ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TALASEMİ A (ALFA)'NIN BAZI MOLEKÜLER VE GENETİK YAPISININ İNCELENMESİ

Ghassan Haikel Abedallah ALMOSA

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Çankırı
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ghassan Haikel Abedallah ALMOSA tarafından hazırlanan **"Talasemi A (ALFA)'nın Bazı Moleküler Ve Genetik Yapısının İncelenmesi**" adlı tez çalışması 24/06/2021 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK

Eş Danışman : Dr. Amran Mezher Lawas AL-LAWAS

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi İlkay ÇORAK ÖCAL
Çankırı Karatekin Üniversitesi
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Salih SARICAOĞLU
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Terapi ve Rehabilitasyon Bölümü

Yukarıdaki Sonucu Onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine göre hazırlamış olduğum "**TALASEMİ A (ALFA)'NIN BAZI MOLEKÜLER VE GENETİK YAPISININ İNCELENMESİ**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programıyla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmenliğine ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim. (24/ Haziran /2021).

GHASSAN HAIKEL ABEDALLAH ALMOSA

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TALASEMİ A (ALFA)'NIN BAZI MOLEKÜLER VE GENETİK YAPISININ İNCELENMESİ

Ghassan Haıkel Abedallah ALMOSA

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Eş danışman: Dr. Amran Mezher Lawas AL-LAWAS

Genellikle Akdeniz ülkelerine ait ırklarda görülen ve kalıtsal bir hastalık olan Talesemi, hemoglobin yapımındaki bozukluk sonucunda ortaya çıkmaktadır. Hemoglobinde, globin parçasının iki alt birimi olan alfa ve beta zincirlerinde kalıtsal bozukluklar talesemiye yol açmaktadır. Çalışmamızda, Irak'ın Tikar Vilayetinde Yer Alan Kalıtsal Kan Hastalıkları Merkezi'ne başvuran hastalar arasından 120 tanesine erişilmiş ve deney grubu oluşturulmuştur. Hastalardan alınan numuneler kullanılarak gerçekleştirilen deneysel çalışma sonucunda, Taleseminin moleküler teşhisine yönelik anlamlı sonuçlara ulaşılmıştır. Bu çalışmada, talaseminin genetik moleküler incelemesi gerçekleştirilmiştir. Delesyon allelleri için hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak SYBR-PCR yöntemi tercih edilmiş sonuçlar klasik PCR yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Agaroz jel elektrofezinden elde edilen PCR ürünlerinden bant görünümü elde edilememiştir ancak SYBR-PCR yönteminde yaklaşık 20 kat daha verimli sonuç elde edilmiştir. Son olarak 120 adet DNA numunesi, 4 farklı SYBR-PCR/DC analiz teknikleri ile test edilmiştir. Sonuçların mPCR/jel elekrofez yöntemi ile tutarlı ve üstelik daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

2021, 76 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Talesemi, Moleküler Teşhis, Genetik Özellikler, PCR, DNA

ABSTRACT

Master of Science Thesis

STUDY OF SOME MOLECULAR GENETIC PROPERTIES OF THALASSEMIA A (ALFA)

Ghassan Haıkel Abedallah ALMOSA

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK
Dr. Amran Mezher Lawas AL-LAWAS

Thalassemia, which is an inherited disease that is generally seen in races belonging to Mediterranean countries, occurs as a result of a defect in hemoglobin production. Inherited disorders in the alpha and beta chains, two subunits of the globin part, in hemoglobin cause thalassemia. In our study, 120 of the patients who applied to the Hereditary Blood Diseases Center in Tikar Province of Iraq were reached and the experimental group was formed. As a result of the experimental study performed using samples taken from the patients, significant results were obtained regarding the molecular diagnosis of thalesemia. In this study, genetic molecular analysis of thalassemia was carried out. SYBR-PCR method was preferred as a fast and reliable method for deletion alleles and the results were compared with classical PCR method. Band appearance could not be obtained from the PCR products obtained from agarose gel electrophoresis, but approximately 20 times more efficient results were obtained in the SYBR-PCR method. Finally, 120 DNA samples were tested with 4 different SYBR-PCR / DC analysis techniques. The results were found to be consistent with the mPCR / gel electrophoresis method and more sensitive.

2021, 76 pages

KEYWORDS: Thalesemia, Molecular Diagnosis, Genetic Features, PCR, DNA

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Hayatımda tüm zorlukları benimle göğüsleyen ve hayatımın her evresinde ben destekleyen en değerli insanlar babam ve annem, çalışmanın her safhasında yakın ilgi ve önerileri ile beni yönlendiren, her türlü yardımını esirgemeyen, her zaman destekleyen, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı önemini asla unutmayacağım, büyük bir anlayış gösteren ve hiç kırmayan değerli danışman hocam Prof. Dr. Seçil AKILLI ŞİMŞEK'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

GHASSAN HAİKEL ABEDALLAH ALMOSA

Çankırı, Haziran 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1. GİRİŞ **1**
2. KURAMSAL BİLGİLER **3**
2.1 Hemoglobinin Araştırma Geçmişi **3**
2.2 Hemoglobin Molekülünün Yapısı **4**
2.2.1 Hem'in Yapısı **5**
2.2.2 Globin zincir gen yapısı **7**
2.3 Hemoglobin Molekülünün Kalıtsal Bozuklukları **9**
2.3.1 Anormal hemoglobinler **11**
2.3.2 Talasemiler **12**
2.4 β-Talasemi **22**
2.4.1 β-talaseminin moleküler tanısı **26**
2.5 Klinik Ciddiyet, Klasik Tedavi ve Yeni Tedaviler Üzerine Genetik Faktörler, β-Talasemi İçin Gen Terapisi **28**
2.6 B-Talasemide Klasik Tedaviler **29**
2.6.1 Transfüzyon tedavisi **30**
2.6.2 Splenektomi **30**
2.6.3 Demir şelasyon tedavisi **31**
2.6.4 Fetal hemoglobin üretiminin değişmesi **31**
2.6.5 Antioksidanlar **32**
2.7 Proteine Dayalı Teşhis Yöntemleri **41**
2.7.1 Hemoglobin electrophoresis **41**
2.7.2 HPLC **41**
2.7.3 Hemoglobin bozukluklarının teşhisinde elektroforez ve kromatografinin kullanımı **42**

3. MATERYAL VE YÖNTEM 44
3.1 Materyal 44
3.1.1 Hastaların seçimi 44
3.2 Yöntem 44
3.2.1 Numunelerin toplanması 44
3.2.2 Dna ekstraksiyonu 45
3.2.3 PCR primerleri 45
3.2.4 Sybr-PCR 46
3.2.5 Erime eğrilerinin yorumlanması 46
3.2.6 mPCR/agaroz jel elektrofezi 47
3.2.7 Klonlama ve dizileme (sekanslama) 48
4. BULGULAR 49
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 56
KAYNAKLAR 60
ÖZGEÇMİŞ 76

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	Deoksi Nükleotit Tri Fosfat
HS	Hipersensitif
Hb	Hemoglobin
PCR	Polimeraz Zincirleme Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
RT-PCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 Deoksihemoglobinin Yapısı 1
Şekil 2.1 Hem molekülünün yapısı 6
Şekil 2.2 Tetrapirolunun yapısal şekli 6
Şekil 2.3 Kromozom 11p15.5 üzerinde β-globin gen kümesinin ve kromozom 16p13.3 9
Şekil 2.4 Hemoglobin varyantlarının ve talasemilerin dünya üzerindeki yayılımı 11
Şekil 2.5 Hemoglobin H hastalığı 19
Şekil 2.6 Fetustan yetişkinlere globin geçişinde önemli faktörler 25
Şekil 2.7 Beta talasemi için gen tedavisi stratejileri 34
Şekil 4.1 SEA/pozitif ve SEA/negatif DNA örneklerinin SYBR-PCR1 ile mplifikasyon grafiği. Sol taraf amplifikasyonu sağ taraf DC verilerini göstermektedir 50
Şekil 4.2 a/Pozitif ve a/Negatif (a/3,7) DNA Numunelerinin amplifikasyon ve DC grafiği. Sol taraf amplifikasyonu sağ taraf DC verilerini göstermektedir 51
Şekil 4.3 a/Pozitif ve a/Negatif (a/4,2) DNA Numunelerinin amplifikasyon ve DC grafiği. Sol taraf amplifikasyonu, sağ taraf DC verilerini göstermektedir 52
Şekil 4.4 SYBR-PCR4'te kullanılan primerlerin konsantrasyonlarının DC üzerindeki etkisi. Primer CD2 've C "konsantrasyonları sırasıyla (A) 0,10ng, (B) 0,125ng, (C) 0,150ng ve (D) 0,175ng 53
Şekil 4.5 DC (C) analizinin hassasiyetlerinin SYBR-PCR4 reaksiyonundan (B) sonra agaroz jel elektroforezi (A) ile karşılaştırılması. P206-bp DNA'nın orijinal kopya sayısı: (1) 1,60 x 10^5, (2) 1,60 x 10^4, (3) 1,60 x 10^3, (4) 1,60 x 10^2, (5) 1,60 x 10, (6) 1,60 x 1 6D: Standart Eğiris. M (A): ’a6’cbDNA/ Hind µEcoRµ 54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 Irak'ta belirlenen alfa globin zincirinden kaynaklı anormal hemoglobinler (Eatherall et al. 1981, White et al. 1985, Cavdar 1971) 12

Çizelge 2.2 Hemoglobin Karşılaştırmalı Alfa Talasemi (Denic et al. 2011) 21

Çizelge 3.1 PCR Primer dizileri 47

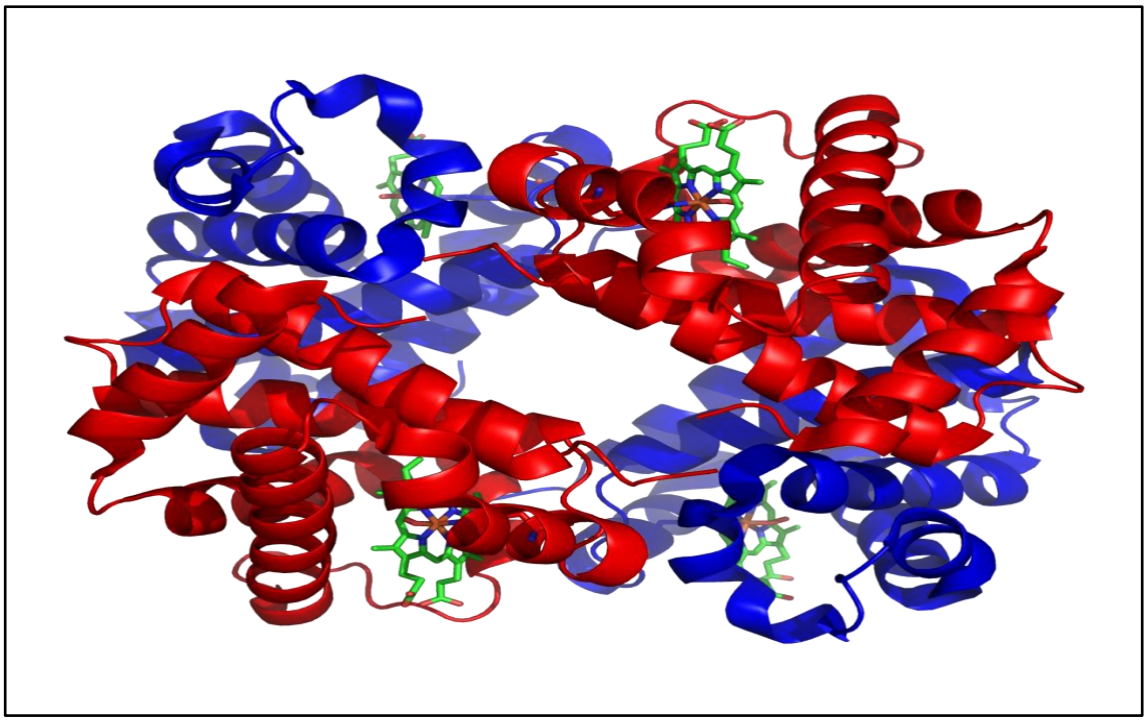
Çizelge 4.1 Genotipleme sonuçları ile 120 DNA numunesinin teşhisi. 4 SYBR-PCR ve / DC ve mPCR Sonuçları 55

Çizelge 5.1 Özellikler iki aralık içerir (Orta ve Yüksek) 57

1. GİRİŞ

Hemoglobin, Hb veya Hgb olarak kısaltılır, hemen hemen tüm omurgalıların kırmızı kan hücrelerinde (eritrositler) demir içeren oksijen taşıyan metaloproteindir ve bazılarının dokularıdır. Omurgasızlarda, kandaki hemoglobin, oksijeni akciğerlerden veya solungaçlardan vücudun geri kalanına (yani dokulara) taşır. Metabolizma adı verilen süreçte, organizmanın işlevlerine güç sağlamak için enerji sağlamak için aerobik solunuma izin vermek için oksijen salınır. Sağlıklı bir birey, her 100 mL kanda 12 ila 20 gram hemoglobine sahiptir (Patton and Kevin 2015, Zhao *et al.* 2001).

Hemoglobin diğer gazların taşınmasında da rol oynar. CO_2'nin hem proteinine bağlı olduğu karbaminohemoglobin olarak vücudun solunum karbondioksitinin bir kısmını (toplamın yaklaşık %20-25'i) taşır. Molekül ayrıca bir globin proteini tiyol grubuna bağlı önemli düzenleyici molekül nitrik oksidi taşır ve onu oksijenle aynı zamanda serbest bırakır (Patton and Kevin 2015, Weatherall and Clegg 1981). Bkz Şekil 1.1.



Şekil 1.1 Deoksihemoglobinin Yapısı (Branson *et al.* 2014)

Talasemiler, hemoglobin üretiminde azalma ile karakterize kalıtsal Kan hastalıklarıdır. Belirtiler türe bağlıdır ve hiç ile şiddetli arasında değişebilir. Genellikle hafif ila şiddetli anemi (düşük kırmızı kan hücreleri veya hemoglobin) vardır. Anemi, yorgun ve soluk cilt hissine neden olabilir. Ayrıca kemik problemleri, genişlemiş dalak, sarımsı cilt ve koyu renkli idrar olabilir. Çocuklarda yavaş büyüme meydana gelebilir (Unissa et al. 2018, Vergin 2008). 2015 yılı itibarıyla yaklaşık 280 milyon kişide talasemi görülmekte olup, yaklaşık 439.000'i ağır hastalığa sahiptir (Vos *et al*. 2018, Abubakar *et al*. 2005).

En çok İtalyan, Yunan, Orta Doğu, Güney Asya ve Afrika kökenli insanlar arasında yaygındır (Kumari *et al*. 2016). Erkek ve kadınlarda benzer hastalık oranları vardır (Chatterjee and Shinde 2002). 1990'da 36.000 ölüm ile, 2015 yılında ise 16.800 ölümle sonuçlandı (Wang *et al*. 2006, Abubakar *et al*. 2005). Orak hücre özelliği olanlara benzer şekilde küçük talasemiye sahip olanlar, sıtmaya karşı bir miktar korumaya sahipler, bu da sıtmanın var olduğu bölgelerde neden daha yaygın olduklarını açıklamaktadır (Traivaree *et al*. 2018, Thong *et al*. 2005, Sibley and Ahlquist 1984).

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün araştırmasına göre, dünyada hemoglobino pan taşıyıcılarının sıklığı %5,1' dir ve 266 milyon taşıyıcı olduğu bildirilmiştir. Verilere göre her yıl 365.000 hemoglobino pençe hastası hayata gelir (Kutlu et al. 2006, Gu 1987). Ülkemizde en yaygın hemoglobin varyantı Hb S olup görülme sıklığı %0,5-44,2 arasındadır. Talasemi taşıyıcılarının sayısının yaklaşık 1.300.000, hasta sayısının yılda 4.500 ve 400 yeni hasta çocuğu olduğu bildirilmektedir (Yaprak 2008, Po *et al*. 1987).

Bu hastalıkların genetik bilgisine yönelik önce allele spesifik PCR ile mutasyon analizi yapılmaktadır. Bu yöntemle tanımlanamayan olgular ise DNA Dizi Analiziyle incelenmektedir.

Bu çalışmada α-talasemi frekansının yüksek olduğu IRAK (Dhi Qar Valiliği) BÖLGESİNDE Gap-PCR yöntemi ile tanımlanamayan α-talasemi mutasyon tipleri DNA dizi analizi yöntemiyle belirlenmiştir.

2. KURAMSAL BİLGİLER

2.1 Hemoglobinin Araştırma Geçmişi

J. F. Engelhart (1825), demirin proteine oranının çeşitli türlerin hemoglobinlerinde aynı olduğunu keşfetti (Engelhart, Johann Friedrich 1825). Bilinen atomik demir kütlesinden, hemoglobinin moleküler kütlesini, bir proteinin moleküler kütlesinin ilk belirlemesi olan n×16000' e (n= hemoglobin başına düşen demir atomu sayısı) hesapladı. Bu "hızlı sonuç" o zamanlar herhangi bir molekülün bu kadar büyük olabileceğine inanamayan bilim adamlarından pek çok alay konusu oldu. Gilbert Smithson Adair, Engelhart'ın 1925'teki sonuçlarını, hemoglobin çözeltilerinin ozmotik basıncını ölçerek teyit etti (Adair 1925, Goossens 1980).

Hemoglobinin oksijen taşıyan özelliği 1840 yılında Hünefeld tarafından keşfedilmiştir (Hünefeld 1840). 1851'de Alman fizyolog Otto Funke, kırmızı kan hücrelerini saf su, alkol veya eter gibi bir çözücü ile art arda seyrelterek ve ardından çözücünün elde edilen protein çözeltisinden yavaşça buharlaşmasıyla büyüyen hemoglobin kristallerini tanımladığı bir dizi makale yayınladı (Funke 1851, George 2000). Hemoglobinin tersinir oksijenasyonu birkaç yıl sonra Felix Hoppe-Seyler tarafından tanımlandı (Hoppe-Seyler 1866, Mandel and Marmur 1968).

1959'da Max Perutz, hemoglobinin moleküler yapısını X-ışını kristalografisi ile belirledi (Perutz *et al*. 1960, Myers 1987). Bu çalışma John Kendrew ile küresel proteinlerin yapıları üzerine yaptıkları çalışmalar nedeniyle 1962 Nobel Kimya Ödülü'nü paylaşmasıyla sonuçlandı.

Hemoglobinin kandaki rolü, Fransız fizyolog Claude Bernard tarafından açıklandı. Hemoglobin adı, hemoglobinin her bir alt biriminin gömülü bir heme grubuna sahip küresel bir protein olduğu gerçeğini yansıtan heme ve globin kelimelerinden türetilmiştir. Her heme grubu, bir oksijen molekülünü (iyon) ile indüklenmiş dipol kuvvetler yoluyla bağlayabilen bir demir atomu içerir. Memelilerde en yaygın

hemoglobin türü, bu tür dört alt birimi içerir (Hentze *et al*. 2010, Patton 2015, Old *et al*. 2001).

2.2 Hemoglobin Molekülünün Yapısı

Hemoglobinin kuaterner bir yapısı vardır. A ve β zincirleri olarak adlandırılan iki çift farklı proteinden oluşur. Hemoglobinin α ve β zincirlerinde sırasıyla 141 ve 146 amino asit vardır. Miyoglobinde olduğu gibi, her alt birim kovalent olarak bir heme molekülüne bağlıdır. Böylece hemoglobin, dört O_2 molekülünü bağlar. İki özdeş α zinciri ve iki özdeş β zinciri, dört yüzlü olarak düzenlenmiştir. Bu birimler, hidrofobik etkileşimler, hidrojen bağı ve ters yüklü amino asit yan zincirleri arasındaki iyon çiftleri (tuz köprüleri) ile bir arada tutulur (Liebhaber 1986).

Hemoglobinin α ve β alt birimleri işbirliği içinde etkileşime girer ve bir heme O_2'ye bağlandığında, diğerlerinin her biri hızla O_2'ye bağlanır. Sağlıklı bir yetişkin bireyde, hemoglobin A (HbA) % 95 - 97, hemoglobin A2 (HbA2) %2 - 3 ve hemoglobin F (Hb F) % 1'in altındadır (Perutz *et al*. 1960, Lau 1997).

Normal gelişim sırasında mevcut olan hemoglobinler - embriyonik dönemde ζ2γ2 (Hb Portland-1), ζ2ε2 (Hb Gower-1) ve α2ε2 (Hb Gower-2); fetal evre sırasında α2γ2 (fetal Hb veya HbF); ve α2β2 (yetişkin Hb veya HbA) yanı sıra yetişkinlerde küçük miktarlarda α2δ2 (HbA2). Gelişimin çeşitli aşamalarında belirli avantajlar sağlayan bazı farklı özelliklere sahiptir. Örneğin, bu hemoglobinler çok benzer genel yapısal mimarilere sahip olsalar da, O_2 afinitesinde ve allosterik efektörlerle etkileşimlerinde farklılıklar vardır (Hoffman et al. 1996, He 2001), stratejik pozisyonlarda amino asit ikamelerinden kaynaklanan alt birimlerin birbirine uyma biçimi (Perutz *et al.* 1989). Bu alt birim etkileşimlerinin çeşitli hemoglobinler için nasıl farklılaştığına dair bilgi, fizyolojik özelliklerinin anlaşılması açısından önemlidir.

Globin alt birimlerinin ifade sırası, göreceli gen konumlarına göre belirlenir, yani kromozom 16'da ζ → α (2 kopya) ve kromozom 11'de ε → γ (2 kopya) → δ → β

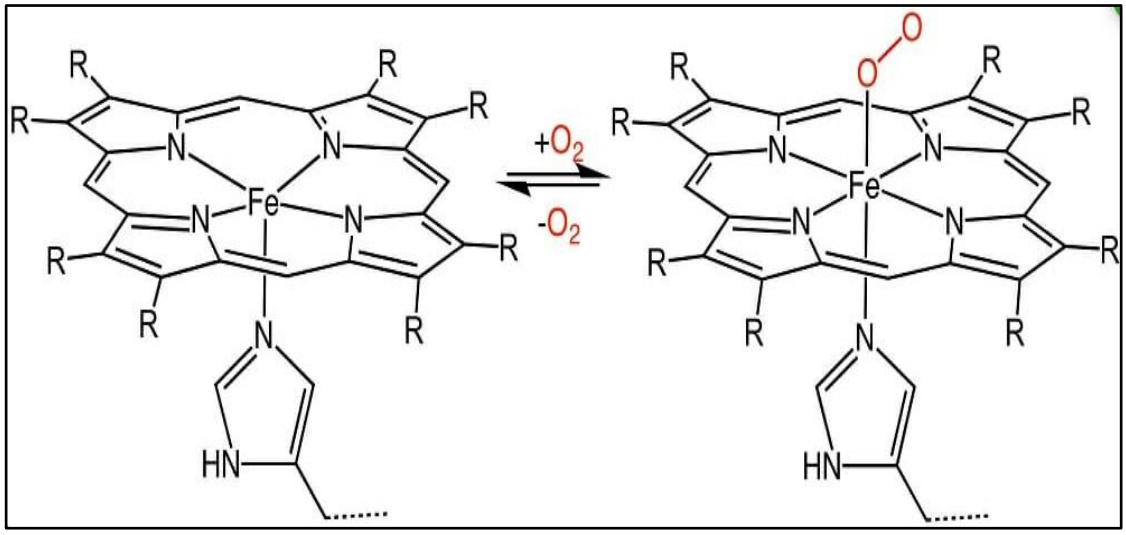
Dolayısıyla, ζ- kombinasyonları ε- veya γ- alt birimleri embriyonik hemoglobinler oluşturmak için α-alt birimleri içeren fetal ve yetişkin hemoglobinlerin ortaya çıkmasından önce meydana gelir. Bununla birlikte, bu hemoglobinler arasında herhangi bir dinamik olup olmadığı ve çeşitli gelişim aşamalarında uzun ömürlülüğünü neyin yönettiği açık değildir.

Üç yaygın embriyonik hemoglobin, Hb Portland-1 (ζ2γ2), Hb Gower-1 (ζ2ε2) ve Hb Gower-2 (α2ε2) normalde yaşamın ilk birkaç ayında mevcuttur (Huehns et al. 1965, Brittain 2004). Bununla birlikte, başka bir embriyonik Hb olan Portland-2 (ζ2β2), seyrek olarak ve esas olarak aşırı bir α-talasemi tipinde ("hidrops fetalis") bulunur; burada ζ-zincirleri, ikincisinin sentezi ciddi şekilde bozulduğunda α-zincirlerinin yerini alır (Randhawa 1984).

