' uçlarında bulunan biotin moleküllerinden yararlanırlar. Biotin molekülleri streptavidin ile özgül ve güçlü bir bağ kurma özelliğine sahiptir. SNP analizlerinde 5' uçlarında biotinle işaretlenmiş PCR ürünlerinin çip yüzeyindeki test alanlarına gönderilmesi tercih edilmektedir. Test alanlarına stabil bir şekilde bağlanan PCR ürünlerinin analizi mutant ve yabancı tip problemlerle hibridizasyona tabi tutularak yapılır⁵⁰.

Tanımlanmak istenen SNP'nin yaklaşık olarak çoğaltılacak PCR ürününün (200-400 bp) ortalarına gelmesi istenir. Ürünün biotinle işaretlenmesi PCR için kullanılan primerlerden birinin biotinli olarak kullanılması ile sağlanır⁵⁰.

2.3.2.5.1. Mutant ve Yabancı Tip İşaretleyici

SNP analizlerinde işaretleyici olarak tanımlanmak istenen SNP'yi 5' ucunda taşıyan bir yabancı tip, bir de mutant tip yaklaşık 10-12 baz çiftlik oligonükleotidler tasarlanır. Analiz edilen hedef dizi ile bir alakası olmayan ve uygulanan bütün testler için kullanılan floresan işaretli bu işaretleyicilerin özgül diziyeye bağlanabilmesini sağlayabilmek için mutant-yabancı tip prob dizisinin 5' ucuna evrensel işaretleyicinin dizisi de bir kuyruk olarak takılır. Böylece hibridizasyon sırasında floresan işaretli evrensel işaretleyiciler özgül diziyeye ait problemlere bağlanabilir hale gelmiş olur⁵⁰ (Şekil 6).



Şekil 6. Evrensel işaretleyici⁵⁰

2.3.2.5.2. Sabitleyici

DNA mikroarray sisteminde, SNP'lerin yabanıl tip veya mutant problemlerin hibridizasyonu ile teşhisine kesin güvenilirlik özelliği kazandırmak için bağımsız DNA molekülleri arasındaki baz etkileşim enerjisinden (base stacking energy) faydalanılmaktadır. Baz etkileşim enerjisi, DNA zincirleri boyunca nükleotidler arasındaki elektronların üst üste çakışması ile açığa çıkar⁵⁰.

Diziye özgül işaretleyici probun 5' ucunun hemen bitiminden başlayan 25-35 nükleotidlik sabitleyici olarak tabir edilen ikinci bir oligo hibridizasyon aşaması gereklidir. Hibridizasyon sırasında sabitleyici ve diziye özgül işaretleyici prob ard arda PCR ürününe bağlanırlar. Ard arda yerleşen sabitleyici 5' ucundaki baz ile işaretleyicinin 3' ucundaki baz arasında oluşan "baz etkileşim" enerjisi hibridizasyonun kuvvetini arttıran bir etken olarak belirir. DNA mikroarray çipi hibridizasyon sonrası özgül olmayan bağlanmalardan arındırılmak üzere yıkamalara ve artan sıcaklığa mağruz bırakılır. Yabanıl tip probun mutant allele, mutant probun ise yabanıl allele bağlanması, aralarındaki fark yalnızca bir bazdan ibaret olduğu için mümkündür. DNA mikroarray sisteminde uygulanan ısı ve yıkama işlemlerine ek olarak sabitleyicinin yarattığı "baz etkileşim" enerjisi mevcuttur. Dolayısıyla SNP analizlerinde meydana gelebilecek yanlış eşleşmelerde test alanındaki DNA'ya bağlanmayan tek baz, sabitleyici ve işaretleyici oligo arasındaki etkileşimi değiştirecek, bu da yıkama ve ısı uygulamaları sırasında söz konusu yanlış eşleşmiş problemlerin uzaklaştırılmasını iyice kolaylaştıracaktır. Baz etkileşim enerjisinin en düşük olduğu ve bu nedenle en çok tercih edilen baz kombinasyonu TA'dır⁵⁰ (Şekil 7).

5'-3'	AA	AC	AG	AT
Enerji	-5,37	-10,5	-6,78	-6,57
5'-3'	TA	TC	TG	TT
Enerji	-3,82	-9,81	-6,57	-5,37
5'-3'	CA	CC	CG	CT
Enerji	-6,57	-8,26	-9,69	-6,87
5'-3'	GA	GC	GG	GT
Enerji	-9,81	-14,6	-8,26	-10,5

Şekil 7. Baz etkileşim enerjileri⁵⁰

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler ve Kimyasal Maddeler

3.1.1. Gereçler

- UV Spektrofotometre (Shimadzu UV-120-02)
- Santrifüj (Eppendorf 5403)
- Manyetik Karıştırıcı (Heidoph MR 2002)
- Buz Makinesi (Scotsman AF-10)
- Hassas Terazî (Mettler AJ 100)
- Etüv (Nüve N 400)
- Vorteks (Nüve NM 110)
- Mikrosantrifüj (Beckman Microfuge E)
- Analog pH metre (Beckman Century SS-1)
- Otomatik Pipet (Gilson P-2,P-10,P-20,P-100,P-200,P-1000)
- Elektroforez Güç Kaynağı (Bio-Rad Power PAC 300,Pharmacia Electroforesis Power Supply EPS 500/400)
- Elektroforez Tankı (Bio-Rad Mini Protean II Cell, Bio-Rad Sub-CellGT)
- Thermal Cycler (Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600)
- Thermal Cycler (Eppendorf Gradient PCR System)
- Pürifikasyon pompası (Millipore)
- İletkenlik ölçer (Horiba Twin Compact Meter)
- Çalkalayıcı (Irma Shaker)
- Mikroarray (Nanogen Nanochip Molecular Biology Workstation)

3.1.2. Kimyasal Maddeler

- Amonyum Klorür
- Amonyum Bikarbonat
- NaCl
- EDTA-Na₂
- SDS
- Proteinaz K
- Doymuş fenol çözeltisi
- Kloroform
- Etanol
- Primerler
- dNTP'ler
- Taq DNA polimeraz
- dH₂O
- L-Histidin
- NaOH
- Düşük tuz çözeltisi
- Yüksek tuz çözeltisi

3.2. Örnek Toplama

Çukurova Üniversitesi Biyokimya Anabilim Dalı'na β -talasemi ön tanısı ile başvuran kişilerin kan örnekleri kullanılmıştır. Moleküler analizlerde kullanılacak olan toplam 52 örneğin DNA'ları Na-EDTA'lı tüplere alınan tam kan lökositlerinden izole edilmiştir. İzole edilen DNA örnekleri kullanılacakları zamana kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Tam Kandan DNA İzolasyonu

Prensip: EDTA'lı tüplere alınan kanın plazması uzaklaştırılarak şekilli elemanlar yıkanıp eritrositler hemoliz edilerek saf lökosit elde edilmiştir. Proteinaz K ve STE ile

muamele edilen lökositlerin hücre zarı parçalanarak proteinler hidroliz edilerek homojen karışım fenol ile ekstre edilip sulu fazla bulunan DNA alkol ile çöktürülmüştür^{57, 58}.

3.3.1.1. Lökosit DNA İzolasyonu

Ayırıcılar

1. Parçalayıcı (Lizis) Tampon

Amonyum Klorür	131,0 mM
Amonyum Bikarbonat	0,9 mM

2. 4 M NaCl

3. 0,5 M EDTA-Na₂ (pH 7,5)

4. Tampon A

%10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)

Proteinaz K (10 mg/ml)

5. Doymuş Fenol Çözeltisi (önceden hazırlanır)

250 g kristalize fenol 50 ml saf suda çözülüp eşit hacimde 0,5 M Tris-HCl tamponu (pH 8,0) ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 15 dk karıştırılmıştır. Çözelti iki faza ayrıldığında üst faz aspire edilerek üzerine eşit hacimde 0,1 M Tris-HCl tamponu eklenip aynı işlem tekrarlanmıştır. Bu işleme fenol fazının pH'sı 8,0 olana kadar devam edilmiş ve son derişimi %0,1 olacak şekilde 8-hidroksikinolin ilave edilmiştir.

6. Kloroform

7. %70'lik etanol

8. Saf soğuk etanol

Yöntem

- 500 µL EDTA'lı tam kan 1,5 mL'lik ependorf tüpüne konmuştur.
- Üzerine 1 mL parçalayıcı tampon eklenerek 3 dk buzda bekletilip 13.000 devirde 2 dk santrifüj edilerek süpernatant atılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlandıktan sonra pellet üzerine 500 µl Tampon A eklenip hafifçe karıştırılarak 37 °C'de bir gece veya 55 °C'de 2 saat bekletilmiştir.
- Süre sonunda tüpe 250 µL fenol, 250 µL kloroform eklenerek karıştırılmış ve 1 dk 13.000 devirde santrifüj edilerek alttaki fenol-kloroform karışımı atılmıştır. Bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır.

- Aynı işlem 3 kez sadece kloroform ile tekrarlanmıştır.
- Süpernatant başka bir ependorf tüpüne aktararak üzerine 1 mL saf etil alkol eklenerek tüp yavaşça alt üst edilip DNA'nın ipliksi görünüm alması sağlanmıştır. Tüp 13.000 devirde 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılır, dipte DNA pellet halinde görülür hale geldikten sonra DNA üzerine 1 mL %70'lik etil alkol eklenip karıştırılmış ve 13.000 devirde 2 dk santrifüj edilmiştir.
- Süpernatant atılıp, tüp ters çevrilerek alkol kurutulmuştur.
- Pelletin büyüklüğüne göre saf su eklenir ve DNA'nın çözülmesi için 1 saat 37 °C'de bekletilmiştir.
- Çözünen DNA'nın derişimi hesaplanarak amplifikasyona hazır hale getirilmiştir.

$$\text{DNA derişimi } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \times \text{sulandırma faktörü (50)} \times 50$$

3.3.2. ARMS Yöntemi ile Mutasyonların Belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin ilgili bölgeleri PCR ile amplifiye edildikten sonra ARMS yöntemi ile mutasyon tanımlanması gerçekleştirilmiştir^{44,47}.

Ayıraçlar

Stok Çözeltiler

KCl	2 M
TrisHCl, pH 8,3	1 M
MgCl ₂ .6H ₂ O	1 M
+4 °C'de saklanır.	

10X Cetus Tamponu

2 M KCl	1,25 mL
1 M Tris.HCl	0,5 mL
1 M MgCl ₂	75 µL
Jelatin	5 mg
Steril distile su	3,2 mL

Jelatinin erimesi için 37 °C'de bekletilir.

Spermidin	1 M
------------------	------------

PCR Karışımı (4 mL)

10X Cetus Tamponu	500 µL
Steril distile su	2700 µL
1,25 mM dNTP karışımı	800 µL
Spermidin 1 M	4 µL

dNTP Karışımı

dNTP'lerin (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) her birinden (100 mM'lık stoktan) 60 µL alınıp üzerine 4740 µL steril distile su eklenerek 1,25 mM'lık çözelti hazırlanmıştır.

Primerler

Primerler 5 pmol/ µL olacak şekilde sulandırılmıştır.

10X TBE Tamponu pH 8,3

Tris.HCl	2 M
Sodyum Asetat 3H ₂ O	1 M
EDTA-Na ₂	10 mM

Saf su ile 1 litreye tamamlanıp pH'ı glasiyel asetik asit ile ayarlanmıştır.

3.3.2.1. Amplifikasyon Koşulları

Amplifikasyon 24,1 µL'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Reaksiyon karışımı; PCR karışımı, mutasyonu içeren bölgeye özgü ARMS primeri, ortak primer (1 veya 2), sabit primer, genomik DNA ve Taq polimeraz içermektedir⁴⁴.

Amplifikasyon Protokolü

PCR Karışımı	20 µL
Ortak primer 1 veya 2	1 µL
5' sabit primer	1 µL
3' sabit primer	1 µL
gDNA (0,5-1 µg/mL)	1 µL
Taq polimeraz (5 U/µL)	0,1 µL

- ARMS yönteminde kullanılan ortak ve sabit primerler^{44,47}

Ortak primer 1	5' ACC TCA CCC TGT GGA GCC AC 3'
Ortak primer 2	5' CCC CTT CCT ATG ACA TGA ACT TAA 3'
5' sabit primer	5' CAA TGT ATC ATG CCT CTT TGC ACC 3'
3' sabit primer	5' GAG TCA AGG CTG AGA GAT GCA GGA 3'

- β -talasemi mutasyonlarına özgü kullanılan ARMS primerleri Çizelge3'de gösterilmiştir.

Çizelge 3. ARMS primerleri ⁴⁴

IVS I-110 (G→A) mutant	5' ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACT 3'
IVS I-110 (G→A) normal	5' ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACC 3'
IVS I-1 (G→A) mutant	5' TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAT 3'
IVS I-1 (G→A) normal	5' TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAC 3'
Cd 39 (C→T) mutant	5' CAG ATC CCC AAA GGA CTC AAA GAA CCT GTA 3'
Cd 39 (C→T) normal	5' TTA GGC TGC TGG TGG TCT ACC CTT GGT CCC 3'
IVS I-6 (T→C) mutant	5' TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATG 3'
IVS I-6 (T→C) normal	5' TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATA 3'
IVS II-1 (G→A) mutant	5' AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAT 3'
IVS II-1 (G→A) normal	5' AAG AAA ACA TCA AGG GTC CCA TAG ACT GAC 3'
Cd 6 (-A) mutant	5' CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT GCC 3'
Cd 6 (-A) normal	5' CCC ACA GGG CAG TAA CGG CAG ACT TCT GCT 3'
IVS II-745 (C→G) mutant	5' TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGG 3'
IVS II-745 (C→G) normal	5' TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGC 3'
- 87 (C→G) mutant	5' CAC TTA GAC CTC ACC CTG TGG AGC CAC CCG 3'
- 87 (C→G) normal	5' CAC TTA GAC CTC ACC CTG TGG AGC CAC CCC 3'

PCR Programı

PCR programı 25 döngü; 94°C’de 1 dk (denatürasyon), 65°C’de 1 dk (yapışma) ve 72°C’de 1 dk (uzama) olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Son olarak 72°C’de 3 dk 1 döngü şeklinde tamamlanmıştır⁴⁴.

Agaroz Jel Elektroforezi

Ayırıcılar

%2’lik Nuesive-Agaroz Jel

NuSieve 1 g

Agaroz 1 g

100 mL 0,5xTBE tamponu içinde mikrodalga fırında eritilerek hazırlanmıştır.

Yükleme Tamponu

Brom fenol mavisi %0,05

Gliserol %10

Ficoll %15

5 x Tris Borat EDTA (TBE) Tamponu pH 8,0

Tris baz 54,0 g

Borik Asit 27,5 g

EDTA (0,5 M pH 8,0) 20 mL

1 L saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

Etidyum Bromür Çözeltilisi

EtBr 5 µg/mL olacak şekilde saf suda çözülerek hazırlanmıştır.

PCR sonunda amplifiye olan üründen 20 µL alınarak 2 µL yükleme boyası ile karıştırıldıktan sonra %2’lik agaroz jele uygulanıp 150 voltta 30 dk yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel etidyum bromür ile 3 dk boyanıp boyanın fazlası saf su ile yıkanarak temizlenmiştir. DNA parçaları UV ile görünür hale getirilerek fotoğrafı çekilmiştir.

Homozigot olgular mutant çalışmada çift bant, normal çalışmada ise tek bant verirler. Heterozigot olgular hem mutant hem de normal çalışmada çift bant verirler. Normal olgular ise mutant çalışmada tek bant, normal çalışmada çift bant verirler.

3.3.3. DNA Mikroarray Yöntemi ile Mutasyonların Belirlenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin ARMS yöntemi ile mutasyonları tespit edildikten sonra DNA mikroarray yöntemine geçilerek aynı örnekler için tekrar mutasyon taraması yapılmıştır. DNA mikroarray yöntemi; amplifikasyon, saflaştırma, yükleme, okutma ve analiz olmak üzere 5 basamakta gerçekleştirilmiştir⁵⁹.

3.3.3.1. Amplifikasyon

Amplifikasyon Koşulları: Genomik DNA'nın amplifikasyonu için NanoChip Molecular Biology Workstation Beta Talasemi Amplifikasyon kiti kullanılmıştır. Kit, amplifikasyon için “oligo-mix” reaksiyon karışımlarını içermektedir. Tam kan lökositlerinden elde edilen genomik DNA, ilgilenilen bölgeyi içeren dört amplikon elde edilebilmesi amacı ile iki çift amplifikasyonda kullanılmıştır⁵⁹. Elde edilecek amplikonlarda bulunan mutasyonlar Çizelge 4’de, kit içerisinde bulunan “oligo-mix 1” ve “oligo-mix 2” çözeltilerinin içeriği ise Çizelge 5’de gösterildiği gibidir⁵⁹.

Çizelge 4. Amplikonlarda yer alan mutasyonlar⁵⁹

Amplikon	Mutasyonlar
1	IVS I-110, Cd39
2	IVS I-1, IVS I-6, IVS II-1
3	IVS II-745
4	-87, Cd6

Çizelge 5. Oligo-mix 1 ve Oligo-mix 2 çözeltilerinin içeriği⁵⁹

Çözelti	Miktar	İçindeki maddeler
Oligo-mix 1	2 x 1350 µL	500 nM oligonükleotidler, KCl, Tris-HCl, Triton X-100, MgCl ₂ , dNTPs, Biotin
Oligo-mix 2	2 x 1350 µL	500 nM oligonükleotidler, KCl, Tris-HCl, Triton X-100, MgCl ₂ , dNTPs, Biotin

PCR Programı: Amplifikasyon 1 döngü 95°C’de 15 dk; 35 döngü 95°C’de 1 dk, 57°C’de 1 dk, 72°C’de 1 dk ve son olarak 1 döngü 72°C’de 10 dk olacak şekilde gerçekleştirilmiştir⁵⁹.

Amplifikasyondan önce oligo-mix 1 ve oligo-mix 2 için iki ayrı tüp hazırlanmış ve her bir tüpte 5 U/µL Taq polimeraz stok çözeltisi Çizelge 6’da gösterildiği gibi 1,5U/reaksiyon olacak şekilde sulandırılarak ilave edilmiştir. Her bir örnek için; 45 µL oligo-mix 1+Taq ve 45 µL oligo-mix 2+Taq karışımı ilave edilmiştir. Hazırlanan karışımlar üzerine 5 µL DNA eklenerek örnekler amplifiye edilmiştir⁵⁹.

PCR sonunda amplifiye olan üründen 20 µL alınarak 2 µL yükleme tamponu ile karıştırıldıktan sonra %2’lik agaroz jeli uygulanmış ve 150 voltta 30 dk yürütülmüştür. Elektroforez sonrası jel etidyum bromür ile 3 dk boyanmış ve boyanın fazlası saf su ile yıkanarak temizlenmiştir. DNA parçaları UV ile görünür hale getirilerek fotoğrafı çekilip amplifikasyon kontrolü yapılmıştır.

Çizelge 6. Taq polimeraz stok çözelti dilüsyonları⁵⁹

Örnek Sayısı	Enzim Miktarı	Oligo-mix 1 Miktarı	Oligo-mix 2 Miktarı
5	1,5 µL	225 µL	225 µL
10	3,0 µL	450 µL	450 µL
15	4,5 µL	675 µL	675 µL
20	6,0 µL	900 µL	900 µL
25	7,5 µL	1125 µL	1125 µL
30	9,0 µL	1350 µL	1350 µL
35	10,5 µL	1575 µL	1575 µL
40	12,0 µL	1800 µL	1800 µL
45	13,5 µL	2025 µL	2025 µL
50	15,0 µL	2250 µL	2250 µL

3.3.3.2. Saflaştırma

Saflaştırma işlemi aşağıdaki şekilde gerçekleştirilmiştir;

- Her bir örneğin oligo 1 ve oligo 2 için ayrı ayrı amplifiye edilen ürünlerinden eşit miktarda (45 µL + 45 µL = 90 µL) alınmıştır.

- Üzerine 100 µL dH₂O eklenip

- Bu şekilde hazırlanan karışımlar her örnek için bir kuyucuk kullanılacak şekilde saflaştırma tabağına aktarılarak saflaştırma pompası üzerine yerleştirilip 15 inç Hg (500 mbar) olacak şekilde 10–15 dk basınç uygulanmıştır.

- Süre sonunda kuyucuklara tekrar 100 µL dH₂O eklenip

- Tüm kuyucuklardaki miktarlar bitince saflaştırma tabağı pompadan alınarak her bir kuyucuğa 200 µL 50 mM L-Histidin eklenip 5 dk çalkalama işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde saflaştırılan ürünler DNA mikroarray yönteminde kullanılmak üzere hazır hale getirilmiştir⁵⁹.

* Saflaştırma işlemine başlamadan önce kullanılacak olan dH₂O'nun iletkenliği ölçülmüştür. dH₂O'nun iletkenliği 15 µS/cm'yi geçmemelidir.

3.3.3.3. Yükleme

Saflaştırma işleminin ardından elde edilen ürünlerden 100 µL alınarak mikroarray tabağına (96 kuyucuklu) yükleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Tüm ürünler bu şekilde yükleme tabağına her kuyucukta bir örnek olacak şekilde (toplam 52 kuyucuk) uygulanmıştır. En son kuyucuğa ise analiz sırasında arka planı oluşturacak olan 50 mM L-Histidin'den 200 µL yüklenmiştir. Histidinden sonraki kuyucuğa ise 200 µL NaOH (denatüran olarak) uygulanmıştır.

* Kullanılan 100 mM'lık histidinin iletkenliği 200 µS/cm'den küçük olmasına dikkat edilmiştir..

3.3.3.4. Okutma

Mikroarray tabağına yüklenen örneklerin her biri çip üzerinde belirlenen ayrı ayrı kuyucuklara cihaz tarafından otomatik olarak yüklenmiştir. Okutma işlemine geçilmeden önce çip üzerindeki DNA'ların denatüre olmasını sağlamak amacı ile çip yüzeyi 0,3 M NaOH ile yıkanmıştır. Örneklerin denatürasyonu tamamlandıktan sonra her mutasyona özgü toplam 8 işaretleyici (IVS I-110, Cd39, IVS I-1, IVS II-1, IVS I-6, IVS II-745, Cd6, -87) çip yüzeyine teker teker gönderilmiş ve okutma işlemi gerçekleştirilmiştir.

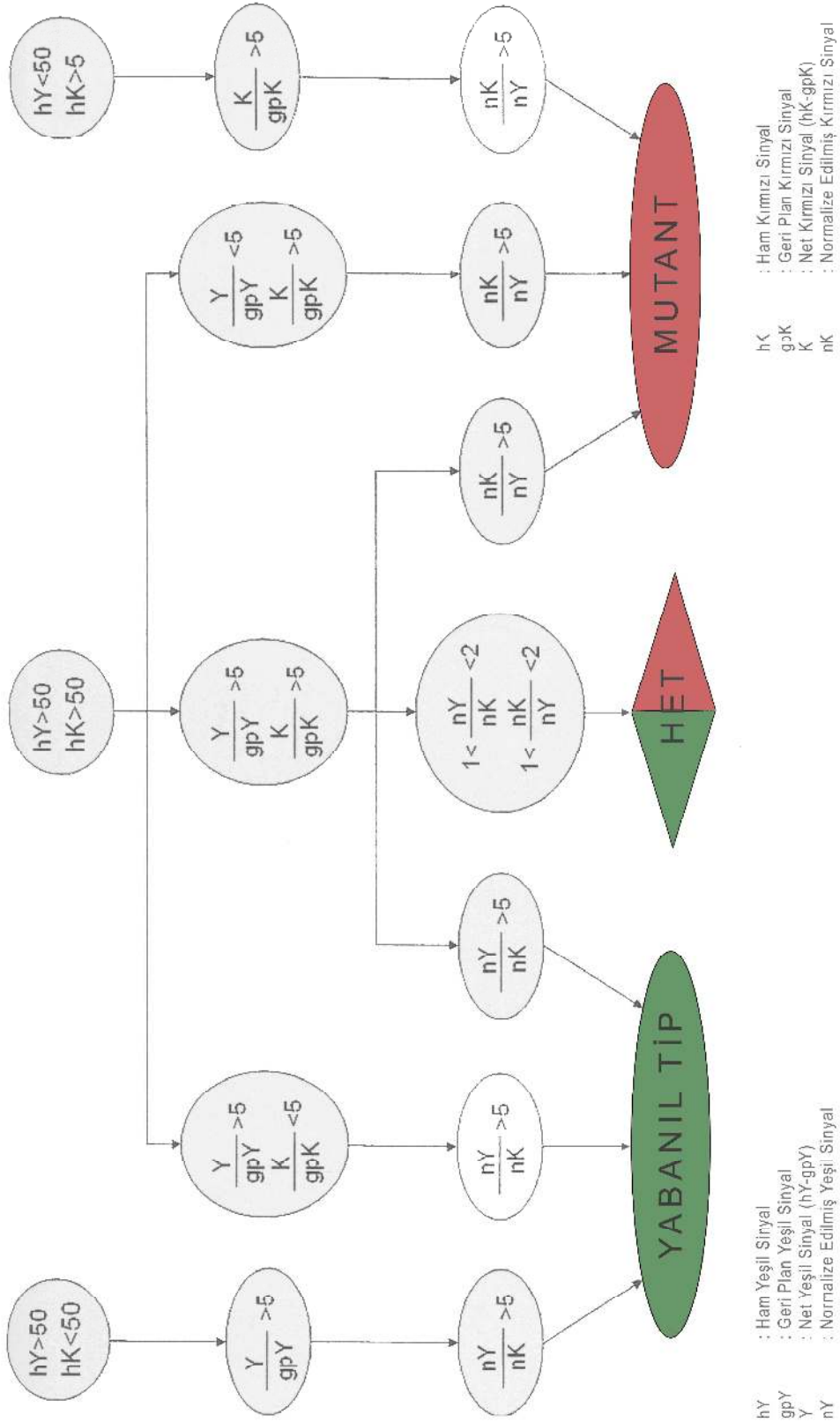
3.3.3.5. Analiz

Veri analizinde, örneklerden alınan sinyaller değerlendirilirken öncelikle bir örnekten alınan kırmızı ve/veya yeşil sinyallerin asgari 50 düzeyinde olup olmadığı kontrol edilmiştir (Sinyallerden en az biri bu düzeyi aşamamışsa söz konusu örnek değerlendirmeye alınmamıştır). Sonuçların değerlendirilmesinde iki türlü sinyal bulunmaktadır. Bunlar geri plan kırmızı/yeşil sinyaller ve özgül kırmızı/yeşil sinyallerdir⁵⁰.

Geri plan sinyalleri; çipe yüklenen histidin üzerinden alınan özgül olmayan yeşil ve kırmızı sinyallerdir. Geri plan sinyalleri ile örneklerden alınan özgül sinyallerden biri arasında, özgül sinyallerin sağlıklı sınırdaki değerlendirilebilmesi için, 5'e 1 veya daha fazla oranda bir fark bulunması gerekmektedir. Bunlardan biri örneklerden alınan sinyalin arka plan sinyale oranı (örnek/histidin), diğeri ise kırmızı sinyalin yeşil sinyale oranıdır (kırmızı/yeşil). Geri plan kırmızı veya yeşil sinyallerinden en az birine göre

özgöl sinyalleri 5'e 1 veya üzeri oranı tutturamayan örnekler değerlendirilmemiştir. Bu oran istatistiksel olarak hesaplanmış standart sapma değerinin 3 katı kullanılarak ve kesin doğruluk arz eden sonuçlar elde etmek üzere belirlenmiştir. Doğru belirlemelerin yapılabilmesi için heterozigot kontrollerde, hem kırmızı hem de yeşil kanalların 5:1 kriterini geçmiş olması gerekmektedir. Homozigot örneklerde ise kırmızı veya yeşil kanalın bu oranı yakalaması esastır⁵⁰.

Özgöl sinyaller; örneklerden alınan özgöl yeşil ve kırmızı sinyallerdir. Bu sinyallerin birbirine olan oranı ile örneğin genotipi belirlenir. Buna göre; 1:1 – 1:2 arasındaki oranlarda örnek *heterozigot*, 1:5 ve üzerindeki oranlarda yüksek olan sinyal kırmızı ise *mutant*, yeşil ise *yabanıl tip*, 1:2'den fazla veya 1:5'den az olduğunda ise genotipleme yapılamaz⁵⁰. Bu değerlendirmenin şematik anlatımı Şekil 8'de gösterilmiştir.



Şekil.8. Mikroarray analiz değerlendirmesinin şematik gösterimi⁵⁰

4. BULGULAR

Çalışma grubu, Ç.Ü Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'na talasemi ön tanısı ile gelmiş olan kişilerden oluşmaktadır. Toplam 52 bireyden alınan kan örneklerinin genomik DNA'larının izole edilmesinin ardından ARMS yöntemi ile β -talasemi mutasyon tipleri saptanmıştır. Mutasyon sonuçları incelendiğinde; 23 allelin IVS I-110, 13 allelin IVS I-1, 9 allelin IVS I-6, 9 allelin IVS II-1, 8 allelin Cd39 ve 6 allelin IVS II-745 mutasyonlarını içerdiği gözlenmiştir. Ayrıca 13 olgunun homozigot, 3 olgunun da çift heterozigot özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Bu olguların mutasyon tipleri Çizelge 7'de gösterildiği gibidir.

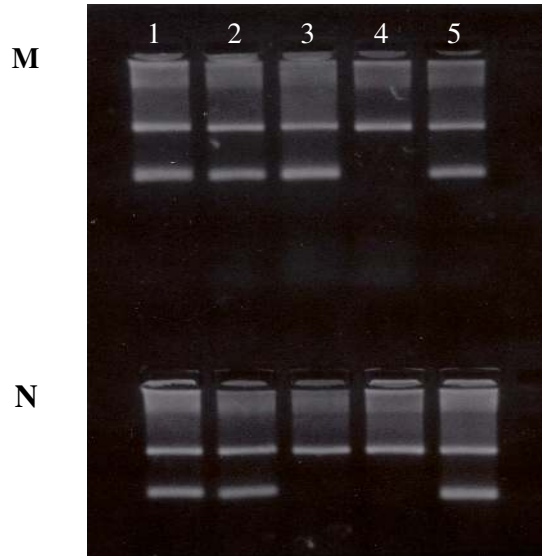
Çizelge 7. Olguların ARMS yöntemi sonucunda elde edilen β -talasemi mutasyon tipleri

No	İsim	Mutasyon Tipi
1	A.D.	IVS I-110 / IVS I-110
2	Z.A.	Cd39 / Cd39
3	B.M.	IVS I-1 / N
4	D.K.	IVS I-6 / N
5	S.K.	IVS II-1 / N
6	O.K.	IVS II-745 / N
7	F.A.	IVS I-110 / N
8	T.Ç.	IVS I-110 / N
9	B.M.Ü.	IVS I-1 / N
10	İ.K.	IVS I-6 / N
11	B.C	IVS II-1 / N
12	T.A.	IVS II-1 / N
13	Z.B.	Cd39 / N
14	M.K.	IVS I-110 / N
15	N.K.	IVS I-110 / N
16	A.K.	IVS I-110 / IVS I-110

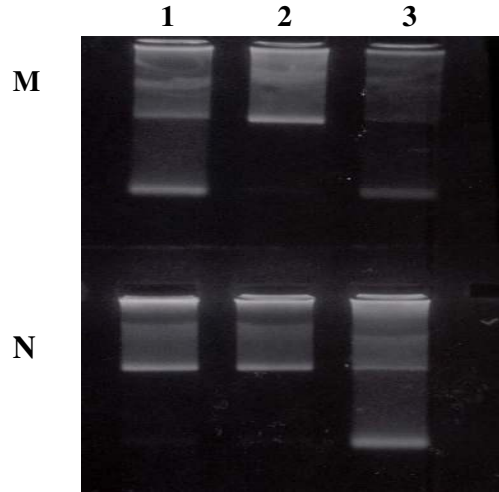
17	H.K.	IVS I-1 / IVS I-1
18	F.Ö.	IVS I-6 / IVS I-6
19	E.C.Ç.	IVS I-6 / IVS I-6
20	M.N.E.	IVS I-110 / N
21	Y.S.	IVS I-110 / IVS I-1
22	B.B.	IVS I-110 / IVS I-110
23	G.S.	IVS I-110 / IVS II-1
24	Z.K.	IVS I-110 / IVS I-110
25	A.G.	IVS II-1 / N
26	C.K.	IVS I-1 / N
27	H.K.	IVS II-1 / N
28	G.K.	Cd 39 / N
29	M.B.	IVS II-1 / IVS II-1
30	O.A.	IVS II-1 / N
31	M.E.	Cd39 / N
32	Ç.K.	IVS I-110 / N
33	F.G.	IVS I-1 / N
34	N.A.	IVS II-745 / IVS II-745
35	M.T.	IVS I-110 / IVS I-110
36	F.T.	IVS I-1 / N
37	H.A.	IVS I-6 / N
38	C.G.	IVS I-6 / N
39	T.E.	Cd39 / N
40	A.G.	IVS I-1 / N
41	N.S.	IVS I-110 / IVS I-6
42	F.S.	IVS I-110 / N
43	Z.A.	IVS I-110 / N
44	S.E.	IVS I-110 / N
45	S.B.	Cd39 / Cd39
46	H.B.	IVS I-1 / N
47	A.S.	IVS I-110 / N

48	D.B.	IVS I-1 / N
49	S.Y.	IVS II-745 / N
50	A.S.	IVS I-1 / N
51	M.E.K.	IVS I-1 / N
52	S.Y.	IVS II-745 / IVS II-745

IVS I-110 ve IVS I-1 mutasyon taramaları için ARMS yöntemi ile yapılan amplifikasyonun %2'lik agaroz jeldeki görünümü Şekil 9 ve 10'da gösterilmiştir. IVS I-1 mutasyonu için yapılan amplifikasyon kontrolünün IVS I-110 mutasyonuna göre daha zayıf olduğu gözlenmiştir.



Şekil 9. IVS I-110 mutasyon taraması için ARMS yöntemi ile yapılan amplifikasyonun %2'lik agaroz jeldeki görünümü. 1- Heterozigot örnek, 2- Heterozigot örnek, 3- Homozigot mutant örnek, 4- Negatif kontrol, 5- Pozitif kontrol; M: mutant, N: normal



Şekil 10. IVS I-1 mutasyon taraması için ARMS yöntemi ile yapılan amplifikasyonun %2'lik agaroz jeldeki görünümü. 1- Homozigot mutant örnek, 2- Negatif kontrol, 3- Pozitif kontrol; M: mutant, N: Normal

Çalışmanın ikinci aşamasında izole edilen DNA örnekleri mikroarray analizi için mikroarray primerleri ile tekrar amplifiye edilmiştir. Amplifikasyonu takiben saflaştırılan örnekler mikroarray yönteminde kullanılmak üzere hazır hale getirilmiş ve mikroarray ile mutasyon taraması yapılmıştır.

Mikroarray analizi için Nanogen β -Talasemi kiti kullanılmıştır. Kit içerisinde toplam 8 farklı mutasyona özgü (IVS I-110, Cd39, IVS I-1, IVS II-1, IVS I-6, IVS II-745, Cd6, -87) prob ve sabitleyici bulunmaktadır. Her bir mutasyon için ayrı ayrı okutma yapılarak mutasyonlar tespit edilmiştir (Her mutasyon için mutlaka bir kontrol örneği belirlenmiştir).

Amplifikasyon sonucu elde edilen biyotin işaretli ampikonlar çip üzerinde tek bir ped üzerine adreslenmiştir. Ampikonların işaretleyiciler yardımı ile hibridize edilmesinin ardından çip yüzeyi ikili lazer sisteminin kullanımı ile taranmıştır. Her bir mutasyon, normal allele komplementer olan bir proba beraber mutasyonlu diziye komplementer olan bir probun kullanımı ile tespit edilmiştir. Her bir prob farklı bir floresan ile işaretlendiği için iki farklı dalga boyundaki floresan yoğunluğu ölçülerek her bir örneğin genotipinin belirlenmesi mümkün olmuştur.

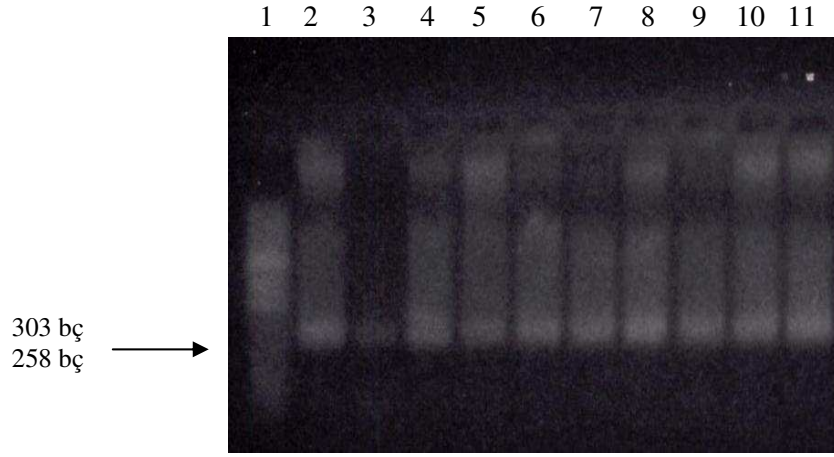
Olguların DNA mikroarray analiz sonuçları incelendiğinde; 23 allelin IVS I-110, 13 allelin IVS I-1, 9 allelin IVS I-6, 9 allelin IVS II-1, 8 allelin Cd39 ve 6 allelin IVS II-

745 mutasyonlarını taşıdığı belirlenmiştir. Ayrıca 13 olgunun homozigot, 3 olgunun da çift heterozigot özellik gösterdiği tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar Çizelge 8’de gösterildiği gibidir. Mikroarray ile yapılan mutasyon taraması sonucunda hiçbir olguda Cd6 ve -87 mutasyonları tespit edilmemiştir. Oligo-mix 1 ve oligo-mix 2 ile yapılan amplifikasyon kontrolünün %2’lik agaroz jel görünümü Şekil 11 ve Şekil 12’de gösterilmiştir.

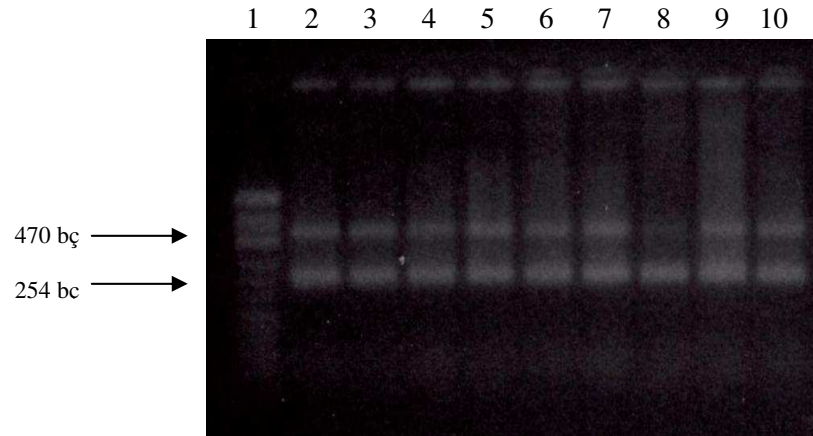
Çizelge 8. Olguların mikroarray çalışması sonucu elde edilen β -talasemi mutasyon tipleri

No	İsim	Mutasyon Tipi
1	A.D.	IVS I-110 / IVS I-110
2	Z.A.	Cd39 / Cd39
3	B.M.	IVS I-1 / N
4	D.K.	IVS I-6 / N
5	S.K.	IVS II-1 / N
6	O.K.	IVS II-745 / N
7	F.A.	IVS I-110 / N
8	T.Ç.	IVS I-110 / N
9	B.M.Ü.	IVS I-1 / N
10	İ.K.	IVS I-6 / N
11	B.C.	IVS II-1 / N
12	T.A.	IVS II-1 / N
13	Z.B.	Cd39 / N
14	M.K.	IVS I-110 / N
15	N.K.	IVS I-110 / N
16	A.K.	IVS I-110 / IVS I-110
17	H.K.	IVS I-1 / IVS I-1
18	F.Ö.	IVS I-6 / IVS I-6
19	E.C.Ç.	IVS I-6 / IVS I-6
20	M.N.E.	IVS I-110 / N
21	Y.S.	IVS I-110 / IVS I-1

22	B.B.	IVS I-110 / IVS I-110
23	G.S.	IVS I-110 / IVS II-1
24	Z.K.	IVS I-110 / IVS I-110
25	A.G.	IVS II-1 / N
26	C.K.	IVS I-1 / N
27	H.K.	IVS II-1 / N
28	G.K.	Cd 39 / N
29	M.B.	IVS II-1 / IVS II-1
30	O.A.	IVS II-1 / N
31	M.E.	Cd39 / N
32	Ç.K.	IVS I-110 / N
33	F.G.	IVS I-1 / N
34	N.A.	IVS II-745 / IVS II-745
35	M.T.	IVS I-110 / IVS I-110
36	F.T.	IVS I-1 / N
37	H.A.	IVS I-6 / N
38	C.G.	IVS I-6 / N
39	T.E.	Cd39 / N
40	A.G.	IVS I-1 / N
41	N.S.	IVS I-110 / IVS I-6
42	F.S.	IVS I-110 / N
43	Z.A.	IVS I-110 / N
44	S.E.	IVS I-110 / N
45	S.B.	Cd39 / Cd39
46	H.B.	IVS I-1 / N
47	A.S.	IVS I-110 / N
48	D.B.	IVS I-1 / N
49	S.Y.	IVS II-745 / N
50	A.S.	IVS I-1 / N
51	M.E.K.	IVS I-1 / N
52	S.Y.	IVS II-745 / IVS II-745

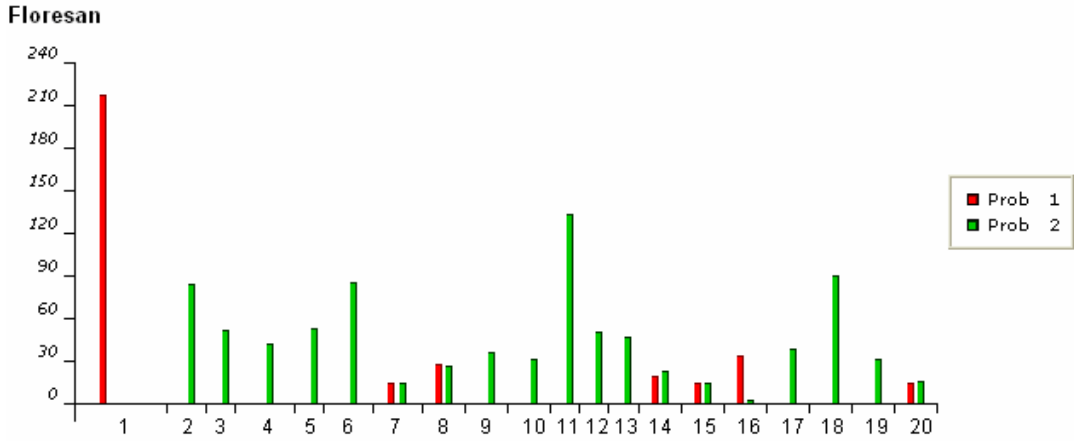


Şekil 11. Oligo-mix 1 ile yapılan amplifikasyon kontrolünün %2'lik agaroz jel görünümü. 1- Belirteç;
2,3,4,5,6,7,8,9,10,11- amplifiye olan örnekler
Belirteç olarak Hinf I kullanılmıştır

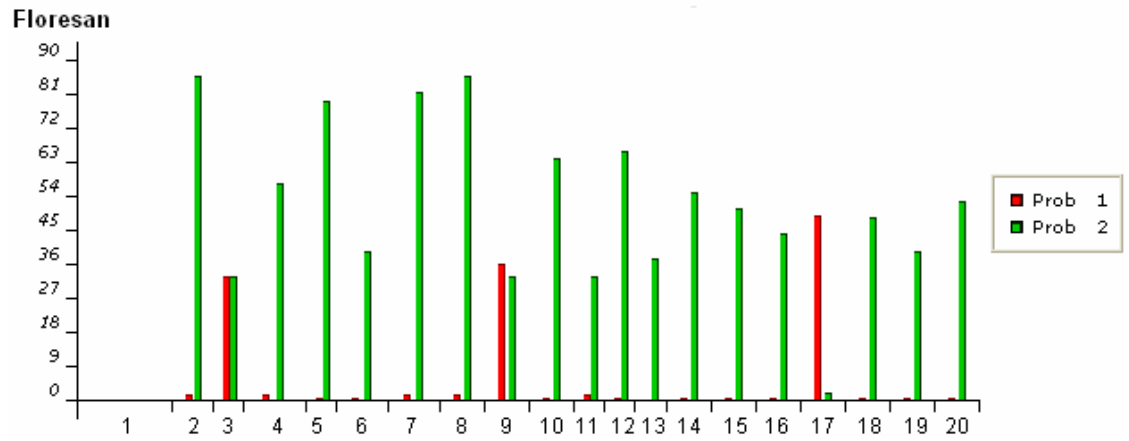


Şekil 12. Oligo-mix 2 ile yapılan amplifikasyon kontrolünün %2'lik agaroz jel görünümü. 1- Belirteç;
2,3,4,5,6,7,8,9,10- amplifiye olan örnekler
Belirteç olarak Hinf I kullanılmıştır

Pürifikasyonu takiben yapılan DNA mikroarray analiz grafikleri Şekil 13 ve 14’de gösterilmiştir.



Şekil 13. IVS I-110 için yapılan mikroarray analiz grafiği. 1 ve 16: Homozigot mutant örnekler; 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 19: Homozigot normal örnekler; 8, 14, 15, 20: Heterozigot örnekler (7 numaralı örnek kontrol olarak kullanılmıştır)



Şekil 14. IVS I-1 için yapılan mikroarray analiz grafiği. 17: Homozigot mutant örnek; 1, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19, 20: Homozigot normal örnekler; 9: Heterozigot örnek (3 numaralı örnek kontrol olarak kullanılmıştır)

Çalışmamızda, DNA mikroarray yönteminin β -talasemi prenatal tanısında rutin uygulamaya geçirilebilmesi amacı ile yöntem karşılaştırılması yapılmıştır. β -talasemi moleküler tanısında kullanılan klasik yöntemler ve DNA mikroarray yöntemi ile yapılan analizler sonucunda belirlenen 8 mutasyona ait allel sayıları Çizelge 9’da gösterilmiştir. Teorikte yöntemler arasında fark olmadığı gözlemlenmesine rağmen pratikte DNA mikroarray yönteminin klasik yöntemlere oranla çok büyük avantajlar sağladığı belirlenmiştir.

Laboratuvarlarda kullanılacak olan yöntemlerin seçimi duyulan ihtiyaca göre yapılmaktadır. En iyi yöntem kendisinden beklenen ihtiyaçların tümünü karşılayandır. Yöntem seçimini etkileyen faktörler; yöntemin toplam maliyeti (yatırım maliyeti, sarf malzemesi ve reaktif maliyetleri), uygulamadaki pratik özellikler (numune türü ve hacmi, yöntemin prensibi v.b), yöntemin analitik performans özellikleri (doğruluğu, spesifikliğı) ve yöntemin tıbbi yararı (teşhisteki hassasiyeti); göz önüne alındığında DNA mikroarray yönteminin prenatal tanıda sağlayacağı yarar ortaya çıkmaktadır. DNA mikroarray yöntemi hem ülkemize ve hastalara düşen maliyetin azaltılması hem de hızlı ve daha güvenilir sonuç verilebilmesi açısından gerek duyulan ihtiyacı tümüyle karşılamaktadır⁶⁰.

Çizelge 9. Mutasyonlara ait allel sayıları

Mutasyonlar	Klasik Yöntemler (Allel sayısı)	DNA Mikroarray (Allel sayısı)
IVS I-110	23	23
IVS I-1	13	13
IVS I-6	9	9
IVS II-1	9	9
Cd 39	8	8
IVS II-745	6	6
Cd 6	-	-
-87	-	-

5. TARTIŞMA

Talasemi, dünya popülasyonunun oldukça geniş bir kısmını etkileyen temel monojenik hastalıklardan biridir⁶¹. β globin gen ekspresyonunu azaltan ya da tamamen ortadan kaldıran mutasyonlar sonucu oluşmaktadır⁶². Ülkemiz, çeşitli etnik grupları birarada içermesinden dolayı β talasemi prevalansı ve β talasemi mutasyonlarının dağılımı farklı bölgelere göre çeşitlilik göstermektedir⁶³. Dünyada yaygın olarak görülen bu kalıtsal kan hastalığına Türkiye'de en sık rastlanılan yörenin Çukurova bölgesi olduğu çeşitli yayınlarda belirtilmiştir⁶⁴⁻⁶⁹.

β talasemi majörde genetik hasar, çoğunlukla β globin geninin her iki allelinde de meydana gelen nokta mutasyonlarından kaynaklanmaktadır. β talasemili bebekler genellikle sağlıklı doğmakta ve 3-6 aya kadar sağlıklı kalmaktadırlar^{61,70}. Sonraki dönemlerde bu bireylerde düzenli kan transfüzyonu gerektiren ağır bir anemi gelişmekte ve daha ileri dönemlerde de demir şelasyon tedavisi uygulanması gerekmektedir. Etkilenmiş kişiler genellikle yaşamlarının üçüncü evresinde hayatlarını kaybetmektedirler. Talasemi, tedavi maliyeti oldukça yüksek bir hastalık olup bir talasemi hastasının yıllık maliyetinin 10.000 \$ civarında olduğu tahmin edilmektedir⁷⁰. Ayrıca hastalığa ait semptomlar ve tedavi süreci de aileler ve onların sosyal yaşamları üzerinde zihinsel, fiziksel ve ekonomik açıdan olumsuz bir etki yaratmaktadır⁷¹.

Talasemi hakkındaki yetersiz bilgi ve eğitimsizlik bu hastalığın dünya çapında yayılmasına neden olmuştur. Bu nedenle şu anda birçok ülkede çiftlere gebelik öncesinde ya da başlangıcında sağlık kontrolünden geçmeleri önerilmektedir. Talaseminin analizi ve izlenmesinde etkili ve ekonomik tekniklerin geliştirilmesi amacı ile yapılan girişimler özellikle hastalığın yaygın olduğu ülkelerde önem taşımaktadır⁷². Hastalığın yayılmasının kontrolü popülasyon izlenmesi ve taşıyıcılara genetik danışmanlık verilmesi ile sağlanmakla birlikte, en etkili yol prenatal tanı aracılığı ile talasemili çocuk doğumunun önlenmesidir⁶¹.

β -talasemi Türkiye'de de önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Akriba evliliklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, ülkemizde beklenilenin de üzerinde β -talasemili çocuk doğmasına neden olmaktadır. Bu nedenle moleküler tanı ve doğum öncesi erken tanı (prenatal tanı) riskli aileler için büyük önem taşımaktadır⁸.

Talaseminin Türkiye'deki en yaygın tek gen hasarı olduğunun anlaşılmasından bu yana hastalığın moleküler temelini anlaşılması amacı ile birçok çalışma yapılmıştır^{11,73}. Günümüzde talasemilerin takibi ve tanısında PCR temeline dayalı olan birçok klasik moleküler yöntem kullanılmaktadır^{6,74}. Bu yöntemleri iki sınıfa ayırmak mümkündür; bilinen mutasyonların analizinde kullanılan yöntemler ve bilinen/bilinmeyen mutasyonların analizinde kullanılan yöntemler. Birinci sınıfta ARMS, RFLP, yüksek dansiteli oligonükleotid prob analizi (mikroarray), dot-blot analizi ve reverse dot-blot analizi yöntemleri sayılabilir. Diğer sınıf ise DGGE, dHPLC, TGCE gibi yöntemlerle yapılan heteroduplex analizi, manuel ve otomatik dizi analizi yöntemlerini içerir^{6,75-86}. Bu yöntemler, gendeki mutasyonlar hakkında detaylı bilgi edinmemizi sağlayan DNA teknolojisini kullanan avantajlı tekniklerdir⁷². β -talasemi moleküler tanısında; IVS I-110, IVS I-1, IVS II-1, IVS I-6, IVS II-745, Cd 39, Cd 8, Fsc 8/9, -30 gibi mutasyonlara bakılmaktadır^{63,74, 87-90}.

Türkiye'de Yılmaz ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 35 talasemili olgu incelenmiş ve ARMS yöntemi ile yapılan mutasyon analizleri sonucunda IVS I-110 mutasyonu en yüksek oranda (%32,85) gözlenmiştir. Bunu izleyen mutasyonlar ise IVS I-6 (%7,14), IVS I-1 (%7,14) ve IVS II-745 (%4,28) olarak rapor edilmiştir⁹¹.

Yüreğir ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Çukurova'nın üç ilinde (Hatay, Adana, İçel) toplam 7444 kişi taranmış ve beta talasemi sıklığı sırasıyla %5,7, %1,8 ve %3,3 olarak bulunmuştur. Yine aynı çalışma ile mutasyon sıklıkları; IVS I-110 (%54,6), IVS I-1 (%9,4), Cd39 (%8,7), IVS I-6 (%4,7), FrCd8 (%3,5), IVS II-1 (%2,7), -30 (%2,4), IVS II-745 (%1,9), Cd76 (%0,8), FrCd36/37 (%0,4) olarak bulunmuştur. Örneklerin %10,9'nun ise mutasyonları belirlenememiştir⁸⁷.

Tadmouri ve arkadaşları Türkiye'nin bölgelerindeki mutasyon dağılımının belirlenmesi amacı ile yaptıkları çalışmalarında yine Türkiye'de en yaygın olarak görülen mutasyonun IVS I-110 olduğunu ve bunu IVS I-6, Cd 8, IVS I-1, IVS II-745, IVS II-1, Cd 39, -30 ve Fsc 5 mutasyonlarının izlediğini belirlemişlerdir. Yine aynı çalışmada IVS I-110 mutasyonunun bölgelere göre dağılımının; Marmara bölgesinde %34,1, Ege ve Akdeniz bölgesinde %42,4, Anadolu'nun merkezinde %52,3, güneybatı Anadolu'da %26,4, Karadeniz bölgesinde %31,0 ve batı Anadolu'da %27,1 olduğunu tespit etmişlerdir¹¹.

Setianingsih ve arkadaşları Endonezya'da yaptıkları bir çalışma ile ARMS ve ACRS tekniklerini kullanarak daha önceden Endonezya popülasyonunda belirlenmiş olan 7 mutasyonu (IVS I-5, IVS I-1, IVS II-654, Cd 41-42, Cd 15, Cd 8-9 ve Cd 26) taramışlardır. En yüksek oranda görülen mutasyonun Cd 26 (%29) olup bunu IVS I-5 (%19) ve Cd 35 (%8) mutasyonlarının izlediğini, diğer mutasyonların frekansının ise %1-4 arasında değiştiğini rapor etmişlerdir⁹².

Baysal ve arkadaşları Birleşik Arap Emirlikleri'nde yaptıkları çalışmada PCR'a dayalı DNA tanı tekniklerini kullanarak 626 kromozom incelemişler ve mutasyon frekanslarını IVS I-5 (%47,6), HbS (%21,9), -25 bp del (%6,2), Cd 8/9 (%4,3), IVS II-1 (%2,9), Cd 8 (%1,9) olarak tespit etmişlerdir⁹³.

Türkiye'de prenatal tanı amacı ile yapılan bir çalışmada 140 kromozom incelenmiş ve mutasyon frekansları IVS I-110 (%37,15), IVS I-6 ve IVS I-1 (%7,15), Cd 39 (%6,43), Fsc 8 ve IVS II-1 (%5,71) ve IVS II-745 (%3,57), Fsc 5 (%2,86) olarak belirlenmiş ve diğer mutasyonların frekanslarının %2'den daha düşük olduğu rapor edilmiştir⁹⁴.

Çürük ve arkadaşları tarafından Çukurova bölgesi'nde yapılan çalışmada ARMS ve DNA dizi analizi yöntemleri kullanılarak mutasyon taraması yapılmış ve mutasyon frekansları; IVS I-110 (%57,3), IVS I-1 (%8,3), Cd 39 (%6, 4), IVS I-6 (%5,7), Cd 8 (%5,7), -30 (%4,7), IVS II-1 (%3,4), IVS II-745 (%2,8) ve CD 5 (%1,1) olarak bulunmuştur⁹⁵.

β -talasemili olgularla yaptığımız çalışmamızda hem klasik yöntemlerle (ARMS) hem de DNA mikroarray yöntemi ile mutasyon taraması yapılmış ve her iki yöntemle de mutasyon frekansları IVS I-110 (%22,11), IVS I-1 (%12,50), IVS I-6 (%8,65), IVS II-1 (%8,65), Cd 39 (%7,69) ve IVS II-745 (%5,76) olarak tespit edilmiştir. Cd 6 ve -87 mutasyonlarına ise hiçbir olguda rastlanmamıştır. Türkiye'de yapılan diğer çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda en yüksek oranda gözlenen mutasyonun IVS I-110 olduğu belirlenmiştir. Diğer mutasyonların ise bölgeye göre farklılıklar gösterdiği görülmektedir. ARMS yöntemi kullanılarak yaptığımız mutasyon tarama çalışmamız (DNA izolasyon aşaması hariç) yaklaşık 5 günde tamamlanmıştır.

β -talasemi, DNA düzeyinde araştırılan ilk genetik hastalıklar arasında olmasına rağmen β -globin genindeki mutasyonların belirlenmesi halen kullanışsız örnek manüplasyonu gerektiren zaman alıcı yöntemlere dayanmaktadır. Bu durum kısmen

hastalığın farklı etnik gruplar arasında çeşitlilik göstermesine bağlanabilir. Bu da tanısal stratejilerin gelişmesine engel olmaktadır⁹⁶. Bilindiği gibi β -talasemide erken teşhis ve tanı büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle popülasyon taramalarında taşıyıcıların belirlenmesi ve riskli çiftlere doğum öncesi erken tanı uygulanmasında hızlı, ekonomik ve kolay uygulanabilen yöntemler ön plana çıkmaktadır. Günümüzde β -talasemi tanısında kullanılan klasik yöntemlerle kesin ve güvenilir sonuçlar elde edilmektedir. Ancak doğum öncesi erken tanı söz konusu olan durumlarda Türk toplumu gibi birçok mutasyon olasılığı olan toplumlarda bu yöntemleri zaman baskısı altında uygulamak kolay değildir¹⁰. Bu nedenle tedaviye cevabın ve hastalığın ilerlemesinin önceden belirlenmesi ve en önemlisi tedavi için yeni hedeflerin bulunmasında mikroarray'ler büyük önem taşımaktadır¹¹.

Moleküler tanı, DNA ve RNA analizleri için oldukça ileri teknolojilerin gelişmesi ile devrime uğramıştır. En önemli değişimlerden biri de; mikroelettroniklerin mikroçipe dayalı nükleik asit teknolojileri ile bütünleşmesidir. Bu mikrosistemlerin spesifik özelliği; bir moleküler tanı prosedürünün mümkün olan her aşamasını minyatüre ve otomatize etmesidir⁹⁷. Son yıllarda birçok farklı mikroarray teknolojisi gelişmiştir. Bunlar; gen ekspresyonu, genotipleme ve diğer uygulamalarda kullanılmaya başlanmıştır. Mikroelettronik yöntemler (mikroarray) pasif hibridizasyon tekniklerine ait birçok problemin üstesinden gelebilen yüksek-performanslı hibridizasyon sağlamaktadır. Bu aktif mikroelettronik cihazlar mikroarray yüzeyindeki yüklü DNA/RNA moleküllerinin hızlı ve kontrol edilebilen taşınımını sağlayan elektrik alanlarının üretilmesi yeteneğine sahiptir. Ayrıca test bölgesinde prob/hedef DNA'nın toplanmasını sağlayarak DNA hibridizasyon oranını artırma özelliğine de sahiptirler. Test bölgesindeki elektrik alanının tersine dönmesi elektronik bir direnç etkisi yaratmaktadır. Bu da hibridizasyonun spesifitesini büyük ölçüde arttırarak nokta mutasyonları ve SNP'lerin ayırım yeteneğini arttırmaktadır⁹⁸.

Tek bir çalışma ile yüzlerce ya da binlerce SNP'in eş zamanlı genotiplendirilmesi son yıllarda gelişmiş bir teknolojidir⁹⁹. Bu gelişmiş platform (NanoChip Molecular Biology Workstation) bir günde 400 örnek (4 çip) tarama imkanı sağlayan tamamen otomatize bir cihazdır⁹⁶. NanoChip Molecular Biology Workstation, kendine ait bir mikroçip kartuşu kullanmaktadır. Bu kartuş elektronik olarak adreslenebilen 100 bölge içermektedir¹⁰⁰. Bu bölgelerde belirlenmiş test alanları

üzerindeki biyotinli moleküllerin aktif depolanmasına ve toplanmasına olanak sağlamaktadır. Daha sonra her bir ped üzerindeki DNA, normal veya mutant dizilere komplementer olan spesifik oligonükleotid probalar ile (Cy3 ve Cy5 boya ile işaretlenmiş) hibridize edilir. Çip yüzeyi görüntülenir, floresan sinyaller taranır, izlenir ve oldukça gelişmiş sayısal görüntüleme yöntemleri ile değerlendirilir¹⁰¹. Bu teknolojinin en önemli yararı; yöntemin tasarımına olanak sağlayan yüksek esneklik özelliğidir¹⁰⁰. Sistemin esnekliği aynı çip üzerinde farklı içerikte, uzunlukta ve kimyasal kompozisyondaki çeşitli problemlerin aynı anda kullanımına olanak sağlamasıdır¹⁰².

Jel elektroforezi, RFLP, pasif prob hibridizasyonu ve DNA dizi analizi gibi yöntemler mutasyon belirlenmesinde standart yöntemler olarak kabul edilmelerine rağmen zaman alıcı ve zahmetli yöntemlerdir¹⁰¹. Güncel yöntemlerle karşılaştırıldığında NanoChip sisteminin kullanımının zaman tasarrufu ve basitliği açısından avantaj sağladığı yapılan çalışmalarla ispatlanmıştır. Hem çözelti maliyeti hem de etkili çalışma zamanı açısından karşılaştırıldığında klasik yöntemlerin elektronik çip yönteminden iki kat daha pahalı olduğu gösterilmiştir. Bunun ana sebebi de daha fazla çalışma zamanı gerektirmesi ile açıklanmaktadır¹⁰².

Nanochip sistemi oldukça cazip olmasına rağmen cihazın şu anki maliyeti birçok laboratuvar için pahalı olmaktadır. Ancak sistem kurulduktan sonra sadece rutin moleküler tanı çalışmaları için değil yeni testlerin hızlı ve kolay bir şekilde geliştirilebilmesi için de oldukça kullanışlıdır¹⁰⁰.

Yapılan çalışmalarda olduğu gibi bizim çalışmamızda da analiz maliyetinin azaltılması için bir evrensel oligonükleotid işaretleyici sistemi dizayn edilmiş ve uygulanmıştır. Bu sistemde normal ve mutant işaretleyiciler floresan boya ile işaretlenmek yerine işaretlenmiş evrensel işaretleyici dizeye komplementer olan bir dize ile uzatılmıştır. Böylece sadece bir çift floresan oligonükleotidin kullanılması ile ilgilenilen her bir mutasyona özgü, özgül Cy3 veya Cy5 işaretli oligonükleotid kullanımı ihtiyacından sakınılarak her bir olası SNP'in varlığının açıkça belirlenmesi sağlanmıştır¹⁰⁰.

Foglieni ve arkadaşları Nanogen Workstation mikroyarray cihazı ile yaptıkları çalışmalarında sık rastlanan 9 β -talasemi mutasyonunu (Cd39C→T, IVS 1-110G→A, IVS 1-1G→A, IVS 1-6T→C, IVS 2-745C→G, Cd6delA, -87C→G, IVS 2-1G→A ve Cd8delAA) taramışlardır. Çalışmayı, önceden diğer yöntemlerle (allel-spesifik

hibridizasyon (dot blot ve reverse dot blot), ARMS, RFLP, DGGE ve dizi analizi) genotipi belirlenmiş olan 250 DNA örneği üzerinde denemiş ve daha sonra multiplex PCR yaparak çipin test yüzeyi üzerinde aynı çalışma ile 9 mutasyonun tümünü analiz etmişlerdir. Sinyal alınamayan örneklerin nedenini amplifikasyonun yetersiz veya az olması ya da pürifikasyon sırasında örneklerin kaybedilmesi ile açıklamışlardır. Toplam 700 örnek ile yaptıkları çalışmada; bu açık ve esnek yöntemin her bir coğrafik bölgedeki mutasyonların bölgesel yaygınlığına göre tasarlanabileceği görüşüne varmışlardır. Ayrıca dünyanın diğer bölgelerindeki β -talasemiye neden olan diğer mutasyonları da içerecek şekilde düzenlenebileceğini de belirtmişlerdir⁹⁶.

Bizim çalışmamızda da örneklerin %8,65'inden sinyal alınamamıştır. Bu durum saflaştırma işleminin düzgün yapılamamış olabileceğine bağlanmış ve örnekler tekrar saflaştırılarak mikroarray ile analiz edilmişlerdir. Analiz sonucunda tüm örneklerden doğru sonuçlar elde edilebilmiştir.

Çin'de Bang-Ce ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, talasemi mutasyon tipleri önceden belirlenmiş olan 1880 kişinin mikroarray yöntemi ile tekrar mutasyonları taranmış ve yapılan moleküler analizler sonucunda yine aynı mutasyonlar tespit edilmiştir. Sonuçlar, mikroarray yönteminin gen üzerindeki tek-baz değişimlerinin ayırımında mükemmel bir yöntem olduğunu açıkça göstermiştir. Ayrıca insan genomik DNA'sındaki homozigot ve heterozigot mutasyonların belirlenmesi ve ayrılmasında da oldukça başarılı bir yöntem olduğu tespit edilmiştir. Bang-Ce ve arkadaşları bu sonuçlara dayanarak mikroarray yönteminin popülasyon izleme çalışmaları için uygun bir teknik olduğu kanısına varmışlardır¹⁰³.

Santacroce ve arkadaşları klinik olarak ilgili genler (faktör VII, β -globin ve RET protoonkogen) üzerinde yaptıkları çalışmada SNP'lerin belirlenmesi amacı ile Nanogen Molecular Workstation mikroelettronik DNA çip cihazını kullanmışlardır. Yaklaşık 950 örnek (faktör VII geni için 331 örnek, β -globin geni için 604 örnek ve RET protoonkogen için 15 örnek) ile yapılan çalışmada ilk olarak tüm örnekleri dizi analizi, allel-spesifik PCR, RFLP gibi çeşitli yöntemler kullanılarak genotiplendirmişlerdir. Ardından mikroelettronik çip yöntemi ile de analiz ettikleri örneklerin tümünde diğer genotipleme yöntemleri ile belirlenen sonuçları elde etmişlerdir. Santacroce ve arkadaşlarının bu çalışmasında β -globin geninde yapılan analizde IVS I-1G→A, IVS I-6T→C ve IVS II-1G→A mutasyonları incelenmiştir¹⁰². Çalışma sonucunda bu

yöntemin IVS I-1 ve IVS I-6 için heterozigot olan örnekleri açık bir şekilde ayırt ettiği tespit edilmiştir. Ayrıca IVS II-1 olan örnekleri de normal genotipli örneklerden ayırt edebildiğini göstermişlerdir. Tüm örneklerden elde edilen sonuçları geleneksel yöntemlerle elde edilen genotiplerle %100 uyumlu bulmuşlardır. Yapılan çalışmada örneklerin %8-12'den sinyal alamamışlardır. Bu durumu örneklerin düzgün hazırlanmamış olabileceğine ya da PCR ürünlerinin miktarının yetersizliğine bağlamışlardır. Bu örnekleri tekrar saflaştırarak tekrar mikroarray ile analiz ettiklerinde bazı örneklerden tekrar edilen analiz sonucunda doğru sonuçlar tespit edilirken bazılarından yine sinyal alınamamıştır. Santacrose ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada tüm analitik aşamaların (PCR ürünlerinin yüklenmesi, prob hibridizasyonu, yıkama ve hibrid belirlenmesi) 4-6 saatte tamamlandığını (~2 saatlik amplifikasyon süresi dışında) belirtmişlerdir. En zaman alıcı aşamanın ise biyotinlenmiş PCR ürünlerinin ped üzerine adreslenmesi (~3,5 saat) olduğunu belirtmişlerdir¹⁰².

Toplam 52 örnekle yaptığımız çalışmamızda klasik ARMS yöntemi kullanılarak yapılan mutasyon tarama çalışması yaklaşık 5 günde (DNA izolasyon aşaması hariç) tamamlanırken DNA mikroarray ile yapılan tarama çalışması tüm aşamalar (amplifikasyon, saflaştırma, yükleme, okutma ve analiz) dahil olmak üzere 7-8 saatte tamamlanmıştır.

Sonuç olarak; Çukurova bölgesinde yaygın olarak görülen β -talaseminin moleküler tanısında DNA mikroarray yönteminin kullanılmasının klasik yöntemlere oranla hem zaman tasarrufu sağlaması hem de topluma ve hastaya olan maliyeti azaltması, %100 güvenilirlikle çalışması ve tekrarlanabilirliğinin yüksek oluşu açısından büyük bir avantaj sağlayacağı görüşüne varılmıştır. Ayrıca daha ileri çalışmalarla prob tasarımı ve üretiminin de yapılarak bu konuda patent alınması da hedeflenmektedir.

6. SONUÇLAR

1. Çalışma toplam 52 olgu ile gerçekleştirilmiştir. Moleküler analizler çerçevesinde; klasik araştırmalarda kullanılan ARMS yöntemi ve moleküler tanıda yeni bir teknoloji olan DNA mikroarray yöntemi kullanılarak olguların β -talasemi mutasyon tipleri belirlenmiştir.

2. β -talasemi'nin moleküler tanısında rutin olarak kullanılan ARMS yöntemi ile yapılan analizler sonucunda 23 allelin IVS I-110, 13 allelin IVS I-1, 9 allelin IVS I-6, 9 allelin IVS II-1, 8 allelin Cd39 ve 6 allelin IVS II-745 mutasyonunu içerdiği saptanırken Cd6 ve -87 mutasyonlarına hiçbir olguda rastlanmamıştır. DNA mikroarray ile yapılan analizler sonucunda da olgularda aynı mutasyonlar tespit edilmiş olup 23 allelin IVS I-110, 13 allelin IVS I-1, 9 allelin IVS I-6, 9 allelin IVS II-1, 8 allelin Cd39, 6 allelin IVS II-745 mutasyonunu taşıdığı bulunmuştur. Aynı şekilde Cd6 ve -87 mutasyonları hiçbir olguda gözlenmemiştir. Bu çalışma kapsamında her iki yöntemle de aynı sonuçlar elde edilmiş olmasına rağmen β -talasemi moleküler tanısında kullanılan klasik ARMS yöntemine oranla DNA mikroarray yönteminde sonuçlar daha kısa sürede elde edilmiştir. Ayrıca tek seferde tüm örnekleri çalışabilme imkanı da sağlanmıştır.

3. β -talasemi mutasyonlarının moleküler düzeyde incelenmesi, hastalığın önlenmesinde ve prenatal tanısında büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle hassas ve güvenilir tanısal yöntemlerin kullanılması gerekmektedir. Her ne kadar günümüzde kullanılmakta olan klasik moleküler yöntemler bu ihtiyaca cevap vermekte ise de son yıllarda geliştirilen DNA mikroarray teknolojisi tanıda büyük bir değer kazanmaya başlamıştır. Yöntem hem çok sayıda örneği aynı anda çalışma imkanı sağlaması hem de %100 güvenilirlikle sonuç vermesi bakımından daha avantajlıdır. Ayrıca DNA mikroarray yönteminin kullanılması ile hastalara ve topluma olan maliyet de azaltılmış olmaktadır. Bu durum β -talasemi prenatal tanısında oldukça büyük bir önem teşkil etmektedir. Bu nedenle Çukurova bölgesinde yaygın olarak görülen bu hastalığın moleküler tanısında DNA mikroarray yönteminin kullanılmasının büyük bir avantaj sağlayacağı görüşüne varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. **Loukopoulos D.** Thalassemia: Genotypes and phenotypes. *Ann Hematol*, **1991**; 62(4): 85-94.
2. **Kazazian HH Jr.** The thalassemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin Hematol*, **1990**; 27(3): 209-228.
3. **Lukens J.** The Thalassemia and Related Disorders: Quantitative Disorders of Hemoglobin Synthesis. Eds; Lee GR, Foerster J, Lukens J, Paraskevas F, Greer JP, Rodgers GM. In. *Wintrobe's Clinical Hematology* , 10th Ed., Baltimore, WB Saunders Company, **1999**:1405-1448.
4. **Weatherall DJ.** The Thalassemias. Eds; Stamatoyannopoulos G, Majerus PW, Perlmutter RM, Varmus H. In. *The Molecular Basis of Blood Disease*, 3th Ed., Philadelphia: WB Saunders Company, **2001**; 183-226.
5. **Bunn HF, Forget BG.** *Hemoglobin In: Molecular Genetic and Clinical Aspects*, Philadelphia; WB Saunders Company, **1986**; 60-90.
6. **Kazazian HH, Boehm CD.** Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood*, **1998**; 72(4): 1107-1116.
7. **Arcasoy A, Canatan D.** Dünyada ve Türkiye'de Talasemi ve Hemoglobinopatiler. Eds; Arcasoy A, Canatan D, Köse M, Üstündağ M. *Hemoglobinopati ve Talasemi, Önlem-Tanı-Tedavi*. Antalya; Siyah Grafik Matbaacılık Ltd. Şti., **2002**: 13-17.
8. **Tüzmen Ş, Schechter AN.** Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic method for elucidating β - thalassemia mutations. *Blood Rev*, **2001**; 15(1): 19-29.
9. **Çavdar AO.** Türkiye'de Talasemi insidansı. Thalassemia Sempozyumu, TÜBİTAK, Ankara, **1981**: 13-17.
10. **Başak AN.** Talasemi Moleküler Genetiği. Temel Moleküler Hematoloji Kursu. Mersin, 2005: 99-106.
11. **Akyerli C.** Hematoloji'de Microarray Kullanımı. Temel Moleküler Hematoloji Kursu. Mersin, 2005: 23-24.
12. **Sarnaik SA.** Thalassemia and related hemoglobinopathies. *Indian J Pediatr*, **2005**; 72: 319-324.
13. **Tadmouri GO, Tüzmen Ş, Özçelik H, Özer A, Baig SM, Senga EB, Başak AN.** Molecular and population genetic analyses of β -thalassemia in Turkey. *Am J Hematol*, **1998**; 57: 215-220.
14. **Cao A.** β -thalassemia mutations in mediterranean populations. *Br J Haematol*, **1989**; 71: 309-312.

15. **Diaz-Chico JC, Yang K, Yang K, Efremow DG, Stoming TA, Huisman THJ.** The detection of β globin gene mutations in β thalassemia using oligonucleotide probes and amplified DNA. *Biochim Biophys Acta*, **1988**; 949: 43–48.
16. **Arcasoy A.** Türkiye’de Thalassemia Taşıyıcı Sıklığı ve Anormal Hemoglobinler. *Ankara Talasemi Derneği*, **1994**.
17. **Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW.** *Harper Biyokimya*. 25.Baskı, İstanbul; Nobel Matbaacılık, **2004**.
18. **Champe PC, Harvey RA.** *Lippincott Biyokimya*. 2. Baskı, İstanbul: Tayf Ofset, **1997**.
19. **Higgs DR, Thein SL, Wood WG.** Human Haemoglobin. Eds; Gibbons R, Higgs DR, Old JM, Oliveri NF, Thein SL, Wood WG. In. *The Thalassemia Syndromes*, 4th Oxford Ed, Blackwell Science Ltd, **2001**; 65-120.
20. **Erişim:**(http://academic.pgcc.edu/~aimholtz/AandP/206_ONLINE/Blood/blood1.html).Erişim tarihi:06.03.2006.
21. **Nelson DL, Cox MM.** Lehninger Biyokimyanın İlkeleri. 3. Baskıdan çeviri, İstanbul: Palme Yayıncılık, **1999**.
22. **Erişim:** (<http://pharyngula.org/~pzmyers/MyersLab/teaching/Bi104/107/heme.html>). Erişim tarihi: 15.03.2006
23. **Swank AR, Stamatoyannopoulos G.** Fetal gene reactivation. *Curr Opin Genet Dev*, **1998**; 8: 366-370.
24. **Clarke GM, Higgins TN.** Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: Review and update. *Clin Chem*, **2000**; 46(8B): 1284-1290.
25. **Weatheral DJ, Clegg JB, Higgs DR, Wood WG.** The Thalassemias. Eds; Scriver CR, Arthur AL, Sly WS, Valle D. In. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 8th Ed., New York: McGraw Hill Publishing Division, **2001**: 4571-4636.
26. **Aksoy M.** Anormal Hemoglobinler ve Hemoglobinopatiler. *Çocuk Hematolojisi ve İmmünolojisi*, İstanbul, **1973**: 33-71.
27. **Olivieri NF, Weatheral DJ.** Thalassemias. Eds; Lilleyman JS, Hann IM, Blanchette VS In. *Pediatric Hematology*, 2th Ed., London: Churchill & Livingstone, **1999**: 307-327.
28. **Gürgey A.** Talasemi ve Hemoglobinopatilerde Yeni Görüşler. TÜBİTAK, Ankara, **1986**.

29. **Weatheral DJ.** The Thalassemias. Eds; Beutler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. In. *Williams Hematology*, 6th Ed., New York: Mc Graw Hill Publishing Co, **2001**:547-580.
30. **Gümrük F.** Hemoglobin ve Hemoglobinopatiler. Eds; İliçin G, Ünal S, Biberoğlu K, Akalın HE, Süleymanlar G, In. *Temel İç Hastalıkları*, 1.Baskı, Ankara, Güneş Kitabevi Ltd, **1996**: 1233-1243.
31. **Hoffbrand AV, Pettit J.** Color Atlas of Clinical Hematology. 3th Ed, Barcelona: Serena Bureau, **2000**: 85–106.
32. **Yüreğir GT.** Hemoglobin Yapısı ve Özellikleri. Klinik Biyokimya 1, **1990**: 132-143.
33. **Nienhuis AW, Anagnou NP, Ley TJ.** Advances in thalassemia research. *Blood*, **1984**; 63(4): 738-758.
34. **Erişim:**(http://www.mun.ca/biology/scarr/4241_Genome_organization.htm).Erişim tarihi:15.03.2006
35. **Rund D, Rachmilewitz E.** Pathophysiology of α - and β - thalassemia: Therapeutic implications. *Sem Hematol*, **2001**; 38(4): 343-349.
36. **Huisman THJ, Carver MFH, Baysal E.** A Syllabus of Thalassemia Mutations. The Sick Cell Anemia Foundation, Augusta, USA, **1997**.
37. **Basalic R, Gavrilu L.** Application of molecular diagnosis technologies in beta-thalassemia: Enzymatically amplified DNA and restriction site analysis. *Roum Biotechnol Lett*, **2001**; 6(1): 63-70.
38. **Apak H.** Hemoglobinopatiler ve Talasemiler. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Anemiler Sempozyumu, İstanbul, **2001**: 149-162.
39. **Rosatelli MC, Dozy A, Faa V, Meloni A, Sardu R, Saba L, Kan YW, Cao A.** Molecular characterization of β -thalassemia in the Sardinian population. *Am J Hum Genet*, **1992**; 50: 422-426.
40. **Weatheral DJ.** The Thalassemias. Eds; Williams WJ, Beutler E, Coller BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U. In. *Williams Hematology*, 5th Ed., New York: McGraw Hill Publishing Co, **1995**; 581-615.
41. **Çürük MA, Attila G, Tuli A, Arpacı A, Evrücke C, Özgünen FT, Kılınç Y, Aksoy K, Yüreğir GT.** Çukurova Bölgesinde Orak Hücre Anemisi ve Beta Talasemi Sıklığı; 537 Prenatal Tanı Sonucu. 1. Uluslar arası Talasemi Yaz Okulu. Antalya, 2000: 133-134.
42. **Mastropietro F, Modiano G, Cappabianca MP, Foglietta E, D'Asero C, Mezzabotta M, Ponzini D, Maffei L, Amato A, Lerone M, Grisanti P, Biagio PD, Rinaldi S, Bianco I.** Factors regulating Hb F synthesis in thalassemic diseases. *BMC Blood Disorders*, **2002**; 2: 1-7.

43. **Najmabadi H, Teimourian S, Khatibi T, Neishabury M, Pourfarzad F, Jalil-Nejad S, Azad M.** Amplification Refractory Mutation System (ARMS) and reverse hybridization in the detection of beta-thalassemia mutations. *Arch Iran Med*, **2001**; 4 (4): 165–170.
44. **Kayrın L, Aksoy K, Tuli A, Çürük MA, Attila G.** Tanıda DNA Teknikleri VI. Biyokimya Yaz Okulu Kitabı, Çukurova Üniversitesi, Adana, **2003**.
45. **Atalay EÖ, Çırakoğlu B, Dinçol G, Atalay A, Kılınç Y, Aytekin H, Yüreğir GT, Arpacı A, Benuek E, Aksoy M.** Regional distributions of β -thalassemia mutations in Turkey. *Int J Hematol*, **1993**; 57: 207-211.
46. **Arcasoy MO, Gallagher PG.** Molecular diagnosis of hemoglobinopathies and other red blood cell disorders. *Semi Hematol*, **1999**; 36(4): 328-339.
47. **Tanrıverdi K.** β -Talasemi Mutasyon Tiplerinin Moleküler Düzeyde İncelenmesi. *Bilim Uzmanlığı Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Adana, **1993**.
48. **Topal K.** Antakya, Kayseri ve İzmir örneklerinde β -Talasemi Mutasyon Tiplerinin Saptanması. *Doktora Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Adana, **1998**.
49. **Green EK.** Restriction Fragment- Length Polymorphism. Eds; Rapley R, Walker J. In. *Molecular Biomethods Handbook*. New Jersey: Humana Press, 1998: 271-279.
50. **Nanogen Nanochip Molecular Biology Workstation Türkçe Kullanım Klavuzu.**
51. **Bowden JR, Brennan PA.** DNA microarray technology: insights for oral and maxillofacial surgeons. *Br J Oral Maxillofac Surg*, **2004**; 42: 542-545.
52. **Bryant PA, Venter D, Browne RR, Curtis N.** Chips with everything: DNA microarrays in infectious diseases. *Lancet Infect Dis*, **2004**; 4: 100-111.
53. **Fadiel A, Naftolin F.** Microarray applications and challenges: A vast array of possibilities. *Int Arch Biosci*, **2003**: 1111-1121.
54. **Eickhoff H, Schneider U, Nordhoff E, Nyarsik L, Zehetner G, Nietfeld W, Lehrach H.** Technology Development for DNA Chips. Eds; Grigorenko EV. In. *DNA Arrays Technologies and Experimental Strategies*. 2nd Ed, United States of America: CRC Press, **2002**; 1-9.
55. **Schena M, Davis RW.** Genes, Genomes, and Chips. Eds; Schena M. In. *DNA Microarrays A Practical Approach*., New York: Oxford University Press, **2001**; 1-16.
56. **Amaratunga D, Cabrera J.** Exploration and analysis of DNA microarray and protein array data. New Jersey: Wiley-Interscience, **2004**; 23-38.

57. **Dünder E.** Koroner Arter Hastalığında Genetik Risk Faktörleri ve MDA'nın Yeri. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Adana, **2003**.
58. **Düzgünce D.** Çukurova Bölgesinde Hemofili A ve B'li Hastaların Mutsyon Analizi. *Yüksek Lisans Tezi*, Çukurova Üniversitesi, Adana, **2006**.
59. NanoChip Molecular Biology Workstation Beta Thalassemia Genotyping Reagents and Amplification Mix
60. **Uras F.** Yöntem Seçimi ve Standardizasyonu. Ed; Aslan D. In. Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi. Mart Matbaacılık, 72-81.
61. **Li D, Liao C, Li J, Xie X, Huang Y, Zhong H, Wei J.** Prenatal diagnosis of β thalassemia in Southern China. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, **2006**; 128(1-2): 81-85.
62. **May C, Sadelain M.** A Promising genetic approach to the treatment of β -thalassemia. *Trends Cardiovasc Med*, **2001**; 11(7): 276-280.
63. **Öner AF, Özer R, Üner A, Arslan Ş, Gürük F.** Beta-thalassemia mutations in the East of Turkey. *Turk J Hematol*. **2001**; 18(4): 239-241.
64. **Kılınç M, Koçak F, Yüreğir G, Aksoy K.** İçel ilinde orak hücre anemisi ve β -talasemi taşıyıcılık sıklığı. *ÇÜ Tıp Fak Der*, **1999**; 24: 62-65.
65. **Aksoy M.** Sick cell trait in South Turkey. *Lancet*, **1955**; 19: 589.
66. **Arcasoy A, Çavdar AO.** Türkiye'de talasemi ve anormal hemoglobin nispeti. *Ank Ü Tıp Fak Mec*, **1970**; 33: 1-18.
67. **Yüreğir GT, Donma O, Dikmen N, İsbir T, Çınar M.** Population studies of Haemoglobin S and other variants in Çukurova, The Southern part of Turkey. *Acta Haematol Jap*, **1987**; 50: 757-765.
68. **Yüreğir G, Aksungur P, Burgut R, Solakoğlu A, Atalay Ö, Aksoy M.** A survey of high A₂ β -Talasemi, hemoglobin variants, G6PD deficiency anemia in Karataş, Çukurova, Southern Turkey. *Doğa TU J Med Sci*, **1989**; 13: 203-210.
69. **Yüreğir GT, İspir T.** Çukurova'da Hb S ve G6PD enzim eksikliği ve aralarındaki ilişki. *Doğa Tıp Ecz Der* 1984; 8: 232-244.
70. **Chern SR, Chen CP.** Molecular prenatal diagnosis of thalassemia in Taiwan. *Int J Gynaecol Obstet*, **2000**; 69: 103-106.
71. **Erişim:**(<http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/clinicclinique/pdf/s2c20e.pdf>).Erişimtarihi:02.04.2006.

72. **Hartwell SK, Srisawang B, Kongtawelert P, Christian D, Grudpan K.** Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta*, **2005**; 65: 1149-1161.
73. **Altay C, Başak AN.** Molecular basis and prenatal diagnosis of hemoglobinopathies in Turkey. *Int J Pediat Hematol/Oncol*, **1995**; 2: 283.
74. **Denmat CL, Duchassaing D.** Rapid diagnosis of β thalassemia mutations in Mediterraneans by PCR and restriction analysis of naturel and created sites. *Clin Biochem*, **1997**; 30(5): 433-437.
75. **Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF.** Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* **1989**; 17: 2503-2516.
76. **Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ.** Rapid detection and prenatal diagnosis of beta-thalassaemia: studies in Indian and Cypriot populations in the UK. *Lancet*, **1990**; 336: 834-837.
77. **Romey MC ,Aguilar-Martinez P, Demaille J, Claustres M.** Rapid detection of single nucleotide deletions: application to the beta 6 (-A) mutation of the beta-globin gene and to cystic fibrosis. *Hum Genet*, **1993**; 92: 627-628.
78. **Pirastu M, Ristaldi MS, Cao A.** Prenatal diagnosis of beta thalassaemia based on restriction endonuclease analysis of amplified fetal DNA. *J Med Genet*, **1989**; 26: 363-367.
79. **Ristaldi MS, Pirastu M, Rosatelli C, Monni G, Erlich H, Saiki R, Cao A.** Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia in mediterranean populations by dot blot analysis with DNA amplification and allele specific oligonucleotide probes. *Prenat Diagn*, **1989**; 9: 629-638.
80. **Maggio A, Giambona A, Cai SP, Wall J, Kan YW, Chehab FF.** Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven mediterranean beta-thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood*, **1993**; 81: 239-242.
81. **Sutcharitchan P, Saiki R, Huisman TH, Kutlar A, McKie V, Erlich H, Embury SH.** Reverse dot-blot detection of the African-American beta-thalassemia mutations. *Blood*, **1995**; 86: 1580-1585.
82. **Losekoot M, Fodde R, Harteveld CL, van Heeren H, Giordano PC, Bernini LF.** Denaturing gradient gel electrophoresis and direct sequencing of PCR amplified genomic DNA: a rapid and reliable diagnostic approach to beta thalassaemia. *Brit J Haematol*, **1990**; 76: 269-274.
83. **Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM.** Attachment of a 40-base-pair G + C-rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes. *Proc Nat Acad Sci USA*, **1989**; 86: 232-236.
84. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Nat Acad Sci USA*, **1977**; 74: 5463-5467.

85. **Hacia JG.** Resequencing and mutational analysis using oligonucleotide microarrays. *Nat Genet*, **1999**; 21: 42–47.
86. **Lipshutz RJ, Fodor SP, Gingeras TR, Lockhart DJ.** High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*, **1999**; 21: 20–24.
87. **Yüreğir GT, Arpacı A, Aksoy K, Tuli A, Dikmen N, Özgünen FT, Kılınç Y.** Population at risk for hemoglobinopathies in Çukurova, Türkiye: Need for prenatal diagnosis. *Ann Med Sci*, **1995**; 4: 61-69.
88. **Kayıslı GÖ, Keser İ, Canatan D, Şanlıoğlu A, Özeş ON, Lüleci G.** Identification of a novel frameshift mutation [Codon 3 (+T)] in a Turkish patient with β -thalassemia intermedia. *Turk J Med Sci*, **2005**; 35: 175.177.
89. **Altay Ç.** The frequency and distribution pattern of β -thalassemia mutations in Turkey. *Turk J Hematol*, **2002**; 19(2): 309-315.
90. **Rahimi Z, Raygani AV, Merat A, Haghshenass M, Gerard N, Nagel RL, Krishnamoorthy R.** Thalassemic mutations in southern İran. *Iran J Med Sci*, **2006**; 31(2): 70-73.
91. **Yılmaz B, Balım Z, Özkinay F, Gündüz C, Altıntaş N, Aydınok Y, Topçuoğlu N.** Beta talasemi mutasyon tiplerinin moleküler analizi. *Ege Tıp Dergisi*, **2000**; 39(3): 153-157.
92. **Setianingsih I, Williamson R, Marzuk S, Harahap A, Tamam M, Forrest S.** Molecular basis of β -Thalassemia in Indonesia: Application to prenatal diagnosis. *Mol Diagn*, **1998**; 3(1): 11–20.
93. **Baysal E.** Molecular heterogeneity of beta-thalassemia in the United Arab Emirates. *Community Genet*, **2005**; 8: 35–39.
94. **Tüzmen Ş, Tadmouri GO, Özer A, Baig SM, Özçelik H, Başaran S, Başak AN.** Prenatal diagnosis of β -thalassemia and sickle cell anemia in Turkey. *Prenat Diagn*, **1996**; 16: 252–258.
95. **Çürük MA, Arpacı A, Attila G, Tuli A, Kılınç Y, Aksoy K, Yüreğir GT.** Genetic heterogeneity of beta-thalassemia at Cukurova in southern Turkey. *Hemoglobin*, **2001**; 25(2): 241-245.
96. **Foglieni B, Cremonesi L, Travi M, Ravani A, Giambona A, Rosatelli MC, Perra C, Fortina P, Ferrari M.** β -Thalassemia microelectronic chip: A fast and accurate method for mutation detection. *Clin Chem*, **2004**; 50(1): 73-79.
97. **Ferrari M, Cremonesi L, Bonini P, Stenirri S, Foglieni B.** Molecular diagnostics by microelectronic microchips. *Expert Rev Mol Diagn* , **2005**; 5(2): 183-192.
98. **Heller MJ.** DNA microarray technology: Devices, systems, and applications. *Annu Rev Biomed Eng.*, **2002**; 4: 129-153.

- 99. Craig DW, Stephan DA.** Applications of whole-genome high-density SNP genotyping. *Expert Rev Mol Diagn.*, **2005**; 5(2): 159-170.
- 100. Moutereau S, Narwa R, Matheron C, Vongmany N, Simon E, Goossens M.** An improved electronic microarray-based diagnostic assay for identification of MEFV mutations. *Hum Mutat*, **2004**; 23: 621-628.
- 101. Ferrari M, Cremonesi L, Bonini P, Foglieni B, Stenirri S.** Single-nucleotide polymorphism and mutation identification by the nanogen microelectronic chip technology. *Methods Mol Med.*, **2005**; 114: 93-106.
- 102. Santacroce R, Ratti A, Caroli F, Foglieni B, Ferraris A, Cremonesi L, Margaglione M, Seri M, Ravazzolo R, Restagno G, Dallapiccola B, Rappaport E, Pollak ES, Surrey S, Ferrari M, Fortina P.** Analysis of clinically relevant single-nucleotide polymorphisms by use of microelectronic array technology. *Clin Chem*, **2002**; 48(12): 2124–2130.
- 103. Bang-Ce Y, Hongqiong L, Zhuanfong Z, Zhengsong L, Jianling G.** Simultaneous detection of α -thalassemia and β -thalassemia by oligonucleotid microarray. *Haematologica*, **2004**; 89: 1010-1012.

8. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında Ereğli’de dünyaya gelen Elçin ÖZKARALI; ilk, orta ve lise öğrenimini Ereğli’de tamamladıktan sonra, 1999 yılında Ç.Ü Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü’nü kazanmış ve buradan 2003 yılında mezun olmuştur. Aynı yıl Ç.Ü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Anabilim Dalı’nda Yüksek Lisans eğitime başlamıştır. Halen Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitime devam etmektedir.