

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

ANTALYA'DA BETA TALASEMİ MAJÖR
HASTALARINDA GAMMA GLOBİN PROMOTOR
BÖLGE MUTASYONLARI VE HBF İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Murat BİLLOR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2021-ANTALYA

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

ANTALYA’DA BETA TALASEMİ MAJÖR
HASTALARINDA GAMMA GLOBİN PROMOTOR
BÖLGE MUTASYONLARI VE HbF İLİŞKİSİNİN
ARAŞTIRILMASI

Murat BİLLOR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr.İbrahim KESER

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2019-4566 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2021-ANTALYA

TEŞEKKÜR

Öncelikle yüksek lisans eğitimim boyunca emek ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, tezimin hazırlanmasında bilgi ve deneyimleri ile bana büyük katkısı olan danışman hocam Sayın Prof.Dr.İbrahim KESER'e, Anabilim Dalımızdaki tüm öğretim üyelerine ve asistan arkadaşlarıma ayrıca tez çalışmalarımda katkılarından dolayı Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof.Dr.Fahri UÇAR'a, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof.Dr. Erdal KURTOĞLU'na

Tıbbi Genetik Anabilim Dalı'ndan çalışmamda yardımlarından dolayı Sayın Doç.Dr.Özden ALTIOK CLARK'a ve Biyolog Fatma KAPLAN'a

Manevi desteklerini her daim hissettiğim değerli büyüklerim annem Aynur BİLLOR ve babam Mustafa BİLLOR'a

Tez çalışmam boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen değerli dostlarım Tuğba KARAMAN MERCAN, Uğur KESKİN ve Öznur TOKTA'ya

Ayrıca her daim yanımda olan ve bana desteğini hiç esirgemeyen kıymetli dostum Uzm.Dr.Erdem AYIK'a

Özellikle sevgili eşim Büşra AKAN BİLLOR ve biricik oğlum Murat Çağın BİLLOR'a sevgileri ile yanımda oldukları için çok teşekkür ediyorum.

ÖZET

Amaç: Beta talasemi otozomal resesif kalıtılan tek gen hastalıklarından olup, dünyada, ülkemizde ve Antalya’da en yaygın görülen hemoglobinopatilerden biridir. Bu çalışmamızın amacı; Antalya’da yaygın olan beta talasemi majör hastalarında, yetişkin dönemde mutant formda iken bazı transkripsiyon faktörlerinin bağlanmasını sağlayarak, HbF’in yükselmesine neden olduğu düşünülen ve HbF yapısında yer alan G-gamma ve A-gamma globin genlerinin promotorundaki mutasyonları taramak ve HbF yüksekliği ile ilişkini ortaya çıkarmaktır.

Yöntem: Çalışmada HbF’i yüksek olan 30 beta-talasemi majör hastasında ve talasemik olmayan 30 sağlıklı bireyde periferik kandan DNA eldesini takiben, hedefi tanıyan primerlerin kullanıldığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile G-gamma ve A-gamma promotor bölgesi amplifiye edildi. PZR ürünleri Sanger DNA ile dizilenerek, mutasyonlar için tarandı. Bulgular yüzde olarak değerlendirildi.

Bulgular: Çalışmaya alınan HbF’i yüksek 30 beta-talasemi majör hastasının 27’inde başarılı sonuç alındığından, sonuç alınamayan 3 hasta hesaplamalara dahil edilmedi. Hastalar içerisinde beta globin geni mutant allel dağılımı bakımından en sık görülen allelin %75,92 sıklıkla IVS.I.110 (G>A), genotipin ise 17 hastada IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A) homozigot genotip olduğu görüldü. Hem hastaların hem de 30 sağlıklı kontrol bireyinin G-Gamma ve A-Gamma promotor bölgeleri normal genotipte olduğu bulundu.

Sonuç: Çalışmamızda, Türkiye’de Antalya İlinde ilk defa HbF’i yüksek olan beta talasemi majör hastalarında, G-Gamma ve A-Gamma promotor bölgeleri mutasyonlar bakımından taranmış ve normal genotipte oldukları bulunmuştur. Bu promotor bölgeleri, HbF’in düzenlenmesinde TAL1 başta olmak üzere, birçok transkripsiyon faktörünün hedefindeki dizi motiflerini içermektedir. Bu bölgelerin normal olmasına karşın, hastalardaki HbF yüksekliğinde, TAL1 ile birlikte hareket eden diğer faktörlerin yeni hedefi olması bakımından önemli bir bulgu olarak değerlendirildi.

Anahtar Kelimeler: Talasemi major, Hb F yüksekliği, gamma globin, promotor bölge, mutasyon

ABSTRACT

Objective: Beta thalassemia is one of the single gene diseases with autosomal recessive inheritance and one of the most common hemoglobinopathies in our country and Antalya Province as well as in the world and. The purpose of this study is to screen the mutations in the promoter of the G-Gamma and A-gamma globin genes, which are thought to cause the increase of HbF and are found in the HbF structure, by binding some transcription factors while in the mutant form in adulthood, in beta thalassemia major patients, which are common in Antalya, Turkey and to reveal the relationship with the height of HbF.

Method: In the study, after DNA extraction from peripheral blood in 30 beta-thalassemia major patients with high HbF and 30 healthy individuals without thalassemia, the G-gamma and A-gamma promoter region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using target-recognizing the pair of primers. PCR products were sequenced by Sanger DNA sequencing method and screened for mutations. Findings were evaluated as percentages.

Results: Since successful results were obtained in 27 of 30 beta-thalassemia major patients with high HbF in this study, 3 patients with no results were not included in the calculations. In terms of mutant allele distribution, the most frequent allele was IVS.I.110 (G>A) with %75,92 of frequency. IVS.I.110 (G> A) /IVS.I.110 (G> A) homozygous genotype was found in 17 patients. G-gamma and A-gamma promoter regions of both patients and 30 healthy control individuals were found to be in normal genotype.

Conclusion: In our study, the G-gamma and A-gamma promoter regions were screened the first time for mutations and found to be in normal genotype in beta thalassemia major patients with high HbF in Antalya Province, Turkey. These promoter regions contain sequence motifs at the target of many transcription factors, especially TAL1, in the regulation of HbF. Although these regions were normal, it was considered an important finding in terms of being the new target of other factors acting together with TAL1 in elevated HbF in patients.

Keywords: Thalassemia major, Hb F elevation, Gamma globin, promoter region, mutation

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Hemoglobinin Yapısı ve Özellikleri	3
2.2. Hemoglobinopatiler	5
2.2.1. Alfa-Talasemi	5
2.2.2. Beta-Talasemi	6
2.2.3. Beta-Talasemi Majör	6
2.2.4. β -Talasemi İntermedia	7
2.2.5. β -Talasemi Minör	8
2.3. β -Talaseminin Moleküler Patolojisi	8
2.4. Beta-Talaseminin Epidemiyolojisi	9
2.5. Antalya’da β -Talasemi Majör	10
2.6. Beta-Talasemide Moleküler Genetik Analiz	12
2.7. Hemoglobin F Yapısı ve Özellikleri	12
2.7.1. Hemoglobin Dönüşümünün Temeli	13
2.7.2. Yetişkinlerde Hb F Artışının Sebepleri	14
2.7.3. Hb F Yapımını Etkileyen Genler	14
3. GEREÇ VE YÖNTEM	16
3.1. Hasta Seçimi	16
3.2. DNA İzolasyonu	17

3.2.1. Kit ile DNA İzolasyonu	17
3.3. DNA Örneklerinin Spektrofotometre ile Ölçümü	18
3.4. PCR Yöntemi ile A γ ve G γ -Globin Promoter Bölgelerinin Amplifikasyonu	18
3.5. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması	19
3.6. PCR Amplikonlarının Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi	20
3.7. PCR Ürünlerinin Temizlenmesi	20
3.8. Sanger Sekans Dizileme Reaksiyonu	21
3.9. Sekans Labeling PCR Ürünlerinin Sephadex G-50 ile Temizlenmesi	22
3.10. İstatiksel Analiz	23
4. BULGULAR	24
4.1. Hastalara Ait Demografik, Hematolojik ve Genetik Bulgular	24
5. TARTIŞMA	30
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	36
KAYNAKLAR	38
EKLER	47
EK-1. Aydınlatılmış Onam Formu	
ÖZGEÇMİŞ	51

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Gamma globin promotor bölgesinde sık görülen tek nükleotit polimorfizmleri	14
Tablo 3.1. A γ ve G γ globin promoter bölgesine özgü primer çiftleri	18
Tablo 3.2. PZR için kullanılan bileşenler ve miktarları	19
Tablo 3.3. Thermal Cycler Amplifikasyonu için döngü basamakları	19
Tablo 3.4. DNA dizileme reaksiyonu için her bir örneğin miktarı	21
Tablo 3.5. Sekans reaksiyonu için inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri	22
Tablo 4.1. Çalışılan beta-talasemi majörlü 27 hastanın demografik ve hematolojik verileri	24
Tablo 4.2. Çalışılan beta-talasemi majörlü 27 hastanın demografik, hematolojik ve önceden ortak vaka olarak çalışılmış olanların BCL11A, XMN1, SALL2 genetik varyantları ve TAL1 ekspresyon verileri	29

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. İnsan hemoglobin molekülü yapısı	4
Şekil 2.2. Embriyodan yetiştine hemoglobinin dönüşümü	5
Şekil 2.3. Globin geni promotor bölgesinin Lokus Kontrol Bölgesi (LCR) ile interaksyonu ve ilmeklenmesi ile Hemoglobin dönüşüm modeli	15
Şekil 4.1. Çalışılan beta-talasemi majörlü 27 hastada tespit edilen 5 farklı beta-globin mutant allel dağılımı	25
Şekil 4.2. Çalışılan beta-talasemi majörlü 27 hastada görülen 7 farklı beta-globin genotipin dağılımı	26
Şekil 4.3. G-Gamma globin promotor bölgesi referans dizi ve primerlerin yerleşimi	26
Şekil 4.4. A-Gamma globin promotor bölgesi referans dizi ve primerlerin yerleşimi	27
Şekil 4.5. G-Gamma Globin geni promotor bölge 1.PCR Amplikonu (666 bp)'nunun M 100 bp Marker'e (M) karşılık %2 Agaroz jelde görüntüsü	27
Şekil 4.6. A-Gamma Globin geni promotor bölge 1.PCR Amplikonu (682 bp)'nunun M 100 bp Marker'e (M) karşılık %2 Agaroz jelde görüntüsü	27
Şekil 4.7. G-Gamma Globin geni promotor bölge 1.PCR Amplikonu (666 bp)'nunun pürifiye örneklerinin M 100 bp Marker'e (M) karşılık %2 Agaroz jelde görüntüsü	28
Şekil 4.8. G-Gamma Geni Promotor Bölge parsiyel dizisi (üstte), A-Gamma Globin geni promotor bölgesinde TAL1 transkripsiyon faktörünün tutunduğu hedef motifinin kısmi elektroferogram görüntüsü (altta)	28

SİMGELER ve KISALTMALAR

BCL11A	: B Hücreli Lenfoma 11 A Proteini
β-TM	: β Talasemi Majör
GATA1	: Eritroid Transkripsiyon Faktör 1
Hb	: Hemoglobin
HbA1	: Erişkin Hemoglobini 1
HbA2	: Erişkin Hemoglobini 2
HbF	: Fetal Hemoglobin
HBG1	: Hemoglobin G1
HBG2	: Hemoglobin G2
HBS1L	: HBS1 Benzeri Translasyonel GTPaz
HPFH	: Kalıtsal Kalıcı Fetal Hemoglobin
KLF1	: Krüppel Benzeri Faktör 1
LCR	: Lokus Kontrol Bölgesi
MCH	: Ortalama Eritrosit Hemoglobini
MCHC	: Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
MCV	: Ortalama Eritrosit Hacmi
MYB	: Myrloblastozis Protoonkogeni
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RBC	: Kırmızı Kan Hücresi
RDW	: Eritrosit Dağılım Genişliği

SOX6	: SRY(cinsiyet belirlenmesi Y bölgesi)-Box6
TAL-1	: T-Hücre Akut Lenfoblastik Lösemi Protein 1
XmnI	: Xanthomonas manihotis 1'den İzole Restriksiyon Enzimi
ZFN	: Çinko Parmak Nükleaz
ZHX2	: Çinko Parmak ve Homebox Protein 2



1. GİRİŞ

Talasemi terimi, Eski Yunanca kökenli bir kelime olmakla birlikte, thalas (deniz) ve emia (anemi, kansızlık) kelimelerinin birleşiminden türemiştir. Cooley Anemisi, Akdeniz Anemisi olarak bilinen talasemi hemoglobinopatilerden biri olup, ismini ilgili mutant globin geninden alır. Alfa (α) ve Beta (β) başta olmak üzere globin genlerinde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklı globin zincirlerinin kantitatif ve kalitatif üretimi sırasındaki dengesizlikten oluşur. İnsanda 11. ve 16.kromozomlar üzerinde yer alan globin genlerinden birinde veya daha fazlasında meydana gelen kalıtsal bozukluklardan köken alır. Hastalığa sebep olan 200'den fazla farklı mutasyon varlığı belirlenmiş olup, klinik belirtiler semptomların olmayışından ölümcül sonuçlara kadar değişiklik gösterir(Rani ve ark., 2013).

Beta-talasemi sendromları ise, β -globin zincirinde azalma, bozuk üretilme veya β globin zincirinin olmayışı ile kategorize edilir. β globin zincir eksikliği kırmızı kan hücrelerinde (RBC) azalma ve anemi ile sonuçlanır. Talasemilerin çoğu otozomal resesif olarak kalıtılır (Galanello ve Origa, 2010a).

Değişik klinik formları olan β -talasemi hastalığında; β -talasemi taşıyıcıları β globin geni allellerinden birinde meydana gelen mutasyonla sonuçlanır ve genellikle asemptomatiktir. Beta-talasemi majör en ağır formu olup, kan transfüzyonu gerektirir. Beta-talasemi intermedia ise tedavi taşıyıcı fenotipinden ağır klinik fenotipe kadar giden yelpazede klinik formları oluşturur(Thein ve ark., 1990).

β -talasemi otozomal resesif modelde kalıtılıp, heterozigot taşıyıcı anne ve babanın doğacak her çocuğunda; %25 oranında β -TM, %50 oranında asemptomatik taşıyıcı ve %25 oranında hastalıktan etkilenmemiş normal birey olarak doğma şansı vardır(Rani ve ark., 2013).

Beta-talasemi hem fenotipik hem de genetik heterojenite göstermektedir. Özellikle beta-talasemi majör hastalarında görülen fenotipik heterojenitenin altında farklı genetik modifiye edici faktörler ile epigenetik ve farmakogenetik ajanların etkili olduğu görülmektedir. Bu fenotipik değişikliklerden biri fetal hemoglobinin (Hb F) artmış düzeyidir. Hb F doğum öncesi ve doğumdan itibaren kısa bir süre total hemoglobinin %90 dan fazlasını oluşturur. Hemoglobin üretimi sırasında meydana

gelen globin zincir dengesizliği ve bozuklukları Hb F miktarında artışa neden olabilir. Eritropoietik stres ve hipoksik durum, Hb F artışına sebep olabilir. Gamma (γ) globin zincirleri, α globin zincirlerine bağlanarak α ve β globin zincirleri arasındaki dengesizliği önler. Fetal hemoglobinin ekspresyon seviyesinin yükselmesi talasemi hastalıklarında önemli bir terapötik yaklaşım oluşturur. Sitotoksik bazı ilaçlar; vinblastine, busufan, cytosine, arabinoside ve hidroksiüre, Hb F üretimini indükleyen ajanlar olarak bilinir (Munshi ve ark., 2015). Ayrıca genetik modifiye edici genler, globin zinciri dengesizliğini azaltarak hastalığın klinik şiddetini hafifletirler (Galanello ve Origa, 2010b).

Ayrıca günümüzde Hb F düzeyini artırma yönünde genetik ve epigenetik çalışmaların yanında, CRISPR/Cas9 genom düzenleme mekanizmaları, gen tedavi protokolleri çerçevesindeki çalışmalar devam etmektedir.

Genom bazında yapılan çalışmalarda önemli genetik mutasyon ve polimorfizmler belirlenmiştir. Bunlardan Xmn1-HBG2, HBS1L-MYB, SALL2 ve BCL11A'nın Hb F seviyelerindeki fenotipik çeşitliliğin büyük bir bölümünden sorumlu olduğu görülmüştür. Ayrıca Zinc Fingers ve Homebox 2 (ZHX2) ve TAL1 gibi transkripsiyon faktörleride γ globin promotorları ve LCR bağlanmaları ile HbF regülasyonunda potansiyel aday genler olarak görülmüştür (Munshi ve ark., 2015).

Tüm bu bilgiler ışığında gerçekleştirilen çalışmamızda; HbF indüksiyonunda birincil derecede hedef olan G-gamma ve A-gamma promotor bölgeleri, mutasyonlar bakımından DNA dizileme yöntemi ile normal kontrollere karşılık tarandı. Daha önce Türk popülasyonunda yapılmamış olan çalışmamızın sonuçlarının toplam verilerle değerlendirildiğinde, ortaya çıkacak sonuçların, ülkemizde yaşayan β -talasemi majör hastalarının, HbF'nin yükseltilmesi stratejisi ile hedeflenen tedavisi seçeneklerinde önemli genetik ve epigenetik hedefleri ortaya çıkaracağını düşünmekteyiz.

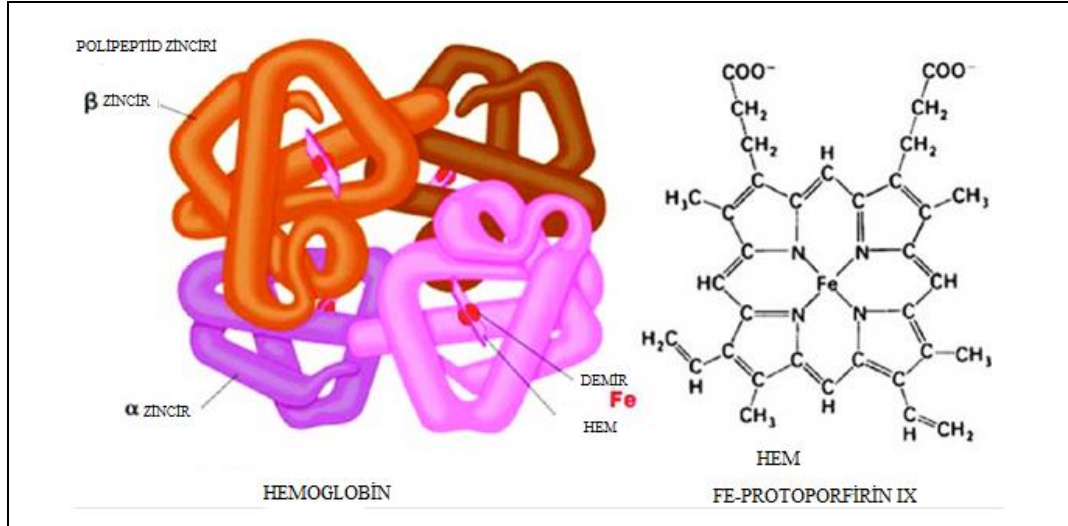
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hemoglobinin Yapısı ve Özellikleri

Hemoglobin molekülü çoğu omurgalılarda 2 α -ve 2 β -globin polipeptid zinciri içeren tetramerik globular bir proteindir. Her bir globular protein oksijen bağlayan demir içeren hem (demir protoporfirin IX) grubuna sahiptir. Türler arasında aminoasit içeriği bakımından farklılıklar gözlenir. İnsan hemoglobin molekülü α -zinciri 141 aminoasitten, β -zinciri ise 146 aminoasitten oluşur(Jensen ve ark., 1998).

Hemoglobin molekülünün ağırlığı 64,500 daltondur. Hemoglobin molekülünün hem grubu tüm hemoglobinlerde aynı olmasına karşın, globin zincirlerindeki aminoasitlerin cinsi sayısı ve sırasına göre farklılıklar görülmektedir(Huisman, 1993).

Yetişkin bireylerde hemoglobin molekülünün %95'inden fazlasını 2 α -ve 2 β -globin zinciri taşıyan Hemoglobin A1(Hb A1) molekülü oluşturur (Şekil 2.1). Globin zincirleri eritrositlerin sitozolünde sentezlenir. İki alfa (α -) ve 2 delta (δ)- globin zinciri içeren hemoglobin A2 molekülü ise toplam hemoglobinin %2,2-3,5' lük kısmı oluşturur. HbA2 molekülü oksijen taşıyıcılığı bakımından Hb A1'e göre daha zayıftır. İki α - ve 2 γ -globin zincirinden oluşan Hemoglobin F (Hb F) molekülü doğumdan hemen sonra bebeklerde %5-95 arasında değişkenlik gösterirken 6.aydan sonra seviyesi azalışa geçer. Normal yetişkinlerde Hb F seviyesi %1'den azdır. Oksijen transferinde HbA' ya göre oksijen afinitesi daha yüksektir(Thomas ve Lumb, 2012).

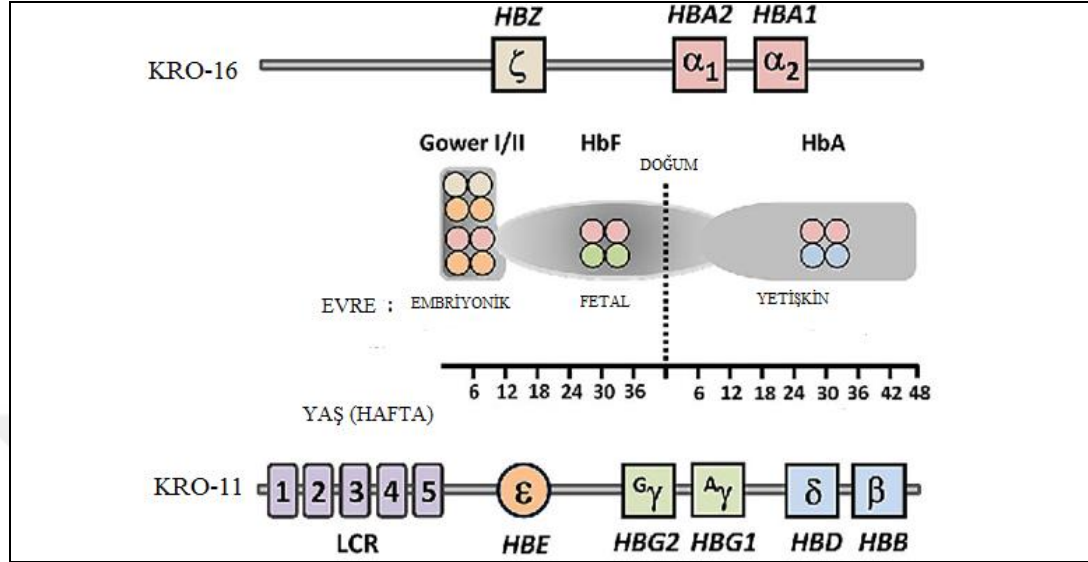


Şekil 2.1. İnsan hemoglobin molekülü yapısı (<http://blogs.dickinson.edu/mindmeetsmatter/2010/11/26/hemoglobin/>, Erişim tarihi : 21.03.2020)

Hemoglobinin primer fonksiyonu akciğerlerden dokulara oksijeni taşımak ve iletmektir. Oksijen molekülleri hem grubundaki demir atomuna geri dönüşümlü olarak bağlanır. Oksijene bağlı olan hem grupları oksijenin kısmi basıncına göre çeşitli şekiller gösterir. Oksijenasyon fazlaştıkça, daha fazla oksijen molekülü ile kombinasyon daha kolay hale gelir. 100 mmHg'lik bir kısmi oksijen basıncında kırmızı kan hücrelerindeki hemoglobin oksijene tamamen doymuş olur. Hemoglobin molekülü alt ünitelerinin düzenlenmesi, oksijenin olup olmasına göre konformasyonel farklılıklar gösterir. İnsan hemoglobinde oksijen molekülleri demir atomlarına bağlandığında, polipeptit zincirleri arasındaki boşluklar daralır. Yapısal olarak hemoglobin molekülü oksijenlenince büzülür, oksijen ayrılınca ise genişleme gösterir (Baldwin, 1975). Hemoglobin molekülünde oksijen atomu dışında demir atomu ile Nitrik Oksit (NO) ve Karbon Monoksit (CO) gibi diğer moleküllere de bağlanır. Karbonmonooksitin demir atomu ile bağlanımı oksijen atomuna göre daha sıkı olur. Karbonmonooksitin hemoglobin molekülü ile birleşmesiyle oluşan karboksihemoglobin molekülü hiçbir şekilde tekrar oksijen molekülü ile bağlanamaz.

Globin genleri, alfa benzeri ve beta benzeri gen ailesi olarak, alfa globin zincirlerine ait genler 16. kromozomun kısa kolu (16p13.3) üzerinde bulunurken, β- globin zincirlerine ait genler 11. kromozomun kısa kolu (11p15.5) üzerinde bulunur. Hemoglobin molekülünü oluşturan globin zincirlerinin tipleri, insanın gelişim basamaklarında farklılıklar göstermektedir. İnsanın embriyosunda oksijen taşınımı

Hb Portland ($\zeta\gamma_2$), Hb Gower I ($\zeta\varepsilon_2$) ve Hb Gower II ($\alpha_2\varepsilon_2$) molekülleri ile yapılırken, daha ileri gelişim olan fetusta fetal hemoglobin (HbF $\gamma_2\alpha_2$), doğumla birlikte HbA1 ve HbA2 şeklinde değişim gösterir (Şekil 2.2) (Güngör ve ark., 2011).



Şekil 2.2. Embriyodan yetişkine hemoglobinin dönüşümü (Wilber ve ark., 2011a)

2.2. Hemoglobinopatiler

Dünya genelinde görülen monogenik majör sağlık problemlerinden biri olan hemoglobinopatiler yoğun olarak Akdeniz'e kıyısı olan ülkelerde görülmekle birlikte, Asya ve Afrika'da da yoğun olarak görülmektedir. Uluslararası göçlerle hemoglobinopatiler dünya genelinde geniş bir yayılım alanı göstermiştir (Kohne, 2011).

Genetik kökenli hemoglobin bozukluğundan kaynaklanan hemoglobinopatiler, temel olarak iki gruba ayrılırlar. Bunlar; talasemi sendromları ve yapısal hemoglobin varyantları (anormal hemoglobinler)dir. Her iki hastalık grubunda α ve β globin genlerinde nokta mutasyonundan delesyonlara kadar farklı mutasyonlardan kaynaklanır. Hemoglobinin sentezinden kaynaklanan bozukluklar talasemileri oluştururken, hemoglobinlerin yapısal bozuklukları ise anormal hemoglobinleri oluştururlar (Weatherall ve Clegg, 2001; Herklotz ve ark., 2006; Kohne ve Kleihauer, 2010).

2.2.1. Alfa-Talasemi

Alfa talasemiler; α -globin zincir sentezi eksikliğinden kaynaklanır. Moleküler seviyede dört α -globin geninden bir tanesinde veya çoğunda meydana gelen kısmi ya

da total mutasyonlar sonucunda oluşurlar. Afrika, Arap Ülkeleri ve daha sıklıkla Güney Doğu Asya'da görülür(Weatherall ve Clegg, 2001).

Alfa talasemilerden hepsi prenatal olarak görülen; α -talasemi minima kan sayımında hafif hipokromik anemi ile karşımıza çıkar. Dört alfa geninden 3 tanesinin delesyonu ile ortaya çıkan Hb H hastalığında, orta derecede hipokromik hemolitik anemi ve splenomegali görülür. HbH hastalığı, alfa talasemi intermedia olarak da bilinir. Viral enfeksiyonlar ve bazı ilaçlar anemik krizlere neden olurlar. Komplikasyonlar arasında safra kesesi taşları, kalp sorunları, bacak ülserleri ve folik asit eksikliği görülür. Hb Bart's Hidrops Fetalis ise, 4 α -globin zincirinin olmayışı ile ortaya çıkar ve prenatal dönemde ciddi hemolitik anemi görülür(Weatherall ve Clegg, 2001; Higgs ve Weatherall, 2009).

2.2.2. Beta-Talasemi

Genel anlamda beta-talasemi, klinik olarak tanımı yapılmadan önce, Akdeniz Bölgesi ve Güneydoğu Asya'da görülmüş olan çok yaygın bir genetik hastalık şeklinde karşımıza çıkmaktadır. İlk defa 1925'te klinik olarak tanımlanmıştır. Otozomal resesif ve tek gen hastalığı olduğundan, 3 farklı klinik tip oluşturur. Tek allelde mutasyon taşıyan beta-talasemi taşıyıcıları, her iki allelde mutasyon ağırlığına göre ise beta-talasemi majör ve beta-talasemi intermedia fenotipi ortaya çıkmaktadır.

2.2.3. Beta-Talasemi Majör

Beta-talasemi majör hastaları hayatta kalmaları için ilk iki yıl düzenli kan transfüzyonuna ihtiyaç duyarlar. Daha sonraki yıllarda kan transfüzyonuna ihtiyaç duyulmayan durumlarda talasemi intermedia tanısı alırlar. Talasemi majör ve talasemi intermedianın klinik olarak ayrımı oldukça önemli olmasının nedeni, talasemi intermedia hastalığında gereksiz kan transfüzyonunun engellenmesi, talasemi majörde ise erken kan transfüzyonunun başlaması için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle talasemin bu iki tipi arasındaki ayrım oldukça önemlidir. Beta-talasemi majörlü bebekler gelişme geriliğine bağlı olarak, soluk bir hal alırlar. Beslenme problemlerinin eşlik ettiği durumlarda tekrarlayan ateş nöbetleri, ishal, sinirlilik ve splenomegali gelişebilir. Doğumdan itibaren düzenli kan transfüzyonunda ile hemoglobin seviyeleri 9.5-10.5 g/L seviyelerinde tutulması ile 10-11 yaşına kadar normal bir gelişim özelliği gösterip, daha sonrasında ise vücutta biriken aşırı demir yüküne karşı demir şelasyonu terapisi uygulanmaktadır(Cao ve Galanello, 2010).

Demirin vücutta aşırı birikmesi sonucunda gelişme geriliği, cinsel olgunlaşma bozuklukları ve özellikle kalp, karaciğer ve endokrin bezleri etkileyen Hemogloblin E ile ilişkili kalıtsal hemakromatozis ve nadir olarak enfeksiyöz komplikasyonlar eşlik eder. Diğer görülen komplikasyonlar arasında, düzensiz ve geç başlanılan kan transfüzyonuna bağlı olarak, gelişen hipersplenizm, splenektomi sonrası görülebilen venöz tromboz ve osteoporoz görülür(Origa ve ark., 2005; Voskaridou ve ark., 2006). Hepatoselüler karsinom gelişme riski viral enfeksiyonlar nedeniyle artış gösterir(Borgna-Pignatti ve ark., 2004b).

Transfüzyonu düzenli yapılmış ve uygun demir şelasyonu tedavisiyle sağ kalım yaşı 30 yaşın üzerine çıkmıştır. β -talasemide vücutta demir birikimi sağ kalımı sınırlayan en önemli komplikasyon olarak görülür. β -Talasemi majörde kardiyak komplikasyonlar ölümlerin %71'den fazlasını oluşturur(Borgna-Pignatti ve ark., 2004a).

Gelişmekte olan bazı ülkelerde kan transfüzyonunun yetersiz oluşu nedeniyle, etkilenmiş hastalarda β -talaseminin klasik görünümü oluşur. Bunlar arasında, büyüme geriliği, deride kahverengi pigmentasyon birikimi, hepatosplenomegali, genu valgum, zayıf kas gelişimi, bacak ülserleri, kemik iliği genişlemesinden kaynaklı olarak iskeletsel değişiklikleridir. Bacak kemiklerindeki deformiteler ve maxiller hipertrofi, malar kemik belirginliği, üst dişlerin belirginliği, burun köprüsü çöküntüsü gibi kraniofasial deformiteler kemik yapıdaki oluşan değişimlerini kapsar(Weatherall ve Clegg, 2001).

2.2.4. β -Talasemi İntermedia

Beta-talasemi majörden sonra gelen en önemli talasemi hastalığı olan beta-talasemi intermediada, genellikle hafif bir anemi tablosu görülürken, bu hastalar kan transfüzyonuna genellikle ihtiyaç duymazlar veya bazı zamanlarda ihtiyaç duyarlar. Beta-talasemi intermedialı hastalarda klinik bulguların ortaya yaşı değişken olup, ağır tipinde bile 2 ile 6 yaş arası genellikle düzenli kan transfüzyonu olmadan hayatta kalabilmektedirler. Öte yandan klinik olarak bu hastalığı hafif geçirenler yetişkinlik çağına kadar asemptomatiktirler. Genellikle hafif bir anemik tablo dışında başka bir belirti görülmez. Klinik görünüm olarak yüz ve kemiklerde karakteristik değişiklikler, uzun kemiklerin patolojik kırıkları, osteoporoz ve öncelikle dalağı etkileyen karaciğer, lenf düğümleri, göğüs ve omurgalarda görülebilen eritropoetik

kitleler görülür. Ekstramedüller eritropoez intratoraksik kitleler ve spinal kord sıkışması ile gelişen paraplezi gibi nörolojik problemlere yol açabilir. Kan dolaşımındaki hasar görmüş kırmızı kan hücreleri temizlenmediğinden dolayı dalakta genişleme görülür. Sonuçta etkisiz eritropoez ve periferik hemoliz etkisiyle talasemi intermedia hastalarında talasemi majörlülere göre safra kesesi taşları daha sık görülür(Galanello ve ark., 2001). Özellikle splenektomi geçirmiş talasemi intermedialı hastalarda, talasemi majörlülere göre, daha fazla tromboz eğilimi (derin ven trombozu, portal ven trombozu, felç, pulmoner emboli) ve bacak ülserleri görülür(Taher ve ark., 2008).

Talasemi intermedialı hastalar her ne kadar vücutta aşırı demir birikimi nedeniyle hipogonadizm, hipertroidizm ve diyabet gibi hastalıklar bakımından risk altında olsalarda bu hastalıklar yaygın görülmez(De Sanctis ve ark., 1998). Beta-talasemi intermedialı kadın hastalar, kan tranfüzyonun yeterli olduğu durumlarda, hamilelik bakımından herhangi bir problem yaşamazlar. Fakat; kan transfüzyonunun yeterli olmadığı durumlarda, eritrosit otoantibadileri ve hemolitik alloantibadilerin gelişme riski vardır(Nassar ve ark., 2008). Kalp tutulumu ve pulmoner hipertansiyon görülürken, sistolik sol ventrikül fonksiyonu genellikle korunmuştur(A. Aessopos ve ark., 2005). Vasküler yaygın bir bağ dokusu hastalığı olan arteriyel duvarlarda elastik lamina degradasyonu ve kalsiyum birikmesi ile görülen pseudoksantoma elasticum, bu hastalarda görülmüştür (Aessopos ve ark., 2002).

2.2.5. β -Talasemi Minör

Beta-talasemi minör taşıyıcıları klinik olarak genellikle belirti vermezken bazı vakalarda hafif bir anemi izlenir. Evlilik öncesi yapılan prenatal testlerde eğer anne ve babanın her ikisinde taşıyıcı ise doğacak her bir çocuğun talasemi majörlü olma olasılığı %25'tir (Galanello ve Origa, 2010b).

2.3. β -Talaseminin Moleküler Patolojisi

Gelişimin her aşamasında α ve β globin zincir üretimi dengededir. β globin sentezi normal olarak iki gen tarafından kontrol edilir. Bir geni etkileyen bir mutasyon genellikle klinik olarak bireyi etkilemezken her iki gende meydana gelen mutasyonda ise şiddetli anemi görülür. Yetişkin bireylerdeki başlıca patofizyolojisi α globin zincir üretimi karşısında yetersiz β -globin zinciri üretimidir. Eritrosit prekürsör hücrelerde beta-globin zinciri yetersiz üretime karşı α -globin zincirinin

aşırı birikimi diseritropoeze neden olur. Ayrıca olgun kırmızı kan hücrelerinde membran hasarına ve hemolize yol açar. Eritropoezdeki bu değişiklikler ikincil değişikliklere (şiddetli anemi, kemik iliği genişlemesi, splenomegali, kemik deformiteleri, demir birikimi ve hipermetabolik durum) ve organ hasarına yol açar(Weatherall ve Clegg, 2001).

Hemoglobin tetramerinde β globin zincirlerinin az oluşu veya olmayışı ile karakterize edilen β Talasemi (Makis ve ark., 2016) klinik olarak taşıyıcılıktan transfüzyona bağımlı olarak değişkenlik gösterir(Musallam ve ark., 2013).

Beta-talasemi hastaları arasında benzer moleküler bozukluklar görülmesine rağmen, fenotipik farklılar görülmektedir. Hastalığın klinik şiddeti hastalar bazında değişebilmektedir. Beta-talasemi majörlü bazı hastalar, düzenli olarak kan transfüzyonu almaları gerekirken, bazı hastalar ise (beta-talasemi intermedia gibi) düzenli kan transfüzyonu gerektirmeden yaşamlarına devam edebilmektedir(Joanna ve Jim, 2008).

Beta-globin geninde 200'den fazla farklı mutasyonlarla β -talasemi klinik tablosu ortaya çıkmıştır. Mutasyonların büyük çoğunluğu tek nükleotit polimorfizmleri, oligonükleotit eklenmesi, delesyonu ve çerçeve kayması mutasyonları yoluyla olmaktadır. Nadir olarak da büyük gen delesyonları yoluyla oluşur(Giardine ve ark., 2007).

Beta-talasemi majörde, α -globin zincirlerinin aşırı birikimi ve serbest demir atomu birikimi oksidatif hücre hasarına ve erken hücre ölümüne yol açan reaktif oksijen türlerinin oluşumunu katalize eder. Bu nedenle etkisiz eritropoez ve eritrositlerin hemolizi ile sonuçlanır(Nienhuis ve Nathan, 2012).

Şiddetli anemi eritropoietin üretimini arttırarak kemik iliği genişlemesini arttırır. Bunun sonucunda da yüz ve kafatası bölgesinde kemik deformiteleri ve uzun kemiklerde patolojik kırıklara sebep olur(El Kababi ve ark., 2019).

2.4. Beta-Talaseminin Epidemiyolojisi

Dünya genelinde insan popülasyonunun yaklaşık %1,5'lik kısmında β -talasemi taşıyıcılığı tahmin edilmektedir. Yılda yaklaşık 60.000 kadar yeni doğan çocuk bu hastalıktan etkilenmiş olarak dünyaya gelmektedir (Modell ve Darlison, 2008).

Dünya üzerinde genel olarak Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu, Hindistan ve Güney Çin gibi coğrafi bölgelerde yoğunlaşmalar görülmektedir (Weatherall, 2010). Bu coğrafi bölgelerin birçoğunda talaseminin varlığı, akrabalık bağı ile ilişkili görülmüştür (Bittles ve ark., 1991; Weatherall, 2010). Yapılan bazı çalışmalarda öne sürülen Falciparum Malarianın (Malarya hipotezi) bulunduğu coğrafi bölgelerde α ya da β -talasemi görülme sıklığı benzerlik göstermektedir (Weatherall ve ark., 2010).

Dünya genelinde özellikle gelir düzeyi düşük ülkelerdeki hastaların tedavileri düzenli yapılmadığı için ölümlere sıkça rastlanır. Ölümün engellenmesi için ülkelerin sağlık politikalarında önemli değişiklikler yapması gerekir (Weatherall, 2010). Dünya üzerinde yaşanan göçler, β -talasemi hastalığının dağılımına etki ederek, daha önceden seyrek görülen Kuzey Avrupa, Avustralya ve Kuzey Amerika'da artık yoğun hale gelmiştir. Bu nedenle bu coğrafi bölgelerde prenatal tanı, genetik danışma ve düzenli tedavi gerekli hale gelmiştir. Uluslararası Talasemi Federasyonu (TIF), dünya genelinde en az 200.000 talasemili hastanın düzenli tedavi gördüğünü bildirmektedir. Bu sayı, kayıtlı tedavi gören hastaları kapsadığından, gerçek anlamda tedavi ihtiyacı olan hasta sayısının daha yüksek olduğu tahmin edilmektedir (Higgs ve ark., 2012).

2.5. Antalya'da β -Talasemi Majör

Türkiye'de β -TM ve diğer hemoglobinopatiler dahil, yaklaşık 5500 hasta bulunduğu bildirilmiştir (Canatan, 2014). β -TM sıklığı bölgeler arasında oldukça değişkenlik göstermektedir (Guvenc ve ark., 2012). Türkiye genelinde beta-talasemi taşıyıcılık oranı %2'lerde olup, bu oran bazı Akdeniz ve Güney ve Güneydoğu bölgelerimizde %10-13'e kadar çıkmaktadır (Nazlı Başak, 2007). Dünyada olduğu gibi, Türkiye popülasyonundada β -TM hem fenotipik hem de genetik heterojenite göstermektedir. Yapılan birçok çalışmada, heterojen genetik bulgular içinde IVS.I.110 (G>A) mutasyonu en yaygın mutasyon olarak tespit edilmiştir (Ulasli ve ark., 2015).

Antalya, Akdeniz Bölgesinde bulunan ve Türkiye'de beta-talasemi başta olmak üzere, hemoglobinopatilerinden sık görüldüğü şehirdir. Antalya popülasyonuna yönelik yapılan bir çalışmada beta-talasemi ile ilişkili olduğu bulunan 16 farklı mutasyon saptanmış, bunlar içinde %44,4'lük bir oran ile IVS.I.110 (G>A) mutasyonu en yüksek sıklıkta görülen mutasyon olmuştur (Keser ve ark., 2004; Mendilcioglu ve ark., 2011).

Antalya ve çevresini kapsayan bölgede, hemoglobinopatilerin çözümsel yaklaşımla önlenmesi ve takibine yönelik, halka eğitim programları, klinik tarama ve laboratuvar tanısı için prenatal ve postnatal yönde birçok araştırma yapılmıştır. Keser ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada 103 fetüs üzerinden yapılan taramalar sonucunda; β -talasemi açısından 26 etkilenmiş fetüs bulunmuş olup, bunlardan 25'inin β -TM ve 1'inin ise Hemoglobin S/B Talasemi birlikteliği olduğu belirlenmiş, IVS.I.110 (G>A) mutasyonu %50,4 oran ile en sık görülen allel olduğu bildirilmiştir. Aynı çalışmada, endikasyonu olan anneler nedeniyle incelenen B-TM genotipli 26 fetüsten birinde 46,XY/47,XY,+22 mozaik karyotip izlenirken, diğer taraftan etkilenmemiş fetüslerden birinde 45,X Turner sendromu karyotipi görülmüştür(Keser ve ark., 2005). Yapılan çalışmalarda beta-talasemi majör olup, dizi analizi ve RDBH yöntemleri ile mutasyon belirlenememiş olan 31 hasta üzerinden GAP-PCR metoduyla yapılan bir çalışmada Türk tipi inv/delesyon ($\delta\beta$) mutasyonunun, daha önceden tespiti yapılmış olan tüm mutasyonların %1,5'ini kapsadığı görülmüştür(Bilgen ve ark., 2016b). Öney ve arkadaşlarının, β -talasemi taşıyıcılarında; β globin geni mutasyon tipi ve hematolojik fenotip arasındaki ilişkiyi ortaya koyan bir çalışmada toplam 84 beta-talasemi taşıyıcısında IVS I-110 (G $\rightarrow$ A), IVS II.745 (C $\rightarrow$ G), IVS I-1 (G $\rightarrow$ A), Cod.39 (C $\rightarrow$ T), IVS I-6 (T $\rightarrow$ C), IVS II-1 (G $\rightarrow$ A), Cod 5 (-CT), Cod 8 (-AA) ve Cod 44 (-C) mutasyonları incelenmiş olup, olguların 45'inde Beta⁺ mutasyonu, 39'unda ise Beta⁰ mutasyonu görülmüştür. Beta⁺ grubunda hematokrit değerleri daha yüksek bulunurken, Beta⁰ grubunda ise Hb F ve Hb A2 değerlerinin daha yüksek olduğu görülmüştür. Sonuç olarak, β -talasemi taşıyıcılığında genotipin, hematolojik fenotip üzerinde etkili olduğu bildirilmiştir(Öney ve ark., 2008).

β -talasemi majör riski bulunan gebelere ilişkin Antalya merkezli yapılan bir prenatal tanı çalışmasında, 407 fetüsten koryonik villus örnekleri kullanılarak yapılan moleküler genetik analizleri sonucunda; 105 fetüs (%25,8) hasta, 201 fetüs (%49,4) taşıyıcı ve 101 fetüsün ise (%24,8) normal olduğu bildirilmiştir(Mendilcioglu ve ark., 2011). β -TM hastalığı bakımından fenotipik bulgular veren ve aynı zamanda Down Sendromlu olan bir çocuğa yapılan mutasyon taramasında, IVS.1.110(G-A)/IVS.2.745(C-G) birleşik heterozigot genotipi bildirilmiştir (Keser ve ark., 2001).

2.6. Beta-Talasemide Moleküler Genetik Analiz

Tüm hemoglobinopatilerde olduğu gibi, beta-talasemi içinde bir popülasyonda az ya da sınırlı sayıda mutasyonların varlığı, moleküler genetik analizleri oldukça kolaylaştırmıştır. Bu da o popülasyonda genetik taramayı hızlandırmıştır. Sık görülen beta-talasemi mutasyonları daha çok PCR tabanlı testler ile analizi yapılmaktadır. En sık kullanılan yöntemler Reverse Dot Blot Hibridizasyon (RDBH) analizi ve popülasyonlarda sık görülen mutasyon bölgelerine spesifik Allel Spesifik Oligonükeotid Hibridizasyonu gibi tamamlayıcı prob ya da primer yardımıyla yapılan amplifikasyonlardır (Al-Mosawy, 2017). Beta-talasemideki en yaygın mutasyonlar nokta mutasyonlar olduğundan, teyit için ihtiyaç duymaksızın altın standart (Gold Standart) yöntem DNA dizi analizidir. Bu yöntem aynı kökenden gelen ve birbirine dizi benzerliği gösteren globin genlerini ayırt etmede de işe yaramaktadır.

2.7. Hemoglobın F Yapısı ve Özellikleri

Hemoglobın molekülünü oluşturan farklı globin genleri, atasal bir globin molekülünün milyonlarca yıl içerisinde geçirmiş olduğu gen duplikasyonları, konversiyonları, kromozomlar arası translokasyonlar ve DNA düzeyindeki mutasyonlar sonucu evrimleşerek çeşitlenmiş ve globin gen ailesini ortaya çıkararak farklı globin genleri şeklinde günümüzdeki halini almıştır(Hardison, 2012). Günümüze kadar ulaşan ve halen farklı mutasyonlarla karşımıza çıkan farklı hemoglobın molekülleri, yaklaşık 450 milyon yıl önce ilkel formlarından farklılaşarak bugünkü halini almıştır. Örneğin, fetal hemoglobini oluşturan gamma globin genleri (HBG1 ve HBG2); HBB geninin duplikasyonu sonucu olmuştur. Beta-benzeri globin genleri olarak; embriyonik epsilon geni, HBG1 ve HBG2 globin genleri, HBD ve HBB geni 11. kromozomun kısa kolunda yer alırlar (11p15) (Steinberg ve Thein, 2013).

Gamma globin genleri, ekzonlarındaki kodon farklılıklarıyla birbirinden ayrılırlar. HBG1 (A-Gamma globin)'de 136. kodon Alanini kodlanırken, HBG2 (G-Gamma globin)'de Glisini kodlanır(Adachi ve ark., 1990). Gamma globin zinciri 39 ya da 40 aminoasit bakımından β -globin zincirlerinden farklılık gösterir. Bu durum Hb A'nın Hb F'e kıyasla alkali direncini artırır(Slightom ve ark., 1980). HBG1'de kodon 75'te izolösinin treoninle yer değiştirdiği yaygın hemoglobın varyantı, Hb Sardinia olarak

bilinir. HbF, oksijen afinitesi bakımından hemen hemen bütün memelilerde erişkin hemoglobinine göre, daha yüksek bir oksijen afinitesine sahiptir. Yapısal olarak neredeyse aynı olmasına rağmen, fetüs ve yetişkinlerde HBG1 ve HBG2 farklı seviyelerde eksprese edilir. Yenidoğanlarda gamma globin zincirlerinin yaklaşık 2/3'ünü G-gamma globin oluştururken, kalanını A-gamma globin oluşturur. Bu oran, gamma-beta globin zincir üretimine geçiş sırasında düşer ve yetişkin eritroid hücrelerinde neredeyse tersine çevrilir(Steinberg ve Thein, 2013).

2.7.1. Hemoglobin Dönüşümünün Temeli

Gebeliğin 8. haftasından sonra, fetüste HB F predominant hemoglobin haline gelir ve gebeliğin ortasına kadar artmaya devam eder. Daha sonra, HbF seviyesi azalışa geçer. Doğumdan 6 ay sonra, Hb F aşamalı olarak Hb A ile yer değiştirir. Fetal hemoglobinden yetişkin hemoglobinine geçilen bu süreçte, HBB ekspresyonu artarken, HBG ekspresyonu düşer. Tüm insanlar yaşamları boyunca HbF'i eser miktardada olsa sentezlenmeye devam ederler. Bu durum terapötik yaklaşımlar için bir temel oluşturur(Steinberg ve Thein, 2013).

HbF'in HbA'ya dönüşü esnasında bir çok genetik faktör devreye girer(Bauer ve ark., 2012; Sankaran ve Orkin, 2013). Gamma globin gen ekspresyonunun düzenlenmesinde KLF11 (Krüppel Like Factor 1), BCL11A (B Cell Lymphoma 11 A), ZBTB7A (Zinc Finger ve BTB domain containing 7A) ve MYB (Myeloblastosis Protooncogene) gibi transkripsiyon faktörlerinin birbirleri ile etkileşimi ve GATA 1(Erythroid Transcription Factor 1) ve diğer ko-reseptör komplekslerinin dahil olduğu kromatin modeling ve epigenetik modifiye edici genler etkilidirler(Ginder, 2015).

HbF'in HbA'ya dönüşümü sırasında, beta benzeri genleri kontrol eden LCR (Lokus Kontrol Bölgesi) ile gamma globin geni promotor bölgesinin etkileşimi kritik rol oynar. Bununla birlikte, LCR ve β -globin genindeki hipersensitif diğer alanlar, hemoglobinin değişiminde önemli rol oynayabilirler(Shen ve ark., 2018). LCR, ilmeklenme (looping) ile sürdürülmüş gamma globin genlerinin promotorlarına etki edip, gen ekspresyonun artışını sağlayarak, HbF üretiminde artışa ve yetişkin hemoglobin olan HbA1 miktarında düşüşe sebep olmak üzere, tekrar aktive edebilir(Deng ve ark., 2012; Breda ve ark., 2016). Her ne kadar tam olarak netleşmezse HbF gen regülasyonunun anlaşılması, bazı sağlıklı yetişkin bireylerde HbF'in neden normalden yüksek olduğu konusunda yeterli veri sunmuş ve terapötik

HbF reaktivasyonu için yeni stratejiler geliştirilmesini sağlamıştır(Perrine, 2006; Bauer ve ark., 2012).

2.7.2. Yetişkinlerde Hb F Artışının Sebepleri

Yetişkinlerde artmış olan HbF seviyeleri için bir dizi kazanılmış ve kalıtsal olan bulgular mevcuttur. Yetişkinlerde artmış HbF seviyesi ile ilişkili kalıtsal koşullardan birisi, primer olarak genetik varyasyon ve mutasyonlar yoluyla oluşan kalıtsal kalıcı fetal hemoglobin (HPFH)dir. Orak hücreli anemi ve talasemi ile ilişkili HbF artışları ise, kalıtsal genetik varyasyonla modüle edilen bu hastalıkların, eritropoez stresi ve hemoliz karakteristiğine ikincil tepkilerden oluşurlar(Steinberg ve Thein, 2013).

Daha önce yapılan çalışmalardan elde edilen veriler doğrultusunda kalıtsal kalıcı fetal hemoglobin ile ilişkili gamma globin promotor bölge mutasyonlarının çoğunun tek nükleotit polimorfizm mutasyonları olduğu görülmüş olup, sık görülenler Tablo 2.1’de verilmiştir.

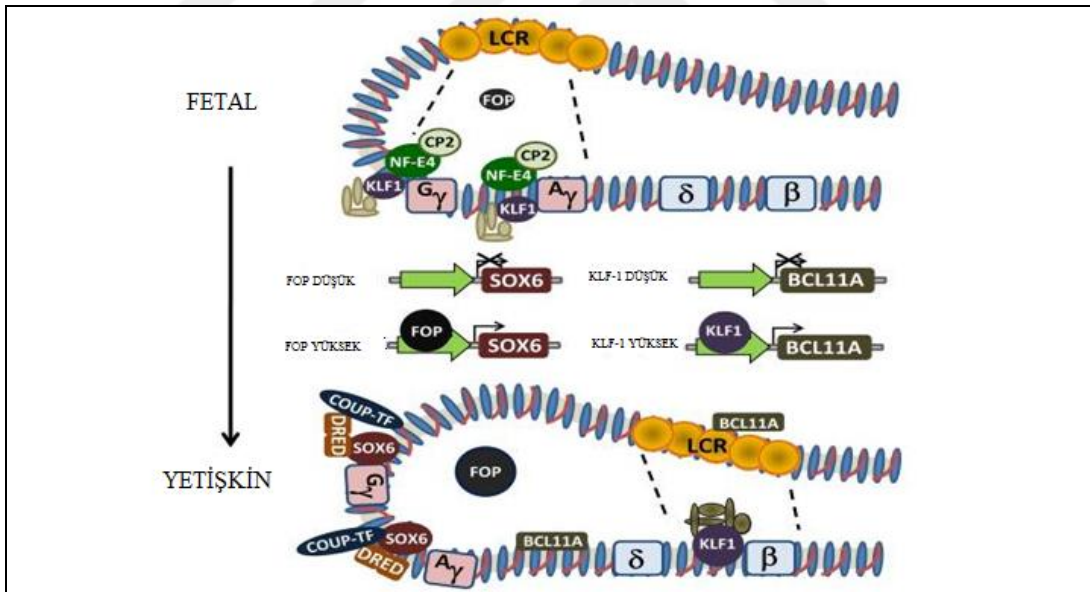
Tablo 2.1. Gamma globin promotor bölgesinde sık görülen tek nükleotit polimorfizmleri(Gumucio ve ark., 1988; Costa ve ark., 1990)

Gamma globin promotor bölgesi	Tek nükleotit polimorfizmi
G γ Globin promotor bölgesi	-202 (C>G)
	-158 (C>T)
A γ Globin promotor bölgesi	-202 (C>T)
	-198 (T>C)
	-196 (C>T)
	-175 (T>C)
	-117 (G>A)

2.7.3. Hb F Yapımını Etkileyen Genler

G-gamma globin geni promotor bölgesi -158. pozisyonundaki C>T değişimi, Xmn-1 (Xanthomonas maniholis-1) restriksiyon enzim kesimi polimorfizmini göstermektedir. Bu polimorfizmin, hematopoetik stres altındaki yetişkinlerde HbF üretimini arttırdığı görülmüştür. ZHX2 (Çinko-Parmak ve Homeoboxes 2) geni,

gamma globin gen ekspresyonunu düzenleyen bir aday gen olarak görülüp, yapılan farklı çalışmalarda, ZHX2'nin gamma globin geninin baskılanmasında rol oynadığı bildirilmiştir. BCL11A, HbF seviyelerini modüle ederek hemoglobin bozukluklarını iyileştirmeye yardımcı olabileceği ortaya konmuştur. KLF-1'in ekspresyonunun azalışı ile gamma globin gen ekspresyonunun arttığı, bu nedenle KLF-1'in fetalden erişkine geçişte önemli bir rolü olduğu ileri sürülmektedir. HBSL1-MYB, MYB'nin eritropoezde kritik bir rolü olduğu görülmekte, bunu KLF-1 ekspresyonunun transaktivasyonu ile gerçekleştirdiği bildirilmektedir. GATA-1 ise, gamma globin promotor bölgesinde meydana gelen bazı nokta mutasyonlar nedeniyle buraya bağlanmasının azalması sonucu, baskılayıcı özelliğini kaybederek, HbF seviyesinde artışa neden olduğu görülmüştür. FOP (Friend of Protein); FOP geninin susturulmasının, eritroid progenitör hücrelerinde gamma globin geninin ekspresyonuna ve HbF üretiminin artışına sebep olduğu bildirilmiştir. SOX6 (Sex Determining Region X-box 6)'nın ise, embriyonik globin genlerinin susturulmasında önemli rol oynadığı ifade edilmektedir (Şekil 2.3) (Munshi ve ark., 2015).



Şekil 2.3. Globin geni promotor bölgesinin Lokus Kontrol Bölgesi (LCR) ile interaksyonu ve ilmeklenmesi ile Hemoglobin dönüşüm modeli (Wilber ve ark., 2011b)

Bütün bu güncel bilgiler ve veriler ışığında, biz de bu çalışmamızda; HbF'i yüksek olan beta-talasemi majörlü hastalarda, DNA dizi analizi ile A-gamma ve G-gamma globin genlerinin promotor bölge mutasyonlarını araştırmayı ve yüksek HbF ile ilişkisini ortaya çıkarmayı amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Projemiz “Antalya’da Beta Talasemi Majör Hastalarında Gamma Globin Promotor Bölge Mutasyonları 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) Pandemisinin 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 β talasemi majör tanısı almış ve HbF değeri yüksek ($Hb F > \%2$), transfüzyon tarihlerine göre merkeze gelen 30 hastadan, transfüzyon öncesi EDTA’lı 5’er ml periferik kanlar toplanmaya başlandı. Hastalardan ve kontrol grubundan aldığımız ve genomik DNA izolasyonu yapılacak periferik kanlar, taze olarak çalışılmadığından -20°C ’de saklandı. Kontrol grubu için ise aynı merkezden ve Organ Nakli Merkezi’nden 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, genomik DNA elde edilmeye gidildi.

3.1. Hasta Seçimi

Projemiz, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayını aldıktan sonra Adem Tolunay Talasemi Merkezinden β Talasemi tanısı almış HbF değeri yüksek ($Hb F > \%2$) 30 hasta ve yine aynı merkezden ve Organ Nakli Merkezi’nden transplantasyona hazırlanan hastalara donör olan kan parametreleri normal aralıklarda olan araştırmaya katılmak isteyen ve

imzalı Aydınlatılmış Onam Formu (EK-1) alınan 30 sağlıklı bireyden 5 ml'lik periferik kan EDTA'lı tüplere alınarak genomik DNA elde edildi.

Genomik DNA eldesi için tuzla çöktürme yöntemi ve Pure Link Genomik DNA Mini Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) kullanıldı. DNA eldesi Pure Link Genomik DNA MiniKiti talimatlarına uygun olarak yapıldı. İşlemler ana başlık olarak sırasıyla; lizis tamponları yardımıyla hücre zarının parçalanması ve hücre içeriğinin açığa çıkarılması, proteaz ile hücre proteinlerin uzaklaştırılması, alkolle çöktürülen DNA'nın yoğunlaşarak görünür hale getirilmesi ve daha sonrasında spin kolonda membrana bağlanmış olan DNA'nın elüsyonu basamaklarından oluşmaktaydı.

3.2. DNA İzolasyonu

3.2.1. Kit ile DNA İzolasyonu

1. Su banyosu (Nüve) 55°C ye ayarlandı.
2. EDTA lı tüplere eklenen 200 µl lik Periferik kan alt üst edilerek 2 ml lik ependorf tüplerine konuldu.
3. Üzerine 20 µl lik Proteinaz K eklenerek pipetaj yapıldı.
4. Üzerine 20 µl RNase A eklenerek pipetaj yapıldı ve oda ısında 2 dk inkübasyona bırakıldı.
5. Üzerine 200 µl Lizis buffer eklenerek solüsyon homojenize olana kadar iyice karıştırıldı.
6. Proteinlerin iyice parçalanması için 55°C lik su banyosunda 10 dk inkübasyona bırakıldı.
7. Elde edilen Lizata 200 µl absolu ethanol eklenerek iyice vortekslendi (Boeco, Germany).
8. Sonrasında elde edilen karışım filtreli kolona eklenerek 10.000 rpm'de 1 dk, oda sıcaklığında santrifüj (Boeco, Germany) edildi, toplama tüpü atıldı.
9. Filtreli kolon temiz bir toplama tüpüne aktarıldı.

10. Üzerine 500 µl yıkama solüsyonu WB 1 eklenerek, 10.000 rpm de 1 dk santrifüj edilerek toplama tüpleri atıldı.

11. Üzerine 500 µl yıkama solüsyonu WB 2 eklenerek, oda sıcaklığında maximum hızda 3 dk santrifüj edildi ve toplama tüpleri atıldı.

12. Sonra filtreli kolon, 1,5 ml lik steril ependorf tüplerine aktararak üzerine 100 µl'lik elüsyon buffer eklendi.

13. Daha sonra oda sıcaklığında, 1 dk inkübe edilerek, maximum hızda 1 dk santrifüj edildi ve DNA'nın filtreden ayrılarak kolona geçmesi sağlandı.

14. Elde edilen DNA'lar -20°C (Bosch DeepFreezer)de saklandı.

3.3. DNA Örneklerinin Spektrofotometre ile Ölçümü

Elde edilen DNA örneklerinin miktar ve saflığı nanodrop cihazı (Quawell 9000, USA) ile ölçülerek sırasıyla 260 nm ve 280 nm dalga boylarında spektrofotometrik olarak ölçümleri yapıldı. Saflık oranı OD 260/OD 280 formülüne göre DNA konsantrasyonu, DNA miktarı OD 260 X Sulandırma katsayısı X 50 formülüne göre hesaplandı.

3.4. PCR Yöntemi ile A γ ve G γ -Globin Promoter Bölgelerinin Amplifikasyonu

Gamma globin promoter bölgelerini çoğaltmak için iki çift primer tasarlandı ve sentez ettirildi (Sentromer Ltd, Türkiye), belirlenen PZR protokollerinde reaksiyonlar kuruldu. Gamma globin promotor bölge mutasyonlarının taranması için tasarlanan primer çiftleri ve hazırlanan çalışma protokolleri sırasıyla Tablo 3.1 ve Tablo 3.2'de verilmektedir.

Tablo 3.1. A γ ve G γ globin promoter bölgesine özgü primer çiftleri

BÖLGE	YÖN	PRİMER BAZ DİZİLERİ	T _m
A γ Globin Promoter	F	5'-TCTATTACTGCGCTGAACTGTG-3'	66 °C
	R	5'-GTCTGGACTAGGAGCTTATTGAT-3'	66 °C
G γ Globin Promoter	F	5'-AACTGTTGCTTTATAGGATTTTCA-3'	62 °C
	R	5'-GTCTGGACTAGGAGCTTATTGAT-3'	66 °C

Tablo 3.2. PZR için kullanılan bileşenler ve miktarları.

PZR Bileşenleri	Hacmi (µL)
10X Tampon	2,5
MgCL2	1
Tag DNA Polimeraz	0,4
Forward Primer	0,8
Reverse Primer	0,8
dNTP	1
Distile Su	16,5
Genomik DNA	2
Total Hacim	25

Tüm örnekler Tablo 3.3'te verilen sıcaklık ve sürelerle göre ayarlanıp, thermal cycler cihazında (AppliedBiosystem 9700, USA) inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.3. Thermal Cycler Amplifikasyonu için döngü basamakları

Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
94 °C	5 dk	1 döngü
94 °C	30 sn	35 döngü
57 °C	30 sn	
72 °C	45 sn	
72 °C	7 dk	1 döngü
4°C	∞	Sürekli

3.5. %2'lik Agaroz Jel Hazırlanması

1X TBE solüsyonu hazırlamak için 10X konsantrasyonlu TBE(Tris-Borat-EDTA) Tamponu (Sigma) 1/10 oranında distile su ile sulandırılarak hazır hale getirildi. 100 ml'lik erlen içine 50 ml 1X TBE tamponu ve 1gr toz agaroz (Sigma) alınarak mikrodalga fırında (Arçelik) erimesi sağlandı. Arada erlen çıkarılarak çalkalandı. Agaroz eridikten sonra, erlen mikrodalga fırından çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Solüsyon sıcaklığı 45-60°C'ye düştükten sonra %10'luk EtBr'den(Merck) 4 µl

eklendi ve hava kabarcığı oluşturmada nazikçe karıştırıldı. Tray üzerine kuyucukların oluşturulması için tarak yerleştirilerek, agaroz solusyonu tray üzerine döküldü. Oda sıcaklığında katılaşması için bekletildi. Jel donduktan sonra, tarak nazikçe çıkarılarak kullanıma hazır hale getirildi.

3.6. PZR Amplikonlarının Agaroz Jel Elektrofrezinde Görüntülenmesi

Tüm elektroforetik işlemler 1X TBE tamponu içinde gerçekleştirildi. Tampon hazırlanması için cam şişe içerisine 100 ml (10X TBE) (Sigma) konsantre TBE solusyonu konularak, üzerine 900 ml distile su eklendi ve 1 litreye tamamlandı. %2'lik Agaroz jelin hazırlanması için ise 2 gr toz agaroz hassas terazide (Metler Toledo) tartılıp, 100 ml 1X TBE tamponu ile birlikte erlen mayere eklenerek, mikrodalga fırında erimesi sağlandı. Agaroz tamamen eridikten sonra mikrodalga fırından çıkarılarak, soğuması için oda sıcaklığına bırakıldı. Solüsyon sıcaklığı 45-60°C iken üzerine 8 µl Etidium Bromür (Merck) eklenerek yavaşça karıştırıldı. Elektrofrez kalıbına konarak jel üzerine yükleme kuyucuklarının oluşması için taraklar yerleştirildi. Oda sıcaklığında tamamen katılaşan agaroz jelden taraklar çıkarıldı ve 1X TBE ile doldurulan elektrofrez tankı içine yerleştirilen agaroz jelle örnekler 6X Loading Dye (Fermantas) ile karıştırılarak yüklendi. Örnekler 120 voltta 20 dk yürütüldü ve DNA görüntüleri transilluminatör yardımı ile görüntülenip değerlendirildi.

3.7. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi

İlgili amplikon uzunluklarında PZR ürünleri elde edildikten sonra, GeneJET PCR Pürifikasyon Kiti (Thermo Fisher Scientific, USA) kullanılarak temizleme işlemi yapıldı.

- 1- Eşit hacimde PZR örneği ile bağlama tampon eklenerek (binding buffer) pipetaj yapıldı.
- 2- Renk sarıya döndükten sonra, filtreli kolon üzerine toplam 40 µl'lik karışım yüklendi.
- 3- 1 dk 13.000 rpm'de santrifüj edildi.
- 4- 400 µl yıkama tamponu (Washing Buffer)eklendi ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi.

5- Toplama tüpü içeriği boşaltıldı ve kolon tekrar aynı toplama tüpüne yerleştirildi ve son kez aynı koşullarda yıkama yapmadan boş santrifüj yapıldı.

6- Filtreli kolon steril 1.5 ml'lik ependorfa alındı ve üzerine 35 µl ayırıştırma tamponu (Elution Buffer)eklendi.

7.Aynı koşullarda santrifüj edildi ve örnekler kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı. Daha sonrasında pürifiye edilmiş PZR ürünleri agaroz jelde yürütülerek UV Transilluminatör (POPBio-Vü, USA) cihazında kontrol edildi. Jel görüntüsünde bant elde edilen ürünlerle çalışmaya devam edilirken bant görülmeyen ürünler için tekrar PZR kuruldu.

3.8. Sanger Sekans Dizileme Reaksiyonu

Sanger sekans dizileme reaksiyonu zincir sonlandırma yöntemi olarakta bilinen bu reaksiyon, dideoksinükleotid trifosfatlar (ddNTP) kullanılarak yapılır, dNTP'lerden farklı olarak ddNTP'ler 3'OH ucuna sahip olmadıklarından kendilerinden sonra gelen dNTP'lerle fosfodiester bağı kuramayacaktır ve bu şekilde zincir uzaması sonlanacaktır. Her bir ddNTP kendine floresan bir boya ile işaretlenerek farklı dalga boylarında ışıma yapacaktır. Sekans reaksiyonu için gerekli olan bileşenler ve miktarları Tablo 3.4'te verildi.

Tablo 3.4. DNA dizileme reaksiyonu için her bir örneğin miktarı

Dizileme reaksiyonu bileşenleri	Her bir örnek için miktar
5X Tampon	2 ul
Big Dye	2 µl
Primer 1	2 ul
PZR ürünü	2 ul
Distile su	2 ul
Toplam hacim	10 ul

Total hacmi 10 µl olan tüpler thermal cycler cihazında Tablo 3.5'te verilen sıcaklık ve sürelerle göre inkübasyona bırakıldı.

Tablo 3.5. Sekans reaksiyonu için inkübasyon sıcaklıkları ve süreleri

Sıcaklık	Süre
96 ° C	1 dk
96 ° C	10 sn
50° C	5 sn
60° C	4 dk
4 ° C	∞

3.9. Sekans Labeling PZR Ürünlerinin Sephadex G-50 ile Temizlenmesi

Reaksiyon bittikten sonra temizleme işlemi Sephadex G-50 (GE Health Care) aracılığıyla yapıldı. Buna göre;

1-Sephadex G-50 Solüsyonunun hazırlaması: 1 gr Sephadex G-50 tartıldı ve 14 ml dH₂O en az 20 dk çalkalama işlemine tabi tutuldu.

2-Süre sonunda +4°C’de en az 30 dk bekletildi.

3-Yükeleme yapılacağı zaman, filtreli kolonların üzerine bu solüsyondan 650 µl ilave edildi.

4-Kolonlar 5000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi.

5-Toplama tüpü içeriği boşaltıldıktan sonra filtreli kolon tekrar yerleştirildi.

6-Üzerine 10 ul’lik sekans reaksiyonu örneği yüklendi.

7-5000 rpm’de 2 dk santrifüj edildi.

8-Sonra toplama tüpünde biriken sıvı 96 well-plate’in daha önceden tanımlana ve belirlenen kuyucuklarına yüklendi.

9- Plate 10 sn düşük devirde döndürüldükten sonra, 16 kapillerli ABI 3130 XL cihazına tanıtıldı.

10-Dizileme için cihaz çalıştırıldı ve kapiller elektroforez işlemi başlatıldı.

Dizileme işlemi sonuçlarına ait veriler ABI sequencing analysis v3.1 adlı yazılım programında değerlendirilmiş ve normal insan genomuna karşı NCBI (National

Center For Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) aracılığı ile A-gamma ve G-gamma geni promotor bölgesi referans dizisine bakılarak analiz edildi.

3.10. İstatiksel Analiz

Elde edilen sonuçlar örnek azlığı nedeniyle, % olarak hesaplandı ve hasta-kontrol kıyaslaması yapılarak veriler tartışıldı.



4. BULGULAR

4.1. Hastalara Ait Demografik, Hematolojik ve Genetik Bulgular

Projemizde; periyodik olarak transfüzyon alan, HbF değerleri yüksek 30 β -talasemi majör hastasından çalışılan ve sonuç elde edilen 27 hastaya ait demografik bulgular Tablo 4.1’de verilmiştir. Çalışılan 3 hastadan; çalışmanın başından itibaren DNA miktarı ve kalitesinin çok düşük olmasından dolayı, bilgi verici sonuçlar elde edilemediği için değerlendirmelere dahil edilmedi. Bu verilere göre 27 hastanın yaş ortalaması 29,4 olarak hesaplandı. Hastalarımızın cinsiyet dağılımlarına bakıldığında 13 tanesinin erkek (%48,14), 14 tanesinin kadın (%51,84) olduğu ve bütün hastalarımızın ortalama hemoglobin değeri ise 9,03 olduğu görüldü. Tüm hastalar dahil edildiğinde ortalama HbF değeri 11,18 olarak bulundu. En küçük HbF değeri %2,20 ve en yüksek HbF değerinin ise 61,4 olduğu görüldü. β -talasemi majör olan hastalarımızın %74,07’inin splenektomize olduğu ve %25,93’ünün olmadığı görüldü(Tablo 4.1).

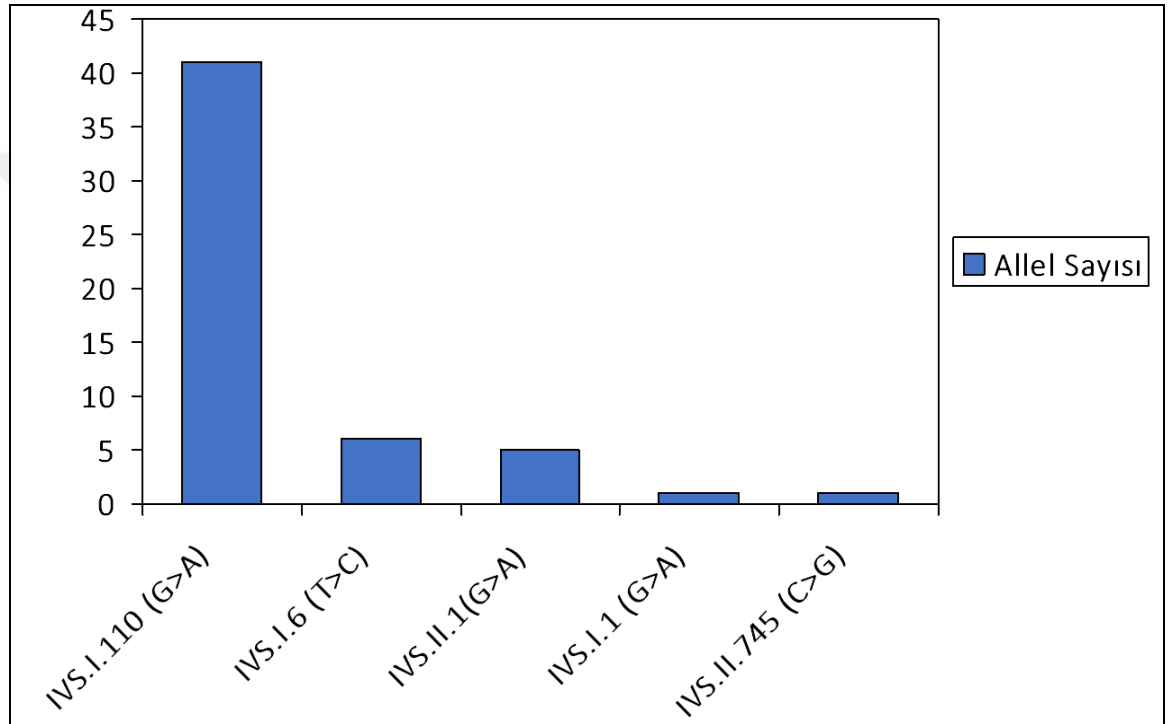
Tablo 4.1. Çalışılan beta-talasemi majörlü 27 hastanın demografik ve hematolojik verileri

NO	KOD	Y-C	BETA TALASEMİ MUTASYONU	HbF	HGB	MCV	MCH	MCHC	RDW	HbA1	HbA2	SP
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
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
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
4	4	22-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	2,70	9,4	85,5	28,5	33,3	14,8	80,10	2,70	E
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
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
9	9	25-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	2,40	7,9	79,8	28,3	35,5	14,1	81,1	2,8	H
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
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
12	12	40-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.110 (G>A)	8	8,4	81,7	25,5	31,3	21,2	74,8	2,9	E
13	13	29-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	20,1	8,9	83,2	25,9	31,1	19,3	65,8	3,3	E
14	14	37-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	17,00	9,1	83,7	27,5	32,9	17,6	69,5	2,7	E
15	15	45-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10,5	10,2	82,5	26,9	32,6	17,2	72	2,8	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
17	17	21-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	3,8	9,5	80,8	27,7	34,3	14,2	81,1	2,8	H
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
20	20	36-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	12,80	8,9	84,4	28,2	33,3	18,2	73,10	2,70	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
22	22	22-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	12,1	8,5	75	25,7	34,2	27,4	74,1	3	H
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
24	24	32-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	6,30	10,5	84,7	31,4	37,1	19,3	76,90	2,70	E
25	25	26-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.745 (C>G)	2,20	9,2	78,1	26,6	34,1	14,1	81,90	2,50	H
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
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
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
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
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

NO: Sıra no, KOD: Hasta kodu, Y-C: Yaş- Cinsiyet, HbF: HbF düzeyi, E:Erkek K:Kadın, HGB: Hemoglobin, SP: Splenektomi olup-olmadığı, E (Evet): Splenektomi yapılmış, H (Hayır):

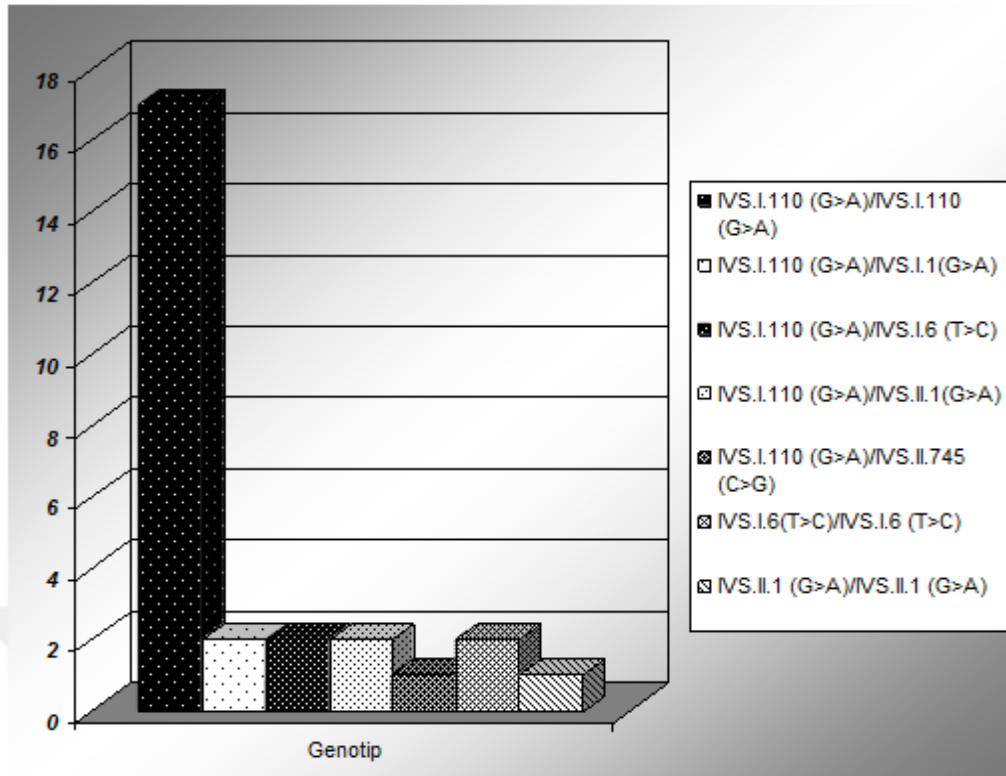
Splenektomi yapılmamış olduğunu göstermektedir. Hemogloblin (HB) için normal değer aralığı Antalya Adem Tolunay Kan Hastalıkları Merkezi laboratuvarlarındaki referans aralıkları; 13.6-17.2, MCV için 80.7-95.5, MCH:27.2-33.5, MCHC:32.7-33.5, RDW için ise 11.6-14.6 olarak verilmektedir.

Projemizde çalışılan 27 β -talasemi majör hastasında, 5 farklı mutasyon ve β -talasemiye neden olan 7 farklı beta-globin genotipi gözlemlendi. En sık görülen allelin %75,92 sıklıkla IVS.I.110 (G>A) alleli olduğu bulundu. İkinci sırada ise %11,11 sıklıkla IVS.I.6 (T>C), üçüncü sırada % 9,25 sıklıkla IVS.II.1 (G>A) alleli yer aldı (Şekil 4.1).



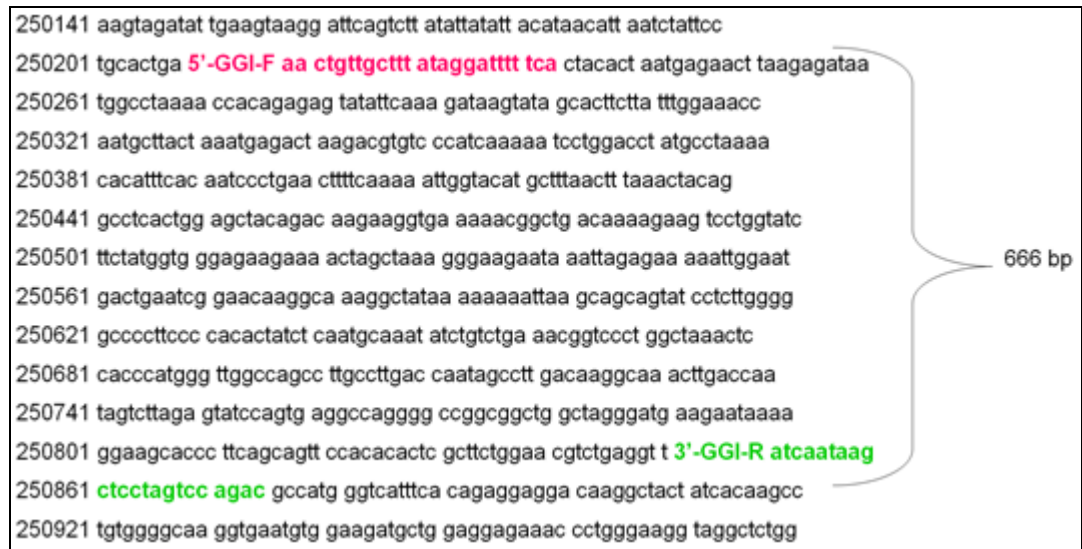
Şekil 4.1. Çalışılan beta-talasemi majörlü 27 hastada tespit edilen 5 farklı beta-globin mutant allel dağılımı

Hastalarda görülen 7 farklı genotipten; 17 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 2 hastada, IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.6 (T>C) birleşik heterozigot genotipide 2 hastada görüldü. IVS.II.1 (G>A)/ IVS.II.1 (G>A) homozigot genotipi 1, ayrıca IVS.I.6 (T>C)/ IVS.I.6 (T>C) homozigot genotipide 2 hastada görülürken, diğer genotipler birer hastada tespit edildi (Şekil 4.2).

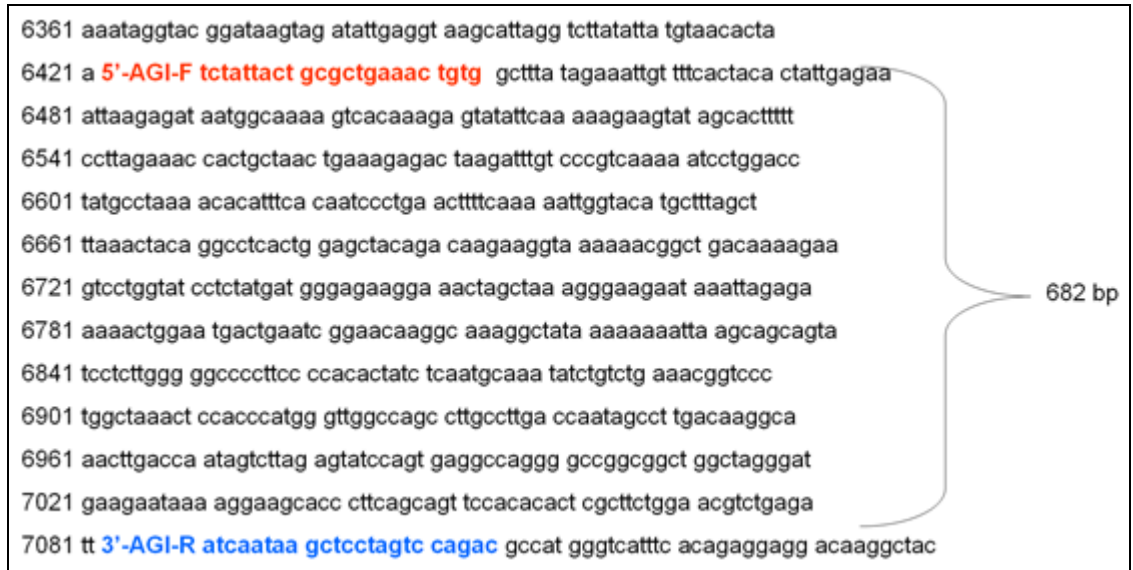


Şekil 4.2. Çalışılan beta-talasemi majörlü 27 hastada görülen 7 farklı beta-globin genotipin dağılımı

Çalışılan hedef bölgelerin Genbank referans dizileri üzerinde belirlenen primer çiftleri (Şekil 4.3 ve Şekil 4.4) ve çıkacak PZR ampikon büyüklükleri belirlendikten sonra, gerçekleştirilen birinci PZR reaksiyonunda ampikonlar doğru bir şekilde elde edildi

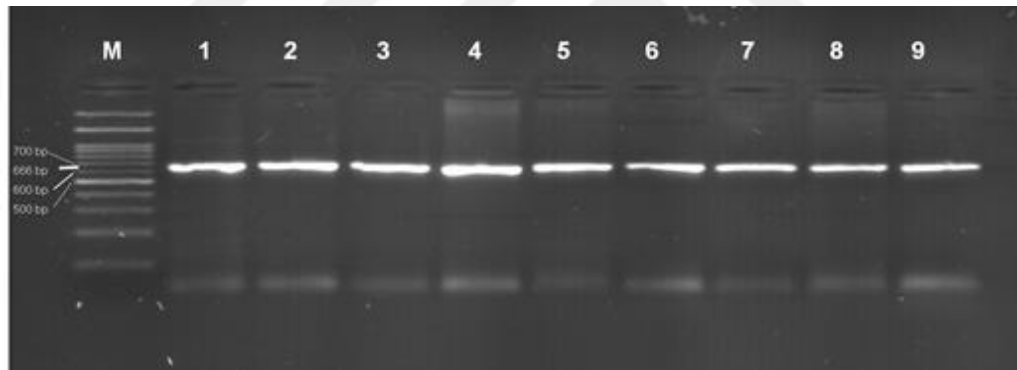


Şekil 4.3. G-Gamma globin promotor bölgesi referans dizi ve primerlerin yerleşimi

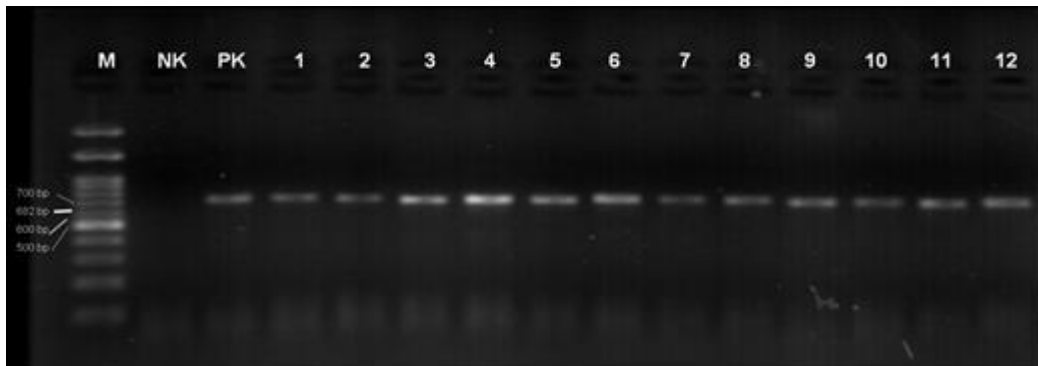


Şekil 4.4. A-Gamma globin promotor bölgesi referans dizi ve primerlerin yerleşimi

Çalışılan hedef promotor bölgelerin 1.PZR amplikonları %2'lik agaroz jelde görüntülendi ve doğru büyüklükte fragmentler olduğu görüntülendi (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).

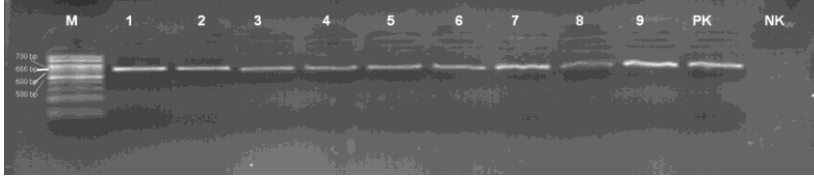


Şekil 4.5. G-Gamma Globin geni promotor bölge 1.PZR Amplikonu (666 bp)'nunun M 100 bp Marker'e (M) karşılık %2 Agaroz jelde görüntüsü



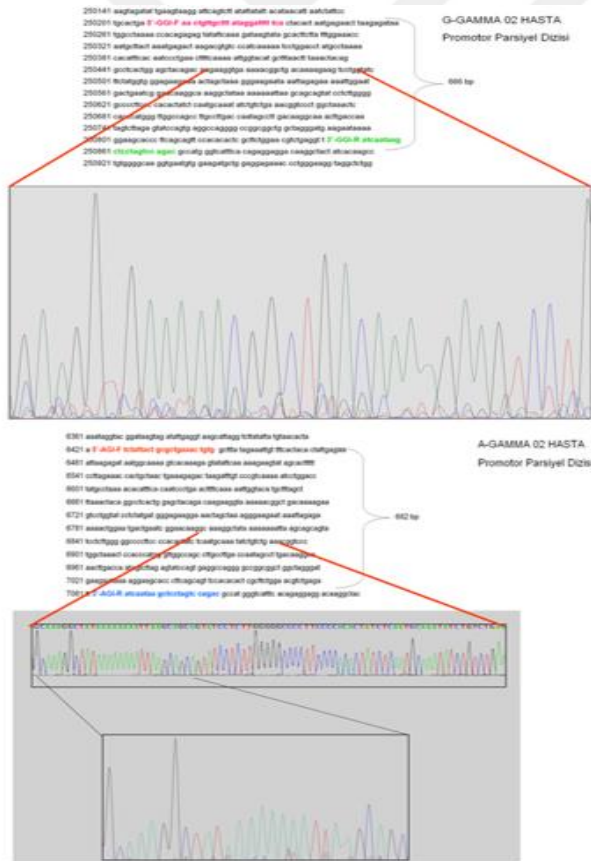
Şekil 4.6. A-Gamma Globin geni promotor bölge 1.PZR Amplikonu (682 bp)'nunun M 100 bp Marker'e (M) karşılık %2 Agaroz jelde görüntüsü

Hedef bölgeleri içeren 1.PZR amplikon ürünleri Pürifikasyon kiti ile pürifiye edildi. Çalışılan hedef promotor bölgelerin pürifiye edilmiş 1.PZR amplikonları %2'lik agaroz jelde görüntülendi ve doğru büyüklükte fragmentler olduğu görüntülendi (Şekil 4.7).



Şekil 4.7.G-Gamma Globin geni promotor bölge 1.PZR Amplikonu (666 bp)'nunun pürifiye örneklerinin M 100 bp Marker'e (M) karşılık %2 Agaroz jelde görüntüsü. PK: Pozitif Kontrol, NK: Negatif Kontrol

Pürifiye edilen hasta ve kontrol grubu 1.PZR amplikonlarından sekans reaksiyonları gerçekleştirildi ve elektroferogramlar referans dizilere göre analiz edildi (Şekil 4.8). Her iki geninde promotor dizilerinde bir genomik değişiklik saptanmadı.



Şekil 4.8. 2 Nolu Hastanın G-Gamma Geni Promotor Bölge parsiyel dizisi (üstte) ve A-Gamma Globin geni promotor bölgesinde TAL1 transkripsiyon faktörünün tutunduğu hedef motifinin kısmi elektroferogram görüntüsü (altta)

Tez projemiz hastaları takibi gerektiren özellikli bir grup olduğundan, daha önceki tez projelerinde çalışılmış hasta grupları ile ortak olanlar bulunmaktadır. Bu nedenle çalışılan 27 hastamızda, daha önce BCL11A, Xmn1 (Arıkan, 2016) ve SALL2 (Karaman, 2017) modifiye edici gen ve varyantların sonuçları ile yine gamma globin promotor bölge motifini tanıyan TAL1 transkripsiyon faktörünün ekspresyon düzeyinin (Uyguç, 2021) yer aldığı veriler Tablo 4.2’de görülmektedir.

Tablo 4.2. Çalışılan beta-talasemi majörlü 27 hastanın demografik, hematolojik ve önceden ortak vaka olarak çalışılmış olanların BCL11A, XMN1, SALL2 genetik varyantları ve TAL1 ekspresyon verileri

NO	KOD	Y-C	BETA TALASEMI MUTASYONU	HB	HGB	MCV	MCH	MCHC	RDW	HbA1	HbA2	SP	BCL11A C>T	XMN1 C>T	SALL2 c.2236 C>G	TAL1 EKS
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	2	23-E	IVS.I.I (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	16,7	8,9	78	25,6	32,7	19,4	70,8	3,1	H	CC	CC	CG	1,7
3	3	26-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	2,6	9,3	88	28,4	32,3	14,4	80,3	2,9	E	CT	CC	CG	1
4	4	22-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	2,70	9,4	86	28,5	33,3	14,8	80,10	2,70	E				
5	5	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	11,1	8,3	84	26,9	31,9	15,9	74,4	2,8	E			CG	
8	8	21-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	5,6	7,9	52	17,3	33,4	29,8	76,4	7,7	E			CG	1,5
9	9	25-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	2,40	7,9	80	28,3	35,5	14,1	81,1	2,8	H			CG	
10	10	25-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.110 (G>A)	4,7	8,6	89	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	84	27,9	33,2	15,9	76,10	2,60	E			CG	2
12	12	40-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.110 (G>A)	8	8,4	82	25,5	31,3	21,2	74,8	2,9	E	CT	CC	CC	
13	13	29-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	20,1	8,9	83	25,9	31,1	19,3	65,8	3,3	E			GG	
14	14	37-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	17,00	9,1	84	27,5	32,9	17,6	69,5	2,7	E			GG	
15	15	45-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10,5	10	83	26,9	32,6	17,2	72	2,8	E			CG	
16	16	38-K	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	5,9	9,2	79	24,3	30,9	27,2	77,9	3,9	E	CT	CC	CC	2
17	17	21-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	3,8	9,5	81	27,7	34,3	14,2	81,1	2,8	H			GG	
18	18	27-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	8,6	10	79	26,6	33,5	18	78,7	2,5	E			CG	
20	20	36-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	12,80	8,9	84	28,2	33,3	18,2	73,10	2,70	E			CG	
21	21	25-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	61,4	8	75	22	29,5	31	27	7,9	E	CT	CC	GG	5,2
22	22	22-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	12,1	8,5	75	25,7	34,2	27,4	74,1	3	H	TT	CC		
23	23	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	7	8,8	72	22	30,6	36	73,6	5,6	E	TT	CC	CG	1
24	24	32-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	6,30	11	85	31,4	37,1	19,3	76,90	2,70	E			CG	
25	25	26-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.745 (C>G)	2,20	9,2	78	26,6	34,1	14,1	81,90	2,50	H			CG	
26	26	32-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	25	9,2	75	25,5	33,8	27,5	62,8	3	E			CC	
27	27	31-K	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	4,7	9,6	81	26,9	33,2	16,6	78,7	2,7	H			GG	1,2
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		1
29	29	26-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	6,00	10	84	27,7	32,9	17,4	78,50	2,70	E			GG	1,3
30	30	28-E	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	5,1	8,1	85	27,1	31,9	14,8	79,5	2,9	E	CT	CC	CG	1,6

NO: Sıra no, KOD: Hasta kodu, Y-C: Yaş-Cinsiyet, HbF: HbF düzeyi, E:Erkek K:Kadın, HGB: Hemoglobin, SP: Splenektomi olup-olmadığı, E (Evet): Splenektomi yapılmış, H (Hayır): Splenektomi yapılmamış olduğunu, TAL1 EKS: TAL1 ekspresyon düzeyini normalin katları olduğunu göstermektedir. Hemoglobin (HB) için normal değer aralığı Antalya Adem Tolunay Kan Hastalıkları Merkezi laboratuvarlarındaki referans aralıkları; 13.6-17.2, MCV için 80.7-95.5, MCH:27.2-33.5, MCHC:32.7-33.5, RDW için ise 11.6-14.6 olarak verilmektedir. NOT: Beyaz satırda bulunan hastalar, aynı zamanda yapılan diğer bir tez çalışması (Uyguç 2021) ile ortak hastalar olduğunu göstermektedir.

5. TARTIŞMA

Dünyada en fazla Akdeniz ülkelerinde görülen olan β -talasemi, çeşitli coğrafik bölgelerde farklı dağılım göstermektedir. En yüksek taşıyıcı frekansı %14 ile Kıbrıs birinci sırada iken, onu %10,3 sıklıkla Sardunya ve Güneydoğu Asya takip etmektedir. Nüfus göçleri ve farklı etnik gruplar arasındaki evliliklerle β -talasemi, neredeyse dünyanın her ülkesinde görülmektedir. Küresel nüfusun %1,5'inin β -talasemi taşıyıcısı olduğu düşünülmektedir(Jha ve Jha, 2014). Türkiye'de ilk hemoglobinopati çalışmaları 1945 yılında Muzaffer Aksoy tarafından yapılmıştır(Aksoy ve ark., 1958). Türkiye'de yakın zamanda yapılan bölgesel çalışmalarda β -talasemi sıklığı %2,1 olup, Güney ve Doğuya bağlanan bölgelerimizde sıklığı %0,7 ile %13 arasında değişmektedir. Çavdar ve Arcasoy tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada, Türkiye'de ilk defa β -talaseminin sıklığı gösterilmiştir(Çavdar ve Arcasoy, 1971). Ülkemizde bölgesel olarak yapılan çalışmalardan Antalya ve çevresinde yapılan bir çalışmada β -talasemi ile ilişkili olduğu bulunan 16 farklı mutasyon saptanmış olup, bunlardan IVS-I-110 (G>A), %44,4 ile en sık görülen mutasyon olmuştur (Keser ve ark., 2004). Akdeniz Bölgesine özgü 2004 yılında yapılan bir çalışmada 459 vakada 19 farklı mutasyon belirlenmiş olup, IVS-I-110 (G>A), en sık görülen allel olarak bildirilmiştir. Antalya ve çevresinde yapılan mutasyon taramalarında Hb Antalya olarak yeni bir hemoglobin varyantı tanımlanmıştır(Keser ve ark., 2001). Bilgen ve arkadaşları tarafından, β -globin geni mutasyonuna yönelik bir ailede yapılan taramada, yeni bir genetik değişim (HBB: c.-127G>C) tespit edilmiş olup, toplam dört çocuğa sahip ailenin iki çocuğunda HBB:c-127G>C mutasyonu taşıyıcılığı görülmüşken, diğer iki çocukta ise codon 8(-AA) (HBB:c.25_26 delAA) delesyonu için taşıyıcı oldukları bildirilmiştir(Bilgen ve ark., 2016a). Güzeloğlu-Kayışlı ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, dokuz yaşında bir çocuk hastanın β -globin geni DNA dizi analizi metoduyla incelenerek 5. ve 6. kodondaki nükleotit değişimi ile Hb Tyne ve Hb S'in birlikte kalıtıldığı ilk defa bildirilmiştir(Güzeloğlu-Kayışlı ve ark., 2005). Keser ve arkadaşları tarafından β globin geni mutasyon taramasına yönelik yapılan başka bir çalışmada, oldukça seyrek olarak görülen ve Türk popülasyonunda ilk defa rastlanılan Hb Knossos [Cod27 (G>T)] varyantı, IVS-II-745(C>G) ile birleşik heterozigot genotipte olduğu görülmüştür. Varyantın heterozigot genotipinde hafif

şiddette bir talasemi tablosu görülürken, homozigot kalıtımında ise orta şiddete bir β -TM tablosu oluşturduğu bildirilmiştir(Keser ve ark., 2007). Kan gazı ölçümlerinde düşük oksijen seviyesine sahip bir siyanoz hastasından β globin genine yönelik yapılan moleküler taramada genin 308. pozisyonunda A'nın C'ye dönüşümü görülmüştür. Hb Kansas olarak da bilinen ve seyrek görülen bu hemoglobin varyantı Türkiye'de ilk defa rapor edilmiştir(Keser ve ark., 2015). Ayrıca, Antalya popülasyonunda yapılan taramalarda Hb D-Los Angeles, Hb E, Hb-G Coushatta, Hb S, Hb Knossos, Hb Tyne ve Hb Antalya olarak yedi farklı hemoglobin varyantı bulunduğu bildirilmiştir(Keser ve ark., 2010). Manguoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, anne ve babasında sırasıyla IVS-II-849(A>G) ve IVS-I-1 (G>A) mutasyonları mevcut olan bireyde, IVS-II-849(A>G)/IVS-I-1(G>A) genotipi β -TM fenotipi ile ortaya çıkmıştır. Yine bu çalışmada, Türk popülasyonunda bu mutasyona ilk defa rastlanıldığı rapor edilmiştir. Hasta bireyin kendisinden sonra doğan kardeşine yönelik yapılan prenatal tanı sonucunda, kardeşinde IVS-II-849(A>G)/Normal heterozigot genotipi görülmüştür(Manguoğlu ve ark., 2005). Antalya ve çevresinde yapılan tüm bu çalışmalar bize, beta-talasemideki genetik ve klinik heterojenitenin ne kadar yüksek olduğunu göstermekte, ayrıca hem Antalya hem Türkiye hem de dünyada en yaygın mutasyonun IVS-I-110 (G>A) olduğunu ortaya koymaktadır.

Beta-talasemi majör'ün fenotipik etkilerinden biri olan osteoporozun, β -TM'lü çocuklar üzerine olan etkisinin araştırıldığı 37 çocuk hastada, COLIA 1 geni üzerinde SP1 transkripsiyon faktörünün bağlanma bölgesindeki polimorfizmin varlığı ile β -TM'lü çocuk hastalarda osteoporozun gelişimi arasında pozitif ilişki bulunmuş, osteoporozun engellenmesi için önemli bir erken belirteç olabileceği gösterilmiştir(Guzeloglu-Kayisli ve ark., 2008). Bu çalışma bize, beta-talasemi majörülü hastalardaki her parametrenin çalışılmasının ne derece önemli olduğunu göstermektedir.

β -TM hastalarında aşırı demir birikimini önlemek için kan transfüzyonunu azaltmaya yönelik alternatif tedaviler geliştirilmiştir. Kan transfüzyonuna alternatif olarak splenektomi ameliyatı, hematopoetik kök hücre nakli ve hidroksiüre tedavisi gibi yöntemler kullanılmaktadır(Cappellini ve ark., 2018). Splenektomi ameliyatları sonrası Hb F miktarı artabilmektedir. Fakat tromboz ve sepsisten dolayı sağlayacağı

yarardan çok, zarar getirebilme ihtimali bulunmaktadır(Eleftheriou, 2008; Cappellini ve ark., 2018).

Hematopoetik kök hücre nakli β -TM'lü çocuklar için sağ kalımı ve yaşam kalitesini önemli derecede arttıran bir tedavi seçeneğidir(Eleftheriou, 2008; Cappellini ve ark., 2018; Shah ve ark., 2019). Ancak, uygun donör olmayışı, yaş problemi, tedavi başlangıcının yüksek maliyeti ve yüksek morbidite ve mortalite oranından dolayı risk taşımaktadır (Eleftheriou, 2008; Cappellini ve ark., 2018).

Bu riski ortadan kaldırmak için araştırmacılar ve klinisyenler, HbF indüksiyonu için ilaç olarak kullanılan bir çok farmakolojik ajan kullanmıştır.

Bu ajanlardan biri Hidroksiüre (HU)'dir. HU, HbF indükleyici ajan olarak α - ve β - zincir dengesizliğini azaltarak, kan transfüzyon ihtiyacını azaltması beklenen potansiyel farmakolojik bir ajan olarak gösterilmiştir(Musallam ve ark., 2013). Ancak, HbF indüksiyonu için kullanılan kimyasalların ciddi yan etkilerinden dolayı, HbF indüklenmesinde rol oynayan ve yan etkisi az veya hiç olmayan aktivatör ve inhibitörler üzerine yapılan epigenetik ve farmakogenetik çalışmalar günümüzde daha da yoğunlaşmıştır.

Arıkan'nın 2016 yılında yaptığı araştırmada, resveratrol ve sodyum bitüratın K562 hücrelerinde doza bağımlı olarak hemoglobinizasyonu arttırdığı gösterilmiştir. Yine aynı çalışmada, her iki farmakolojik ajanın gamma globin indüksiyonunu yapabildikleri gösterildi. Ayrıca, HbF indüksiyonunu baskılayan BCL11A, Xmn1 polimorfizmi ve KLF1 varyantlarının bireysel olarak HbF seviyesini etkilediğini göstermiştir. Bu da bize gamma globin promotorlarının HbF üretimi için birincil ve önemli bir hedef bölge olduğunu, ayrıca bu indüksiyon yolağında rol oynayan inaktivatörlerin mutasyonu sonucu HbF'in seviyesinin arttığını göstermektedir.

HbF'in statüsü ile ilgili yapılan benzer çalışmalardan biri, β -talasemi major hastası 100 hasta üzerinden El Gawhary ve arkadaşları tarafından yapılmıştır. Çalışmada, Xmn1 C>T polimorfizmi taşıma oranı %4 olarak bulunmuş ve polimorfizm taşıyan hastalarda Hb F konsantrasyonu, olmayanlara göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir. Hastalığın klinik seyrinde yine polimorfizmin görülmediği diğer hastalara göre daha iyi olduğu bildirilmiştir (El Gawhary ve ark., 2018). Bu da G-gamma promotor

bölgesindeki bireysel polimorfizmlerin, tek belirleyici olmadığı ama, hasta bireyin HbF'i üzerine etkili olduğunu ifade etmektedir.

Ugrin ve arkadaşları tarafından HBG1 promotor bölge mutasyonu üzerine yapılan bir çalışmada, bulunan HBG1: g.-225_222delAGCA dört nükleotitlik delesyonun, HBG1'in promotorunda GATA-1 için bir bağlanma bölgesi oluşturduğu, böylece gamma globin gen ekspresyonunu baskıladığı görülmüştür(Ugrin ve ark., 2016). γ -globin üretimi açısından KLF-1 ile BCL11A birlikteliğinin etkilerinin araştırıldığı çalışmada ise, KLF-1, Lentiviral vektörler yardımıyla verilen shRNA'larla CD34+ hücrelerde susturulmuş böylelikle BCL11A gen ekspresyonu seviyesinin azalmasına sebep olmuş ve düşük BCL11A seviyelerinde γ -globin gen ekspresyonunun arttığı verilerine ulaşılmıştır(Zhou ve ark., 2010). Martyn ve arkadaşları tarafından yapılan diğer bir çalışmada da γ -globin promotor bağlanma bölgesinde CRISPR/Cas9 metodu kullanılarak meydana getirilen yapay mutasyonlar sonucu, HbF'i baskılayan iki majör faktörün, BCL11A ve ZBTB7A'nın, promotora bağlanması engellenmiş, bu engellenme sonucu γ -globin mRNA'sında artış olduğu ve bunun da Hb F seviyesini arttırdığı sonucuna ulaşılmıştır(Martyn ve ark., 2018). Bu her üç çalışmanın yöntemleri farklı olsa da, ortak hedefin gamma globin promotorunun, baskılayıcıların etkisinden kurtarmak olduğunu görmekteyiz.

Modares ve arkadaşları tarafından Zinc Finger Nuclease tekniği kullanılarak yapılan çalışmada, dizayn edilen ZFN-Lentivirüs aracılığı ile SOX6 geninin bağlanma domaininde yapay olarak oluşturulan mutasyon sonucu, SOX6 proteininin γ -globin promotor bölgesine bağlanması engellenmiş, farklılaşmadan 5 gün sonra RT-PCR metoduyla yapılan ekspresyon ölçümlerinde, γ -globin mRNA seviyesinin kontrol hücrelerine göre 6 kat daha fazla arttığı bildirilmiştir (Modares Sadeghi ve ark., 2018). Yine aynı bakış açısıyla Shariati ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada, SOX 6 geninin bağlanma domainine ait 3 farklı bölge seçilerek, CRISPR/Cas9 yöntemi ile mutasyonlar yaratılmış, bunların hücresel farklılaşma üzerine olan etkileri Flow-Sitometri yöntemi ile belirlenmiştir. Bu çalışma sonucunda farklılaşan hücrelerdeki γ -globin mRNA seviyelerinin normal hücrelere oranla daha yüksek artış gösterdiği belirtilmiştir(Shariati ve ark., 2018).Bu çalışmalara ek olarak, Gamma promotorunda yapay mutasyon oluşturma yaklaşımında diğer bir çalışmada ise, Weinert ve arkadaşları CRISPR/Cas9 teknolojisi kullanarak, γ -globin promotor bölgesinde yapay

olarak -175T>C mutasyonu yaratmışlar. TAL-1 ile bağlantılı LMD2 ve LBD-1 proteinleriyle oluşan protein kompleksinin, bu mutasyon bölgesine bağlanıp, γ -globin ekspresyonunu reaktifte ederek, Hb F miktarında artış sağlandığı gösterilmiştir (Wienert ve ark., 2015). Bu son üç çalışma bize, beta-talasemi majör hastalarında gamma globin promotor bölgelerinin normal dizilimde olsa bile, CRISPR/Cas9 gibi genom düzeltme (editing) yöntemleri ile yapay mutasyon yaratılarak, gamma globin ekspresyonunu sağlayan transkripsiyon faktörlerinin buraya tutunmasının sağlandığını ve etkili sonuçlar alındığını göstermektedir.

HbF artışını sağlamaya yönelik yapılan çalışmalar incelendiğinde; fetal dönemden erişkin döneme geçişte γ -globin promotor bölgesinde oluşan mutasyonlarla, doğrudan ya da dolaylı olarak bazı önemli transkripsiyon faktörlerinin bu bölgeye bağlanması sonucu, γ -globin ekspresyon seviyelerinin arttığı görülmüştür.

Bizim projemizde ise, Hb F'si yüksek β -talasemi majörlü 30 hasta planlanmış, ancak 27 hasta çalışılmış, ancak hem A-gamma hem de G-gamma promotor bölgelerinde herhangi bir mutasyon saptanamamıştır. Bu durum, HbF değerlerinin yeniden gözden geçirilmesini ve klinik olarak yeniden değerlendirilmesini düşündürse de daha çok hastada çalışılmasının önemini de ortaya koymaktadır.

Diğer yandan çalıştığımız hastalardan bazıları, Anabilim Dalımızda daha önce HbF yüksekliği ile ilişkili farklı hedef modifiye edici gen ve varyantlarının çalışıldığı hastalar olduğundan, bu yöndeki verilerin, bizim sonuçlarımızla birlikte değerlendirmesi kısmen de olsa HbF yüksekliklerine açıklık getirmektedir. Bu veriler ışında bakıldığında, HbF yüksekliğini artıran nedenin bir tek faktöre bağlanamayacağı, ilişkili genetik faktörlerin ve bireysel varyantların birlikte ele alınması gerektiğini ortaya koymaktadır.

Bu çerçevede, Tablo 4.2'de çalıştığımız 27 hastanın demografik, hematolojik ve önceden ortak vaka olarak çalışılmış olanların BCL11A, XMN1, SALL2 genetik varyantları ve çalışmamızla ortak 12 hastanın yer aldığı TAL1 ekspresyon verilerinin bulunduğu hastalar incelendiğinde, HbF yüksekliği ile ilişkili dört varyant için; BCL11A, XMN1, SALL2 ve TAL1 ekspresyon verileri tamamen çakışan 6 (2, 3, 16, 21, 23, 30 Kodlu) hastanın bulunduğu görülmektedir.

Bu 6 hastanın HbF değerlerine bakıldığında, %2,6-%61,4 arasında olup, ortalamasının %16,45 gibi yüksek bir oran olduğu ortaya çıkmaktadır. Bu 6 hastanın 4'ünde BCL11A CT genotipinde olup, HbF'in artışından sorumlu genotip olarak tutulmaktadır(Arıkan, 2016). Bu ortak 6 hastada Xmn1 polimorfizminin (CC normal) etkisi gözükme de bu hastaların 5'inde SALL2 geni ekzon-2'deki c.2236 C>G, p. Gly746Arg değişiminin heterozigot genotipte bulunması, bunun HbF yüksekliğine önemli katkı sunduğunu düşünmekteyiz.

İlave olarak, bu 5 hastanın HbF'nin yapısında yer alan ve fetal dönemde gamma globin transkripsiyonunu sağlayan kompleks içinde önemli rol oynayan, hem A-gamma hem G-gamma promotor bölgelerine bağlanan hem de β -grubu globin genlerinin LCR bölgesine tutunan, TAL1 transkripsiyon faktörünün ekspresyon düzeylerine bakıldığında, 4 hastanın (2, 16, 21, 30 Kodlu) TAL1 ekspresyon düzeyleri normal kontrollere karşı 1,6-5,2 kat arasındaki artışa sahip oldukları görülmektedir. Bu da bize, TAL1 ekspresyon seviyesinin artışının, bu hastaların HbF'lerinin yüksekliğine önemli katkı sağladığını göstermektedir.

Çalışmamızda A-gamma ve G-gamma promotor bölgelerinde herhangi bir mutasyon bulunmasa da, HbF'i artıran ve TAL1'in ilmek (loop) içinde diğer taraftan bağlanma bölgesi olan LCR bağlanma bölgesinin çalışılmasını işaret etmektedir.

Çalışmamızda yer alan ve gamma globin promotorları dizileri normal bulunan, ancak HbF indüksiyon yolağındaki diğer faktörlerin bireysel olarak ortaya konduğu beta-talasemi majör hastaları, yapay mutasyon oluşturarak HbF'i yükseltmek için iyi birer örnek olduklarını ortaya koymaktadır. Bundan sonraki projelerimize temel oluşturacaktır.

Ayrıca, çalışmamızın sonuçlarının, TAL1 ile birlikte gamma globin transkripsiyon ilmeği (loop) içinde yer alan diğer faktörlerin de çalışılmasına zemin oluşturduğunu düşünmekteyiz.

Sonuç olarak, beta-talasemi majör hastalarındaki HbF'nin yüksekliğinden yola çıkarak, hastaların klinik tablolarını hafifletmek ve düzeltmek adına; HbF'yi yükselten her genetik ve epigenetik faktörler çalışma ve araştırmalar için hedef olmaya devam edecektir. Bizim çalışmalarımızın da bu çerçevede önemli katkılar sunacağını düşünüyoruz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda HbF'si yüksek olan beta-talasemi majörlü 30 hastanın 27'i çalışılmış, HbF yüksekliğinde sorumlu olan A-gamma ve G-gamma promotor bölge mutasyonları taranmış ve herhangi bir mutasyon saptanmamıştır. Hasta sayımızın az olmasına karşın, bu bulgunun HbF yüksekliği araştırmalarında dikkat çekeceği düşüncesindeyiz.

Çalışmamızın sonuçları çerçevesinde aşağıdaki önerilerin de akademik ve bilimsel araştırmalara bakış açısı getirmesi adına önemli olduğunu düşünmekteyiz.

1-Hb F'nin yüksek olduğu beta-talasemi majör hastalarının klinik laboratuvar verilerinin en az iki farklı zamanda yapılması ve değişkenlikler olup olmadığının belirlenmesi,

2-Bu tür tarama temelli projelerde, standardize hasta sayısının artırılması,

3-Çalışılan hasta sayının az olmasına karşın, A-gamma ve G-gamma promotor bölge mutasyonları taranmış ve herhangi bir mutasyon saptanmamış olması, bu bölgeyi hedefleyen TAL1 başta olmak üzere birçok transkripsiyon faktörünün çalışılmasına temel olması,

4-Çalışmamız sonucu, β grubu genlerinin gelişimsel döneme bağlı olarak kontrolünü sağlayan LCR bölgesinin de çalışılmasına işaret etmesi,

5-Çalışmamızda yer alan ortak hastaların genetik verilerinin değerlendirilmesi ile HbF'i yüksek bireylerde bir panel ve kit oluşturmamıza olanak sağlaması,

6-HbF yüksekliğinde birden fazla genetik ve epigenetik faktörün rol oynayacağına dikkat çekmesi,

7-HbF yüksekliğinde hedef olan gamma globin promotor bölgesi normal olduğunda, bu bölgenin mutasyona uğratılması adına, yeni genom düzenleme tekniği CRISPR/Cas9 için hedef olması,

8-HbF'i yükseltmek için A-gamma ve G-gamma globin gen promotor bölgeleri için yeni nesil nanoteknoloji ilaç düzenlenmesi için hedef olması,

9-Yeni projelere zemin oluşturacak dűřünceler üretmesi bakımından çalışmamızın sonuçlarının katkı sağlayacağı dűřüncesindeyiz.



KAYNAKLAR

- Adachi, K., Kim, J., Asakura, T., & Schwartz, E. Characterization of two types of fetal hemoglobin: Alpha 2g gamma 2 and alpha 2a gamma 2. *Blood*. 1990; 75 (10): 2070-2075.
- Aessopos, A., Farmakis, D., & Loukopoulos, D. Elastic tissue abnormalities resembling pseudoxanthoma elasticum in β thalassemia and the sickling syndromes. *Blood*. 2002; 99 (1): 30-35.
- Aessopos, A., Farmakis, D., Deftereos, S., Tsironi, M., Tassiopoulos, S., Moyssakis, I., & Karagiorga, M. Thalassemia heart disease: A comparative evaluation of thalassemia major and thalassemia intermedia. *Chest*. 2005; 127 (5): 1523-1530.
- Aksoy, M., Ikin, E. W., Mourant, A. E., & Lehmann, H. Blood groups, haemoglobins, and thalassaemia in turks and eti-turks. *Br Med J*. 1958; 2 (5102): 937.
- Al-Mosawy, W. The beta-thalassemia. *Scientific Journal of Medical Research*. 2017; 01: 24-30.
- Baldwin, J. M. Structure and function of haemoglobin. *Progress in biophysics and molecular biology*. 1975; 29 (3): 225-320.
- Bauer, D. E., Kamran, S. C., & Orkin, S. H. Reawakening fetal hemoglobin: Prospects for new therapies for the β -globin disorders. *Blood*. 2012; 120 (15): 2945-2953.
- Bilgen, T., Canatan, D., Delibas, S., & Keser, I. A novel mutation in the promoter region of the β -globin gene: Hbb: C.-127g> c. *Hemoglobin*. 2016a; 40 (4): 280-282.
- Bilgen, T., Clark, Ö. A., Öztürk, Z., Yeşilipek, M. A., & Keser, İ. Gap-pcr screening for common large deletional mutations of β -globin gene cluster revealed a higher prevalence of the turkish inversion/deletion ($\delta\beta$) 0 mutation in antalya. *Turkish Journal of Hematology*. 2016b; 33 (2): 107.

Bittles, A. H., Mason, W. M., Greene, J., & Rao, N. A. Reproductive behavior and health in consanguineous marriages. *Science (New York, N.Y.)*. 1991; 252 (5007): 789-794.

Borgna-Pignatti, C., Rugolotto, S., De Stefano, P., Zhao, H., Cappellini, M. D., Del Vecchio, G. C., Ghilardi, R. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. *Haematologica*. 2004a; 89 (10): 1187-1193.

Borgna-Pignatti, C., Vergine, G., Lombardo, T., Cappellini, M. D., Cianciulli, P., Maggio, A., Bisconte, M. G. Hepatocellular carcinoma in the thalassaemia syndromes. *British journal of haematology*. 2004b; 124 (1): 114-117.

Breda, L., Motta, I., Lourenco, S., Gemmo, C., Deng, W., Rupon, J. W., 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. Thalassemias and hemoglobinopathies in turkey. *Hemoglobin*. 2014; 38 (5): 305-307

Cao, A., & Galanello, R. Beta-thalassemia. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2010; 12 (2): 61-76.

Cappellini, M. D., Porter, J. B., Viprakasit, V., & Taher, A. T. A paradigm shift on beta-thalassaemia treatment: How will we manage this old disease with new therapies? *Blood reviews*. 2018; 32 (4): 300-311.

Costa, F., Zago, M., Cheng, G., Nechtman, J., Stoming, T., & Huisman, T. The brazilian type of nondeletional α gamma-fetal hemoglobin has a c----g substitution at nucleotide-195 of the α gamma-globin gene. 1990.

Çavdar, A. O., & Arcasoy, A. The incidence of β -thalassemia and abnormal hemoglobins in turkey. *Acta haematologica*. 1971; 45 (5): 312-318.

De Sanctis, V., Tangerini, A., Testa, M., Lauriola, A., Gamberini, M., Cavallini, A., & Rigolin, F. Final height and endocrine function in thalassaemia intermedia. *Journal of pediatric endocrinology & metabolism: JPEM*. 1998; 11: 965.

Deng, W., Lee, J., Wang, H., Miller, J., Reik, A., Gregory, P. D., Blobel, G. A. Controlling long-range genomic interactions at a native locus by targeted tethering of a looping factor. *Cell*. 2012; 149 (6): 1233-1244.

El Gawhary, S., Farid, M., Ezzat, M., ElAwady, H., & Mostafa, H. Xmn polymorphism in egyptian patients with β -thalassemia major and its correlation with the hbf level. *Gene Reports*. 2018; 11: 69-73.

El Kababi, S., El Khalfi, B., El Maani, K., & Soukri, A. β thalassemia major: Overview of molecular etiology, pathophysiology, current and novel therapeutic approaches. *International Blood Research & Reviews*. 2019: 1-15.

Eleftheriou, A. Thalassemia international federation: Guidelines for the clinical management of thalassemia. Thalassemia International Federation Nicosia Cyprus. 2008.

Galanello, R., & Origa, R. Beta-thalassemia. *Orphanet journal of rare diseases*. 2010a; 5 (1): 11.

Galanello, R., & Origa, R. Beta-thalassemia. *Orphanet journal of rare diseases*. 2010b; 5: 11.

Galanello, R., Piras, S., Barella, S., Leoni, G., Cipollina, M., Perseu, L., & Cao, A. Cholelithiasis and gilbert's syndrome in homozygous β - thalassaemia. *British journal of haematology*. 2001; 115 (4): 926-928.

Giardine, B., van Baal, S., Kaimakis, P., Riemer, C., Miller, W., Samara, M., . . . Patrinos, G. P. Hbvar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations: 2007 update. *Human Mutation*. 2007; 28 (2): 206-206.

Ginder, G. D. Epigenetic regulation of fetal globin gene expression in adult erythroid cells. *Transl Res*. 2015; 165 (1): 115-125.

Gumucio, D. L., Rood, K. L., Gray, T. A., Riordan, M. F., Sartor, C. I., & Collins, F. S. Nuclear proteins that bind the human gamma-globin gene promoter: Alterations in binding produced by point mutations associated with hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Mol Cell Biol*. 1988; 8 (12): 5310-5322.

Güngör, A. A., Demir, Y., & Demir, N. Anormal hemoglobinler'in farklı hemoglobin elektroforezleri ile belirlenmesi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Fen Dergisi. 2011; 6 (1): 40-54.

Güvenc, B., Canataroglu, A., Unsal, C., Yildiz, S. M., Turhan, F. T., Bozdogan, S. T., Erkman, H. B-thalassemia mutations and hemoglobinopathies in adana, turkey: Results from a single center study. Archives of medical science: AMS. 2012; 8 (3): 411.

Güzeloğlu, Ö. K., Keser, İ., Özeş, O. N., Canatan, D., Yeşilipek, A., & Lüleci, G. Compound heterozygosity for two β chain variants: The mildly unstable hb tyne (codon 5 pro $\rightarrow$ ser) and hbs (codon 6 glu $\rightarrow$ val). Turkish journal of haematology: official journal of Turkish Society of Haematology. 2005; 22 (1): 37-40.

Güzeloğlu, Kayisli, O., Cetin, Z., Keser, I., Ozturk, Z., Tuncer, T., Canatan, D., & Luleci, G. Relationship between sp1 polymorphism and osteoporosis in β thalassemia major patients. Pediatrics International. 2008; 50 (4): 474-476.

Hardison, R. C. Evolution of hemoglobin and its genes. Cold Spring Harb Perspect Med. 2012; 2 (12): a011627-a011627.

Herklotz, Risch, & Huber. Hämoglobinopathien–klinik und diagnostik von thalassämien und anomalen hämoglobinen. Therapeutische Umschau. 2006; 63 (1): 35-46.

Higgs, D. R., Engel, J. D., & Stamatoyannopoulos, G. Thalassaemia. The Lancet. 2012; 379 (9813): 373-383.

Higgs, D., & Weatherall, D. The alpha thalassaemias. Cellular and molecular life sciences. 2009; 66 (7): 1154-1162.

Hsiao Phin Joanna, V., & Jim, V. Controlling α -globin: A review of α -globin expression and its impact on β -thalassemia. Haematologica. 2008; 93 (12): 1868-1876.

Jensen, F. B., Fago, A., & Weber, R. E. Hemoglobin structure and function. Fish physiology. 1998; 17: 1-40.

Jha, R., & Jha, S. β thalassemia-a review. Journal of pathology of Nepal. 2014; 4 (8): 663-671.

Keser, I. b., Canatan, D., Güzeloglu-Kayışli, Ö., Cosan, R., & Lüleci, G. (2001). *B-thalassemia major associated with down syndrome*. Paper presented at the Annales de genetique.

Keser, I., Kayisli, O. G., Yesilipek, A., Ozes, O. N., & 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., Manguoğlu, E., Kayışli, Ö. G., Kurt, F., Mendilcioğlu, I., Şimşek, M., . . . LÜLECİ, G. Prenatal diagnosis of b-thalassemia in the antalya province. Turkish Journal of Medical Sciences. 2005; 35 (4): 253-255.

Keser, I., Manguoglu, E., Kayisli, O., Yesilipek, A., & Luleci, G. Combination of hb knossos [cod 27 (gt)] and ivsii-745 (cg) in a turkish patient with beta-thalassemia major. Genetic testing. 2007; 11 (3): 228-230.

Keser, I., Öztaş, A., Bilgen, T., & Canatan, D. First observation of hemoglobin kansas [β 102 (g4) asn→ thr, aac> acc] in the turkish population. Turkish Journal of Hematology. 2015; 32 (4): 374.

Keser, I., Sanlioglu, A., Manguoglu, E., Kayisli, O. G., Nal, N., Sargin, F., . Canatan, D. Molecular analysis of beta-thalassemia and sickle cell anemia in antalya. Acta haematologica. 2004; 111 (4): 205-210.

Keser, İ., YEŞİLİPEK, A., Canatan, D., & Lüleci, G. Abnormal hemoglobins associated with the beta-globin gene in antalya province, turkey. Turkish Journal of Medical Sciences. 2010; 40 (1): 127-131.

Kohne, E. Hemoglobinopathies: Clinical manifestations, diagnosis, and treatment. Deutsches Ärzteblatt International. 2011; 108 (31-32): 532.

Kohne, E., & Kleihauer, E. Hemoglobinopathies: A longitudinal study over four decades. Dtsch Arztebl Int. 2010; 107 (5): 65-71.

Makis, A., Hatzimichael, E., Papassotiriou, I., & Voskaridou, E. 2017 clinical trials update in new treatments of β - thalassemia. *American journal of hematology*. 2016; 91 (11): 1135-1145.

Manguoğlu, E., Sargin, C. F., Nal, N., Keser, I., Küpesiz, A., Yeşilipek, A., & Lüleci, G. Combination of ivs2. 849 ag with ivs1. 1 ga: A mutation of β -globin gene in a turkish β -thalassemia major patient. *Pediatric hematology and oncology*. 2005; 22 (4): 291-295.

Martyn, G. E., Wienert, B., Yang, L., Shah, M., Norton, L. J., Burdach, J., . . . Funnell, A. P. Natural regulatory mutations elevate the fetal globin gene via disruption of bcl11a or zbtb7a binding. *Nature genetics*. 2018; 50 (4): 498-503.

Mendilcioglu, I., Yakut, S., Keser, I., Simsek, M., Yesilipek, A., Bagci, G., & Luleci, G. Prenatal diagnosis of β -thalassemia and other hemoglobinopathies in southwestern turkey. *Hemoglobin*. 2011; 35 (1): 47-55.

Modares Sadeghi, M., Shariati, L., Hejazi, Z., Shahbazi, M., Tabatabaiefar, M. A., & Khanahmad, H. Inducing indel mutation in the sox6 gene by zinc finger nuclease for gamma reactivation: An approach towards gene therapy of β thalassemia. *Journal of cellular biochemistry*. 2018; 119 (3): 2512-2519.

Modell, B., & Darlison, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008; 86 (6): 480-487.

Munshi, A., Dadeech, S., Babu, M. S., & Khetarpal, P. (2015). Modifiers of γ -globin gene expression and treatment of β -thalassemia. *Inherited Hemoglobin Disorders*, 103.

Musallam, K. M., Rivella, S., Vichinsky, E., & Rachmilewitz, E. A. Non-transfusion-dependent thalassemias. *Haematologica*. 2013; 98 (6): 833-844.

Musallam, K. M., Taher, A. T., Cappellini, M. D., & Sankaran, V. G. Clinical experience with fetal hemoglobin induction therapy in patients with β -thalassemia. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*. 2013; 121 (12): 2199-2212.

Nassar, A. H., Naja, M., Cesaretti, C., Eprassi, B., Cappellini, M. D., & Taher, A. Pregnancy outcome in patients with (Ginder)-thalassemia intermedia at two tertiary care centers, in beirut and milan. *Haematologica*. 2008; haematol. 13152v13151.

Nazı Başak, A. The molecular pathology of β -thalassemia in turkey: The boğaziçi university experience. *Hemoglobin*. 2007; 31 (2): 233-241.

Nienhuis, A. W., & Nathan, D. G. Pathophysiology and clinical manifestations of the β -thalassemias. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012; 2 (12): a011726.

Orig, R., Fiumana, E., Gamberini, M. R., Armari, S., Mottes, M., Sangalli, A., . . . Borgna-Pignatti, C. Osteoporosis in beta-thalassemia: Clinical and genetic aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005; 1054: 451-456.

Öney, S., Öztürk, Z., Küpesiz, A., Keser, İ., & Yeşilipek, M. A. Beta-talasemi taşıyıcılarında beta-globin gen mutasyon tipi ve hematolojik fenotip arasındaki ilişki. *Türk Çocuk Hematoloji Dergisi*. 2008; 2 (4): 23-28.

Perrine, S. P. Hemoglobin f: New targets, new path. *Blood*. 2006; 108 (3): 783-784.

Rani, M. J., Vijayakumar, S., Kumar, G. V., & Chandana, N. International journal of pharmacology research. 2013; 3 (2): 71-79.

Sankaran, V. G., & Orkin, S. H. The switch from fetal to adult hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013; 3 (1): a011643.

Shah, F. T., Sayani, F., Trompeter, S., Drasar, E., & Piga, A. Challenges of blood transfusions in β -thalassemia. *Blood Rev*. 2019; 37: 100588.

Shariati, L., Rohani, F., Heidari Hafshejani, N., Kouhpayeh, S., Boshtam, M., Mirian, M., . . . Pieper, I. L. Disruption of sox6 gene using crispr/cas9 technology for gamma - globin reactivation: An approach towards gene therapy of β - thalassemia. *Journal of cellular biochemistry*. 2018; 119 (11): 9357-9363.

Shen, Y., Bassett, M. A., Gurumurthy, A., Nar, R., Knudson, I. J., Guy, C. R., . . . Bungert, J. Identification of a novel enhancer/chromatin opening element associated with high-level γ -globin gene expression. *Mol Cell Biol*. 2018; 38 (19): e00197-00118.

Slightom, J. L., Blechl, A. E., & Smithies, O. Human fetal γ and δ globin genes: Complete nucleotide sequences suggest that DNA can be exchanged between these duplicated genes. *Cell*. 1980; 21 (3): 627-638.

Steinberg, M. H., & Thein, S. L. Fetal hemoglobin (hemoglobin f) in health and disease. UpToDate, Post TW (Ed), UpToDate, Waltham, MA.(Accessed on November. 2013; 25.

Taher, A. T., Othrock, Z. K., Uthman, I., & Cappellini, M. D. Thalassemia and hypercoagulability. *Blood reviews*. 2008; 22 (5): 283-292.

Thein, S., Hesketh, C., Taylor, P., Temperley, I., Hutchinson, R., Old, J., Weatherall, D. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta-thalassemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1990; 87 (10): 3924-3928.

Thomas, C., & Lumb, A. B. Physiology of haemoglobin. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care and Pain*. 2012; 12 (5): 251-256.

Ugrin, M., Stojiljkovic, M., Zukic, B., Klaassen, K., Katsila, T., Vasiljevic, J., . . . Pavlovic, S. Functional analysis of an $\alpha\gamma$ -globin gene promoter variant (hb γ 1: G.-225_-222delagca) underlines its role in increasing fetal hemoglobin levels under erythropoietic stress. *Hemoglobin*. 2016; 40 (1): 48-52.

Ulasli, M., Oztuzcu, S., Kirkbes, S., Bay, A., Igci, Y. Z., Bayraktar, R., . . . Aytekin, E. Novel β (beta)-thalassemia mutation in turkish children. *Indian Journal of Hematology and Blood Transfusion*. 2015; 31 (2): 218-222.

Voskaridou, E., Anagnostopoulos, A., Konstantopoulos, K., Stoupa, E., Spyropoulou, E., Kiamouris, C., & Terpos, E. Zoledronic acid for the treatment of osteoporosis in patients with beta-thalassemia: Results from a single-center, randomized, placebo-controlled trial. *Haematologica*. 2006; 91 (9): 1193-1202.

Weatherall, D. J. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*. 2010; 115 (22): 4331-4336.

Weatherall, D. J., Williams, T. N., Allen, S. J., & O'Donnell, A. The population genetics and dynamics of the thalassemias. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2010; 24 (6): 1021-1031.

Weatherall, D., & Clegg, J. *The thalassaemia syndromes*. 4th edn oxford. UK: Blackwell Science.[Google Scholar]. 2001.

Wienert, B., Funnell, A. P., Norton, L. J., Pearson, R. C., Wilkinson-White, L. E., Lester, K., Crossley, M. Editing the genome to introduce a beneficial naturally occurring mutation associated with increased fetal globin. *Nat Commun*. 2015; 6: 7085

Wilber, A., Nienhuis, A., & Persons, D. Transcriptional regulation of fetal to adult hemoglobin switching: New therapeutic opportunities. *Blood*. 2011b; 117: 3945-3953.

Zhou, D., Liu, K., Sun, C.-W., Pawlik, K. M., & Townes, T. M. Klf1 regulates *bcl11a* expression and γ -to β -globin gene switching. *Nature genetics*. 2010; 42 (9): 742-744.

EKLER

EK 1. AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

a. Araştırmanın Adı:

Antalya'da β Talasemi Majör Hastalarında gamma globin promotor bölge mutasyonları ve Hb F ilişkisinin araştırılması

b. Araştırmanın İçeriği:

BetaTalasemi Majör Dünya çapında yaygın olarak görülen otozomal resesif kalıtılan tek gen hastalıklarından biridir. Beta Talasemi Majör hastalarında β globin zinciri üretimi yetersizliğinden kaynaklı olarak şiddetli hemolitik anemi görülür ve hasta olan bireyler düzenli olarak her ay kan transfüzyonuna ihtiyaç duyarlar. Hemogloblin F fetus ve yenidoğanlarda major hemoglobin olup 2 yaşından sonra normal çocuklarda % 2 nin altına düşer. Bazı β Talasemi Majör hastalarında β globin zinciri hiç üretilmeyip Hb A bulunmamasına rağmen Hb F seviyesinin yüksek oluşu nedeniyle düzenli kan transfüzyonu gerektirmeden yaşamlarına devam edebilmektedirler. Bu bilgiler ışığında araştırmamızın amacı gamma globin promotor bölge mutasyonlarının taranması ve Hb F yapımı ile ilgili etkilerini araştırarak elde edilen bulguların ileriye yönelik yeni tedavi protokolleri geliştirilmesine katkı sağlaması beklenmektedir.

c. Araştırmanın Amacı:

Bu projemizin amacı, gamma globin bölge mutasyonlarının taranması ve Hb F yapımı ile ilgili etkileri araştırılarak elde edilen bilgilerin ileriye yönelik yapılan çalışmalara katkı sunmasıdır.

d. Araştırmanın Nedeni:

() Bilimsel araştırma

(X) Tez çalışması

e. Araştırmanın Öngörülen Süresi: Satın alma işlemleri tamamlandıktan sonra 1yıl.

f. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı: 60 olgu

g. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:

- Örneklerden DNA izolasyonu
- Araştırılacak genlere özgül tasarlanan primerlerle ilgili genlerin amplifikasyonu (PZR yöntemi ile)
- Amplifiye edilen bölgelerin DNA dizi analizi

2. Gönüllünün/Katılımcının Uygulama Sırasında Karşılaşabileceği Riskler ve Rahatsızlıklar :

Yukarıda açıklanan araştırma sırasında uygulanacak olan işlemlerin bana aşağıda belirtilen riskleri ve rahatsızlıkları getirebileceğinin bilincindeyim:

Diğer kan alma işlemlerinde olduğu gibi kan alınan yerde kızarma, şişme ve ağrı oluşabilir. Bunun dışında girişimsel bir işlem yapılmayacağı için herhangi bir risk veya zarar yoktur.

3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

Beta talasemi majör hastalarındaki gamma globin promotor bölge mutasyonlarının belirlenmesi ile Hb F seviyelerinin ilişkisinin belirlenmesi ileriye yönelik yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

Araştırmanın yürütülmesi sırasında olası yan etkiler, riskler ve zararlar ile haklarım konusunda bilgi almak için aşağıda belirtilen kişiyle bağlantı kurmam yeterli olacaktır.

Adı- Soyadı: Prof.Dr.İbrahim KESER

Adı- Soyadı: Arş. Gör.Murat BİLLOR

5. Zararların Karşılanması:

Bu çalışmaya katıldığım için zarar göreceğim olursam, gerekli olan tıbbi bakımın sorumlu araştırmacı tarafından yerine getirileceği, uygulanan işleme bağlı olarak gelişebilecek her tür hasara (sakatlanma ve ölüm dahil) karşı güvencede olduğum, masraflarımıntarafından karşılanacağı bana bildirildi.

6. Araştırma Giderleri:

Araştırma kapsamındaki bütün işlemler için benden ya da bağlı bulunduğum sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir.

7. Gönüllülük, Çalışmayı Reddetme ve Çalışmadan Çekilme Hakkı, Çalışmadan Çıkarılma:

- Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.
- Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.
- Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.

8. Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.

9. Gizlilik:

Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak ,bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

10. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularıma doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabulediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....
Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):
.....
.....

Tarih:

Açıklamaları Yapan Araştırmacının Adı- Soyadı: Prof. Dr. İbrahim KESER

İmzası:

Tarih:

Adı-Soyadı: Arş. Gör. Murat BİLLOR

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin Adı- Soyadı:

Prof. Dr. Erdal KURTOĞLU

İmzası:

Görevi:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Murat	Uyruğu	T.C
Soyadı	Billor	Tel no	
Doğum tarihi		e-posta	

Eğitim Bilgileri

Mezun olduğu kurum		Mezuniyet yılı
Lise	Yavuz Selim Lisesi	2002
Lisans	Gaziantep Üniversitesi Biyoloji Lisans	2007
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Genetik	2021
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyolog	Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Patoloji A.B.D	2007-

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	60

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Antalya’da β Talasemi Majör hastalarında gamma globin promoter bölge mutasyonları ve Hb F ilişkisinin araştırılması	BAP	2019-2021

Burslar-Ödüller:

Yayınlar ve Bildiriler: