

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

**BETA-TALASEMİ MAJÖR HASTALARINDA TAL1 GENİ
EKSPRESYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ VE HBF İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuğba Nur UYGUÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

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

**BETA-TALASEMİ MAJÖR HASTALARINDA TAL1 GENİ
EKSPRESYON DÜZEYİNİN BELİRLENMESİ VE HBF İLE
İLİŞKİSİNİN ARAŞTIRILMASI**

Tuğba Nur UYGUÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim KESER

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2019-4573 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma, jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Tıbbi Genetik Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 05/02/2021

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İbrahim KESER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Fahri UÇAR
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Türker BİLGİN
Tekirdağ Namık Kemal Üniversitesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Erol GÜRPINAR
Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Öğrenci

Tuğba Nur UYGUÇ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. İbrahim KESER

TEŐEKKÜR

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan değerli danışman hocam sayın Prof. Dr. İbrahim KESER'e, sonsuz teőekkür ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca yardım, bilgi ve tecrübeleri ile bana sürekli destek olan Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü alıőanlarına, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalındaki tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma teőekkür ederim.

Projemizde yer alan ve tez hastalarımızın klinik takibini yapan Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Adem Tolunay Talasemi Merkezi'nden Sayın Prof.Dr.Erdal KURTOğLU ve ekibine, gönüllü olarak çalışmaya katılan kontrol grubu ve tüm hastalarımıza teőekkür ederim.

Çalıőmalarım boyunca maddi, manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan aileme çok teőekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana olan inancıyla beni hep cesaretlendirmiş ve desteğini hiçbir zaman esirgememiş olan değerli sevgilim Uzay Yuna'ya çok teőekkür ederim.

ÖZET

Amaç: Hemoglobinopatiler dünyada görülen en yaygın tek gen hastalıklarıdır. Hemoglobinopatilerden biri olan beta-talasemi için postnatal dönemde fetal γ -globin ekspresyonunun HbF düzeyini yükseltmesi, modifiye edici faktörlerden biri olup, hastalık semptomlarını azaltmaktadır. Bu çerçevede projemizin amacı, HbF düzeyi yüksek olan beta-talasemi majör hastalarında gamma globin promotor bölgesini regüle eden transkripsiyon faktörü TAL1'in ekspresyonu ve HbF yüksekliği arasındaki ilişkiyi araştırmaktır.

Yöntem: Çalışmamızda 30 beta-talasemi majörlü ve 30 normal kontrol bireyinde, RNA izolasyonunu takiben, cDNA elde edilerek, TAL1 ekspresyon profili tayini için qRT-PCR yöntemi kullanıldı. Çalışmada referans olarak bir housekeeping gen olan GAPDH kullanıldı. Normalizasyonu takiben, TAL1 ile GAPDH ve normal kontrollerin ekspresyon düzeyleri kıyaslandı. HbF yüksekliği ile TAL1 ekspresyon seviyeleri karşılaştırıldı ve tüm sonuçlar yüzde olarak hesaplandı.

Bulgular: Çalışmamıza alınan HbF'i yüksek beta talasemi majörlü 30 hastanın ortalama hemoglobin değeri 8,63 iken, ortalama HbF değerinin %10,23 olduğu görüldü. En sık görülen allelin %55 sıklıkla IVS.I.110 (G>A) alleli olduğu bulundu. qRT-PCR sonuçlarında 30 hastanın %76,6'sında (23 hastada) 1,1 ila 5,2 kat arasında artış gözlenirken, 7 hastada normal seviyede tespit edildi. İki katın altında TAL1 ekspresyonu 13 hastada gözlenirken, 2 katın üzerinde görülen 10 hastadan 8'inin en yüksek HbF düzeyine sahip olduğu bulundu.

Sonuç: Çalışmamızda hasta sayısının az olmasına rağmen, HbF'i yüksek olan beta-talasemi majör hastalarımızın %76'sında yüksek HbF oranı ile artmış TAL1 geni ekspresyon seviyesi arasında pozitif yönde bir ilişki bulunmuştur. Bu sonuç bize, TAL1 ve onun bağlandığı bölgelerin, HbF indüksiyonu ile tedavi seçeneği için yeni araştırma hedefleri olabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hemoglobinopatiler, Beta-Talasemi Majör, HbF, TAL1, qRT-PCR.

ABSTRACT

DETERMINATION OF TAL1 EXPRESSION AND ITS RELATIONSHIP WITH HbF LEVEL IN BETA-THALASSEMIA MAJOR PATIENTS

Objective: Hemoglobinopathies are the most common single gene diseases seen in the world. For beta-thalassemia, which is one of the hemoglobinopathies, the increase of fetal γ -globin expression in the postnatal period is one of the modifying factors and decreases the symptoms of the disease. In this context, the aim of our project is to investigate the relationship between the expression of the transcription factor TAL1 that regulates the gamma globin promoter region and HbF elevation in beta-thalassemia major patients with high HbF levels.

Methods: In our study, qRT-PCR method was used for TAL1 expression profile by obtaining cDNA following RNA isolation in 30 beta-thalassemia major and 30 normal control individuals. GAPDH, a housekeeping gene, was used as a reference in the study. Following normalization, expression levels of TAL1 and GAPDH and normal controls were compared. HbF height and TAL1 expression levels were compared and all results were calculated as percentages.

Results: The mean hemoglobin value of 30 patients with high HbF beta thalassemia major included in our study was 8.63, while the mean HbF value was 10.23%. It was found that the most common allele was the IVS.I.110 (G> A) allele with 55% frequency. While an increase between 1.1 and 5.2 times was observed in TAL1 levels in 76.6% of 30 patients (23 patients) in the qRT-PCR results, it was found to be normal in 7 patients. While TAL1 expression less than two times was observed in 13 patients, 8 out of 10 patients with more than 2 folds were found to have the highest HbF level.

Conclusion: Despite the small number of patients in our study, a positive relationship was found between high HbF rate and increased TAL1 gene expression level in 76% of our beta-thalassemia major patients with high HbF. This result shows us that TAL1 and its binding sites may be new research targets for the treatment option with HbF induction.

Key words: Hemoglobinopathies, Beta-Thalassemia Major, HbF, TAL1, qRT-PCR.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Hemoglobin	2
2.1.1. Hemoglobin Çeşitleri	3
2.1.2. Globin Gen Aileleri.....	5
2.2. Hemoglobinopatiler	9
2.3. Beta Talasemi	13
2.3.1. Malarya Hipotezi.....	13
2.3.2. Epidemiyoloji.....	16
2.3.3. Beta Talasemi Mutasyonları	17
2.3.4. Beta Talasemi; Patofizyolojisi ve Tedavi Stratejileri.....	22
2.3.5. Beta Talasemide Klinik Tabloyu Etkileyen Genetik Faktörler.....	32
2.4. Fetal Hemoglobin	36
2.5. TAL1 Transkripsiyon Faktörü	43
2.6. Kantitatif RNA Ekspresyon Tayin Yöntemi: qRT-PCR	48
3. GEREÇ ve YÖNTEM	50
4. BULGULAR	58
5. TARTIŞMA	66

6. SONUÇ ve ÖNERİLER	72
KAYNAKLAR	74
ÖZGEÇMİŞ.....	83



TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Yaygın β -Hemoglobinopati türleri ve spesifik klinik bulguları.....	10
Tablo 2.2. Akdeniz bölgesinde en sık görülen β -Talasemi mutasyonları ve etki mekanizmaları.....	19
Tablo 2.3. Türkiye’de en sık görülen 5 β -talasemi mutasyonu.....	20
Tablo 2.4. Yaygın genotipleri ile beta- talasemi sınıflarının genel özellikleri.....	22
Tablo 3.1. Ekspresyon tayini için TAL1 ve GAPDH genlerine özgü primer çiftleri	55
Tablo 4.1. Çalışılan 30 hastanın demografik ve hematolojik verileri.	59
Tablo 4.2. Çalışılan 30 hastanın HbF değerlerinin büyüklüklerine göre 10’arlı 3 gruba ayrılması ve grup HbF ortalamaları	63
Tablo 4.3. Çalışılan 30 hastanın demografik, hematolojik ve genetik verilerinin birlikteliği ve çalışılan hastalardan, diğer iki ayrı tez projesi (Arıkan, 2016; Karaman, 2017) ile ortak olanların, HbF düzeyleri ile BCL11A rs11886868 C>T, Xmn1 rs7482144 C>T ve SALL2 Ex-2 c.2236 C>G varyantlarının birlikteliği.....	64
Tablo 4.4. HbF değeri yüksek beta-talasemi majörlü ve TAL1 ekspresyonu 2 katın üzerinde olan 10 hastanın BCL11A rs11886868 C>T, Xmn1 rs7482144 C>T ve SALL2 Ex-2 c.2236 C>G varyantları ile ilişkisi.	65
Tablo 5.1. 30 hastaya ait demografik, hematolojik, daha önceki proje çalışmalarımızda ortak olan hastalara ait genetik veriler ile birlikte, TAL1 ekspresyon düzeylerinin kümülatif verileri.....	70

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Hemoglobin Proteininin Yapısı	3
Şekil 2.2. Heme Molekülünün Yapısı.....	3
Şekil 2.3. Globin zincirlerinin gelişimsel süreçte sentezlendiği organlar ve oranları .	4
Şekil 2.4. Kromozom 11 ve 16'da lokalize α ve β globin genleri	5
Şekil 2.5. İnsan kromozomları. HBA ve HBB gen lokuslarının bulunduğu kromozomlar	6
Şekil 2.6. Alfa-1 globin zincirini kodlayan HBA1 geninin kromozom 16 üzerinde lokalizasyonu.....	6
Şekil 2.7. Alfa-2 globin zincirini kodlayan HBA2 geninin kromozom 16 üzerinde lokalizasyonu.....	7
Şekil 2.8. β -globin zincirini kodlayan HBB geninin kromozom 11 üzerinde lokalizasyonu.....	7
Şekil 2.9. Gamma1-globin zincirini kodlayan HBG1 (γ -A) geninin kromozom 11 üzerinde lokalizasyonu.....	8
Şekil 2.10. Gamma2-globin zincirini kodlayan HBG2 (γ -G) geninin kromozom 11 üzerinde lokalizasyonu.....	8
Şekil 2.11. Thomas Cooley.....	13
Şekil 2.12. Alfa- ve beta talaseminin dünya üzerindeki dağılımı.....	15
Şekil 2.13. Malarya'nın dünya üzerindeki dağılımı.....	16
Şekil 2.14. Beta Talasemi ile sonuçlanan mutasyonların konumları.....	18
Şekil 2.15. β -Talasemiye sebep olan nokta mutasyonların oluştuğu yerlere ve sebep oldukları talasemi sınıfına göre gösterimi.....	18

Şekil 2.16. β -talasemiye sebep olan delesyon mutasyonları ve epidemiyolojileri	19
Şekil 2.17. “PSU Genome Browser” web sitesinin ekran görüntüsü, kromozom 11'deki IVS-I-110 (G-> A) β + (HBB: c.93-21G> A, HbVarID.827) mutasyonunun yerini göstermektedir.....	21
Şekil 2.18. Nükleotid seviyesinde IVS 1-110 (G> A) mutasyonu.....	21
Şekil 2.19. Beta Talasemi patofizyolojisi ve tedavi hedefleri şekilde gösterilmiştir.	24
Şekil 2.21. İnefektif eritropoez	28
Şekil 2.22. İnefektif Eritropoez sonucu olan α -hemikromların kırmızı kan hücre (eritrosit) duvarlarına zarar vermesi ve trombotik komplikasyonlarının hücresel boyutta gösterimi.....	29
Şekil 2.23. Klasik Beta-talasemi hastalığına ait komplikasyonlar ve yönelik tedaviler şekilde gösterilmiştir.	30
Şekil 2.24. β -globin geninin aktif looping pozisyonunda etkisi olan başlıca transkripsiyon faktörleri	37
Şekil 2.25. Gelişimsel süreçte aktif/inaktif haldeki γ -globin ve β -globin genleri değişimini gösteren illüstrasyon.....	39
Şekil 2.26. Kromatin looping ve β -LCR&LDB1/GATA kompleksi aracılı β -globin geni transkripsiyonunun illüstrasyonu	40
Şekil 2.27. HbF regülatör elemanlarından Beta-Globin gen lokusunun ve lokalize polimorfizmlerin haritalanması.....	41
Şekil 2.28. HbF regülatör elemanlarından BCL11A gen lokusunun ve lokalize polimorfizmlerin haritalanması.....	42
Şekil 2.29. HbF regülatör elemanlarından MYB gen lokusunun ve lokalize polimorfizmlerin haritalanması.....	42

Şekil 2.30. TAL1 transkripsiyon faktör proteinini kodlayan TAL1 geninin kromozom 1 üzerinde lokalizasyonu.....	44
Şekil 2.31. TAL1 geninin yapısı ve bu gene ait uzun ve kısa transkript varyantları .	45
Şekil 2.32. TAL1'in ilişkide olduğu protein ve transkripsiyon faktörleri	46
Şekil 2.33. TAL1'in ilişkide olduğu protein ve transkripsiyon faktörleri illustrasyonuna ait lejant	47
Şekil 2.34. RT-PCR işlem adımları.	49
Şekil 3.1. Gerçek (Eş) zamanlı RT-PCR döngüleri, Eşik Çizgisi, Taban çizgisi, Linear faz ve Ct değeri.	57
Şekil 4.1. Çalışılan 30 hastadaki mutant beta-globin allellerinin dağılımı.	60
Şekil 4.2. Çalışılan 30 Beta-Talasemi Majör hastasının genotip dağılımı.....	60
Şekil 4.3. İzole edilen RNA'nın elektroforezde kontrolü: gDNA'ya karşı yürütülen toplam RNA'daki 28S rRNA ve 18S rRNA'nın görüntüsü.....	61
Şekil 4.4. TAL1 geninin referans dizisi ve ekspresyon analizi için kullanılan primerlerin yerleşimleri.....	61
Şekil 4.5. Çalışılan 30 hastanın normal-kontrole karşılık hesaplanan TAL1 ekspresyon düzeyleri.....	62

SİMGELER ve KISALTMALAR

α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
δ	Delta
ε	Epsilon
2-ME	2-Merkaptoetanol
BCL11A	B-cell lymphoma/leukemia 11A Geni
b-TI	Beta Talasemi İntermedia
b-TM	Beta Talasemi Majör
b-TT	Beta Talasemi Taşıyıcısı
C282Y	HFE Geninde Cys282Tyr Mutasyonu
cDNA	Komplementer DNA
Ct	Eşik Döngüsü (Cycle Treshold)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EDTA	EtilenDiaminTetraAsetikası
ESR	Östrojen Reseptör Geni
GAPDH	Gliseraldehid3-Fosfat Dehidrojenaz
GATA1	GATA Binding Protein 1
GSP	Gen Spesifik Primer
GVHD	Graft versus Host Hastalığı
H63D	HFE Geninde 63'te Histidin-Aspartik Asit Mutasyonu
Hb	Hemoglobin
HbA	Hemoglobin-A (Adult Hb, Yetişkin hemoglobin)
HBA	Hemoglobin Alfa Geni

HbA2	Hemoglobin-A2
HBA2	Hemoglobin-Alfa 2 Geni
HBB	Hemoglobin-Beta Geni
HBD	Hemoglobin Delta Geni
HBE	Hemoglobin Epsilon Geni
HbF	Fetal Hemoglobin
HBG1,2	Hemoglobin-Gamma 1,2 Geni
HbS	Hemoglobin S
HBS1L	HBS1 Benzeri (Like) Translasyonel GTPaz Geni
HFE	Hemostatik Fe (Demir) Regülatör Geni
HLA	İnsan Lökosit Antijeni (Human Leukocyte Antigen)
HMIP	HBS1L-MYB İntergenik Bölge
HPFH	Kalıtımsal Fetal Hemoglobin Kalıcılığı
HS	Çok Hassas Bölge
ICAM	İntersellüler Adezyon Molekülü
KLF1	Krueppel-like Faktör 1 Geni
LCR	Lokus Kontrol Bölgesi
LDB1	LIM-Domain Binding 1 Geni
LIM	Lin11/Isl1/Mec3 Geni
LMO1,2	LIM Domain Only 1,2 Geni
MYB	MYB Proto-onkogen, Transkripsiyon Faktörü
O2	Oksijen
OD	Optik Yoğunluk (Optical Density)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)
qRT-PCR	Kantitatif RT-PCR
QTL	Kantitatif Karakter Lokusu

RNA	Ribonükleik Asit
RT-PCR	Revers-Transkriptaz PCR
SCL	Kök Hücre Lösemi, (Stem Cell Leukemia) Geni
SNP	Tek Baz Polimorfizmi (Single Nucleotide Polimorphism)
SOX6	SRY-Box Transkripsiyon Faktörü 6 Geni
TA7	UGT1 Geninde TA7 Mutasyonu
TAL1	T-hücre Akut Lenfositik Lösemi Geni
TF	Transkripsiyon faktörü
Tm	Erime Sıcaklığı (Temperature of Melting)
TNF	Tümör Nekroz Faktörü
UGT1	UDP Glukuronozil Transferaz 1 Geni
VDR	Vitamin D Reseptör Geni
ZBTB7A	LRF, Zinc Finger and BTB Domain 7A Geni

1. GİRİŞ

Hemoglobin yapımından sorumlu globin genlerinin ekspresyonundan, inefektif eritropoez ve kan hücrelerinin apoptozuna kadar olan süreçte, mevcut mutasyonlar hemoglobinopatilere neden olur ve mutasyona uğramış globin zincirlerine göre isimlendirilirler (Keser ve ark., 2004). Beta Talasemi, dünya çapında ve ülkemizde ciddi klinik semptomlara ve hatta mortaliteye neden olan önemli hemoglobinopatilerden biridir (Keser, 2017).

Mevcut destekleyici tedavi yaklaşımları arasında ömür boyu süren ilaç uygulamaları ve gözlem, splenektomi, düzenli kan transfüzyonunu içermektedir. Ancak hematopoietik kök hücre nakli (kemik iliği nakli) kalıcı çözüm sunabilse de HLA-uyumlu donör bulma zorluğu, GVHD gibi immün reaksiyon hastalıkları ve rekürrensi riski gibi dezavantajlara sahiptir.

Beta-talasemi, tek gen hastalığı olmasına karşın, genetik ve epigenetik modifiye edici faktörlerle farklı klinik fenotipler göstermektedir. Özellikle beta-talasemi majör fenotipinde görülen HbF yüksekliği ile patofizyolojinin daha hafif olması dikkat çekmiş ve önemli bir araştırma alanı yaratmıştır. HbF'i indükleyen genetik ve epigenetik faktörler birlikte, genom düzeltme için yeni hedef bölge ve fonksiyonlar daha çok aydınlatıldıkça, bunlara yönelik tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi ve çeşitlendirilmesi ile hastaların yaşam kalitesinin artırılması sağlanabilecektir.

Bu kapsamda, yukarıdaki bilgiler ışığında, daha önceki çalışmalarımız olan HbF'in epigenetik olarak indüklenmesi, modifiye edici genlerin analizini takiben bu projemizde de yüksek HbF seviyesine sahip birçoğu ortak olan beta-talasemi majörlü hastalarda yaptığımız çalışmanın amacı, fetal hemoglobin yapısında yer alan gamma globinin promotor bölgesine tutunarak ekspresyonunu sağlayan TAL1 transkripsiyon faktörünün qRT-PCR yöntemiyle belirlenen ekspresyon seviyesi ile aynı hastaların HbF düzeyleri arasındaki ilişkini araştırılmasıdır.

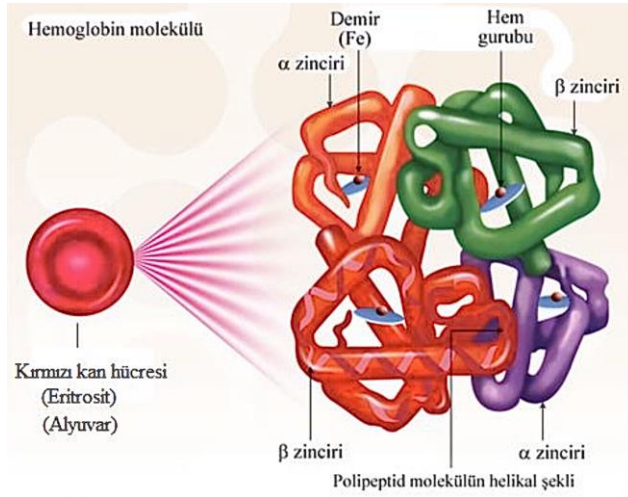
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemoglobin

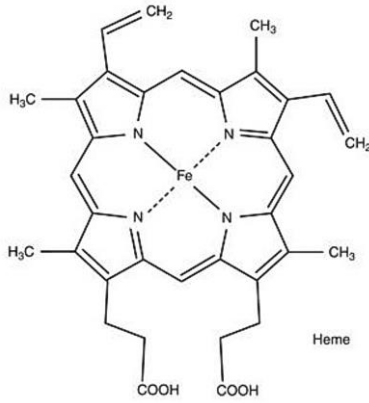
Hemoglobin molekülü, omurgalı hayvanların ve bazı solucanlar gibi yumuşakçaların kırmızı kan hücrelerinde yani; eritrositlerinde (yumuşakçalarda plazmada) bulunup dokulara ve organlara oksijen (O_2) taşımaktadır. İnsan kanında sadece bir tek eritrosit içinde yaklaşık 270 milyon bulunan hemoglobin molekülü bulunmaktadır. Hemoglobin 4 globin aminoasit zincirinden oluşmakta; her birine kovalent bağlı 1 heme grubu ve bunların merkezlerinde bağlı 1 Fe (demir) molekülünden oluşup, kuaterner yapıda bir protein özelliği taşırlar (https://en.wikipedia.org/wiki/Red_blood_cell, Erişim tarihi: 01.09.2020).

Hemoglobin molekülünün oksijen taşıma yeteneğinin yaklaşık 500 milyon yıl öncesine dayandığı düşünülmektedir (Miyata ve ark., 2020). Oksijen taşıma yetenekleri ise; yapılarındaki demir bağlı globin zincirlerinin O_2 elementine karşı gösterdiği allosterik düzenleme sayesinde (Perutz, 1989). Hemoglobinlerin oksijene affiniteleri, O_2 bağlandıkça yükselir ve daha fazla oksijen bağlamalarını sağlar.

Anormal veya fonksiyonunu kaybetmiş globin zincirleri O_2 'e bağlanma yeteneği gösteremezler veya farklı affinitelerle bağlanma eğilimi gösterebilirler. Globin zincirlerinin O_2 'e affinitesi ise ortam koşullarına ve globin cinsine ve globin genlerinde meydana gelmiş mutasyonların varlığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir (Damsgaard ve ark., 2013; Perutz ve ark., 1981; Ronda ve ark., 2013)



Şekil 2.1. Hemoglobin Proteininin Yapısı (Hemoglobin.gen.tr, <https://hemoglobin.gen.tr/>, Erişim tarihi: 01.09.2020).



Şekil 2.2. Heme Molekülünün Yapısı (Boundless, <https://www.boundless.com/physiology/textbooks/boundless-anatomy-and-physiology-textbook/respiratory-system-22/gas-exchange211/oxygen-transport-1035-2202/>, Erişim tarihi: 01.09.2020)

2.1.1. Hemoglobin Çeşitleri

Hemoglobin molekülü insanın prenatal gelişim dönemleri olan embriyonik ve fetal dönem ile doğum sonrası postnatal dönemde farklı globin zincirleri içerdiği görülmektedir. Bunlar;

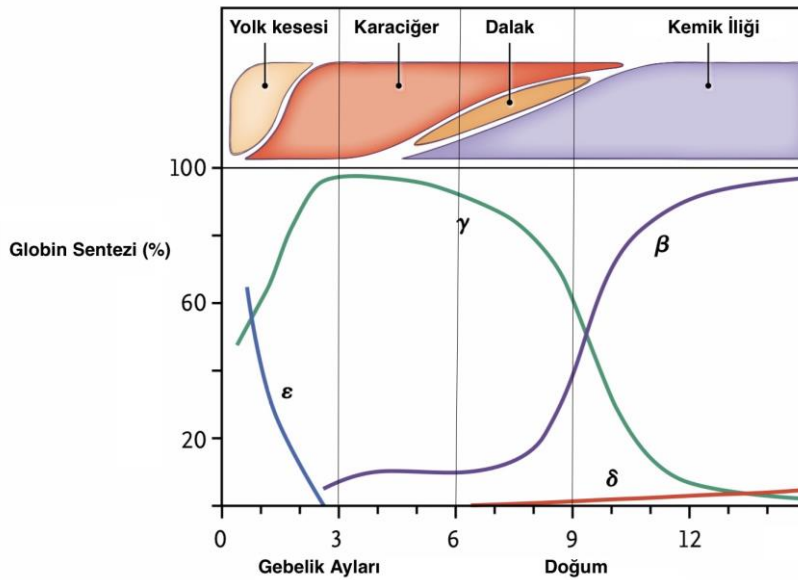
- Hemoglobin Portland,
- Hemoglobin Gower-1,
- Hemoglobin Gower-2,
- Hemoglobin F,
- Hemoglobin A,
- Hemoglobin A2 fonksiyonel hemoglobinlerdir.

Gebelik süresince bebeğin sahip olduğu hemoglobinler; ilk 8 hafta embriyonik hemoglobinler (Gower-1 [$\zeta 2\epsilon 2$], Gower-2 [$\alpha 2\epsilon 2$] ve Portland [$\zeta 2\gamma 2$]) ve 9. haftadan sonra baskın olacak fetal hemoglobin ($\alpha 2\gamma 2$)'dir. Doğumdan sonra Hb F (Fetal Hemoglobin) miktarı giderek azalacak ve 1 yaşından sonra toplam hemoglobin içindeki oranı %2'nin altına inecektir.

Her ne kadar zigot oluşumunun 1. ayından itibaren üretilmeye başlasa da HbA, doğum sonrası 6. aydan itibaren kandaki hemoglobinlerin yaklaşık %95ini oluşturacaktır.

Hb A2 ($\alpha 2\delta 2$) doğumdan hemen sonra görülmeye başlar ve %1,5-3,5 gibi düşük seviyede hayat boyu devam eder (Şekil 1.1) (Schecher, 2008).

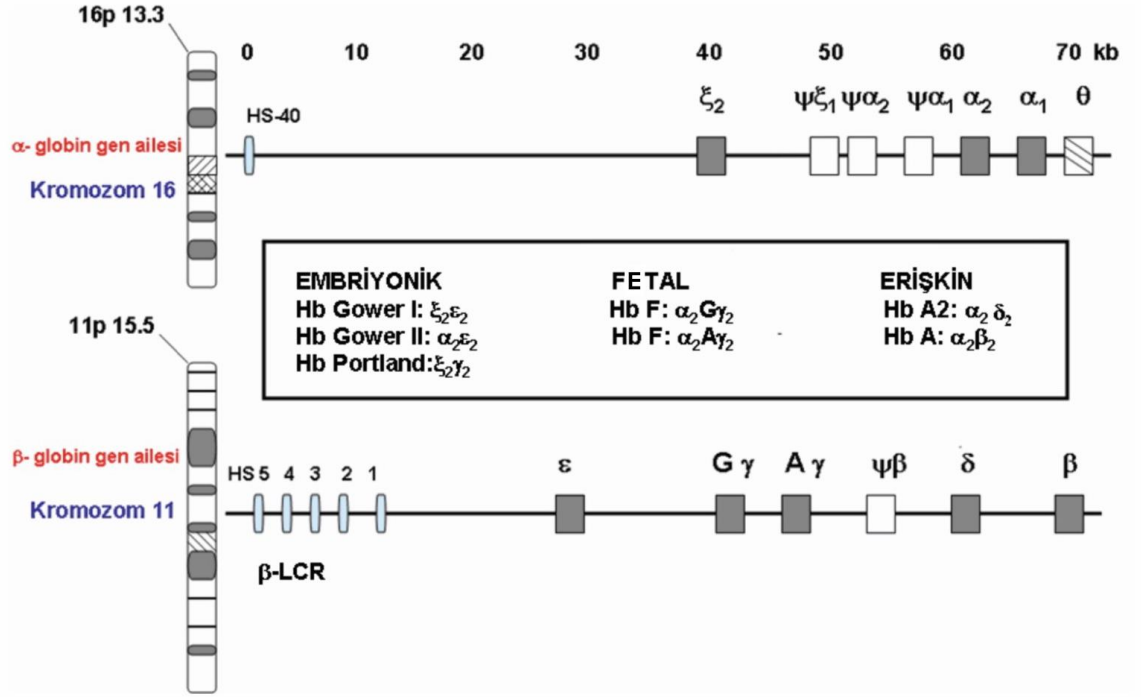
Sağlıklı bireylerde hemoglobinin %95'ini HbA ($2\alpha, 2\beta$), %2-3'ünü Hb A2 ($2\alpha, 2\delta$) ve %1'den azını Hb F ($2\alpha, 2\gamma$) oluşturmaktadır (Karakas, 2014).



Şekil 2.3. Globin zincirlerinin gelişimsel süreçte sentezlendiği organlar ve oranları (Forget, 2011)

2.1.2. Globin Gen Aileleri

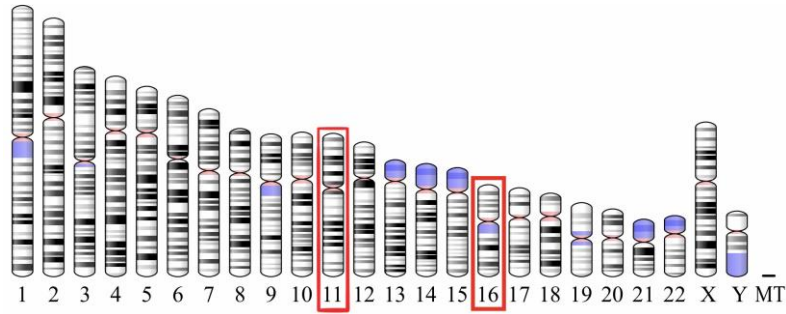
Hemoglobin yapısında bulunan globin zincirlerinin ikisi beta-globin gen lokusundan, iki tanesi ise α -globin gen lokusundan transkribe olurlar ve üç boyutlu yapıda $\alpha\beta$ globin dimerlerini oluştururlar.



Şekil 2.4. Kromozom 11 ve 16'da lokalize α ve β globin genleri. (Bahadır, 2009)

İnsanda alfa-globin gen ailesi (HBA) lokusu 16 numaralı kromozomun kısa kolunda (16p13.3) lokalizedir ve 5'-3' yönünde sırasıyla HS-40, hassas lokus kontrol bölgesini ve fonksiyonel HBZ, HBA2 (α_2), HBA1 (α_1), ve HBQ1 genlerini içerir.