2.2.1 Hem'in Yapısı

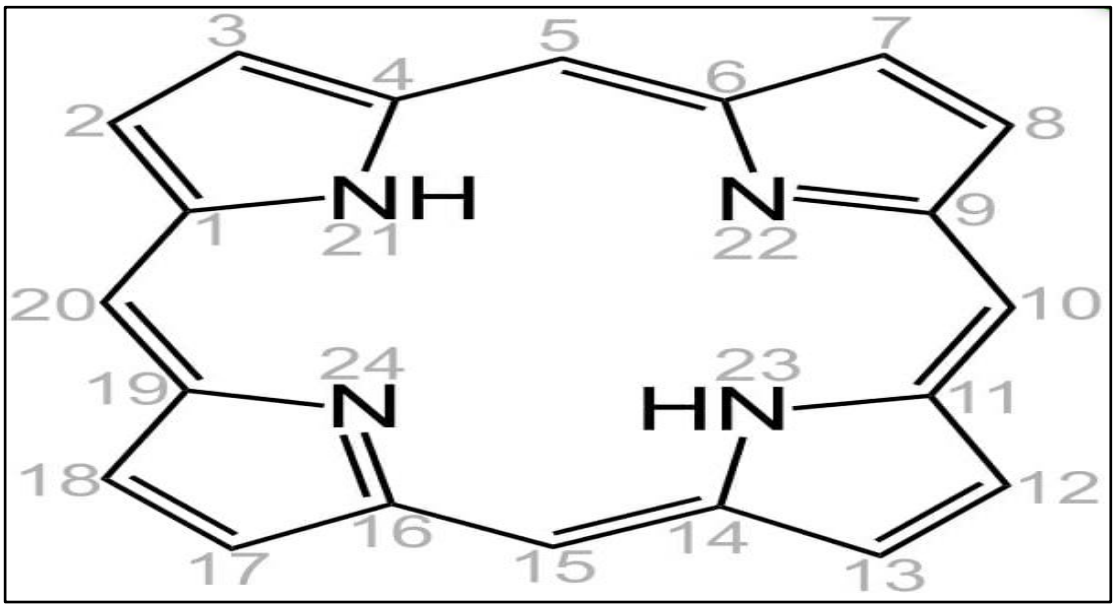
Hem organik, halka şeklinde bir moleküldür. Özel yapısı nedeniyle, bir hem bir demir molekülünü tutabilir veya "barındırabilir". Bir hem, 4 karbon ve 1 nitrojenden oluşan küçük beşgen şekilli moleküller olan 4 pirrolden yapılır. Dört pirrol birlikte bir tetrapirol oluşturur. Tetrapirol, yan zincirlerde metal iyonu tutmasına izin veren ikamelere sahipse, buna porfirin denir. Bu nedenle, bir hem, demir tutan bir porfirindir (Lodish *et al*. 2008, Inusa 2017, Higgs 2001).

Bir hem içindeki demir molekülü, dört nitrojen molekülünün dengeli çekici kuvvetleri tarafından yerinde tutulur. Azot moleküllerinin tümü, oluşturdukları daha büyük halkanın iç tarafına işaret eder. Pirolleri birbirine bağlayan çift ve tek bağlar, elektronların dengede kalması ve tüm molekülün sabit kalması için eşit olarak düzenlenmiştir. Bu onu aromatik bir molekül yapar (Lodish *et al.* 2008, Higgs 1990). Bir hem molekülü aşağıda görülebilir. Bkz Şekil 2.1 ve Şekil 2.2.



Şekil 2.1 Hem molekülünün yapısı (Turner 1989)

Tüm porfirinler gibi, hem de dört pirrolden oluşan büyük bir halkanın temel yapısına sahiptir. Doğada nadiren ara madde olarak görülen bu baz moleküle porfin denir. Bir organizmada hizmet etmesi gereken birçok işleve karşılık gelen birçok farklı hem biçimi vardır. Spesifik proteinler, bağlanmak için çeşitli yan zincirleri kullanır ve hem özelliklerini değiştirirler. Ancak temel yapı her zaman aynıdır (Pough 2009, Carton 2012). Şekil 2.2 tetrapirolü göstermektedir.



Şekil 2.2 Tetrapirolunun yapısal şekli (Tanaka and Tanaka 2007)

Moleküller üzerindeki sayılar, molekülün alabileceği ve belirli bir kullanım için değiştirilebileceği noktaları gösterir. Karbon 3, 8, ve 18'e bağlı yan zincirlerdeki farklılıklar, en yaygın hem gruplarının bazıları arasındaki farkı oluşturur. Örneğin, hemoglobin ve miyoglobin, Hem B'yi taşır. Hem B, oksijen taşır ve uygun zamanda oksijeni serbest bırakmasına yardımcı olmak için bağlı olduğu proteinler. Hem A ise sitokrom c'nin bir parçası olarak elektron taşıma zincirinde çalışır. Bu, proteinlerin taşınmasına ve reaksiyonların katalize edilmesine dahil olduğu anlamına gelir. İki molekül arasındaki tek fark, karbon 3 ve 18'e bağlanan yan zincirlerdir. Karbon 8 üzerindeki yan zincir aynı kalır (Pough 2008, Gibbons and Higgs 2001).

2.2.2 Globin zincir gen yapısı

Globin genleri iki küme halinde düzenlenmiştir. α benzeri genler, 16 numaralı kromozomun kısa kolunun 20 kb'lik bir uzak segmenti boyunca bulunur. Küme, üç fonksiyonel gen (α1, α2 ve ζ2), üç psödogen (çünkü genlerin evrimsel kalıntıları nedeniyle ifade edilmeyen evrimsel kalıntılar) ve işlevi belirlenmemiş bir gen (mutasyonları etkisizleştirmeyen globin benzeri bir gen) içerir. β benzeri gen kümesi, 11. kromozomun kısa kolunun 60-kb'lik bir bölümü boyunca yer alır ve beş işlevsel gen (β, δ, Gγ, Aγ ve ε) ve bir psödogen içerir. Her kompleksin içinde genlerin hepsi aynı 5′-3′ yönelimindedir ve gelişim sırasında ifade edildikleri sıraya göre düzenlenmiştir (Goh *et al*. 2005).

2.2.2.1 α-Benzer globin gen kümesi

α- globin gen kümesi, her kromozom 16 üzerinde 5′- ζ2-α2-α1-3′ sırasına göre düzenlenmiş 1 embriyonik ζ- ve 2 α-globin geni içerir (Şekil. 2.4). α -globin gen kümesi içinde 4 psödogen vardır (Steinberg 2009). Her bireyin 2 kromozomu 16 olduğu için, genellikle toplam 4 işlevsel α-globin geni vardır. Genel olarak, bu 4 α-globin genlerinden birleşik α-globin zincirlerinin üretimi, kromozom 11'deki 2 β-globin genlerinden türetilen β-globin zincirlerininkine yaklaşık olarak eşdeğerdir (Cao and Moi 2002, Grosso 2012).

16 Kromozom başına α-globin genlerinin sayısı, yanlış hizalanmış α-globin gen kümeleri ve diğer rekombinasyon olayları arasındaki eşit olmayan geçiş nedeniyle 0 ila 4 arasında değişebilir. Bu nedenle, bir kişinin sahip olabileceği α-globin genlerinin toplam sayısı 0 ile 7 veya 8 arasında değişebilir (Chatterjee *et al.* 2012). Bu gözlemler, insan genetik çeşitliliğinin bir örneğini göstermektedir (Kumari *et al*. 2016).

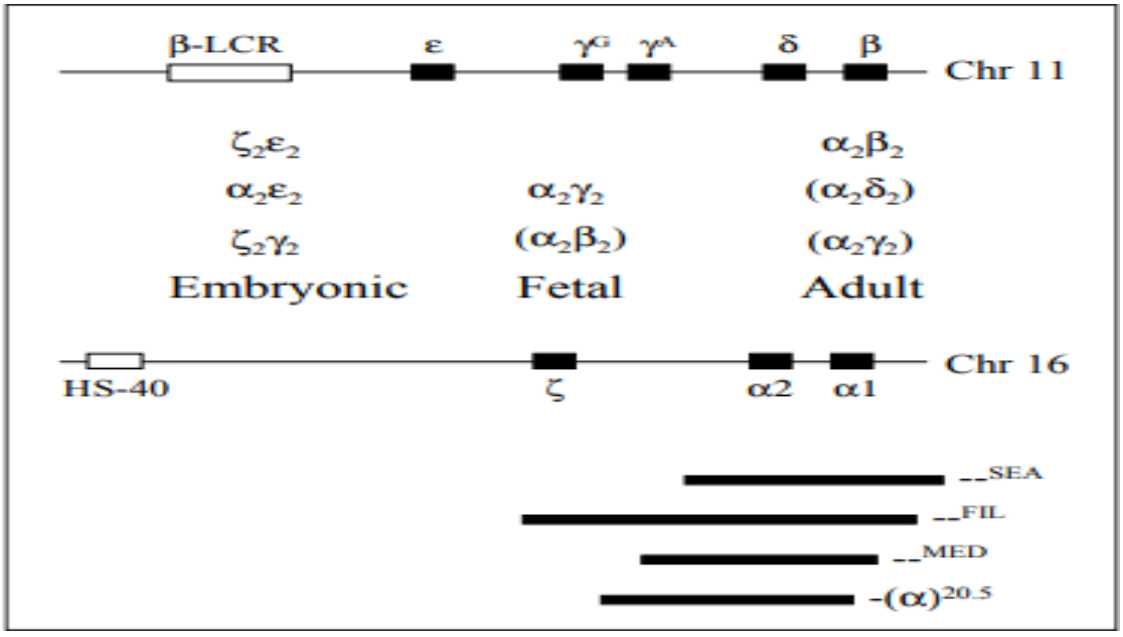
α2- ve α1-globin genleri 141 amino asit kalıntısının özdeş α-globin zincirlerini kodlarken, α2-globin geni, muhtemelen farklı etkisinden dolayı α1-globin genine göre üretilen α-globin zincirlerinin iki katını üretir. Sonuç olarak, α2-globin gen mutasyonları genellikle α1-globin geni üzerindeki aynı mutasyonlardan daha fazla ters etkilerle ilişkilendirilir (Wang *et al*. 2016).

α-globin gen kümesinin yaklaşık 40 Kb yukarı akışı, HS-40 olarak bilinen bir bölgedir ve bir dizi DNaz hiperduyarlı bölgeye ve transkripsiyon faktörleri için bağlanma bölgelerine karşılık gelir (Abubakar *et al*. 2005). Bütünlüğü, α-globin genlerinin aşağı yönde ekspresyonunu etkili bir şekilde susturan birkaç doğal silmede ortadan kaldırılmasıyla fazlasıyla gösterildiği gibi α-globin gen ekspresyonu için gereklidir (Kutlu *et al.* 2006). Bu gibi durumlarda, bu insanlar α-talasemi taşıyıcıları olarak ortaya çıkar.

α-globin genlerine ve bunların cis düzenleyici sekanslarına ek olarak, globin gen kümelerine bağlanmamış genler tarafından kodlanan önemli transkripsiyonel faktörler vardır. Bu faktörler, α-globin gen promoterine veya HS-40 sekanslarına veya her ikisine bağlanarak, diğer DNA bağlayıcı proteinlerle etkileşime girerek veya kromatin yapısını değiştirerek gen ekspresyonunu düzenlemede çok önemlidir. İyi bir örnek, kromozom Xq13.3 üzerindeki ATRX genidir. Bu genin mutasyonları, α-globin gen ekspresyonunda belirgin aşağı regülasyona ve ayrıca ciddi zihinsel engelliliğe neden olur (Yaprak 2008).

2.2.2.2 β-Benzer globin gen kümesi

β-globin gen kümesi, kromozom 11'in kısa kolu üzerinde yaklaşık 17 kb'lık bir bölgeyi kapsar. Bileşen genlerinin her biri, yan bölgeleri ve aralarındaki bölgelerin büyük uzantıları dizilenmiştir. Yapılan çalışmalar, transkripsiyon faktörü NF-E1'in eritroid olgunlaşması sırasında artan β-globin gen ekspresyonunu düzenlediğini göstermektedir. β-globin promotörünün yukarı akış segmentinde NF-E1 bağlanma bölgesinin silinmesi, murin lösemi hücrelerinde transkripsiyonun indüksiyonunu bloke eder. Bkz Şekil 2.3.



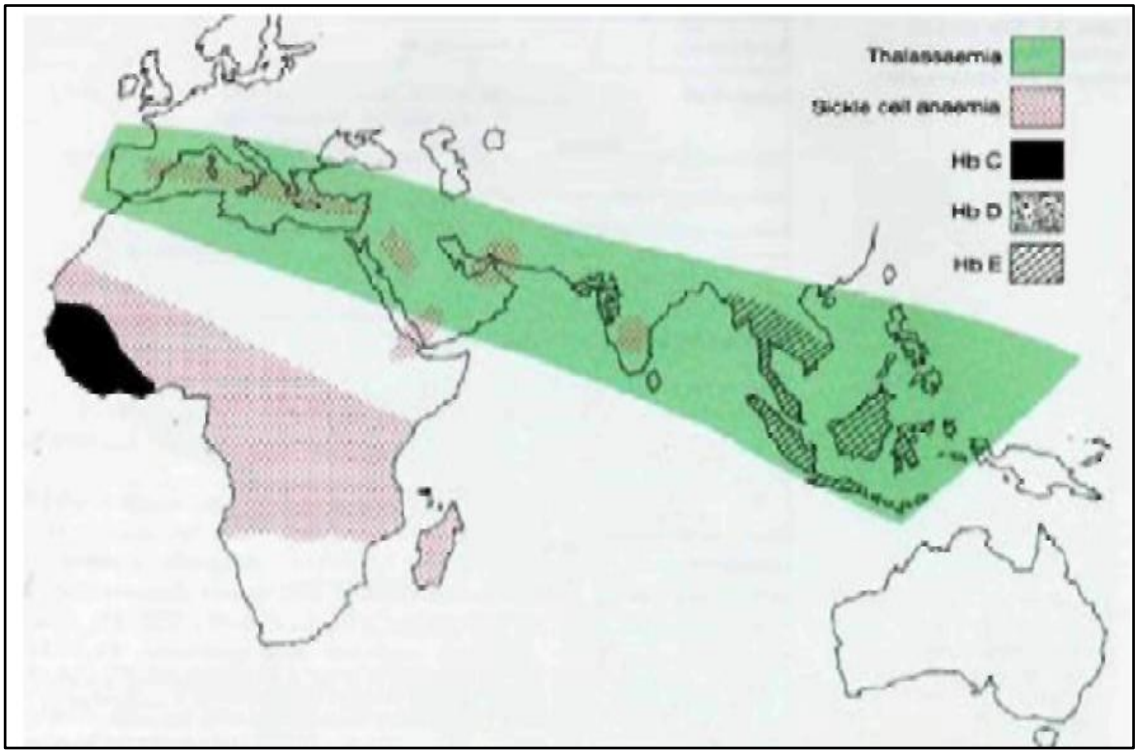
Şekil 2.3 Kromozom 11p15.5 üzerinde β-globin gen kümesinin ve kromozom 16p13.3

2.3 Hemoglobin Molekülünün Kalıtsal Bozuklukları

Kalıtsal hemoglobin bozuklukları iki ana gruba ayrılır: yapısal hemoglobin varyantları ve hatalı globin üretiminin neden olduğu talasemiler. Hepsi resesif bir kalıtım biçimini takip ediyor. Tek bir kusurlu globin genine sahip olanlar - taşıyıcılar veya heterozigotlar - semptomsuzdur. Eğer iki taşıyıcı evlenirse, ürettikleri her çocuğun her ebeveynden kusurlu genler alma şansı dörtte birdir - yani, belirli bozukluk için homozigotturlar

(Steinberg *et al.* 2001). Yapısal varyantlar çoğunlukla α veya β zincirlerindeki tekli aminoasitlerden dolayı kaynaklanır. Genellikle bunlar zararsızdır, ancak bazı durumlarda hemoglobinin stabilitesini veya fonksiyonel özelliklerini değiştirebilir ve klinik bir bozukluğa yol açabilir. Alfabedeki harflerle veya durumun ilk keşfedildiği yer adlarıyla belirtilirler. Araştırmacılar 700'den fazla yapısal hemoglobin varyantı tanımlamış olsalar da, yalnızca üçü (Hb S, Hb C ve Hb E) yaygındır. Orak hücre geni için homozigot durum, orak hücre anemisine neden olurken, orak hücre ve Hb C genleri için bileşik heterozigot durumu, Hb SC hastalığına neden olur. Hb SC hastalığı, daha hafif olmakla birlikte, önemli halk sağlığı sonuçlarına da sahiptir. Küresel olarak en yaygın varyant olan Hb E, heterozigot ve homozigot hallerinde zararsızdır, ancak HbA'dan daha az etkili bir şekilde sentezlendiği için, β talasemi ile etkileşime girerek Hb E β talasemi adı verilen ve giderek yaygınlaşan son derece yaygın bir durum oluşturur. Asya'nın birçok yerinde önemli sağlık sorunudur (Weatherall *et al*. 2001). Bkz Şekil 2.4.

Talasemiler, etkisiz olarak sentezlenen globin zincirlerine göre sınıflandırılır. Halk sağlığı açısından, sadece α ve β talasemileri önemli olacak kadar yaygındır. Irak'ta ilk hemoglobinopati çalışmaları Muzaffer Aksoy tarafından yapılmaya başlanmıştır (Aksoy *et al.* 1971, Casale *et al.* 2018).



Şekil 2.4 Hemoglobin varyantlarının ve talasemilerin dünya üzerindeki yayılımı (Vento *et al*. 2006)

2.3.1 Anormal hemoglobinler

Anormal hemoglobinler, ilgili globin genindeki nükleotidlerin dizisini veya sayısını değiştiren mutasyonlardan veya daha nadiren mayoz sırasında iki benzer gen arasında yanlış eşleşmeden ve çapraz geçişten, her iki gen dizisinin bir füzyon proteini oluşturmasından kaynaklanır. Mutasyon, etkilenen globinin polipeptit sekansındaki bir veya daha fazla aminoasidin ikamesine, eklenmesine veya silinmesine neden olabilir. Dünyada bilinen anormal hemoglobin sayısı 1037'dir Irak'ta ve dünyada en yaygın olarak gözlemlenen anormal hemoglobinler Hb S, Hb D, Hb E ve Hb C'dir. Bugüne kadar Irak genelinde belirlenen α globin zincirinden kaynaklı anormal hemoglobinler Çizelge 2.1'de verilmiştir (Giordano *et al.* 1990).

Çizelge 2.1 Irak'ta belirlenen alfa globin zincirinden kaynaklı anormal hemoglobinler (Eatherall et al. 1981, White et al. 1985, Cavdar 1971)

Mutasyonun Adı	**Mutasyon Tipi**
Hb – O – Padova	α-30 (B11) Glu->Lys (GAG->AAG)
Hb – Hasharon	α-47 (CE5) Asp->His (GAC->CAC)
Hb – Montgomery	α- 48 (CE6) Leu->Arg (CTG->CGG)
Hb – Irak	α- 59 (E8) Gly->Asp (GGC->GAC)
Hb – J – Anatolia	α- 61 (E10) Lys->Thr (AAG->ACG)
Hb – Ube -2	α- 68 (E17) Asn->Asp (AAC->GAC)
Hb - Q - İran	α- 75 (EF4) Asp->His (GAC->CAC)
Hb – Moabit	α- 86 (F7) Leu->Arg (CTG->CGG)
Hb- M-Iwate	α- 87 (F8) His->Tyr (CAC->TAC)
Hb – Çapa	α- 94 (G1) Asp->Gly (GAC->GGC)
Hb – Georgi	α- 95 (G2) Pro->Leu (CCG->CTG)
Hb – Strumica	α- 112 (G19) His->Arg (CAC->CGC)
Hb – J – Meerut	α- 120 (H3) Ala->Glu (GCG->GAG)
Hb Setif	α- 94 (G1) Asp->Tyr (GAC->TAC)
Hb Bronova	α- 103 His->Leu (CAC->TAC)
Hb – J- Paris I	α 2(A10) Ala->Asp β2 (C->A)
Hb Constant Spring	α- 142 (H19)(+31 uzamış zincir)

Not: Hb Irak ve Hb Irak çevresi Türkmenlerde ilk kez saptanan anormal hemoglobinlerdir.

2.3.2 Talasemiler

Talasemi, vücudun kırmızı kan hücrelerinin önemli bir parçası olan hemoglobin adlı proteinden yeterince üretemediği zaman ortaya çıkan kalıtsal (yani ebeveynlerden çocuklara genler yoluyla geçen) bir kan hastalığıdır. Yeterli hemoglobin olmadığında, vücudun kırmızı kan hücreleri düzgün çalışmaz ve daha kısa süre dayanırlar, bu nedenle kan dolaşımında daha az sağlıklı kırmızı kan hücresi dolaşmaktadır. Kırmızı kan hücreleri, vücudun tüm hücrelerine oksijen taşır. Oksijen, hücrelerin işlev görmek için kullandığı bir tür besindir. Yeterli sağlıklı kırmızı kan hücresi olmadığında, vücudun diğer tüm hücrelerine de yeterince oksijen verilmez ve bu da kişinin yorgun, halsiz veya

nefes darlığı hissetmesine neden olabilir. Bu, anemi denen bir durumdur. Talasemili kişilerde hafif veya şiddetli anemi olabilir. Şiddetli anemi organlara zarar verebilir ve ölüme neden olabilir (Needs *et al*. 2021)

Türk toplumunda talasemiye ait ilk moleküler çalışmalar 1987 yılında Akar ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Akar *et al*. 1987).

2.3.2.1 β – talasemi

Beta talasemiler (β talasemiler) bir grup kalıtsal kan hastalığıdır. Şiddetli anemiden klinik olarak asemptomatik bireylere kadar değişen sonuçlarla sonuçlanan hemoglobinin beta zincirlerinin azalmış veya hiç sentezlenmemesinden kaynaklanan talasemi formlarıdır. Küresel yıllık insidansın 100.000'de bir olduğu tahmin edilmektedir. Beta talasemiler, hemoglobin alt birimi beta veya HBB'deki arızalar nedeniyle ortaya çıkar. Hastalığın şiddeti mutasyonun doğasına bağlıdır (Galanello *et al.* 2010).

Zamanla HBB tıkanması, beta zinciri sentezinin azalmasına neden olur. Vücudun yeni beta zincirleri bir araya getirememesi, HbA'nın yetersiz üretimine yol açar (Goldman *et al.* 2015). Kırmızı kan hücrelerini doldurmak için genel olarak mevcut olan HbA'daki düşüşler, mikrositik anemiye yol açar. Mikrositik anemi nihayetinde, yeterli kırmızı kan hücresi işlevi için yetersiz HBB proteini ile ilgili olarak gelişir (Perkin et al. 2008). Bu faktör nedeniyle hasta beta zincirlerindeki tıkanıklığı telafi etmek için kan transfüzyonu gerektirebilir. Tekrarlanan kan transfüzyonları aşırı demir yüklenmesiyle ilişkili ciddi sorunlara neden olur (Galanello et al. 2010). Irak'ta en sıklıkla rastlanan β-talasemi mutasyonu IVS-I-110'dur. Bunu IVS-I-6, FSC-8, IVS-I-1, IVS-II-745, IVS-II-1, Cd39, -30 ve FSC-5 mutasyonları takip etmektedir (Cürük *et al*. 2001).

2.3.2.2 α- talasemi

Alfa talasemi, kalıtsal (ailelerden geçen) bir talasemi türüdür. Vücudun sağlıklı kırmızı kan hücreleri ve normal hemoglobini ne kadar iyi ürettiğini azaltan bir kan hastalığıdır. Hemoglobin, vücuttaki hücrelere oksijen taşıyan, kırmızı kan hücrelerinde bulunan demir açısından zengin bir proteindir. Bu proteinin iki bölümü vardır - biri alfa globin ve diğeri beta globin olarak adlandırılır (Harteveld *et al*. 2018).

Bazı genler vücudun hemoglobini nasıl üreteceğini kontrol eder. Bu genler değiştiğinde (değiştirildiğinde) veya eksik olduğunda talasemi oluşur. Alfa talasemide etkilenen hemoglobin proteini, alfa globindir (Higgs *et al.* 2013).

Bir ebeveynden değişen veya eksik olan ancak diğer ebeveynden normal genleri miras alan hemoglobin genlerini miras alan kişilere taşıyıcı denir. Alfa talasemi taşıyıcılarının genellikle hiçbir belirti veya semptomu yoktur. Ancak hatalı genleri çocuklarına aktarabilirler. Orta ila şiddetli alfa talasemi formlarına sahip kişiler, her iki ebeveynden de hatalı hemoglobin genleri miras almışlardır (Yamsri *et al*. 2011, Harewood 2017).

Alfa globin, 16. kromozomun her bir ipliğinde ikişer tane olmak üzere dört spesifik gen tarafından yapılır. Her insan, vücudun hemoglobininin normal şekilde çalışması için yeterli alfa globini yapmak için bu dört gene (her ebeveynden iki tane) ihtiyaç duyar. Bu genlerden biri veya daha fazlası eksikse, farklı alfa talasemi formları ortaya çıkar (Zimmermann *et al*. 2008, Brancaleoni *et al*. 2016).

- Bir gen eksikse - kişi alfa talaseminin "sessiz" bir taşıyıcısıdır ve genellikle hiçbir belirti veya semptom göstermez.
- İki gen eksikse - bir kişinin alfa talasemi özelliği (alfa talasemi minör olarak da adlandırılır) vardır ve hafif anemi olabilir.
- Üç gen eksikse - bir kişide hemoglobin H hastalığı vardır. Bu orta ila şiddetli anemiye neden olabilir.
- Dört genin tümü eksikse - bir kişide alfa talasemi majör (aynı zamanda

hemoglobin Bart's veya hidrops fetalis olarak da adlandırılır) vardır. Bu, en şiddetli alfa talasemi türüdür. Bu bozukluğa sahip bir fetüs genellikle rahimde ölür veya bebek doğumdan hemen sonra ölür çünkü çocuk vücutta oksijen taşımak için normal hemoglobin yapamaz (http://www.thd.org.tr/thdData/Books/925/alfa-talasemi.pdf 2021).

2.3.2.2.1 Delesyonel α –talasemiler

2.3.2.2.1.1 α^0 –talasemiler

α^0-talasemi, Güneydoğu Asya ve Çin'de α-talas-semia'nın en şiddetli şeklidir. Tayland'da, ülkenin her bölgesinde yaygınlık %2,5 ile %10 arasında değişmektedir (Fucharoen *et al*. 1987, Luı *et al.* 1997). Genellikle, kromozom 16'nın kısa kolundaki iki globin geninin silinmesinden kaynaklanır. Bireysel α^0-talasemi heterozigotu, hafif hipokromik mikrositik anemiyle klinik olarak sessiz olmasına rağmen, bu formun homozigot hali, şu şekilde bilinen ölümcül bir durum oluşturur: Hb Bart'ın hidrops fetalis sendromu; bu sendromlu bebekler neredeyse her zaman ya 23-38. Gebelik haftalarında utero'da ya da doğumdan hemen sonra ölürler. Hastalık aynı zamanda şiddetli preeklampsi, doğum öncesi ve sonrası kanama ve ölümcül komplikasyonlarla birlikte artmış maternal komplikasyon riski taşır (Chui *et al*. 1998). Ek olarak, α^0-talaseminin α^{0+} -talasemi ile etkileşimi Hb H hastalığına yol açar ve Hb H hastalığının HbE ile etkileşimi kompleks αβ-talasemi intermedia sendromlarına yol açabilir (Fucharoen *et al*. 1998, Boonsa *et al*. 2004). Bu nedenle, a^0-talasemi taşıyıcılarının belirlenmesi, risk altındaki ailelerde talaseminin genetik danışmanlığında, önlenmesinde ve kontrolünde önemli bir adımdır.

2.3.2.2.1.2 α^+ -talasemiler

Her bir kromozomda en fazla bir a-globin geninin eksik olduğu bu durum, α^+ -talasemi olarak bilinir (α^0-talasemi, her iki gen bir kromozomdan çıkarıldığında oluşur). α^+ -

talaseminin sıtmaya karşı iyi bilinen faydalı etkisine rağmen, bilim adamları α^+ -talasemilerin bu korumayla tam olarak nasıl sonuçlandığını ve hastalığın tüm formlarına karşı koruyup korumadıklarını çok az biliyorlar. Williams ve meslektaşları, α+ -talaseminin (bir veya iki α-globin geninin kaybolmasıyla birlikte) sıtma (ciddiyet belirtileri olsun veya olmasın) ve şiddetli sıtma ile hastaneye yatış oranında önemli azalmalarla ilişkili olduğunu bulmuşlardır. Hem homozigot bireyler (toplamda iki α geni, her kromozomdan bir tane eksik) hem de heterozigot bireyler (toplamda sadece bir α geni eksik) normal çocuklardan çok daha düşük şiddetli sıtma anemisi oranlarına sahiptirler. Bununla birlikte, α^+ -talaseminin semptomsuz parazitemi üzerinde hiçbir etkisi olmamıştır (bir çocuğun kanında *Plasmodium falciparum* sıtma parazitinin bulunması, ancak ateş veya diğer semptomların olmaması olarak tanımlanır). Ve hem heterozigotlarda hem de α+ -talasemi için homozigotlarda komplike olmayan sıtmanın ortaya çıkması normal çocuklara kıyasla daha düşük olmasına rağmen, insidanstaki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir (Mockenhaupt *et al*. 2004).

2.3.2.2.2 Nondelesyonel α –talasemiler

α-talaseminin 70'in üzerinde delesyon olmayan mutasyonu tanımlanmış ve belgelenmiştir (53). Delesyon olmayan mutasyonlar, α-globin genlerinin normal ekspresyonu için kritik olan genomik bölgeleri etkileyen nokta mutasyonları içerir. α2-globin genini etkileyen nokta mutasyonlarının, α-globin genlerinin ekspresyonu üzerinde daha önemli etkileri olduğu görülmektedir. Normal koşullar altında, α2-globin gen ekspresyonu, α1-globin gen ekspresyonundan neredeyse üç kat daha yüksektir (Fucharoen *et al*. 2009). Silinmeyen mutasyonlar, genellikle kırmızı hücrelerde çökelen, çözünmeyen inklüzyon cisimcikleri oluşturan ve sonunda kırmızı hücre zarına zarar veren veya yok eden kararsız hemoglobinlere neden olabilir (Kwaifa *et al.* 2020)

Non-delesyonel α-talasemiye; RNA "splicing"i etkileyen mutasyonlar, Poli A kuyruğu sinyalini etkileyen mutasyonlar, mRNA translasyonunu etkileyen mutasyonlar, Frameshift delesyonları ve zincir sonlanma mutasyonları neden olmaktadır (Steinberg *et al.* 2005).

2.3.2.2.3 α- talasemilerin klinik tablosu

α-Talasemi sendromu, hemoglobinin a-zincirlerinin üretiminin olmaması veya azalmasının neden olduğu bir grup kalıtsal anemiyi ifade eder. Dünya nüfusunun %5 kadarı bu yaygın gen mutasyonlarının taşıyıcılarıdır. Genotipik çeşitlilikten kaynaklanan α-talasemide belirgin fenotipik heterojenite vardır. Spektrumun bir ucunda, dört α genden birinin işlevsiz olmasından kaynaklanan tamamen asemptomatik bir fenotip bulunur. Diğer uçta, dört α geninin yokluğundan kaynaklanan, hemoglobin Bart'ın hidrops fetalisi adı verilen ölümcül bir rahim içi hastalıktır (Weatherall 2008, Weatherall *et al.* 2008).

α-Talasemilerin fenotipi, doğrudan etkilenen a-globin genlerinin sayısı ile ilgilidir. Bağlı α gen çiftlerinden birinin silindiği α^+ -talasemilere ayrılırlar (–α/αα); ve her ikisinin de silindiği a^0-talasemiler (-/αα). α^+ -talasemi için heterozigot durum klinik olarak sessizken, α^0-talasemi için heterozigot durum, hematolojik olarak β-talasemi özelliğine benzer bir durum olan α-talasemi özelliğini üretir. α^+ -talasemi için homozigot durum, benzer bir fenotip ile sonuçlanır. Hem α^+ -talasemi hem de α0-talaseminin (–α/-) kalıtımı, hemoglobin H hastalığına neden olur. Bir α-globin geninin çeşitli yapısal anormalliklerinin neden olduğu silinmeyen α-talasemi (–αND/αα) formları da vardır. Bunlar α0-talasemi (–αND/-) ile birlikte miras alındığında, daha şiddetli bir hemoglobin H hastalığı formu ortaya çıkar. Hemoglobin H, kararsız olan ve son derece yüksek bir oksijen afinitesine sahip olan ve bu nedenle etkili bir şekilde oksijen veremeyen bir β zincirleri (β4) tetrameridir. Aynı zamanda nispeten kararsızdır ve etkisiz eritropoez ve hemolitik anemiye neden olur. Adını, keşfedildiği Londra hastanesinden alan Hemoglobin Bart's, hemoglobin H'nin fetal karşılığıdır ve fetal hemoglobin (Vos *et al.* 2015) γ zincirlerinin bir tetramerinden oluşur. Hemoglobin H'den daha az kararsız olmasına rağmen, çok yüksek bir oksijen afinitesine sahiptir (Weatherall 2008, Weatherall *et al*. 2008, Çürük 2001).

2.3.2.2.3.1 Sessiz taşıyıcı

Alfa talaseminin sessiz taşıyıcı formu, bir alfa zinciri gen lokuslarının silinmesinden kaynaklanır. Sessiz taşıyıcılar olan bireyler klinik hastalık göstermezler ve rutin laboratuvar testleri sırasında normal sonuçlar gösterirler. Bu alfa talasemi formu genellikle genetik ailesel testlerle keşfedilir. Sessiz taşıyıcı alfa talasemi ebeveynleri, talasemi genleri taşıyan bir partneri olan çocukları varsa, alfa talasemi genini ve muhtemelen daha ciddi bir alfa talasemi biçimini aktarabilirler (Keikhaei *et al*. 2018, Svasti *et al*. 2007).

2.3.2.2.3.2 Hemoglobin özelliği

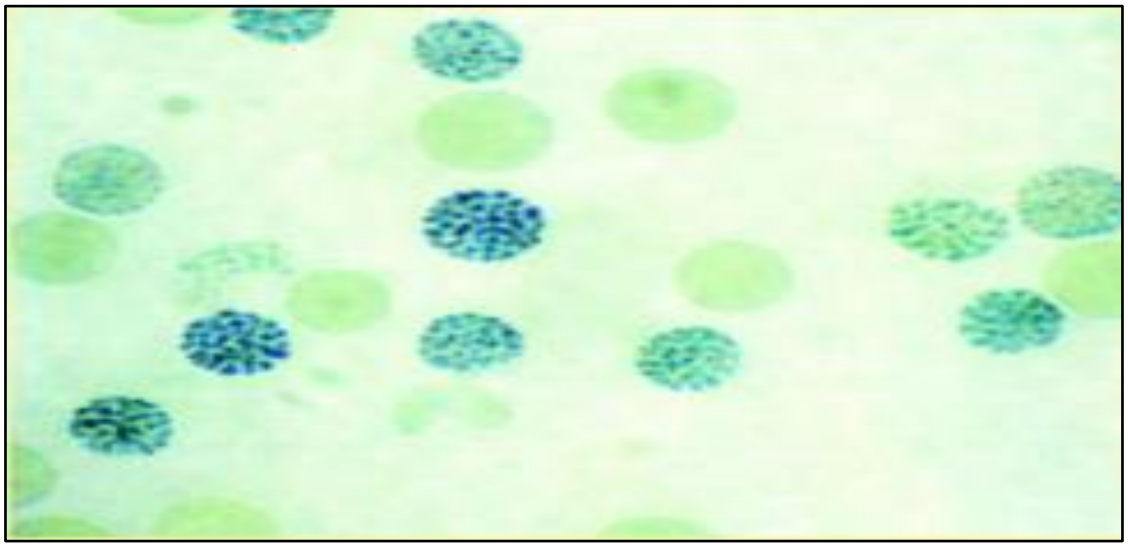
Orak hücre özelliği bir hastalık değildir. Bir özelliğe sahip olmak, bir kişinin orak hücre genini yalnızca bir ebeveynden miras aldığı anlamına gelir. Orak hücre özelliği, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 12 Afrikalı-Amerikalıdan 1'ini etkiler. Orak hücre özelliği olan kişiler genellikle herhangi bir belirti göstermez ve normal bir hayat yaşarlar. Amerika Birleşik Devletleri'nde yaşayan yaklaşık 3 milyon insan orak hücre özelliğine sahiptir ve birçoğu durumlarının farkında değildir. Orak hücre (sickle cells) özelliği olan çoğu insan, bazı normal A hemoglobine sahip oldukları için herhangi bir sağlık etkisine sahip değildir. Bununla birlikte, orak hücre özelliği olan bazı kişiler, orak hücre anemisi krizine benzer sağlık koşullarına sahip olabilir. Bu bölümler, orak hücre özelliğine sahip bir kişi, vücudun normalden daha fazla çalışmasına neden olan yorucu faaliyetler veya sporlarla uğraştığında meydana gelebilir. Bir bölümün semptomları nefes darlığı, ellerde ve ayaklarda soğukluk, soluk cilt, göğüs ağrısı ve baş ağrılarını içerebilir. Orak hücre özelliğiniz varsa, orak hücre özelliği veya orak hücre hastalığı olan bir çocuğa sahip olma riski olabilmektedir (Lacy *et al*. 2017).

2.3.2.2.3.3 Hemoglobin H

Hemoglobin H, yalnızca bir normal alfa geni kalıtsal olduğunda oluşur. Bu, önemli ölçüde bozulmuş alfa globin üretimine neden olur. Yenidoğan döneminde, bu aşırı

gama neden olur ve yetişkinlerde bu, fazla miktarda beta-globin zinciri bırakır. Serbest alfa zincirleri çözünmez. Hem gama hem de beta zincirleri çözünürdür ve homotetramerler yapar. Hemoglobin H, dört beta zincirinden oluşur ve HbBarts, dört gama zincirinden oluşur. Bununla birlikte, kararsızdırlar ve hücre içinde bir miktar çökeltiler, çeşitli klinik belirtilere yol açar. Yetişkinlerdeki HbH, etkilenen bireylerde dolaşımdaki hemoglobinin %40'ını oluşturabilir. Bu hemoglobin, oksidan hasarına daha duyarlıdır ve oksijen taşıma kapasitesi zayıftır. Afinitesi HbA'dan on kat daha fazladır. Anormal bir oksihemoglobin ayrışma eğrisine sahiptir. Bu, oksijene bağlanabileceği ancak normal olarak dokulara vermediği anlamına gelir (Sadelov *et al.* 2008).

Hb H hastalığı Güneydoğu Asya, Orta Doğu ve Akdeniz ülkelerinde görülmektedir. Özellikle Güneydoğu Asya ve Çin'in güneydoğusunda yüksek frekansta (--SEA) mutasyonu ve daha az sıklıkta (--FIL) mutasyonu görüldüğünden bu bölgelerde Hb H'ın frekansı yüksektir (Bernini *et al.* 1998), Şekil 2.5'da gösterildiği gibi.



Şekil 2.5 Hemoglobin H hastalığı (Vichinsky 2013)

2.3.2.2.3.4 Hemoglobin bart’s

Hb Barts olarak kısaltılan Hemoglobin Barts, dört gama globinden oluşan anormal bir hemoglobin türüdür. Orta derecede çözünmezdir ve bu nedenle kırmızı kan hücrelerinde birikir. Hb Barts, oksijen için son derece yüksek bir afiniteye sahiptir, bu nedenle dokuya oksijen salamaz. Bu nedenle, bu onu verimsiz bir oksijen taşıyıcı yapar. Bir embriyo geliştikçe, gelişimin 5-6 haftalarında alfa globin üretmeye başlar. Alfa globinleri kodlayan HBA1 ve HBA2 genlerinin her ikisi de işlevsiz hale geldiğinde, etkilenen fetüsler işlevsel bir hemoglobini sentezlemekte zorluk çekecektir. Sonuç olarak, gama zincirleri birikecek ve dört gama globini oluşturacaktır. Bu gama globinleri, hemoglobin Barts oluşturmak için bağlanır (Al-Allawi *et al.* 2010). Alfa talasemi hastalığında üretilir ve en şiddetli vakalarda dolaşımdaki tek hemoglobin şeklidir. Bu durumda, fetüs hidrops fetalis geliştirecek ve intrauterin kan transfüzyonu yapılmadıkça normalde doğumdan önce veya kısa bir süre sonra ölecektir.

Alfa talasemide hemoglobin Barts yükseldiği için ölçülebilir ve bazı popülasyonlarda bu hastalık için yararlı bir tarama testi sağlar (Van der Dijs *et al*. 1999).

Hemoglobin Barts'ı ölçme yeteneği, onu yenidoğan tarama testlerinde faydalı kılar. Yeni doğan bir ekranda hemoglobin Barts tespit edilirse, hasta genellikle daha ileri değerlendirme için yönlendirilir çünkü hemoglobin Barts tespiti, bebeği sessiz bir alfa talasemi taşıyıcısı, iki alfa globin geni delesyonu (alfa talasemi) yaparak ya bir alfa globin gen silinmesini gösterebilir (Songdej *et al.* 2017), Çizelge 2.2'ye bakın.

Çizelge 2.2 Hemoglobin Karşılaştırmalı Alfa Talasemi (Denic *et al*. 2011)

Phenotype	Hb A	Hb Barts	Hb H
Normal	97 – 98%	0	0
Silent Carrier	96 – 98%	0 – 2% (At birth)	0
α Thalassemia	85 – 95%	2 – 8% (At Birth)	< 2%
Hb H Disease	Dec	<10% (At birth)	5 – 40%
Hydrops Fetalis	0	70 – 80% (with 20% Hb Portland)	0 – 20%

2.3.2.2.4 Talasemi sıklığı ve frekansı

Alfa ve beta globin kusurlarının sıklığı, öncelikle kaynak yetersizliği ve daha büyük klinik öncelikler nedeniyle dünya çapındaki tüm ülkelerde analiz edilmemiştir. Bununla birlikte, bazı ülkelerde bu çalışmaları birkaç işçi üstlenmiştir. WHO'nun dünya çapındaki rakamları, globin gen kusurları için 270 milyon taşıyıcı olduğunu ve yılda 300.000 ila 400.000 çocuğun şiddetli bir hemoglobin bozukluğuyla doğduğunu göstermektedir (Weatherall *et al.* 2001). Sosyoekonomik koşullar dünya çapında iyileştikçe, daha fazla sayıda çocuk yetişkinliğe kadar hayatta kalacak ve hemoglobinopatilerin tedavisinin ekonomik yükü çok yönlü artacaktır (Khodaei *et al.* 2013, Altay 2002).

Bireysel gruplar tarafından yapılan mikro haritalama, talasemi veya HbE gibi varyant hemoglobinlerin sıklığının, genellikle sadece birkaç mil uzakta bir bölgede önemli ölçüde değişebileceğini göstermiştir (Ahmed *et al*. 2002, Araújo *et al.* 2003). Bu, birçok güneydoğu Asya toplumunda olduğu gibi sosyal faktörlerden kaynaklanıyor olabilir. Bu

faktörlerevlilikler kabile/aile grubu sınırları içinde meydana gelir ve bu, belirli gruplarda daha yüksek bir gen sıklığı ile sonuçlanmıştır; Pakistan'da genel popülasyon için talasemi özelliği sıklığı %5,4'tür, ancak indeks vakalara dayalı aile testine göre insidans %31 idi ve taşıyıcının risk altında bir evlilikte olma riski %25 idi. Umman'da yerli Arap nüfusu için taşıyıcı oranı %1-2'dir (Daar *et al.* 1999), ancak Beluçistan (Pakistan) eyaletinden göç eden Belushi kabilesinde görülme oranı %10'dur.

2.4 β-Talasemi

β-Talasemi dünyadaki en yaygın kalıtsal hemoglobinopatidir ve Akdeniz, Orta Doğu ve Asya popülasyonlarında artış göstermektedir. β-Talasemi, iki mutant β-globin allelinin eş kalıtımının neden olduğu yaygın bir genetik hastalıktır (Galanello and Origa 2010). B-talasemiler otozomal resesif bir hastalıkta kalıtılır. Döllenmeden sonra, her hastanın %25 etkilenme şansı, %50 asemptomatik taşıyıcı olma şansı ve %25 etkilenmeme ve taşıyıcı olmama şansı vardır. Heterozigotlar (taşıyıcılar) orta derecede fenotip ve anemiye sahip olabilirler ancak klinik olarak semptomları yoktur. Artan şiddetin üç klinik ve hematolojik formu kabul edilmektedir:-talasemi taşıyıcı, β-talasemi intermedia ve -talasemi majör (B-TM). B-talasemi heterozigotluğundan kaynaklanan β-talasemi taşıyıcı formu klinik olarak asemptomatiktir ve spesifik hematolojik bulgularla tanımlanır. B-TM, transfüzyona bağlı hafif bir anemidir. Talasemi intermedia, asemptomatik taşıyıcıdan B-TM'ye şiddeti değişen klinik ve genotipik heterojen bir hastalık grubu olarak bilinir. Globin (HBB) geni, δ-globin geni, embriyonik ε geni, fetal A-gamma ve G-gama genleri ve bir psödogeni içeren bir bölgede, 11. kromozomun kısa kolundaki glo globin (HBB) geni haritalarında yer alır. β Talasemi sendromları grubundaki talasemi moleküler olarak heterojendir. Özellikle genetik testler teşhis, tedavi ve önleme için önemli bilgiler sağlayabilir. Tüm talasemi türlerinde genetik testin bazı sınırlamaları vardır; en önemli konu, genetik testin yapılacağı doğru hastayı bulmaktır (De Sanctis *et al.* 2017).

B-TM'nin klinik yönetimi, rutin uzun ömürlü kırmızı kan hücresi transfüzyonlarını ve transfüzyonlarla fazla miktarda verilen demiri uzaklaştırmak için demir şelasyon

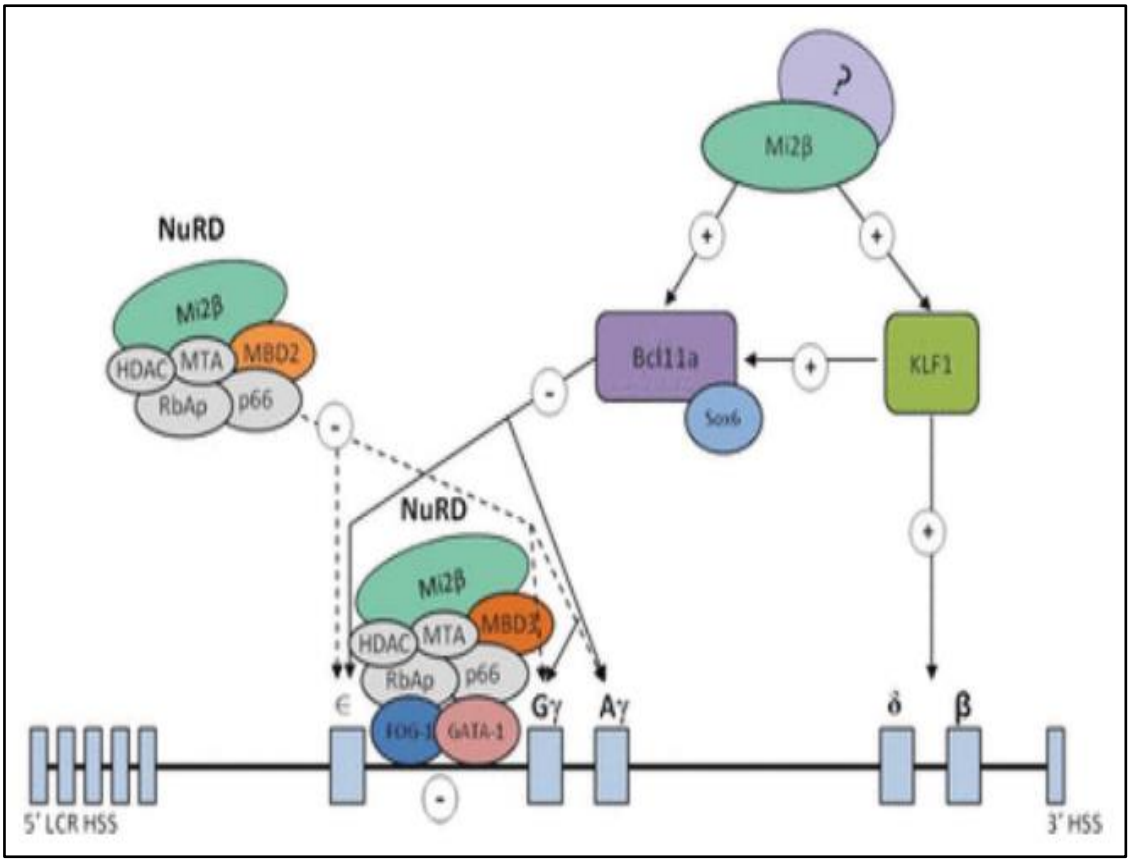
tedavisini içerir. β-Talasemi tedavi modaliteleri arasında küratif allojenik kemik iliği veya kök hücre transplantasyonu ve deferoksamin kullanımı gibi semptomatik demir şelasyon tedavisi yer alır. Araştırılan tedaviler, hemoglobin F'nin (HbF) farmakolojik bileşiklerle indüksiyonu ve kök hücre gen tedavisidir (Cao and Galanello 2010). Yeni tedaviler, düzenli aralıklarla kümelenmiş kısa palindromik tekrarlar / CRISPR ile ilişkili protein (CRISPR-Cas9) sistem terapisi ve kök hücre gen terapilerine dayanmaktadır.

β benzeri globin genlerinin her biri, Hb geçişi (embriyonik → fetal → yetişkin) olarak adlandırılan bir süreç yoluyla farklı gelişim aşamalarında ifade edilir. Doğumdan 6 ay sonra, toplam Hb'nin < %5'ini oluşturan -HbF (α2γ2), yetişkin Hb'nin majör Hb olduğu ve mutasyonların etkilendiği 2 yaşında < %1'lik yetişkin düzeyine düşmeye devam eder. HBB lokusu, doku ve gelişimsel aşamaya özgü düzenleme için bir paradigmadır; bireysel globin genlerinin ekspresyonu, globin promoterleri ile P lokus kontrol bölgesi (P-LCR) arasındaki zamanlı ve doğrudan fiziksel etkileşime dayanır, etkileşim eritroide özgü ve her yerde bulunan transkripsiyon faktörlerinin bağlanması yoluyla aracılık edilir. Gelişimsel ekspresyon için çift mekanizma önerilmiştir: (Maton et al. 1993) LCR'ye en yakın gen için bir avantaj sunan, yukarı yönde β-LCR için gen rekabeti ve önceki genin transkripsiyonel baskılanması. β -LCR ve transkripsiyonel baskılamada yer alma yeteneği, promoter-LCR etkileşimini destekleyen farklı transkripsiyon faktörlerinin bolluğundaki değişime ve listeye bağlıdır E- ve γ-globin genleri, uygun gelişim aşamasında otonom olarak susturulurken, yetişkin β-globin geninin ekspresyonu, LCR dizileri için yukarı akış γ-geninden rekabetin olmamasına bağlıdır. Bütünleştirici moleküler çalışmalara (mutasyonel ve epigenetik analizler gibi) göre, araştırmacılar, glo-globin lokusundaki bir dizi cis-düzenleyici genomik bölgeyi Hb anahtarlamasında potansiyel bir role sahip olarak tanımladılar. B-globin gen kümesindeki β- ve γ-globin genlerini kapsayan doğal olarak meydana gelen delesyonlar ve global genlerin promoterlerindeki nokta mutasyonları, artan HbF ekspresyonu ve fetal Hb'nin kalıtsal kalıcılığı (HPFH) adı verilen iyi huylu bir durumla sonuçlanır. HPFH nokta mutasyonları, γ-globin susturucuları için bağlanma bölgelerini bozabilir veya γ-globin aktivatörleri için yeni bağlanma bölgeleri oluşturabilir (Borgna-Pignatti *et al*. 2004).

β-Talasemi, mikrositik hipokromik anemi, çekirdekli kırmızı kan hücreleri ile anormal periferik kan yayması ve Hb analizinde HbA miktarlarının azalmasıyla sonuçlanan Hb β zincirinin azalmış senteziyle karakterizedir. T-BM'li hastalarda şiddetli anemi ve genişlemiş karaciğer ve dalak vardır; medikal tedaviye çoğunlukla yaşamın ilk 2 yılında gelirle (Allen 2017). β-Talasemi, temelde normal olan β-globin zincirlerinde niceliksel bir azalmaya yol açan bir mutasyon spektrumundan kaynaklanır. β-Globin, 11. kromozomdaki diğer β benzeri genlerle birlikte bir kümede bulunan yapısal bir gen tarafından kodlanır. Küme beş gen içerir, δ (HBD), β (HBB), ε (HBE), Gγ (HBG2), ve embriyonik Hb Gower-1, Hb Gower-2, Hb Portland, fetal Hb ve yetişkin Hb gibi farklı Hb tetramerlerini sentezlemek için gelişim ifadelerinin sırasına göre kromozom boyunca organize edilen Aγ (HBG1). Globin genlerinin ekspresyonu, yerel promoter sekanslarının yanı sıra 6 ve 20 kb 5′HBE genine dağıtılmış beş hiperduyarlı bölgeden oluşan yukarı akış β-globin LCR'ye bağlıdır. Tüm bu düzenleyici bölgeler, önemli ölçüde GATA-1, GATA-2, NF-E2, KLF-1 ve SCL gibi bir dizi önemli eritroid spesifik transkripsiyon faktörünün yanı sıra çeşitli kofaktörler ve doku dağılımlarında daha yaygın olan faktörleri bağlar (Anurathapan *et al.* 2016, Aydinok *et al*. 2015).

Moleküler genetik raporlar, HbF reaktivasyonu için yeni terapötik moleküller sağlayarak HbF regülasyonunda yer alan önemli varyantları ve yolları tanımlamada etkili olmuştur. BCL11A, nicel bir baskılayıcı olarak iyi bilinir ve terapötik faydalar için genomik ve gen düzenleme stratejileri kullanılarak ekspresyonunun manipüle edilmesinde ilerleme kaydedilmiştir. Etkisiz ve anormal eritropoez mekanizmalarındaki çalışmalar ve anlayış, ikisi şu anda klinik deneylerde test edilmekte olan başka terapötik moleküller de sağlamıştır (Anderson et al. 2002). BCL11A, yetişkin eritroblastlarda γ-globin genlerinin ekspresyonunu bastırmak için SOX6, GATA1, FOG1 ve NuRD kompleksi ile işbirliği yapar. BCL11A'nın ekspresyonu,-globin gen ekspresyonunu doğrudan aktive ederek fetalden yetişkin Hb'ye geçişi destekleyen KLF1 tarafından düzenlenir. KLF1, farklı mekanizmalarla γ- - β-globin Hb geçiş sürecinde yer alan anahtar bir moleküldür. Ek olarak KLF1, β-talaseminin şiddetinden kurtulmayı hedefleyen baskılayıcıları kodlayan genlerin doğrudan aktivatörüdür. Transkripsiyon faktörü lenfoma ile ilişkili faktör, NuRD kompleksi aracılığıyla γ-globin ifadesini susturur. GATA-1, eritropoezi düzenleyen ana gendir ve eritropoietin reseptörü (EPoR),

glikoforin (GpA) ve globin zincirleri gibi spesifik eritroid genleri pozitif olarak düzenler ve megakaryosit ve eritrosit farklılaşması için gereklidir. FOG1'in GATA-1 ile etkileşimi eritroid homeostazının sürdürülmesine ve HBB transkripsiyonunun kontrol edilmesine yardımcı olurken, KLF1 β-globin ekspresyonunu ve fetal ve yetişkin globin ekspresyonu arasında geçişi kontrol eder (Ko et al. 2008). KLF1, MYB, aşama seçici protein ve TR2 / TR4 ve COUP-TFII nükleer reseptörleri dahil olmak üzere birçok nükleer faktörün Hb değiştirme mekanizmasını sağladığına inanılmaktadır. Çinko parmak transkripsiyon faktörü BCL11A, insan hücrelerinde δ-globin ifadesinin susturulmasında önemli bir role sahiptir. BCL11A' nın bu işlevi eritroid ana regülatör GATA1, SOX6, FOG-1 ve NuRD kompleksi ile etkileşime girerek uyguladığı düşünülmektedir (Şekil 2.6). BCL11A, B hücrelerinin düzgün gelişimi için gereklidir ve murin BCL11A'dan yoksun hematopoietik kök hücreler (HSC'ler), hücre döngüsü, aşılama ve çok çizgili farklılaşmada kusurlar gösterir (Hasegawa *et al.* 2012, Satta *et al.* 2012). Şekil 2.6'de gösterildiği gibi.



Şekil 2.6 Fetustan yetişkinlere globin geçişinde önemli faktörler (Brown *et al.* 2001)

KLF1'deki kalıtsal mutasyonların tezahürü, HPFH'nin bu faktörün gen terapisi için pratik bir hedef olduğunu ve bir haplo yetmezlik durumu tasarlamak için RNA girişim teknolojisi ile elde edilebileceğini öne sürmesine neden olur. HbF düzeyini artırmayı amaçlayan terapötik çabalar için KLF1 ve BCL11A gibi ümit verici anahtar moleküller belirlenmiştir; bununla birlikte, transkripsiyon faktörlerinin manipülasyonunun terapötik seçimlere dönüştürülebilmesi için daha fazla preklinik veri gereklidir. Bazı çalışma gruplarına göre, BCL11A'nın-globin ekspresyonunu bastırdığı mekanizmaları tanımlayarak bu alandaki önemli ilerlemeler, gelecekte genom temelli tedavinin gelişimi için umut vaat etmektedir (Nardo-Marino *et al.* 2020).

Hb, hem α- hem de β- benzeri polipeptit alt birimlerinden oluşan bir tetramerdir. Ontogeneze göre, bu alt birimlerin yapısı değişkenlik gösterir ve Hb moleküllerinin çeşitli fizyolojik varlıklarla birleşmesine yol açar. İnsanlarda ve Eski Dünya maymunlarında, Hb molekülünün β benzeri alt birimlerinin sentezi için iki gelişimsel değişim gerçekleşir (Marzollo *et al.* 2017). İlk geçiş, tüm memelilerde mevcuttur ve tamamen geçici olarak üretilen embriyonik ilkel eritrosit dalgasında ifade edilen Hb alt birimlerinden, fetal karaciğerden kaynaklanan eritrositlerin en erken tanım dalgasında üretilen Hb alt birimlerine geçişi içerir. Hb anahtarı, β-globin lokusundaki ilkelden kesinliğe geçiş olarak bilinir. İnsanlarda α-globin lokusunda, normalde ilkel eritrositlerle sınırlı olan embriyonik bir Hb'den yetişkin α-globin alt birimlerine benzer bir geçişin meydana geldiğine dikkat etmek önemlidir (McGrath and Palis 2008, Daar 1998).

2.4.1 β-talaseminin moleküler tanısı

Moleküler tanı yöntemleri çoğunlukla genetik danışmanlık vermede ve doğum öncesi tanı uygulamasında faydalıdır. PZR tabanlı testler, α-talasemi delesyonlarının taşıyıcılarını bulmak için yeterlidir ve uygulanabilir multipleks PZR ve multipleks ligasyona bağımlı prob amplifikasyonu (MLPA) testleri, delesyonların neden olduğu α- ve β-talasemiyi teşhis etmek için uygundur. Mutasyonların neden olduğu çeşitli

hastalıkların saptanması nedeniyle β-talaseminin teşhisi daha zordur. Farklı etnik popülasyonlara sahip olması nedeniyle Amerika Birleşik Devletleri'nde β-talasemi ile ilişkili tüm mutasyonları tespit etmek için doğrudan DNA sıralaması en pratik yöntem olabilir. Dünyanın bazı yerlerinde popülasyonlarda β-talasemi mutasyonlarında daha az heterojenite vardır ve dünyanın bu bölgelerinde β-talasemi taşıyıcılarını taramak için daha hedefli bir strateji kullanılabilir. Son zamanlarda, ters nokta-leke hibridizasyonu, sınırlama parçası uzunluğu polimorfizmi ve denatüre edici gradyan jel elektroforezi, en yaygın mutasyon tarama yöntemleri olarak kullanılmıştır. Bu testler, düşük verimle yoğun emek gerektirir, pahalı yüksek teknolojili ekipman gerektirir ve yorumlanması zor sonuçlar verebilir (Weatherall 2010, Higgs 2009).

β -globin genindeki en yaygın mutasyon Türkiye, İtalya, Mısır ve Yunanistan dahil olmak üzere Akdeniz ülkelerinde IVS-I-110'dur. Aldemir ve diğerleri. Çalışma, Türkiye'nin Hatay ilindeki β-talasemi mutasyonlarının spektrumunu göstermiştir ve β-talasemi hastalığı için etkili bir önleme programının bir parçası olacak doğum öncesi genetik testler için bir temel oluşturmuştur. İlişkili olmayan 93 hastadaki β-talasemi mutasyonlarının spektrumu Aldemir ve ark. Doğrudan sıralama yöntemi kullanılarak bunlar tarafından büyük miktarda β-talasemi mutasyonu tanımlanmıştır (Canatan D. et al. 2006). Sonuçlar Türkiye'nin diğer bölgelerinden farklı. En yaygın mutasyonlar şunlardır: IVS-I-110 (G> A), IVS-I-6 (T> C), IVS-I-1 (G> A), frameshift codon (FSC) 8 (−AA), kodon 39 (C> T) ve IVS-II-745 (C> G). Pek çok Suriyeli ve Iraklı göçmenin, diğer çalışmalardan farklı olan talasemi özelliklerinin yaygınlığını bildirdiler. β-Talasemi, 300'den fazla farklı β-globin zincirinden kaynaklanır (Kilinç *et al*. 2002).

Geniş bir mutasyon yelpazesi, birincil mRNA transkriptinin işlenmesini engeller. Müdahale sekansında (IVS) değişmez dinükleotit GT veya AG sekanslarını etkileyenler, β^0-talasemiye neden olarak normal eklemeyi tamamen önler. Hem eksonlar hem de intronlar ayrıca, bir ek yeri için konsensüs dizisine çok benzeyen ancak normal olarak kullanılmayan "şifreli" birleştirme bölgeleri içerir. Bu bölgelerde, normal birleşme yerine benzeyen bir dizi üreten mutasyonlar meydana gelebilir; ancak normalde kullanılmaz. RNA işleme sırasında, oluşturulan site farklı şekilde kullanılır ve bu da olağandışı eklemelere yol açar; yetersiz bir şekilde eklenmiş mRNA işlevsel

değildir çünkü bir çerçeve kayması ve bir erken sonlandırma kodonu, eklenmiş intronik diziler tarafından yaratılır. HBB geninin ekson 1'indeki kodon 26'daki bu tür mutasyonlar, HbE varyantı ile sonuçlanır. Bileşik HbE / β-talasemi heterozigotlarının klinik görünümü, şiddetli anemi ve transfüzyon bağımlılığı ile transfüzyona bağımlı olmayan durumlar (yani talasemi intermedia veya transfüzyona bağımlı olmayan talasemi (NTDT) arasında uzanan, iki β-talasemi alleli olanlara benziyor. -HbE / β-talasemi aleli ve diğer genetik faktörler. Diğer RNA işleme mutantları, poliadenilasyon sinyalini ve 3′UTR'yi etkiler. Bunlar hafif β-talasemi allelleridir (Borgna-Pignatti *et al*. 2004, Agarwal 2013).

2.5 Klinik Ciddiyet, Klasik Tedavi ve Yeni Tedaviler Üzerine Genetik Faktörler, β-Talasemi İçin Gen Terapisi

β-talasemi sendromlarının klinik şiddeti, α-globin zinciri / α-globin olmayan zincir dengesizliğinin boyutuna bağlıdır. Kemik iliğindeki ve dalaktaki eritroid öncüleri α-globin zinciri tarafından hasar görür ve etkisiz eritropoeze neden olur. Ancak hastaların teşhisi için kemik iliği incelemesine genellikle gerek yoktur. Kemik iliği, miyeloid / eritroid oranı normalden (3 veya 4) 0,1 veya daha altına ters çevrilmiş, belirgin eritroid hiperplazisinin bir sonucu olarak çok hücreseldir. B-TM'nin klinik görünümü 6 ile 24 ay arasında ortaya çıkar. Hepatosplenomegali nedeniyle karın şişliği ile birlikte yılın ikinci yarısında olağan görünüm ilerleyici solukluktur. 10-11 yaşından sonra hastalar, şelasyon tedavisine itaatlerine bağlı olarak aşırı demir yüklemesine bağlı ciddi komplikasyonlar geliştirme riski altındadır (Andreani *et al.* 2011, Boitano *et al.* 2010).

β-talasemi hastalıklarının klinik ekspresyonundaki heterojenite, β-globin gen mutasyonlarının doğasından, α-talasemi gen etkileşiminden veya HbF üretimindeki farklılıklardan kaynaklanabilir. Bu çalışma, bu genetik belirleyici faktörlerin β-talasemili hastaların fenotipik şiddetini tahmin edip edemeyeceğini belirlemek ve fenotip ile genotip arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla yapılmıştır. Mevcut literatüre göre,-talasemi genotipinin en az bir alleline sahip bir hastada-talasemi mutasyonu ve α-talasemi tiplerinin eş kalıtımı, bozukluğun klinik ciddiyetinin

tahminidir. Tersine, β_0/β + -talasemi veya oro-talasemi/HbE'li bazı hastalarda hafif bir klinik bulgu, bu bireylerin bir a-talasemi haplotipine sahip olmamasıdır (Brendel *et al.* 2015, Divan and Royds 2013).

β-talasemi fenotipinin farklı faktörler tarafından değiştirildiği bulunmuştur. α-globin gen delesyonunun eş kalıtımlı-Talasemi, orta derecede klinik özelliklere sahip olabilirken, her iki α-globin geninin delesyonu karakteristik olarak talasemi intermedia ile ilişkilidir. HbF,-talasemili bireylerde hastalık şiddetinin başlıca değiştiricisidir. Homozigot β-talaseminin ciddiyeti, α- ve glo-globin zincirleri arasındaki orantısızlıkla ilişkili olduğundan, F hücrelerindeki düşük glo-globin seviyeleri bile α-globinin göreceli fazlalığını azaltır ve HbF üreten hücrelerin seçici bir hayatta kalmasını sağlar. -talaseminin en yaygın formlarında etkisiz eritropoez zamanında (Bauer *et al.* 2012).

Orantısızlık derecesini azaltabilecek her türlü faktör klinik özelliği geliştirebilir. Bu nedenle, bu seçici hayatta kalma, homozigot β-talasemide yüksek HbF seviyelerinden sorumlu olabilir. Genetik varyantların varlığı HbF üretmeye devam ettiğinden, gelişimin klinik özelliği üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Orak hücre hastalığında (SCD) morbidite ve mortaliteyi iyileştirmek için yetişkinlikte HbF'nin daha yüksek ekspresyon seviyeleri önerilmiştir. Nemati et al. batı İran'daki B-TM hastalarında Xmn1 polimorfik bölgelerinin insidansını incelemişlerdir. Çalışma, bu polimorfik bölgeye sahip olmanın HbF üretimi ve G-γ oranı üzerinde pozitif bir etkiye neden olduğunu ve bu da β-talasemi hastalarının klinik bulgularını iyileştirebileceğini tespit etti (Svasti **et al.** 2007).

2.6 B-Talasemide Klasik Tedaviler

Klasik tedaviler 5 alt gruba ayrılır. Bu tedavilerin faydalarını ve uzun vadeli yan etkilerini aşağıda anlatılmıştır (Piel *et al*. 2017).

2.6.1 Transfüzyon tedavisi

Artan kanıtlar, transfüzyon tedavisinin pulmoner hipertansiyon ve tromboembolik olaylar gibi komplikasyonların oluşumunu azaltmadaki avantajını göstermektedir. Bu nedenle, yaygın uygulama komplikasyonlar ortaya çıktığında transfüzyona başlamak olsa da, önleyici stratejiler ortaya çıktıkça transfüzyon tedavisini daha erken başlatmak değerli olabilir, bu da gecikmiş transfüzyon başlangıcı ile artan alloimmünizasyon riskini hafifletmeye yardımcı olacaktır. Kan transfüzyonlarının daha erken başlatılması, demir birikimi oranını artıracak olsa da, şu anda demir şelasyonunun güncel yaklaşımları mevcuttur. Hastanın esenlik duygusu, normal bir hayatın aktivitelerinden zevk almak için yetersiz bir düzeye düştüğünde transfüzyon gerekli hale gelir. 70g / l'nin altındaki Hb seviyeleri için kronik hipoksi gibi problemler genellikle hastalarda gelişir. Hastanın düzenli büyüme, büyüme hızı, dalak boyutu, kemik yaşı, hızlı büyüme dönemleri, kemik deformiteleri ve gebelik gibi genel durumu dikkate alınmalıdır. Bazen enfeksiyona bağlı aplastik krizlerde transfüzyon gerekli hale gelir. Kalp hastalığı da transfüzyon tedavisinin bir göstergesidir. Transfüzyon tedavisi, transfüzyon kararı verildiğinde genel olarak B-TM için uygulanan tedaviye benzer olmalıdır (Taher *et al.* 2009, Eldor and Rachmilewitz 2002).

2.6.2 Splenektomi

Talasemi Intermedia'da (TI) splenektomi için mevcut endikasyonlar büyüme geriliği, artmış transfüzyon gereksinimi, lökopeni, trombositopeni ve splenomegali içerir. Bununla birlikte, splenektomi, TI'da tromboembolik olaylara ve pulmoner hipertansiyona artan bir yatkınlığa katkıda bulunabilir. Kronik hiper pıhtılaşma durumunun varlığı, dolaşımdaki bozulmuş kırmızı kan hücrelerinin yüzeyinde açığa çıkan anyonik fosfolipidlerin prokoagülan etkisine bağlı olabilir. Yıkıcı splenektomi sonrası sepsis ani bir olaydır ve ölümcül olabilir. Splenektomi sonrası hastalarda en sık görülen bakteri Streptococcus pneumoniae, Hemophilus influenzae ve Neisseria meningitidis'tir. Demir yüklü makrofajlar, hücre içi patojenleri interferon-aracılı yolaklarla öldürme yeteneğini kaybeder. Bu yeteneğin kaybı, demir varlığında azalmış

nitrik oksit oluşumu ile ilişkilidir. Splenektomi genellikle hastaların çoğunda transfüzyonu durdurur. Bununla birlikte, genellikle talasemi intermedia'sını karakterize eden yüksek çıkış durumunu ve artmış pulmoner arter basıncını değiştirmez. Dalağın kısmi dearterializasyonu ve parsiyel splenektominin çok önemli ve faydalı bir etkisi vardır, ancak uzun ömürlü değildir (Shawky and Kamal 2012).

2.6.3 Demir şelasyon tedavisi

On yıl sonra, bazı organlarda demir birikimini önlemek için demir şelasyon tedavisi başlandı, ancak demir şelasyonu klinik kalp hastalığının gelişimini engellemeyebilir. Biyopsi veya R2 MRI gibi invazif olmayan bir yöntemle karaciğer demir konsantrasyonunun doğrudan hesaplanması önerilir. Demir şelasyon tedavisi, genellikle karaciğer demir konsantrasyonu, karaciğer dokusunun kuru ağırlığı 7 mg/g'ı aşarsa başlatılmalıdır. 400-500ng/mL'lik eşik serum ferritin değerleri, demir şelasyon tedavisine başlamak için bir gösterge olarak düşünülebilir (Shawky and Kamal 2012).

2.6.4 Fetal hemoglobin üretiminin değişmesi

İlaçlar, HbF (α2γ2) düzeylerini artırır ve globin sentezindeki bir iyileşme nedeniyle β-talasemi intermediyası olan hastalarda bir avantaj olabilir. Hidroksiüre, HbF sentezini indükleyerek ve γ-globin üretimini artırarak gerçekleştirilir. Hem hidroksiüre hem de bütirat yan ürünleri, Hb'de sadece ılımlı artışlar göstermiştir. Transfüzyona bağımlı olmayan bazı β-talasemi intermedia hastaları hidroksiüre tedavisine yanıt verebilir. Hidroksikarbamid, talasemi hastalarına birçok farklı rejime göre tek başına veya diğer ilaçlarla kombinasyon halinde uygulanmıştır. Birçok hastada kan transfüzyonu ihtiyacında önemli bir azalma gözlendi; bazı hastalarda ihtiyaç tamamen ortadan kalktı. α-Delesyonlar, XmnI polimorfizmi ve HbE / β-talasemi hidroksikarbamide iyi bir yanıtın habercisi olabilir. Neredeyse genel olarak bildirilen iyi olma hissi, etkisiz eritropoezdeki önemli düşüşü taklit edebilir. Talasemi tedavisi için bazı klinik çalışmalarda rekombinant insan eritropoietini (rHuEPO) kullanmak, HbF'de, ortalama korpus hacminde (MCV) ve ortalama Hb içeriğinde (MHC) bir artış olmaksızın,

talasemik eritropoezde anlamlı, doza bağlı bir artış gösterdi ve α / non-α oranında bir değişiklik olmaksızın, çoğunlukla splenektomi uygulanmış talasemi intermedia hastalarında görülür. Talasemi hastalarında eritropoietin ve hidroksiüre ile kombinasyon tedavisi, HbF artışı ve artmış paketlenmiş hücre hacmi açısından tek başına tedaviden daha avantajlı görünmektedir (Shawky and Kamal 2012, Casale 2019).

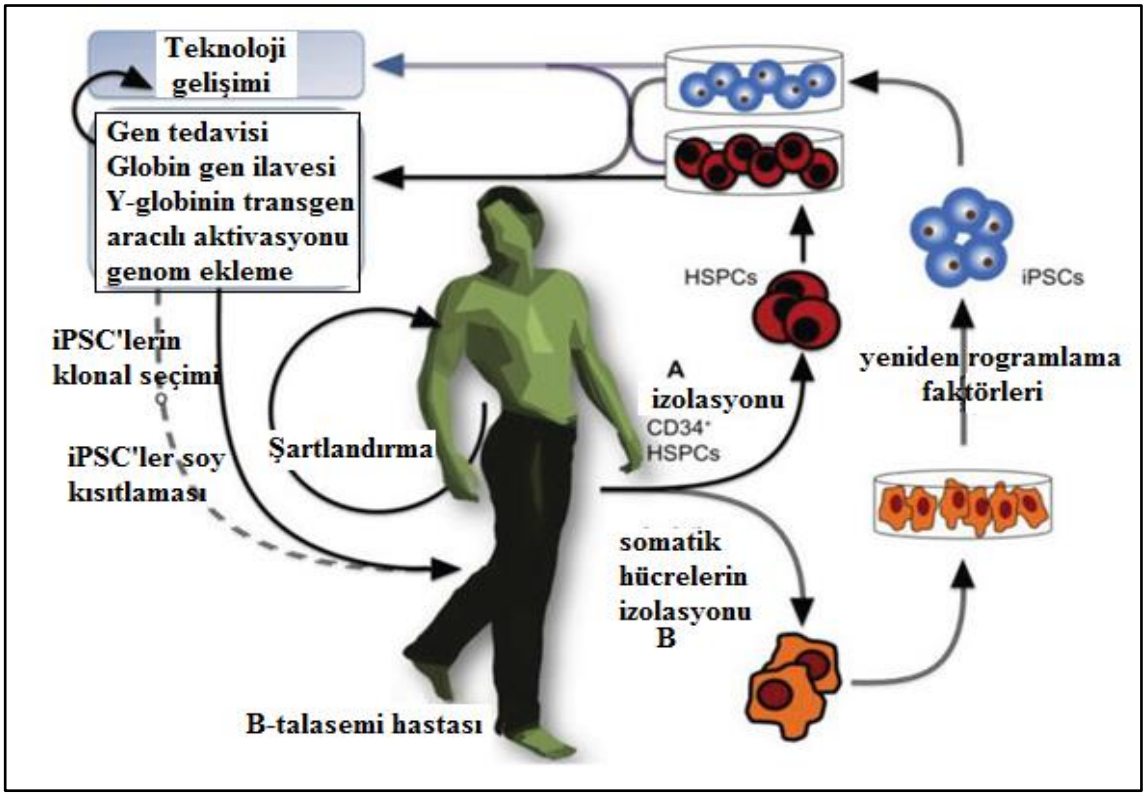
2.6.5 Antioksidanlar

Oksidatif hasar, hücresiz globin zinciri ve transferine bağlı olmayan demirin şelatlanabilir bir bileşeni olan kararsız plazma demiri (LPI) üzerindeki varlığıyla üretilebilir ve bu, demir şelatlama maddeleriyle işlemden geçirilerek azaltılabilir. Nötrofiller üzerindeki kalıcı stres, antibakteriyel yeteneklerini ve solunum patlaması reaksiyonlarını azaltabilir. E vitamininin N-asetilsistein ve demir şelatörlerle birlikte uygulanması, benzersiz bir antioksidan kullanımından daha etkili olabilir (Shawky and Kamal 2012). B-TM hastalarının prognozları, klinik semptomlar, yeni şelatörler ve artan kan güvenliği prosedürleri ortaya çıkmadan önce organ demirini ölçmek için invazif olmayan yöntemlerin ortaya çıkmasıyla son on yılda önemli ölçüde gelişmiştir. Tıptaki yeni gelişmeler, daha önce B-TM hastalarında ölümlerin %71'ine neden olduğu bildirilen, kardiyak mortaliteyi azaltmada önemli bir gelişmenin yolunu açtı (Mazurkiewicz *et al*. 2017, Gali 1999).

Çalışmalar, etnik farklılıklara rağmen, transfüzyona bağlı talasemili çoğu kişinin normal kardiyak demirine sahip olduğunu, ancak önemli bir kısmında eş zamanlı karaciğer demir yüküne sahip olduğunu göstermektedir. Bu amaç için yeni ve en umut verici yöntem, etkili ve doğru bir durumda bölgeye özgü genom düzenlemeye ve hedeflenen transgen entegrasyonuna izin veren gen düzenleme araçlarıdır (GET'ler). Transkripsiyon aktivatör benzeri nükleazlar (TALEN), çinko parmak nükleazlar ve CRISPR / Cas9, büyük GET'ler ile işbirliği yapar. Nükleaz sistemleri, DNA tanıma türlerine göre yaklaşık olarak iki gruba ayrılabilir: ZFN, TALEN ve meganükleazlar, protein-DNA etkileşimleri yoluyla spesifik DNA bağlanmasını başarır, Cas9, temel alan kısa bir RNA anahtar molekülü tarafından spesifik DNA dizilerine hedeflenir.

Doğrudan hedef DNA ile eşleşir ve protein-DNA ilişkilerinin hedeflemede rolü vardır. CRISPR / Cas9, in vitro ve in vivo sistemler için basit ve verimli bir GET'dir. Son yıllarda, β-talasemi tedavisi için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Yeni terapötik stratejilerden biri olan β-globin geni hedefleme, daha sonra HSC'lere farklılaştırılır ve hastaya iade edilir. İndüklenmiş pluripotent kök hücreleri (iPSC'ler) kullanırken, göz önünde bulundurulması gereken en acil konular, indüksiyondan sonra ihtiyaç duyulmayan transkripsiyon faktörlerinin ortadan kaldırılması ve iPSC'lerin tümöre dönüşmeyecek şekilde doğru yeniden programlamanın yeniden oluşturulmasıdır (Doudna and Charpentier 2014).

β-talasemi için gen terapisi stratejileri çok yönlüdür. Bu stratejilerdeki ortak amaç, iPSC'lerde ve CD34 + hematopoietik kök pluripotent hücrelerde (HSPC'ler) düzeltilmiş β-globin gen kusurlarıdır. Bu tedavileri kullanmanın iki alternatif yolu vardır: ilki CD34 + HSC'leri kullanmaktır ve alt popülasyonlar gen terapisi ile düzeltilebilir. İkincisi, somatik hücreleri izole etmek ve yeniden programlamaktır. Kesin genom uygulamasını mümkün kılan gen düzenleme teknolojisinin ortaya çıkışı, β-hemoglobinopatilerin tedavisi için yeni bir strateji sunuyor. Bölgeye özgü çift sarmal kırılmalar (DSB) çinko parmak nükleazlar, TALENS, meganükleazlar ve daha yakın zamanda CRISPR / Cas9 sistemi ile indüklenebilir. CRISPR / Cas9, gen hedeflemede devrim yarattı. Hedef sekans tanıma için bir protein dimer kullanan ve her yeni hedef bölge için yeni bir proteinin tasarlanmasını gerektiren diğer nükleazların aksine, CRISPR / Cas9 teknolojisi, DNA sekansına tamamlayıcı 20 bp sekanslı kısa bir kılavuz RNA (gRNA) kullanır (Finotti *et al*. 2015). Şekil 2.7'de gösterildiği gibi.



Şekil 2.7 Beta talasemi için gen tedavisi stratejileri (Mancuso *et al*. 2006)

Şekil 2.7'de (A) yaygın olarak kullanılan CD34 + HSPC'ler ve alt popülasyonlar, doğrudan gen terapisi ile düzeltilebilir. (B) Alternatif olarak, somatik hücreler izole edilebilir ve pluripotens için yeniden programlanabilir, sonuçta ortaya çıkan iPSC'ler daha sonra gen terapisi, klonal seçim ve nesile özgü farklılaşma için hastaya özgü bir substrat olur. Dairesel oklar dışında, içi dolu oklar HSPC'ler için prosedürleri ve iPSC'ler için olan içi boş okları gösterir (Finotti *et al*. 2015).

Gen ekleme veya düzenleme yoluyla gen terapisi, SCD ve-talasemi gibi kalıtsal kan hücresi bozuklukları için iyileştirici bir terapötik seçenektir. Gen transfer tekniklerinin güvenliği ve etkinliği, lentiviral vektörler kullanılarak geliştirilmiştir. Bu teknoloji mükemmel bir şekilde gelişmiştir, ancak aşılama ile dönüştürülen HSC'lerin sayısı ve B0-TM'nin tam düzeltilmesi ile sonuçlanan yeterli transgen ifadesi dahil olmak üzere bazı sınırlamalar vardır. Bu, dönüştürülmüş HSC'lerin in vivo hayatta kalmasına katkıda bulunabilecek faktörleri sınıflandırma ve ele alma ihtiyacının altını çizer veya mevcut vektörlerden ekspresyon geliştirmek için araçlar bulma ihtiyacının altını çizer. Son

bilgilere göre, hemoglobinopatilere yönelik spesifik gen tedavisi yöntemlerinin, preklinik çalışmaların ve klinik çalışmaların başarı oranı ışığında gözden geçirilmesi gerekmektedir. HIV-1 (LV) ve murin Moloney lösemi virüsü (RV) gibi viral vektörlerin yan etkilerini düzeltmek için preklinik denemelere ihtiyaç duyulacaktır. Başlıca problemler, virülans ve patojenliklerinden sorumlu olan genetik unsurları ortadan kaldırmak ve β-globin genini ve LCR'yi eklemektir. LV, hemoglobinopati hayvan modellerinin düzeltilmesinde en yararlı olmuş ve bunların klinik dönüşümüyle sonuçlanmıştır (Pinzani and Marra 2001).

LCR dahil edilmeden RV aracılı insan β-globin gen transferine bakan ilk çalışmalar, değişken ve düşük seviyelerde gen ekspresyonu gösterdi. Bir dizi çalışmanın ardından, etkili globin geni ekspresyonunu ifade etmek için RV geliştirmek için yaklaşık 10 yıllık çabanın yetersiz olduğu bulundu. Globin genleri dışındaki genlerin transgen ekspresyonunu sağlamak için LTR'nin güçlendirici / promoter sekanslarını kullanan RV'ler, klinik deneylerde kullanılan ilk RV'lerdi. Hastaların gen terapisinin immün yetmezliklerindeki klinik başarılarına rağmen, vektör aracılı insersiyonel mutagenez raporlarının ardından güvenlikleriyle ilgili endişeler ortaya çıktı. RV vektör eklemeleri, birincil hematopoietik projenitör hücrelerin ölümsüzleşmesine yol açar. RV-LTR güçlü bir güçlendirici iken ve transgen ekspresyonunu HIV-LTR ve sitomegalovirüsten nispeten daha zayıf güçlendiricilerle karşılaştırıldığında çok yüksek seviyelere yükseltirken, aynı anda yerleştirme bölgelerini çevreleyen hücresel protoonkojenleri aktive eder. Ayrıca, LTR'nin metilasyonu, entegre transgen promoterin inaktivasyonuna neden olabilir ve uzun vadeli transgen ekspresyonunu önleyebilir. Kendi kendini inaktive eden (SIN) vektör tasarımının yapısı, LTR promotör / güçlendiricisini siler ve transgen ekspresyonunun dahili hücresel promotörler tarafından yönlendirilmesine izin vererek, LTR güçlendirici aracılı genotoksisiteyi ve bunun metilasyonla indüklenen inaktivasyonunu azaltır (Rai *et al.* 2016).

Klinik öncesi LV aracılı insan çalışmalarının β-talasemi intermedia ve B-TM fare modellerini kurtardığı gösterilmiştir. Imren *et al.* -talasemi farelerinde βT87Q geni taşıyan bir vektör kullanarak-globin genindeki bir nokta mutasyonunun ona yapışmayı önleyici özellikler kazandırdığı bir vektör kullanılarak düzeltme gösterdi. Bununla

birlikte, fare talasemi fenotipinin yeterli şekilde düzeltilmesi için birden fazla kopya gerekliydi. Miccio et al. küçültülmüş bir LCR HS2 / HS3'e bağlı β-globin genini taşıyan bir LV vektörü kullandı. Th3 / + farelerindeki talasemi fenotipinin, ortalama vektör kopya sayısı 1 olan, %30-50 frekansla dönüştürülmüş hematopoietik hücreler tarafından tamamen düzeltilebileceğini göstermiştir. Ayrıca, in vivo hayatta kalma avantajına sahip genetik olarak düzeltilmiş eritroblastların olduğu gösterilmiştir. Klinik gen tedavisi çalışmaları için azaltılmış yoğunluklu transplant rejimlerinin kullanımını araştırmak için gereklidir. Malik ve arkadaşlarına göre, hemoglobinopatiler için gen terapisi şu anda bir gerçektir, birkaç hasta β_0 / β_E-talasemiden tedavi edilmiştir veya β_0 / β_0-talasemiden önemli ölçüde iyileşme ile SCD'li bir hasta, diğerleri ise orta derecede transgen ekspresyonu sergilemektedir (Rai *et al*. 2016).

Talasemi hastalığının ciddiyeti, gen transfer teknolojisinin mevcut tedavi kapasitesini sınırlamaya çalışır. Hemoglobinopatilerde etkili klinik çevirinin zorlukları, aşılanabilir transdüksiyonlu HSC'lerin dozunu, ön koşullandırma transplant rejiminin yoğunluğunu ve transgenin ekspresyonunu kapsar. İn vivo seçim modelleri, genetik olarak modifiye edilmiş birkaç HSC'nin genişlemesini sağlayabilir. Vektör potensinin iyileştirilmesi, gen ekspresyonunu artıracaktır. Engraflanabilir HSC'ler üretmek için iPSC teknolojisinin farklılaşmasını teşvik etme çabaları HSC kaynağını genişletebilir ve gen düzenleme, yüksek transgen eksprese eden LV ve LV'nin potansiyel, insersiyonel mutagenezine olan ihtiyacı ortadan kaldırabilir (Moreira 2007).

Gen terapisinin geleceğini geri yükleyebilecek yeni teknolojiler, CRISPR-Cas9 kullanarak gen düzenleme ve iPSC'lerden HSC'lerin geliştirilmesidir, ancak bu gerçekte çok fazla çalışma gerektirebilir. Kök hücre biyolojisi ve genetik manipülasyondaki bilimsel gelişmelerle, doğum öncesi hemoglobinopati teşhisi konan bir çocuğun genetik olarak değiştirilmiş kordon kanı kök hücrelerini fetalden erişkin Hb'ye geçişinden önce bile transfekte ettirebileceği bir geleceğin mümkün olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle bu, herhangi bir hastalık belirtisinin varlığını önleyecektir (Rai *et al.* 2016).

Lin et al. β-talasemi ve OHA tedavisi için fetal hemoglobini artırmak için bir çalışma üzerinde çalıştı. Normal kemik iliği HSC'lerini ve HSPC'leri delesyon HPFH genotipine dönüştürmek için CRISPR-Cas9 kullandılar. Bu tür modifiye edilmiş HSPC'lerden türetilen eritroid hücreleri, silinmeyle modifiye edilmemiş CD34 + HSPC'ler, iPSC'ler ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha yüksek p-globin ekspresyonu gösterdi. Bu klinik buluştan yararlandılar ve CD34 + HSPC'leri değiştirerek-globin lokusunun bir kısmının homoloji dışı uç birleştirme yoluyla genomu çıkarması ve onarması için HPFH'yi taklit eden ve eritroid hücrelere farklılaştığında yüksek düzeyde γ-globin ifadesi üreten bir genotip yaratması için modifiye ettiler. Çalışma, CRISPR-Cas9 sisteminin homozigot β-talasemi ve SCD tedavisi için otolog transplantasyon tedavisine yeni bir potansiyel yaklaşım olduğunu gösterdi (Rai *et al*. 2016).

B-talasemi hastaları için mevcut altın standart prosedür, granülosit koloni uyarıcı faktör (G-CSF) ve kemik iliği stromal hücreleri tarafından ifade edilen stromal hücre türevi faktör-1'in bağlanmasını antagonize eden pleriksafor'un bir kombinasyonunu içerir. HSPC'lerin yüzeyinde bulunan kemokin CXC-reseptör-4. G-CSF artı pleriksafor'un mobilize talasemili hastalarda tek aferez ile çok yüksek sayıda CD34 + hücresi sağladığı, şu anda tek başına pleriksafor kullanılarak HSC'lerde bildirilen en yüksek zenginleşmeye rağmen gösterilmiştir (Rai *et al*. 2016).

Ek olarak, SCD hastalarından yeterli dozda HSPC toplamak için iki veya üç kemik iliği hasadı gerekir; bunun başlıca nedeni, HSC hasadının iltihaplı SCD kemik iliği mikro ortamından ve kemik iliği mononükleer hücrelerinin izolasyonu sırasında hücre kümelerinin oluşumundan olumsuz etkilenmesidir. OHA hastalarında, G-CSF uygulaması ciddi advers olaylara yol açmıştır ve bu nedenle kontrendikedir. Plerixafor'un AKÖ hastaları için potansiyel olarak daha güvenli bir mobilize edici ilaç olduğunu öne sürdüler (Maton 1993, Patton and Kevin 2015).

2012 yılında, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki β-talasemik hastalarda yapılan bir faz 1 klinik çalışma, vahşi tip β-globin transgenini ifade eden TNS9.3.55 vektörünü ve azaltılmış yoğunluklu busulfan bazlı bir şartlandırma yöntemini kullandı. Bu yöntemin

sonucu sınırlıydı ve tedavi edilen dört hasta yeterli klinik olumlu etki göstermedi. TNS9.3.55 varyant vektörü kullanılarak ikinci bir aşama klinik çalışma planlanmıştır, hasta hastalığı semptomları yoktur, ancak sonuçların çok sayıda hastada ve daha uzun bir takip süresi boyunca yeniden üretilmesi gerekir. β_0-talasemi ve muhtemelen SCD için, net klinik fayda sağlamak için üretim, hücre işleme ve protokol tasarımında daha fazla iyileştirmeye ihtiyaç vardır. Birkaç grup, endojen γ-globin ekspresyonunu artırmak veya mutasyonlara neden olan hastalığı düzeltmek için alternatif LV ve genom düzenlemeye dayalı stratejiler önermiştir. Bununla birlikte, LV vektörleri, hasta HSC'lerini genetik olarak değiştirmek için düzenli ve güvenli bir şekilde kullanılır ve genom düzenleme yaklaşımlarının klinik uygulaması, ilişkili toksisite ve potansiyel hedef dışı uygulama olasılığı için uzun süreli HSC'lerin düzenleme verimliliği açısından doğrulanmalıdır. Eşleşen farklı donörler ve haploidentik donörler kullanılarak yeni rejimlerin geliştirilmesi gibi alternatif stratejileri keşfeden güncel klinik çalışmalar, gelecekte SCD hastalarının çoğu için transplant seçeneğini artıracaktır. B-talasemiyi iyileştirmenin diğer stratejisi, gen tedavisi geliştirme çabalarıdır. Değiştirilmiş bir β-globin LV tabanlı vektörü (gen tedavisi) olan iki-talasemi hastası başarıyla tedavi edilmiştir. Bu gelişme SCD için potansiyel barındırmaktadır (Cavazzana-Calvo *et al.* 2010, Sabth *et al*. 2013).

β-Talasemi, OHA'dan sonra ikinci yaygın kalıtsal hemoglobinopatidir. β-talasemi için gen terapisinin keşfi, HLA-özdeş donörler, HSC transplantasyonunun en genç hastalara uygulanmasının dar penceresi ve HSC bazlı gen terapisindeki son gelişmeler tarafından doğru olmuştur. Bu konuyla ilgili çok sayıda yayın, gen terapisinin bir HLA geno-özdeş kardeşi veya alternatif, tıbbi olarak kabul edilebilir bir donörü olmayan hastalar için tercih edilen tedavi olma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Genetiği değiştirilmiş HSC'ler, β-hemoglobinopatilerin tedavisi için allojenik hematopoietik kök hücre transplantasyonuna (HSCT) iyi bir alternatiftir. Eşleştirilmiş bir donör ihtiyacını ortadan kaldırır ve böylelikle HSCT'den sonra greft-konak hastalığı ve greft reddi riskini ortadan kaldırır. Ayrıca, genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin aşılanması için gerekli olan koşullandırma rejimi, otolog kökenleri nedeniyle, immünosupresif ilaçları içermez. Bu tedavinin dünya çapında uygulanması günümüzde daha iyi güvenlik ve bugüne kadar gen terapisi yollarında tedaviye bağlı mortalitenin olmaması sayesinde

mümkün olabilir. Mevcut literatür açısından, gen terapisi için yeni LV vektörlerinin kullanılması ve β-talasemi ve SCD için genom düzenlemeye dayalı tedavi stratejileri tartışılmış ve iyi belgelenmiştir. Yeni terapötik stratejiler, endojen HbF ekspresyonunu yeniden aktive etmek için LV vektörlerinin ve/veya genom düzenleme araçlarının kullanımına dayanmaktadır (Moreira 2007, El Yazji *et al*. 2011).

HSC'leri genetik olarak manipüle etmek ve β-hemoglobinopatilerin altında yatan genetik kusuru düzeltmek için çeşitli yaklaşımlar kullanılabilir. Çok sayıda güncel klinik çalışma (otolog β-talasemi ve SCD HSC'lerin transplantasyonuna dayalı olarak), β benzeri globin transgenlerini eksprese eden LV vektörlerinin kullanımını araştırmaktadır. Elde ettikleri sonuçlar, yeni bir HIV-1 aşı uygulama platformu olarak integraz kusurlu lentiviral vektörlerin (IDLV) daha fazla değerlendirilmesini desteklemektedir (Negri et al. 2016). Globin eksprese eden LV'lerin klinik deneyleri şu anda Avrupa ve Amerika Birleşik Devletleri'ndeki çeşitli yerlerde devam etmektedir. İlk sonuçlar, transfüzyon bağımsızlığının başarılması açısından cesaret vericidir. Bu umut verici sonuçlara rağmen, bazı sorunlar daha fazla araştırmayı hak ediyor. Koşullandırma yönteminin amacı, hastalıklı HSC'leri etkili bir şekilde ortadan kaldırırken diğer organlarda hedeflenmemiş toksisiteden kaçınmaktır (Negri *et al.* 2016). Yeni tedavi stratejileri, endojen HbF ekspresyonunu yeniden etkinleştirmek için LV vektörlerinin ve/veya genom düzenleme araçlarının kullanımına dayanmaktadır.

WDFEE

Traxler et al. CRISPR / Cas9 sistemini mikrohomoloji aracılı uç birleştirme yoluyla γ-globin promotorlarında 13 bp HPFH delesyonunu düzenlemek için kullandı. Bu bölgenin HbF baskılayıcı BCL11A için bir bağlanma sahası içerdiği düşünülmektedir. Çalışmalarında, HbF reaktivasyonu azalmış orak β-globin seviyeleri ile ilişkilendirildi ve in vitro SCD hücre fenotipini iyileştirdi. HPFH seviyelerinin yeniden oluşturulması, β ve δ-globin genlerini içeren uzun genomik parçaların homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) tabanlı eksizyonunu ve BCL11A tarafından hedeflenen 3,5 kb D-gama-intergenik HbF susturucuyu gerektirir. Bu yaklaşım, genom düzenlemenin genel verimliliğini azaltabilecek NHEJ onarım yolundan yararlanmaktadır. Bununla birlikte, ilkenin ispatı işe yararsa, bu yaklaşım HbF'yi yeniden aktive etti, β-globin genini sürekli

bozdu ve SCD hücre fenotipini iyileştirdi. Somatik hücrelerin uyarılmış pluripotent kök hücrelere yeniden programlanması, β-talasemi tedavisi için yeni bir yaklaşım açar. Siz ve iş arkadaşlarınız, homozigot β_0-talasemili bir hastanın deri fibroblastlarını, Hb'yi üreten uyarılmış pluripotent kök hücrelere yeniden programladı. Pluripotent kök hücreleri indüklediğine dair bu raporlar, ass-talasemi tedavisi için yeni bir yaklaşım sunabilir. Bu stratejiler şu anda in vitro düzeydedir (Ye *et al*. 2009, Traxler *et al.* 2016). β-talasemi için epigenetik tedavi yaklaşımları, bu hastalığın tedavisi için umut vericidir (Chang 1991).

Son olarak, genom düzenlemesinin etkinliği ve bu stratejinin potansiyel yan etkilerinin (toksisite) iyi niyetli HSC'lerde daha fazla test edilmesi gerekir. B-hemoglobinopatilerden muzdarip hastalara en iyi terapötik seçeneği sağlamak için farklı stratejiler etkinlik, etkinlik ve güvenlik açısından karşılaştırılmalıdır. Son zamanlarda, birkaç araştırma grubu, β-talasemi mutasyonlarını düzeltmek için genom düzenlemeye dayalı yöntemler keşfetti. Nihayetinde, yenilikçi denemeler, tamamen farklılaşmış somatik hücrelerin uyarılmış pluripotent kök hücreler yapmak için yeniden programlanabileceği yönünde bir heves geliştirdi. Sonraki denemeler, bu orijinal stratejiyi kullanarak SCD'nin bir fare modelinde değişiklik olduğunu gösterdi ve bu nedenle, birkaç kısıtlama ile hemoglobinopatileri tedavi etmek için bu hücrelerin kullanılmasının yolunu açtı: Bir kısıtlama, tüm hematopoietik hatların indüklenmiş pluripotent kök hücrelerle onarılamamasıydı. İnsan tedavisinin kullanılmasını engeller. Gen terapisinin geleceği, dikkate değer ilerlemeler göstermiştir. Faz 1 denemeleri, LV β-globin vektörleri ile ex vivo transdüksiyona uğramış otolog CD34 + eritroid progenitör hücrelerin transplantasyonunun etkililiğini ve çoğunlukla uzun ömürlü güvenliğini incelemek amacıyla halihazırda bireyleri işe almaktadır (Yu *et al.* 2007, Arumugam and Malik 2010).

2.7 Proteine Dayalı Teşhis Yöntemleri

2.7.1 Hemoglobin electrophoresis

Hemoglobinlerin çeşitli elektroforetik tekniklerle ayrılması, hemoglobin bozukluklarının teşhisinin temelini oluşturur. Halen kullanımda olan en yaygın elektroforetik yöntem, selüloz asetat alkalin elektroforezinin yerini büyük ölçüde (yeterlilik testi anketleri ve tahta incelemeleri dışında) alan izoelektrik odaklamadır. Bu yöntem, hemoglobin A, hemoglobin F ve hemoglobin A dahil en yaygın normal hemoglobinleri ve hemoglobin S ve C ortak varyantlarını kolayca ayırır. B-talasemi ve HbH hastalığı ile ilişkili aşırı HBB zincirleri ile ilişkili yüksek hemoglobin A2, ayrıca izoelektrik odaklanma ile görselleştirildi. İzoelektrik odaklama ile hemoglobin S'den (örneğin, hemoglobin D veya hemoglobin G) veya hemoglobin C'den (örneğin hemoglobin E veya hemoglobin OArab) bazı nispeten yaygın varyantların çözümlenmesi zordur, bu nedenle kesin olarak ayırt etmek için başka bir elektroforetik teknik veya HPLC gereklidir. PH 6.2'de sitrat agar kullanan elektroforez, hemoglobin S veya hemoglobin C'nin izoelektrik odaklamayla benzer şekilde hareket eden diğer varyantlardan ayırt edilmesine izin verir. Örneğin, hemoglobin E'yi hemoglobin A2'den ayırabilen kapiler bölge elektroforezi kullanılarak artık daha da büyük çözünürlük mümkündür, HPLC ile mümkün değildir. Kapiler bölge elektroforezi, birçok durumda eski elektroforez yöntemlerinin yerini alma potansiyeline sahiptir (Borbely *et al.* 2013).

2.7.2 HPLC

Katyon değişim kromatografisine dayalı olarak hemoglobinleri ayıran çeşitli üreticilerden bir dizi HPLC yöntemi mevcuttur. Bu yöntemler, diyabetli hastalarda tedaviyi izlemek için hemoglobin F ve hemoglobin A2'nin yanı sıra hemoglobin A1c'nin (glikozlu hemoglobin) kantifikasyonu için ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından onaylanmıştır. HPLC, hemoglobin S ve hemoglobin C'nin, elektroforez üzerine göç. Aynı zamanda, değişken hemoglobinlerin miktarının belirlenmesine de izin verir. HPLC, hemoglobin E'yi hemoglobin A2'den ayıramaz. Bu genel olarak tanısal önemi

olmamasına rağmen, bu iki hemoglobini ayırma yeteneği, hemoglobin E için homozigotluğu, hemoglobin E ve β0-talasemi için bileşik heterozigotluğundan ayırt etmede faydalı olabilir. Hemoglobin E ve A2'nin ayrılması, kılcal bölge elektroforezi ile gerçekleştirilebilir. Hemoglobin türlerini ayırmak için başka kromatografik teknikler mevcuttur. Özellikle boronat afinite kromatografisi, glikolize edilmemiş hemoglobin türlerinden, hemoglobin varyantları olan diyabetik hastaları izlemek için yararlıdır, ancak bu tekniğin talasemi veya hemoglobinopatilerin teşhisinde herhangi bir yararı yoktur (Rhea and Molinaro 2014).

2.7.3 Hemoglobin bozukluklarının teşhisinde elektroforez ve kromatografinin kullanımı

β-talasemi teşhisi genellikle elektroforez ve/veya kromatografi ile artmış hemoglobin A2 gösterilerek gerçekleştirilir, ancak birlikte bulunan δ-talasemi veya şiddetli demir eksikliği gibi olağandışı durumlarda, hemoglobin A2 seviyesi artmayabilir. Hemoglobin A2'deki tanısal artış, HBB ve HBD genlerinin silinmesine bağlı olarak β-talasemide de gözlenmeyecektir, ancak hemoglobin F δβ-talasemi ve fetal hemoglobinin kalıtsal kalıcılığında (HPFH) görüldüğü gibi sıklıkla yükselir. Protein bazlı teknikler ayrıca yenidoğan döneminde β-talasemi varlığını tespit edemeyebilir, çünkü hemoglobin A2 yaklaşık 6 aylık olana kadar yetişkin düzeylerine ulaşmaz. Bununla birlikte, iki 0-talasemi alleli için homozigotluk/ bileşik heterozigotluğuna bağlı talasemi majör, doğumda hemoglobin A eksikliğine bağlı olarak şüphelenilecektir (Sabath *et al.* 2013).

Hemoglobin elektroforezi ve HPLC genellikle, bir veya iki (cis veya trans) HBA geninin silindiği α-talaseminin daha hafif formlarının teşhisine katkıda bulunmaz. Bu bozukluklardaki fazla HBB zincirleri, kısmen HbH'nin kararsızlığından dolayı standart tekniklerle görselleştirilecek kadar bol değildir. HbH, nadir eritrositlerde, parlak kresil mavisi ile supravital boyama ile görselleştirilebilen inklüzyonlar oluşturur, ancak bu teknik birçok laboratuvarda mevcut değildir. Bu nedenle, α-talasemi genellikle mikrositozlu, normal demir çalışmaları ve normal hemoglobin elektroforezi / HPLC'si olan bir hastanın bir tür α-talasemiye sahip olduğu varsayıldığı bir dışlama tanısıdır, ancak küçük miktarları saptamak için yöntemler tarif edilmiştir. A-talaseminin daha

hafif formlarında bulunan HbH. Bu hastalar için moleküler tanı, kesin tanı koymanın tek yolu olabilir ve bu, genetik danışma için kritik olabilir. Üç HBA geninin silindiği veya HBA delesyonlarının ve nokta mutasyonlarının bir kombinasyonunun olduğu HbH hastalığı durumunda, HbH'yi elektroforez veya HPLC ile görselleştirmek için yeterli zincir dengesizliği vardır (Sabath *et al*. 2013).

Bir varyant hemoglobinin tahmini tanımlanması jel elektroforezi, izoelektrik odaklanma, HPLC ve/veya kapiler bölge elektroforezi ile gerçekleştirilebilir. Önceden belgelenmiş bir varyantı içeren numunelerle karşılaştırma, tanımlama için paralel olarak analiz edilebilir. DNA diziliminin mevcudiyetinden önce, hemoglobin varyantları, proteolitik global peptidlerin kütle spektrometrisiyle karakterize edildi. DNA dizilimi, varyant hemoglobinleri tanımlamanın en yaygın yolu olsa da, daha yeni kütle spektrometrisi teknikleri, sağlam molekülün kütlesine veya tanımlanmış globin fragmanlarına dayalı olarak hemoglobin varyantlarını hızlı bir şekilde tanımlama olasılığını sunar (Sabath *et al.* 2013).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Hastaların seçimi

Çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen deneylerde, 120 adet hastanın katılımıyla deney grubu oluşturulmuştur. Deney grubunu oluşturan hastaların seçiminde belirli kriterler göz önünde bulundurulmuştur. Bu kriterlere aşağıda yer verilmektedir:

- Hastaların 18 yaşından büyük olması.
- Hastaların, deneyin gerçekleştirildiği hastanenin Hematoloji Kliniğine başvurmuş olması ve Hematoloji Kliniğinden Talasemi tanısının kesin bir şekilde konmuş olması.
- Hastaların herhangi farklı bir kan hastalığı ve kanser tanısı almamış olması. Hastaların kemoterapi ve radyoterapi başta olmak üzere deney sürecini ve sonuçlarını etkilemesi muhtemel herhangi bir farklı tedavi sürecine dahil olmamaları.

Çalışmamız, Irak'ın Tikar Vilâyeti'nde yer alan Kalıtsal (Genetik) Hastalıklar Merkezi'nde gerçekleştirilmiştir. Hastaların her birine çalışmamız hakkında kapsamlı bir bilgi verilmiş olup, ayrıca, Hasta Onam Formu ile deneye katılımlarında Rızaları alınmıştır. Hasta Onam Formlarının toplamasından sonra Hastane Etik Kurulu'ndan çalışma onayı alınmıştır.

3.2 Yöntem

3.2.1 Numunelerin toplanması

Çalışmamız kapsamında yürütülecek deneyler için, Tikar Kalıtsal Hastalıklar Merkezi'nin Hematoloji Kliniğine başvuran 120 hastadan mor kapaklı EDTA tüplerinde

5-10 mL hacminde kan numunesi toplanmıştır. Toplanan kanlar soğuk zincir depolama ile muhafaza altına alınmış ve DNA Ekstraksiyonu için saklanmıştır. Numune toplama işlemi tamamlandığında, toplanan kan numuneleri DNA Ekstraksiyonu için eş zamanlı olarak işleme tabi tutulmuştur.

3.2.2 Dna ekstraksiyonu

Genomik DNA'nın izolasyonu, hastalardan rızaları dahilinde alınan 5-10 mL periferik kan numunesinden, Nucleon BACC3 Genomik DNA Ekstraksiyon Kiti (GE Healthcare, Life Sciences) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamayı takiben, numunelerin niceliksel incelemesi ve miktar ölçümü için NanoDrop 2000 Spektrofotometre (Thermo Scientific) kullanılmıştır. DNA İzolasyon işleminde kit üreticisinin kullanım talimatları adım adım takip edilmiş ve uygulanmıştır.

Rızaları dahilinde, hastalardan edinilen klinik numunelerden izole edilen DNA örneklerinin tıbbi kalitesinin tespiti için Beer-Lambert denklemi esas alınarak, Nano Drop 200 markalı ve Thermo Scientific Inc. Adlı şirket tarafından üretilen spektrofotometri cihazı ile ölçüm yapılmıştır. 1 µL numunelerin derişimini ve saflık oranını tespit etmek için öncelikle saf su ölçümü yapılmış ve cihaz kalibre edilmiştir. 260nm–280nm aralığında optik yoğunluk değeri numunenin saflık düzeyini belirlemek için optimal değer olarak alınmıştır. 260nm – 280nm optik yoğunlukların ölçümünde 1,7–1,9 aralığında elde edilen sonuç hastalardan edinilen klinik numunelerin istenen saflık düzeyinde olduğunu göstermiştir. Ayrıca genotipler, tek tüp mültipleks PCR ile tespit edilmiştir.

3.2.3 PCR primerleri

PCR Primerleri, gap prensibine uygun olarak tasarlanmıştır. DNA izolasyonunu takiben, 5'-CTGCGGGCCTGGG CCG-3've 5'-GCCCATCGGGCAGGAGGAAC-3' primerleri, i 2 PCR fragmanı (-101 pozisyonundan Poly-A sinyali) 25 µl reaksiyon hacimlerinde 30-50ng genomik DNA kullanarak alınmıştır ve 1,9 -Kb amplikonu

kullanılarak 206-bp amplikon ile değiştirilmiş ve PCR reaksiyonu sonuçları incelenmiştir. Ayrıca SYBR-PCR analizine tabi tutulmuştur. PCR karışımı 12,5 µl 2X PCR ana karışımı ve her bir primerden 5 pmol içermektedir.

3.2.4 Sybr-PCR

SYBR-PCR işlemi GeneAmp5700 (Applied Bio Systems, Foster City, CA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spesifik SYBR-PCR1–4, sırasıyla --- SEA, --a3.7, --a4.2 ve silinmeyen tip allelleri saptamak için kullanılmıştır.

Reaksiyon karışımının bileşenleri, her SYBR-PCR ve SYBR Green1'de sadece 1 çift primer içermesi dışında standart talimatlar izlenerek gerçekleştirilmiştir.
Touch-Down Termal profili ile gerçekleştirilen Amplifikasyon parametreleri şu şekildedir:

i. 300 saniye - 94°C.
ii. 20 saniye 1 döngü 94°C.
iii. 60 saniye - 65°C.
iv. 120 saniye 72°C.
v. Daha sonra tavlama şablonu her döngüde 1°C azaltılmıştır.
vi. Tavlama şablonu 61°C'ye ve 36 döngüye ulaştığında, amplifikasyon döngülerini, 1,7°C / dakikalık bir geçiş hızıyla 60°C'den 95°C'ye kadar ardışık bir eritme döngüsü izlemiştir.
vii. Erime işlemi sırasında floresan takibi yapılmıştır.

3.2.5 Erime eğrilerinin yorumlanması

Amplifiye edilmiş çıktının Erime sıcaklığının (Tm) altındaki sıcaklık derecelerinde, SYBR Green-1 (Yeşil) boyası dsDNA'ya bağlanmakta ve parlak bir şekilde floresanlaşmaktadır. Tm değerine erişildiğinde, dsDNA denatüre olmakta ve SYBR-

Green-1 serbest bırakılmaktadır. Bu durum, floresan yoğunluğunda ciddi anlamda bir düşüşe neden olmaktadır. Bu değişim oranı, negatif türevi (-dF / dT) PCR cihazının veri analiz yazılımı tarafından sıcaklığa karşı çizilerek belirlenmiştir. Tüm analizler, arka plan düzeltmesi ve renk telafisi ile gerçekleştirilmiştir. Grafikte bir tepe noktasının oluştuğu sıcaklık, DNA dupleksinin Tm değerine karşılık gelmektedir (Grafikler, deney bölümünün sonunda sırasıyla yer almaktadır).

Hassasiyet değerleri, pozitif alel ile seyreltilmiş şablon DNA çözeltilerinden saptanabilir en küçük tepe yüksek tarafından belirlenmiştir.

3.2.6 mPCR/agaroz jel elektrofezi

Tek tüplü m-PCR'da yedi primer kullanılmıştır. Primer dizileri aşağıdaki tabloda yer almaktadır. A2 geni, üç silme allelinin hepsinde, yani -a3.7,- a4.2 veya --SEA'da kısmen veya tamamen silindiğinden, pozitif amplifikasyonu (1,9kb ürün), bir delesyon alel de mevcut olduğunda heterozigotluğu belirtmek için kullanılmıştır. 1,6kb ürün, şablon DNA'da bir -a3.7 aleli temsil etmektedir. 1,5kb bant bir a4.2 aleli temsil ederken, 0,8kb bant SEA aleli temsil etmektedir. Çizelge 3.1'de gösterildiği gibi.

Çizelge 3.1 PCR Primer dizileri

Primer	Dizi (5' → 3')	Çıktı (in kb)	Amplifikasyon aleli
A'	CTT TCC CTA CCC AGA GCC AGG	1,6	-a3.7
B'	GCC CAA GGG GCA AGA AGC ATG	1,6	-a3.7
A'	CTT TCC CTA CCC AGA GCC AGG	1,9	aa
C'	CAG CAC CTT CTC TTG AGC AGG C	1,9	Aa
G'	TTT GAA TGA AGT CCG AGT AGG CAG	1,5	-a4.2
E'	CCC TGG GTG TCC AGG AGC AAG CC	1,5	-a4.2
S (1)	GTA TCC TCT GTC CTG ACC GAG AA	0,8	--SEA
S (2)	AGA TAT ATG GGT CTG GAA GTG TAT C	0,8	--SEA

m-PCR ve elektroforezden sonra her DNA örneğinin jel modelinde bir veya iki bant olmalıdır. Bir numune için belirli bir bant yoksa bu, numunenin PCR'sinin başarısız olduğu ve nedenlerinin araştırılması gerektiği anlamına gelir.

3.2.7 Klonlama ve dizileme (sekanslama)

Gap-PCR ürünleri, plazmit DNA'ya klonlanmıştır ve rutin prosedürler kullanılarak dizilenmiştir (sekanslanmıştır).

4. BULGULAR

Hem SEA heterozigotları hem de homozigotlar dahil olmak üzere iyi bilinen pozitif SEA aleli olan 64 vaka ve SEA aleli olmadığı bilinen 56 vaka arasındaki SEA alelleri SYBR-PCR1 ile tespit edilmiş ve ardından dissosiasyon analizi yapılmıştır (Grafikler, deney bölümünün sonunda sırasıyla yer almaktadır).

SEA / pozitif numunelerin tamamı 82,5 ± 1°C'de net bir tepe noktası göstermiştir. (Grafikler deney bölümünün sonunda sırasıyla yer almaktadır). SEA / negatif numunelerin tamamı 72 ± 1°C' ye kaydırılmıştır.

Amplifikasyon grafiği çalışmanın sonunda yer almaktadır ve tespit edilebilir bir eşik değeri içermektedir. Bu nedenle, amplifikasyon grafiği ve CT, SYBR-PCR'nin pozitif bir indeksi olarak uygulanmamıştır.

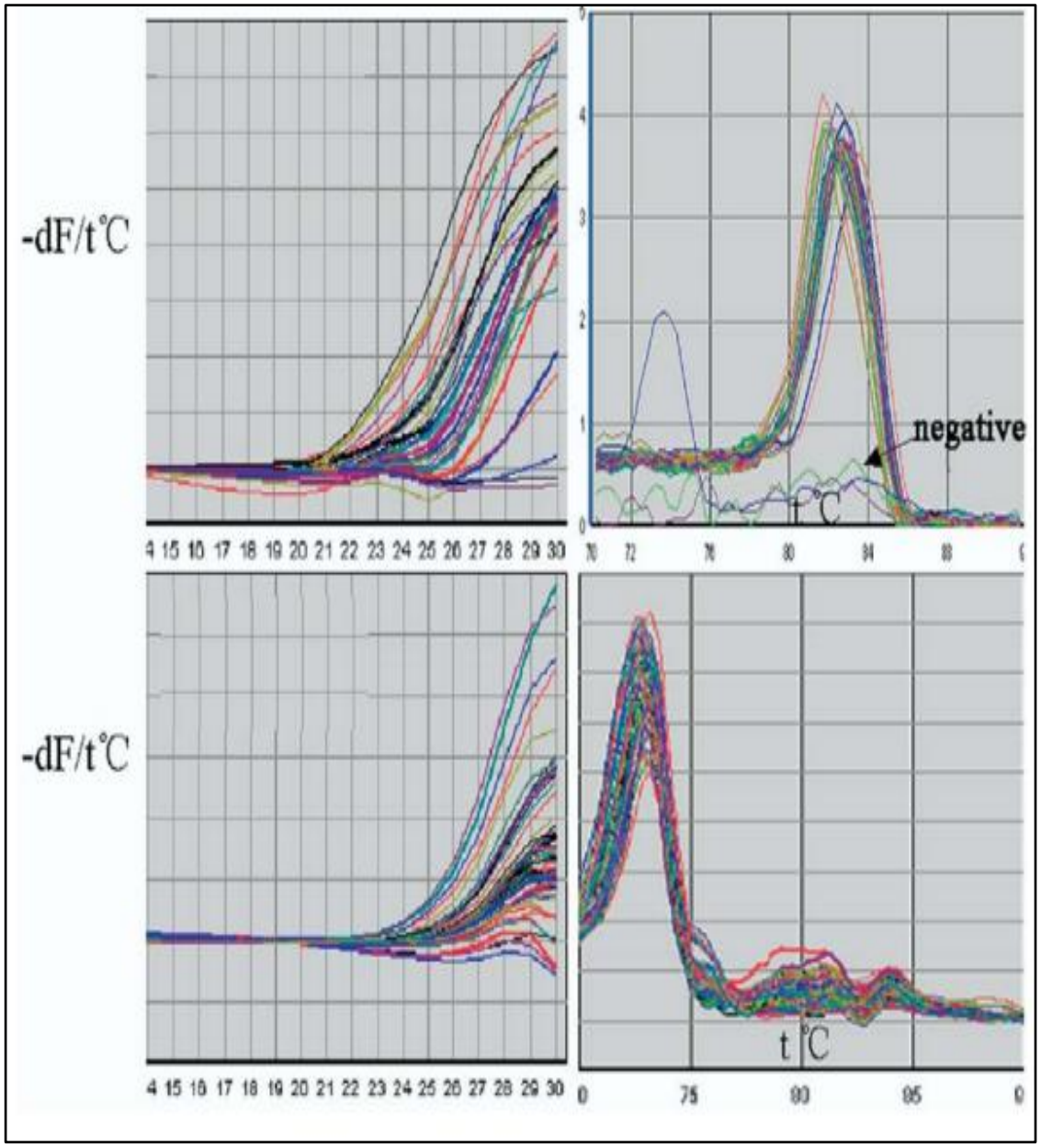
Pozitif bir sonuç, yalnızca DC analizinden 82,5 ± 1°C'de karakteristik bir noktası ve tepe noktası değeri kesme değeri olarak sunularak kabul edilmiştir.

Net bir moleküler tanı elde etmek için, primer konsantrasyonunun ve diğer reaksiyon koşullarının SYBR-PCR ve DC analizi üzerindeki etkisi sistemik olarak değerlendirilmiş ve optimize edilmiştir. Dört ayrışma eğrisi farklı primer CD2've C'' konsantrasyonları ile SYBR-PCR4'ün 4 farklı reaksiyonunu temsil etmektedir. Grafikler, deney bölümünün sonunda sırasıyla yer almaktadır). Hem CD2 'hem de C' için optimize edilmiş primer konsantrasyonu, erime noktası 83,0 ± 0,5°C'de berrak bir pik oluşturmak için 0,125g / 50L olarak alınmıştır.

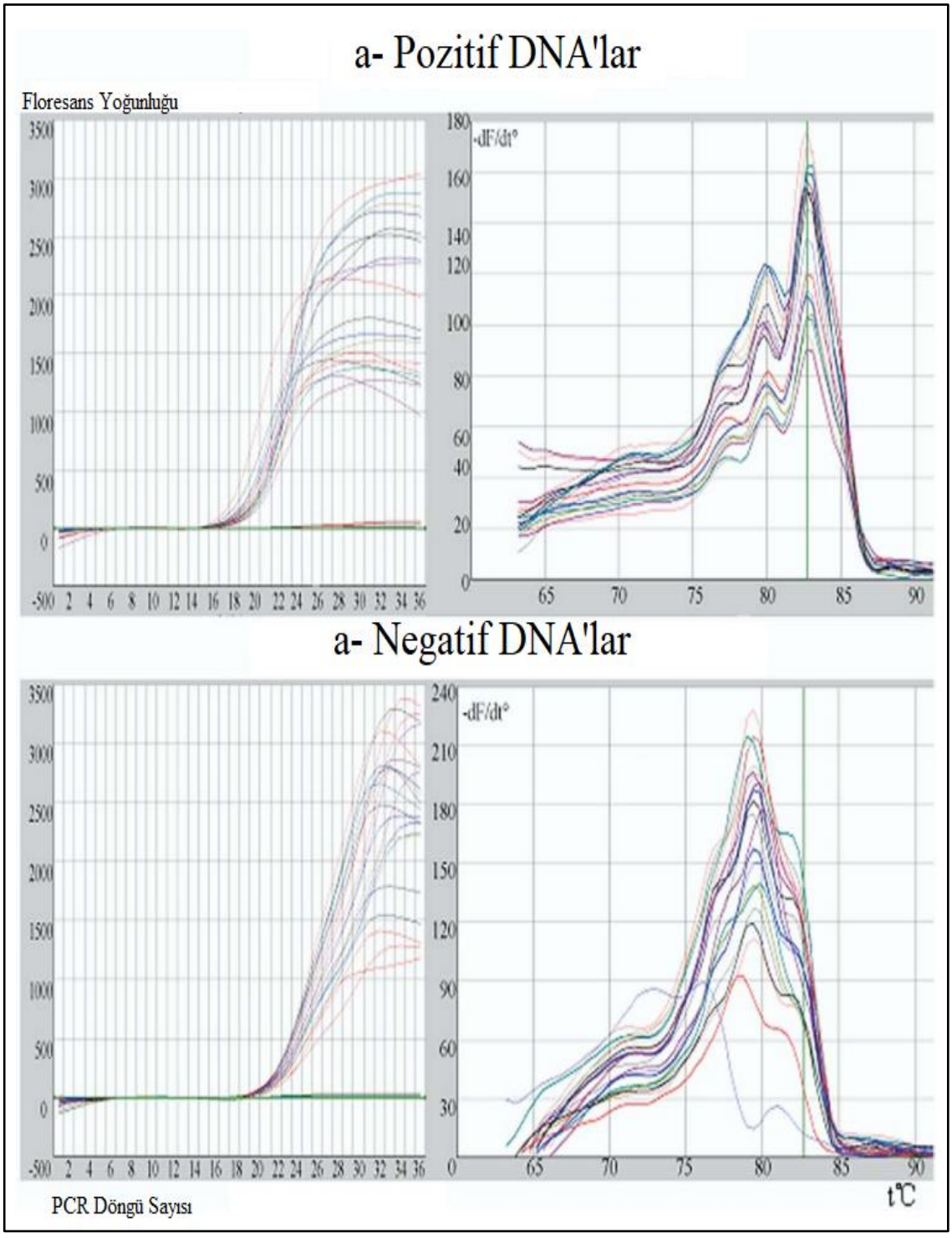
Nispeten yeni sayılabilecek bir yaklaşım olan SYBR-PCR yaklaşımı, rutin PCR/agaroz jel elektrofez yöntemi ile de çalışmamız içerisinde karşılaştırılmıştır. Agaroz jel elektrofezinden elde edilen PCR ürünlerinden bant görünümü elde edilememiştir ancak SYBR-PCR yönteminde yaklaşık 20 kat daha verimli sonuç elde edilmiştir (Grafikler

çalışmanın sonunda yer almaktadır). Şekil 4.1- Şekil 4.5'te gösterildiği gibi.

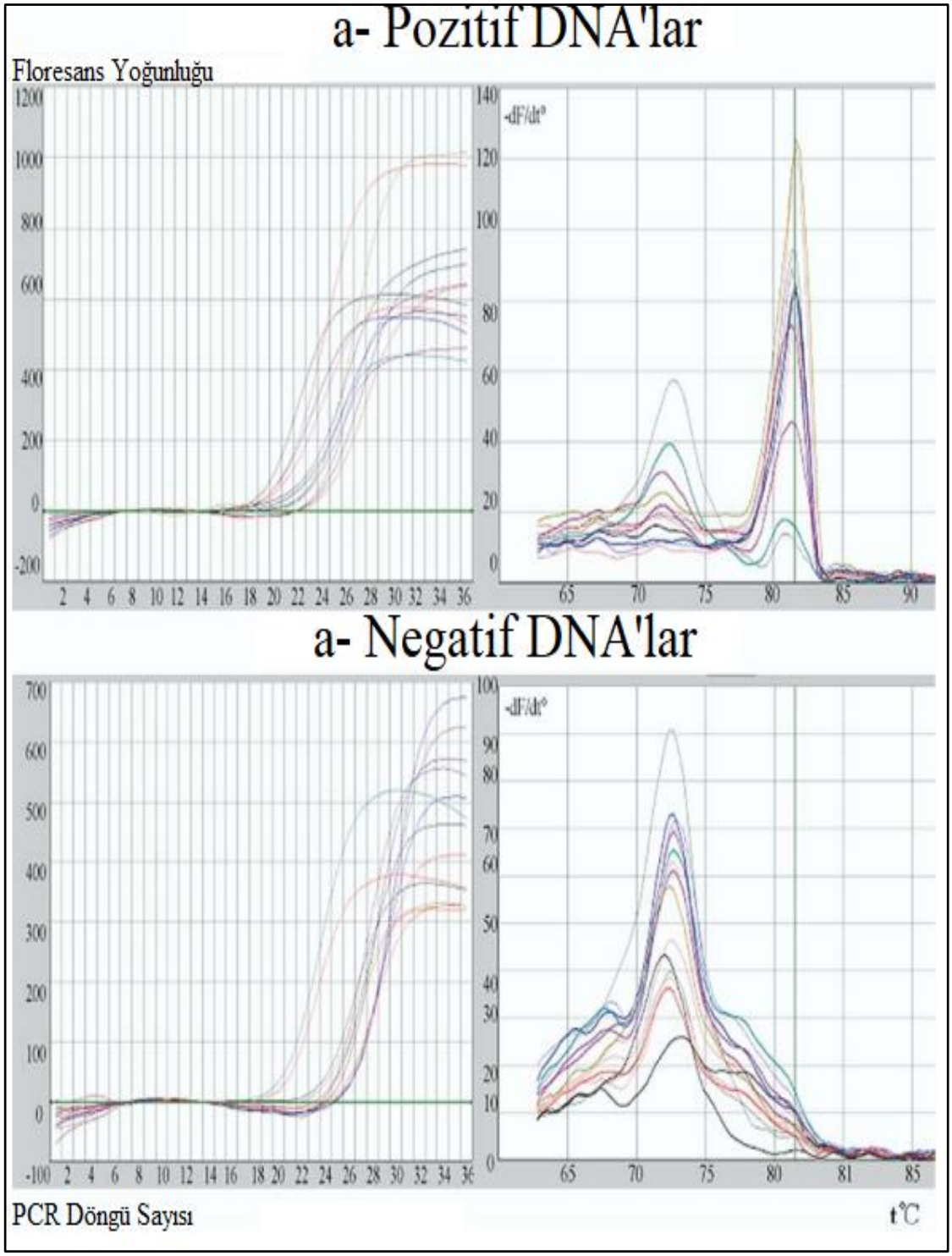
Son olarak 120 adet DNA numunesi, 4 farklı SYBR-PCR/DC analiz teknikleri ile test edilmiştir. Sonuçlar mPCR/jel elekrofez yöntemi ile tutarlı ve üstelik daha duyarlıdır.



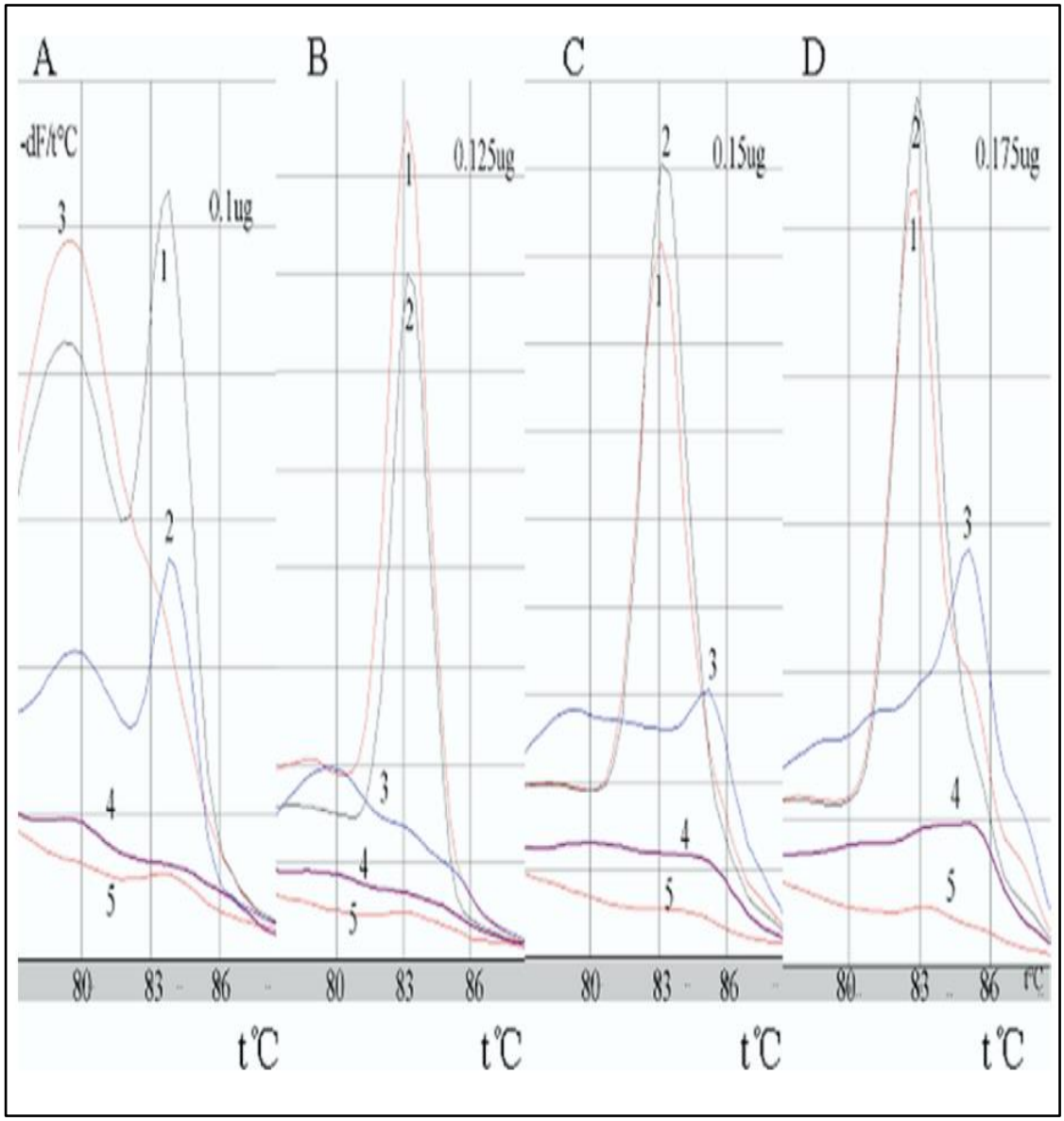
Şekil 4.1 SEA/pozitif ve SEA/negatif DNA örneklerinin SYBR-PCR1 ile mplifikasyon grafiği. Sol taraf amplifikasyonu sağ taraf DC verilerini göstermektedir



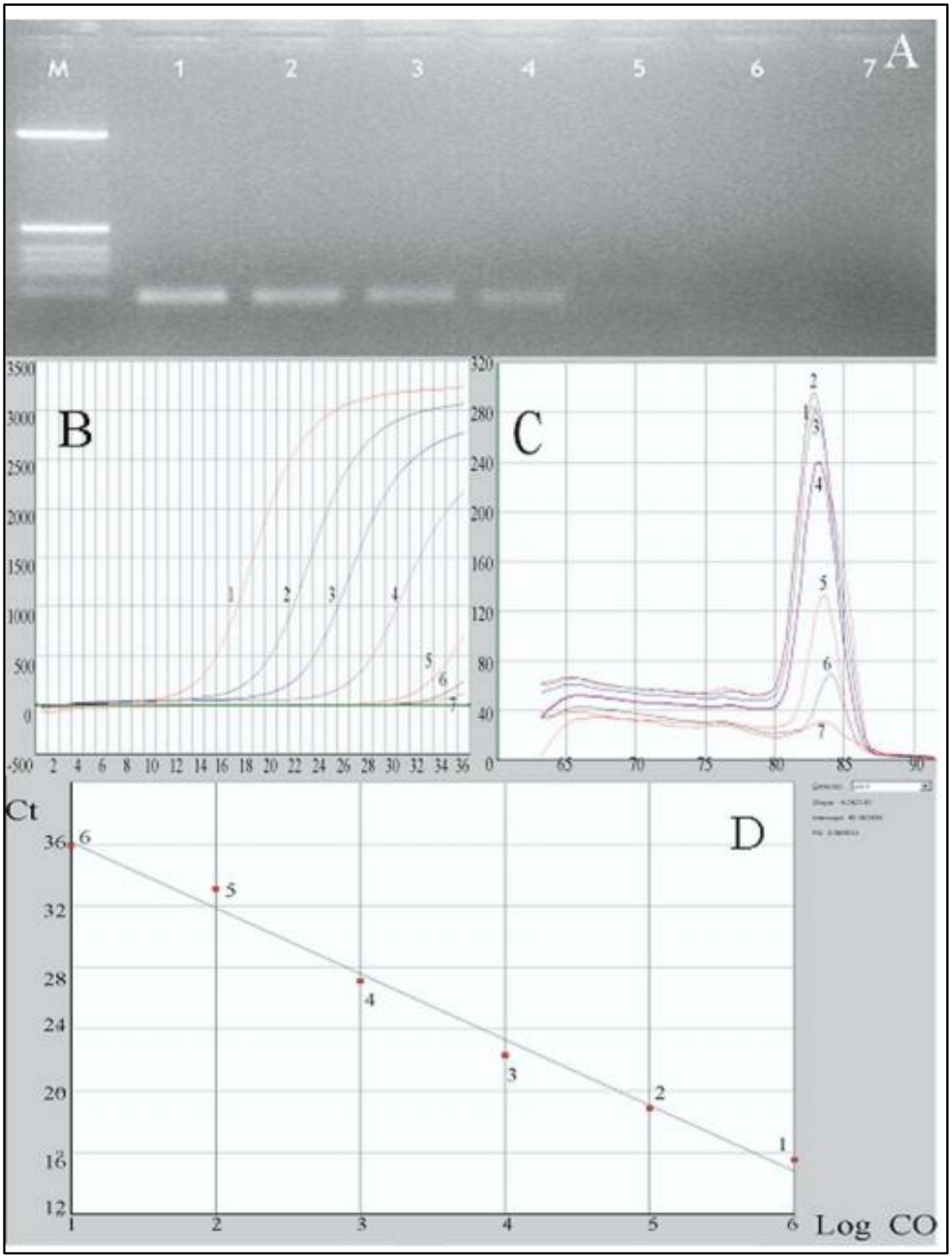
Şekil 4.2 a/Pozitif ve a/Negatif (a/3,7) DNA Numunelerinin amplifikasyon ve DC grafiği. Sol taraf amplifikasyonu sağ taraf DC verilerini göstermektedir



Şekil 4.3 a/Pozitif ve a/Negatif (a/4.2) DNA Numunelerinin amplifikasyon ve DC grafiği. Sol taraf amplifikasyonu, sağ taraf DC verilerini göstermektedir



Şekil 4.4 SYBR-PCR4'te kullanılan primerlerin konsantrasyonlarının DC üzerindeki etkisi. Primer CD2' ve C"konsantrasyonları sırasıyla (A) 0,10ng, (B) 0,125ng, (C) 0,150ng ve (D) 0,175ng



Şekil 4.5 DC (C) analizinin hassasiyetlerinin SYBR-PCR4 reaksiyonundan (B) sonra agaroz jel elektroforezi (A) ile karşılaştırılması. P206-bp DNA'nın orijinal kopya sayısı: (1) 1,60 x 10^5, (2) 1,60 x 10^4, (3) 1,60 x 10^3, (4) 1,60 x 10^2, (5) 1,60 x 10, (6) 1,60 x 1 6D: Standart Eğiris. M (A): 'a6'cbDNA/ Hind µEcoRµ

Çizelge 4.1 Genotipleme sonuçları ile 120 DNA numunesinin teşhisi. 4 SYBR-PCR ve / DC ve mPCR Sonuçları

SYBR-PCR4 83 ± 1ºC 206 bp	SYBR-PCR2 82,5±1 ºC 1,9 kb	SYBR-PCR3 83±1 ºC 1,65 kb	SYBR-PCR1 81±1 ºC 0,8 kb	mPCR ile test edilen genotipler	Vaka sayısı
-	-	-	+	SEA/SEA	3
-	-	+	+	SEA/a	18
-	+	-	+	SEA/a	12
+	-	-	+	SEA/aa	8
+	-	-	+	SEA/aa	9
-	+	-	-	a/a	4
-	-	+	-	a/a	4
-	+	+	-	a/a	10
+	-	+	-	a/aa	18
+	+	-	-	a/aa	24
+	-	-	-	a/aa	10
				TOPLAM	120

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Çalışmamızda, talaseminin genetik moleküler incelemesi gerçekleştirilmiştir. Delesyon allelleri için hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak SYBR-PCR yöntemi tercih edilmiş sonuçlar klasik PCR yöntemi ile karşılaştırılmıştır. SYBR-PCR ile DC analizi birleştirilerek sonuçlar yorumlanmıştır. DC'den elde edilen erime noktası sıcaklığı kesme değerinde karakteristik bir pike dayalı olarak pozitif delesyon alel tanımlanmıştır. DC'nin şekli ve konumu, erime sıcaklığında 2°C'den daha az ayrılan amplifikasyon ürünlerini ayırt etmek için kullanılabilen GC / AT oranının, uzunluğunun ve dizisinin işlevleridir. Gerçekten de, SYBR-PCR çıktılarının dört erime noktası değeri arasındaki fark 2°C'nin altındaydı, ancak bunlar SYBR-PCR reaksiyonlarının her biri için çok spesifikti ve ek olarak sırasıyla 4 adet SYBR-PCR 4 ayrı tüpte gerçekleştirilmiştir. İdeal koşullar altında saptanabilir başka hiçbir spesifik olmayan amplifikasyon ürünü ve primer dimmer gözlenmemiştir. Amplifikasyon grafiği ve CT, PCR'nin pozitif olup olmadığını belirlemek ve gerekirse orijinal şablon kopya numarasının kantitatif bir sonucunu vermek için kullanılabilir. a-globin gen kümesi çok yüksek bir GC içeriğine ve birçok homolog bölgeye sahip olduğundan, a-3.7 alleli saptamak için kullanılan SYBR-PCR2'deki spesifik olmayan amplifikasyon ürününü tamamen ortadan kaldırmak imkansızdır. Aslında SYBR-PCR2'de kullanılan a2F ve B'' primer çifti, test edilen 4 primer çifti kombinasyonu arasında en iyisi olarak gözlenmiştir. A-3.7 pozitif ve negatif grupların her ikisinde de ayrışma eğrisinde bazı spesifik olmayan amplifikasyon ürünleri bulunmasına rağmen, eğri şekilleri açıkça farklı olarak gözlenmiştir. 3.7 pozitif grup, 83 ± 1 °C'de 20 değeri olan bir pik gösterirken, negatif grup aynı erime sıcaklığında pik göstermemektedir. Dolayısıyla, a-3.7 alel için çok güvenilir bir teşhis sonucu, SYBR-PCR2 ve ardından DC analizi kullanılarak elde edilebilmektedir. Bu prosedür güvenilir ve uygun maliyetli olup, PCR sonrası işlemi ortadan kaldırır, PCR ürünü taşıma kontaminasyonunu önler, prob gerektirmez ve yüksek verimlidir. Bu SYBR-PCR tabanlı yöntem, güney Irak'ta ve bölgede her tür delesyon a/b- talasemi için rutin klinik tanı için mevcut alternatif bir teknoloji olabilir. Aşağıdaki gibi yapılan çalışmalarla elde edilen sonuçlar arasındaki farkla aynıydı. Son birkaç yılda, tüm genom analizi varyasyon ölçeğini ortaya çıkarmayı görünüşte normal bireylerde insan genomu (Lupski and Stankiewicz 2005, Gün 2010).

In thisstudy, Bu çalışmada, çalışma ile aynıdır Çinli bir aileden, -α3.7 / - SEA ve SEA HbH hastalığı olan hastaların fenotiplerine benzer şekilde hafif anemi ve hafif bir innHb düşüşü gösteren bir proband araştırdıkmaktadır.

PCR sırasında biriken PCR ürününü tespit etmek için Applied Biosystems™ SYBR™ Yeşil boya (dsDNA bağlayıcı boya) kullanmaktadır. PCR sırasında biriken hedefi tespit etmek için hedef gene özel bir florojenik prob kullanmaktadır. Çizelge 5.1'de gösterildiği gibi.

Çizelge 5.1 Özellikler iki aralık içerir (Orta ve Yüksek).

Özellikler	Orta	Yüksek
Hassasiyet-düşük kopya sayısı	Değişiklikler	1-10 kopya
Yeniden üretilebilirlik	Orta	Yüksek
Çoğullama		✓
Önceden tasarlanmış testler		✓
Tipik olarak kullanıcı tasarımı, deneysel optimizasyon gerektirir	✓	
Gen ifadesi	Düşük miktar tayini	Yüksek miktar tayini

5.1 Sonuç

120 hasta numunesi üzerinde yaptığımız çalışmayla, farklı deniz alelleri a ve aa için SYBR-PCR için farklı pozitif ve negatif sonuçlar veren birçok silme alanı belirledik, burada sonuçlar Çizelge 4.1 allellerinde gösterildiği gibidir. Deniz / a / deniz, deniz, SYBR-PCR1 81 ± 1^{o}C 0,8kb pozitif ve a / aa, SYBR-PCR1 81 ± 1^{o}C 0,8 kb negatiftir. Daha fazla allel ve daha geniş pcr yöntemleri incelenecektir.

Sıcaklık, çift sarmallı DNA'nın (dsDNA) nükleik asit yapısını etkiler. Erime sıcaklığı (Tm), DNA ipliklerinin yarısının rastgele sarmal veya tek iplikli (ssDNA) durumda olduğu sıcaklık olarak tanımlanmaktadır. Tm, ONA molekülünün uzunluğuna ve onun spesifik nükleotid dizisine bağlıdır. DNA, iki ipliğinin ayrışmış olduğu bir durumdayken (Le., dsDNA molekülü iki bağımsız iplik olarak bulunur), yüksek sıcaklık tarafından denatüre edilmiş olarak adlandırılmaktadır.

DNA erimesi olarak da adlandırılan DNA denatürasyonu, çift sarmallı deoksiribonükleik asidin çözüldüğü ve bazlar arasındaki hidrofobik istifleme çekiciliklerinin kırılmasıyla tek sarmallı sarmallara ayrıldığı süreçtir. Hidrofobik etkiye bakmaktadır. Her iki terim de bir karışım ısıtıldığında meydana gelen sürece atıfta bulunmak için kullanılır, ancak "denatürasyon", formamid veya üre gibi kimyasallar tarafından indüklenen DNA ipliklerinin ayrılmasını da ifade edebilmektedir.

DNA denatürasyonu süreci, DNA'nın bazı yönlerini analiz etmek için kullanılabilmektedir. Sitozin/guanin baz eşleşmesi genellikle adenin/timin baz eşleşmesinden daha güçlü olduğundan, bir genomdaki ("GC içeriği" olarak adlandırılır) sitozin ve guanin miktarı, genomik DNA'nın eridiği sıcaklık ölçülerek tahmin edilebilir. Daha yüksek sıcaklıklar, yüksek GC içeriği ile ilişkilidir.

DNA denatürasyonu, iki farklı DNA dizisi arasındaki dizi farklılıklarını saptamak için de kullanılabilmektedir. DNA ısıtılır ve tek iplikli duruma denatüre edilir ve karışım, ipliklerin yeniden hibritleşmesine izin vermek için soğutulur. Benzer diziler arasında

hibrit moleküller oluşur ve bu diziler arasındaki herhangi bir farklılık, baz eşleşmesinin bozulmasına neden olmaktadır. Genomik bir ölçekte, yöntem, araştırmacılar tarafından DNA-DNA hibridizasyonu olarak bilinen bir süreç olan iki tür arasındaki genetik mesafeyi tahmin etmek için kullanılmıştır. DNA'nın tek bir izole bölgesi bağlamında, denatüre edici gradyan jeller ve sıcaklık gradyan jelleri, sıcaklık gradyan jel elektroforezi olarak bilinen bir işlem olan iki dizi arasındaki küçük uyumsuzlukların varlığını tespit etmek için kullanılabilmektedir.

Erime sıcaklığına dayalı DNA analizi yöntemleri, altta yatan diziyi incelemek için proxy olma dezavantajına sahiptir; DNA dizilimi genellikle daha doğru bir yöntem olarak kabul edilmektedir.

5.2 Öneriler

1. Hem erkekler hem de kadınlar için evlilik öncesi talasemi testleri yapmak.
2. Tüm hastalar için epidemiyolojik istatistiklerin bulunması.
3. Talasemi teşhisi için gelişmiş cihazlar sağlamak.
4. Tip alfa talasemili hastaların mekanistik bölgelerindeki mutasyonların varlığı konusunda polarize çalışmalar yapılması.

KAYNAKLAR

Abubakar, A., Iliyasu, B., Yusuf, A. B., Igweh, A.C., Onyekwelu, N. A., Shamaki, B. U., Afolayan, D. O. and Ogbadoyi, E. O. 2005. Antitrypanosomal and haematological effects of selected Nigerian medicinal plants in Wistar rats. Biokemistri, 17(2), pp. 95-99.

Abubakar, I. I., Tillmann, T. and Banerjee, A. 2015. Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet, 385(9963), pp. 117-171.

Adair, G. S. 1925. A critical study of the direct method of measuring the osmotic pressure of hœmoglobin. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, 108(748), pp. 627-637.

Agarwal, A. M., Nussenzveig, R. H. and Hoke, C. 2013. Identification of one or two α-globin gene deletions by isoelectric focusing electrophoresis. Am J Clin Pathol. 140: 301-305.

Ahmed, S., Saleem, M., Modell, B. and Petrou, M. 2002. Screening extended families for genetic hemoglobin disorders in Pakistan. New England journal of medicine., 347(15), 1162-1168.

Akar, N., Cavdar, A. O., Dessi, E., Loi, A., Pirastu, M. and Cao, A. 1987. β-Thalassemia mutations in theTurkish population. J Med Genet, 1987; 24: 378-379.

Aksoy, M., Dinçol, K., Akgün, T., Erdem, Ş. and Dinçol, G. 1971. Haematological effects of chronic benzene poisoning in 217 workers. Occupational and Environmental Medicine, 28(3), pp. 296-302.

Al-Allawi, N. A., Shamdeen, M. Y. and Rasheed, N. S. 2010. Homozygosity for the Mediterranean α-thalassemic deletion (hemoglobin Barts hydrops fetalis).

Annals of Saudi medicine, 30(2), 153-155.

Allen, S., Young, E. and Bowns, B. 2017. Noninvasive prenatal diagnosis for single gene disorders. Curr Opin Obstet Gynecol. 29: 73–9.

Altay, Ç. 2002. The frequency and distribution pattern of ß-thalassemia mutations in Turkey. Turk J Haematol, 19(2), pp. 309-315. Khodaei, G.H., Farbod, N., Zarif, B., Nateghi, S. and Saeidi, M., 2013. Frequency of thalassemia in Iran and Khorasan Razavi. International journal of Pediatrics, 1(1), pp. 45-50.

Andreani, M., Testi, M., Gaziev, J., Condello, R., Bontadini, A., Tazzari, P. L., Ricci, F., De Felice, L., Agostini, F., Fraboni, D. and Ferrari, G. 2011. Quantitatively different red cell/nucleated cell chimerism in patients with long-term, persistent hematopoietic mixed chimerism after bone marrow transplantation for thalassemia major or sickle cell disease. haematologica, 96(1), pp. 128.

Anurathapan, U., Hongeng, S., Pakakasama, S., Sirachainan, N., Songdej, D., Chuansumrit, A., Charoenkwan, P., Jetsrisuparb, A., Sanpakit, K., Rujkijyanont, P., Meekaewkunchorn, A., Lektrakul, Y., Iamsirirak, P., Surapolchai, P., Satayasai, W., Sirireung, S., Sruamsiri, R., Wahidiyat, P. A., Ungkanont, A., Issaragrisil, S. and Andersson, B. S. 2016. Hematopoietic stem cell transplantation for homozygous β-thalassemia and β-thalassemia/hemoglobin E patients from haploidentical donors. Bone Marrow Transplant, 51: 813–8.

Araújo, A. S., Silva, Jr., W. A., Leão, S. A., Bandeira, F. C., Petrou, M., Modell, B. and Zago, M. A. 2003. A Different Molecular Pattern of β-Thalassemia Mutations in Northeast Brazil. Hemoglobin, 27(4), 211-217.

Arumugam, P. and Malik, P. 2010. Genetic therapy for beta-thalassemia: from the bench to the bedside. ASH Education Program Book. 2010(1): 445-450.7

Ayçiçek, A., Koç, A., Özdemir, Z. C., Bilinç, H., Koçyiğit, A. and Dilmeç, F. 2011. Beta-globin gene mutations in children with beta-thalassemia major from Şanlıurfa province, Turkey. Turk J Haematol, 28(2), pp. 264-268.

Aydinok, Y., Kattamis, A., Cappellini, M. D., El-Beshlawy, A., Origa, R., Elalfy, M., Kilinç, Y., Perrotta, S., Karakas, Z., Viprakasit, V., Habr, D., Constantinovici, N., Shen, J. and Porter, J. B. 2015. Effects of deferasirox-deferoxamine on myocardial and liver iron in patients with severe transfusional iron overload. Blood, 125(25), 3868–3877.

Bernini, L. F. 1998. α-Thalassaemia. Baillière's Clin Haem, 11(1): 53-90.

Boitano, A. E., Wang, J., Romeo, R., Bouchez, L. C., Parker, A. E., Sutton, S. E., Walker, J. R., Flaveny, C. A., Perdew, G. H., Denison, M. S. and Schultz, P. G. 2010. Aryl hydrocarbon receptor antagonists promote the expansion of human hematopoietic stem cells. Science, 329(5997), pp. 1345-1348.

Boonsa, S., Sanchaisuriya, K., Fucharoen, G., Wiangnon, S., Jetsrisuparb, A. and Fucharoen, S. 2004. The diverse molecular basis and hematological features of Hb H and AEBart's diseases in northeast Thailand. Acta haematologica, 111(3), 149-154.

Borbely, N., Phelan, L., Szydlo, R. and Bain, B. 2013. Capillary zone electrophoresis for haemoglobinopathy diagnosis. Journal of clinical pathology, 66(1), 29-39.

Borgna-Pignatti, C., Rugolotto, S., De Stefano, P., Zhao, H., Cappellini, M. D., Del Vecchio, G. C. and Cnaan, A. 2004. Survival and complications in patients with thalassemia major treated with transfusion and deferoxamine. haematologica, 89(10), 1187-1193.

Brancaleoni, V., Di Pierro, E., Motta, I. and Cappellini, M. D. 2016. Laboratory diagnosis of thalassemia. International Journal of laboratory hematology, 38, pp. 32-40.

Branson, B. M., Owen, S. M., Wesolowski, L. G., Bennett, B., Werner B. G. and Wroblewski, K. E. 2014. Laboratory Testing for the Diagnosis of HIV Infection: Updated Recommendations. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention.

Brendel, C., Goebel, B. and Daniela, A. 2015. CD133-targeted gene transfer into long-

term repopulating hematopoietic stem cells. Mol Ther. 23(1): 63-70.

Brittain, T. 2004. Measuring assembly and binding in human embryonic hemoglobins. Methods in enzymology, 379, 64-80.

Brown, K. E., Amoils, S. and Horn, J. M. 2001. Expression of α- and β-globin genes occurs within different nuclear domains in haemopoietic cells. Nat Cell Biol. 3: 602-606.

Canatan, D., Kose, M. R., Ustundag, M., Haznedaroglu, D. and Ozbas, S. 2006. Hemoglobinopathy control program in Turkey. Public Health Genomics, 9 (2), pp. 124-126.

Cao, A. and Moi, P. 2002. Regulation of the globin genes. Pediatric research, 51(4), pp. 415-421.

Cao, A. and Galanello, R. 2010. Beta-thalassemia. Genetics in medicine, 12(2), 61-76.

Carton, J. 2012. Oxford Handbook of Clinical Pathology. 02(16).OUP Oxford.

Casale, M., Cozzolino, F., Scianguetta, S., Pucci, P., Monaco, V., Sanchez, G., Santoro, C., Rubino, R., Cannata, M. and Perrotta, S. 2019. Hb Vanvitelli: A new unstable α-globin chain variant causes undiagnosed chronic haemolytic anaemia when co-inherited with deletion− α3. 7. Clinical biochemistry, 74, pp. 80-85.

Cavazzana-Calvo, M., Payen, E., Negre, O., Wang, G., Hehir, K., Fusil, F. and Leboulch, P. 2010. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human β-thalassaemia. Nature, 467(7313), 318-322.

Cavdar, A. P. and Arcasoy, A. 1971. The incidence of b thalassaemia and abnormal haemoglobin in Turkey. Acta haematologica, 45: 312-8.

Chang, J. G., Lee, L. S. and Lin, C. P. 1991. Rapid diagnosis of alpha-thalassemia-1 of Southeast Asia type and hydrops fetalis by polymerase chain reaction. Blood. 78(3): 853-4.

Chatterjee, M. N. and Shinde, R. 2002. Jaypee brothers. Drugs for Pulmonary Hypertension

Chui, D. H. and Waye, J. S. 1998. Hydrops fetalis caused by α-thalassemia: an emerging health care problem. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 91(7), 2213-2222.

Çürük, M. A., Kilinç, Y., Evrüke, C., Ozgünen, F. T., Aksoy, K. and Yüreğir, G. T. 2001. Prenatal Diagnosis Of Hb H Disease Caused By A Homozygosity For Theα2 Poly A (Aataaa→ Aataag) Mutation. Hemoglobin, 25(2), 255-258.

Daar, S., Hussein, H. M., Merghoub, T. and Krishnamoorthy, R. 1998. Spectrum of betathalassemia mutations in Oman. Ann N. Y. Acad. Sci, 850, 404-406.

De Sanctis, V., Kattamis, C., Canatan, D., Soliman, A. T., Elsedfy, H., Karimi, M., Daar, S., Wali, Y., Yassin, M., Soliman, N. and Sobti, P. 2017. β-thalassemia distribution in the old world: an ancient disease seen from a historical standpoint. Mediterranean journal of hematology and infectious diseases, 9(1).

Denic, S., Souid, A. K., Nagelkerke, N., Showqi, S. and Balhaj, G. 2011. Erythrocyte reference values in Emirati people with and without α+ thalassemia. BMC Blood Disord. 11: 1.

Divan, A. and Royds, J. eds., 2013. Tools and techniques in biomolecular science. Oxford University Press.

Doudna, J. A. and Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 346(6213).

El Yazji, M. S. 2011. Immunological Assessment of β-thalassemic Major Children Aged 5-12 Years Old Attending Abd El-Aziz El-Rantisy Hospital in Gaza Strip Gaza Şeridi'ndeki Abd El-Aziz El-Rantisy Hastanesi'ne Başvuran 5-12 Yaşlarındaki β-Talasemi Major Hastalarının İmmünolojik Değerlendirmesi. Journal of the Turkish Society of Immunology, 16(1), 17-24.

Eldor, A. AND Rachmilewitz, E. A. 2002. The hypercoagulable state in thalassemia.

Blood, 99(1), 36-43.

Engelhart, J. F. 1825. Commentatio de vera materiae sanguini purpureum colorem impertientis natura. typis Dieterichianis.

Farashi, S. and Harteveld, C. L. 2018. Molecular basis of α-thalassemia. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 70, pp. 43-53.

Finotti, A., Breda, L., Lederer, C. W., Bianchi, N., Zuccato, C., Kleanthous, M. and Gambari, R. 2015. Recent trends in the gene therapy of β-thalassemia. Journal of blood medicine, 6, 69.

Fucharoen, S. and Viprakasit, V. 2009c. Hb H disease: clinical course and disease modifiers. Hematology, 2009(1), 26-34.

Fucharoen, S. and Winichagoon, P. 1987a. Hemoglobinopathies in southeast Asia. Hemoglobin, 11(1), 65-88.

Fucharoen, S., Winichagoon, P., Siritanaratkul, N., Chowthaworn, J. E. W. and Pootrakul, P. 1998b. α-and β-thalassemia in Thailand. Annals of the New York Academy of Sciences, 850(1), 412-414.

Funke, O. 1851. Uber das milzvenenblut. Z Rat Med. 1: 172–218.

Galanello, R. and Origa, R. 2010. Beta-thalassemia. Orphanet Journal of Rare Diseases. 5 (1): 11.

Gali, E. A., Polat, G., Doğdu, O., Akgol, M., Parlar, H. R., Arpacı, A., Aksoy, K. and Yuregir, G. T. 1999. A premaritial screeing programme of hemoglobinopathiesin Hatay. Ann Med Sci, 8:88-92.

George C. 2000. Marshall Space Flight Center. A NASA recipe for protein crystallography. [Marshall Space Flight Center, Ala.?] : National Aeronautics and Space Administration, [Marshall Space Flight Center.]

Gibbons, R. J. and Higgs, D. R. 1996. The alpha-thalassemia/mental retardation syndromes. Medicine, 75(2), 45-52.

Giordano, P. C., Fodde, R., Anions, R., Ploem, J. E. and Bernini, L. F. 1990. HB J-Anatolia [α61 (E10) LYSTHR]: Structural Characterization and Gene Localization of A New a Chain Variant. Hemoglobin, 14(2), 119-128.

Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for. 2015. 240 causes of death, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet, 385(9963), 117-171.

Goh, S. H., Lee, Y. T., Bhanu, N. V., Cam, M. C., Desper, R., Martin, B. M., Moharram, R., Gherman, R. B. and Miller, J. L. 2005. A newly discovered human α-globin gene. Blood, 106(4), pp. 1466-1472.

Goldman, L., Schafer, A. I. 2015. Goldman-Cecil Medicine: Expert Consult - Online. Elsevier Health Sciences. 4(21).

Goossens, M., Dozy, A. M., Embury, S. H., Zachariades, Z., Hadjiminas, M. G., Stamatoyannopoulos, G. and Kan, Y. W. 1980. Triplicated alpha-globin loci in humans. Proceedings of the National Academy of Sciences, 77(1), 518-521.

Grosso, M., Sessa, R., Puzone, S. and Maria, R. S. P. I. M. 2012. Molecular Basis of Thalassemia, Anemia, InTechOpen; 2012. pp. 346–9.

Gu, Y. C., Landman, H. and Huisman, T. H. J. 1987. Two different quadruplicated α globin gene arrangements. British journal of haematology, 66(2), 245-250.

Hasegawa, A., Shimizu, R., Mohandas, N. and Yamamoto, M. 2012. Mature erythrocyte membrane homeostasis is compromised by loss of the GATA1-FOG1 interaction. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, 119(11), 2615-2623.

He, Z. and Russell, J. E. 2001. Expression, purification, and characterization of human hemoglobins Gower-1 (ζ 2ε2), Gower 2 (α2ε2) and Portland-2 (ζ2β2) assembled in complex transgenic-knockout mice. Blood 97: 1099-1105.

Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B. and Camaschella, C. 2010. Two to tango: regulation of Mammalian iron metabolism. Cell, 142(1), pp. 24-38.

Higgs, D. R., Wood, W. G., Jarman, A. P., Sharpe, J., Lida, J., Pretorius, I. M. and Ayyub, H. 1990. A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus. Genes & development, 4(9), 1588-1601.

Higgs, D. 2001. Molecular mechanisms of α thalassemia. Disorders of hemoglobin, 405-430.

Higgs D. R. 2009. The pathophysiology and clinical features of α thalassemia. In: Steinberg, M. H. Forget, B. G, Higgs, D. R eds. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. New York, NY: Cambridge University Press. 266-295.

Higgs, D. R. 2013. The molecular basis of α-thalassemia. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 3(1), p.a011718.

Hoffman, O. and Brittain, T. 1996. Ligand binding kinetics and dissociation of human embryonic hemoglobins. Biochem. J. 315: 65–70.

Hoppe-Seyler, F. 1866. Über dir oxidation in lebendem blute. Med-chem Untersuch Lab, 1 pp. 133-140.

https://www.stjude.org/disease/alpha-thalassemia.html. Erişim Tarihi: 23.08.2020.

Huehns, E. R. and Shooter, E. M. 1965. Human haemoglobins. Journal of Medical Genetics, 2(1), 48.

Hünefeld, F. L. 1840. Der Chemismus in der thierischen Organisation: Physiologisch-chemische Untersuchungen der materiellen Veränderungen, oder des Bildungslebens im thierischen Organismus; insbesondere des Blutbildungsprocesses, der Natur der Blut körperchen und ihrer Kernchen. Ein Beitrag zur Physiologie und Heilmittellehre. Brockhaus.

Inusa, B. P. D., & Colombatti, R. 2017. European migration crises: The role of national hemoglobinopathy registries in improving patient access to care.

Keikhaei, B., Slehi-Fard, P., Shariati, G. and Khosravi, A. 2018. Genetics of Iranian

alpha-thalassemia patients: a comprehensive original study. Biochemical genetics, 56(5), pp.506-521.

Kilinç, M., Yüregir, G. T. and Ekerbiçer, H. 2002. Anaemia and iron-deficiency anaemia in south-east Anatolia. European journal of haematology, 69(5-6), pp.280-283.

Ko, M., Sohn, D. H., Chung, H. and Seong, R. H. 2008. Chromatin remodeling, development and disease. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 647(1-2), pp.59-67.

Kumari, S., Biswas, A. K. and Giri, G. A. 2016. randomized prospective clinical trial comparing intravaginal dinoprostone gel and misoprostol vaginal tablets as a method of induction of labour.

Kutlu, M., Çekmiş, H., Başak, M., Osman, N., Açıkgöz, Ö., Sevindir, İ. and Özcan, ÖZ. 2006. Talasemiler. Bakırköy Tıp Dergisi. 2:33-40.

Kwaifa, I. K., Lai, M. I. and Noor, S. M. 2020. Non-deletional alpha thalassaemia: a review. Orphanet journal of rare diseases, 15(1), pp., 1-12.

Lacy, M. E., Wellenius, G. A., Sumner, A. E., Correa, A., Carnethon, M. R., Liem, R. I., Wilson, J. G., Sacks, D. B., Jacobs, D. R., Carson, A. P. and Luo, X. 2017. Association of sickle cell trait with hemoglobin A1c in African Americans. Jama, 317(5), pp., 507-515.

Lau, Y. L., Chan, L. C., Chan, Y. Y. A., Ha, S. Y., Yeung, C. Y., Waye, J. S. and Chui, D. H. 1997. Prevalence and genotypes of α-and β-thalassemia carriers in Hong Kong implications for population screening. New England journal of medicine, 336(18), 1298-1301.

Liebhaber, S. A., Cash, F. E. and Ballas, S. K. 1986. Human alpha-globin gene expression. The dominant role of the alpha 2-locus in mRNA and protein synthesis. Journal of Biological Chemistry, 261(32), 15327-15333.

Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M. P. and

Matsudaira, P. 2008. Molecular cell biology. Macmillan.

Lupski, J. R. and Stankiewicz, P. 2005. Genomic disorders: molecular mechanisms for rearrangements and conveyed phenotypes. PLoS genetics, 1(6), e49.

Mancuso, A., Sciarrino, E., Renda, M. C. and Maggio, A. A. 2006. prospective study of hepatocellular carcinoma incidence in thalassemia. Hemoglobin. 30(1):119–124.

Mandel, M. and Marmur, J. 1968. Use of ultraviolet absorbance-temperature profile for determining the guanine plus cytosine content of DNA. In Methods in enzymology (Vol. 12, pp. 195-206). Academic Press.

Marzollo, A., Calore, E., Tumino, M., Pillon, M., Gazzola, M. V., Destro, R., Colombatti, R., Marson, P., Tison, T., Colpo, A. and Mainardi, C. 2017. Treosulfan-based conditioning regimen in sibling and alternative donor hematopoietic stem cell transplantation for children with sickle cell disease. Mediterranean journal of hematology and infectious diseases, 9(1).

Maton, A., Hopkins, J., McLaughlin, C. W., Johnson, S., Warner, M. Q., LaHart, D. and Wright, J. D. 1993. Human Biology and Health. Englewood Cliffs, New Jersey, US: Prentice Hall.

Mazurkiewicz, Ł., Petryka, J., Śpiewak, M., Miłosz-Wieczorek, B., Małek, Ł. A., Jasińska, A., Jarmus, E., Marczak, M., Misko, J. and Grzybowski, J. 2017. Clinical and prognostic relevancy of left ventricular trabeculation assessed by cardiac magnetic resonance in patients with dilated cardiomyopathy. Kardiologia Polska (Polish Heart Journal), 75(8), pp., 794-803.

McGrath, K. and Palis, J. 2008. Ontogeny of erythropoiesis in the mammalian embryo. Current topics in developmental biology, 82, 1-22.

Mockenhaupt, F. P., Ehrhardt, S., Gellert, S., Otchwemah, R. N., Dietz, E., Anemana, S. D. and Bienzle, U. 2004. α+-thalassemia protects African children from severe malaria. Blood, 104(7), 2003-2006.

Moreira, R. K. 2007. Hepatic stellate cells and liver fibrosis. Archives of pathology & laboratory medicine, 131(11), pp. 1728-1734.

Myers, R. M., Maniatis, T. and Lerman, L.S. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. Methods in enzymology, 155(31), pp. 501-527.

Nardo-Marino, A., Brousse, V. and Rees, D. 2020. Emerging therapies in sickle cell disease. British journal of haematology, 190(2), pp. 149-172.

Needs T, Gonzalez-Mosquera LF, Lynch DT. Beta Thalassemia. [Updated 2021 Jul 18]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan-. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK531481/

Negri, D., Blasi, M., LaBranche, C., Parks, R., Balachandran, H., Lifton, M. and Cara, A. 2016. Immunization with an SIV-based IDLV expressing HIV-1 Env 1086 clade C elicits durable humoral and cellular responses in rhesus macaques. Molecular Therapy, 24(11), 2021-2032.

Old, J. M., Khan, S. N., Verma, I., Fucharoen, S., Kleanthous, M., Ioannou, P., Kotea, N., Fisher, C., Riazuddin, S., Saxena, R., Winichagoon, P., Kyriacou, K., Al-Quoba li, F. and Khan, B. 2001. A multi-center study in order to further define the molecular basis o f betathalassemia in Thailand , Pakistan, Sri Lanka, Mauritius, Syria, and India, and to develop a simple molecular diagnostic strategy by amplification refractorymutation system - polymerase chain reaction. Hemoglobin, 25, 397-407.

Origa, R. 2010. Beta-thalassemia-gene reviews. Orphanet Journal of Rare Diseases. 5(11).

Patton, K. T. 2015. Anatomy & Physiology 9th Edition Plus Brief Atlas & Quick Guide for Anatomy & Physiology 9th Edition. Elsevier Science Health Science.

Perkin, R. M., Newton, D. A. and Swift, J. D. (eds), 2008. Pediatric hospital medicine: textbook of inpatient management. Lippincott Williams & Wilkins.

Perutz, M. F., Rossmann, M. G., Cullis, A. F., Muirhead, H., Will, G. and North, A. C. T. 1960. November. Structure of hemoglobin. In Brookhaven Symp Biol. (Vol. 13, pp. 165-183)

Perutz, M. 1989. Mechanisms of cooperativity and allosteric regulation in proteins. Q. Rev. Biophys. 22: 139-237.

Piel, F. B., Steinberg, M. H. and Rees, D. C. 2017. Sickle cell disease. N Engl J Med. 376: 1561–1573.

Pinzani, M. and Marra, F. 2001. Cytokine receptors and signaling in hepatic stellate cells. In Seminars in liver disease (Vol. 21, No. 03, pp. 397-416). 2001 by Thieme Medical Publishers, Inc., 333 Seventh Avenue, New York, NY 10001, USA.

Po, T., Steger, G., Rosenbaum, V., Kaper, J. and Riesner, D. 1987. Double-stranded cucumovirus associated RNA 5: experimental analysis of necrogenic and non-necrogenic variants by temperature-gradient gel electrophoresis. Nucleic acids research, 15(13), pp. 5069-5083.

Pough, F. H., Janis, C. M. and Heiser, J. B. 2009. Vertebrate Life. Boston: Pearson Benjamin Cummings. San Francisco, 1.

Rai, P. and Malik, P. 2016. Gene therapy for hemoglobin disorders-a mini-review. Journal of rare diseases research & treatment, 1(2), 25.

Randhawa, Z. I., Jones, R. T. and Lie-Injo, L. E. 1984. Human hemoglobin Portland II (£2 β2). Isolation and characterization of Portland hemoglobin components and their constituent globin chains. Journal of Biological Chemistry, 259(11), 7325-7330.

Rhea, J. M. and Molinaro, R. 2014. Pathology consultation on HbA1c methods and interferences. American journal of clinical pathology, 141(1), 5-16.

Sabath, N., Ferrada, E., Barve, A. and Wagner, A. 2013. Growth temperature and genome size in bacteria are negatively correlated, suggesting genomic

streamlining during thermal adaptation. Genome biology and evolution, 5(5), pp. 966-977.

Sadelov, I. O., Bobrynina, V., Krasilnikova, M. and Smetanina, N. 2008. 1Federal scientific clinical center of pediatric hematology, oncology and immunology named after Dmitriy Rogachev, Moscow, Russian Federation Background: Hemoglobinopathies are heterogeneous group of diseases caused by qualitative (abnormal Hb) or quantitative (thalassemia) failure in. In 18TH CONGRESS OF THE EUROPEAN HEMATOLOGY ASSOCIATION STOCKHOLM, SWEDEN JUNE 13-16, 2013 (Vol. 93, No. s1, p. 699).

Satta, S., Perseu, L., Maccioni, L., Giagu, N. and Galanello, R. 2012. Delayed fetal hemoglobin switching in subjects with KLF1 gene mutation. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 48(1), 22-24.

Shawky, R. M. and Kamal, T. M. 2012. Thalassemia intermedia: An overview. Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 13(3), 245-255.

Sibley, C. G. and Ahlquist, J. E. 1984. The phylogeny of the hominoid primates, as indicated by DNA-DNA hybridization. Journal of molecular evolution, 20(1), pp. 2-15.

Songdej, D., Babbs, C. and Higgs, D. R. 2017. An international registry of survivors with Hb Bart's hydrops fetalis syndrome. Blood, 129(10), 1251-1259.

Steinberg, M. H. B. G., Forget, D. R., Higgs, and R. L. Nagel. 2001. Disorders of Hemoglobin. New York: Cambridge University Press.

Steinberg, M. H., Forget, B. G., Higgs, D. R. and Weatherall, D. J. 2009. Disorders of hemoglobin: genetics, pathophysiology, and clinical management. Cambridge University Press.

Svasti, S., Paksua, S., Nuchprayoon, I., Winichagoon, P. and Fucharoen, S. 2007. Characterization of a novel deletion causing (δβ) 0-thalassemia in a Thai family. American journal of hematology, 82(2), pp.155-161.Anderson LJ,

Wonke B, Prescott E, Holden S, Walker JM, Pennell DJ. Comparison of effects of oral deferiprone and subcutaneous desferrioxamine on myocardial iron concentrations and ventricular function in beta-thalassaemia. Lancet. 2002; 360: 516–20.

Taher, A. T., Musallam, K. M. and Cappellini, M. D. 2009. Thalassaemia intermedia: an update. Mediterranean journal of hematology and infectious diseases, 1(1).

Tanaka, R. and Tanaka, A. 2007. Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. Annu. Rev. Plant Biol., 58, 321-346.

Taylor, G. I. 1934. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, containing papers of a mathematical and physical character. The formation of emulsions in definable fields of flow, pp. 501-523.

Thong, M. K., Tan, J. A. M. A., Tan, K. L. and Yap, S. F. 2005. Characterisation of β-globin gene mutations in Malaysian children: A strategy for the control of β-thalassaemia in a developing country. Journal of tropical pediatrics, 51(6), 328-333.

Traivaree, C., Monsereenusorn, C., Rujkijyanont, P., Prasertsin, W. and Boonyawat, B. 2018. Genotype–phenotype correlation among beta-thalassemia and beta-thalassemia/HbE disease in Thai children: predictable clinical spectrum using genotypic analysis. Journal of blood medicine, 9, pp. 35.

Traxler, E. A., Yao, Y., Wang, Y. D., Woodard, K. J., Kurita, R., Nakamura, Y. and Weiss, M. J. 2016. A genome-editing strategy to treat β-hemoglobinopathies that recapitulates a mutation associated with a benign genetic condition. Nature medicine, 22(9), 987-990.

Turner, G. 1989. Using Mutant and Chemically Modified Hemoglobins to Probe the Molecular Mechanism of Cooperativity. Ph.D. thesis, The Johns Hopkins University

Unissa, B., Monica, S., Konakanchi, R., Darak, R., Sandagalla, L. K. and Saranya A. K. 2018. Thalassemia: A Review . Asian J. Pharm. Res. 8(3): 195-202.

Van der Dijs, F. P., Volmer, M., Van, G., Wiersma, D. G., Smit, J. W., Van, Veen, R. and Muskiet, F. A. 1999. Predictive value of cord blood hematological indices and hemoglobin Barts for the detection of heterozygous alpha-thalassemia-2 in an African-Caribbean population. Clinical Chemistry. 45(9): 1495–500.

Vento, S., Cainelli, F. and Cesario, F. 2006. Infections and thalassaemia. The Lancet InfectiousDiseases. 6(4): 226-33. PMID: 16554247

Vergin, C. 2008. Anormal Hemoglobinler. 5. Uluslararası Talasemi Yazokulu. Antalya-Türkiye, 2008:47-54.

Vichinsky, E. P 2013. Clinical manifestations of α-thalassemia. Cold Spring Harb Perspect Med. 3(5):a011742.

Vos, T., Barber, R. M., Bell, B., Bertozzi-Villa, A., Biryukov, S., Bolliger, I. and Brugha, T. S. 2015. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. The Lancet, 386(9995), 743-800.

Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R. M., Bhutta, Z. A., Carter, A. and Bell, M. L. 2016. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. The lancet, 388(10053), 1459-1544.

Weatherall, D. J. and Clegg, J. B. 2001. Inherited Haemoglobin Disorders: An Increasing Global Health Problem. Bulletin of the World Health Organization. a;79(8):704–12.

Weatherall, D. J. 2008. Hemoglobinopathies worldwide: present and future. Current molecular medicine, 8(7), 592-599.

Weatherall, D. J. and Clegg, J. B. 2008. The thalassaemia syndromes. John Wiley & Sons.

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

White, J. M. 1985. Thalassaemia genes in peninsular Arabs. British journal of haematology,60:269-78.

Yamsri, S., Sanchaisuriya, K., Fucharoen, G., Sae-Ung, N. and Fucharoen, S. 2011. Genotype and phenotype characterizations in a large cohort of β-thalassemia heterozygote with different forms of α-thalassemia in northeast Thailand. Blood Cells, Molecules, and Diseases, 47(2), pp., 120-124.

Yaprak I. Talasemi Tipleri ve Kliniği. 5. Uluslararası Talasemi Yazokulu. Antalya-Türkiye, 20-24 Ekim 2008: 43-46. Erişim: (http://globin.csu.edu.tr.) 2010. Erişim Tarihi: 23/08/2020.

Ye, L., Chang, J. C., Lin, C., Sun, X., Yu, J. and Kan, Y. W. 2009. Induced pluripotent stem cells offer new approach to therapy in thalassemia and sickle cell anemia and option in prenatal diagnosis in genetic diseases. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106(24), 9826-9830.

Yu, J., Vodyanik, M. A., Smuga-Otto, K., Antosiewicz-Bourget, J., Frane, J. L., Tian, S., Nie, J., Jonsdottir, G. A., Ruotti, V., Stewart, R., Slukvin, I. and Thomson, J. A. 2007. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. Science, 318(5858): 1917-1920.

Zhao, Y., Zhong, M. and Liu, Z. 2001. Rapid detection of the common α- thalassemia-2 determinants by PCR assay. Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi. 18(3): 216 8.

Zimmermann, M. B., Fucharoen, S., Winichagoon, P., Sirankapracha, P., Zeder, C., Gowachirapant, S., Judprasong, K., Tanno, T., Miller, J. L. and Hurrell, R. F. 2008. Iron metabolism in heterozygotes for hemoglobin E (HbE), α-thalassemia 1, or β-thalassemia and in compound heterozygotes for HbE/β-thalassemia. The American journal of clinical nutrition, 88(4), pp. 1026-1031.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : GHASSAN HAIKEL ABEDALLAH ALMOSA

Yabancı Dili : Arapça ve İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Soq Alşoyok (2008 - 2009)

Lisans : Üniversite Mazaya Kolej (2014-2015)

Yüksek Lisans: Çankırı Karatekin Üniversitesi (2019-2021)