HBB gen lokusu ise 11. kromozomun kısa kolunda (11p15.5) lokalize olup, 5'-3' yönünde sırasıyla 5 hassas lokus kontrol bölgesi (HS 5-1) ve insan hayatında sırasıyla aktif hale gelen; HBE1 (ε), HBG2 (γ -G), HBG1 (γ -A), HBD (δ) ve HBB (β) genlerini içermektedir. Homolog kromozomlarında da aynı genler aynı pozisyonda bulunmaktadır.



Şekil 2.5. İnsan kromozomları. HBA ve HBB gen lokuslarının bulunduğu kromozomlar (HBA 16. Kromozom ve HBB 11. Kromozomda işaretlenmiştir.) (Wikipedia, HBB geni; Wikipedia, HBA geni, https://en.wikipedia.org/wiki/Hemoglobin_alpha_1; <https://en.wikipedia.org/wiki/HBB>, Erişim tarihi: 01.09.2020)

HBA1 geni 16. Kromozomun p kısa kolunda 13.3 pozisyonunda yer alır ve 176,680 bp noktasından 177,522 bp noktasına kadar devam eder. HBA2 geni ise HBA1 ile aynı sitogenetik lokasyonda bulunmakla birlikte 172,876 bp noktasından 173,710 bp noktasına kadar devam etmektedir. Bu iki gen birbirinin yapısal olarak kopyasıdır fakat $\alpha 2$ geni $\alpha 1$ 'den 3 kat fazla α -globin zinciri oluşturur. (Karakaş, 2014)

Genomic Locations for HBA1 Gene

Genomic Locations for HBA1 Gene

chr16:176,651-177,522 (GRCh38/hg38)

chr16:226,679-227,521 (GRCh37/hg19)

Size: 872 bases Orientation: Plus strand

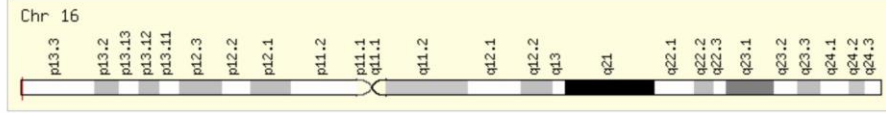
Size: 843 bases Orientation: Plus strand

Genomic View for HBA1 Gene

Genes around HBA1 on UCSC Golden Path with GeneCards custom track

Cytogenetic band: 16p13.3 by HGNC 16p13.3 by Entrez Gene 16p13.3 by Ensembl

HBA1 Gene in genomic location: bands according to Ensembl, locations according to GeneLoc (and/or Entrez Gene and/or Ensembl if different)



GeneLoc Genomic Neighborhood • Exon Structure • Gene Density

RefSeq DNA sequence for HBA1 Gene

NC_000016.10

Şekil 2.6. Alfa-1 globin zincirini kodlayan HBA1 geninin kromozom 16 üzerinde lokalizasyonu. (GeneCards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HBA1&keywords=HBA1>, Erişim tarihi: 01.09.2020)

Genomic Locations for HBA2 Gene

Genomic Locations for HBA2 Gene

chr16:172,847-173,710 (GRCh38/hg38)

chr16:222,846-223,709 (GRCh37/hg19)

Size: 864 bases Orientation: Plus strand

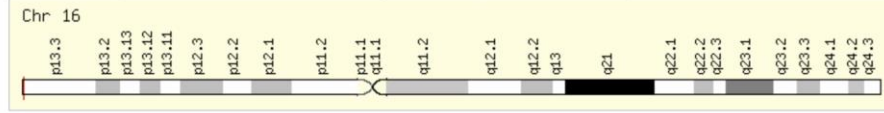
Size: 864 bases Orientation: Plus strand

Genomic View for HBA2 Gene

Genes around HBA2 on UCSC Golden Path with [GeneCards custom track](#)

Cytogenetic band: 16p13.3 by [HGNC](#) 16p13.3 by [Entrez Gene](#) 16p13.3 by [Ensembl](#)

HBA2 Gene in genomic location: bands according to [Ensembl](#), locations according to [GeneLoc](#) (and/or [Entrez Gene](#) and/or [Ensembl](#) if different)



[GeneLoc](#) Genomic Neighborhood • Exon Structure • Gene Density

RefSeq DNA sequence for HBA2 Gene

NC_000016.10

Şekil 2.7. Alfa-2 globin zincirini kodlayan HBA2 geninin kromozom 16 üzerinde lokalizasyonu. (GeneCards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HBA2&keywords=HBA1>, Erişim tarihi: 01.09.2020)

HBB geni 11. Kromozomun p kısa kolunda 15.4 pozisyonunda yer alır ve 5,225,464 bp noktasından 5,229,395 bp noktasına kadar devam eder.

Genomic Locations for HBB Gene

Genomic Locations for HBB Gene

chr11:5,225,464-5,229,395 (GRCh38/hg38)

chr11:5,246,694-5,250,625 (GRCh37/hg19)

Size: 3,932 bases Orientation:

Size: 3,932 bases Orientation:

Minus strand

Minus strand

Genomic View for HBB Gene

Genes around HBB on UCSC Golden Path with [GeneCards custom track](#)

Cytogenetic band: 11p15.4 by [HGNC](#) 11p15.4 by [Entrez Gene](#) 11p15.4 by [Ensembl](#)

HBB Gene in genomic location: bands according to [Ensembl](#), locations according to [GeneLoc](#) (and/or [Entrez Gene](#) and/or [Ensembl](#) if different)



[GeneLoc](#) Genomic Neighborhood • Exon Structure • Gene Density

RefSeq DNA sequence for HBB Gene

NC_000011.10

Şekil 2.8. β -globin zincirini kodlayan HBB geninin kromozom 11 üzerinde lokalizasyonu. (GeneCards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HBB&keywords=HBB>, Erişim tarihi: 01.09.2020)

Sağlıklı bir bireyde 4 adet α -globin geni, 2 adet β -globin geni bulunur. Bireyde 2 veya daha fazla sayıda gen kopyası varsa, birey mutasyonun zararlı etkilerinden belli bir dereceye kadar korunur. Bu nedenle hemoglobinde en zararlı mutasyonlar, β geninde meydana gelmektedir (Şekil 2.4)

HBB1 geni de 11. Kromozomun p kısa kolunda 15.4 pozisyonunda, β -globin gen lokusunda yer alır ve 5,248,079 bp noktasından 5,249,859 bp noktasına kadar devam eder (Şekil 2.9).

Genomic Locations for HBG1 Gene

Genomic Locations for HBG1 Gene

chr11:5,248,079-5,249,859 (GRCh38/hg38)

chr11:5,269,313-5,271,122 (GRCh37/hg19)

Size: 1,781 bases Orientation:

Size: 1,810 bases Orientation:

Minus strand

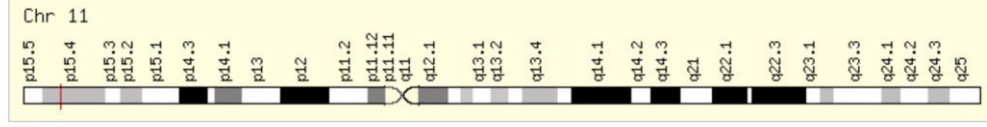
Minus strand

Genomic View for HBG1 Gene

Genes around HBG1 on UCSC Golden Path with GeneCards custom track

Cytogenetic band: 11p15.4 by HGNC 11p15.4 by Entrez Gene 11p15.4 by Ensembl

HBG1 Gene in genomic location: bands according to Ensembl, locations according to GeneLoc (and/or Entrez Gene and/or Ensembl if different)



GeneLoc Genomic Neighborhood • Exon Structure • Gene Density

RefSeq DNA sequence for HBG1 Gene

NC_000011.10

Şekil 2.9. Gamma1-globin zincirini kodlayan HBG1 (γ -A) geninin kromozom 11 üzerinde lokalizasyonu. (GeneCards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HBG1&keywords=HBG1>, Erişim tarihi: 01.09.2020)

HBG2 geni ise 11. Kromozomun p kısa kolunda 15.4 pozisyonunda, β -globin gen lokusunda yer alır ve 5,253,188 bp noktasından 5,505,605 bp noktasına kadar devam eder.

Genomic Locations for HBG2 Gene

Genomic Locations for HBG2 Gene

chr11:5,253,188-5,505,605 (GRCh38/hg38)

chr11:5,274,420-5,667,019 (GRCh37/hg19)

Size: 252,418 bases Orientation:

Size: 392,600 bases Orientation:

Minus strand

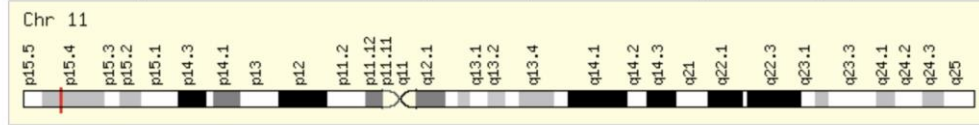
Minus strand

Genomic View for HBG2 Gene

Genes around HBG2 on UCSC Golden Path with GeneCards custom track

Cytogenetic band: 11p15.4 by HGNC 11p15.4 by Entrez Gene 11p15.4 by Ensembl

HBG2 Gene in genomic location: bands according to Ensembl, locations according to GeneLoc (and/or Entrez Gene and/or Ensembl if different)



GeneLoc Genomic Neighborhood • Exon Structure • Gene Density

RefSeq DNA sequence for HBG2 Gene

NC_000011.10

Şekil 2.10. Gamma2-globin zincirini kodlayan HBG2 (γ -G) geninin kromozom 11 üzerinde lokalizasyonu. (GeneCards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=HBG2>, Erişim tarihi: 01.09.2020)

HBG2, diğer bir deyişle globin G-gamma, ve HBG1, diğer bir deyişle globin A-gamma, genleri fetal hemoglobinin gama zincirlerini kodlarlar. İki gamma zinciri birbirinden sadece bir aminoasit ile ayrılır; HBG2 geninin 136. ve son kodonu glisin amino asitini kodlarken, HBG1'in ise 136. ve son kodonu alanin amino asitini kodlamaktadır (Schroeder ve ark., 1968).

Hem alfa hem de beta globin gen lokuslarında yer alan globin genlerinin birinde veya fazlasında meydana gelen mutasyonlar farklı klinik fenotipe yol açan hemoglobinopatilerle ilişkilendirilmektedir.

2.2. Hemoglobinopatiler

Hemoglobinopati, hemoglobin bozuklukları, kanda fonksiyonu bozulmuş hemoglobinlerin sebep olduğu patofizyolojiye sahip hastalıkların tümüne denilmektedir ve anormal olan globin zincirine göre isimlendirilir. Bunlar; anormal hemoglobin varyantları (orak hücreli anemi, HbS gibi), talasemiler (Alfa Talasemi ve Beta Talasemiler gibi) bunlara örnek gösterilebilir (Antonini ve Brunori, 1970, HbVar Database, PSU Database).

Hemoglobin anormallikleri üç gruba ayrılabilir;

- a) Nitel anormallikler (Hb varyantları, anormal hemoglobinler)
- b) Kantitatif anormallikler [talasemiler ve HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin olup, kalıtsal fetal hemoglobin kalıcılığı anlamına gelmektedir.)],
- c) Hem nitel hem de niceliksel anormallikler (Anormal hemoglobinler ve talasemi birliktelikleri).

Niteliksel anormallikler yapısal bir kusura neden olur ve Hb varyantları bu grubun tipik örnekleridir (Örneğin Hb Antalya (Keser ve ark., 2001)). Kantitatif anormalliklerde ise sorun, yapısal değil, sentezlenen globin miktarında bir azalmadır. Bu vakalar grubunda, globin zinciri az sentezlenir veya hiç sentezlenmez. Bu, HbA'nın sırasıyla, eksikliği veya yokluğu ile sonuçlanır (Kutlar, 2014). Örneğin; β^0 talasemide hiç β -globin zinciri sentezlenemezken, β^+ veya β^{++} talasemide azalmış β -globin zinciri sentezi vardır (Başak, 2005).

Bir hastada nicel veya nitel anormallikler bir arada bulunuyorsa, aynı hastada talasemi ve Hb varyantlarının bir arada bulunması (HbS/ β -thal. gibi) söz konusu olabilir (Kutlar, 2014).

Hemoglobinopatiler ise oluşturdıkları klinik tablolara göre dört ana grupta incelenmektedir;

- 1- α talasemi sendromları (Hidrops Fetalis bu sınıfta ciddi patolojiye sahiptir).
- 2- β talasemi sendromları ($\delta\beta$ talasemi, HbE/ β talasemi de bu gruba girer).
- 3- Orak hücreli anemi (Hb S/S, Hb S/C, HbS/ β -thal. ve daha az rastlanılan diğer Hb varyantları (Hb S/D Punjab, Hb S/OArab ve Hb S/Lepore gibi).
- 4- Hemolitik anemi, polisitemi ve nadiren siyanozun olduğu Hb varyantları.
- 5- HPFH ve HPFH- β -Talasemi birliktelikleri.

Tablo 2.1. Yaygın β -Hemoglobinopati türleri ve spesifik klinik bulguları. (Aliyeva ve ark., 2018; Lo ve Singer, 2002) (Hb: Hemoglobin, MCV: Mean Corpuscular Volume;Ortalama Hücre Hacmi, MCH: Mean Corpuscular Hemoglobin, Ortalama Hemoglobin Sayısı)

Hemoglobinopati	Kırmızı Kan Hücresi Değerleri	Hb Modelleri
β -Talasemi Taşıyıcısı	↓ MCV, ↓ MCH, ↑ RBC	↑ HbA2
β -Talasemi majör/intermedia	↓ Hb	↑ HbF
α^+ - β Heterozigot	Normal	Normal
α^0 - β Heterozigot	↓ MCV, ↓ MCH	Normal ya da düşük HbA2
HbH Hastalığı	↓ MCV, ↓ MCH	%3- %30 HbH
$\delta\beta$ -Talasemi Taşıyıcısı	↓ MCV, ↓ MCH	Normal ya da düşük HbA2, ↑ HbF
Hb Lepore	↓ MCV, ↓ MCH	Düşük HbA, %80 HbF, %5-%15 anormal Hb
HbS Taşıyıcısı	Normal	%35-%40 HbS
HbS Homozigot	↓ Hb, normal MCV & MCH	%5-%10 HbF, %75-%95 HbS
HbS/ β -Talasemi	↓ Hb, ↓ MCV, ↓ MCH	%5-%10 HbF, %65-%95 HbS
HbS/ $\delta\beta$ -Talasemi	↓ MCV, ↓ MCH	%25-%35 HbF, %75-%95 HbS
HbE Taşıyıcısı	Normal	%25-%30 HbE
HbE Homozigot	↓ MCV, ↓ MCH	%5-%15 HbF, %85-%95 HbE
HbE/ β -Talasemi	↓ Hb	%40-%60 HbF, %40, %60 HbE
HPFH Homozigot	↓ Hb, ↓ MCV	%100 HbF
HPFH- β Heterozigot	Normal	%15-%40 HbF

HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin-Kalıtısal Fetal Hemoglobin Kalıcılığı) bozukluğuna sebep olan mutasyonlar, erişkin dönemde HbF baskılanmasını kısıtlar. Ancak, genelde sessiz bir patoloji yaratabilir ve iyi huylu olarak bahsedilir. Hatta HPFH, talasemilerle birlikte olduğu durumlarda aneminin kötü etkilerini azaltmaktadır. (De Sanctis ve ark., 2017; Weatherall ve Clegg, 2001)

Hemoglobinopatiler dünyada en yaygın, kalıtsal olarak resesif (bazı formları dışında) tek gen hastalıklarını oluşturmakla birlikte, tedavisi global bir yük oluşturmaktadır. Dünya nüfusunun yaklaşık %5'i hemoglobinopati taşıyıcısı ve %2,9'u talasemidir. Her yıl yaklaşık 300,000-400,000 bebek hemoglobin bozukluğu ile dünyaya gelmektedir. (Aliyeva ve ark., 2018; Muncie ve Campbell, 2009; Williams ve Weatherall, 2012)

Hemoglobinopatiler ve talasemilerin tüm dünyada yayılmasındaki önemli faktörleri aile planlamasının olmaması, akraba evlilikleri gibi gelişmekte olan ülkelerin sorunları oluşturmaktadır. Popülasyon kontrol programları, Akdeniz'de hemoglobinopati bakımından risk altındaki popülasyonlarda ilk kez 1970'lerin sonlarına doğru uygulanmaya başlanmıştır. (Angastiniotis ve Hadjiminias, 1981)

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Akdeniz ülkelerinde hemoglobinopatilerin önlenmesi için kamu bilinçlendirme ve eğitimi, ileriye dönük tarama programları ve genetik danışmanlık başlatmıştır. İtalya, Yunanistan, İngiltere ve Kıbrıs'ta evlilik öncesi tarama çalışmaları 1970'den beri devam etmektedir.(Modell ve Darlison, 2008) Doğu ve Orta Doğu ülkelerinde de nüfus tarama ve önleme stratejileri devam etmektedir. (Abi Saad ve ark., 2014; Aliyeva ve ark., 2018; Belhoul ve ark., 2013; Chatterjee ve ark., 2015; Nosheen ve ark., 2015)

Talasemileri önleme konusunda ilk çalışmaları dünyada Angastiniotis, Modell, Weatherall ve ekipleri üstlenirken, Türkiye'de 1993 yılında Aksoy ve ekibinin girişimleriyle "Kalıtısal Kan Hastalıkları ile Mücadele" kanunu yayınlanmış, konuyla ilgili yönetmelik ise 2002 yılında yayınlanmıştır(Aksoy ve ark., 1958; Canatan ve Delibas, 2016).

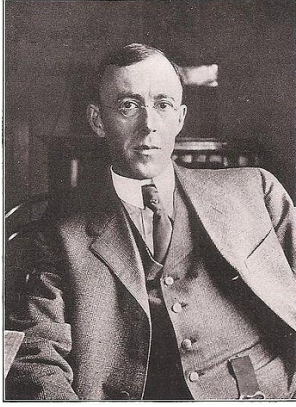
Türkiye’de; ilk pilot evlilik öncesi tarama 1996’da Altay ve ekibi (Altay ve ark., 1996) tarafından Mersin’de yapılmış ve Hb S ve β -talasemi insidansı sırasıyla % 4,3 ve % 2,3 olarak kayda geçirilmiştir. İkinci çalışma ise 2000 yılında Denizli’de Keskin ve ekibi (Keskin ve ark., 2000) tarafından yapılmıştır. 19.804 sağlıklı bireyi taramışlar ve %2,6 oranında talasemi taşıyıcısı ve %0,11 oranında ise orak hücre anemi taşıyıcısı (Hb AS) tespit etmişlerdir (Canatan ve Delibas, 2016).

Beta-talasemi tanı ve tedavisinde ülkemizde yapılan ilk çalışmalar ise 1950’li yıllara dayanmaktadır. İlk β -talasemi majör (β -TM) hastası 1941’de bildirilmiştir (Aksoy, 1991). İlk klinik ve hematolojik çalışmalar ise 1958’de Aksoy tarafından yayınlanmıştır. 1971’de ise Cavdar ve Arcasoy tarafından β -talasemi insidansının %2,1 olduğu bildirilmiştir. 1983 yılında, hemoglobinopatilerin belirlenmesi için ilk prenatal tanı prosedürleri Beksaç ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir. (5). 1987’de Akar ve ark. (6) Türk popülasyonunda en sık görülen talasemi allelinin IVS-I-110 (G4A; HBB: c.93-21G4A) mutasyonu olduğunu ve bu mutasyonun Akdeniz bölgesinde yüksek riskli bölgelerin çoğunda en sık görülen talasemi mutasyonu olduğunu göstermişlerdir. 1993 yılında ise, Canatan ve Arcasoy, Türkiye’de ilk kök hücre naklinin talasemili bir hastada gerçekleştirildiğini yayınlamışlardır. (Canatan ve Arcasoy, 1993)

2000’li yılların sonrasında ise talasemiye önlemek adına Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, Türkiye Ulusal Hemoglobinopati Konseyi ve Türkiye Talasemi Federasyonu tarafından yazılı yönetmelik, eğitim ve önleme kampanyaları gibi önemli adımlar atılmıştır. 2003 yılında T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından “Hemoglobinopati Önleme Programı” talaseminin yaygın olduğu illerde başlatılmıştır. 2003 yılında tüm çiftlerin evlilik öncesi tarama testi yüzdesi %30,0 iken, 2013 yılında %86,0’a ulaşmıştır. Talasemi ve hemoglobinopatili yenidoğan sayısı 2002’de 272 iken 2010’da 25’e düşmüştür. 2003-2013 yılları arasında, verilere göre etkilenen doğumlarda %90,0 azalma olmuştur (Kukulu ve ark., 2006; Canatan, 2014).

2.3. Beta Talasemi

Talasemi, 1925'te ilk kez klinik tanımı yapılmadan önce özellikle Akdeniz Bölgesi ve Güneydoğu Asya'da görülmüş olan çok yaygın bir genetik hastalıktır. Daha önceki yıllarda bugünkü talasemi olduğu düşünülen pek çok vaka splenik anemi, porotik hiperostoz ya da daha geniş heterojen bir grubu kapsayan Von Jaksch anemisi olarak tanımlanmıştır. O dönemlerde başka İtalyan doktorlar tarafından tanısı konulsa da Amerikalı doktor Thomas B. Cooley (Cooley ve Lee, 1925) bu hastalığın ömür boyu tedavi reçetesiyle beraber ilk spesifik tanısını yapmıştır ve bugünkü adıyla talasemi, ilk kez 1932 yılında Whipple ve Bradford (Whipple ve Bradford, 1932) tarafından tavsiye edilene kadar, Cooley anemisi olarak anılmıştır. Günümüzde halen Cooley anemisi ismi de kullanılmaktadır. Talasemi isim olarak Yunanca'da "Thalas", "deniz" ve "anemi" isimlerinin birleşiminden oluşmaktadır (Wikipedia).



Şekil 2.11. Thomas Cooley (Wikipedia, https://en.wikipedia.org/wiki/Thomas_Benton_Cooley, Erişim tarihi: 01.09.2020).

2.3.1. Malarya Hipotezi

1949-1960 yılları arasında talasemi'nin hemoglobinin genetik bozukluğu olduğu bilinmekteydi. Hemoglobinin genetik altyapısı ile ilişkili ilk kilometre taşları ise 1949'da Beet ve Neel grupları, 1951'de Lambotte-Legrands, 1959'da Ingram ve Stretton tarafından ortaya konulmuştur. 1949'da ise talasemi epidemiolojisiyle Malarya epidemiolojisi arasındaki benzerliğe dikkat çeken Haldane, "Malarya Hipotezi"ni ortaya koymuştur (Beet, 1949; Haldane, 1949; Ingram ve Stretton, 1959; Lambotte-Legrand ve Lambotte-Legrand, 1951; Neel, 1949).

Malarya hastalığı, bilinen adıyla sıtma, son 5000 yılın büyük bir bölümünde dünya çapında çocuk ölümlerinin en büyük nedeni olmuştur. Günümüzde bir dereceye kadar kontrol altına alınmasına rağmen, ölüm oranı hala birçok ülkede yüksek olmaya devam etmektedir. WHO 2019 verilerine göre, dünya çapında yalnızca 2018'de tahminen 405.000 ölüm sıtmadan gerçekleşmiş ve bu ölümlerin % 90'ından fazlası Sahra-altı Afrika'da meydana gelmiştir (Kariuki ve Williams, 2020).

Tarımın ortaya çıkmasından önce, kabaca 5000 yıl önce, insanların büyük sıtma salgınlarına maruz kalması olası değildir; bu aşamaya ancak Neolitik (erken dönem) çiftçileri, sivrisinek istilasına uğramış yumuşak ve bataklık topraklara yerleştiğinde ulaşılmış olabilir. Bu çevrelerde talasemilerin (α - ve β -) genç taşıyıcılarının bebeklik döneminde sıtmadan kurtulma şansı normalden daha yüksektir ve bu mutasyonu koruyarak bir sonraki nesle aktarabilmişler, böylece mutant gen sıklığı artmıştır. Farklı popülasyonlarda belirli hemoglobin bozukluklarının daha yüksek veya değişen dağılımı, yüksek sıklıkta akraba evliliklerini, toplu göçleri, beslenme durumundaki iyileşmeyi, bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve tedavisini, yerleşim yerlerini ve yerleşik toplumların yapılarını da yansıtabilmektedir (De Sanctis ve ark., 2017).

Talaseminin dünya üzerindeki dağılımı ile ilgili olarak “Malarya Hipotezi” günümüzde en kabul gören hipotezdir. Bu hipotezin temelini, sıtmanın yoğun olarak görüldüğü bölgelerde, talasemi taşıyıcısı çocuklarda paraziteminin daha az görülmesi, *P. falciparum* ile enfekte yetişkinlerde sıtma hastalığının gözlenmiyor oluşu ve Doğu Afrika'da talasemi gen sıklığı ile sıtma endemisinin paralellik göstermesi oluşturmaktadır (Arpacı ve ark., 2016).

Sıtmaya beş farklı protozoan Plasmodium parazit türü neden olabilir: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. Ovale*, *P. Knowlesi*, *P. falciparum* ve *P. vivax* en yaygın olanlarıdır ve çoğu ölümlü sonuçlanır (Escalante ve ark., 1995; Martinsen ve ark., 2008; Singh ve ark., 2004; WHO, 2019). Tüm sıtma parazitlerinin yayılması, sivrisineklerin üreme döngüsünü ve de insanlarda bir enfeksiyon döngüsünü içermektedir.

Parazitler, kırmızı kan hücrelerinde (RBC'ler) yerleşmeden önce karaciğeri enfekte ederler ve klinik olarak gözlemlenebilen kan evresi, insan konağında merozoitlerin (Malarya parazit sporları) kırmızı kan hücrelerini işgalini ve ardından bunların trofozoitlere ve ardından şizontlara olgunlaşmasını içeren sıralı parazit çoğalması turlarını içerir. Sonuçta yeni kırmızı kan hücrelerini hızla enfekte eden taze merozoitleri serbest bırakmak için eritrositlerden kopar. Eşsiz döngü, kandaki parazitlerin üstel olarak çoğalmasına ve insan konakçıda görülen sıtmanın patojenik özelliklerine yol açar. Parazit yaşam döngüsünde konakçı genetik varyasyonunu etkileyen çok sayıda nokta mutasyon ve tek nükleotid polimorfizmi (SNP; single nucleotide polymorphism) vardır. Ancak, şimdiye kadar açıklanan sıtma koruyucu mutasyonların çoğunun, eritrositlerin yapısı ve işlevi üzerinde çeşitli önemli etkileri olduğu görülmektedir (Kariuki ve Williams, 2020).

Sıtmaya karşı koruma sağlayan genetik mutasyonların içinde HBA ve HBB geninde meydana gelen α - ve β -talasemi mutasyonlarının ve HbS mutasyonunun çoğunluğu oluşturduğu Kariuki ve ekibi tarafından yayınlanmıştır (Kariuki ve Williams, 2020).



Şekil 2.12. Alfa- ve beta talaseminin dünya üzerindeki dağılımı (Weatherall ve Clegg, 2001).



Şekil 2.13. Malarya'nın dünya üzerindeki dağılımı (Weatherall ve Clegg, 2001).

2.3.2. Epidemiyoloji

Hemoglobinopatilerden klinik etkisi en yaygın ve ağır görülen beta-talasemi; Akdeniz Bölgesi (Keser ve ark., 2004), Ortadoğu ve Merkez Asya, Hindistan, Güney Çin ve Uzakdoğu, Afrika'nın kuzey kıyıları ve Güney Amerika'da sıklıkla görülmektedir. 2008 Model grubu ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) çalışmalarına göre en yüksek taşıyıcı frekansı Kıbrıs'ta (%14), Sardunya Adası'nda (%10,3) ve Güney Asya bölgelerinde kaydedilmiştir. Bu bölgelerdeki yüksek frekans en güçlü şekilde *P. falciparum* malarya, bir başka deyişle sıtmadan kaynaklı seçici baskı ile ilişkilidir (Galanello ve Origa, 2010).

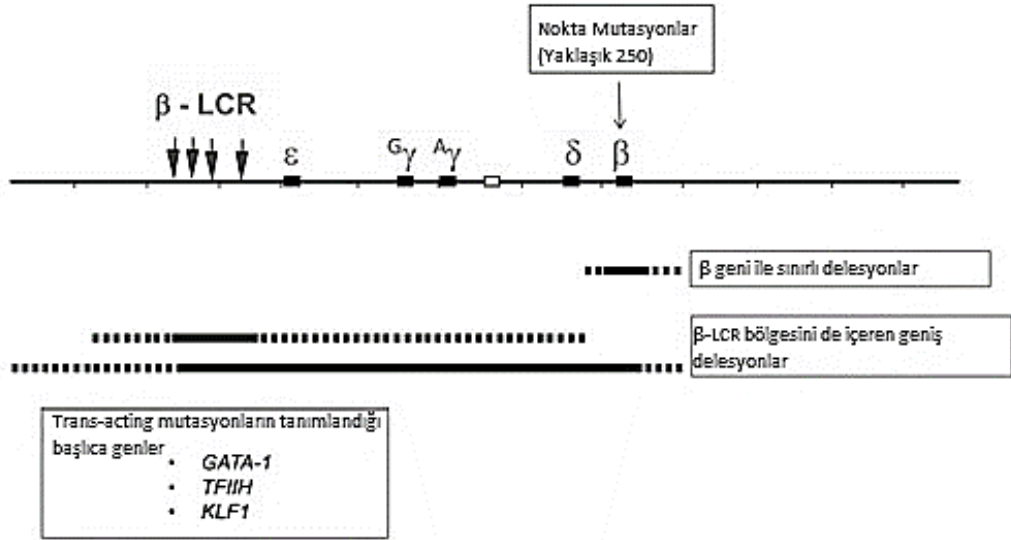
Dünya popülasyonunun yaklaşık olarak %1,5'i (80-90 milyon insan) β -talasemi taşıyıcısıdır ve büyük çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere, her yıl 60,000 yeni doğum gerçekleşmektedir. Semptomatik bireylerin toplam yıllık insidansının dünya genelinde 1/100.000 ve Avrupa'da 1/10.000 kişide olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, birçok popülasyonda taşıyıcı oranlarına ilişkin doğru veriler eksiktir. Uluslararası Talasemi Federasyonu'na göre, talasemi majörlü sadece yaklaşık 200.000 hasta hayatta ve dünya çapında düzenli tedavi gördüğü için kayıtlıdır (Galanello ve Origa, 2010).

2.3.3. Beta Talasemi Mutasyonları

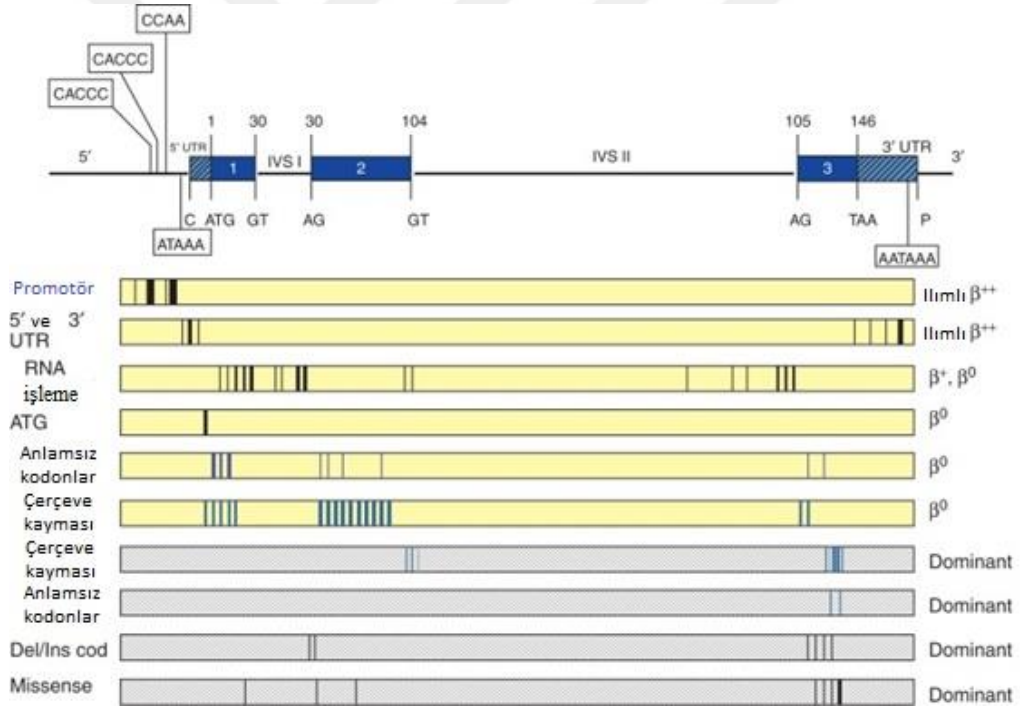
Beta-talaseminin klinik bulguları bir hayli değişkendir. Sessiz mutasyona sahip asemptomatik vakalardan şiddetli olmayan hipokromik anemi ve orta derece veya çok şiddetli ömür boyu kan transfüzyonuna bağımlı anemi ve çoklu organ hasarlarına sebebiyet verebilen formlara varıncaya kadar değişkenlik gösterir (Kohne, 2011).

Beta-talasemi genetik temelde; esas olarak tek nükleotid (nt) değişimi/mutasyonu ve SNP, β -globin geni veya hemen komşu dizisi içinde küçük delesyonlar veya insersiyonlar ile sonuçlanan mutasyonlardan ve nadiren büyük delesyonlardan kaynaklanır. Bugüne kadar, IthaGenes veri tabanında 350'den fazla β -talasemi mutasyonu rapor edilmiştir (Bilgen ve ark., 2011a; De Sanctis ve ark., 2017; Kountouris ve ark., 2014; Thein, 2018).

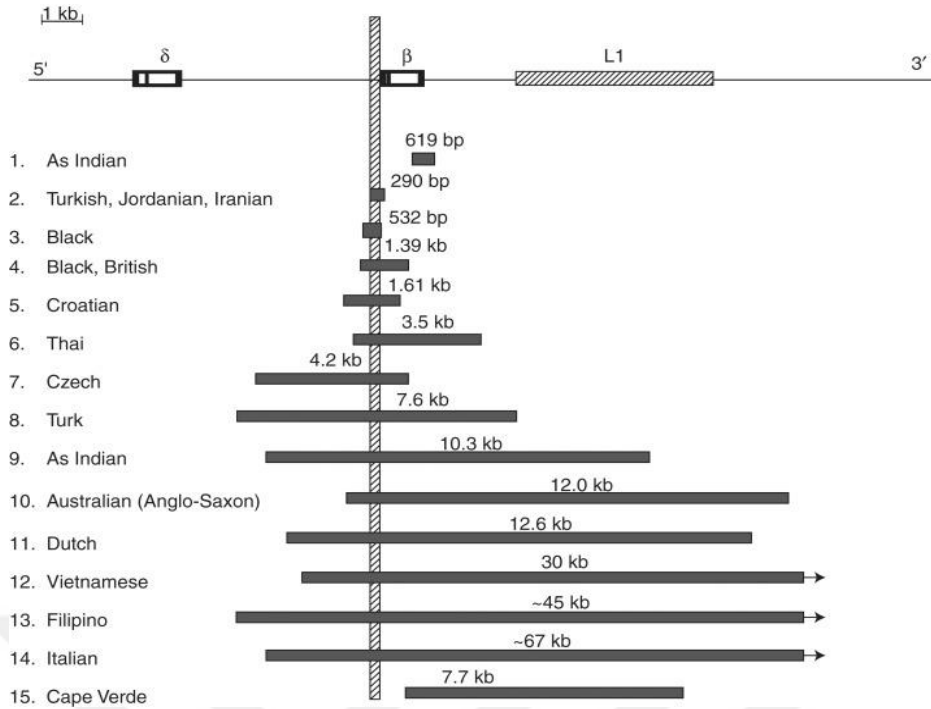
Genellikle normal olan β - zincirlerinin kantitatif redüksiyonundan kaynaklanan β -talasemiler; β -globin proteini sentez yollarını farklı kademelerde etkileyen mutasyonlardan kaynaklanabilmektedir (Weatherall ve Clegg, 2001). Beta-talasemi mutasyonlarında delesyonlar çok nadir görülmekle birlikte mutasyonların büyük çoğunluğunu; transkripsiyon, RNA işlenmesi, RNA translasyon basamaklarını ve RNA stabilitesini etkileyen minör insersiyonlar/delesyonlar oluşturmaktadır (Quek ve Thein, 2007).



Şekil 2.14. Beta Talasemi ile sonuçlanan mutasyonların konumları. “Trans-acting” mutasyonlar β -globin lokusunun dışında belli talasemi-modifier gen bölgelerinde gerçekleşmektedir ve GATA-1, TFIIH, KLF-1, TAL1, BCL11A bunlara örnek olarak gösterilebilir (Thein, 2018).



Şekil 2.15. β -Talasemiye sebep olan nokta mutasyonların oluştukları yerlere ve sebep oldukları talasemi sınıfına göre gösterimi (Thein, 2013).



Şekil 2.16. β -talasemiye sebep olan delesyon mutasyonları ve epidemiyolojileri (Thein, 2013). Taralı alan HBB geni promotörünü göstermektedir.

Tablo 2.2. Akdeniz bölgesinde en sık görülen β -Talasemi mutasyonları ve etki mekanizmaları (HbVar Database,(Thein, 2013)). *:Türkiye’deki allellerde en sık görülen beş mutasyon (Aycicek ve ark., 2011).

Mutasyon	HGVS Adı	Tip
Transkripsiyonel Mutasyonlar		
Promotör Düzenleyici Elemanları		
-101 (C → T)	HBB:c.-151C>T	β^{++} (sessiz)
-92 (C → T)	HBB:c.-142C>T	β^{++} (sessiz)
-30 (T → A)	HBB:c.-80T>A	β^{+}
-29 (A → G)	HBB:c.-79A>G	β^{+}
5' UTR Bölgesindeki Mutasyonlar		
CAP +22 (G → A)	HBB:c.-29G>A	β^{++}
CAP +33 (C → G)	HBB:c.-18C>G	β^{++} (sessiz)
RNA İşleme		
Ekzonların Birleşme Bölgelerindeki Mutasyonlar (Splice (ek) Bölgesi Mutasyonları)		
IVS1-1 (G → A)*	HBB:c.92+1G>A	β^{+}
IVS2-1 (G → A)	HBB:c.315+1G>A	β^0
IVS1-3' sonu del 44 bp	HBB:c.76_92+27del	β^0
IVS1-5 (G → T,C,A)*	HBB:c.92+5G>T,C,A	β^{+}
IVS1-6 (T → C)	HBB:c.92+6T>C	β^{+}
IVS1-110 (G → A)*	HBB:c.93-21G>A	β^0
IVS1-116 (T → G)	HBB:c.93-15T>G	β^0

IVS2-745 (C → G)	HBB:c.316-106C>G	β ⁺
CD27 (GCC → TCC) (Ala → Ser, Knossos)	HBB:c.82G>T	β ⁺
RNA Salınması —Poli A sinyali		
AATAAA → AATGAA	HBB:c.*111A>G	β ⁺⁺
3' UTR Bölgesindeki Diğer Mutasyonlar		
Term CD +90, del 13 bp		β ⁺⁺ (sessiz)
RNA Okuması		
Anlamsız Kodonlar		
CD39 CAG → TAG*	HBB:c.118C>T	β ⁰
Çerçeve Kayması		
CD1 -G	HBB:c.4delG	β ⁰
CD5-CT	HBB:c.17_18delCT	β ⁰
CD6 -A	HBB:c.20delA	β ⁰
CD8 -AA*	HBB:c.25_26delAA	β ⁰
CD22/23/24 -7 bp (-AAGTTGG)	HBB:c.68_74delAAGTTGG	β ⁰
CD37/38/39 del 7 bp (-GACCCAG)	HBB:c.114_120delGACCCAG	β ⁰
CD45 +T	HBB:c.138delT	β ⁰
CD74/75 -C	HBB:c.226delC	β ⁰

Tablo 2.3. Türkiye’de en sık görülen 5 β-talasemi mutasyonu (Aycicek ve ark., 2011; Mendilcioglu ve ark., 2011).

Mutasyon	HGVS Adı	Tip	Homozigot (%)	Heterozigot (%)	Toplam (%)
IVS-1-110 (G>A)	HBB:c.93-21G>A	β ⁰	60 (26.1)	7 (3.0)	67 (29.1)
IVS-1-1 (G>A)	HBB:c.92+1G>A	β ⁺	22 (9.6)	10 (4.3)	32 (13.9)
codon 39 (C>T)	HBB:c. 118C>T	β ⁰	18 (7.8)	6 (2.6)	24 (10.4)
codon 8 (-AA)	HBB:c.25_26delAA	β ⁰	16 (7.0)	5 (2.2)	21 (9.1)
IVS-1-5 (G>C)	HBB:c.92+5G>C	β ⁺	6 (2.6)	4 (1.7)	10 (4.3)

2.3.4. Beta Talasemi; Patofizyolojisi ve Tedavi Stratejileri

Beta-talasemiler spesifik olarak şöyle sınıflandırılabilir;

- Beta Talasemiler
 - a. Talasemi majör
 - b. Talasemi İntermedia
 - c. Talasemi Minör
- Hb Anomalileri ile Birlikte Görülen Beta Talasemiler
 - a. HbC/Beta Talasemi
 - b. HbE/Beta Talasemi
 - c. HbS/Beta Talasemi
- HPFH ile Birlikte Görülen Beta Talasemiler
- Beta Talaseminin Otozomal Dominant Formları
- İlişkili Hastalıklarla Beraber Görülen Beta Talasemiler
 - a. Trikotodistrofi ile Beraber Beta Talasemi
 - b. X'e Bağlı Trombositopeni ile Beraber Beta Talasemi

Tablo 2.4. Yaygın genotipleri ile beta- talasemi sınıflarının genel özellikleri (Chonat ve Quinn, 2017)

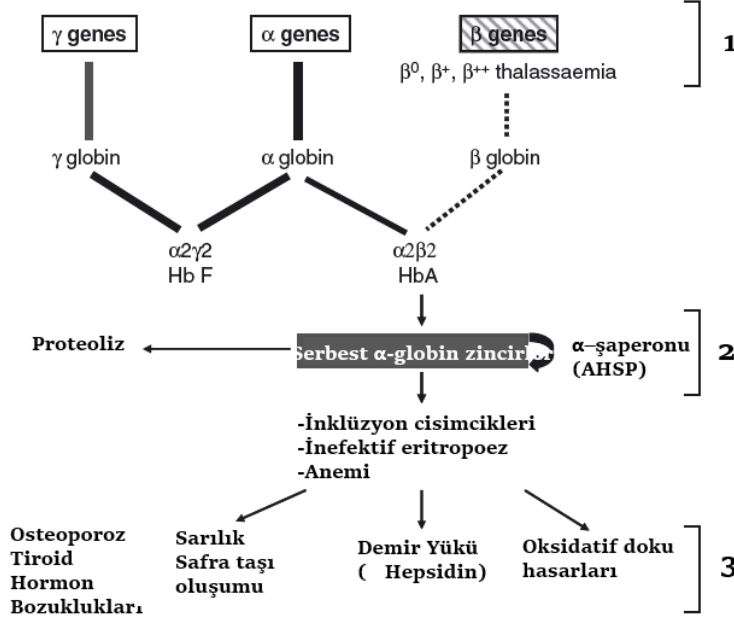
Genotip	Hastalık Derecesi	Fenotip
β/β	-	-
β/β^0 β/β^+	Beta Talasemi Taşıyıcısı (β -TT)	Talasemi Minör: Asemptomatik, Hafif Mikrositik Hipokromik Anemi
β^+/β^+ β^+/β^0 β^E/β^+ β^E/β^0	Beta Talasemi İntermedia (β -TI)	Değişken Şiddette Hastalık Seyri, Hafiften Ortaya Anemi, Olası Extramedüler Hematopoez, Demir Yüğü
β^0/β^0	Beta Talasemi Majör (β -TM)	Şiddetli Anemi, Transfüzyona Bağımlılık, Ekstramedüler Hematopoez, Demir Yüğü

Genotip-fenotip ilişkilerine yakından bakılacak olursa (Tablo 2.4); beta talasemi hastalığının şiddeti, β -globin üretiminin kantitatif redüksiyonu ile doğru orantılıdır (Thein, 2005a). β -globin zincir üretiminin düşmesi, α -globin zincir üretimi normal olarak devam ettiği için eşleşmemiş α -globin zincirlerinin eritroid öncül hücrelerinde birikimine sebep olacaktır.

Serbest α -globin zincirleri tetramer oluşturamazlar ve eritroid öncüllerinde birikip çökerek inklüzyon cisimciklerini oluştururlar. İnküzyon cisimcikleri, eritrositlerin hücre duvarlarına ve kemik iliğindeki olgunlaşmamış eritroid öncül hücrelerine büyük hasarlar vermektedir (inefektif eritropoez) (Schrier, 2002). Bu yüzden, globin zincir dengesizliğini veya serbest α -globin miktarını azaltan faktörler, α -talasemi ile beraberlik veya HbF oranını (γ -globin) artıran mutasyonlar gibi, hastalık üzerinde iyileştirici etkiye sahiptir (Lechauve ve ark., 2019; Quek ve Thein, 2007).

Heterozigot mutasyon taşıyan Beta Talasemi İntermedia hastalarda (β -TI), bir veya iki β -globin geninde mutasyon olmasına rağmen, HPFH veya α - ya da δ - β - talasemi etkenlerinin varlığı globin zincir dengesizliğini azaltarak/artırarak aneminin şiddetini ciddi oranda azaltmakta veya artırabilmektedir. Homozigot β^0 -talasemi majör (β -TM) hastalarında ise α -/ α - olmayan zincir oranı şiddetli inefektif eritropoezle ilişkilidir ve hayatta kalım için kan transfüzyonu ihtiyacını belirlemektedir (Gabbianelli ve ark., 2008). Bu verilere dayanarak aneminin şiddetinin gama-globin reaktivasyonu ile ciddi oranda azaltılabileceği öngörülebilmektedir.

Beta-talasemi taşıyıcıları, klinik olarak normal ve büyük oranla da hastalıktan habersizlerdir. Her biri bir ebeveynden aktarılan iki beta talasemi geni kopyası ise genellikle ölümcül anemiye ve transfüzyona bağlı yaşama sebep olmaktadır. Hastalığın orta şiddetli anemi ve duruma bağlı değişkenlik gösteren kan transfüzyonu ihtiyacı taşıyan orta dereceli klinik formları ise beta talasemi intermedia olarak tanımlanmakta ve mutasyonlarının ölçüsüyle hastalık seyri değişmektedir. Şiddetli talasemi formlarında tedavi, ömür boyu kan transfüzyonu ve demir şelasyonu tedavilerinin komplikasyonlarının yönetimi temeline dayanmaktadır. Demir yükünün getirdiği komplikasyonlar, anemi ve inefektif eritropoez sebepli durumlar ve demir şelasyonunun kendisi de transfüzyona bağımlı talasemilerde morbidite ve mortalitenin ana sebepleridir (Aydınok, 2019; Quek ve Thein, 2007; Weatherall ve Clegg, 2001).



Şekil 2.19. Beta Talasemi patofizyolojisi ve tedavi hedefleri şekilde gösterilmiştir (Quek ve Thein, 2007).

Beta-talasemi patofizyolojisinin aşama aşama aydınlatılması ve 50 yılı aşkın biyokimyasal ve biyolojik çalışmaları içeren bu süreç, hastalığı iyileştirme veya iyileştirme girişimlerinde yeni stratejiler geliştirilmesinin önünü açmıştır. Beta-talaseminin klinik çeşitliliğini oluşturan potansiyel tedavi hedefleri şekildeki gibi üç kategoriye ayrılabilir (Şekil 2.19).

Birincil tedavi stratejileri, azalmış beta-globin üretimini direkt olarak etkileyen beta-gen lokusundaki mutasyonlara, polimorfizmlere yönelik olup; hematopoetik kök hücre transplantasyonu, viral vektörler, anti-sense mRNA ve CRISPR/Cas9 ile genetik düzeltme gibi girişimleri kapsamaktadır.

İlk yapıtaşları Lucarelli, Gaziev ve ülkemizde kayıtlı hastaların 1988-2008 yıllarında atılan adımlarla “*Hemopoetik Kök Hücre Transplantasyonu*”, genellikle kemik iliği nakli, talaseminin kesin tedavisi için başvuru en temel tedavi şeklidir. Bu tür bir tedaviden en fazla yararı elde etmesi bekleyen hastalar, erken yaşta ancak şiddetli transfüzyona bağlı anemiye sahip ve çok az komplikasyon sahibi olan hastalar olmak zorundadır. Öncesinde karaciğer ve kalpteki demir birikiminin optimum sınırlarda (Pesaro risk sınıflarına göre) olması, kan transfüzyonuna bağlı gelişen kandaki antikor sayılarının optimum düzeyde olması ve bu yüzden genel olarak erken yaşlarda başvurulması gerekmektedir.

En iyi koşullarda, HLA-uyumlu aile donöründen transplantasyonda bile, bu tedavi %5'lik bir ölüm oranı ile ilişkilidir. Tedavi sonucunda bu hastaların, büyümede bozulma, gonadal yetmezlik ve kronik graft-versus host hastalığı gibi zamanla organ hasarları geliştirme riski hala yüksektir (Canatan, 2013; D Gaziev ve ark., 2000; J Gaziev ve Lucarelli, 2010; Lucarelli ve ark., 1998).

Otolog hematopoetik kök hücrelerin genetik düzenlenmesi, allojenik kök hücre nakillerindeki donör eksikliği ve immün reaksiyon (GVHD) dezavantajlarının üstesinden gelmektedir. Ancak pratikte beklenenden daha zor olduğu çalışmalarca kanıtlanmıştır. Öyle ki beta talasemide gen tedavisi şu üç kriteri karşılamalıdır;

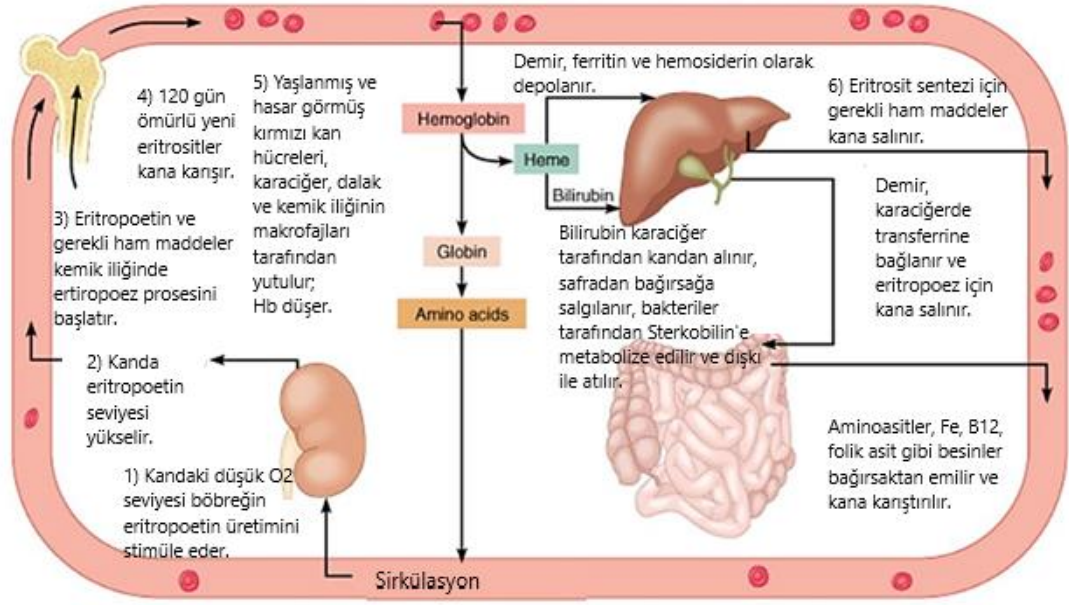
- Güvenli ve verimli viral/nonviral transfeksiyon sağlanmalı,
- Vektör eritroid-spesifik olmalı,
- Yeterli fonksiyonel beta-globin ekspresyonu sağlamalıdır.

Bu yönde yapılan ilk girişimler β -LCR elementleri takılı onko-retroviral vektörlerle denenmiş fakat; vektörün stabil olmaması, beta-globin'in düşük ekspresyonu sebeplerinden dolayı başarılı olamamıştır (Cone ve ark., 1987).

Günümüze kadar AAV (Adeno-Associated Virus) (Sabatino ve ark., 2000), Lentiviral (LV) (Cavazzana-Calvo ve ark., 2010), SIN-LV (güvenliği artırılmış Self-Inactivating-LV) (Hanawa ve ark., 2005), HIV-1 bazlı LV (May ve ark., 2000) gibi birçok viral vektör, nonviral oligonükleotitler kullanılarak çalışmalar yapılmıştır. Başarılı bir vektörel gen terapisi örneğinde Cavazzana ve çalışma grubu (Cavazzana-Calvo ve ark., 2010) tarafından; HbE/ β^0 talasemi transfüzyonuna bağımlı ve HLA uyumlu bir donörü olmayan 18 yaşındaki bir kadın için, β -globin gen transferi için lentiviral vektör kullanılmıştır. Kullanılan viral vektör önceden inaktive edilmiş ve genotoksisite ve malignite gelişme riski azaltılmıştır. Genetik materyal transferi yapılmış CD34+ hematopoietik hücre transplantasyonundan sonraki 30 ayda, genetik olarak modifiye edilmiş hücre oranı %10'a ulaşmış, hastanın transfüzyon gereksiniminin kademeli olarak azalmış, hastanın Hb'i 10 g/dl' de sabitlenmiş ve 12. ayın sonunda tamamen kaybolduğu gözlemlenmiştir. Transplantasyondan sonra toplam hemoglobinin 1/3'ünün vektöre bağlı hemoglobin olduğu tespit edilmiştir. Güvenliği artırılmış lentiviral vektörler ise gelecek vaat etmektedir (Quek ve Thein, 2007).

RNA interferansı (RNAi); CRISPR, TALEN gibi endonükleazlarla homolog rekombinasyon; siRNA; BP1 (Beta-Protein 1) inhibisyonu gibi diğer girişimler de beta talaseminin birincil tedavi hedeflerine cevap olarak gösterilebilir (Quek ve Thein, 2007).

İkincil tedavi hedefi ise β -globin yetersizliği sonucu tetramer oluşturamayan ve hücrede, kanda ve dokularda biriken α -globin zincirlerini stabilize etmeyi ve α - β globin dengesizliğini azaltmayı kapsamaktadır. Doğal bir α -şaperonu olan AHSP'nin indüklenmesine bu amaçla başvurulabilir (Thein, 2004). γ -globin sentezinin indüklenmesi ve HbF indükleyici farmasötik girişimler ise globin zincir dengesizliğini oldukça iyileştirecek olan oldukça gelecek vaat eden tedavi stratejileridir (Chambers ve ark., 2020; Grieco ve ark., 2015; Hu ve ark., 2020; Wienert ve ark., 2017). α -globin zincirlerinin fazlalığının en önemli sonucu ise “**inefektif eritropoez**”dir.

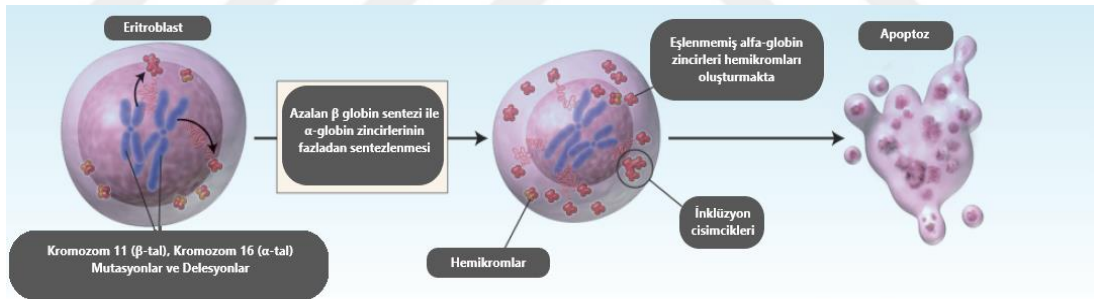


Şekil 2.20. Eritrositlerin Yaşam Döngüsü (Quora, 01.09.2020 tarihinde <https://www.quora.com/How-are-RBCs-formed> sitesinden alınmış ve düzenlenmiştir.).

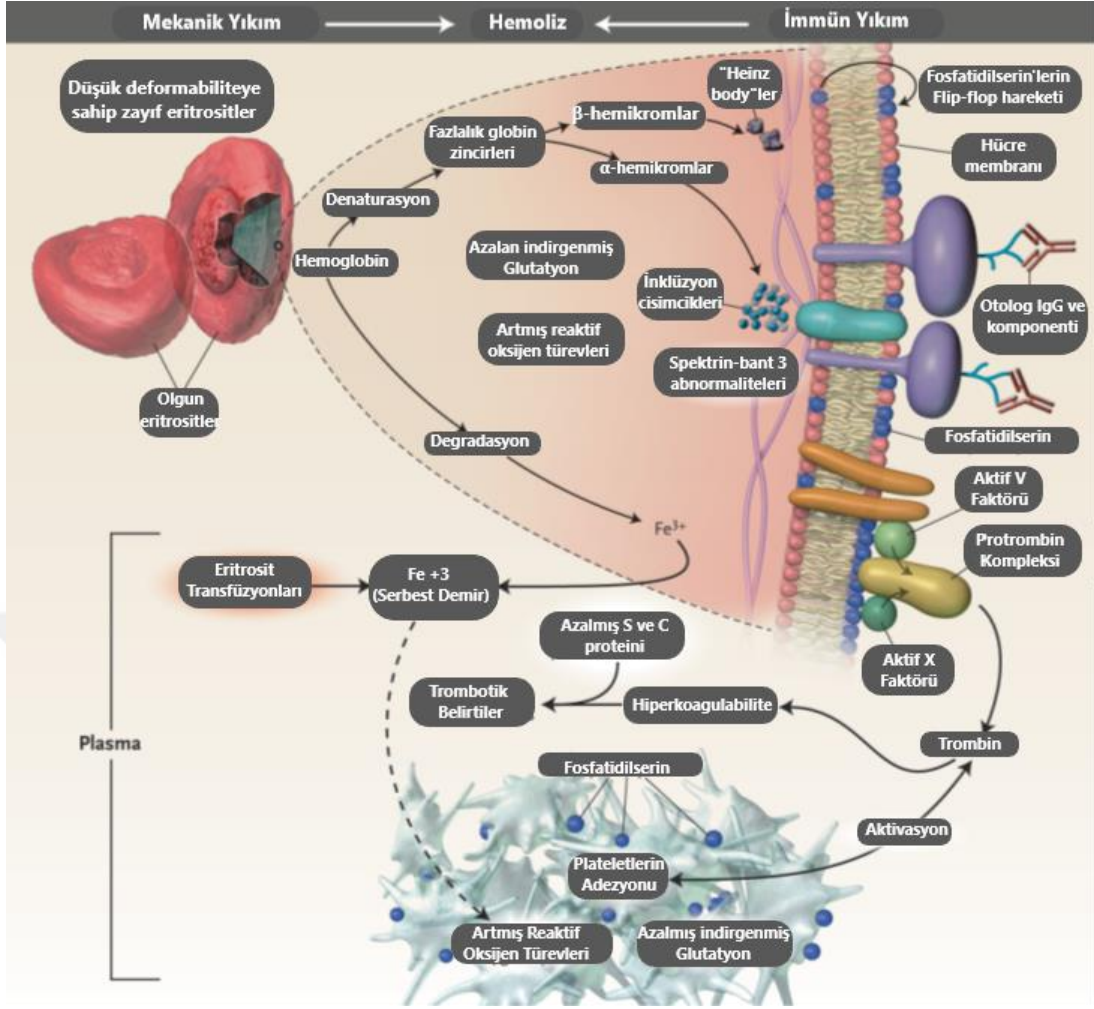
Sağlıklı bir insanda düşük O₂ ile uyarılan böbrekler eritropoetin proteini üretirler ve eritropoetin seviyesinin kanda yükselmesi ise kemik iliğini uyarır. Böylece yeni eritrositler üretilip, fonksiyon gösteremeyen, yaşlı eritrositler yıkılarak döngünün devamı sağlanır. Anemik bireylerde ise düşük hemoglobine sahip kanda O₂ seviyelerinin düşüklüğü eritropoetin salgısını, ardından kemik iliğini uyaracaktır. Fakat uyarılan kemik iliğinde gerçekleşen eritropoezde, beta talasemi örneğinde, β -globin zincirlerinin yetersizliğinden veya fonksiyonunu kaybetmiş β -globinlerin tetramer oluşturamayışından dolayı, serbest kalan α -globin zincirleri hemikromları (ardından inklüzyon cisimciklerini) oluşturarak eritrositlerin hücre zarına zarar verirler ve olgunlaşmamış eritroid öncül hücrelerinin de erken apoptozuna sebebiyet verirler. Bu; sebebi basit, sonuçları ise oldukça karmaşık ve zararlı olan fenomene inefektif eritropoez denmektedir (Şekil 2.21).

Beta-talasemilerde, özellikle şiddetli majör formlarında, zayıf veya olgunlaşmamış kırmızı kan hücreleri (eritrositler) mekanik yıkıma uğrarlar ve sonucunda açığa çıkan hemoglobin proteinleri sindirilirler (hemoliz). Aynı zamanda vücudun immün cevabı olarak hücre zarında bulunan fosfatidilserin molekülleri flip-flop hareketiyle yer değiştirirler ve hücre dışına apoptoz sinyali gönderirler (Şekil 2.22). İnefektif eritropoezden dolayı eritroid öncüllerinde denaturasyona uğrayan hemoglobinler α - ve β -globin zincirlerine parçalanırlar. Serbest α - globin zincirleri α -hemikromları; onlar da inklüzyon cisimcikleri şeklinde presipite(çökme) olurken anormal β -globin zincirleri β -hemikromlar ve en nihayetinde Heinz-body'ler şeklinde presipite olup, hücre iskeletine ve hücre zarına zarar verirler. Bu sırada hücre zarında aktif hale geçen Protrombin Kompleksi pıhtılaşmayı başlatacaktır. Bu olaylar zinciri anemiye hiperkoagülasyon ve ileride oluşabilecek emboli riskini de eklemektedir.

Ayrıca eritrosit içinde degrede olan hemoglobinden açığa çıkan demir, transfüzyona bağımlı talasemilerde, rutin kan transfüzyonuyla alınan demire eklenince kan, dalak, kalp, böbrekler ve diğer organlarda majör demir birikimi kaçınılmaz olmaktadır (Şekil 2.22).

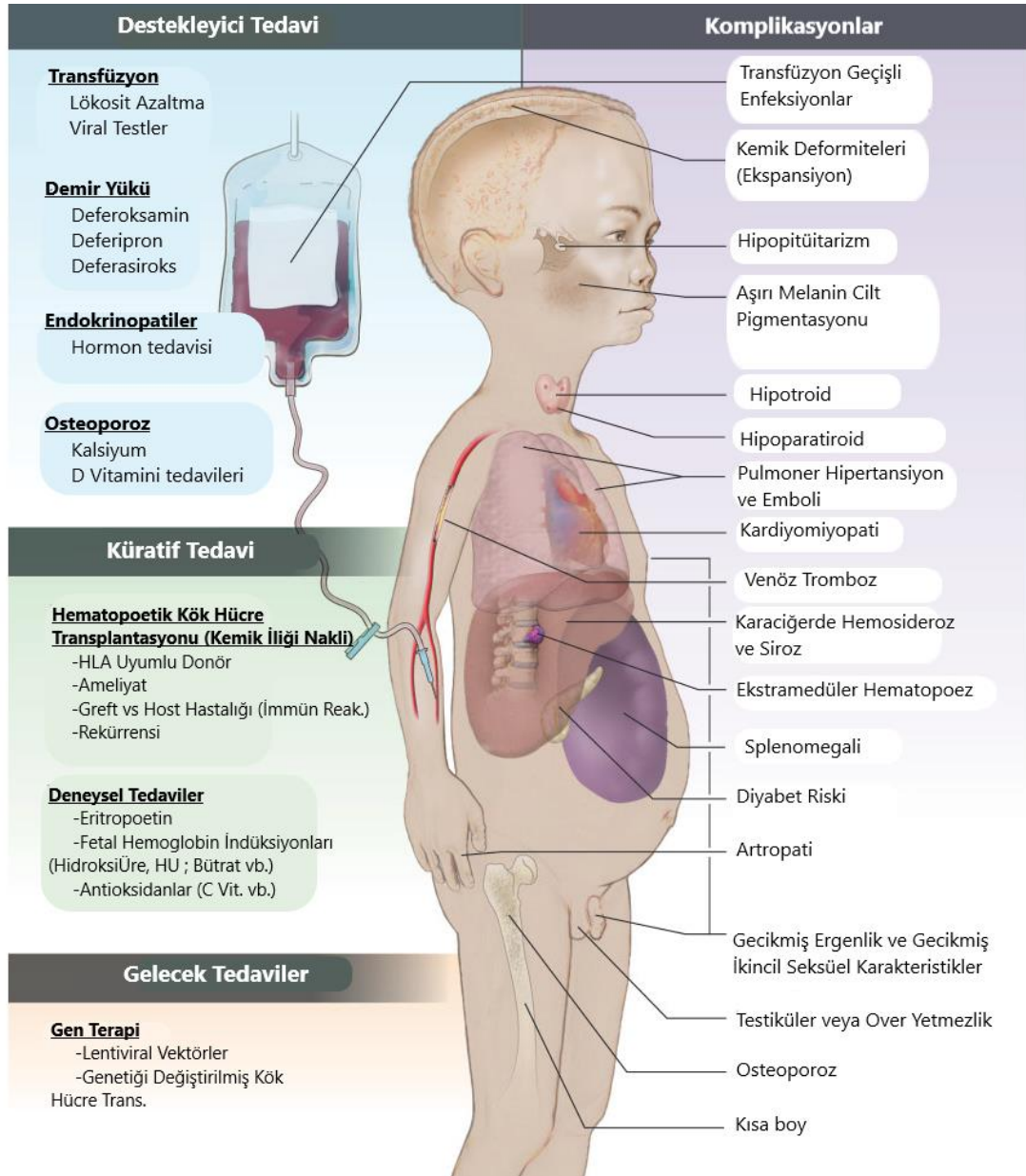


Şekil 2.21. İnefektif eritropoez (Rund ve Rachmilewitz, 2005).



Şekil 2.22. İnefektif Eritropoez sonucu olan α-hemikromların kırmızı kan hücre (eritrosit) duvarlarına zarar vermesi ve trombotik komplikasyonlarının hüresel boyutta gösterimi (Rund ve Rachmilewitz, 2005).

İnefektif eritropoez sonucunda hasta açısından iki majör olay gerçekleşmektedir; apoptoza uğrayan eritrositlerin yıkımından büyük oranlarda demir açığa çıkarak vücutta birikmekte ve organ hasarlarına neden olmakta, ikinci olarak ise yeterli miktarda sağlanamayan oksijen seviyeleri sonucu eritropoetin ile uyarılan kemik iliği aşırı çalışarak, kemik hiperplazilerine, yüzde ve uzun kemiklerde deformitelere sebep olmaktadır. Ayrıca ekstramedüler hematopoez, organomegali, organ yetmezlikleri, periferel hemoliz, böbrek taşı oluşumu, trombotik bozukluklar ve vasküler hastalıklar çok önemli sonuçlarındandır. Beta-talasemi majörlerde uygulanan düzenli kan transfüzyonu eritropoetin stimülasyonunu baskılayarak, kemik iliği üzerindeki baskıyı hafifletmektedir. Ancak, demir birikimi için ek olarak şelasyon tedavisini de gerektirmektedir. (Şekil 2.23).



Şekil 2.23. Klasik Beta-talasemi hastalığına ait komplikasyonlar ve yönelik tedaviler şekilde gösterilmiştir (Rund ve Rachmilewitz, 2005).

Beta-talaseminin destekleyici tedavisinin temel dayanağı olan transfüzyon tedavisi normal büyüme ve gelişmeye izin verir ve inefektif eritropoezi baskılar. Fakat; transfüzyonla bulaşan enfeksiyonlar (öncelikle hepatit B ve C), uygun testlerin yapılamadığı ülkelerde önemli bir ölüm nedenidir. Demir yüklenmesi hem transfüzyonel hemosiderozdan hem de aşırı gastrointestinal demir emiliminden kaynaklanır. Kalpte, karaciğerde ve çoklu endokrin bezlerinde demir birikimi, değişken endokrin organ yetmezliği ile bu organlarda ciddi hasara neden olabilmektedir. Endokrin bozuklukları ise ek hormon tedavileri gerektirir (Lo ve Singer, 2002).

Bununla birlikte, aşırı demir yüklenmesinin en ciddi sonucu, zorunlu-yaşam boyu süren şelasyon tedavisinden kaynaklanan kardiyotoksisitedir (Rund ve Rachmilewitz, 2005).

Talaseminin tedavisi olarak; splenektomi, düzenli kan transfüzyonu ve demir yükünün azaltılması olduğunu tanısıyla beraber öneren Cooley, ilk splenektomi ameliyatını 1935'te gerçekleştirmiştir. 1953'te ise Lichtman grubu, splenektomi sonrasında hastanın kan transfüzyonu ihtiyacının da azaldığını belirteceklerdir (Lichtman ve ark., 1953).

1960 yılı başlarında ise demir şelasyonu için atılan önemli olan bir farmasötik adım, o yıllardaki ismiyle Ciba Ltd., Novartis, ilaç firmasının “desferrioxamine”i tanıtmasıdır. Desferal adı altında çıkan bu şelatörün daha sonra kullanım şekilleri hakkında çalışmalar yapılmış, pompalı sistemlerle yavaş infüzyonu, oral formları çıkana kadar uzun bir süre kullanılmıştır (Weatherall ve Clegg, 2001).

Daha önce o yıllarda belli bir süre trisodiumcalcium diethylenetriamine-penta-acetate (D.T.P.A.) ve türevlerinin de kullanıldığı bilinmektedir (Fahey ve ark., 1961).

Deferoksamin şelatörü 1980'lerden beri Türkiye'deki hastaların kullandığı tek şelatör olmuştur. Deferiprone, ticari adıyla “Ferriprox” spesifik olarak beta talasemi majörlü hastalar için 2004'te lisanslanmıştır. Uzun yıllar da deferipron ve deferoksaminin kombine tedavilerinin kullanılmasından sonra en güncel demir şelatörü, “deferasirox” T.C. Sağlık Bakanlığı tarafından 2008'de onaylanmıştır (Canatan, 2014). “Exjade” ticari adıyla bilinen bu efervesan şelatörün film kaplı tablet formları birkaç yıldır kullanımdadır.

Beta-talasemi majör hastalarının klinik tedavilerin en güncel yöntemlerle yapıldığı günümüzde, klinik tabloda değişmeyen bazı parametrelerin bir veya birçok genetik ve epigenetik faktörlerce desteklendiği fikri, çalışmaları buralarda yoğunlaştırmıştır.

2.3.5. Beta Talasemide Klinik Tabloyu Etkileyen Genetik Faktörler

Beta-talasemi fenotipi en yüksek oranda; β -globin (HBB) mutasyonları, α -talasemiyle birlikte kalıtımı ve fetal hemoglobin (HbF) üretiminden sorumlu genlerdeki mutasyonlardan ve polimorfizmlerden etkilenmekte ve modifiye edilmektedir (Razak ve ark., 2018). Temel olarak iki grup modifiye edici faktör sıralanabilir; β -globin ekspresyonunu ve α - β -zincir dengesizliğini etkileyen mutasyon ve polimorfizmler, ikincil olarak ise hastalığın seyrini iyileştirip, şiddetlendirme potansiyeline sahip olan anemi komplikasyonlarına etki eden mutasyon ve polimorfizmler. Bu modifiye edici faktörlere bağlı olarak; hastalığın şiddeti ve dolayısıyla tedavi stratejileri de değişmektedir.

Weatherall (Weatherall, 2001) beta talasemi modifiye edici faktörleri üç sınıfta incelerken, Rund ve Quek çalışma grupları (Quek ve Thein, 2007; Rund, 2016) çalışma grupları bunları iki sınıfa ayırmışlardır. Weatherall;

- Primer modifiye edici faktörler olarak *yalnız beta-globin gen lokusunda lokalize polimorfizmleri*,
- Sekonder modifiye edici faktörler olarak *diğer globin zincirlerinin sentezlerini etkileyen polimorfizmleri*,
- Tersiyer modifiye edici faktörler olarak ise *demir metabolizması, kardiyak hastalıklar, tiroid bezi bozuklukları, hiperkoagülasyon, böbrek taşı oluşumu gibi anemi komplikasyonlarını etkileyen polimorfizmleri* incelemektedir.

Rund ve Quek ise;

- Birincil modifiye edici faktörler olarak *globin zincir dengesizliğini (α/β) etkileyen tüm polimorfizmleri*,
- İkincil modifiye edici faktörler olarak ise *komplikasyonları etkileyen polimorfizmleri* sorumlu tutmuşlardır.

Primer Modifiye Edici Faktörler

Beta-globin gen lokusunda bulunan ve β -globin zincir üretimini etkileyen mutasyonlar ve polimorfizmler bu grupta incelenebilir (Özkınay, 2014; Thein, 2005b; Weatherall, 2001). Beta-talasemi allellerinin farklı kombinasyonları klinik tabloyu etkileyen birincil unsurlardır.

HBB genindeki mutasyona bağlı olarak aneminin şiddeti belirlenmektedir. β^0 , β^+ , β^{++} fenotipleri arasındaki fark birincil olarak HBB genindeki mutasyonların farklılığından kaynaklanmaktadır. β^0 mutasyonlar genellikle 1. ve 2. ekzonda ya da ekzon-intron sınırına yakın bölgelerde bulunan nokta mutasyonları veya küçük delesyonlar ve insersiyonlardır (Manguoglu ve ark., 2005). Cd 6(-A) and Cd 8(-AA) gibi birkaç β^0 talasemi mutasyonu, γ -globin geninin promotör bölgesindeki aktive edici bir mutasyonla bağlantı gösterdiği için, yüksek HbF üretimi nedeniyle hafif klinik tablo gösterir. Ayrıca c.*+96T>C mutasyonu ile heterozigot allel taşıyan beta-talasemi vakaları da daha ılımlı seyretmektedir (Bilgen ve ark., 2011b).

Beta-talasemide büyük delesyonlar nadirdir. Kapsadıkları gen lokusuna göre ise etkileri farklılık göstermektedir. Örneğin -125'den +78 e kadar olan bazların delesyonu, 5' bölgesindeki gen ekspresyonu için gerekli CACCC, CCAAT ve TATA lokus kontrol elementlerini de içerir. Bu mutasyon HBB geni için hayati değer taşıyan elementlerin kaybına sebep olduğu için β globin geni ile cis durumda bulunan δ ve γ genlerinin ekspresyonu artmıştır ve bu nedenle HbA2 düzeyleri belirgin şekilde yüksek olarak bulunur.

11. kromozom üzerindeki tüm β -ve β -benzeri globin genlerinin ve LCR bölgesinin delesyona uğradığı heterozigot $\epsilon\gamma\delta\beta^0$ talasemide ise hematolojik parametreler talasemi taşıyıcılığını gösterirken HbA2 düzeyleri normal olarak bulunmaktadır.

Bazı HBB mutasyonları klinik tablo sergilemeksizin sadece dizi analizinde tespit edilebilmektedir, bunlar sessiz veya gizli mutasyonlardır. Taşıyıcılarda bulgu vermezler. Homozigot olarak bulduklarında taşıyanlarda beta talasemi taşıyıcılığı tablosu görüldüğü için; ağır bir başka mutasyon ile birleşik heterozigot durumda bulduklarında, talasemi intermedia tablosu gösterdiklerinde, yapılan analizlerde saptanabilmektedir.

Hafif mutasyonlar da bazı sessiz/gizli mutasyonlar gibi genellikle HBB geninin 5' promotor bölgesinde, 3'UTR bölgesinde ve PoliA bölgesinde lokalizedir. Hafif mutasyon taşıyıcılarında hematolojik parametreler, taşıyıcılığı gösterir. Bu mutasyonlar homozigot durumda genellikle talasemi intermedia tablosu yaparlar. Ağır mutasyonlarla birleşik heterozigotluk durumunda, klinik tablo talasemi intermedia tablosundan, talasemi major tablosuna kadar değişkenlik göstermektedir (Bilgen ve ark., 2011b; Özkınay, 2014).

Bazı beta talasemi mutasyonları ise geneli gibi otozomal resesif değil, dominant kalıtılmaktadır. Bunlar tek allelde bulunmaları durumunda, talasemi intermediadan talasemi majöre kadar değişen klinik tabloya sebep olurlar (Thein, 2013).

Sekonder Modifiye Edici Faktörler

α - β globin zinciri dengesizliğini etkileyen; β -globin geni ile cis durumundaki diğer β -benzeri genlerde, transkripsiyona etki eden β -globin ile trans pozisyonundaki diğer genlerde ve α -globin transkripsiyonuna etki eden α -gen lokusunda ve diğer lokuslarda lokalize mutasyonlar bu başlık altında incelenebilir.

α -gen delesyonlarında, α -globin sentezi azalacağı için klinik tablo hafiflemektedir. δ -gen delesyonunun bulunduğu, α -/ $\alpha\alpha$, $--/\alpha\alpha$, α -/ α -, α -/-- genotipleri ile heterozigot beta talasemi formlarında klinik tablo görece çok daha hafiftir. Alfa-globin genlerinin triplikasyon veya quadriplikasyonları ise ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$ gibi) inefektif eritropoezi, α -zincir presipitasyonunu ve benzeri komplikasyonları artıracığı için anemi şiddetini oldukça arttıracaktır.

Aynı zamanda diğer Hb variantları ile birlikte görülen beta-talasemi patofizyolojileri de değişkenlik göstermektedir (Keser ve ark., 2007; Keser ve ark., 2010).

Tam tersi şekilde HBG (Bilgen ve ark., 2013), HBD genlerinde bulunan bazı HPFH mutasyonları ile birlikte görülen beta talasemilerde klinik tablo daha hafif seyretmektedir. Ek olarak gelişimsel süreçte γ -globin promotörünü kapatarak HBG'den HBB'ye globin ekspresyonunun değişimini indükleyen BCL11A, KLF1, GATA1, SOX6, MYB genlerindeki mutasyonların da inefektif eritropoezi, α -zincir presipitasyonunu azaltıp; γ -globin üretimini artırarak, beta talaseminin klinik tablosu üzerinde iyileştirici etkisi olduğu gösterilmiştir (Galanello ve ark., 2009; Martyn ve ark., 2019; Thein, 2018; Wienert ve ark., 2017).

Tersiyer Modifiye Edici Faktörler

Beta-talasemi komplikasyonlarında iyileşmeye ya da aksi yönde etkiye sahip diğer polimorfizmler ve nokta mutasyonları bu sınıfta incelenebilir.

Kemik metabolizmasında görev alan vitamin D reseptörü (VDR), östrojen reseptör geni (ESR), kolajen genlerindeki varyasyonlar beta talaseminin önemli komplikasyonlarından biri olan osteoporozun gelişmesini etkiler (Guzeloglu-Kayisli ve ark., 2008). Demir metabolizmasında rol oynayan, hemokromatozisten sorumlu HFE geni C282Y ve H63D genlerindeki mutasyonların fenotipi etkilediği gösterilmiştir. Bilirubin metabolizması genlerindeki polimorfizmler (Örnek: UGT1 geni (TA)7 polimorfizmi) ve immun sistem genlerindeki (HLA, TNF, ICAM gibi) mutasyon ve polimorfizmlerin de talasemili hastalarda morbidite ve mortaliteyi etkilediği gösterilmiştir (Özkınay, 2014).

2.4. Fetal Hemoglobin

Fetal hemoglobinler, gelişimin erken evrelerinde, anne karnında, sentezlenen; iki γ -globin ve iki α -globin zincirinin tetramerinden oluşan hemoglobin çeşididir. Yetişkin hemoglobinlerden (HbA) daha yüksek O₂ taşıma kapasitesine sahiptir ve talasemi vakalarında varlığı, özellikle β^0 -talasemilerde hastalık seyrini çok iyileştirmektedir.

Beta-talaseminin, kemik iliğinde HbF üretimini stimüle eden HPFH veya δ -talasemi ile heterozigot formları talasemi majörden çok daha hafif seyreden ve transfüzyon ihtiyacı daha az olan intermedia sınıfında yer almaktadır.

- HPFH varlığı,
- δ - β talasemi birlikteliği,
- BCL11A, HBS1L-MYB gibi Hb QTL (Quantitative Trait Loci; Kantitatif özellik lokusu) bölgelerindeki mutasyonlar,
- Kemik iliği tümörleri,
- Aplastik anemi,
- Fanconi anemisi,
- Eritropoetik stres,
- Hamilelik durumu,
- HbF indükleyici tedaviler, artmış HbF sebepleri arasında sayılmaktadırlar.

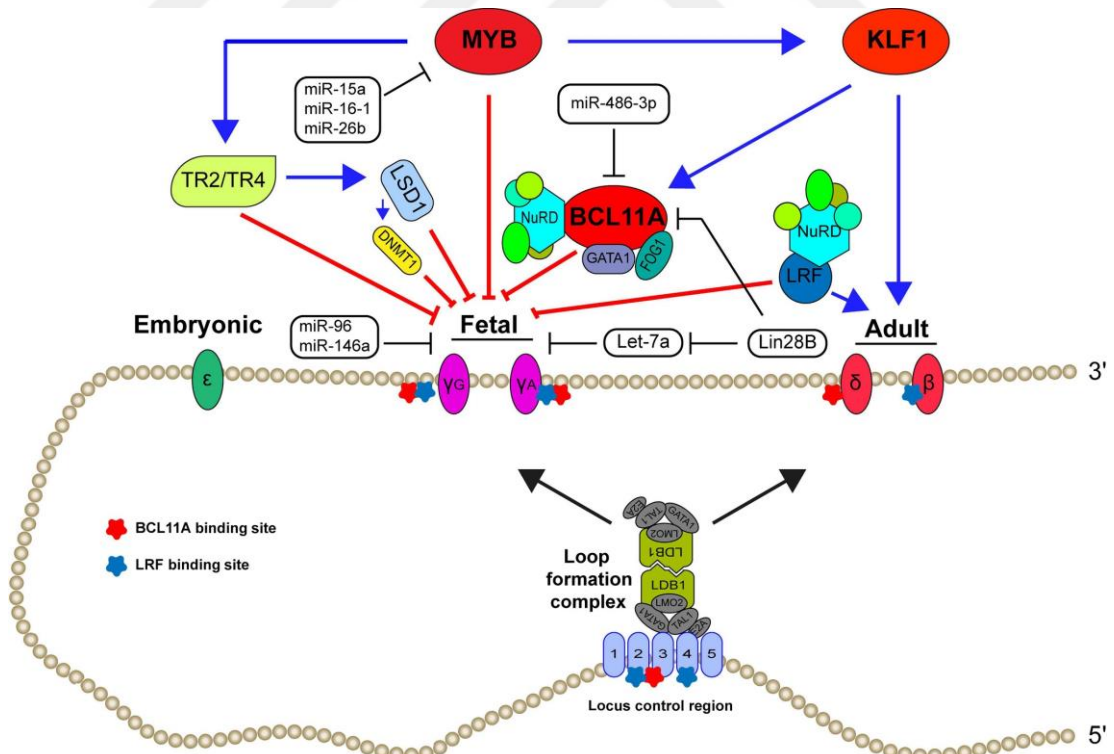
HbF düzeyini önemli ölçüde etkileyen tek nükleotid değişimleri veya delesyonlar genellikle şu gen bölgelerinde veya bu bölgelere bağlanan transkripsiyon faktörlerinde meydana gelmektedir;

- β -Globin Geni ve LCR'a bağlanan transkripsiyon faktörleri (LDB1/LMO2/GATA1/TAL1/E2A kompleksi),
- BCL11A geni,
- HBS1L-MYB genler-arası bölge (HMIP),
- KLF1 geni,
- HBG1-HBD intergenik bölge ve HBG1 ve HBG2 promotörleri,
- HBG2 promotöründe Xmn1'in bağlanma bölgesi (Xmn1-HBG2 bölge lokusu),

- LRF(ZBTB7A) geni (Bilgen ve ark., 2011a; Bilgen ve ark., 2013; Deng ve ark., 2012; Grieco ve ark., 2015; Hu ve ark., 2020; Martyn ve ark., 2019; Razak ve ark., 2018)

En önemli üç kantitatif özellik lokusu (QTL'ler), Xmn1-HBG2 veya rs7482144 olarak adlandırılan kromozom 11p15.4 üzerinde HBG2'nin 5' -158 pozisyonundaki C / T, 6q23 kromozomu üzerindeki HBS1L-MYB intergenik bölgesinde bulunan SNP ve kromozom 2p16.1 üzerindeki BCL11A geninde bulunan mutasyonları ve SNP'leri kapsayan gen lokuslarıdır. Bu üç bölgedeki DNA mutasyon ve polimorfizmleri, HbF seviyelerindeki varyasyonların yaklaşık %10-%50'sini oluşturur. Bu da ek lokusların dahil olduğunu göstermektedir (Thein, 2018).

Birçok çalışma göstermiştir ki; HBG1-HBD intergenik bölge, γ - β globin gen değişiminde önemli bir regülatör rol üstlenmektedir. Galarneau ve çalışma grubu bu bölgede yer alan bir SNP (rs10128556) tespit etmiş ve HbF üzerinde HBG2-Xmn1 QTL'inden daha fazla etkisi olduğunu öne sürmüşlerdir (Galarneau ve ark., 2010; Hu ve ark., 2020).

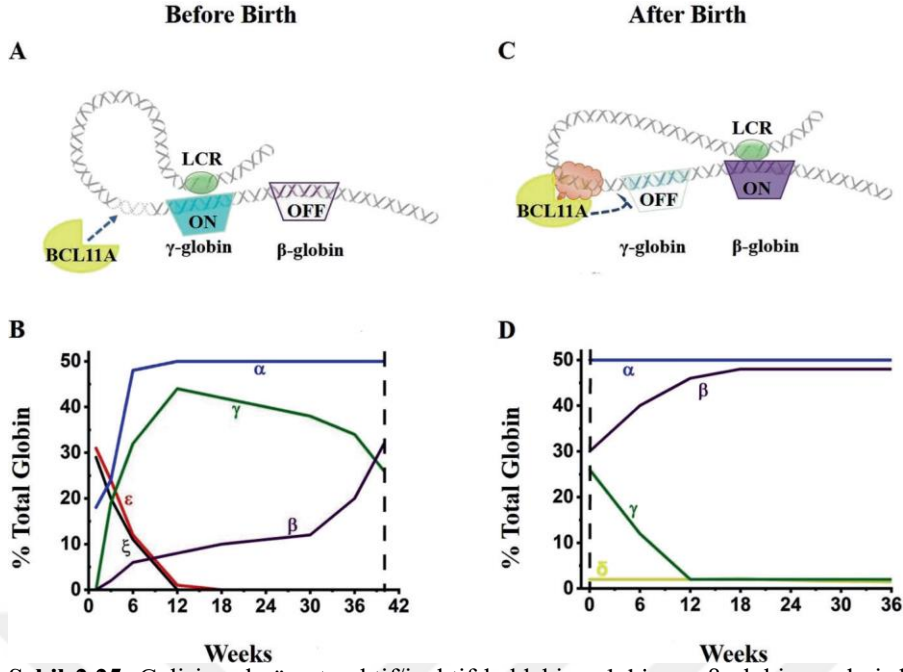


Şekil 2.24. β -globin geninin aktif looping pozisyonunda etkisi olan başlıca transkripsiyon faktörleri (Paikari ve Sheehan, 2018). γ -A HBG1 genini, γ -G HBG2 genini, ϵ HBE genini, δ HBD genini ve β HBB genini işaret etmektedir.

β -benzeri globin genleri, 11. kromozom üzerinde gelişim sırasında eksprese edildikleri sıraya göre doğrusal olarak dizilmiştir (HBE1, HBG1 / HBG2, HBD / HBB). 16 kb uzunluğundaki lokus kontrol bölgesi (β -LCR), transkripsiyon aktivatörleri için bağlanma bölgelerinin kümelerinden (loci) oluşan dört eritroid spesifik DNaz-I hiper sensitif (HS) bölgeden oluşmaktadır. LCR, β -benzeri gen kümesinin 40-60 kb yukarısında bulunup, looping ve β -benzeri globin promotörleri ile direkt etkileşim yoluyla β -benzeri genlerin ekspresyonunu düzenler (Kim ve Dean, 2012). GATA1, TAL1, E2A, LMO2 ve LDB1 transkripsiyon faktör proteinlerinden oluşan kompleksin, LCR ve globin promotörleri arasındaki döngü oluşumuna aracılık ettiği düşünülmektedir (Breda ve ark., 2016).

β benzeri globin gen ekspresyonu; gen-otonom kontrol ve LCR için globin genleri ve BCL11A gibi γ - δ intergenik bölgeye bağlanan trans-acting repressör genlerin kompetitif bağlanması ile düzenlenmektedir (Enver ve ark., 1990).

GWAS (Genome-wide association) ve takip eden çalışmalar, **BCL11A**'nın HBG'nin anahtar negatif regülatörü olduğunu göstermiştir. Bir ZF (Zinc-Finger) transkripsiyonel repressör olan BCL11A proteini, β -benzeri globin gen lokusu içindeki HBG aktivasyonu için kritik bölgeleri işgal etmekte ve HBG promotörünü kapatarak, LCR ile HBB promotörü arasındaki uzun etkileşimler silsilesinin başlamasına izin vermektedir (Şekil 2.24). BCL11A bu rolü, eritroid ana düzenleyiciler GATA1, SOX6, ZFPM1 / FOG1 ve HDAC1 ve HDAC2 içeren NuRD baskılayıcı kompleksi ile etkileşime girerek uygulayabilmektedir. BCL11A'nın mutasyona veya delesyona uğradığı durumlarda, BCL11A baskısından kurtulan LCR, HBG'nin serbest kalan promotörüne bağlanarak γ -globin ekspresyonunu başlatacaktır (Bauer ve ark., 2013; Paikari ve Sheehan, 2018).



Şekil 2.25. Gelişimsel süreçte aktif/inaktif haldeki γ -globin ve β -globin genleri değişimini gösteren illüstrasyon (Ali ve ark., 2020).

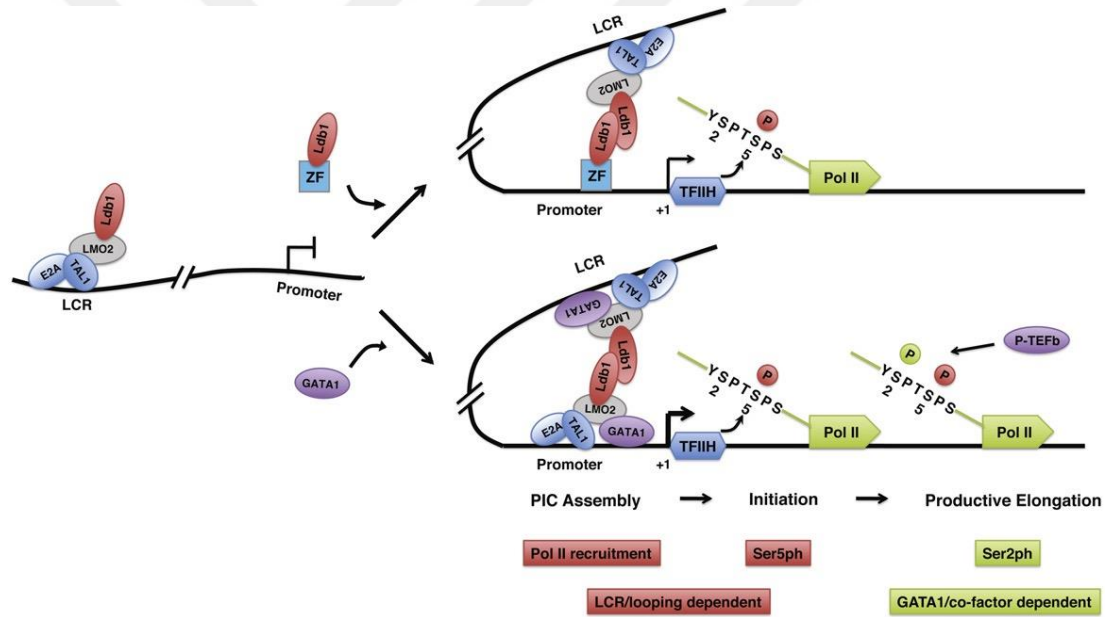
Genomik çalışmalar ayrıca, yüksek HbF seviyeleri ile ilişkili, kromozom 6q üzerindeki GTP bağlayıcı uzama faktörü HBS1L ile myeloblastoz onkogen *MYB* arasındaki intergenik bölge içinde lokalize mutasyon ve polimorfizmleri de göstermiştir. MYB transkripsiyon faktörü, hematopoez, eritropoez ve HbF seviyelerinin önemli bir regülatör elemanıdır ve eritroid karakteristiklerini şu iki mekanizma yoluyla modüle etmektedir: Birincisi doğrudan KLF1 ve TR2/TR4 gibi diğer nükleer reseptörlerin aktivasyonu ile ve ikincisi de dolaylı olarak eritroid farklılaşmasının kinetiğinin değiştirilmesi yoluyla yapmaktadır. Düşük MYB seviyeleri, eritroid farklılaşmasını hızlandırarak, daha büyük olan ve fakat halen ağırlıklı olarak γ -globin eksprese eden erken eritroid progenitör hücrelerin üretimine yol açar (Stadhouders ve ark., 2014).

KLF1 (Kruppel benzeri faktör 1), eritropoezde anahtar rol oynayan temel bir eritroid spesifik transkripsiyon faktörüdür. KLF1, hem yetişkinlik aşamasında HBB promotörü ile etkileşime girerek doğrudan β -globin gen ekspresyonunu aktive ederek, hem de BCL11A promotörüne yerleşerek γ -globin repressörü BCL11A ekspresyonunu artırarak hemoglobin değişimini etkilemektedir. Doğuştan heterozigot KLF1 mutasyonlarının, fetal hemoglobinin kalıtsal kalıcılığı (HPFH) ve KLF'in lentiviral yöntemle knock-down edilmiş yetişkin eritroblast kültürlerinde azalmış BCL11A ekspresyonu ile sonuçlandığı bildirilmiştir (Bank, 2006).

Ek olarak globin genlerinin regülasyonu; epigenetik olarak histon modifikasyonları, metilasyon, Lizin-spesifik Dimetilazlar (LSD'ler) ve microRNA (miRNA'lar) ile kontrol edilmektedir (Paikari ve Sheehan, 2018).

LDB1 (LIM-Domain Binding 1) Geni; β -globin genlerinin transkripsiyonu için DNA looping'ini başlatan ana proteindir. Ancak, DNA'ya direkt olarak bağlanamaz, bunun için TAL1, LMO2, E2A ve GATA1 proteinlerini içeren GATA elementlerine (β -LCR kompleksi) ihtiyaç duyar (Deng ve ark., 2012).

GATA1; KLF1, MYB genleri BCL11A'nın promotörüne bağlanarak aktivasyonundan da sorumludur. Dolayısıyla bu genlerdeki polimorfizmler HbF üzerinde daha büyük etkisi olan BCL11A'nın kendi ekspresyonunu bastırarak, γ/β globin regülasyonunu tersine çevirme yeteneğine sahiptir.

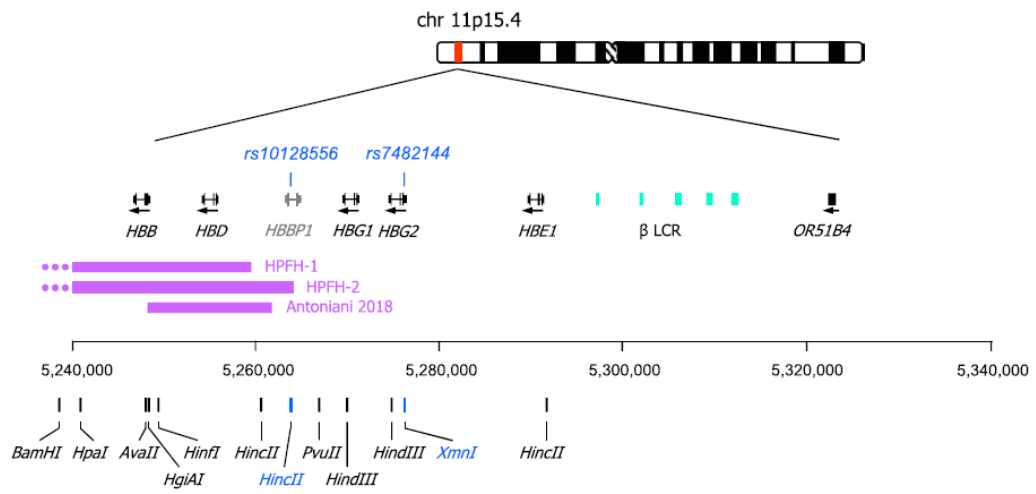


Şekil 2.26. Kromatin looping ve β -LCR&LDB1/GATA kompleksi aracılı β -globin geni transkripsiyonunun ilustrasyonu (Deng ve ark., 2012).

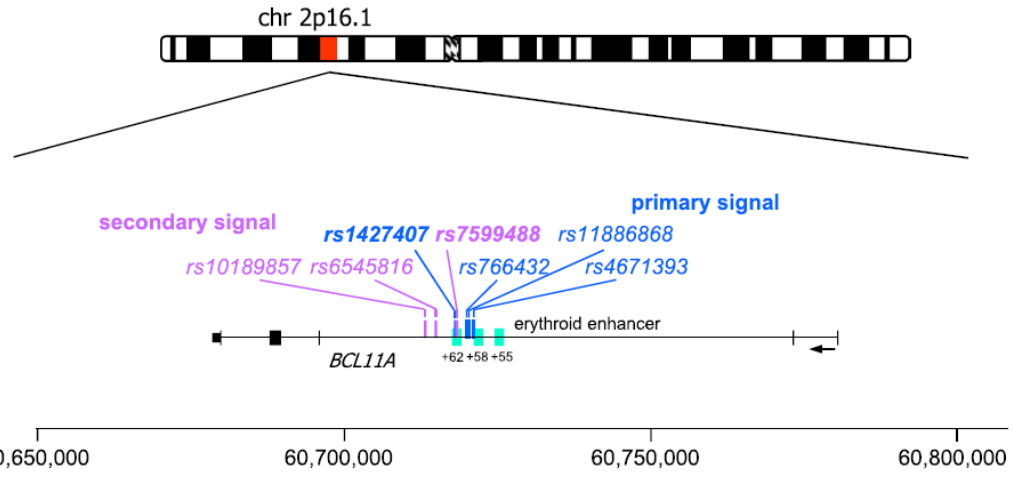
Şekil 2.26'da Deng ve çalışma grubu tarafından GATA1'in yerine LDB1'e bağlanan bir ZF (Zinc-finger) oligonükleotidinin kromatin looping'ini başlattığını, ancak transkripsiyonun devamı için GATA1 elemanına ihtiyaç olduğu gösterilmiştir.

TALI ise, GATA1'in BCL11A'ya bağlanmasından, β -LCR'nin β -benzeri genlerin promotörlerine bağlanmasından, KLF1'in aktivasyonundan, GATA1'in aktivasyonuna kadar tüm süreçlerde kilit protein rolü üstlenmektedir (Kassouf ve ark., 2010).

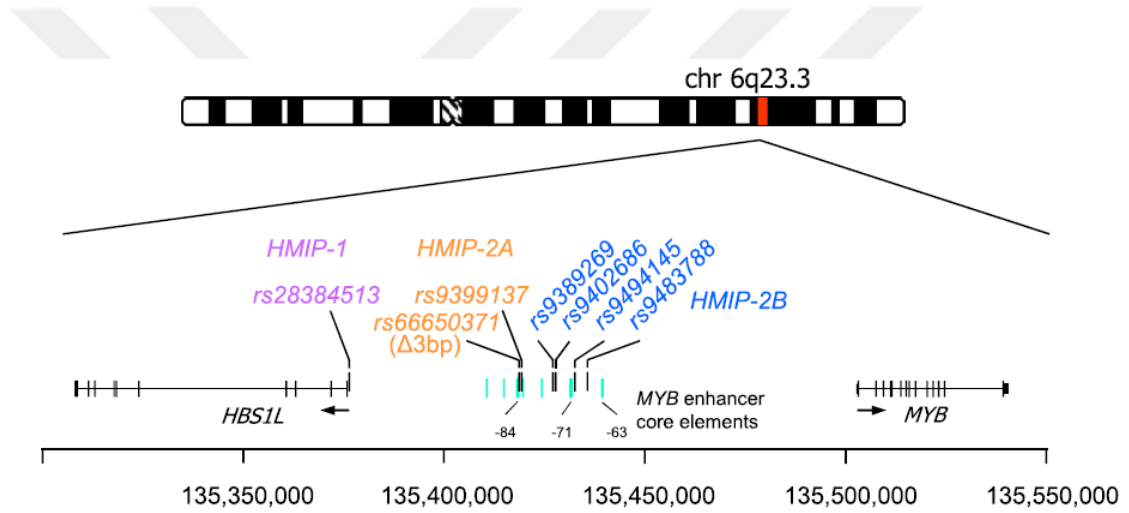
Ayrıca HbF regülasyonunda işe karışan ve beta-globin gen lokusunda lokalize olan ve olmayan (BCL11A ve MYB gibi) tüm regülatörlerin sahip oldukları polimorfizlerin haritalanması ve HbF üzerine olan etkileri güncel araştırmalar içinde yer almaktadır (Şekil 2.27, Şekil 2.28 ve Şekil 2.29).



Şekil 2.27. HbF regülatör elemanlarından Beta-Globin gen lokusunun ve lokalize polimorfizmlerin haritalanması (Menzel ve Thein, 2019).



Şekil 2.28. HbF regülatör elemanlarından BCL11A gen lokusunun ve lokalize polimorfizmlerin haritalanması (Menzel ve Thein, 2019)



Şekil 2.29. HbF regülatör elemanlarından MYB gen lokusunun ve lokalize polimorfizmlerin haritalanması (Menzel ve Thein, 2019)

2.5. TAL1 Transkripsiyon Faktörü

Protein yapıdaki TAL1 (SCL/TAL1, T-hücre Akut Lösemi Proteini-1, bHLH Transkripsiyon Faktörü-1, Eritroid Diferansiyasyon Faktörü), hematopoez ve lökomogenez işlemlerine katılan bir transkripsiyon faktörüdür. Eritrositler ve diğer kan hücrelerinin yapımına, erken emriyogenezde mezodermin oluşturulmasına katılmakta ve yetişkinlikte ise hematopoezi regüle etmektedir.

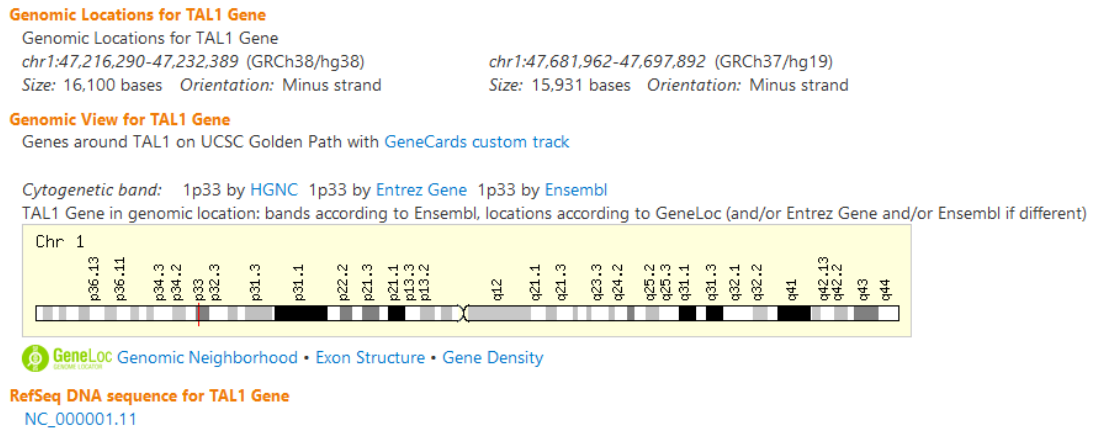
TAL1 geni, insan lösemisinde bulunan tümöre özgü bir kromozomal translokasyondaki rolü ile 24 yıl önce tanımlanmıştır (Robb ve Begley, 1997). TAL1'in aşırı ekspresyonuna yol açan değişikliklerin, insan T hücresi akut lenfoblastik lösemisinde (T-ALL) bulunan en yaygın tümöre özgü kromozomal anormallikler olduğu kabul edilmektedir. Ayrıca çalışmalar, TAL1'in kötü huylu transformasyona dahil olduğunu doğrulamış ve tümör oluşumunu hızlandırmak için diğer onkojenler ile sinerjik olarak hareket edebileceğini göstermiştir (Robb ve Begley, 1997; Schroeder ve ark., 1968).

Hematopoitik kök hücrelerinin multipotensisini belirlemekte ve bunları sessiz fazda (G0) tutmakta zorunluluk arz eden TAL1 aynı zamanda, E2A/HEB, GATA1-3, LMO1-2, Ldb1, ETO2, Runx1, ERG, FLI1 gibi birçok transkripsiyon faktörüyle etkileşime girerek hematopoezi regüle etmekle yükümlüdür. Bu kompleksler içinde TAL1 normal myeloid farklılaşmasını, eritroid progenitörlerinin proliferasyonunu regüle etmekle birlikte, hematopoitik kök hücrelerinin farklılaşma yönünü de seçmektedir (Vagapova ve ark., 2018).

SCL kompleksi veya TAL kompleksi denilen transkripsiyon kompleksi; genellikle (TAL1/E2A/GATA1/LMO2/Ldb1) ana elemanlarından oluşup, üyeleri değişkenlik göstererek, çeşitlilik arz edebilmektedir. TAL1'in etkileşim içinde bulunduğu ve komplekste yerini alan TF'lerin cinsi ise myeloid ve lenfoid hücrelerinin farklılaşmalarının aktivasyonu veya inhibisyonunu belirlemekte, uzun yıllardır TAL1 doğrudan kanserle ilişkili bulunmaktadır (Choi, 2014; Gering ve ark., 1998; Paliı ve ark., 2011; Tan ve ark., 2019).

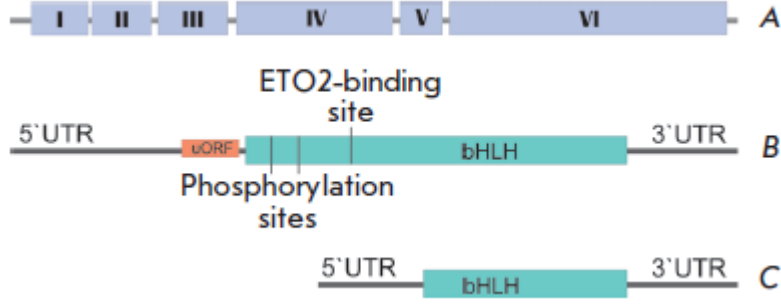
Transkripsiyon faktörü TAL1, hematopoezin ana regülatörlerinden biridir ve DNA'ya regülatör bölgelerinden bağlanan, E-box dizisi (CANNTG) ile etkileşime giren ve GATA, Ets, Runx gibi faktörlere bağlanmayı sağlayan HLH (Helix-Loop-Helix) domaini içerir. TAL1 gen ekspresyonunun inhibisyonunun, erken embriyonik evrede, vitellüs kesesinde hematopoezin tamamen durmasıyla sonuçlandığı çalışmalarda gösterilmiştir (Robb ve ark., 1995). Erişkinlikte ise TAL1'in maksimum ekspresyonu, pluripotent hematopietik kök hücreleri, multipotent myeloid ve lenfoid progenitörleri, eritroid ve megakaryositik hücrelerinin varlığını işaret etmektedir.

TAL1 geni insanda 1 numaralı kromozomun kısa kolunda p33 bölgesinde yerleşmiştir (Şekil 2.30).



Şekil 2.30. TAL1 transkripsiyon faktör proteinini kodlayan TAL1 geninin kromozom 1 üzerinde lokalizasyonu. (GeneCards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TAL1>, Erişim tarihi: 01.09.2020)

TAL1 geni yapısal olarak birbirinden farklı uzun ve kısa transkript varyantları ortaya çıkarmaktadır. Normal TAL1 6 ekzondan (I-VI ekzonlar) oluşurken, alternatif kırılma ile kısa (TAL1-S) ve uzun (TAL1-L) TAL1 transkript varyantları, izoformları ortaya çıkmaktadır. TAL1-L ve TAL1-S izoformları bu normal mRNA'dan sentezlenir (Şekil 2.31).



Şekil 2.31. TAL1 geninin yapısı ve bu gene ait uzun ve kısa transkript varyantları. a. I-VI ekzonlarının yerleşimi, b.Uzun TAL1 transkript varyantı. TAL1-L ve TAL1-S izoformları bu mRNA'dan sentezlenir. UTR: Translasyona katılmayan bölge (Untranslated region), ORF: upstream açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame), bHLH: Helix-Loop-Helix domain'ini sentezleyen mRNA bölgesi. c. Kısa TAL1 transkript varyantı, bu varyanttan sadece TAL1-S izoformunu sentezlenmektedir (Vagapova ve ark., 2018).

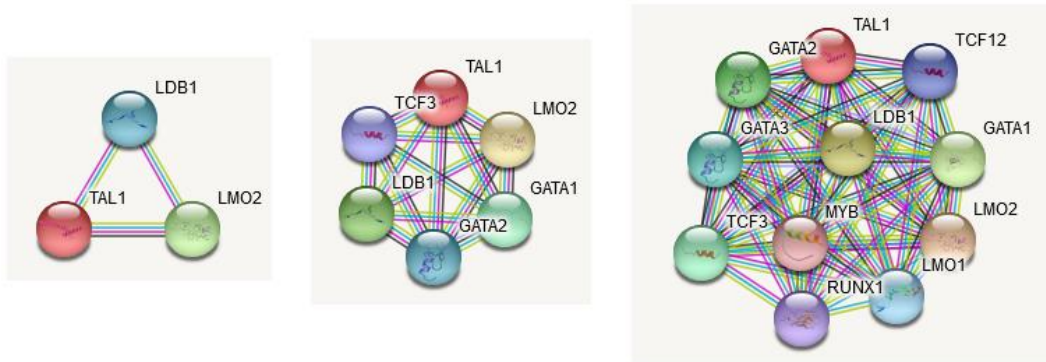
TAL1, hemoglobinin gelişimsel süreç boyunca sentezlenmesinde β -globin/ γ -globin seçiminde γ -globin'den yana kromatin katlanmada büyük rol oynamaktadır (Grieco ve ark., 2015; Vagapova ve ark., 2018; Wienert ve ark., 2015; Yun ve ark., 2014).

TAL1 geni, GATA1'in BCL11A'ya bağlanmasından, β -LCR'nin β -benzeri genlerin promotörlerine bağlanmasından, KLF1'in aktivasyonundan, GATA1'in aktivasyonuna kadar tüm süreçlerde kilit protein rolü üstlenen TAL1 proteinini kodlayan gen olarak önem arz etmektedir. (Abi Saad ve ark., 2014)

Temel olarak fonksiyonları şöyle sıralanabilir:

- bHLH gen ailesi üyeleriyle etkileşim (E2A gibi),
- LIM-domain proteinlerle etkileşim (LMO1, LMO2 gibi),
- Kötü huylu onkogen aktivitesi,
- E-box motiflerinden (CANNTG) DNA'ya bağlanma,
- Hematopoez regülasyonu gibi yaşamsal düzenlemelerde işe karışmaktadır.

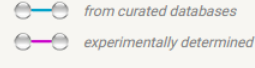
Böylesine kritik rolleri olan TAL1'in özellikle hemotopoez, globin gen regülasyonu(özellikle HbF için gamma globin gen ekspresyonu) ve hemoglobin düzenlenmesine yönelik davranışında, ilişkide ve etkileşimde olduğu protein ve transkripsiyon faktörleri için değişik ağ (network) çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalarda TAL1 ile etkileşen 3'lü, 6'lı ve çoklu bağlantılar, TAL1'in önemini daha da artırdığını ortaya koymaktadır. Aynı zamanda TAL1, etkileşimde bulunduğu LMO2, GATA1-3, MYB genleri ile simültane olarak eksprese olduğu görülmektedir (Şekil 2.32 ve Şekil 2.33).

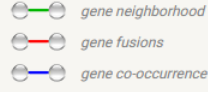


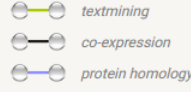
Şekil 2.32. TAL1'in ilişkide olduğu protein ve transkripsiyon faktörleri (STRING, <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bbT5HyzABCJl&sessionId=btmjLPM545nx>, Erişim tarihi: 01.09.2020).

Edges:

Edges represent protein-protein associations
associations are meant to be specific and meaningful, i.e. proteins jointly contribute to a shared function; this does not necessarily mean they are physically binding each other.

Known Interactions


Predicted Interactions


Others


Your Input:
 T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1; Implicated in the genesis of hemopoietic malignancies. It may play an important role in hemopoietic differentiation. Serves as a positive regulator of erythroid differentiation (By similarity); Basic helix-loop-helix proteins (331 aa)
 ● TAL1

Predicted Functional Partners:

	Neighborhood	Gene Fusion	Cooccurrence	Coexpression	Experiments	Databases	Textmining	[Homology]	Score
● LMO2	Rhombotin-2; Acts with TAL1/SCL to regulate red blood cell development. Also acts with LDB1 to maintain erythroid precursors ...	●	●	●	●	●	●	●	0.999
● LDB1	LIM domain-binding protein 1; Binds to the LIM domain of a wide variety of LIM domain- containing transcription factors. May re...	●	●	●	●	●	●	●	0.996
● GATA1	Erythroid transcription factor; Transcriptional activator or repressor which probably serves as a general switch factor for erythro...	●	●	●	●	●	●	●	0.994
● GATA2	Endothelial transcription factor GATA-2; Transcriptional activator which regulates endothelin-1 gene expression in endothelial c...	●	●	●	●	●	●	●	0.990
● TCF3	Transcription factor E2-alpha; Transcriptional regulator. Involved in the initiation of neuronal differentiation. Heterodimers betwe...	●	●	●	●	●	●	●	0.987
● GATA3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3; Transcriptional activator which binds to the enhancer of the T-cell recept...	●	●	●	●	●	●	●	0.985
● LMO1	Rhombotin-1; May be involved in gene regulation within neural lineage cells potentially by direct DNA binding or by binding to ot...	●	●	●	●	●	●	●	0.983
● TCF12	Transcription factor 12; Transcriptional regulator. Involved in the initiation of neuronal differentiation. Activates transcription by ...	●	●	●	●	●	●	●	0.977
● RUNX1	Runt-related transcription factor 1; CBF binds to the core site, 5'-PYGPGGT-3', of a number of enhancers and promoters, includi...	●	●	●	●	●	●	●	0.967
● MYB	Transcriptional activator Myb; Transcriptional activator; DNA-binding protein that specifically recognize the sequence 5-YAAC[G...	●	●	●	●	●	●	●	0.967

Your Current Organism:
 Homo sapiens
 NCBI taxonomy Id: [9606](#)
 Other names: H. sapiens, Homo sapiens, human, man

Şekil 2.33. TAL1'in ilişkide olduğu protein ve transkripsiyon faktörleri illustrasyonuna ait lejant (STRING, <https://string-db.org/cgi/network?taskId=bbT5HyzABCJl&sessionId=btmjLPM545nx>, Erişim tarihi: 01.09.2020).

Biz de bütün bu bilgiler ışığında, HbF'i yüksek beta-talasemi majörlü hastalarda, TAL1 ekspresyon düzeyi ile yüksek HbF seviyesi arasında bir ilişkinin olup olmadığını gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR (Real-time quantitative RT-PCR) yöntemi kullanarak belirlemeye çalıştık.

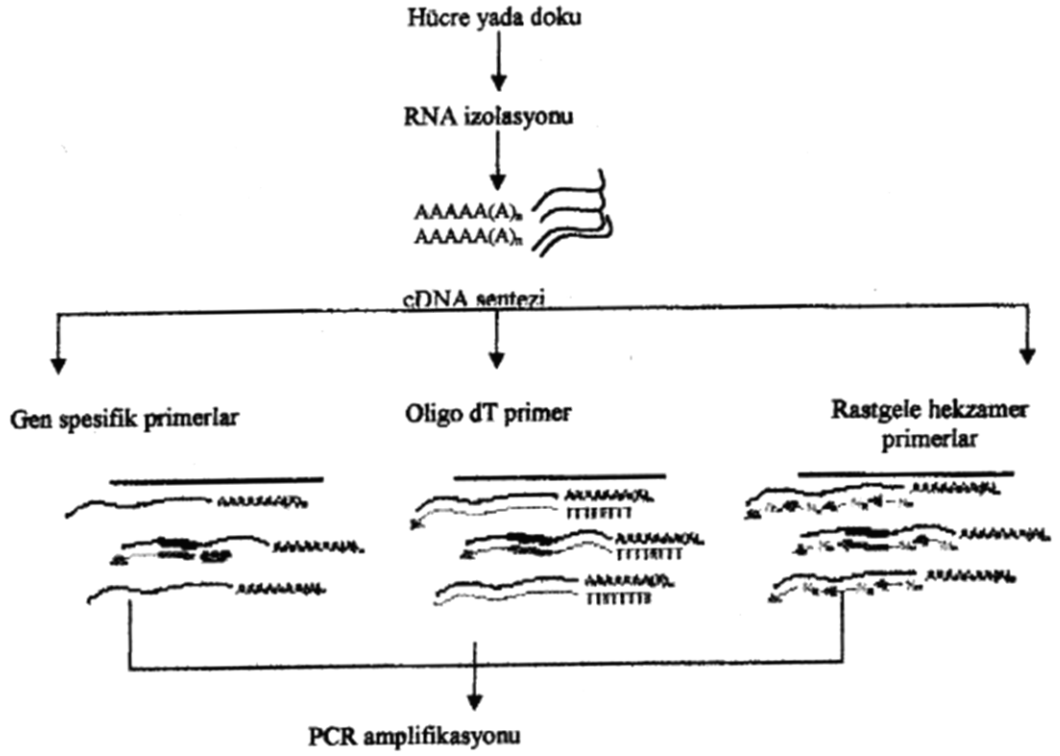
2.6. Kantitatif RNA Ekspresyon Tayin Yöntemi: qRT-PCR

Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR); hücrelerden izole edilen RNA moleküllerinin, retrovirüslerden izole edilen *Revers Transkriptaz* enzimi yardımıyla komplementer DNA (cDNA) sentezini gerçekleştirmesi sonucu, gen ekspresyonu analizlerinin yapılabildiği hızlı ve hassas bir yöntemdir. Bu yöntemle çok düşük titrelerdeki mRNA bile saptanabilmekte ve aynı zamanda ekspresyon miktarı da tespit edilebilmektedir. Oluşan RT-PCR ürünlerinden cDNA kütüphaneleri oluşturulabilir ki bunlar daha sonra gen kütüphaneleri olarak değerlendirilebilmektedir. RNA analiz tekniklerinden; RNA hibridizasyonu, RNaz koruma yöntemleri, in situ hibridizasyon ve SI nükleaz yöntemleri ile kıyaslandığında daha hassas, hızlı, güvenilir ve kolay bir yöntem olarak değerlendirilebilir.

RT-PCR tek veya iki adımlı olarak gerçekleştirilebilir.

İki adımlı RT-PCR'da; RT tamponunda cDNA sentezi gerçekleştirilir. Sentez edilen cDNA'nın 1/10'u PCR için kullanılır. Kullanılmayan cDNA ise -80 °C'de saklanmalıdır. Tek zincirli cDNA oligo (dT), random hekzamer veya GSP (Gen Spesifik Primerler) primerlerle eşleşir. Tek adımlı RT-PCR yönteminden farklı olarak faydaları ise amplifikasyon enziminin ve primerlerin seçilebilmesi, tek örnekten oluşan farklı mesajların saptanması ve kantitasyonuna uygunluktur.

Tek adımlı PCR'da ise revers transkripsiyon ve PCR aynı tüpte optimize edilen koşullarda gerçekleşir. Bu yöntem fazla miktarda RNA örneği varken daha kullanışlıdır. cDNA sentezi ve amplifikasyon arasında tüplerin açılıp kapatılmasına gerek olmadığından tek adımlı RT-PCR yönteminde kontaminasyon riski en aza indirilmiş olur. Tek zincirli RNA GSP primerleriyle eşleşir. Daha az pipetleme, daha az kontaminasyon riski vardır. Kantitatif PCR'a uygundur. Revers transkriptaz ile amplifikasyon enzimleri birlikte çalışır ve yüksek hassasiyetlidir (Okutucu ve Pehlivan, 2003).



Şekil 2.34. RT-PCR işlem adımları (Okutucu ve Pehlivan, 2003).

Biz de bu çalışmamızda hızlı, pratik ve maliyeti uygun olan SYBR Green ve random (rastgele) heksamer primerleri kullanarak, cDNA amplifikasyonuna dayalı kantitatif gerçek veya eş zamanlı (real-time) RT-PCR yöntemi kullanarak, HbF'i yüksek olan beta-talasemi majörlü hastalarda HbF sentezini düzenleyen kompleks içinde yer alan TAL1 gen ekspresyonunu 30 hastadan gerçekleştirerek HbF yüksekliği ile ilişkisini araştırdık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Projemiz “Beta Talasemi Majör Hastalarında TAL1 Geni Ekspresyon Düzeyinin Belirlenmesi ve HbF ile İlişkisinin Araştırılması” ismi ile Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayını aldıktan sonra, proje kapsamında yer alan 30 hasta ve 30 kontrol için kullanılacak sarf malzemelerin satın alma sürecine geçildi. Satın alma süreci henüz başlamışken, Yükseköğretim Kurulu (YÖK) kararı (2019) ile Anabilim Dalımız Tıbbi Genetik Programının başka bir Anabilim Dalına aktarılmasından sonra, Üniversitemiz BAP Birim Koordinatörlüğü bilgilendirildi ve proje sarflarının satın alması BAP tarafından durduruldu. Projemizin satın alması yaklaşık 6 ay süreyle gecikmiş oldu. Süreç sonunda satın alma işlemleri yeniden başlatılmış ancak COVID-19 (SARS-CoV-2) Pandemisi'nin başlaması ile satın alınacak sarf malzemelerin gecikmeli olarak, ayrı ve uzun aralıklarda gelmesine neden oldu. Tezini çalışacak öğrencilerin pandemiye maruz kalmamaları ve hak kaybına uğramamaları için YÖK tarafından iletilen kararname ile 2020-Bahar döneminde kayıtları donduruldu. Bu arada projemizde paydaş olan Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Adem Tolunay Talasemi Merkezi'nden beta talasemi majör tanısı almış ve HbF değeri yüksek (HbF>%2), tranfüzyon tarihlerine göre merkeze gelen 30 hastadan, transfüzyon öncesi EDTA'lı 5'er ml periferik kanlar toplanmaya başlandı. Hastalardan ve kontrol grubundan aldığımız ve toplam RNA izolasyonu yapılacak periferik kanlar, taze olarak çalışılmadığından -20 °C'de saklandı. Kontrol grubu için ise aynı merkezden kan vermek için başvuran, donör olan, talasemi ve diğer hemoglobinopatilerle ilgisi olmayan, HbF başta olmak üzere kan parametreleri normal seviyelerde olan, bilgilendirilmiş, araştırmaya katılmak isteyen ve imzalı Aydınlatılmış Onam Formu (EK-1) alınan 30 sağlıklı bireyden 5 ml'lik periferik kan EDTA'lı tüplere alınarak, RNA elde edilmeye gidildi.

Toplam RNA eldesi için Pure Link™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) kullanıldı. Kit içinde verilen aşağıdaki basamakları içeren protokol kullanıldı.

Kit ile RNA izolasyonu

Periferik Kandan Kit ile RNA İzolasyon Protokolü

Ön hazırlık olarak; her bir örnek için %1'lik 2-Merkaptoetanol (2-ME) (Sigma) içeren 0.2 ml (200 µl) taze Lizis Tamponu hazırlandı.

Bunun için 198 mikrolitre Lizis Tampon üzerine 2 µl 2-ME eklenip, pipetaj veya vorteksle karıştırıldı.

1. Periferik kandan 0.2 ml alınarak RNaz içermeyen 1.5 ml ependorf tüpe konuldu.
2. Üzerine taze hazırlanmış ve 2-ME içeren Lizis Tampondan 0.2 ml eklendi.
3. Kan hücreleri vortekslenerek (Boeco, Germany) lizize uğratıldı ve 13 000 rpm'de oda ısısında 2 dakika santrifüj (Boeco, Germany) edildi.
4. Süpernatant RNaz içermeyen yeni 1.5 ml ependorfa transfer edildi.
5. Üzerine 0.2 ml %100'lük etanol (Merck) eklenip, pipetaj ve vorteksle presipite edildi.
6. Örnek, toplama tüpünde bulunan spin kolon üzerine konuldu ve 13 000 rpm'de oda ısısında 15 saniye santrifüj edildi.
7. Spin kolon yeni toplama tüpüne alındı ve üzerine 700 µl Yıkama Tamponu I eklenerek, 13 000 rpm'de oda ısısında 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpü ve sıvı kısım atıldı. Spin kolon yeni bir toplama tüpüne alındı.
8. Spin kolon üzerine, içinde etanol bulunan Yıkama Tamponu II'den, 500 µl eklendi.
9. 13 000 rpm'de oda ısısında 15 saniye santrifüj edildi. Toplama tüpündeki sıvı kısım dökülüp, kolon tekrar tüpe yerleştirildi.
10. 8. ve 9. basamaklar bir defa daha tekrar edildi.

11. Spin kolonlar, RNA'nın tutunduğu membranın kuruması için 13 000 rpm'de oda ısısında 1 dakika santrifüj edildi.
12. Spin kolonlar saklama tüpüne alınarak, tam merkezine 30 µl RNaz içermeyen su ilave edildi.
13. Kolonlar 1 dakika oda ısısında inkübe edildi.
14. Saklama tüpündeki spin kolonlar, 13 000 rpm'de oda ısısında 2 dakika santrifüj edildi.
15. Pürifiye RNA'ların miktar ve kalite ölçümleri yapıldı. Hemen cDNA eldesine gidilmeyen örnekler kısa süreli -80 °C'de (Bosch) saklandı.

RNA Örneklerinin spektrofotometre ile ölçümü

Elde edilen RNA örneklerinin miktar ve saflığı nanodrop cihazı (Quawell, Q9000, Hong Kong) ile ölçülerek sırasıyla 260 nm ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçümleri yapıldı. Saflık oranı OD 260/OD 280 formülüne göre hesaplandı ve 1.8-2.1 arası olanlar saf kabul edildi. RNA miktarı:

“OD₂₆₀ x Sulandırma katsayısı x 40” formülüne göre hesaplandı.

Toplam RNA ve Hedef mRNA Miktarı

Elde edilen toplam RNA'nın içinde mRNA, tRNA, rRNA, miRNA, siRNA ve lncRNA'lar bulunmaktadır. Normal koşullarda bile toplam RNA'nın %80-85'i rRNA (28S, 18S, 5S), %10-15'i tRNA ve %1-5'i mRNA'dan oluşmaktadır. Elde edilen toplam RNA, agaroz jelde elektroforeze tabi tutulduğunda, toplam RNA'nın %80-85'ini oluşturan rRNA'nın 28S ve 18S kısımlarının iki yoğun bandı görülür. Bu görüntü RNA izolasyonunun olduğunu gösterir, ancak özellikle bekletilmiş ve dondurulmuş kan örneklerinde yeterli mRNA varlığını göstermemektedir.

cDNA Sentezi

cDNA Sentezi 3 aşamalı olarak yürütüldü. Birinci aşamada; 2x RT PCR master miksi hazırlandı. İkinci aşamada; toplam RNA, 2x RT PCR master miksi ile 1x konsantrasyona getirildi. Üçüncü aşamada ise, PCR cihazında revers transkriyon (RT) reaksiyonu gerçekleştirildi.

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific, Lithuania) içeriği ile master miks hazırlandı. Protokole göre her bir örnek için 2 defa hazırlanmak üzere;

10X RT Tamponu	2 μ l
25X dNTP miksi (100 mM)	0.8 μ l
10X RT Random Primerler	2 μ l
RNaz İnhibitörü	1 μ l
10X MultiScribe™ Reverse Transkriptaz	1 μ l
Nükleaz içermeyen steril distile su	3.2 μ l
Toplam	10 μl

Buz üzerindeki ependorfların içerisinde master miks hazırlandı.

Bu karışım ilgili reaksiyon tüplerine dağıtıldı. Bunun için her ilgili örneğe ait toplam RNA'dan 10'ar μ l ilave edildi. Toplamda 20 μ l 1x RNA içeren reaksiyon hazırlanmış oldu. Bir-iki defa hafifçe pipetaj yapıldı. Kısa süreli, birkaç saniye olacak şekilde santrifüj edildi. Tüm örnekler, PCR cihazına yükleninceye kadar buzda bekletildi.

cDNA Sentezi için PCR Koşulları

Buz üzerinde bekletilen örnekler için, programlanan PCR cihazında (ABI System 9700, USA) aşağıdaki koşullarda RT reaksiyonu gerçekleştirildi.

25 °C'de 10 dk,

37 °C'de 120 dk,

85 °C'de 5 dk inkübasyona bırakıldı.

Süre sonunda, örnekler kantitatif real time PCR'da ekspresyon tayini için kısa süreli +4 °C'de uzun süreli -80 °C'de saklandı.

Elde Edilen cDNA'nın Elektroforetik Kontrolü

Hem hasta hem kontrol hem de referans *housekeeping gen GAPDH* cDNA örneklerinden 2'şer µl ve 2 µl 6x yükleme tamponu karıştırılarak, elektroforezde (BioRad Midi Consort, USA) 1xTBE tamponda ve %1'lik agaroz jelde (SeaKem, USA) yürütüldü ve görüntüleme sisteminde (Pop Bio Imaging, England) görüntülendi.

Hasta ve kontrol grubunun örneklerinden cDNA sentezinden sonra TAL1 geni ve referans olarak en sık kullanılan *housekeeping gen GAPDH* (GliserAldehid 3-Fosfat DeHidrojenaz)'ın ekspresyonunun tayini için kullanılan primerler (Sentromer DNA Teknolojileri, Türkiye) aşağıda Tablo 3.1'de verilmiştir. Her bir primer 100 µM/µl konsantrasyonunda distile su ile hazırlandı. Stok ve çalışma primeri olarak bölünüp, kullanılmaya kadar -80 °C'de saklandı.

Tablo 3.1. Ekspresyon tayini için TAL1 ve GAPDH genlerine özgü primer çiftleri

PRİMER ADI	YÖN	PRİMER BAZ DİZİSİ	T _m (°C)
TAL1	F	5'-AGG GCC TGG TTG AAG AAG AT-3'	57.3
TAL1	R	5'-AAG TAA GGG CGA CTG GGT TT-3'	57.3
GAPDH	F	5'-ACG GAT TTG GTC GTA TTG GG-3'	57.3
GAPDH	R	5'-TGA TTT TGG AGG GAT CTC GC-3'	57.3

Ayrıca PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix (Universal 2X master mix for real-time PCR) ticari kiti (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) ile TAL1 ve GAPDH genlerine ait PCR koşulları aşağıdaki içerikte hazırlandı.

Kitin optimize olarak önerdiği protokol çerçevesinde toplam reaksiyon hacmi 20 µl olarak alındı. Buna göre her bir örnek için;

PowerUP™ SYBR™ Green Master Mix (2X) solüsyonu	10.0 µl,
F (ileri primer) (100 µM/µl)	0.2 µl,
R (geri primer) (100 µM/µl)	0.2 µl,
Kalıp olarak kullanılacak 20 µl'lik cDNA (1-10 ng)	2.0 µl,
dH ₂ O (Deiyonize su)	7.6 µl,
Toplam hacim:	20.0 µl

Örnekler pipetajla yavaşça karıştırıldı. Kısaca santrifüj edildi. Hava kabarcıkları giderildikten sonra 10'ar µl'lik her bir örnek bir kuyucuğa yüklenerek, optik plate transfer edildi. Optik plate yapışkan optik film ile kapatıldı. Plate kasete alınarak, StepOne Plus (Thermo Fisher Scientific, USA) Eş zamanlı (Real-Time) PCR cihazında reaksiyonlar gerçekleştirildi.

Kantitatif Eş zamanlı (Real-Time) PCR koşulları aşağıda verilmektedir:

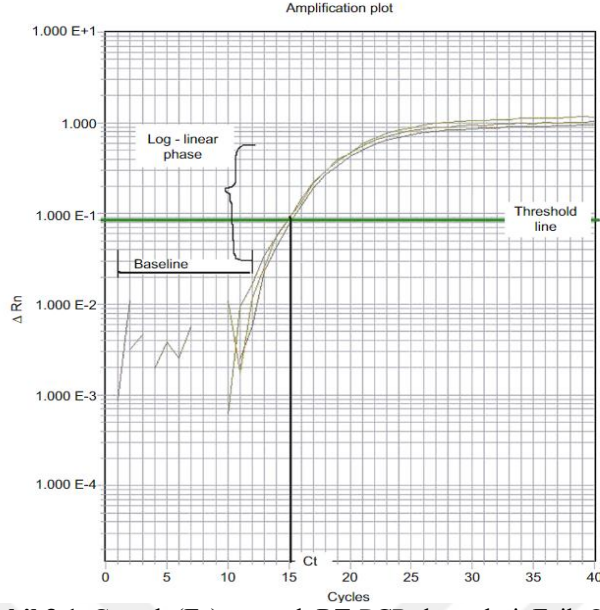
1. Basamak: 95 °C’de 10 dk başlangıç denatürasyonunu takiben
2. Basamak: 95 °C’de 15 sn,
60 °C’de 1 dk 40 döngü olacak şekilde
3. Basamak: +4 °C’de sonsuz saklamada eş zamanlı (Real Time) PCR kuruldu.

Çalışma bittikten sonra veriler kaydedildi ve RT-PCR veri toplama bölümünden Threshold Cycle (Eşik döngü; C_t) hesaplandı. Eşik döngüsü, C_t , sinyalin eşiği ilk geçtiği nokta olarak alındı ve bu tüm örnekler için hesaplandı. Baseline (Taban çizgisi) ise RT-PCR’ın başlangıç döngülerindeki floresan sinyal seviyesi olarak alındı. Çünkü Real-Time PCR’da pozitif reaksiyon, floresan sinyallerinin birikimi ile saptanır. C_t değeri ile hedef nükleik asit miktarı arasında ters orantı vardır. Düşük C_t değerleri, örnekte daha yüksek miktardaki hedef nükleik asit varlığını ifade eder (Heid ve ark., 1996).

Karşılaştırmalı C_t ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) Yöntemi

Karşılaştırmalı C_t yöntemi, gen ifadesindeki değişiklikleri hedef gen ve referans gen (internal gen) arasındaki göreceli kat farkı olarak hesaplayan matematiksel bir modeldir. $\Delta\Delta C_t$ (Delta – Delta C_t) yöntemi ile gösterilmektedir. ΔC_t (hedef gen) = C_t (hedef gen) – C_t (referans gen) olarak hesaplandı. Buna göre, $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$ (hedef gen) – ΔC_t (referans) şeklinde hesaplanırken, “Görelî Miktar (relative quantity)” = $2^{-\Delta\Delta C_t}$ formülü ile hesaplandı.

HbF yüksekliği ile ilişkisini araştırdığımız TAL1 geni ekspresyon düzeyinin belirlenmesi için; HbF’i yüksek hasta örneklerinin C_t değerleri; kontrol grubu olarak alınan hem beta-talasemi majör olup HbF’i normal sınırlarda olan 2 hasta ile hemoglobinopati ilişkisiz sağlıklı ve normal olan kontrol grubunun C_t değerleri, aynı zamanda hasta örnekleri ile referans gen GAPDH’ın C_t değerleri kıyaslanıp, ekspresyon düzeyleri belirlendi.



Şekil 3.1. Gerçek (Eş) zamanlı RT-PCR döngüleri, Eşik Çizgisi, Taban çizgisi, Linear faz ve Ct değeri (Jia, 2012).

Tez projesinin başlamasından bugüne kadar yaşanan program değişikliği, satın alma sürecinin uzaması, sarf malzemelerinin aralıklı ve ayrı ayrı teslimi, çoğu hasta ve kontrol örneklerinin alınıp taze olarak çalışılmaması, tez projesi BAP süresinin ve öğrencilerin Yüksek Lisans sürelerinin maksimum kullanılması, COVID-19 pandemisinden dolayı örnek alma tekrarlarının elde edilemeyeşi ve kısıtlı deney malzemeleri nedeniyle, elde edilen cDNA örneklerinin bir kısmı, son basamağı olan ekspresyon profili deneyinin bir kısmının, maliyetini kendimiz karşılamak üzere, yerel firma aracılığı ile yurtdışından (Centromere GmbH, Germany) yapılması yoluna gidildi. Tüm veriler değerlendirilerek sonuçlar elde edildi.

4. BULGULAR

Hastalara Ait Demografik, Hematolojik ve Genetik Bulgular

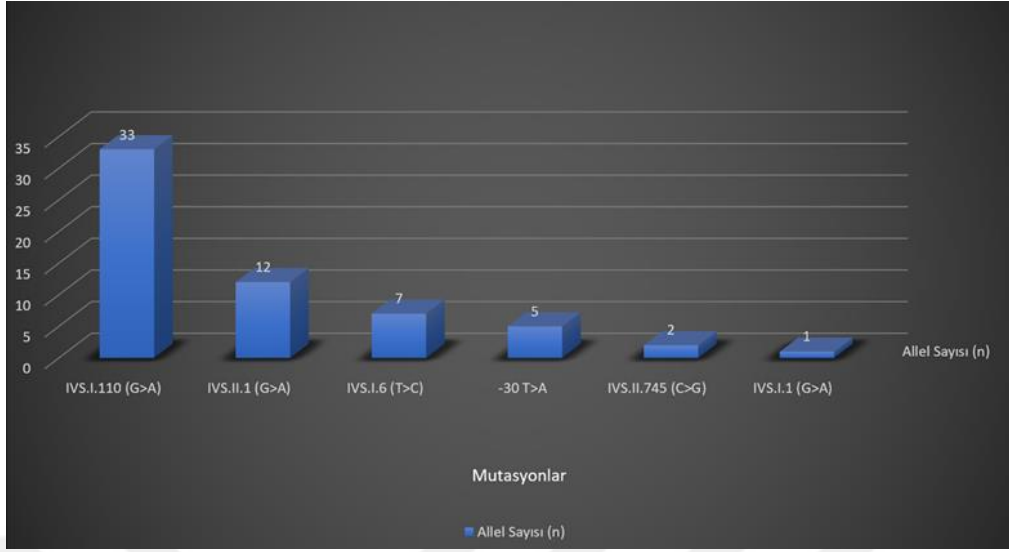
Peryodik olarak transfüzyon alan, HbF değerleri yüksek 30 beta talasemi majör hastasına ait demografik bulgular Tablo 4.1’de verilmiştir. Bu verilere göre 30 hastanın yaş ortalaması 27,7 olarak hesaplandı. Hastalarımızın cinsiyet dağılımlarına bakıldığında 12 tanesinin erkek (%40), 18 tanesi kadın (%60) olduğu ve bütün hastalarımızın ortalama hemoglobin değeri ise 8,63 olduğu görüldü. Tüm hastalar dahil edildiğinde ortalama HbF değeri 10,23 olarak bulundu. En küçük HbF değeri %2,3 ve en yüksek HbF değerinin ise %61,4 olduğu görüldü. Beta talasemi majör olan hastalarımızın %80’inin splenektomize olduğu görüldü. Splenektomize olmayan hastalarının %33’ü IVS.II.1 (G>A)/ IVS.II.1 (G>A) homozigot genotipinde iken, %33’ü IVS.II.1 (G>A) için bileşik heterozigot IVS.II.1 (G>A) / IVS.I.110 (G>A) ve - 30 (T>A)/IVS.II.1 (G>A) genotipindeydi. Splenektomize olmayan bir hasta hariç (No.27), diğer IVS.I.110 (G>A) için homozigot genotipindeki hastaların tümünün splenektomize durumda oldukları görüldü (Tablo 4.1).

Çalışılan 30 beta talasemi majör hastada, beta talasemiye neden olan 6 farklı beta-globin geni mutasyonu gözlemlendi. En sık görülen allelin %55 sıklıkla IVS.I.110 (G>A) alleli olduğu bulundu. İkinci sırada ise %20 sıklıkla IVS.II.1 (G>A) alleli yer aldı (Şekil 4.1). Hastalarda 11 farklı genotip bulundu. Genotipler arasında 13 hasta IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A) homozigot sahipken, IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A) birleşik heterozigot genotipi 4 hastada görüldü. IVS.II.1 (G>A)/ IVS.II.1 (G>A) homozigot genotipi 3, ayrıca IVS.I.6 (T>C)/ IVS.I.6 (T>C) homozigot genotipi de 3 hastada görülürken, diğer genotipler birer hastada tespit edildi (Şekil 4.2).

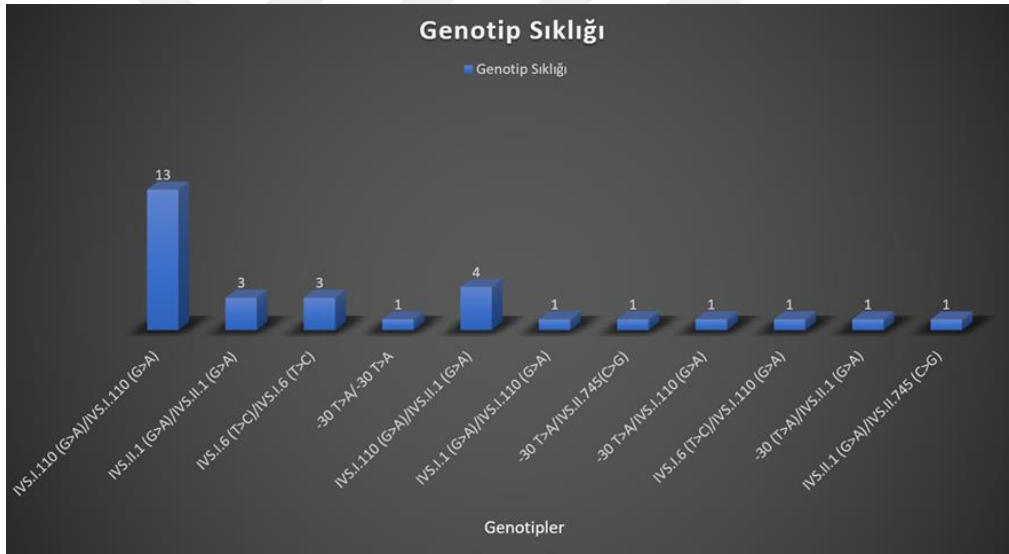
Tablo 4.1. Çalışılan 30 hastanın demografik ve hematolojik verileri.

NO	KOD	Y-C	BETA TALASEMI MUTASYONU	HBF	HGB	MCV	MCH	MCHC	RDW	HBA1	HBA2	SP	BCL11A C>T	XMN1 C>T	SALL2 E2 c.2236 C>G
1	1	35-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	25,20	9,7	80	25,1	31,3	24	61,30	3,30	E			CG
2	2	23-E	IVS.I.I(G>A)/IVS.I.110 (G>A)	16,7	8,9	78,3	25,6	32,7	19,4	70,8	3,1	H	CC	CC	CG
3	3	26-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	2,6	9,3	87,8	28,4	32,3	14,4	80,3	2,9	E	CT	CC	CG
4	4	23-K	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>A)	7,6	8,5	82,4	27,5	33,4	16,7	78,2	2,5	H	TT	TT	GG
5	5	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	11,1	8,3	84,2	26,9	31,9	15,9	74,4	2,8	E			CG
6	6	27-E	(-30T>A/IVS.II.745 (C>G))	6,5	8,6	82	27,2	33,2	16,1	76,7	2,8	E	CT	CC	GG
7	7	30-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	17,6	8,6	83,7	27	32,2	18,5	67,9	2,2	E	CT	CC	GG
8	8	21-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	5,6	7,9	51,8	17,3	33,4	29,8	76,4	7,7	E			CG
9	9	28-E	(-30T>A/IVS.I.110 (G>A))	39	9,8	81,1	24,9	30,7	25,6	50,1	4,1	E	CT	CC	GG
10	10	25-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.110 (G>A)	4,7	8,6	89,3	26,8	30,1	17,1	78,7	3,3	E	CT	CC	GG
11	11	46-K	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>A)	9,70	8,9	83,9	27,9	33,2	15,9	76,10	2,60	E			CG
12	12	63-K	(-30T>A/-30T>A)	30,2	8,4	76,7	22,7	29,5	28,6	57,4	4,6	E	TT	CC	CG
13	13	30-K	(-30T>A/IVS.II.1 (G>A))	18,7	8,5	77,3	25,4	32,9	19,8	68,6	3,6	H	TT	CT	GG
14	14	24-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	4,6	7,4	84,4	27,4	32,5	17,5	72,4	2,9	E			GG
15	15	21-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	2,3	9,2	77,6	26,5	34,2	15,2	81,6	2,6	E			
16	16	38-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	5,9	9,2	78,6	24,3	30,9	27,2	77,9	3,9	E	CT	CC	CC
17	17	19-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	7,5	8,9	71,1	23,8	33,5	34	77,8	3,7	E			
18	18	27-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	8,6	10	79,4	26,6	33,5	18	78,7	2,5	E			
19	19	23-K	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>A)	7,6	8,5	82,4	27,5	33,4	16,7	78,2	2,5	H	TT	TT	GG
20	20	26-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	8,6	10	79,4	26,6	33,5	18	78,7	2,5	E			
21	21	25-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	61,4	8	74,7	22	29,5	31	27	7,9	E	CT	CC	GG
22	22	18-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,5	9,1	83,5	27,6	33	18,5	76,1	2,7	E			
23	23	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	7	8,8	71,8	22	30,6	36	73,6	5,6	E	TT	CC	CG
24	24	23-K	IVS.II.1 (G>A)/IVS.II.745 (C>G)	3,5	10,2	82,7	28,1	34	14,3	81,4	2,4	E			CG
25	25	18-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	3,6	9,9	79,4	27,6	34,7	15,5	80,8	2,6	E			
26	26	32-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	25	9,2	75,4	25,5	33,8	27,5	62,8	3	E	CT	CC	CC
27	27	31-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	4,7	9,6	81,1	26,9	33,2	16,6	78,7	2,7	H			GG
28	28	21-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	4,9	8,8	83	27,5	33,2	14,6	79	2,9	H	TT	TT	
29	29	26-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	6,00	10,1	84,2	27,7	32,9	17,4	78,50	2,70	E			GG
30	30	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	5,1	8,1	84,8	27,1	31,9	14,8	79,5	2,9	E	CT	CC	CG

KOD: Hasta kodu, Y-C: Yaş- Cinsiyet, E: Erkek K: Kadın, HGB: Hemoglobün, SP: Splenektomi olup-olmadığı, E (Evet): Splenektomi yapılmış H (Hayır): Splenektomi yapılmamış olduğunu göstermektedir. Hemoglobün (HGB) için normal değer aralığı Antalya Adem Tolunay Kan Hastalıkları Merkezi laboratuvarlarındaki referans aralıkları; 13.6-17.2 g/dl, MCV için 80.7-95.5 fL, MCH:27.2-33.5 pg, MCHC:32.7-33.5 g/dl, RDW için ise 11.6-14.6 (%) olarak verilmektedir. Yeşil satırda bulunan hastalar, aynı zamanda yapılan diğer bir tez çalışması (Billor, 2021) ile ortak hastalar olduğunu göstermektedir.

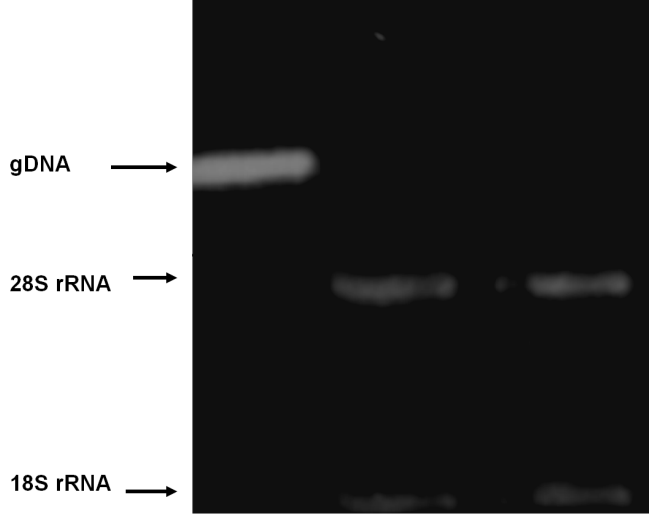


Şekil 4.1. Çalışılan 30 hastadaki mutant beta-globin allellerinin dağılımı.



Şekil 4.2. Çalışılan 30 Beta-Talasemi Majör hastasının genotip dağılımı

Hastalardan elde edilen RNA örneklerinin nicelik ve nitelik ölçümleri ve değerlendirmelerini takiben, %3'lük agaroz jel elektroforezinde görüntüledi. 28S rRNA ve 18S rRNA bantlarının varlığı ile izolasyonun gerçekleştiği teyit edildi (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. İzole edilen RNA'nın elektroforezde kontrolü: gDNA'ya karşı yürütülen toplam RNA'daki 28S rRNA ve 18S rRNA'nın görüntüsü (Smear görüntüsünün baskısından kurtulması için ışık kısılarak fotoğraflandı).

TAL1 geni ekspresyon seviyesinin belirlenmesinde kullanılan cDNA hedef bölgesinin primer dizileri ve yerleşimleri ile 86 bp amplicon büyüklüğünün yeri GeneCards veri tabanından elde edilerek ortaya çıkarıldı (Şekil 4.4)

```

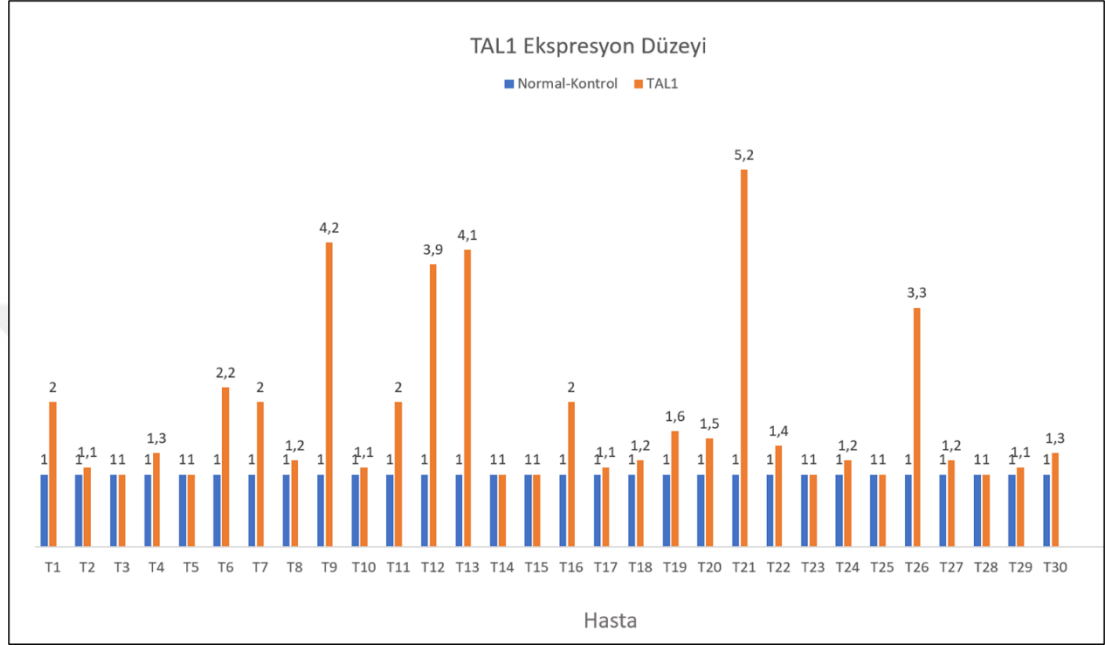
12721 atggtgggct tcagggcagg tggggtgaga attgggaggc tctgaagcaa ggcgggtggac
12781 ttgaactttc ctggatgtct gaactttggg aagcctttac tgaccctggg gctggctttt
12841 ctgtttcctg taccagttagg agatcagaaa aatggagcaa agtggtaggt actttttgtg
12901 aagacggcac ggtcttcctt cttccctcag tcccaaatcc ttcccaagta agaggctgga
12961 gttgtcactg cttttggcct ggagtttggg atccctgtct ttccctaagac ctggggttgt
13021 cagctctcat ctgaggcac cagcagtctc tgccttgccct ttagccctcc ccaagctggc
13081 tggggtggcc tgtgtggcca cttctgtcca tatttatagg tacccaatag ctgcccattt
13141 cgtgagcccc atcttcaccc aggcctatgt tgatccatcc agcttgccag atgctgcaga
13201 gtcacaagcc tcgaggtgcc ttcttcaggg cctgggtgaa gaagatgatc agtggacagt
13261 ctgctctaga tgagctgggc cggagggcca ggaaccacag tcgcccttac tcttgccct
13321 ggggatcaaa gttctgcttt ctccccaatg agacttgccct tcccaagcct gtggctgtgg
13381 agacaatgtc tgcagccctg agaaaaccct gtcgggcttt gtgtgaaggc agagaaaggg
13441 acaatgatag tagagtgata tggagcaaga gatattttgg gcatgtgggc ttcaactcct
13501 cgacatcact gttcatgctg gcgagtgaat gccagtgtgc tgatgggogt acgctgggtc
13561 tgagtagatg cgcagcccca tctgtgcatt ctccctggatg cttagaggga tttctttgct
13621 ataatatc ttttactaa tgaatcagtc tatattccca attgagcaca aagcctatcc

```

Şekil 4.4. TAL1 geninin referans dizisi ve ekspresyon analizi için kullanılan primerlerin yerleşimleri (GeneCards, <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TAL1>, Erişim tarihi: 01.09.2020).

HbF'i yüksek 30 beta-talasemi majör hastasının TAL1 ekspresyon düzeylerinin belirlenmesi; normalizasyonu takiben, hasta, normal-kontrol ve referans GAPDH için Ct değerleri arasındaki farkların hesaplanması ile elde edilen değerler azalış, normal ve katları şeklinde artış olarak hesaplandı. 30 hasta içinde sadece bir hastada (T8) ekspresyon değeri;1.0 olan normal kontrole karşılık 0,9 olarak hesaplandı. Bu farkın hasta RNA kalitesinden kaynaklandığı sonucuna varıldı. Bunun dışında ekspresyon düzeyinde bir azalış saptanmadı.

30 hastanın 23'ünde (%76,6), TAL1 ekspresyonunun 1.1 ila 5,2 kat arasında değişen artış olduğu, buna karşın 7 hastada (%23,4) ise normal seviyede bulunduğu gösterildi. Ekspresyon artışı görülen 23 hastanın 13'ünde 1.1 ila 1,6 kat arasında artış olduğu görülürken, geriye kalan 10 hastanın TAL1 ekspresyon seviyeleri 2 katın üzerinde olduğu bulundu (Şekil 4.5).



Şekil 4.5. Çalışılan 30 hastanın normal-kontrolle karşılık hesaplanan TAL1 ekspresyon düzeyleri

Çalışılan 30 hastanın HbF düzeyleri küçükten büyüğe doğru sıralanarak, 10'arlı 3 gruba ayrıldı. Gruplardan 1.Grup en düşük (HbF=4,6), 2.Grup orta (HbF=7,48) ve 3.Grup en yüksek HbF=25,46 ortalamasına sahipti (Tablo 4.2). TAL1 ekspresyon düzeyi 2 katın üzerinde olan 10 hastadan 8'nin HbF'i en yüksek ortalamaya sahip olan 3.Grupta yer aldıkları görüldü. 2 katın üzerinde ekspresyon gösteren 2 hasta ise (T6 ve T16) 2.Grupta yer aldı.

Tablo 4.2'de görüldüğü üzere, 3.Grupta yer alan 10 kişinin HbF ortalaması 25,46'dır. Bu gruptakilerden 8'inde TAL1 ekspresyonu 2 kat ve üzeri olduğu bulundu.

Tablo 4.2. Çalışılan 30 hastanın HbF değerlerinin büyüklüklerine göre 10'arlı 3 gruba ayrılması ve grup HbF ortalamaları

1.Grup	2.Grup	3.Grup
2,6	8,6	16,7
4,7	7,5	25,20
4,6	6,00	11,1
2,3	9,5	17,6
5,6	7,6	39
3,5	7	9,70
3,6	6,5	30,2
4,7	8,6	18,7
4,9	7,6	61,4
5,1	5,9	25
41,6	74,8	254,6
4,16	7,48	25,46

TAL1 ekspresyon düzeyi 2 katın üzerinde bulunan ve en yüksek HbF ortalamasına sahip 3.Grup hastaların genotiplerine bakıldığında, 4 hastanın IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A) homozigot olduğu, 3 hastanın IVS.I.110 (G>A)'un üç farklı mutasyon ile birleşik heterozigot [IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1(G>A), IVS.I.1(G>A)/IVS.I.110 (G>A) ve – 30 (T>A)/IVS.I.110 (G>A)] olduğu bulundu. Geriye kalan 3 hastadan birin – 30 (T>A)/ – 30 (T>A) homozigot, birinin – 30 (T>A)/IVS.II.1(G>A) birleşik heterozigot ve birinin ise IVS.II.1(G>A)/ IVS.II.1(G>A) homozigot genotipte olduğu görüldü. Çalışılan hastalardan önceki projelerimizle ortak olan BCL11A C>T, Xmn1 C>T (Arıkan 2016) ve SALL2 Ekzon-2 c.2236 C>G varyantlarının genotipleri birlikte değerlendirildi. Ayrıca, mavi satırda yer alan ve diğer bir projemizde A- ve G-gamma promotor bölgeleri çalışılan ortak hastalar olup, henüz verileri yer almamaktadır (Tablo 4.3).

Tablo 4.3. Çalışılan 30 hastanın demografik, hematolojik ve genetik verilerinin birlikteliği ve çalışılan hastalardan, diğer iki ayrı tez projesi (Arıkan, 2016; Karaman, 2017) ile ortak olanların, HbF düzeyleri ile BCL11A rs11886868 C>T, Xmn1 rs7482144 C>T ve SALL2 Ex-2 c.2236 C>G varyantlarının birlikteliği. Mavi satırdaki hastalar ise A- ve G-gamma promotor bölgeleri çalışılan ortak hastalar.

NO	KOD	Y-C	BETA TALASEMİ MUTASYONU	HbF	HGB	MCV	MCH	MCHC	RDW	HBA1	HBA2	SP	BCL11A C>T	XMN1 C>T	SALL2 E2 c.2236 C>G
1	1	35-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	25,20	9,7	80	25,1	31,3	24	61,30	3,30	E			CG
2	2	23-E	IVS.I.1(G>A)/IVS.I.110 (G>A)	16,7	8,9	78,3	25,6	32,7	19,4	70,8	3,1	H	CC	CC	CG
3	3	26-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	2,6	9,3	87,8	28,4	32,3	14,4	80,3	2,9	E	CT	CC	CG
4	4	23-K	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>A)	7,6	8,5	82,4	27,5	33,4	16,7	78,2	2,5	H	TT	TT	GG
5	5	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	11,1	8,3	84,2	26,9	31,9	15,9	74,4	2,8	E			CG
6	6	27-E	(-30T>A)/IVS.II.745 (C>G)	6,5	8,6	82	27,2	33,2	16,1	76,7	2,8	E	CT	CC	GG
7	7	30-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	17,6	8,6	83,7	27	32,2	18,5	67,9	2,2	E	CT	CC	GG
8	8	21-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	5,6	7,9	51,8	17,3	33,4	29,8	76,4	7,7	E			CG
9	9	28-E	(-30T>A)/IVS.I.110 (G>A)	39	9,8	81,1	24,9	30,7	25,6	50,1	4,1	E	CT	CC	GG
10	10	25-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.110 (G>A)	4,7	8,6	89,3	26,8	30,1	17,1	78,7	3,3	E	CT	CC	GG
11	11	46-K	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>A)	9,70	8,9	83,9	27,9	33,2	15,9	76,10	2,60	E			CG
12	12	63-K	(-30T>A/-30T>A)	30,2	8,4	76,7	22,7	29,5	28,6	57,4	4,6	E	TT	CC	CG
13	13	30-K	(-30T>A)/IVS.II.1 (G>A)	18,7	8,5	77,3	25,4	32,9	19,8	68,6	3,6	H	TT	CT	GG
14	14	24-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	4,6	7,4	84,4	27,4	32,5	17,5	72,4	2,9	E			GG
15	15	21-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	2,3	9,2	77,6	26,5	34,2	15,2	81,6	2,6	E			GG
16	16	38-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	5,9	9,2	78,6	24,3	30,9	27,2	77,9	3,9	E	CT	CC	CC
17	17	19-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	7,5	8,9	71,1	23,8	33,5	34	77,8	3,7	E			
18	18	27-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	8,6	10	79,4	26,6	33,5	18	78,7	2,5	E			
19	19	23-K	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>A)	7,6	8,5	82,4	27,5	33,4	16,7	78,2	2,5	H	TT	TT	GG
20	20	26-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	8,6	10	79,4	26,6	33,5	18	78,7	2,5	E			
21	21	25-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	61,4	8	74,7	22	29,5	31	27	7,9	E	CT	CC	GG
22	22	18-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,5	9,1	83,5	27,6	33	18,5	76,1	2,7	E			
23	23	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	7	8,8	71,8	22	30,6	36	73,6	5,6	E	TT	CC	CG
24	24	23-K	IVS.II.1 (G>A)/IVS.II.745 (C>G)	3,5	10,2	82,7	28,1	34	14,3	81,4	2,4	E			CG
25	25	18-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	3,6	9,9	79,4	27,6	34,7	15,5	80,8	2,6	E			
26	26	32-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	25	9,2	75,4	25,5	33,8	27,5	62,8	3	E	CT	CC	CC
27	27	31-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	4,7	9,6	81,1	26,9	33,2	16,6	78,7	2,7	H			GG
28	28	21-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	4,9	8,8	83	27,5	33,2	14,6	79	2,9	H	TT	TT	
29	29	26-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	6,00	10,1	84,2	27,7	32,9	17,4	78,50	2,70	E			GG
30	30	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	5,1	8,1	84,8	27,1	31,9	14,8	79,5	2,9	E	CT	CC	CG

HbF'i yüksek olan 30 hastanın 23'ünde TAL1 ekspresyonu sayısal olarak artış göstermekte, en yüksek HbF artışı gösteren 3.Grup 10 hastadan 8'inde BCL11A BCL11A rs11886868 C>T mutasyonunun varlığı daha önce gösterilmişti. Bu 8 hastanın Xmn1 rs7482144 C>T değişimi için bir hasta hariç (T13), tümü normal genotipe sahipti. TAL1 ekspresyonunun 2 katın üzerinde olup, en yüksek HbF ortalamasına sahip 10 hastanın tümünde SALL2 Ex-2 c.2236 C>G varyantı çalışılmış olup, 5 hastada homozigot mutant (GG) genotipi gözlenirken, 3 hastada heterozigot (CG) ve 2 hastada ise normal genotip(CC) gözlenmişti. Ayrıca bu 10 hastanın ortak olan 5 hastasında gamma globin geni promotor mutasyonlarının taraması normal bulunmuştur (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. HbF değeri yüksek beta-talasemi majörlü ve TAL1 ekspresyonu 2 katın üzerinde olan 10 hastanın BCL11A rs11886868 C>T, Xmn1 rs7482144 C>T ve SALL2 Ex-2 c.2236 C>G varyantları ile ilişkisi. *BCL11A rs11886868 C>T ve Xmn1 rs7482144 C>T, **SALL2 Ex-2 c.2236 C>G varyantları ortak hastalarda tespit edilmiş olup, diğer iki tez projemizde çalışılmıştır *(Arıkan, 2016), *(Karaman, 2017) Gamma-Globin promotor mutasyonlarının incelendiği aynı hastalar mavi dolgu ile gösterilmektedir (Billor, 2021).

Hasta No	HbF (%)	TAL1 Ekspresyonu (Normalin Katı)	Gamma Globin Promotor Mutasyonu	*BCL11A rs11886868 C>T	*Xmn1 rs7482144 C>T	**SALL2 Ex-2 c.2236 C>G
T1	25,2	2	-	-	-	CG
T6	6,5	2,2		CT	CC	GG
T7	17,6	2		CT	CC	GG
T9	39,0	4,2		CT	CC	GG
T11	9,7	2	-	-	-	CG
T12	30,2	3,9		TT	CC	CG
T13	18,7	4,1		TT	CT	GG
T16	5,9	2	-	CT	CC	CC
T21	61,4	5,2	-	CT	CC	GG
T26	9,2	3,3	-	CT	CC	CC

5. TARTIŞMA

Hemoglobinopatilerden biri olan beta-talasemi, otozomal resesif kalıtılan, genetik ve klinik heterojenite gösteren en yaygın tek gen hastalığıdır. Beta talasemi içinde ise en ağır klinik tabloya sahip olan hasta grubu beta talasemi majörlü olanlardır. Beta-talasemi majörlü hastalar kan transfüzyonuna ihtiyaç duyan grup olduğundan, hastaların transfüzyona ihtiyaç duymayacak hale gelmesi, transfüzyon sayısının azaltılması, transfüzyona bağlı sekonder klinik yükün hafifletilmesi önemli çalışma ve araştırma alanları yaratmıştır.

Özellikle beta-talasemi majörlü hastalardaki genetik ve klinik heterojenite içinde yer alan ve klinik tabloyu hafifleten bulgular dikkat çekmektedir. Bunların içinde en dikkat çeken parametre ise HbF yüksekliği ve hafif klinik tablo arasındaki ilişkidir. İnsanın embriyonik gelişim döneminde eksprese olan ve HbF yapısında yer alan gamma globin genleri ve bunların prenatal ve postnatal ekspresyonunu sağlayan genetik ve epigenetik mekanizmalar birincil hedef olarak seçilmiştir.

Bu hedef seçiminde temel kriter HbF indüksiyonu için gamma globin promotorunu aktif hale getirerek, mutant beta-globin zincirine oranla, gamma globin zincir sentezini artırmak ve HbF seviyesini yükseltmektir. Beta grubu globin genlerinin gelişimsel döneme bağlı ardışık devreye girmesinde beta control bölgesi LCR ve her bir globin geni promotor bölgesi arasındaki pozitif veya negative yönde regülasyonu sağlayan çok sayıda transkripsiyon faktörü ve aksesuar protein bulunmaktadır.

Biz de HbF düzeyi yüksek beta talasemi majörlü hastalarda, A-gamma ve G-gamma globin promotorları ve LCR lokusu arasında kilit bir rol oynayan ve gamma globin ekspresyonunu artıran TAL1 transkripsiyon faktörünün ekspresyon düzeyi ile yüksek HbF seviyesi arasındaki ilişkiyi araştırdık.

Çalışılan 30 hastaya ait demografik, hematolojik, daha önceki proje çalışmalarımızda ortak olan hastalara ait genetik veriler ile birlikte, TAL1 ekspresyon düzeyleri Tablo 5.1'de kümülatif olarak verilmektedir.

Beta-talasemiye ilişkin yapılan mutasyon taramalarında, dünyada olduğu gibi ülkemizde ve Antalya’da en sık görülen beta-globin geni mutasyonunun IVS.I.110 (G>A) olduğu bildirilmiştir (Keser ve ark., 2010). Bizim bu çalışmamızda da örnek sayısının az olmasına karşın yine en sık olarak IVS.I.110 (G>A) mutasyonu tespit edildi. Bazı toplumlarda diğer mutasyon öne çıksa da, dünyadaki yaygınlığından dolayı IVS.I.110 (G>A) mutasyonunun beta-talasemide kurucu mutasyon olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda, HbF’i yüksek 30 beta talasemi majör hastasında, beta talasemiye neden olan 6 farklı beta-globin geni mutasyonu gözlemlendi. En sık görülen allelin %55 sıklıkla IVS.I.110 (G>A) alleli olduğu bulundu. İkinci sırada ise %20 sıklıkla IVS.II.1 (G>A) alleli yer aldı (Şekil 4.1). Hastalarda 11 farklı genotip bulundu. Genotipler arasında 13 hasta IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A) homozigot genotipe sahipken, IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A) birleşik heterozigot genotipi 4 hastada görüldü. IVS.II.1 (G>A)/ IVS.II.1 (G>A) homozigot genotipi 3, ayrıca IVS.I.6 (T>C)/ IVS.I.6 (T>C) homozigot genotipi de 3 hastada görülürken, diğer genotipler birer hastada tespit edildi. Bu mutasyonların dağılımının, daha önce Antalya’da yapılan çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir (Keser ve ark., 2004).

Projemizin temel hedefi olan transkripsiyon faktörü TAL1 ise, hematopoezin ana regülatörlerinden biri olup, DNA’ya regülatör bölgelerinden bağlanan, E-box dizisi (CANNTG) ile etkileşime giren, GATA, ETS, RUNX gibi faktörlere bağlanmayı sağlayan bHLH (basicHelix-Loop-Helix) domaini içermektedir. Pediatrik lenfositik lökemiaların patogenezinde, pediatrik T-ALL’nin yaklaşık %3’ünde görülen t(1;14) (p32;q11) translokasyonla ilgili gündeme gelmiştir. Bu translokasyonla TAL1’in enhancer bölgesinin değiştiği ve anormal ekspresyonuna yol açtığı bildirilmiştir (Choi, 2014).

TAL1 gen ekspresyonunun inhibisyonunun, erken embriyonik evrede, vitellüs kesesinde hematopoezin tamamen durmasıyla sonuçlandığı çalışmalarda gösterilmiştir (Robb ve ark., 1995). Erişkinlikte ise TAL1'in maksimum ekspresyonu, pluripotent hematopoietik kök hücreleri, multipotent myeloid ve lenfoid progenitörleri, eritroid ve megakaryositik hücrelerinin varlığını işaret etmektedir. TAL1, hemoglobinin gelişimsel süreç boyunca sentezlenmesinde β -globin/ γ -globin seçiminde γ -globin'den yana kromatin katlanmada büyük rol oynamaktadır (Grieco ve ark., 2015; Vagapova ve ark., 2018; Wienert ve ark., 2015; Yun ve ark., 2014).

TAL1 geni, GATA1'in BCL11A'ya bağlanmasından, β -LCR'nin β -benzeri genlerin promotörlerine bağlanmasından, KLF1'in aktivasyonundan, GATA1'in aktivasyonuna kadar tüm süreçlerde kilit protein rolü üstlenen TAL1 proteinini kodlayan gen olarak önem arz etmektedir (Abi Saad ve ark., 2014).

Yapılan literatür taramasında, hematopoeziste ve erken embriyonal gelişimsel basamaklarında hemoglobinin ve HbF'in şekillenmesinde işe karışan TAL1 transkripsiyon faktörü ekspresyon düzeyinin, beta-talasemi majörlü hastalardaki HbF yüksekliği ile ilişkisini ortaya koyan bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR yöntemiyle, TAL1 ekspresyonu çalışılan 30 hastanın 23'ünde (%76,6), TAL1 ekspresyonun 1.1 ila 5,2 kat arasında değişen artış olduğu görülmüştür. Bu bize genel olarak TAL1 ekspresyonunun normal kontrole göre, HbF yüksekliği ile paralel artış gösterdiğini ifade etmektedir. Bu verinin tek başına literatüre katkı bakımından kıymetli olduğunu düşünmekteyiz. Buna karşın 7 hastada (%23,4) ise TAL1 ekspresyonu normal seviyede bulunmuştur. Bu 7 hastanın hepsinde beta-globin gen mutasyonlarının IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A) homozigot genotipinde olması dikkat çekmektedir.

Fetal hemoglobin ekspresyonu en yüksek seçilen 10 hasta içinde 4 vakada 1'i homozigot 2'si heterozigot -30 (T>A) mutasyonunun varlığı dikkat çekmektedir. -30 (T>A) mutasyonu bir promotör mutasyonu olup hem TAL1 ekspresyon hem de HbF seviyelerinde belirgin artış görülen vakalarda mevcut olması promotör mutasyonu ile TAL1 arasındaki ilişkiye dikkat çekmektedir.

Ekspresyon artışı görülen 23 hastanın 13'ünde 1.1 ila 1,6 kat arasında artış olduğu görülürken, geriye kalan 10 hastanın TAL1 ekspresyon seviyeleri 2 katın üzerinde olduğu bulundu (Şekil 4.6). Buradan yola çıkıldığında; deney grubunda çalışılan 30 hastanın HbF düzeyleri küçükten büyüğe doğru sıralanarak, 10'arlı 3 gruba ayrıldı. Bunda amaç rastgele listelenmiş hastaların çalışılması sonucu, sadece HbF yüksekliği ile TAL1 ekspresyon düzeyleri arasında bir örtüşmenin olup olmadığını ortaya koymaktı.

Grup oluşturmasını takiben, ortalama hesapları yapıldığında; gruplardan 1.Grup en düşük (HbF=4,6), 2.Grup orta (HbF=7,48) ve 3.Grubun ise en yüksek HbF=25,46 ortalamasına sahip olduğu görüldü (Tablo 4.2). Ancak tablo detaylı incelendiğinde, burada dikkati çeken bulgunun, TAL1 ekspresyon düzeyi 2 katın üzerinde olan 10 hastadan 8'nin HbF'i en yüksek ortalamaya sahip olan 3.Grupta yer almasıydı. 2 katın üzerinde ekspresyon gösteren 2 hasta ise (T6 ve T16) 2.Grupta, yani ortalaması ikinci en yüksek grupta yer aldığı görüldü. Bu veriler bize, 30 hastanın 23'ünde, normal-kontrole karşılık, TAL1 ekspresyonu ile HbF arasında bir ilişkinin olduğunu ortaya koysa da 2 katın üzerindeki TAL1 ekspresyonun en yüksek HbF ortalamasının olduğu 3.Grupta yer alması, TAL1 ekspresyonu ile HbF yüksekliği arasında sıkı bir ilişkinin olduğunu göstermektedir.

TAL1 ekspresyonu 2 katın üstünde olup, 2.Grupta yer alan iki hastanın (T6 ve T16) diğer genetik parametrelerine bakıldığında, T6 nolu hastanın BCL11A'nın CT heterozigot ve SALL2'nin GG homozigot mutant genotipte olması HbF yüksekliğini indüklerken, 3.Grup ortalamasına ulaşamamasında ve TAL1 ekspresyonunun artmasında, TAL1 ilişkili diğer regülatör proteinlerin rol oynadığı düşünülmektedir. Çünkü T16 nolu hastanın genetik parametrelerinde sadece BCL11A'nın CT heterozigot, SALL2'nin CC normal genotipte olduğu görülmektedir (Tablo 5.1).

Tablo 5.1. 30 hastaya ait demografik, hematolojik, daha önceki proje çalışmalarımızda ortak olan hastalara ait genetik veriler ile birlikte, TAL1 ekspresyon düzeylerinin kümülatif verileri

NOK	KOD	Y-C	BETA TALASEMİ MUTASYONU	TAL1 EKS	HbF	HGB	MCV	MCH	MCHC	RDW	HbA1	HbA2	SP	BCL11A C>T	XMN1 C>T	SALL2 c.2236 C>G
1	1	35-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	2	25,20	9,7	80	25,1	31,3	24	61,30	3,30	E			CG
2	2	23-E	IVS.I.1(G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1,1	16,7	8,9	78,3	25,6	32,7	19	70,8	3,1	H	CC	CC	CG
3	3	26-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1	2,6	9,3	87,8	28,4	32,3	14	80,3	2,9	E	CT	CC	CG
4	4	23-K	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>A)	1,3	7,6	8,5	82,4	27,5	33,4	17	78,2	2,5	H	TT	TT	GG
5	5	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1	11,1	8,3	84,2	26,9	31,9	16	74,4	2,8	E			CG
6	6	27-E	(-30T>A)/IVS.II.745 (C>G)	2,2	6,5	8,6	82	27,2	33,2	16	76,7	2,8	E	CT	CC	GG
7	7	30-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	2	17,6	8,6	83,7	27	32,2	19	67,9	2,2	E	CT	CC	GG
8	8	21-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	1,2	5,6	7,9	51,8	17,3	33,4	30	76,4	7,7	E			CG
9	9	28-E	(-30T>A)/IVS.I.110 (G>A)	4,2	39	9,8	81,1	24,9	30,7	26	50,1	4,1	E	CT	CC	GG
10	10	25-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.110 (G>A)	1,1	4,7	8,6	89,3	26,8	30,1	17	78,7	3,3	E	CT	CC	GG
11	11	46-K	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>A)	2	9,70	8,9	83,9	27,9	33,2	16	76,10	2,60	E			CG
12	12	63-K	(-30T>A/-30T>A)	3,9	30,2	8,4	76,7	22,7	29,5	29	57,4	4,6	E	TT	CC	CG
13	13	30-K	(-30T>A)/IVS.II.1 (G>A)	4,1	18,7	8,5	77,3	25,4	32,9	20	68,6	3,6	H	TT	CT	GG
14	14	24-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1	4,6	7,4	84,4	27,4	32,5	18	72,4	2,9	E			GG
15	15	21-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1	2,3	9,2	77,6	26,5	34,2	15	81,6	2,6	E			
16	16	38-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	2	5,9	9,2	78,6	24,3	30,9	27	77,9	3,9	E	CT	CC	CC
17	17	19-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	1,1	7,5	8,9	71,1	23,8	33,5	34	77,8	3,7	E			
18	18	27-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	1,2	8,6	10	79,4	26,6	33,5	18	78,7	2,5	E			
19	19	23-K	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>A)	1,6	7,6	8,5	82,4	27,5	33,4	17	78,2	2,5	H	TT	TT	GG
20	20	26-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	1,5	8,6	10	79,4	26,6	33,5	18	78,7	2,5	E			
21	21	25-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	5,2	61,4	8	74,7	22	29,5	31	27	7,9	E	CT	CC	GG
22	22	18-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1,4	9,5	9,1	83,5	27,6	33	19	76,1	2,7	E			
23	23	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1	7	8,8	71,8	22	30,6	36	73,6	5,6	E	TT	CC	CG
24	24	23-K	IVS.II.1 (G>A)/IVS.II.745 (C>G)	1,2	3,5	10	82,7	28,1	34	14	81,4	2,4	E			CG
25	25	18-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1	3,6	9,9	79,4	27,6	34,7	16	80,8	2,6	E			
26	26	32-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	3,3	25	9,2	75,4	25,5	33,8	28	62,8	3	E	CT	CC	CC
27	27	31-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1,2	4,7	9,6	81,1	26,9	33,2	17	78,7	2,7	H			GG
28	28	21-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	1	4,9	8,8	83	27,5	33,2	15	79	2,9	H	TT	TT	
29	29	26-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1,1	6,00	10	84,2	27,7	32,9	17	78,50	2,70	E			GG
30	30	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	1,3	5,1	8,1	84,8	27,1	31,9	15	79,5	2,9	E	CT	CC	CG

Tablo 5.1’de 30 hastaya ait TAL1 ekspresyon düzeyleri ile eldeki toplam veriler incelendiğinde, diğer çalışma (Arıkan, 2016) ile ortak olan 16 hastanın BCL11A C>T sonuçlarından 9 hastanın CT heterozigot genotipinde olduğu görülmektedir. Bu 9 hastadan 4’ü (T7, T9, T21 ve T26) ise artmış HbF içerisinde en yüksek artış gösteren hastalar olduğu görülmüştür. Ayrıca bu hastalardaki TAL1 ekspresyon düzeyi de 2 katın üzerinde olması, bu genetik faktörlerin birlikte değerlendirilmesi gerektiğini ortaya koymaktadır. Bu sonucun literatürle uyumlu olarak BCL11A’nın CT genotipinin HbF yüksekliği ile ilişkili olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, 30 hastanın diğer bir projemizle ortak olan 23'ünde SALL2 geni ekzon-2'deki c.2236 C>G, p. Gly746Arg mutasyonu çalışılmış (Karaman, 2017), bu mutasyonun amino asit değişikliğine neden olduğundan, bir HDAC1 ve HDAC2 motiflerine bağlanma faktörü olan SALL2'nin, buralara bağlanamayıp, gamma globin promotorlarına bağlanması ile HbF düzeyini arttırdığı düşünülmektedir. Çünkü HbF'i zaten yüksek olan 23 hastadan 2'sinin CC normal, 11'nin GG homozigot mutant, 10 hastanın ise CG heterozigot genotipinde olduğu görülmektedir. Tüm hastalarda genel olmakla birlikte, özellikle 2 katın üzerinde ekspresyon gösteren TAL1'in varlığında hematopoiezisde, mutant BCLL11A ve SALL2 varyantlarının HbF indüksiyonuna katkı sağladığı düşünülmektedir. TAL1'in diğer transkripsiyon faktörleri ile de birlikte aynı yolak ve kompleks içinde yer almasından dolayı önemli bir bileşen olduğu bu şekilde daha da güçlenmekte olup, daha fazla hastada çalışılması daha gerçekçi sonuçları ortaya çıkaracaktır.

Diğer bir projemizle ortak vakaların yer aldığı TAL1 ekspresyonu çalışmamızda, TAL1 ekspresyonunu 2 kat ve üzerinde gösteren 30 hastadan 10 hastanın 2'sinde (T1 ve T11) Xmn1 C>T değişiminin çalışılmadığı, çalışılmış olan 8 hastadan birinde CT, 7'sinde normal CC genotipinde olduğu, bu nedenle Xmn1 rs7482144 C>T değişiminin bu vakalarda HbF artışına etkili olmadığını, bu vakalarda TAL1'in HbF artışında etkili ve diğer faktörlerle birlikte katkı sunduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak HbF'i yüksek olan beta-talasemi majörlü 30 hastadan gerçek zamanlı kantitatif RT-PCR yöntemi kullanarak, normal-kontrollere kıyasla, 23'ünde TAL1 ekspresyonunun yüksek bulunmasının, TAL1 ekspresyonu arttıkça HbF düzeyinin de artış eğiliminde olması, HbF'in yükseltilmesi yönündeki çalışmalara yeni pencereler açacağı düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında yapılan deneyler ve hastaların HbF düzeyleri açısından yüksek modifiye edici özellikte olan genetik faktörlerden; BCL11A, Xmn1 mutasyon ve polimorfizmleri (Arıkan, 2016), SALL2 geni mutasyonu (Karaman, 2017) ve HBG promotör bölge mutasyonlarının taranması (Billor, 2021) ile TAL1 ekspresyon seviyeleri bakımından karşılaştırılmaları göstermiştir ki; TAL1 ekspresyonu belirgin bir şekilde HbF üretimi ile pozitif korelasyon içerisinde olup, TAL1 ekspresyonu arttıkça da HbF düzeyini de arttırdığı görülmektedir.

Günümüzde hemoglobinopatiler ve özellikle beta-talasemi alanında genetik ve epigenetik araştırmaların genişletilmesi, genetik alanında gen düzenleme ve gen knock-out teknolojilerindeki ilerlemelerle birlikte, beta-talasemide fetal hemoglobin indüksiyonu ile patofizyolojinin iyileştirilmesine yönelik çalışmalar sıkça karşımıza çıkmaktadır. Beta-talasemi fetal hemoglobinin doğal olarak fazla kalıtıldığı HPFH ile birlikte görüldüğü durumlarda daha hafif klinik semptomlar göstermekte ve yapılan çalışmalar bunu taklit etmek amacıyla gen düzenleme ile yapay HPFH delesyonu yaratımı (Wienert ve ark., 2015), BCL11A gibi fetal hemoglobin modifiye edici genlerde gen susturulması (knock-out) (Bauer ve ark., 2013), kromatin katlanmayı taklit edecek şekilde gen düzenleme (Breda ve ark., 2016), HMGA2 reaktivasyonu (Cavazzana ve ark., 2010), regülatör protein aktivasyonu (Chambers ve ark., 2020), viral vektörle mRNA transfenksiyonu (Sabatino ve ark., 2000), hidroksiüre (HU) gibi HbF indükleyici farmakogenetik ajanlar (Grieco ve ark., 2015) gibi stratejilerle gerçekleştirilmektedir.

Bu güncel gelişmelere destek olması ve HbF indüksiyonunu attıracak çalışmalara katkı sunacağı düşüncesi ile bu tez çalışması gösterdi ki; TAL1 ekspresyon seviyesi normal düzeyde, bazal olarak tüm HbF yüksekliğine eşlik etmektedir. Ancak en çarpıcı sonucun ise TAL1 ekspresyonu arttıkça HbF seviyesinin de daha yüksek artış ile pozitif korelasyon göstermesiydi. Bu sonuçlarla çalışmamız aşağıdaki önerileri ortaya çıkarmıştır:

1. Çalışmamızda hasta sayısı 30 olup, az olmasına karşın, TAL1 ekspresyon düzeyi ile HbF seviyesinin yüksekliğinin birlikte gitmesinin varlığı, sonucun genellenmesi için daha fazla sayıda beta- talasemi majörlü hasta çalışılmalıdır.
2. Beta-talasemi majör hastalarının klinik olarak aydınlatılmasının ne kadar önemli olduğu ortaya çıkmış, hasta seçimine azami özen gösterilmelidir.
3. Çalışmamızın sonucu göstermiştir ki; HbF'in indüksiyonunda ve baskılanmasında işe karışan genetik ve epigenetik faktörlerin birlikte çalışması, sonuçların birlikte değerlendirilmesi sağlanmalıdır.
4. Çalışmamız, TAL1 ekspresyonunun beta-talasemi majör hastalarında ilk defa yapılmasına karşın, HbF'in yükseltilmesi çalışmalarında TAL1 önemli bir hedef olarak düşünülmelidir.
5. TAL1 transkripsiyon faktörü ile birlikte kompleks yaparak, kontrol bölgesi LCR ve gamma globin promotörleri arasındaki ilişkiyi düzenleyen diğer faktörler de hedef olarak çalışılmalıdır.
6. Çalışmamızdaki bulguların, özellikle TAL1 ekspresyon artış katları ile HbF'in yüksek seviye ilişkisi, genom düzeltme (editing) ve gen düzenlenmesi çalışmalarında hedef olarak seçilmelidir.

Çalışmamız ve çalışmamızdaki ortak hasta verilerine ilişkin sonuçlar toplam değerlendirildiğinde; TAL1 transkripsiyon faktörünün gen ekspresyon seviyeleri ile başta A-gamma ve G-gamma globin genleri olmak üzere, beta-benzeri globin genlerinin regülasyonunda sorumlu pozitif ve negatif genetik ve epigenetik faktörlerin birlikte değerlendirilmesinin, daha gerçekçi sonuçlar vereceği düşüncesindeyiz. Bu bakımdan, HbF'i yüksek beta-talasemi majörlü hastalarda göstermiş olduğumuz TAL transkripsiyon faktörü ekspresyon seviyesinin artışının, HbF seviyesini arttırdığı bulgusunun çok önemli olduğunu, literatüre ve yeni çalışmalara önemli katkı sunacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKLAR

- Abi Saad, M, Haddad, AG, Alam, ES, Aoun, S, Maatouk, P, Ajami, N, . . . Taher, AT. Preventing thalassemia in Lebanon: successes and challenges in a developing country. *Hemoglobin*. 2014; 38(5): 308-311.
- Aksoy, M. The history of beta-thalassemia in Turkey. *Turk J Pediatr*. 1991; 33(3): 195-197.
- Aksoy, M, Ikin, EW, Mourant, AE, & Lehmann, H. Blood groups, haemoglobins, and thalassaemia in Turks in southern Turkey and Eti-Turks. *Br Med J*. 1958; 2(5102): 937-939.
- Ali, G, Tariq, MA, Shahid, K, Ahmad, FJ, & Akram, J. Advances in genome editing: the technology of choice for precise and efficient beta-thalassemia treatment. *Gene Ther*. 2020.
- Aliyeva, G, Asadov, C, Mammadova, T, Gafarova, S, & Abdulalimov, E. Thalassemia in the laboratory: pearls, pitfalls, and promises. *Clin Chem Lab Med*. 2018; 57(2): 165-174.
- Altay, C, Yilgor, E, Beksac, S, & Gurgey, A. Premarital screening of hemoglobinopathies: a pilot study in Turkey. *Hum Hered*. 1996; 46(2): 112-114.
- Angastiniotis, MA, & Hadjiminias, MG. Prevention of thalassaemia in Cyprus. *Lancet*. 1981; 1(8216): 369-371.
- Antonini, E, & Brunori, M. Hemoglobin. *Annu Rev Biochem*. 1970; 39: 977-1042.
- Arıkan, Y. Beta talasemi majorl hastalarda hbf indüksiyonu için genetik ve epigenetik alışmalar. Akdeniz Üniversitesi, SBE Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2016, Antalya (Danışman: Prof.Dr. İ Keser).
- Arpacı, A, Başaralı, MK, İnal, TC, Polat, G, & şahin, G. İnsan Hemoglobinleri. In: N Bozkurt, eds. *Hemoglobinopati Tanı Rehberi*. Ankara: T.C. Sağlık Bakanlığı; 2016
- Aycicek, A, Koc, A, Ozdemir, ZC, Bilinc, H, Kocyigit, A, & Dilmec, F. Beta-globin gene mutations in children with beta-thalassemia major from Sanliurfa province, Turkey. *Turk J Haematol*. 2011; 28(4): 264-268.
- Aydınok, Y. Treatment of thalassaemia: a review of the new approaches on transfusion safety and the novel therapeutics. *International Society of Blood Transfusion*. 2019; O(1-8).
- Bahadır, A. Beta Talasemi Mutasyonları ve Beta Globin Ailesi Haplotip İlişkileri. Pamukkale Üniversitesi, Biyofizik, Doktora Tezi, 2009, Denizli (Danışman: Prof.Dr. E Atalay).

- Bank, A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood*. 2006; 107(2): 435-443.
- Başak, N. (2005). *Talasemi Moleküler Genetiği*. Paper presented at the Moleküler Hematoloji ve Sitogenetik Alt Komitesi, TEMEL MOLEKÜLER HEMATOLOJİ KURSU, İstanbul.
<http://www.thd.org.tr/thdData/userfiles/file/nazlibasak.pdf>
- Bauer, DE, Kamran, SC, Lessard, S, Xu, J, Fujiwara, Y, Lin, C, . . . Orkin, SH. An erythroid enhancer of BCL11A subject to genetic variation determines fetal hemoglobin level. *Science*. 2013; 342(6155): 253-257.
- Beet, EA. The genetics of the sickle-cell trait in a Bantu tribe. *Ann Eugen*. 1949; 14(4): 279-284.
- Belhoul, KM, Abdulrahman, M, & Alraei, RF. Hemoglobinopathy carrier prevalence in the United Arab Emirates: first analysis of the Dubai Health Authority premarital screening program results. *Hemoglobin*. 2013; 37(4): 359-368.
- Bilgen, T, Arikan, Y, Canatan, D, Yesilipek, A, & Keser, I. The association between intragenic SNP haplotypes and mutations of the beta globin gene in a Turkish population. *Blood Cells Mol Dis*. 2011a; 46(3): 226-229.
- Bilgen, T, Canatan, D, Arikan, Y, Yesilipek, A, & Keser, I. The effect of HBB: c.*+96T>C (3'UTR +1570 T>C) on the mild b-thalassemia intermedia phenotype. *Turk J Haematol*. 2011b; 28(3): 219-222.
- Bilgen, T, Clark, OA, Ozturk, Z, Akif Yesilipek, M, & Keser, I. Two novel mutations in the 3' untranslated region of the beta-globin gene that are associated with the mild phenotype of beta thalassemia. *Int J Lab Hematol*. 2013; 35(1): 26-30.
- Billor, M. Antalya'da Beta Talasemi Majör Hastalarında Gamma Globin Promotor Bölge Mutasyonları ve Hbf İlişkisinin Araştırılması. Akdeniz Üniversitesi, SBE Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2021, Antalya (Danışman: Prof.Dr. İ Keser).
- Breda, L, Motta, I, Lourenco, S, Gemmo, C, Deng, W, Rupon, JW, . . . Rivella, S. Forced chromatin looping raises fetal hemoglobin in adult sickle cells to higher levels than pharmacologic inducers. *Blood*. 2016; 128(8): 1139-1143.
- Canatan, D. The Thalassemia center of Antalya State Hospital: 15 years of experience (1994 to 2008). *J Pediatr Hematol Oncol*. 2013; 35(1): 24-27.
- Canatan, D. Thalassemias and hemoglobinopathies in Turkey. *Hemoglobin*. 2014; 38(5): 305-307.
- Canatan, D, & Arcasoy, A. Talasemiada Kemik İliği Transplantasyonu. *Ankara Üniv Tıp Fakültesi Mecmuası*. 1993; 46(2): 173-186.

- Canatan, D, & Delibas, S. Report on Ten Years' Experience of Premarital Hemoglobinopathy Screening at a Center in Antalya, Southern Turkey. *Hemoglobin*. 2016; 40(4): 273-276.
- Cavazzana-Calvo, M, Payen, E, Negre, O, Wang, G, Hehir, K, Fusil, F, . . . Leboulch, P. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature*. 2010; 467(7313): 318-322.
- Chambers, CB, Gross, J, Pratt, K, Guo, X, Byrnes, C, Lee, YT, . . . Wilber, A. The mRNA-Binding Protein IGF2BP1 Restores Fetal Hemoglobin in Cultured Erythroid Cells from Patients with beta-Hemoglobin Disorders. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020; 17: 429-440.
- Chatterjee, T, Chakravarty, A, & Chakravarty, S. Population Screening and Prevention Strategies for Thalassemias and other Hemoglobinopathies of Eastern India: Experience of 18,166 cases. *Hemoglobin*. 2015; 39(6): 384-388.
- Choi, JK. Pathogenesis of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemias. In: LM McManus veMR N, eds. *Pathobiology of Human Disease*. Academic Press; 2014,1749-1758.
- Chonat, S, & Quinn, CT. Current Standards of Care and Long Term Outcomes for Thalassemia and Sickle Cell Disease. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 1013: 59-87.
- Cone, RD, Weber-Benarous, A, Baorto, D, & Mulligan, RC. Regulated expression of a complete human beta-globin gene encoded by a transmissible retrovirus vector. *Mol Cell Biol*. 1987; 7(2): 887-897.
- Cooley, TB, & Lee, P. A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans Am Pediatr Soc*. 1925; 37: 29-30.
- Damsgaard, C, Storz, JF, Hoffmann, FG, & Fago, A. Hemoglobin isoform differentiation and allosteric regulation of oxygen binding in the turtle, *Trachemys scripta*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013; 305(8): R961-967.
- De Sanctis, V, Kattamis, C, Canatan, D, Soliman, AT, Elsedfy, H, Karimi, M, . . . Angastiniotis, M. beta-Thalassemia Distribution in the Old World: an Ancient Disease Seen from a Historical Standpoint. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2017; 9(1): e2017018.
- Deng, W, Lee, J, Wang, H, Miller, J, Reik, A, Gregory, PD, . . . Blobel, GA. Controlling long-range genomic interactions at a native locus by targeted tethering of a looping factor. *Cell*. 2012; 149(6): 1233-1244.
- Enver, T, Raich, N, Ebens, AJ, Papayannopoulou, T, Costantini, F, & Stamatoyannopoulos, G. Developmental regulation of human fetal-to-adult globin gene switching in transgenic mice. *Nature*. 1990; 344(6264): 309-313.

- Escalante, AA, Barrio, E, & Ayala, FJ. Evolutionary origin of human and primate malarias: evidence from the circumsporozoite protein gene. *Mol Biol Evol.* 1995; 12(4): 616-626.
- Fahey, JL, Rath, CE, Princiotto, JV, Brick, IB, & Rubin, M. Evaluation of trisodium calcium diethylenetriaminepentacetate in iron storage disease. *J Lab Clin Med.* 1961; 57: 436-449.
- Forget, BG. Progress in understanding the hemoglobin switch. *N Engl J Med.* 2011; 365(9): 852-854.
- Gabbianelli, M, Morsilli, O, Massa, A, Pasquini, L, Cianciulli, P, Testa, U, & Peschle, C. Effective erythropoiesis and HbF reactivation induced by kit ligand in beta-thalassemia. *Blood.* 2008; 111(1): 421-429.
- Galanello, R, & Origa, R. Beta-thalassemia. *Orphanet J Rare Dis.* 2010; 5: 11.
- Galanello, R, Sanna, S, Perseu, L, Sollaino, MC, Satta, S, Lai, ME, . . . Cao, A. Amelioration of Sardinian beta0 thalassemia by genetic modifiers. *Blood.* 2009; 114(18): 3935-3937.
- Galarneau, G, Palmer, CD, Sankaran, VG, Orkin, SH, Hirschhorn, JN, & Lettre, G. Fine-mapping at three loci known to affect fetal hemoglobin levels explains additional genetic variation. *Nat Genet.* 2010; 42(12): 1049-1051.
- Gaziev, D, Galimberti, M, Lucarelli, G, & Polchi, P. Chronic graft-versus-host disease: is there an alternative to the conventional treatment? *Bone Marrow Transplant.* 2000; 25(7): 689-696.
- Gaziev, J, & Lucarelli, G. Allogeneic cellular gene therapy for hemoglobinopathies. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2010; 24(6): 1145-1163.
- Gering, M, Rodaway, AR, Gottgens, B, Patient, RK, & Green, AR. The SCL gene specifies haemangioblast development from early mesoderm. *EMBO J.* 1998; 17(14): 4029-4045.
- Grieco, AJ, Billett, HH, Green, NS, Driscoll, MC, & Bouhassira, EE. Variation in Gamma-Globin Expression before and after Induction with Hydroxyurea Associated with BCL11A, KLF1 and TAL1. *PLoS One.* 2015; 10(6): e0129431.
- Guzeloglu-Kayisli, O, Cetin, Z, Keser, I, Ozturk, Z, Tuncer, T, Canatan, D, & Luleci, G. Relationship between SP1 polymorphism and osteoporosis in beta-thalassemia major patients. *Pediatr Int.* 2008; 50(4): 474-476.
- Haldane. The Rate of Mutation of Human Genes. *Suppl.* 1949; 35: 267-273.
- Hanawa, H, Persons, DA, & Nienhuis, AW. Mobilization and mechanism of transcription of integrated self-inactivating lentiviral vectors. *J Virol.* 2005; 79(13): 8410-8421.

- Heid, CA, Stevens, J, Livak, KJ, & Williams, PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* 1996; 6(10): 986-994.
- Hu, L, Huang, L, Han, Y, Jin, T, Liu, J, Jiang, M, . . . Huang, S. Association of polymorphisms in the HBG1-HBD intergenic region with HbF levels. *J Clin Lab Anal.* 2020; 34(6): e23243.
- Ingram, VM, & Stretton, AO. Genetic basis of the thalassaemia diseases. *Nature.* 1959; 184: 1903-1909.
- Jia, Y. Real Time PCR, Chapter:3. In: M Conn, eds. *Laboratory Methods in Cell Biology.* Oxford, UK: Academic Pres.; 2012
- Karakaş, Z. ALFA TALASEMİ. *HematoLog.* 2014; 4-1: 117-133.
- Karaman, T. Beta talasemi majör hastalarında modifiye edici sall2 geni bağlanma motifinde mutasyon taranması. Akdeniz Üniversitesi, SBE Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, 2017, Antalya (Danışman: Prof.Dr. İ Keser).
- Kariuki, SN, & Williams, TN. Human genetics and malaria resistance. *Hum Genet.* 2020; 139(6-7): 801-811.
- Kassouf, MT, Hughes, JR, Taylor, S, McGowan, SJ, Soneji, S, Green, AL, . . . Porcher, C. Genome-wide identification of TAL1's functional targets: insights into its mechanisms of action in primary erythroid cells. *Genome Res.* 2010; 20(8): 1064-1083.
- Keser, I. Türkiye'de ve Dünyada Hemoglobopatiler. *Turkiye Klinikleri J Med Genet-Special Topics.* 2017; 2(1): 1-6.
- Keser, I, Kayisli, OG, Yesilipek, A, Ozes, ON, & Luleci, G. Hb Antalya [codons 3-5 (Leu-Thr-Pro-->Ser-Asp-Ser)]: a new unstable variant leading to chronic microcytic anemia and high Hb A2. *Hemoglobin.* 2001; 25(4): 369-373.
- Keser, I, Manguoglu, E, Kayisli, O, Yesilipek, A, & Luleci, G. Combination of Hb Knossos [Cod 27 (G-T)] and IVSII-745 (C-G) in a Turkish patient with beta-thalassemia major. *Genet Test.* 2007; 11(3): 228-230.
- Keser, I, Sanlioglu, AD, Manguoglu, E, Guzeloglu Kayisli, O, Nal, N, Sargin, F, . . . Luleci, G. Molecular analysis of beta-thalassemia and sickle cell anemia in Antalya. *Acta Haematol.* 2004; 111(4): 205-210.
- Keser, I, Yeşilipek, A, Canatan, D, & Lüleci, G. Abnormal hemoglobins associated with the beta-globin gene inAntalya province, Turkey. *Turk J Med Sci.* 2010; 40(1): 127-131.
- Keskin, A, Turk, T, Polat, A, Koyuncu, H, & Saracoglu, B. Premarital screening of beta-thalassemia trait in the province of Denizli, Turkey. *Acta Haematol.* 2000; 104(1): 31-33.

- Kim, A, & Dean, A. Chromatin loop formation in the beta-globin locus and its role in globin gene transcription. *Mol Cells*. 2012; 34(1): 1-5.
- Kohne, E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Dtsch Arztebl Int*. 2011; 108(31-32): 532-540.
- Kountouris, P, Lederer, CW, Fanis, P, Feleki, X, Old, J, & Kleanthous, M. IthaGenes: an interactive database for haemoglobin variations and epidemiology. *PLoS One*. 2014; 9(7): e103020.
- Kutlar, F. Hemoglobinlerin Laboratuvar Tanısı. *HematoLog*. 2014; 4(1): 45-54.
- Lambotte-Legrand, J, & Lambotte-Legrand, C. [Sickle cell anemia in the native child of Belgian Congo]. *Ann Soc Belg Med Trop (1920)*. 1951; 31(2): 207-234.
- Lechauve, C, Keith, J, Khandros, E, Fowler, S, Mayberry, K, Freiwan, A, . . . Weiss, MJ. The autophagy-activating kinase ULK1 mediates clearance of free alpha-globin in beta-thalassemia. *Sci Transl Med*. 2019; 11(506).
- Lichtman, HC, Watson, RJ, Feldman, F, Ginsberg, V, & Robinson, J. Studies on thalassemia. I. An extracorporeal defect in thalassemia major. II. The effects of splenectomy in thalassemia major with an associated acquired hemolytic anemia. *J Clin Invest*. 1953; 32(12): 1229-1235.
- Lo, & Singer. Thalassemia: current approach to an old disease. *Pediatr Clin North Am*. 2002; 49(6): 1165-1191, v.
- Lucarelli, G, Galimberti, M, Giardini, C, Polchi, P, Angelucci, E, Baronciani, D, . . . Gaziev, D. Bone marrow transplantation in thalassemia. The experience of Pesaro. *Ann N Y Acad Sci*. 1998; 850: 270-275.
- Manguoglu, E, Sargin, CF, Nal, N, Keser, I, Kupesiz, A, Yesilipek, A, & Luleci, G. combination of IVS2.849 A-G with IVS1.1 G-A: a mutation of beta-globin gene in a Turkish beta-thalassemia major patient. *Pediatr Hematol Oncol*. 2005; 22(4): 291-295.
- Martinsen, ES, Perkins, SL, & Schall, JJ. A three-genome phylogeny of malaria parasites (*Plasmodium* and closely related genera): evolution of life-history traits and host switches. *Mol Phylogenet Evol*. 2008; 47(1): 261-273.
- Martyn, GE, Wienert, B, Kurita, R, Nakamura, Y, Quinlan, KGR, & Crossley, M. A natural regulatory mutation in the proximal promoter elevates fetal globin expression by creating a de novo GATA1 site. *Blood*. 2019; 133(8): 852-856.
- May, C, Rivella, S, Callegari, J, Heller, G, Gaensler, KM, Luzzatto, L, & Sadelain, M. Therapeutic haemoglobin synthesis in beta-thalassaemic mice expressing lentivirus-encoded human beta-globin. *Nature*. 2000; 406(6791): 82-86.
- Mendilcioglu, I, Yakut, S, Keser, I, Simsek, M, Yesilipek, A, Bagci, G, & Luleci, G. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia and other hemoglobinopathies in southwestern Turkey. *Hemoglobin*. 2011; 35(1): 47-55.

- Menzel, S, & Thein, SL. Genetic Modifiers of Fetal Haemoglobin in Sickle Cell Disease. *Mol Diagn Ther.* 2019; 23(2): 235-244.
- Miyata, M, Gillemans, N, Hockman, D, Demmers, JAA, Cheng, JF, Hou, J, . . . Philipsen, S. An evolutionarily ancient mechanism for regulation of hemoglobin expression in vertebrate red cells. *Blood.* 2020; 136(3): 269-278.
- Modell, B, & Darlison, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ.* 2008; 86(6): 480-487.
- Muncie, & Campbell. Alpha and Beta Thalassemia. *American Family Physician.* 2009; 80(4).
- Neel, JV. The Inheritance of Sickle Cell Anemia. *Science.* 1949; 110(2846): 64-66.
- Nosheen, A, Inamullah, Ahmad, H, Qayum, I, Siddiqui, N, Abbasi, FM, . . . Iqbal, MS. Premarital genetic screening for beta thalassemia carrier status of indexed families using HbA2 electrophoresis. *J Pak Med Assoc.* 2015; 65(10): 1047-1049.
- Okutucu, B, & Pehlivan, S. Revers-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PCR) ve Uygulama Alanları. *DergiPark Arşivi.* 2003; 12(138).
- Özkınay, F. HEMOGLOBİNOPATİLERDE GENETİK PATOLOJİ ve MOLEKÜLER TANI YÖNTEMLERİ. *HematoLog.* 2014; 4(1).
- Paikari, A, & Sheehan, VA. Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2018; 180(2): 189-200.
- Palii, CG, Perez-Iratxeta, C, Yao, Z, Cao, Y, Dai, F, Davison, J, . . . Brand, M. Differential genomic targeting of the transcription factor TAL1 in alternate haematopoietic lineages. *EMBO J.* 2011; 30(3): 494-509.
- Perutz, MF. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. *Q Rev Biophys.* 1989; 22(2): 139-237.
- Perutz, MF, Bauer, C, Gros, G, Leclercq, F, Vandecasserie, C, Schnek, AG, . . . Joysey, KA. Allosteric regulation of crocodilian haemoglobin. *Nature.* 1981; 291(5817): 682-684.
- Quek, L, & Thein, SL. Molecular therapies in beta-thalassaemia. *Br J Haematol.* 2007; 136(3): 353-365.
- Razak, SAA, Murad, NAA, Masra, F, Chong, DLS, Abdullah, N, Jalil, N, . . . Latiff, ZA. Genetic Modifiers of Fetal Haemoglobin (HbF) and Phenotypic Severity in beta-Thalassemia Patients. *Curr Mol Med.* 2018; 18(5): 295-305.
- Robb, L, Lyons, I, Li, R, Hartley, L, Kontgen, F, Harvey, RP, . . . Begley, CG. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(15): 7075-7079.

- Ronda, L, Bruno, S, & Bettati, S. Tertiary and quaternary effects in the allosteric regulation of animal hemoglobins. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1834(9): 1860-1872.
- Rund, D. Thalassemia 2016: Modern medicine battles an ancient disease. *Am J Hematol*. 2016; 91(1): 15-21.
- Rund, D, & Rachmilewitz, E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med*. 2005; 353(11): 1135-1146.
- Sabatino, DE, Seidel, NE, Aviles-Mendoza, GJ, Cline, AP, Anderson, SM, Gallagher, PG, & Bodine, DM. Long-term expression of gamma-globin mRNA in mouse erythrocytes from retrovirus vectors containing the human gamma-globin gene fused to the ankyrin-1 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(24): 13294-13299.
- Schecher, AN. Hemoglobin Research and the Origin of Molecular Medicine. *Blood*. 2008; 112(10): 3927-3938.
- Schrier, SL. Pathophysiology of thalassemia. *Curr Opin Hematol*. 2002; 9(2): 123-126.
- Schroeder, WA, Huisman, TH, Shelton, JR, Shelton, JB, Kleihauer, EF, Dozy, AM, & Robberson, B. Evidence for multiple structural genes for the gamma chain of human fetal hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968; 60(2): 537-544.
- Singh, B, Kim Sung, L, Matusop, A, Radhakrishnan, A, Shamsul, SS, Cox-Singh, J, . . . Conway, DJ. A large focus of naturally acquired Plasmodium knowlesi infections in human beings. *Lancet*. 2004; 363(9414): 1017-1024.
- Stadhouders, R, Aktuna, S, Thongjuea, S, Aghajani-refah, A, Pourfarzad, F, van Ijcken, W, . . . Soler, E. HBS1L-MYB intergenic variants modulate fetal hemoglobin via long-range MYB enhancers. *J Clin Invest*. 2014; 124(4): 1699-1710.
- Tan, TK, Zhang, C, & Sanda, T. Oncogenic transcriptional program driven by TAL1 in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int J Hematol*. 2019; 109(1): 5-17.
- Thein, SL. Genetic insights into the clinical diversity of beta thalassaemia. *Br J Haematol*. 2004; 124(3): 264-274.
- Thein, SL. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *Haematologica*. 2005a; 90(5): 649-660.
- Thein, SL. Pathophysiology of beta thalassemia--a guide to molecular therapies. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005b: 31-37.
- Thein, SL. The molecular basis of beta-thalassemia. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3(5): a011700.
- Thein, SL. Molecular basis of beta thalassemia and potential therapeutic targets. *Blood Cells Mol Dis*. 2018; 70: 54-65.

- Vagapova, ER, Spirin, PV, Lebedev, TD, & Prassolov, VS. The Role of TAL1 in Hematopoiesis and Leukemogenesis. *Acta Naturae*. 2018; 10(1): 15-23.
- Weatherall. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet*. 2001; 2(4): 245-255.
- Weatherall, DJ, & Clegg, JB. Historical Background. In: DJ Weatherall veJB Clegg, eds. *The Thalassemia Syndromes*, 4th edition. USA: Blackwell Science; 2001
- Whipple, & Bradford. Racial or Familial Anemia of Children Associated With Fundamental Disturbances of Bone and Pigment Metabolism (Cooley-von Jaksch). *Am J Dis Child*. 1932; 44(2): 336-365.
- WHO. (2019). World Malaria Report. 01.09.2020 tarihinde "<https://www.who.int/publications/i/item/9789241565721>" Sitesinden Alınmıştır.
- Wienert, B, Funnell, AP, Norton, LJ, Pearson, RC, Wilkinson-White, LE, Lester, K, . . . Crossley, M. Editing the genome to introduce a beneficial naturally occurring mutation associated with increased fetal globin. *Nat Commun*. 2015; 6: 7085.
- Wienert, B, Martyn, GE, Kurita, R, Nakamura, Y, Quinlan, KGR, & Crossley, M. KLF1 drives the expression of fetal hemoglobin in British HPFH. *Blood*. 2017; 130(6): 803-807.
- Williams, TN, & Weatherall, DJ. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2(9): a011692.
- Yun, WJ, Kim, YW, Kang, Y, Lee, J, Dean, A, & Kim, A. The hematopoietic regulator TAL1 is required for chromatin looping between the beta-globin LCR and human gamma-globin genes to activate transcription. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42(7): 4283-4293.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuğba Nur	Uyruğu	
Soyadı	Uyguç	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise		
Lisans		
Yüksek Lisans		
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Yüksek Lisans		

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler: