

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

BETA TALASEMİ MAJÖR HASTALARINDA
MODİFİYE EDİCİ SALL2 GENİ BAĞLANMA
MOTİFİNDE MUTASYON TARANMASI

Tuğba KARAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017-ANTALYA

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

BETA TALASEMİ MAJÖR HASTALARINDA
MODİFİYE EDİCİ SALL2 GENİ BAĞLANMA
MOTİFİNDE MUTASYON TARANMASI

Tuğba KARAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. İbrahim KESER

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2016-1232 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu alışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Tıbbi Genetik Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 19/06/2017

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. İbrahim KESER
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Sibel BERKER KARAÜZÜM
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Türker BİLGİN
Namık Kemal Üniversitesi

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

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

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

Arş. Gör. Tuğba KARAMAN

İmza

Prof.Dr. İbrahim KESER

İmza

TEŐEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim ve tez çalışmam sırasında gösterdiği ilgi ve bilimsel bakış açısı kazanabilmem için verdiği emekleri nedeniyle danışman hocam Prof.Dr.İbrahim KESER'e,

Çalışmama katılan tüm hastalara ve ailelerine gösterdikleri özveriden dolayı, hastaların klinik değerlendirmesini yapan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Hematoloji Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof.Dr. Erdal KURTOĞLU'na, ilgi ve yardımlarından dolayı kıymetli çalışma arkadaşları Hemşire Banu TÜRKMEN'e , sekreteri Melike AKYİĞİT'e,

Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'ndaki tüm hocalarıma, Sağlık Bilimleri Enstitüsü çalışanlarına, Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi Sorumlusu Doç.Dr. Özden ALTIOK CLARK'a ve tüm çalışanlarına, tezim süresince bilgilerinden faydalandığım Dr. Yunus ARIKAN'a, çalışmalarımda desteği olan asistan arkadaşlarım Asef MOBALLEGH ve Vildan ÇİFTÇİ'ye,

Maddi manevi desteğini hiç bir zaman esirgemeyen ve beni güçlü yapan, güvende hissettiren değerli annem Mümine KARAMAN'a ve abim Oğuzhan KARAMAN'a,

Başarıya ulaşmamda her daim yol gösterici olan, her zaman yanımda hissettiğim ve üzerimde emeği olan saygıdeğer ilkokul öğretmenim Fatma ÖZTEPE'ye,

Tezim süresince her türlü yardımda bulunan ve gösterdiği anlayış için sevgili nişanlım Tanju MERCAN'a teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Tezimizin amacı; beta talasemi majör (β -TM) hastalarında kromatin remodelingini ve HbF düzeyini etkileyen modifiye edici *SALL2* geni bağlanma motiflerindeki mutasyonları taramaktır.

Yöntem: Projemiz, Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Adem Tolunay Talasemi ve Kan Hastalıkları Merkezi'ne başvuran, β -TM tanısı konulan, beta-globin gen mutasyonları tanımlanmış 100 hastada planlandı. HbF'i normal 10, HbF'i yüksek olan 66, toplam 76 hastada gerçekleştirildi. Periferik kandan genomik DNA izolasyonunu takiben, *SALL2* geni bağlanma motifine özgün primer çiftleri kullanılarak, PZR yöntemiyle ilgili gen bölgeleri çoğaltıldı. Sanger dizileme yöntemi ile mutasyonlar tarandı. Elde edilen sonuçlar NCBI (National Center for Biotechnology Information) veritabanına göre analiz edildi.

Bulgular: Çalışılan β -TM 76 hastanın 32'si erkek, 44'ü kadındı. HbF'i yüksek olan hastaların ortalama HbF düzeyleri 10.1 gr/dl idi. Üç PZR ampliconu olarak çalışılan ve HbF'i modifiye eden *SALL2* geninde, D1 ve D3 domainlerde (motiflerinde) mutasyon bulunmazken, ikinci domainde (D2) rs61746515 (C>T) g.18721G>A (Gly744=) değişimi; 63(%95.46) hastada GG, 3(%4.54) hastada GA (g.18725C>G p.Gly 746Arg), tespit edildi. rs1263810 (g.18725C>G, p.Gly 746Arg) varyasyonlu toplam 66 hastada; CC, CG, GG genotipleri sırasıyla %9,09, %51,51 ve %39,39 sıklıkta bulundu.

Sonuç: Çalışmamızda, Türk toplumunda ve dünyada HbF'i yüksek olan β -TM hastalarında ilk defa ve DNA dizileme ile tespit edilen *SALL2* geni bağlanma motifinde rs1263810 (C>G) (Gly746Arg) varyasyonu gösterildi. Amino asit değişimine neden olan bu varyasyonun HbF'in düzenlenmesinde ve *SALL2*'in kromatin remodelinginde önemli olabileceğini, HbF indüksiyonunda diğer transkripsiyon faktörleri *KLF1*, *BCL11A* ile birlikte incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: Talasemi majör, HbF, Modifiye edici gen, *SALL2*

ABSTRACT

Objective: The aim of our thesis is to detect mutations in the domains and the *SALL2* genetic binding motifs of modifying effect on chromatin remodeling and affecting HbF levels in beta thalassemia major patients(β -TM).

Method: Our project was planned with 100 patients from Antalya Education and Research Hospital Adem Tolunay Thalassemia and Blood Disease Center, diagnosed with β -TM, defined as beta-globin gene mutations. Our project was carried out in a total of 76 patients; 10 and 66 of them have normal and high HbF, respectively. Following isolation of peripheral blood genomic DNA, gene regions related to the PCR method were amplified using primer pairs specific to the *SALL2* gene binding motifs. Mutations were screened by Sanger Sequencing. The results were analyzed according to the NCBI database.

Results: Of 76 patients with β -TM, 32 and 44 were males and females, respectively. The mean HbF levels of the patients as found to be 10.1 gr/dl. While in the second domain(2D) (D2), rs61746515 (C>T) g.18721G>A (Gly744=) was found as GG in 63(95.46%) patients and GA 3(4.54%) patients and rs1263810 (C>G) (g.18725C>G p.Gly746Arg) variations was found that this variation, g.18725C>G, as CC, CG and GG genotypes were found in 6(9,09%), 34(51,51%) and 26(39,39%) in the 66 patients. Mutations were not found in the first(D1) and third(D3) domains in the *SALL2* gene, which worked as three PCR amplicons and modified HbF.

Conclusion: We concluded that rs1263810 (C> G) variant (Gly746Arg) in the *SALL2* gene binding motif detected by DNA sequencing for the first time in β -TM patients with high HbF in Turkish population may be important in the regulation of HbF and chromatin remodeling of *SALL2*. In the studies of HbF induction, *SALL2* should be examined together with other transcription factors such as *KLF1* and *BCL11A*.

Key words: Thalassemia major, HbF, Modifier gene, *SALL2*

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kanın yapısı ve Özellikleri	3
2.1.1. Kan Hücreleri	3
2.2. Hemoglobin Yapısı ve Özellikleri	4
2.2.1. Gelişim Sürecine Bağlı Olarak Hemoglobin Çeşitleri	5
2.3. Beta Globin ve Alfa Globin Genomik Yerleşimi	6
2.3.1. Beta Globin Gen Kümesinin Kontrolü	6
2.4. Hemoglobinopatiler	7
2.4.1. Talasemiler	8
2.4.2. Alfa Talasemi	8
2.4.3. Beta Talasemi	8
2.5. Modifiye Edici Genler	11
2.5.1. HbF İndüksiyonu Sağlayan Modifiye Edici Genler	12
2.5.2. <i>SALL</i> Gen Ailesi	13
2.5.3. <i>SALL2</i> Geni	13
3. GEREÇ ve YÖNTEM	17
3.1. Hasta Seçimi	17
3.2. Periferik Kandan Genomik DNA İzolasyonu	17
3.2.1. Kit ile Genomik DNA İzolasyonu	17
3.2.2 Tuzla Çöktürme Yöntemi ile Genomik DNA İzolasyonu	18
3.3. DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü	20
3.4. PZR Yöntemiyle <i>SALL2</i> Geni Bağlanma Motiflerinin Çoğaltılması	20
3.5. Agaroz Jel Hazırlanması	24

3.6. Elektroforez	25
3.7. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi	26
3.7.1. Exosap uygulaması ile PZR Ürünlerinin Temizlenmesi	26
3.7.2. Kit ile PZR Ürünlerinin Temizlenmesi	26
3.8. Sanger Dizileme Reaksiyonu	27
3.9. Sephadex ile Dizileme Reaksiyonu Ürünlerinin Temizlenmesi	27
3.10. Dizilerin Analizi	28
3.11. Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi	28
4. BULGULAR	29
4.1. Hastalara ait Demografik ve Hematolojik Bulgular	29
4.2. Hastaların <i>HBB</i> Geni Analiz Sonuçları	33
4.3. <i>SALL2</i> Geni Bağlanma Motifi Bölgesinin Mutasyon Tarama Sonuçları	34
4.4. <i>SALL2</i> Geni D2 Bölgesi Mutasyon Taraması Sonuçları	34
5. TARTIŞMA	38
5.1. <i>SALL2</i> Geni D1 Bölgesi Mutasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	40
5.2. <i>SALL2</i> Geni D2 Bölgesi Mutasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	40
5.3. <i>SALL2</i> Geni D3 Bölgesi Mutasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi	43
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	45
KAYNAKLAR	47
EKLER	54
EK-1. Aydınlatılmış Onam Formu	
ÖZGEÇMİŞ	58

TABLolar DİZİNİ

Tablo	Sayfa
3.1. <i>SALL2</i> bağlanma motifinin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan Primer Dizileri	22
3.2. PZR ile çoğaltılan <i>SALL2</i> geni 2. ekzon bölgelerin ampikon uzunlukları ve primerlerin bağlanma sıcaklıkları	22
3.3. PZR amplifikasyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları	23
3.4. DNA dizileme reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları	27
4.1. β -TM'li 66 hastanın hematolojik parametreleri ile <i>HBB</i> ve <i>SALL2</i> genlerin analizi	30
4.2. Kontrol grubu β -TM'li 10 hastanın hematolojik parametreleri ile <i>HBB</i> ve <i>SALL2</i> genlerin analizi	32
4.3. Tanımlanan beta globin mutasyonlarının tipi, alelik sıklığı ve genotipleri	33

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
2.1. Hemoglobin molekülünün yapısı	5
2.2. Embriyonik sürece bağlı olarak değişen globin zincirleri	6
2.3. A)Beta gen kümesi B)Alfa gen kümesi	6
2.4. İnsan β -globin lokusu	7
2.5. A) <i>SALL2</i> geni ekzonları E1, E1A, E2 ve alternatif promotorları P1 ve P2 B) <i>SALL2</i> iki protein izoformları <i>SALL2</i> E1 ve <i>SALL2</i> E1A	14
2.6. <i>BCLL11A</i> 'nın γ -globin geni ekspresyonunu baskılama mekanizması	16
3.6. <i>SALL2</i> geni ekzon görüntüsü	21
3.7. <i>SALL2</i> proteinine ait aminoasit dizisi ve <i>SALL2</i> proteini bağlanma motifleri	21
4.1. 66 β -TM hastanın beta globin mutasyonlarına bağlı görülen genotipleri ve yüzdesel olarak görülme sıklığı	34
4.2. 35 numaralı hastanın <i>SALL2</i> geni 2. Ekzon D2 bölgesinin ileri dizisi	35
4.3. 62 numaralı hastanın <i>SALL2</i> geni 2. Ekzon D2 bölgesinin ileri dizisi	35
4.4. 54 numaralı hastanın <i>SALL2</i> geni 2. Ekzon D2 bölgesinin ileri dizisi	35
4.5. 2 numaralı hastanın <i>SALL2</i> geni 2. Ekzon D2 bölgesinin ileri dizisi	36
4.6. 2 numaralı hastanın <i>SALL2</i> geni 2. Ekzon D2 bölgesinin geri dizisi	36
4.7. 37 numaralı hastanın <i>SALL2</i> geni 2. Ekzon D2 bölgesinin ileri dizisi	36
4.8. 41 numaralı hastanın <i>SALL2</i> geni 2. Ekzon D2 bölgesinin ileri dizisi	37

SİMGELER ve KISALTMALAR

a.a	: Aminoasit
APOE	: Apolipoprotein ϵ 4
BCL11A	: B Hücreli Lenfoma 11 A Proteini
bp	: Baz Çifti
β-TI	: Beta Talasemi İntermedia
β-TM	: Beta Talasemi Majör
CHD3/4	: Kromodomain Helikaz DNA Bağlanma Proteini 3/4
c-Myb	: Protoonkogen, Transkripsiyon Faktör
COL1A1	:Kollagen, Tip1, Alfa1
COL1A2	:Kollagen tip1, Alfa2
D1	:Domain 1
D2	:Domain 2
D3	: Domain 3
DNMT	: DNA Metil Transferaz
E	: Glutamik Asit Amino Asidi
E1	: Ekzon 1
E1A	: Ekzon 1A
FOG1	: Çinko Parmak Protein 1
GATA1	: Eritroid Transkripsiyon Faktör 1
Glu	:Glutamik Asit
Hb	: Hemoglobin
HbA1	: Erişkin Hemoglobini 1
HbA2	: Erişkin Hemoglobini 2
HbF	: Fetal Hemoglobin
HDAC1	: Histon Deasetilaz 1
HDAC2	: Histon Deasetilaz 2
HFE	: Hemokromatozis
HMIPEP	: İnsan Mitokondri İntermedia Peptidaz Enzimi
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HS	: Hipersensitif Bölge
HU	: Hidroksiüre

K	: Lizin Amino Asidi
Kb	: Kilobaz
KLF1	: Krüppel Benzeri Faktör 1
LCR	: Lokus Kontrol Bölgesi
M	: Metiyonin Amino Asidi
MBD2	: Metil-CpG Bağlayıcı Domain Proteini 2
MCH	: Ortalama Eritrosit Hemoglobini
MCHC	: Ortalama Eritrosit Hemoglobin Konsantrasyonu
MCV	: Ortalama Eritrosit Hacmi
NES	: Nükleer Çıkış Dizisi
NLS	: Nükleer Lokalizasyon Dizisi
P	: Prolin Amino Asidi
P1	: Promotor 1
P2	: Promotor 2
Q	: Glutamin Amino Asidi
q	: Kromozomun Uzun Kolu
QTL	:Kuantitatif Trait Lokus
R	: Arjinin Amino Asidi
RDW	: Eritrosit Dağılım Genişliği
S	: Serin Amino Asidi
SALL2	: Spalt Like Transkripsiyon Faktörü
SNP	: Tek Nükleotid Değişimi
SOX6	: SRY(cinsiyet belirlenmesi Y bölgesi)-Box6
TGFB1	:Transforming Growth Factor Beta1
UGT1A1	:UDP Glukuronil Transferaz-1 Ailesi, Poliipeptid A1
Val	:Valin Amino Asidi
VDR	:Vitamin D Reseptörü
Xmn1-HBG2	: Gama Globin Geninde <i>Xmn1</i> Polimorfizmi
XmnI	: <i>Xanthomonas manihotis</i> 1'den İzole Restriksiyon Enzimi

GİRİŞ

Beta(β) talasemi hemoglobinopatilerden olup, dünya çapında en yaygın görülen, otozomal resesif kalıtılan tek gen hastalıklarından biridir (Weatherall ve Clegg, 2001). Erişkin hemoglobin yapısında iki alfa ve iki beta globin zincirleri yer alır. İki beta zincirinin az sentezlenmesi (β^+) ya da hiç (β^0) sentezlenmemesi durumu beta talasemiye neden olmaktadır (Cao ve Galanello, 2010). Beta zincir sentezindeki dengesizlik stabil olmayan kan hücresi oluşumuna ve hemolitik anemiye yol açar (Abolhasani Foroughi ve ark., 2015) .

Beta talasemide; hastalığın klinik bulgularının geniş yelpazede olması, farklı fenotipik grupları ortaya çıkarır. Bu klinik farklılıklar, genellikle hastalığın asemptomik formu olan beta talasemi minörden ciddi formu olan transfüzyon bağımlısı beta talasemi majöre (β -TM) kadar fenotipleri içermektedir. Bu fenotipler; beta talasemi minör, beta talasemi intermedia (β -TI) ve beta talasemi majör (β -TM) olarak sınıflandırılırlar. Bu klinik sınıflandırma, beta globin geni mutasyonlarının homozigot ya da bileşik (compound) heterozigot formlarından kaynaklanır.

Beta talasemi minör klinik olarak normal fenotipte olup bazı bulgular var ama hastalıktan etkilenmezler, taşıyıcı konumdadırlar. β -TI ise, beta talasemi minör ve β -TM arasında klinik fenotipe dayanan hastalığın bir formudur. Genellikle β -TM kliniğine kıyasla hafif klinik ve ciddi hemolitik anemi olur. β -TI, transfüzyon bağımsız talasemi formu olmasına rağmen, bazı hastalar ara sıra kan transfüzyonuna ihtiyaç duyar. Onlar da β -TM gibi yaşam kalitesini arttırabilmek için dikkatli tıbbi müdahaleye gerek duyarlar (Taher ve ark., 2010; Taher ve ark., 2011; Karimi ve ark., 2014).

Beta talaseminin β -TM fenotipinde ise genellikle yaşamın ilk yıllarında ciddi hemolitik anemi görülür. Bu bireyler hasta bireyler olup, düzenli kan transfüzyonu, demir şelasyonu ve dikkatli tıbbi müdahale gerektirirler (Karimi ve ark., 2014).

Aynı mutasyon tipine sahip olan beta talasemi majör hastalarında, hematolojik parametreler, klinik şiddet ve hastalığın seyri farklılık göstermektedir. Bu klinik seyir, hemen hemen asemptomik bulgular ile yaşamı tehdit edici durumlar arasında değişmektedir (Somervaille, 2001). Bu klinik çeşitlilik, hastalıktan sorumlu genler

üzerine etkili olan, genomdaki diğer modifiye edici (modifier) genlerden kaynaklanmaktadır (Lettre, 2012; Liu ve ark., 2014; Thein, 2013).

Artan HbF seviyesi ve eşlik eden α -talasemi, β -talaseminin klinik ve hematolojik şiddetini değiştirebilen iki ana modifiye edici parametredir (Galanello ve ark., 2009; Higgs ve ark., 2012 ; Thein, 2013).

Günümüzde yapılan araştırmalarla, HbF seviyesini etkileyen birincil modifiye edici genlere yeni aday genler ilave edilmektedir.

Sheehan, Crosby ve arkadaşlarının (2014) beta-globin zincirinde kodon 6 (GAG>GTG)'daki A-T mutasyonu sonucu oluşan HbS varyantı ile karakterize orak hücre anemili (OHA) hastalarda tüm ekzon taramasında, *SALL2* (*spalt like transcription factor*) genindeki *P840R* varyantına sahip hastalarda, hidroksiüre (HU)'ye yanıt olarak HbF seviyesindeki değişimin arttığı gösterilmiştir (Sheehan ve ark., 2014). Bu nedenle *SALL2* geni, yeni bir modifiye edici gen olarak tanımlanmıştır. *SALL2* modifiye edici geni, bugüne kadar beta talasemi majör hastalarında araştırılmamıştır.

Bu araştırmamızda farklı HbF düzeyine sahip beta talasemi majör hastalarında *SALL2* geninin modifiye edici özelliği ve HbF düzeyi ile ilişkisini göstermek için *SALL2* geni bağlanma motifinde mutasyon taranması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kanın Yapısı ve Özellikleri

Kan; çeşitli hücrelerden(lökosit, eritrosit, trombosit) ve akışkan sıvı plazmadan oluşup damar ağı içerisinde dolaşan kırmızı renkli sıvı bir dokudur. Normal erişkin bireyin vücut ağırlığının ortalama 1/13'ünü oluşturmaktadır.

Kan dokusunu oluşturan plazma kan hacminin %55'ini kan hücreleri ise kan hacminin %45'ini oluşturmaktadır. Plazma içerisinde su, organik ve inorganik maddeler yer alır. Kan hücreleri ise eritrositler, lökositler, trombositlerden oluşmaktadır.

Kanın ana görevleri; oksijen ve karbondioksit gazları, hormonlar, metabolik ürün atıkları, inorganik ve organik maddelerin doku ve organlara taşınmasını gerçekleştirmek, sahip olduğu kan hücrelerinden lökositler aracılığıyla vücut savunma sistemine yardımcı olmak ve kemik iliği ile birlikte vücut homeostazını sağlamaktır.

2.1.1. Kan Hücreleri

Kan hücreleri kemik iliğinde bulunan pluripotent kök hücrelerin bölünüp çoğalması ve farklılaşması ile oluşur. Köken aldıkları pluripotent kök hücrelerinden iki majör öncü hücre grupları oluşur. Birinci öncü hücre grubu lenfoid kök hücre (T ve B lenfositler), ikinci öncü hücre grubu myeloid kök hücre (eritrositler, monositler, granülositler, trombositler)'dir.

Lökositler

Beyaz kan hücreleri (akyuvarlar) de denilmektedir. Vücut savunma sisteminde görevlidir. Bunlar çekirdekli olup hücresel organellere sahiptirler. Sağlıklı bir bireyin 1mm³ kanında yaklaşık 7000 lökosit bulunur. Lökositlerin en önemlileri; granülositler, lenfositler, monositlerdir. Lökositlerin en fazlasını granülositler en azını monositler oluşturur. Lökositler köken aldıkları öncü hücre gruplarına bağlı olarak lenfoid ve myeloid kök hücre kaynaklıdır. Granülositler ve monositler myeloid kök hücre kaynaklı, lenfositler lenfoid kök hücre kaynaklıdır. Granülositler ve monositler insan postnatal yaşamında kemik iliğinde üretilirken, lenfositler kemik iliği ve timusta üretilmektedir.

Trombositler

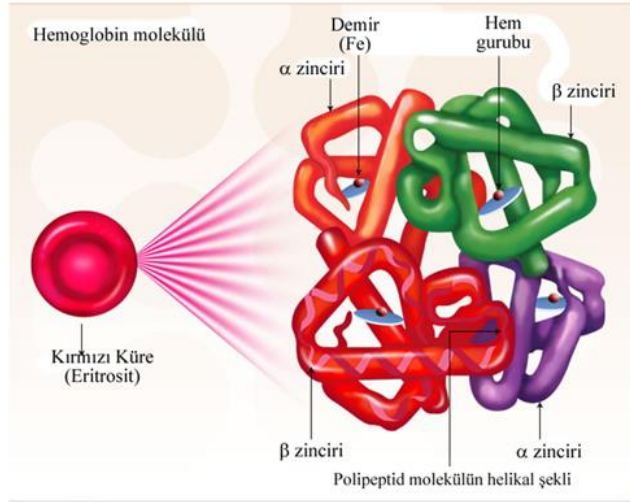
Kan hücrelerinin en küçük hücreleridir. Sağlıklı bir bireyin 1mm^3 kanında 150-300bin civarında trombosit bulunur. Ömürleri yaklaşık 7-10 gündür. Kan damarlarını çevreleyen endotel hücrelerinde herhangi bir hasar ya da yaralanma gerçekleştiğinde trombositler bu hasarlı/yaralı bölgeye giderek trombosit tıkaçı oluştururlar.

Eritrositler

Cinsiyete bağlı olarak erişkin erkeklerin 1mm^3 kanında 4,5-6 milyon, erişkin kadınların 1mm^3 kanında 4-5 milyon civarında eritrosit bulunmaktadır. Kemik iliğinde üretilirler. Kemik iliğinde üretildikten sonra periferik kana geçerek çekirdek ve bazı organellerini kaybederek olgunlaşırlar. Olgun eritrositlerin çekirdekleri ve diğer hücrel organelleri bulunmamaktadır. Ortalama ömürleri 120 gündür. Eritrositlere kırmızı rengi veren sahip oldukları hemoglobin molekülüdür. Hemoglobin molekülü aracılığıyla solunum gazlarının taşınması gerçekleşir. Eritrositlerin sitoplazmasında %97 oranında hemoglobin bulunur. Hemoglobin eritrositlerin mekanik özelliklerinin belirlenmesinde elzem bir faktördür. Eritrosit hemoglobin konsantrasyonundaki (MCHC) artış eritrosit şeklinin değişmesine neden olur.

2.2. Hemoglobin Yapısı ve Özellikleri

Hemoglobin(Hb); yüksek organizmaların optimal oksijen homeostazı ve asidik metabolik atık ürünlerin tamponlanması için gerekli olan ve alyuvar hücrelerinde bulunan tetramerik proteindir. Erişkin hemoglobinin yapısı incelendiğinde 2 alfa ve 2 beta globin zincirleri olmak üzere dört alt birim olan protein kısmı, demir elementi içeren bir prostetik grup “hem” bulundurur. Her bir globin alt birimi, proteinin dış yüzeyi üzerinde bulunan hem (ferroprotoporfirin IX) ile kararlı bir bağ oluşturur. Hem demir elementi içerip hemoglobinin prostetik grubunu oluşturur (Şekil 2.1). Kırmızı kan hücrelerinin sitosolündeki oksijen, hem'deki demir atomlarına geri dönüşümlü bir şekilde bağlanabilir. Ayrıca, hem'in girdiği hidrofobik yarı Fe⁺² hem'e demirinin oksidasyona karşı oksijen bağlayamayan Fe⁺³e karşı koruyabildiğini göstermiştir (Forget ve Bunn, 2013).

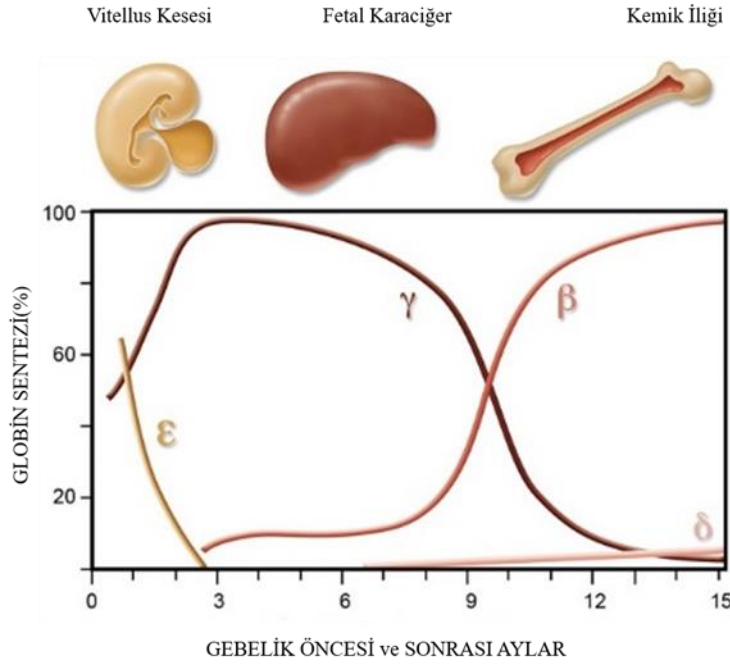


Şekil 2.1. Hemoglobin molekülünün yapısı (<http://www.hemoglobinopatiler.com>, Erişim Tarihi: 23Mart 2017)

2.2.1. Gelişim Sürecine Bağlı Olarak Hemoglobin Çeşitleri

İnsanın gelişim süresince, globin gen ekspresyonları genetik kontrol altında gerçekleşir. β globin gen kümesindeki genlerin ekspresyonu için iki anahtar eşlik eder. Bu anahtarlardan birincisi erken gestasyonel dönemde, embriyonik globinden fetal globin sentezini, ikincisi doğuma yakın dönemde fetal globinden erişkin globin sentezinin gerçekleşmesini kontrol eder (Bauer ve ark., 2012)(Şekil 2.2).

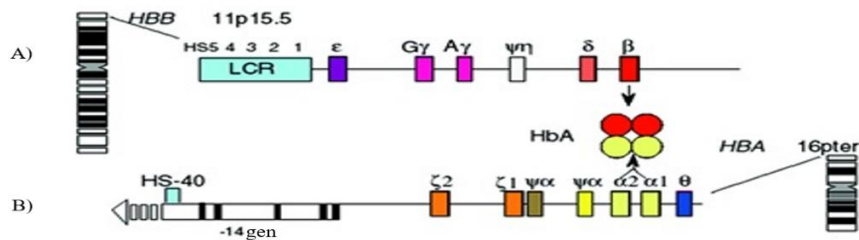
İntrauterin dönemin ilk 8 haftasında yapılan hemoglobine embriyonel hemoglobin [$Gower1(\zeta_2\varepsilon_2)$, $Gower-2(\alpha_2\varepsilon_2)$ ve $Portland(\zeta_2\gamma_2)$] denir. Dokuzuncu haftasından sonra baskın hemoglobin, fetal hemoglobin [$HbF(\alpha_2\gamma_2)$]dir. Doğumdan sonra HbF miktarı giderek azalır ve 1 yaşından sonra da %2'nin altına iner. Erişkin hemoglobin $HbA1(\alpha_2\beta_2)$; fetal hayatın 1. ayından sonra görülmeye başlar ve doğumda toplam hemoglobinin %30'unu, doğumdan 2 ay sonra %50'sini ve 6. aydan sonra yaklaşık %95'ini oluşturur. $HbA2(\alpha_2\delta_2)$ ise doğumdan hemen sonra görülmeye başlar ve %1,5-3,5 gibi düşük seviyede yaşam boyu devam eder. Erişkinlerde hemoglobinin %95'ini $HbA1(\alpha_2\beta_2)$, %2-3'ünü $HbA2(\alpha_2\delta_2)$ ve %1'den azını $HbF(\alpha_2\gamma_2)$ oluşturur (Higgs ve ark., 2012)(Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Embriyonik süreçte değişen globin zincirleri (Bauer ve ark., 2012). Orjinal şekilden modifiye edilmiştir.

2.3. Beta Globin ve Alfa Globin Genlerinin Genomik Yerleşimi

Hemoglobin; gelişim sürecine bağlı olarak, farklı globin zincirleri içeren moleküler bir düzenlenme gösterir. Bu düzenlenme farklı iki gen kümesinin globin zincirlerini içerir. Bunlardan birinci gen kümesi α gen kümesi olup, 16 numaralı kromozomun 16p13.3 bölgesinde bulunmakta ve embriyonik ζ gen, erişkin α1 ve α2 genlerini içermektedir. İkinci gen kümesi ise β gen kümesidir. 11 numaralı kromozomun 11p15.5 bölgesinde yerleşmektedir. β gen kümesi embriyonik ε, fetal G_γ ve A_γ, erişkin δ ve β genlerini içerir (Şekil 2.3)



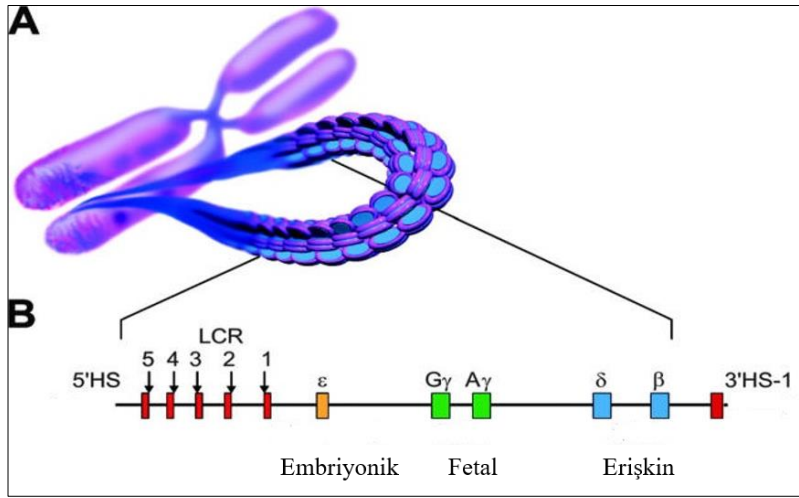
Şekil 2.3. A) Beta gen kümesi B) Alfa gen kümesi (Cao ve Galanello, 2010). Orjinal şekilden modifiye edilmiştir.

2.3.1. Beta Globin Gen Kümesinin Kontrolü

Beta globin lokusunun transkripsiyonu “cis-acting” ve “trans-acting” faktörlerin etkileşimleri ile gerçekleşir. Cis-acting faktörler, βLCR(Locus Control Region)

üzerinde ekilidir. Trans-acting faktörler ise; transkripsiyon faktörleri ve kromatin yeniden düzenlenme aktivitesi üzerinde etkilidir.

β globin LCR; β globin dizisinin 5' ucunda yer alır. Normal seviyede globin geni transkripsiyonun gerçekleşmesini sağlar. 5' uçta bulunan LCR 5 tane Dnaz hypersensitive(HS) bölgeye sahiptir. HS bölgeler nukleozom oluşumundan kaçarlar. Dolayısıyla kromatin yapıda bu HS bölgeler transkripsiyon faktörlerinin etkileşime girebilmesini sağlar. Ayrıca β globin gen dizisinin 3' ucunda bir tane HS bölgesi vardır(Şekil 2.4) (Levings ve Bungert, 2002).



Şekil 2.4. İnsan β -globin lokusu A) 11 numaralı kromozom üzerindeki β -globin lokusu kromatin içinde paketlenmiş B) β -globin grubu LCR ve hypersensitive(HS) bölgelerin linear haritalanması (Bank, 2006) Orjinal şeklinden modifiye edilmiştir.

2.4. Hemoglobinopatiler

Yaşamsal öneme sahip olan kanın önemli kısmını eritrositler, eritrositlerin önemli bir kısmını ise hemoglobin molekülleri oluşturmaktadır. Hemoglobinin yapısında bulunan globin zincirlerinin, dolayısıyla hemoglobinin düzensizlikleri genelde hemoglobinopatiler olarak isimlendirilirler. Hemoglobinopatiler, dünyada en sık görülen hastalık grubunu oluşturmaktadırlar ve dünya popülasyonunun yaklaşık %7'si bir globin gen mutasyonu taşıyıcısıdır (Weatherall ve Clegg, 2001). Birçok ülkede kontrol altına alınan hemoglobinopatiler, dünyanın ve ülkemizin en önemli sağlık sorunu olarak yerini korumaya devam etmektedir. Hemoglobinopatiler tek gen hastalıkları olmasına karşın, geniş klinik ve hematolojik varyasyon ile karakterizedirler. Hemoglobinopatilerdeki bu varyasyonun temelinde de hemoglobini oluşturan farklı globin zincirlerinin genetik varyasyonları yatmaktadır. Hemoglobinopatiler, dünyada en sık görülen hastalıklardan olup, belli coğrafik

bölgelerde sık görülmektedir. Globin zincir sentezlerinin yokluğu veya azalması ile karakterize olan hemoglobinopatiler, genellikle iki grup altında; talasemiler ve yapısal hemoglobin varyantları (anormal hemoglobinler) olarak sınıflandırılırlar (Kohne, 2011).

2.4.1. Talasemiler

Talasemilerin en iyi tanımlanan tipleri; α , β , γ , δ , $\delta\beta$ ve $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemilerdir (Kohne, 2011). Sık görülen talasemiler alfa ve beta globin zincir sentezi dengesizliği ve anemi gibi belirgin özelliklere sahip olan alfa ve beta talasemilerdir. Talasemi ile ilişkili 400'den fazla mutasyon tanımlanmıştır. En yaygın iki talasemi sendromu ise alfa ve beta talasemiler şeklindedir. Sadece alfa ve beta globin zincirlerine bağlı varyasyonun temelinde, 1650'den fazla farklı mutasyon yatmaktadır (Weatherall ve Clegg, 2001; Williams ve Weatherall, 2012).

2.4.2. Alfa Talasemi

Hemoglobin molekülünün yapısında bulunan alfa globin zincir sentezindeki azalma sonucu alfa talasemiler meydana gelmektedir. Alfa globin zincirleri, 16 nolu kromozomun kısa kolunda, 16p13.3'de yer alan ($5'$ - ζ - $\psi\alpha 2$ - $\psi\alpha 1$ - $\alpha 2$ - $\alpha 1$ - θ - $3'$) $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ genleri tarafından sentezlenmektedir. Her alelde iki alfa globin geni olmak üzere bir insanda toplam dört tane alfa globin geni ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) bulunmaktadır. Alfa globin zincir sentezinin yeterli olmaması durumunda yüksek oksijen affinitesine sahip β_4 ve γ_4 homotetramerleri oluşur. Homotetramerler etkisiz oksijen taşıyıcılarıdır. β_4 ve γ_4 oksitlendiğinde çöker. Eritrosit membran yapısını bozarak eritrosit hücresinin yaşamını kısaltır.

2.4.3. Beta Talasemi

Beta talasemi, genomda 11 numaralı kromozomun 11p15.5 bölgesinde yerleşen ve bireyde iki kopya gen ile karakterize sıklıkla nokta mutasyonlarla ortaya çıkan, taşıyıcı, intermedia ve majör fenotipi ile klinik yansıması en sık görülen hemoglobinopatilerden biridir. Hemoglobinopatiler daha çok talasemilerle anılmakta, sistemik hastalık olmaları nedeniyle de birçok genin işleyiş biçimi etkilenmekte ve birçok gen de klinik gidişatı ve işleyişi modifiye edebilmekte, hastalığın fenotipini değiştirebilmektedir (Harteveld ve Higgs, 2010; Higgs, 2013). Beta globin zincir sentezinin yeterli olmaması durumunda eşleşmemiş alfa globin zincirleri çöker. Bu çökme eritroid öncüllerin olgunlaşmasını bozar ve etkisiz eritropoeze neden olur.

Kemiklerde ve diğerk organlarda yayılmış hematopoez ile anemi ve eritroid öncüllerin genişlemesi meydana gelir.

Beta Talasemi Epidemiyolojisi

Beta(β) talasemi hemoglobino patilerden olup, dünya çapında en yaygın görülen, otozomal resesif kalıtılan tek gen hastalıklarından biridir. Akdeniz, Orta Doğu, Transkafkasya, Orta Asya, Hint Altı kıtası ve Uzak Doğu populusyonlarında yüksek prevalans gösterir. Ayrıca nispeten Afrika kökenli populusyonda sık görülür. En fazla insidans Kıbrıs'ta (% 14), İtalya Sardinya Adası'nda (% 12) ve Güney Doğu Asya'da bildirilmektedir (Weatherall ve Clegg, 2001). Bu bölgelerdeki beta talaseminin yüksek gen sıklığı, *Plasmodium falciparum* malaria(sıtma) sonucu gelişen seçilim baskısı ile ilişkilidir. Mevcut ya da geçmiş sıtma endemisine oldukça benzer şekilde dağılım gösterir (Flint ve ark., 1998). Beta talasemi taşıyıcıları *Plasmodium falciparum*'un işgaline karşı nispeten korunmaktadır. Bununla birlikte, populusyon göçü ve sınırlı ölçüde köle ticareti nedeniyle beta-talasemi Kuzey Avrupa, Kuzey ve Güney Amerika, Karayipler ve Avustralya'da da yaygın olarak görülmektedir (Weatherall ve Clegg, 2001)

Beta Talasemi Kliniğı

Erişkin hemoglobin yapısında yer alan iki alfa ve iki beta globin zincirlerinin az (β^+) ya da hiç (β^0) sentezlenmemesi durumu beta talasemiye neden olmaktadır (Cao ve Galanello, 2010). Beta talaseminin klinik şiddeti, alfa globin ve alfa olmayan globin zincirleri arasındaki dengesizliğin boyutuyla ilgilidir. Alfa olmayan globin zincirleri, beta globin zincirlerine ek olarak, HbF($\alpha_2\gamma_2$) spesifik bir komponenti olan gama zincirlerini de içerir ve normal bireylerde az miktarda bulunur. Beta talasemi hastası bireylerde HbF değeri yüzde(%) olarak göreceli artmış ancak değışken miktarda bulunmaktadır. Alyuvar hücresi öncüleri içerisinde, beta globin zincirleri azaldığında veya yok olduğunda, birleştireilmemiş alfa zincirleri çökelir ve hücre zarının oksidatif hasarı, böylece apoptoz gerçekleşir (Cao ve Galanello, 2010; Rund ve Rachmilewitz, 2005; Somervaille, 2001).

Beta zincir sentezindeki dengesizlik stabil olmayan kan hücresi oluşumuna ve hemolitik anemiye yol açar (Foroughi ve ark., 2015).

Beta talasemi hastalığın klinik bulgularının geniş yelpazede olması farklı fenotipik grupları ortaya çıkarır. Bu klinik farklılıklar, genellikle asemptomik formu olan beta talasemi minörden ciddi transfüzyon bağımlısı beta talasemi majör (β -TM) kadar fenotipleri içermektedir. Bu fenotipler; beta talasemi minör, beta talasemi intermedia (β -TI) ve beta talasemi majör (β -TM) olarak sınıflandırılırlar. Bu fenotipik sınıflandırma, beta globin geni mutasyonlarının homozigot ya da bileşik (compound) heterozigot formlarından kaynaklanır. Beta talasemi minör klinik olarak normal fenotipte olup, taşıyıcı konumdadırlar.

β -TI, beta talasemi minör ve β -TM arasında değişen derecelerde klinik şiddeti olan bir formudur. Genellikle β -TM kliniğine kıyasla hafif klinik ve demir birikimi olur. β -TI, transfüzyon bağımsız talasemi formu olmasına rağmen, bazı hastalar ara sıra kan transfüzyonuna ihtiyaç duyar. Onlar da β -TM gibi yaşam kalitesini arttırabilmek için dikkatli tıbbi müdahaleye gerek duyarlar (Karimi ve ark., 2014; Taher ve ark., 2011).

Beta Talasemi Majör Klinik Özellikleri

β -TM fenotipinde genellikle yaşamın ilk yıllarında ciddi hemolitik anemi görülür. Etkin olmayan eritropoez sonucunda kemik iliğindeki eritroid prekürsör hücrelerinin yok edilmesi ile sonuçlanır. Hasta bireyler olup, düzenli transfüzyon ve dikkatli tıbbi müdahale gerektirir (Karimi ve ark., 2014)

β -TM hastalarında artmış kırmızı kan hücrelerinin sayısı, düşük ortalama eritrosit hacmi (MCV) ve ortalama eritrosit hemoglobini (MCH) ile anemi bulunur. Periferik kan yaymaları, mikrositoz (eritrosit hacimlerinin normalden küçük olması) ve hipokromi(normal düzeyden daha az hemoglobin taşıyan eritrositler)ye ek olarak, anizosiyotik (eritrosit çaplarında farklılık), poikilositoz (eritrosit şekillerinde farklılık) ve çekirdekleşmiş kırmızı kan hücreleri (diğer bir deyişle eritroblastlar) gösterir. Eritroblast sayısı aneminin derecesine bağlıdır ve splenektomiden sonra belirgin şekilde artar.

Hb paterni (selüloz asetat elektroforezi veya yüksek performanslı sıvı kromatografisi [HPLC] ile) beta talasemi türüne göre değişir. Beta globin zincir sentezinin olmamasıyla karakterize edilen beta-talasemi'de HbA yoktur, HbF% 95-98 ve HbA2% 2-5'dir (Cao ve Galanello, 2010). β -TM bebeklerin gelişimi giderek

azalmaktadır. Beslenme sorunları, ishal, sinirlilik, tekrarlayan ateş nöbetleri ve splenomegali nedeniyle karın büyümesi meydana gelebilir. Hb konsantrasyonu 95-105 g/L minimum düzeyde sağlayan düzenli bir transfüzyon programı başlatılırsa büyüme ve gelişme 10-11 yaşına kadar normaldir. 10-11 yaşından sonra, etkilenen kişiler, şelasyon tedavisine uyumlarına bağlı olarak, post-transfüzyon aşırı demir yüküyle ilgili ciddi komplikasyonlar gelişme riski altındadır (Cao ve Galanello, 2010).

β -TM klasik klinik tablosu şu anda yalnızca bazı gelişmekte olan ülkelerde görülmekte olup, bu ülkelerde uzun vadeli transfüzyon programlarının yürütülmesinde kullanılacak kaynaklar mevcut değildir. Tedavi edilmeyen ya da iyi transfüze edilmemiş bireylerin en belirgin özellikleri büyüme geriliği, solgunluk, sarılık, cildin kahverengi pigmentasyonu, kötü kas yapısı, çarpık bacak, hepatosplenomegali, bacak ülseri, ekstremiteler hematopoezden kitlelerin gelişimi ve eklem genişlemesinden kaynaklanan iskelet değişiklikleridir. Bu iskelet değişiklikleri, bacakların uzun kemiklerinin deformitelerini ve tipik kranyofasiyal değişiklikleri (kafatası patronluğu, belirgin malar boy, burun köprüsünün depresyonu, gözün mongoloid eğilimi ve maksillanın hipertrofisi) içerir. Üst dişleri açığa çıkarma eğilimindedir. Düzenli olarak transfüze edilmemiş kişiler genellikle otuz yaşından önce ölürlür (Cao ve Galanello, 2010).

Aynı mutasyona sahip beta talasemi majör hastalarında, klinik şiddet ve hastalığın seyri farklılık göstermektedir. Bu klinik seyir, hemen hemen asemptomik bulgular ile yaşamı tehdit edici durumlar arasında değişmektedir (Somerville, 2001). Bu klinik çeşitlilik, genetik dışı etkenler hastalıktan sorumlu genler üzerine etkili olan, genomdaki diğer modifiye edici genlerden kaynaklanmaktadır (Lettre, 2012; Liu ve ark., 2014; Thein, 2013).

2.5. Modifiye Edici Genler

Son zamanlarda insan genom çalışmaları, aynı mutasyonla ortaya çıkan tek gen hastalığındaki klinik farklılıkların, modifiye edici genlerden kaynaklandığını ortaya çıkardı (Nadeau, 2003; Haldane, 1941). Bugüne kadar tek gen hastalıkları hemoglobinopatilerin genelinde olduğu gibi beta-talasemi majör fenotipini de etkileyen birçok modifiye edici gen belirlenmiştir. Beta talasemide modifiye edici genler birincil ve ikincil modifiye ediciler olarak sınıflandırılmıştır. Birincil modifiye

edici genler alfa(α)/ α -olmayan globin zinciri oranında dengesizlikleri tanımlar.

Birincil modifiye ediciler;

1. α -globin genotipi,
 α -talasemi: Globin zinciri azalışı ve α -globin artışına bağlı dengesizlik
Fazladan α -globin genlerin birlikte kalıtımı ($aaa/$, $aaaa/$, ya da HBA gen kümesi duplikasyonu): Aşırı α -globin sentezi ve globin zincir dengesizliği
2. β -globin genotipi(1 ya da 2 beta-zincirinin mutasyonu): Doğrudan β -globin geni etkilenir. Globin zincir dengesizliğine neden olur.
3. HbF'i kontrol eden QTL (Quantitative Trait Locus)lerin (Menzel ve ark., 2007), örneğin *BCL11A*[B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)] (Sankaran ve ark., 2009), *KLF1*[Kruppel-like factor 1 (erythroid)] (Gallienne ve ark., 2012), *HMIPEP*[insan mitokondriyal intermedia peptidaz], *Xmn1-HBG2*[gama globin geninde *Xmn1* polimorfizmi] (Roy ve ark., 2012)SNP'ler gibi: Artan γ -zincirler aşırı α -globin ile birlikte globin zincir dengesizliğinin azalması
4. Ubikitin proteolitik yolundaki varyantları içeren potansiyel modifiye ediciler: aşırı α -globinin proteolizini teşvik eder.
5. α -hemoglobin stabilize edici protein(AHSP) (Sagar ve ark., 2015).

İkincil modifiye ediciler hastalığın komplikasyon düzeyi ve tedavisi ile ilişkilidir.

İkincil modifiye ediciler;

- HFE (Hemokromatozis), Örneğin H63D varyantı,
- VDR (Vitamin D Reseptörü), COL1A1 (Kollagen, tip1, alfa1), COL1A2 (Kollagen tip1, alfa2), TGF β 1 (Transforming Growth Factor Beta1) genlerindeki varyantlar,
- Apolipoprotein(APOE) ϵ 4,
- Glutasyon-S-transferaz M1,
- UGT1A1 (UDP glukuronil transferaz-1 ailesi, polipeptid A1) promotorundaki (TA)_n polimorfizmi (Thein, 2013).

2.5.1. HbF İndüksiyonu Sağlayan Modifiye Edici Genler

Günümüzde yapılan araştırmalarla, HbF seviyesini etkileyen birincil modifiye edici genlere yeni aday genler ilave edilmektedir.

Sheehan, Crosby ve arkadaşlarının (2014) beta-globin zincirinde kodon 6(GAG>GTG,Glu>Val)'daki A-T mutasyonu sonucu oluşan HbS varyantı ile karakterize orak hücreli anemili(OHA) hastalarda tüm ekzon taramasında, *SALL2* (*spalt like transcription factor*) geninde *P840R* varyantına sahip hastalarda, hidroksiüre'ye yanıt olarak HbF seviyesindeki değişimin arttığı gösterilmiştir. *SALL2* geni, yeni bir modifiye edici gen olarak tanımlanmıştır. *SALL2* modifiye edici geni, yapılan detaylı literatür taramasında, bugüne kadar ülkemizde ve dünyada beta talasemi majör hastalarında araştırılmamıştır.

2.5.2. *SALL* Gen Ailesi

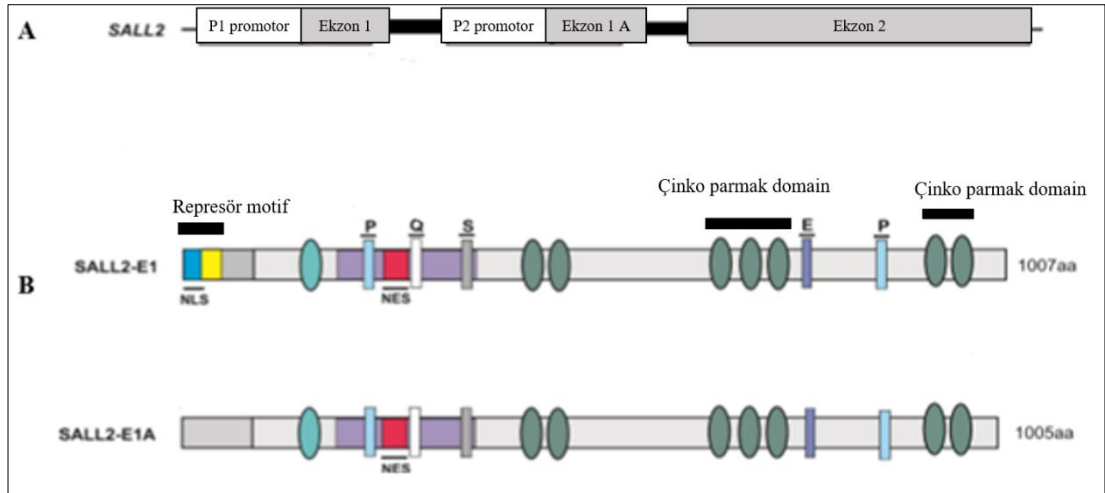
SALL gen ailesi üyeleri evrimsel olarak korunmuş çoklu çinko parmak (multi-zinc finger) transkripsiyon faktörlerini kodlar (de Celis ve Barrio, 2009). Bu transkripsiyon faktörleri omurgalı ve omurgasız türlerde embriyonik gelişimde fonksiyon gösterir. İnsanda *SALL* gen ailesinin üyeleri *SALL1*, *SALL2*, *SALL3* ve *SALL4*'dür. Filogenetik analizler *SALL1* ve *SALL3* ün ortak atadan türediğini gösterir. *SALL1*, ürogenital, ekstremiteler, anal ve kalp malformasyonları ile ilişkili olan Townes-Brockes Sendromlu hastalarda mutasyona uğramıştır (Kohlhase ve ark., 1999; Marlin ve ark., 1998; Weerd ve ark., 1988). Bu sendromlu hastalarda şimdiye kadar hematopoezde kusur gözlenmemiştir. *SALL1* ve *SALL2*, testisler, yumurtalıklar ve böbrekler gibi beyin, iç kulak ve ürogenital sırt kaynaklı yapıların gelişmekte olan nöroektoderminde ifade edilir. *SALL3* gen ürünü 18q delesyon sendromlu hastalarda fenotipi etkileyebilir (Kohlhase ve ark., 1999). Son *SALL* gen ailesi üyesi *SALL4* ise sahip olduğu mutasyon insanda Duane-radial ray sendromuna yol açabilir (Al-Baradie ve ark., 2002)

Özellikle *SALL2* ve *SALL4* genleri normal hematopoez ve lökomogenezde transkripsiyon faktörü olarak rolü vardır.

2.5.3. *SALL2* GENİ

SALL2 C-terminal dizisinde çinko parmak motifleri diğer *SALL* gen ailesi üyeleri ile homolog değildir. Diğer *SALL* üyeleri farklı *SALL*-BOX bulundurmaz (Kohlhase ve ark., 1996; Kohlhase ve ark., 2000). Bu da *SALL2*'nin çinko parmak motiflerinin orijininin ayrı olduğunu gösterir. Sal-2, Hsal2, HSAL2, p150(Sal2), KIAA0360 olarak da bilinen insan *SALL2* geni yirmi yıl önce izole edildi (Kohlhase ve ark., 1996). İnsanda *SALL2* geni kromozom 14'ün q11.1-q12.13 bölgesinde lokalizedir. Fiziksel

yerleşimi 21.989.233-22.005.337 bp arasında 16.11Kb'lik lokusta yerleşmiş olup, 2 Ekzon ve bir introndan oluşur. Alternatif promotorları P1 ve P2'yi kullanan iki olgun transkripti tanımlanmıştır (Kohlhase ve ark., 2000). P1 ve P2 promotorların downstreaminde sırasıyla ekzon1(E1) ve ekzon1A(E1A) ardından çinko parmak domainleri kodlayan ortak 2.ekzon yer almaktadır (Ma ve ark., 2001). P1 ve P2 alternatifli kullanımı sırasıyla 1007a.a'lık E1 ve 1005a.a'lık E1A olmak üzere iki protein izoformları bulunmaktadır. Her iki *SALL2* izoformu için ortak olan, ovaler ile temsil edilen çinko parmak alanları ve dikdörtgenlerle temsil edilen P(prolin), Q(glutamin), S(serin) ve E(glutamik asit) aminoasitlerince zengin motiflerdir. *SALL2* izoformları N-terminal çinko parmak domaini C2HC tipi; transkripsiyon faktörlerinde tipik olarak glutamince zengin ikili ve üçlü çinko parmak bölgeleri içerir (Şekil 2.5) (Hermosilla ve ark., 2017). *SALL2* izoformları N terminal domaininde 25 aminoasit farklılık içerir. E1 izoformu nüklear lokalizasyon dizisi(NLS) (Brameier ve ark., 2007) ve korunmuş MSRRKQRKQP represör motifine sahipken E1A her ikisine de sahip değildir (Lauberth ve Rauchman, 2006). E1 izoformu spesifik fonksiyonları olduğu düşünülmektedir. Üçlü çinko parmak ve C-terminal ikili çinko parmak domainleri her iki izoformda da bulunmaktadır. Bu *SALL2*'nin bağlanması için temel gereksinimidir.



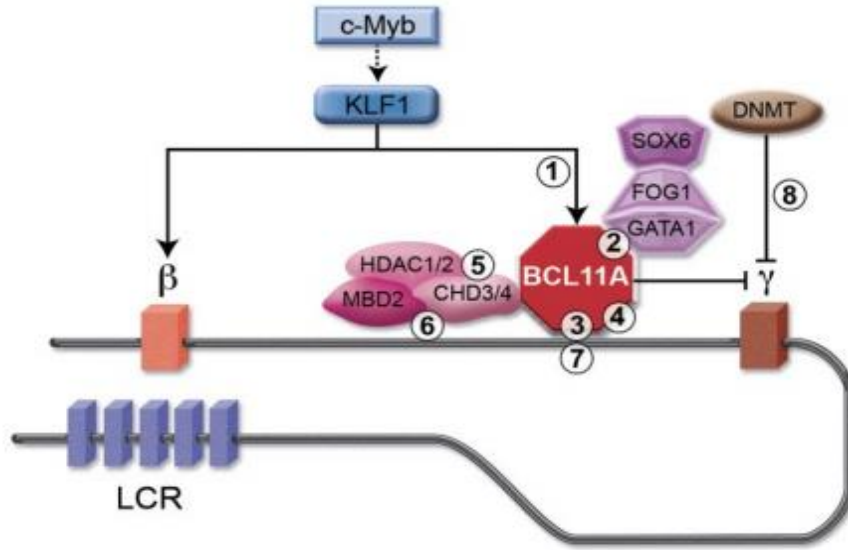
Şekil 2.5. A) *SALL2* geni ekzonları E1, E1A, E2 ve alternatif promotorları P1 ve P2. B) *SALL2* iki protein izoformları SALL2 E1(1007 a.a) ve SALL2 E1A(1005 a.a). çinko parmak domainleri oval ve P, Q, S ve E zengin motifler dikdörtgen şeklinde gösterilmiştir. DNA bağlanma ve transaktivasyon domainleri ve nuklear çıkış dizisi(NES). SALL2-E1 represör domain ve nuklear lokalizasyon sinyali(NLS) içerir (Hermosilla ve ark., 2017). Orjinal şekilden modifiye edilmiştir.

SALL2 transkripsiyon faktörü olduğu için birçok yolakta işe karıştığı görülmektedir. Örneğin; wilms tümör proteini (WT1) tarafından repress edildiği bildirilmektedir

(Ma ve ark., 2001). Ayrıca, *SALL2* geninin fare ortoloğunun onkogenik polyoma large T antijenine bağlandığı ve p21 ekspresyonunu upregüle ettiği için *SALL2* geni bir tümör supressör gen adayı olarak da değerlendirilmektedir (Li ve ark., 2001; Li ve ark., 2004). *SALL2*'nin hücre döngüsünde düzenleyici rol oynadığı, fare timus ve kemik iliğinde p21 ekspresyonunun incelenmesi ile de hematopoiezis mekanizmasında görev aldığı gösterilmiştir. *SALL2* knock out farelerde p21'in down regüle edildiği gözlenmiş, bu bulgulara göre *SALL2* hücre döngüsü ile ilişkili olduğu için hematolojik kusurlarda sorumlu olabileceğini gösterilmiştir (Chai, 2011).

SALL2 insan embriyonik kök hücrelerini upregüle eden en önemli genlerden biri olarak tanımlanmıştır (Sperger ve ark., 2003). Daha sonra çeşitli çalışmalar *SALL2*'nin indüklenmiş pluripotent kök hücrelerde (Liu ve ark., 2012; Nishino ve ark., 2011; Saito ve ark., 2011) ve umbilikal korddan köken almış multipotent hemapoetik hücrelerde upregülasyonu sağladığı buna karşılık pluripotent kök hücrelerde daha az seviyede olduğu belirtilmiştir (Giorgetti ve ark., 2009).

SALL2 geni, hematopoetik hücrelerin olgunlaşmasında ve hücre döngüsünde rol alan multi-çinko parmak transkripsiyon faktörüdür. *SALL2*, N terminal motifinde HbF indüksiyonunda modifiye gen olarak belirlenmiş *BCL11A* [B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)]'daki gibi korunmuş 12 aminoasit içerir. Bu motif nukleozomal remodelling ve deasetilaz co-represör kompleksinin bağlanması için temeldir. Hem HDAC1 (histon deasetilaz 1) hem de HDAC2 (histon deasetilaz 2) HbF in yapısındaki γ -globinin co-represörü olarak rol oynadığı bilinmektedir (Şekil 2.6).



Şekil 2.6. *BCLL11A*'nın γ -globin geni ekspresyonunu baskılama mekanizması (Bauer ve ark., 2012)

Sheehan, Crosby ve arkadaşlarının yaptığı araştırmada, orak hücre anemili hastalarda tespit ettikleri *SALL2* varyantının (P840R), p.Pro840Arg, proteinin 840. pozisyonunda prolin arginin değişikliğine yol açtığını ve bu değişimin protein normal fonksiyonunu bozduğunu ileri sürdüler. HbS varyantına yol açan kodon 6 GAG>GTG değişikliği beta globin geni üzerinde olduğu göz önüne alındığında; *SALL2*'deki bağlanma motifi ve domainlerinde oluşacak mutasyonların, en sık görülen hemoglobinopatilerden beta talasemi majör hastalarında da, HDAC1 ve HDAC2'nin motife bağlanamaması yüzünden, *SALL2* γ -globin ekspresyonunu uyaracaktır. Bu da HbF seviyesindeki artışa yol açacaktır. Bu durumun belirlenmesi beta talasemi majör hastalarının tedavisine yönelik olarak, HbF indüksiyonunda önemli bir kritik noktayı oluşturmaktadır.

Buradan yola çıkarak, henüz literatürde yer almayan (veya ulaşamadığımız biçimiyle sınırlı sayıdaki olan çalışmalara katkı sunmak), bu ilişkiyi kendi popülasyonumuzdaki hastalarda açıklığa kavuşturmak için bu araştırmamızda; HbF seviyesi yüksek olan beta talasemi majörlü hastalarda, *SALL2* geninin bağlanma motifindeki tanımlanmış veya olası tanımlanmamış mutasyonları ve varyasyonları taramayı amaçladık.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi

Projemiz Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayını aldıktan sonra (amacı ve kapsamı doğrultusunda) Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi Adem Tolunay Talasemi ve Kan Hastalıkları Merkezi'nde, beta talasemi majör tanısı konulan, beta globin gen mutasyonu belirlenmiş ,periyodik transfüzyon öncesi rutin test amaçlı başvuran HbF değeri yüksek(≥ 20) olan, araştırmaya katılmak isteyen ve imzalı Aydınlatılmış Onam Formu(EK-1) alınan 18-45 yaş aralığında 100 hasta çalışma grubunu oluşturmuştur. Proje ön değerlendirme süresinin ve ardından satın alma sürecinin uzaması nedeniyle progresif hasta akışında planlanan hasta sayısına tam ulaşamamıştır. Ancak daha önce proje için planlanan 100 hastanın HbF'i yüksek olan 30'nun devam eden diğer bir proje ile ortak olması (Yunus, 2016), yeni eklenen 36 hasta ile toplamda 66 hasta ile çalışmalar yürütüldü. Ayrıca araştırmamızı özgün kılması bakımından, HbF'i normal (≤ 20) olan 10 beta talasemi majör hastası da kontrol olarak çalışıldı. Belirlemiş olduğumuz özelliklere sahip toplam 76 hastadan transfüzyon öncesi, K2EDTA'lı tüplere 5'er ml periferik kan alınıp DNA eldesi yapılana kadar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Geriye kalan hastaların çalışması devam etmekte olup, sonuçlar projenin final raporunda değerlendirilecektir.

3.2 Periferik Kandan DNA İzolasyonu

K2EDTA içeren(BD Vacutainer, Ref:367525, UK) tüplere alınan periferik kanlardan Purelink Genomic DNA mini Kit (Invitrogen, Katalog No:K1820-01,USA) ve ihtiyaç duyulduğunda standart tuzla çöktürme (salting out) yöntemini kullanılarak DNA izolasyonları gerçekleştirildi.

3.2.1 Kit ile Genomik DNA izolasyonu

Kite (Pure Link Genomic DNA mini) özgü şu basamaklar gerçekleştirildi.

- 1.K2-EDTA'lı tüpte bulunan kan alt üst edilerek 200 μl alınıp 1,5ml'lik steril ependorf tüpe konuldu.
2. Kanın üzerine 20 μl ProteinazK ve 20 μl Rnaz A konuldu. Pipetaj yapılarak homojenize edildi. Oda sıcaklığında(RT) 2 dakika(dk) inkübe edildi.

- 3.Üzerine 200 µl PureLink Genomik Lysis/Binding Buffer eklendi ve homojenize edildi.
4. 55 °C'de su banyosunda 10 dk inkübe edildi.
5. Lizatın üzerine 200 µl %96-100 Etanol eklendi ve 4-5saniye(sn) vortekslendi.
6. Hücre lizati filtrelili kolona alındı. 10.000 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı.
7. 500 µl yıkama tamponu (Washing Buffer 1, WB 1) eklendi. 10. 000 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Toplama tüpü boşaltıldı.
8. 500µl yıkama tamponu (Washing Buffer 2, WB 2) eklendi. Maksimum hızda 3 dk Santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.
9. Filtrelili kolon steril bir 1.5 ml'lik ependorf tüpe yerleştirildi.
10. Üzerine 100 µl ayırıştırma tamponu (Elution Buffer EB) eklenildi. 1 dk RT inkübe edildi.
11. Maksimum hızda 1 dk. santrifüj edildi. DNA'nın kolondan ayrılması sağlandı.
- 12.Elde edilen DNA'lar PZR yöntemi yapılarına kadar -20°C'de saklandı.

3.2.2.Tuzla Çöktürme Yöntemiyle Genomik DNA İzolasyonu

Bu yöntem Miller ve arkadaşları tarafından geliştirilen standart DNA eldesi yönteminden (MWER ve ark., 1988) modifiye edilerek kullanıldı.

Kullanılan Solüsyonlar ve Hazırlanışları

Lizis Tamponu

155mM NH₄Cl(Sigma)

10mM KHCO₃(Sigma)

0.5M EDTA(Sigma)

1L Lizis Tamponu hazırlamak için 8.28g NH₄Cl, 1g KHCO₃ ve 4ml EDTA alınıp toplam hacim 1L olacak şekilde distile su eklenerek çözüldü. Hazırlanan lizis tamponu otoklavda sterilize edilerek +4°C'de saklandı.

EDTA(0.5M):18.61g EDTA(Sigma) 100ml distile suda çözüldü. Solüsyon pH'sını 7.4'e ayarlamak için NaOH çözeltisi kullanıldı. Hazırlanan EDTA oda sıcaklığında saklandı.

Lökosit Lizis (WBL) Tamponu

0.1M NaCl(Carlo Erba)

0.5M EDTA(Sigma)

0.1M NaCl solüsyonu hazırlanmak için 23.4g NaCl, 100ml distile suda çözüldü ve otoklavda sterilize edildi. 100ml WBL tamponu hazırlamak için 0.1M NaCl'den 2.5ml, 0.5M EDTA'dan 5ml alındı ve steril distile su ile 100ml'ye tamamlandı.

SDS(Sodyum Dodesil Sülfat) Solüsyonu(%10'luk)

10g SDS(Q-biogene) tartılarak,100ml distile suda çözüldükten sonra 0.22µm'lik filtreden(costar) geçirilerek sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

Proteinaz K (20mg/ml)

100mg Proteinaz K(AppliChem Proteinaz K) 5ml steril distile suda çözüldü. -20°C'de saklandı.

Amonyum Asetat(AmAc) Solüsyonu(9.5M)

36.613g AmAc(Sigma) tartılarak, 15ml steril distile suda çözüldü. Tamamen çözüldükten sonra son hacim 50ml olacak şekilde distile su eklenerek tamamlandı.

%70'lik Alkol(C₂H₅OH)

Etil Alkol(Riedel-de Haën)

dH₂O

70ml Etil alkol, 30ml dH₂O ile karıştırıldı ve +4°C'de saklandı.

Tuzla Çöktürme Yöntemi ile Genomik DNA İzolasyonu Basamakları

1. K2EDTA(BD Vacutainer, Ref:367525, UK) içeren tüplere 5ml kan örneği alındı.
2. Tüpler alt-üst edilip içerisinde kan homejenize edildikten sonra 50ml'lik steril santrifüj tüpüne(Cellstore Greiner) aktarıldı.
3. Üzerine 15ml lizis tamponu eklenerek vorteks(Nüve) yardımı ile homojenize edildi.
4. 20dk -20°C'de bekletildi.
5. 1500rpm'de +4°C'de 10dk soğutmalı santrifüjde(Sigma) santrifüj edildi.
6. Dökelti atıldı, çökelti el yardımı ile vurularak homojenize edildi.

7. Üzerine 15ml seviyesine kadar tekrar lizis tamponu eklendi vorteks ile homojenize edildi.
8. 1500rpm'de +4°C'de 10dk santrifüj edildi.
9. Dökelti atıldı. Elle vurularak kaldırıldı. Vorteks ile homojenize edildikten sonra üzerine 3,7ml WBL tamponu eklendi.
10. Karışıma 250µl %10'luk SDS ve 100µl proteinaz K eklendi. 37°C'de gece boyu inkübe edildi.
11. İnkübasyon sonrası her 3,7ml AmAc eklendi ve vorteks edildi. Homojenize edildi.
12. 4750rpm'de 25°C'de 30dk santrifüj edildi.
13. Üst faz yeni bir steril 50ml'lik santrifüj tüpüne alınarak,üzerine 1:2 oranında %96 soğuk etanol eklendi. Tüp alt üst edilerek DNA'nın görünür hale gelmesi sağlandı.
14. Görünür hale gelen DNA pipet ucu ile alınarak 500µl %70'lik etanol bulunan ependorf tüpüne bırakılarak yıkandı.
15. 1300rpm'de 25°C'de 5dk santrifüj edildi.
16. Alkol uzaklaştırıldı. Ependorf tüpler ağzı açık açık şekilde 37°C'de etüve 5dk konularak alkol kurutuldu.
17. Elde edilen DNA miktarına göre 200-300µl distile suda çözülerek, PZR için -20°C'de saklandı.

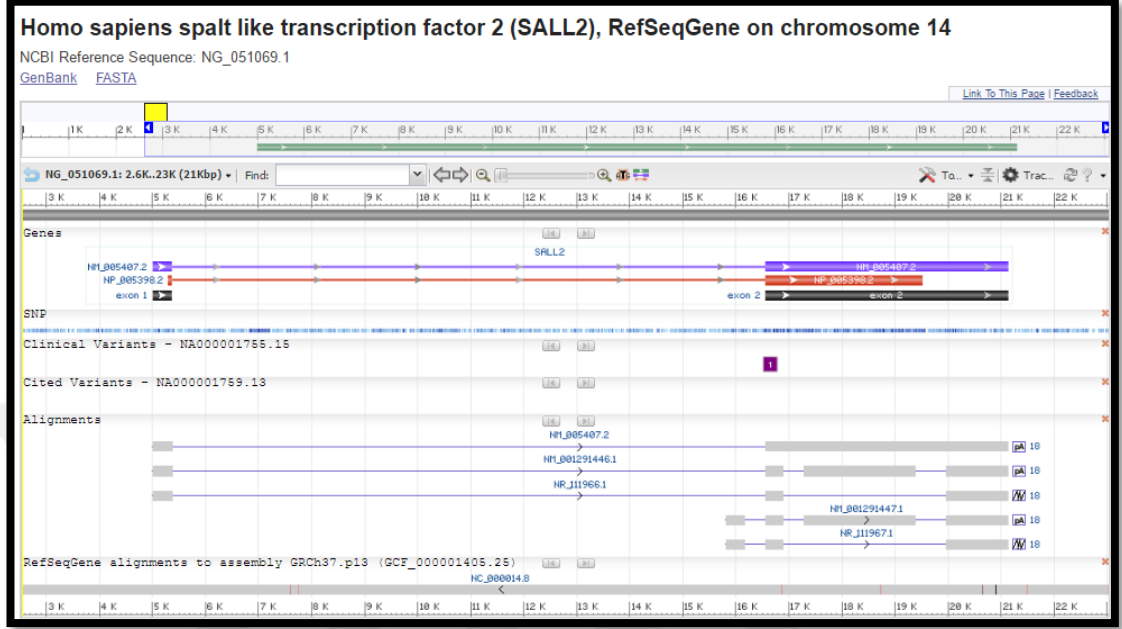
3.3 DNA Örneklerinin Spektrofotometrik Ölçümü

Periferik kandan izole edilen DNA örneklerinin saflığı ve miktarı NanoDrop1000 (Thermo scientific) spektrofotometre cihazında ölçüldü. Ölçüm için 1-1.5µl DNA spektrofotometreye yüklendi. DNA örneklerinin 260nm ve 280nm dalga boylarında elde edilen ölçümlerinin oranı DNA'nın saflığı gösterdi. DNA miktarı ng/µl cinsinden $DNA\ miktarı = 260m'deki\ Optik\ Dansite(O.D) \times Sulandırma\ Faktörü(S.F.) \times 50$ formülü ile hesaplandı. Tuzla çöktürme yöntemi ile elde edilen DNA örnekleri hesaplanan değerlere göre 50ng/µl olacak şekilde sulandırıldı.

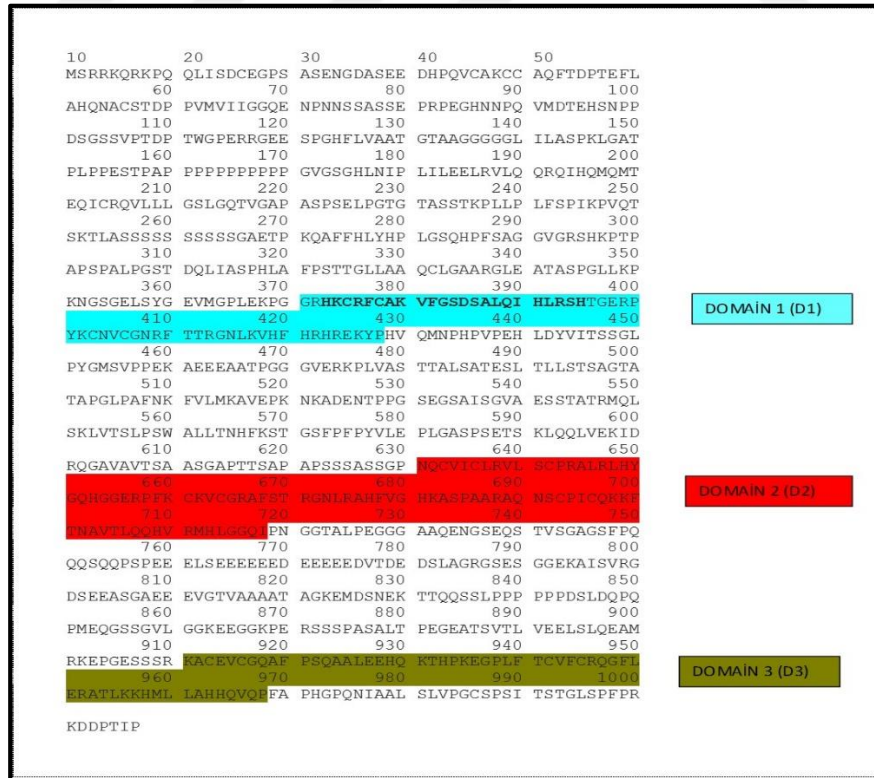
3.4 PZR Yöntemiyle *SALL2* Geni Bağlanma Motiflerinin Çoğaltılması

SALL2 geni iki ekzon ve bir introndan oluşmaktadır. 2. Ekzonunda hedeflediğimiz bağlanma motifleri bulunmaktadır. Çalışmamızda *SALL2* geninin 2. Ekzonunda mutasyon taraması gerçekleştirilmiştir.

Şekil 3.6'da *SALL2* genine ait NCBI'dan ekzon görüntüsü verilmiştir. Şekil 3.7'de *SALL2* proteinine ait aminoasit dizisi verilmiştir. Aminoasit dizisinde çinko parmak domainler farklı renklerde gösterilmiştir.



Şekil 3.6. *SALL2* geni ekzon görüntüsü(www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6297 Erişim Tarihi: 18 Mart 2017)



Şekil 3.7. *SALL2* proteinine ait aminoasit dizisi ve *SALL2* proteini bağlanma motifleri (http://www.uniprot.org/uniprot/Q9Y467 Erişim Tarihi: 18 Mart 2017)

SALL2 geni üç bağlanma motiflerine özgü tasarlanan primer çiftleri (Atlas Biyoteknoloji) tablo 3.1’de verilmiştir. Bağlanma motiflerine özgü primerlerin bağlanma sıcaklığı ve bağlanma motiflerinin ampikon uzunluğu ise tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. *SALL2* geni bağlanma motiflerinin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primer dizileri

Primer Kodları	Primer Baz Dizileri
<i>SALL2</i> -E2-D1	İleri Primer: 5’-GACTACTGGCAGCACAGTG-3’
	Geri Primer: 5’-AAGTGGTTGGTAAGCAGTGC-3’
<i>SALL2</i> -E2-D2	İleri Primer: 5’-GATGCCTCTTCTGAATCACC-3’
	Geri Primer: 5’-GATGCCTCTTCTGAATCACC-3’
<i>SALL2</i> -E2-D3	İleri Primer: 5’-GGTGATTCAGAAGAGGCATC-3’
	Geri Primer: 5’-TCATAACTCTGGGAGGTCCT-3’

(E2:Ekzon2, D1:Domain 1, D2:Domain 2, Domain 3)

Tablo 3.2. *SALL2* geni 2. ekzondaki bağlanma motifleri bölgelerinin ampikon uzunlukları ve primerlerin bağlanma sıcaklıkları

Bölge	Primer Bağlanma Sıcaklığı(°C)	Ampikon Uzunluğu(bç)
<i>SALL2</i> -E2-D1	58	724
<i>SALL2</i> -E2-D2	56	737
<i>SALL2</i> -E2-D3	56	704

(E2:Ekzon2, D1:Domain 1, D2:Domain 2, Domain 3)

Tüm primerlerden her biri 100µM stok solüsyonu olacak şekilde steril distile suda çözüldü. Stok solüsyondan 100µl alınıp ikinci stok solüsyon olarak steril tüplere bölündü ve etiketlendi. Bu 100µl ikinci stok primer solüsyonundan 10 µl alıp üzerine 90µl steril distile su eklenerek PZR için kullanılacak 10µM çalışma primerleri elde edildi. Tablo 3.3’de PZR amplifikasyonu için gerekli bileşenler ve miktarları verilmiştir.

Tablo 3.3. PZR amplifikasyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları

PZR Temel Bileşenleri	1X Miktarı(μl)
10 X Tampon(Geneall)	2,5
50mM MgCl ₂ (Vivantis)	1
10μM İleri primer	0,8
10μM geri primer	0,8
dNTP karışımı(10mM)(thermofischer)	1
Taq polimeraz(2,5U/μl)(Geneall)	0,4
gDNA(25-50ng/μl)	2
Distile su	16,5
Son hacim	25

dNTP karışımı; dNTP set(Thermo Scientific) içerisinde dATP, dCTP, dGTP, dTTP'nin her biri ayrı tüpte 0.25mL ve 100mM şeklinde sağlanmıştır. dNTP karışımı hazırlanması; her bir nükleotit tüplerinden 10'ar μl alınıp üzerine 60μl distile su eklenmesiyle elde edilmiştir. PZR; steril kabin içerisinde 0,2ml'lik PZR tüplerinde hazırlandı. PZR cihazında (ABI 9700 Applied Biosystem Thermal Cycler) cihazında sıcaklık koşulları ayarlanıp çalıştırıldı.

Kontrol gDNA ile PZR optimizasyonu öncelikli hedef olarak literatürde bildirilen *SALL2* geni Ekzon 2'deki P840R varyantının tespit edildiği 3.bağlanma motifine(D3) yönelik primer çiftleri ile bölgenin çoğaltılması sağlandı.

Hastaların *SALL2* geni 2. Ekzonda bulunan 3.bağlanma motifi (D3) bölgesi touchdown PZR ile çoğaltıldı. Touchdown PZR koşulları; 95°C'de 2dk ön denatürasyon; 95°C'de 20sn denatürasyon, her döngüde 1 °C düşmek üzere 62°C'den 56 °C'ye değişen primerlerin bağlanma sıcaklığında 10sn, 72 °C'de 1 dk uzamadan oluşan 6 döngünün ardından 95 °C'de 20sn, 56 °C'de 10sn, 72 °C'de 1 dk olmak üzere 28 döngü, son uzama 72 °C'de 5 dk ve +4 °C'de ∞ saklama olarak gerçekleştirildi.

Ekzon 2'deki ikinci bağlanma motifi (D2) bölgesi için PZR koşulları; 95 °C'de 5dk ön denatürasyon, 95 °C'de 45sn denatürasyon, 56 °C'de 40sn primerlerin bağlanması, 72 °C'de 1 dk uzamadan oluşan 35 döngü, son uzama 72°C'de 5 dk ve +4 °C'de ∞ saklama olarak ayarlandı.

Ekzon 2'deki birinci bağlanma motifi (D1) bölgesi için PZR koşulları; 95°C'de 5dk ön denatürasyon, 95 °C'de 20sn denatürasyon, 58°C'de 10sn primerlerin bağlanması, 72°C'de 1 dk uzamadan oluşan 35 döngü, son uzama 72°C'de 5 dk ve +4°C'de ∞ saklama olarak gerçekleştirildi.

PZR işlemi bittikten sonra gen bölgesinin çoğalıp çoğalmadığını kontrol edebilmek için PZR ürünleri %2'lik agaroz jele yüklenerek elektroforez işlemi gerçekleştirildi.

3.5 Agaroz Jel Hazırlanması

Agaroz deniz yosunundan elde edilmiş toz halindeki lineer bir polisakkarit maddedir. Agaroz elektriği ileten bir tampon içerisinde kaynatılarak çözünür. Ardından oda sıcaklığında donmasıyla katı hale geçer. Agaroz jel konsantrasyonlarına bağlı olarak değişen çaplarda porlara sahiptir. Moleküller bu porlardan ayrılarak hareket eder. Çalışmada kullanılan DNA fragmentlerine göre agaroz konsantrasyonu belirlendi. Çalışmada 100-2500bp büyüklüğü arasında DNA parçasını ayırmak için %2'lik jel kullanıldı.

%2'lik agaroz jel hazırlanması:

10X konsantrasyonlu TBE(Tris-Borat-EDTA) tamponundan (Life Tech) 1X TBE solüsyonu hazırlamak için; 100ml 10X konsantrasyonlu TBE solüsyonundan alınıp 1L'lik cam şişeye boşaltıldı. Üzerine 900ml distile su konularak hacim 1L'ye tamamlandı ve agaroz jel için bu solüsyon (1X TBE tamponu) kullanıldı. Toz halde bulunan agarozdan (Sigma) alınarak hassas terazide 1 gram tartıldı ve 100ml'lik erlene döküldü. Stok 1X TBE tamponundan 50ml alınarak erlene eklendi. Erlen mikrodalga fırına konuldu, kaynatılarak agarozun erimesi sağlandı. Arada erlen çıkarılıp çalkalandı. Tekrar mikrodalgaya konuldu. Agaroz eridikten sonra erlen mikrodalga fırından çıkarılarak soğumaya bırakıldı. Solüsyon sıcaklığı 45-60°C'ye düşünce, 10mg/ml stok Etidyum Bromür (EtBr)'den 4µl eklendi. Hafifçe çalkalanarak, hava kabarcığı oluşturmadan karışması sağlandı. Tray üzerine kuyucukları oluşturan taraklar yerleştirildi. EtBr eklenen agaroz solüsyonu traye döküldü ve kuyucukların oluşması için oda sıcaklığında katılaşması beklendi. Jel donunca taraklar özenle çıkarıldı. %2'lik jel kullanıma hazır hale getirildi.

EtBr hazırlanması(10mg/ml): 1g EtBr(Sigma) üzerine 100ml distile su eklenerek hazırlandı. EtBr DNA üzerinde interkalasyon yaparak bağlanan karsinojen

kimyasaldır. UV altında DNA parçalarının bantlarının görülmesini sağlar. Ayrıca çalışmada elektroforez tankı içerisine kullanılmak üzere 10X konsantrasyonlu TBE'den dilüe edilerek 1X TBE tamponu hazırlandı.

10X TBE tamponu(1 litre) hazırlanışı: Tris-Baz(Sigma) 108g, Borik Asit(Sigma) 55g, Na₂EDTA(Sigma) 7,5g tartılarak distile suda çözüldü, pH 8.3'e ayarlanarak son hacim 1L olacak şekilde distile su eklendi. Oda sıcaklığında saklandı.

3.6 Elektroforez

Elektrik alan oluşturularak tampon içerisinde yüklü parçacığın büyüklük, elektrik yükü ve diğer fiziksel özelliklerine göre ayırma işlemine elektroforez denir.

Elektroforez tankı içerisinde jelin üstünü geçecek seviyede 1X TBE tampon doldurulur. TBE; elektroforez için iyon kaynağıdır. Elektiksel iletkenliği artırır. Ayrıca ortamın pH'sını stabil tutar. Kuyucuklar katot(-) kutupta olacak şekilde jel tanka yerleştirilir. Nükleik asitler negatif yüklü olduğu için katottan anota doğru yürümesi gözlenir. Kuyucuklardan ilk sıradakine 50bp'lik uzunlukta ardışık artan fragmentler içeren(50bp-1000bp) markerdan 2µl yüklenir.

Marker(Standart) hazırlanışı: Stok marker(GeneRuler 50 bp DNA Ladder, Thermo Scientific) solüsyonunda 10ul, 6X loading dye'dan 10ul ve üzerine 40ul steril su eklenerek marker solüsyonu hazırlandı. Marker; belirli baz çifti büyüklüğüne sahip DNA fragmanlarından oluşmuştur. Ürünlerimizin boyutu hakkında bilgi edinmek için markera bakarak ürün boyutunun kaç bp olacağını yorumu yapılır. PZR ürünleri ve temizlenmiş PZR ürünlerinden 4µl, DNA örneklerinden 2µl alınarak ayrı ayrı renkli yükleme tamponu (6x loading dye Thermo Scientific) ile mikropipet yardımıyla karıştırılır. Renkli yükleme tamponu DNA'nın kuyucuk içerisinde ağırlık oluşturarak çökmesini sağlar, ürünler yürütülürken çıplak gözle ürünlerin nerede ve ne kadar ne kadar yürüdüğü hakkında bilgi alınmasına yardımcı olur. Kuyucuklara her bir örnek ayrı ayrı yüklenir. Elektroforezde nükleik asit hareketini sağlayacak olan güç kaynağıdır. Güç kaynağı belirli voltta, belirli sürelerde ve belirli akımda ürünlerimizin yürütülmesi için elektiksel alanın oluşumunu sağlar. Bu çalışmada PZR ürünleri ve temizlenmiş PZR ürünleri 120V'da 20 dakikada yürütüldü. Ürünler yürütüldükten sonra UV transillüminatör(Sygene Ingenius) altında kamera yardımıyla fotoğraflandı.

3.7 PZR Ürünlerinin Temizlenmesi

SALL2 geni Ekzon 2'deki üç farklı motifin PZR ürünlerin temizlenmesinde ihtiyaca göre iki farklı yöntem uygulandı. Exosap(Affymetrix)ve Kit(Axygen, Katalog No:AP-PCR-50,USA) protokolleri ile PZR ürünleri temizlendi.

3.7.1. Exosap Uygulaması ile PZR Ürünlerinin Temizlenmesi

0,2ml'lik PZR tüplerine 10µl PZR ürünü konuldu. Üzerine 2µl Exosap(Affymetrix) eklendi. İyice pipetaj yapıldı. Tüplerin ağzı kapatıldı. ABI 9700 Applied Biosystems cihazına tüpler yerleştirildi. Cihazdaki koşullar; 37°C'de 30 dakika, 80°C'de 15 dakika olacak şekilde döngü ayarlandı. Ardından ürünler hazırlanan %2'lik agaroz jelde 120V'de 20dakika yürütüldü. Transillüminatörde UV altında jel görüntülendi.

Çalışmada bazı PZR ürünlerin temizlenmesi PZR püfifikasyon kiti (Axygen) ile gerçekleştirildi. Exosap ile pürifiye edilen bazı PZR örneklerinin elektroferogram (DNA dizileme sonuçlarında) kirliliklerin fazla olması sebebiyle kit ile temizleme yoluna gidildi. Exosap ile pürifiye edilen bazı PZR örneklerinin elektroferogram(DNA dizileme sonuçlarında) kirliliklerin fazla olması sebebiyle kit ile temizleme yoluna gidildi.

3.7.2. Kit ile PZR Ürünlerinin Temizlenmesi

Kite (Axygen) özgü protokol aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır:

Deneye başlamadan önce Eluent 65°C su banyosunda bekletildi.

1. 20ul PZR ürünü üzerine 100ul Buffer PCR-A eklendi. Pipetaj yapılarak homojenize edildi.
2. 2 ml mikrofuge tüpüne bir PZR kolonu yerleştirildi. 1. Basamaktaki ürünler kolona aktarıldı.
3. 12.000xg'de 1 dk santrifüj edildi.
4. Dökelti uzaklaştırıldı. 2 ml mikrofuge tüpe kolon tekrar konuldu.
5. Kolona 700ul Buffer W2 kolona eklendi. 12.000xg'de 1 dk santrifüj edildi.
6. Dökelti uzaklaştırıldı. 2 ml mikrofuge tüpe kolon tekrar konuldu.
7. Üzerine 400ul Buffer W2 eklendi. 12.000g'de 1 dk santrifüj edildi.
8. Kolon 1,5 mikrofuge tüpe yerleştirildi.
9. Üzerine 25-30ul Eluent eklendi.
10. 1 dk oda sıcaklığında inkübe edildi.

11. 12.000g'de 1 dk santrifüj edildi.

Temizlenmiş PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde 120V'de 20 dk yürütülerek transillüminatör cihazında kontrol edildi.

3.8. Sanger Dizileme Reaksiyonu

Sanger dizileme veya zincir sonlandırma yöntemi olarak da adlandırılan bu reaksiyonda, temel düşünce zincir sonlandırmasını gerçekleştiren dideoksinükleotid trifosfatların (ddNTP) kullanılmasıdır. ddNTP'lerin dNTP'den farkı iki nükleotid arasında fosfodiester bağı oluşturmak için gerekli 3'OH ucuna sahip olmamasıdır. DNA polimeraz kalıp zincire ddNTP eklediye, ddNTP'den sonra DNA polimeraz nükleotid ekleyemez dolayısıyla zincir uzaması sonlanır. ddNTP'ler modifiye edilmiş olup ddATP,ddGTP,ddCTP,ddTTP olarak her bir ddNTP'nin kendine özgü floresan boya ile işaretlenmiştir ve farklı dalga boylarında ışımaya yapmaktadırlar. ddNTP'ler hazır Big Dye(Applied Biosystems, v3.1) içerisinde bulunmaktadır. Dizileme reaksiyonu için gerekli bileşenler ve miktarları tablo 3.4'de verildi. Dizileme reaksiyonunda tek yönlü primer kullanılmasına dikkat edildi. Ayrıca PZR için kullanılan 10µM primerler 1/10 oranında steril su ile dilüe edilerek 1µM olarak DNA dizileme reaksiyonunda kullanıldı.

Tablo 3.4. DNA dizileme reaksiyonu için kullanılan bileşenler ve miktarları

Dizileme Reaksiyonu Bileşenleri	Bir Reaksiyon için Miktar (µl)
5X Tampon	2
Big Dye v3.1	2
Tek Yönlü Primer(1µM)	2
Pürifiye PZR Ürünü	2
Steril Su	2
Son Hacim	10

DNA dizileme için sekans kiti (Applied Biosystem v3.1) kullanılmıştır.

DNA dizileme reaksiyonu için PZR koşulu; thermal cyclerde (ABI 9700 Applied Biosystem) 96°C'de 1dk ön denaturasyon; 96 °C'de 10 sn, 50 °C'de 5 sn, 60 °C'de 4dk olacak şekilde 25 döngü ve +4 °C'de ∞ saklama olarak ayarlandı.

3.9 Sephadex ile Sekans Ürünlerinin Temizlenmesi

Sekans işaretleme yapılan PZR ürünlerinin primer ve serbest nükleotidlerden temizlenmesi için Sephadex ile pürifikasyon işlemine geçildi. Bu işlem için önce Sephadex G-50(GE Health Care)'den 1g sephadex hassas terazide tartıldı. 50ml'lik steril falkon tüpe konup, üzerine 14ml distile su eklenildi. Çalkalamalı inkübatörde 30 dakika çalkalandı. Ardından +4°C buzdolabında en az 30 dk bekletildi. Filtreli kolonlara (Receiver Columns 20 um, 200/Pkg(GML)) +4°C'de bekleyen falkondaki sephadexten 600µl konuldu. Kolonlar 5000rpm'de 5dakika santrifüj edildi. Toplama tüpleri atıldı. Kolonlar 1,5ml'lik steril ependorf tüplere yerleştirildi. Donmuş sephadex in tam ortasına sekans ürünü eklendi. Ardından 5000rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası temizlenen ürünler ependorf'ta biriktirildi. Bu ürünler 96-well plate'de her bir ürüne ait belirlenen kuyucuklara yüklendi. 96-well plate için kapiler jel elektroforezi yapacak 16 kapilerli ABI 3130XL cihazında plate bilgileri oluşturuldu. Plate cihaza yerleştirildi ve örnekler yürütüldü.

3.10 Dizilerin Analizi

Dizleme sonucu elde edilen elektroferogram görüntüleri ABI sequencing analysis v3.1 yazılım programında değerlendirildi. Değerlendirilen elektroferogram görüntüleri Chromas(Technelysium, Versiyon2.6.2) programında incelendi. National Center for Biotechnology Information(NCBI) BLAST(Basic Local Alignment Search Tool) aracılığıyla hedef genin (*SALL2* geni için NCBI referans dizi: NG_051069) normal insan genomundaki referans dizisine bakılarak hasta sonuçları karşılaştırıldı ve analizleri gerçekleştirildi.

3.11 Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışmaya alınan hastaların demografik, hematolojik ve genetik verileri kullanılarak, HbF yüksekliği ve *SALL2* geni bağlanma motifinde tespit edilen mutasyon ve varyasyonlar arasındaki ilişkiler yüzde(%) değerler olarak ortaya konuldu.

4. BULGULAR

4.1. Hastalara Ait Demografik ve Hematolojik Bulgular

Antalya Eğitim ve Araştırma Hatanesi Adem Tolunay Talasemi ve Kan Hastalıkları Merkezi'nde takip edilen ve çalışmamıza gönüllü katılan 76 beta talasemi majörlü (β -TM) hasta bireyden HbF'i yüksek(≥ 2) ilk 30 hasta, yürümekte olan diğer bir projemizle ortak hastalar olup (Yunus, 2016), öncelikli olarak çalışmamıza dahil olmuştur. Yine HbF'i yüksek 36 β -TM hasta ile çalışmamızı bilimsel yönden destekleyecek HbF değeri normal(≤ 2) 10 β -TM hastası kontrol olarak çalışıldı. Toplamda 76 hasta çalışılmış oldu. Çalışma grubuna ait hematolojik ve genetik bulgular tablo 4.1'de verilmektedir. Kontrol hastalarına ait bulgular tablo 4.2'de verilmiştir. Çalışma grubunu oluşturan ve HbF değeri yüksek olan 66 beta talasemi majörlü hastaların yaş ortalaması 28,2 olup, ortalama HbF değeri %10,1 iken, en küçük HbF değeri %2.1 ve en yüksek HbF değeri %61.4'dür.

Yapılan çalışmada, çalışma grubunda 8, kontrol grubunda 4 farklı beta globin gen mutasyonu tanımlandı. Tanımlanan mutasyonların tipi, alelik sıklığı ve genotipleri tablo 4.3'de verilmektedir.

HbF değeri yüksek 66 β -TM hastasının birinde (12 numaralı hasta) beta-globin gen kaynaklı varyant hemoglobin, HbKnossos(Cod27 G>T) taşımaktaydı. 12 numaralı hasta HbKnossos(Cod27 G>T/IVS I.110(G>A)) bileşik heterozigotuna sahip ve HbF'i %19.6 olarak ölçüldü. Hem çalışma grubunda hem de HbF değeri normal kontrol grubu 10 β -TM hastada HbC, HbD, HbS gibi diğer varyantlara rastlanılmadı. HbF değeri yüksek 66 β -TM hastasının %68,2 splenektomize iken kontrol grubu 10 bireyin %30'u splenektomize. HbF değeri yüksek 66 beta talasemi majörlü hasta bireylerden 1 birey Muğla, 4 birey Burdur, 1 birey Isparta, 60 birey Antalya bölgelerindendi. Kontrol grubu 10 beta talasemi majör bireyin hepsi Antalya bölgesindendi.

HbF değeri yüksek 66 hastanın cinsiyet dağılımlarına bakıldığında zaman, 29 hastanın erkek(%44), 37 hastanın kadın(%56) olduğu ve HbF değeri yüksek 66 hasta bireyin ortalama transfüzyon miktarı 1,6 Ünite/Kg, transfüzyon sıklığı 23 Gün, ortalama hemoglobin miktarı 8,9g/dl olarak gözlenmiştir.

Tablo 4.1. β-TM'li 66 Hastanın Hematolojik Parametreleri ile HBB ve SALL2 Genlerinin Analizi

HASTA NUMARASI	CİNSİYET	YAŞ	BETA GLOBİN MUTASYONU	HGB	MCV	MCH	MCHC	RDW	HbA1	HbA2	HbF	SP	D2-V1 c.2232G>A	D2-V2 c.2236C>G	D2- Bileşik Heterozigot
1	E	28,5	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,3	84,2	26,9	31,9	15,9	74,4	2,8	11,1	E	-/-	-/+	-/-
2	E	26,8	IVS.II.1 (G>A)/IVS.II.745 (C>G)	7,8	77,3	26	33,6	16,5	67,9	2,8	16,7	H	-/+	-/+	+/+
3	E	27,5	(-30T>A)/IVS.II.745 (C>G)	8,6	82	27,2	33,2	16,1	76,7	2,8	6,5	E	-/-	+/+	-/-
4	K	23,3	IVS.II.1 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	8,5	82,4	27,5	33,4	16,7	78,2	2,5	7,6	H	-/-	+/+	-/-
5	K	21,4	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	8,8	83	27,5	33,2	14,6	79	2,9	4,9	H	-/-	-/+	-/-
6	E	25,5	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.6 (T>C)	8,7	85,2	25,2	29,5	19,7	71,5	3,2	14,3	E	-/-	+/+	-/-
7	K	29,9	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,6	83,7	27	32,2	18,5	67,9	2,6	17,6	E	-/-	+/+	-/-
8	E	23,2	IVS.I.1(G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,9	78,3	25,6	32,7	19,4	70,8	3,1	16,7	H	-/-	-/+	-/-
9	E	18,3	(-30T>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,8	81,1	24,9	30,7	25,6	50,1	4,1	3,9	E	-/-	+/+	-/-
10	E	30	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.6 (T>C)	7,8	81,3	26,8	32,9	15,6	80,6	3,1	2,2	E	-/-	+/+	-/-
11	K	40,6	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.6 (T>C)	8,1	86,9	27	31	16,7	78	3,1	4,8	E	-/-	-/+	-/-
12	K	41,3	HBKNOSSOS/IVS.I.110 (G>A)	8,5	77,1	24,6	31,9	29,9	69	2,6	19,4	E	-/-	-/+	-/-
13	K	37,3	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	7,8	78,8	25,9	32,9	16,5	78,6	3	3,1	E	-/-	-/+	-/-
14	K	63,3	(-30T>A/-30T>A)	8,4	76,7	22,7	29,5	28,6	57,4	4,6	30,2	E	-/-	-/+	-/-
15	K	23,1	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10	85,2	28,3	33,2	17,3	77,6	3,2	3,8	E	-/-	-/+	-/-
16	K	27,3	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10,1	86,6	28,2	32,5	14,7	79,2	2,7	4,5	E	-/-	-/+	-/-
17	K	38,2	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10,1	87,1	29,2	33,5	15,4	80,2	2,6	2,1	E	-/-	-/+	-/-
18	E	26	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,3	87,8	28,4	32,3	14,4	80,3	2,9	2,6	E	-/-	-/+	-/-
19	E	28	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,8	71,8	22	30,6	36	73,6	5,6	7	E	-/-	-/+	-/-
20	K	25,2	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8	74,7	22	29,5	31	27	7,9	61,4	E	-/-	+/+	-/-
21	E	21,8	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,5	75	25,7	34,2	27,4	74,1	3	12,1	H	-/-	+/+	-/-
22	E	20,6	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,5	79,8	27,1	34	14,8	78,6	2,8	5,8	H	-/-	+/+	-/-
23	K	29,9	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,6	83	28,4	34,2	14,2	82,6	2,9	2,67	H	-/-	+/+	-/-
24	E	21,5	FSC 44(-C)/FSC 44(-C)	8,1	78,8	26,2	33,2	15,3	73,8	3	11,4	H	-/-	-/+	-/-
25	K	30,3	(-30T>A)/IVS.II.1 (G>A)	8,5	77,3	25,4	32,9	19,8	68,6	3,6	18,7	H	-/-	+/+	-/-
26	K	38,6	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	9,2	78,6	24,3	30,9	27,2	77,9	3,9	5,9	E	-/-	-/+	-/-
27	K	40,2	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.110 (G>A)	8,4	81,7	25,5	31,3	21,2	74,8	2,9	8	E	-/-	-/+	-/-
28	K	24,2	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	7,4	84,4	27,4	32,5	17,5	72,4	2,9	4,6	E	-/-	+/+	-/-
29	E	27,9	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,1	84,8	27,1	31,9	14,8	79,5	2,9	5,1	E	-/-	-/+	-/-
30	K	25,1	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.110 (G>A)	8,6	89,3	26,8	30,1	17,1	78,7	3,3	4,7	E	-/-	+/+	-/-

K:Kadın, E:Erkek, HGB:Hemoglobin, MCV:Ortalama eritrosit hacmi, MCH:Ortalama eritrosit hemoglobini, MCHC: Ortalama eritrosit konsantrasyonu,RDW: Eritrosit dağılım genişliği,HbA1(%):Erişkin insan hemoglobini 1, HbA2(%):Erişkin insan hemoglobini 2, HbF(%):Fetal hemoglobin, SP:Splenektomi durumu E:Evet splenektomi yapılmış H:Hayir splenektomi yapılmamış, D1:Domain 1, D2-V1:Domain 2-Varyant 1, D2-V2:Domain 2-Varyant 2, bileşik heterozigot:D2-V1 ve D2-V2, D3:Domain 3. -/-: normal genotip, +/- heterozigot, +/+ homozigot. Antalya Adem Tolunay Talasemi ve Kan Hastalıkları Merkezi Laboratuvarlarındaki hematolojik parametreler için referans aralıkları: HGB:13.6-17.2g/dl, MCV:80.7-95.5fl, MCH:27.2-33.5pg/HÜCRE, MCHC:32.7-33.5g/dl, RDW:11.6-14.6(%).

Tablo 4.1. devam β -TM'i 66 Hastanın Hematolojik Parametreleri ile *HBB* ve *SALL2* Genlerinin Analizi

HASTA NUMARASI	CİNSİYET	YAŞ	BETA GLOBİN MUTASYONU	HGB	MCV	MCH	MCHC	RDW	HbA1	HbA2	HbF	SP	D2-V1 c.2232G>A	D2-V2 c.2236C>G	D2- Bileşik Heterozigot
31	K	22	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,2	77,6	26,3	34,2	15,2	81,6	2,6	2,3	E	-/-	+/+	-/-
32	K	19,9	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	8,9	71,1	23,8	33,5	34	77,8	3,7	7,5	E	-/-	+/+	-/-
33	K	27	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	10	79,4	26,6	33,5	18	78,7	2,5	8,6	E	-/-	+/+	-/-
34	E	36,3	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10,6	83,2	27,8	33,4	16,2	78,1	2,8	5,6	H	-/-	+/+	-/-
35	E	18,3	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,1	83,5	27,6	33	18,5	76,1	2,7	9,5	E	-/-	+/+	-/-
36	K	22,5	IVS.II.1 (G>A)/IVS.II.745 (C>G)	10,2	82,7	28,1	34	14,3	81,4	2,4	3,5	E	-/-	+/+	-/-
37	K	24,3	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,4	81	27,6	34,1	14,7	80	2,7	3,4	H	-/+	+/+	+/+
38	E	18,5	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,9	79,4	27,6	34,7	15,5	80,8	2,6	3,6	E	-/-	+/+	-/-
39	E	25,4	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.745 (C>G)	6,8	81,2	28,8	35,5	18,3	80	2,7	4	H	-/-	+/+	-/-
40	K	31	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,6	81,1	26,9	33,2	16,6	78,7	2,7	4,7	H	-/-	+/+	-/-
41	K	20,8	IVS.I.6 (T>C)/IVS.I.6 (T>C)	7,9	51,8	17,3	33,4	29,8	76,4	7,7	5,6	E	-/+	+/+	+/+
42	K	19,2	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10,5	80,9	27,9	34,5	13,7	77,4	2,6	7,6	H	-/-	+/+	-/-
43	E	28,3	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	7,8	77,8	26,6	34,2	17	77	2,7	9,8	H	-/-	+/+	-/-
44	K	35,7	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,9	86,9	28,1	32,3	16,9	73,3	2,8	14,1	E	-/-	+/+	-/-
45	K	34,1	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>>A)	8,9	83,9	27,9	33,2	15,9	76,1	2,6	9,7	E	-/-	+/+	-/-
46	K	26,2	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>>A)	10,1	81,8	27,1	33,2	22,7	69,2	2,5	17,8	E	-/-	+/+	-/-
47	E	26,3	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10,1	84,2	27,7	32,9	17,4	78,5	2,7	6	E	-/-	+/+	-/-
48	K	25,7	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,2	82,1	26,6	32,4	17,5	77,4	2,6	7,6	E	-/-	+/+	-/-
49	K	21,8	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,4	85,5	28,5	33,3	14,8	80,1	2,7	2,7	E	-/-	+/+	-/-
50	E	35,7	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.1 (G>A)	9,7	80	25,1	31,3	24	61,3	3,3	25,2	E	-/-	+/+	-/-
51	K	36,3	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,9	84,4	28,2	33,3	18,2	73,1	2,7	12,8	E	-/-	+/+	-/-
52	E	19,4	IVS.I.1 (G>A)/IVS.I.1 (G>A)	9,3	78,3	27,2	34,8	17,4	76,3	2,6	10,8	H	-/-	+/+	-/-
53	K	25,2	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	7,9	79,8	28,3	35,5	14,1	81,1	2,8	2,4	H	-/-	+/+	-/-
54	K	32,5	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10,5	84,7	31,4	37,1	19,3	76,9	2,7	6,3	E	-/-	+/+	-/-
55	E	26,3	IVS.I.110 (G>A)/IVS.II.745 (C>G)	9,2	78,1	26,6	34,1	14,1	81,9	2,5	2,2	H	-/-	+/+	-/-
56	E	21,6	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,5	80,8	27,7	34,3	14,2	81,1	2,8	3,8	H	-/-	+/+	-/-
57	E	20,6	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,1	79,5	27,6	34,7	14,9	82,5	2,7	2,8	H	-/-	+/+	-/-
58	K	20	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,5	84,7	28	33	15,4	80,7	2,9	2,5	E	-/-	+/+	-/-
59	E	36,9	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,1	83,7	27,5	32,9	17,6	69,5	2,7	17	E	-/-	+/+	-/-
60	E	31,7	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,2	75,4	25,5	33,8	27,5	62,8	3	25	E	-/-	+/+	-/-
61	K	45,1	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10,2	82,5	26,9	32,6	17,2	72	2,8	10,5	E	-/-	+/+	-/-
62	E	29,4	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,9	83,2	25,9	31,1	19,3	65,8	3,3	20,1	E	-/-	+/+	-/-
63	E	22,8	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,2	85,5	28,4	33,2	19,1	74,8	3,1	12,5	E	-/-	+/+	-/-
64	E	37	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8,8	81,9	27,2	33,1	16	72	3	12,3	E	-/-	+/+	-/-
65	K	20,5	IVS.II.745 (C>G)/IVS.II.745 (C>G)	8,5	76,7	26,6	34,7	16,9	79,1	2,9	7,9	H	-/-	+/+	-/-
66	K	23,4	c.307>A/IVS.I.110 (G>A)	9,5	85,4	28,6	33,5	15,1	80,8	2,8	3,5	H	-/-	+/+	-/-

K:Kadın, E:Erkek, HGB:Hemoglobin, MCV:Ortalama eritrosit hacmi, MCH:Ortalama eritrosit hemoglobini, MCHC: Ortalama eritrosit hemoglobin konsantrasyonu,RDW: Eritrosit dağılım genişliği,HbA1 (%):Erişkin insan hemoglobini 1, HbA2(%):Erişkin insan hemoglobini 2, HbF(%):Fetal hemoglobin, SP:Splenektomi durumu E:Evet splenektomi yapılmış H:Hayır splenektomi yapılmamış. D1:Domain 1, D2-V1:Domain 2-Varyant 1, D2-V2:Domain 2-Varyant 2, bileşik heterozigot:D2-V1 ve D2-V2, D3:Domain 3. -/- normal genotip, +/- heterozigot, +/+ homoziyot. Antalya Adem Tolunay Talasemi ve Kan Hastalıkları Merkezi Laboratuvarlarındaki hematolojik parametreler için referans aralıkları: HGB:13.6-17.2g/dl, MCV:80.7-95.5fl, MCH:27.2-33.5pg/HÜCRE, MCHC:32.7-, RDW:11.6-14.6(%).

Tablo 4.2. Kontrol Grubu β -TM'i 10 Hastanın Hematolojik Parametreleri ile *HBB* ve *SALL2* Genlerinin Analizi

HASTA NUMARASI	CİNSİYET	YAŞ	BETA GLOBİN MUTASYONU	HGB	MCV	MCH	MCHC	RDW	HbA1	HbA2	HbF	SP	D2-V1 c.2232G>A	D2-V2 c.2236C>G	D2- Bileşik Heterozigot
1	K	29,7	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,7	82,1	27,5	33,5	16,8	81,1	2,5	2	H	-/-	+/+	-/-
2	K	20,7	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	10,3	82,2	27,4	33,4	15,5	81	2,7	1,9	H	-/-	-/-	-/-
3	E	24,3	IVS.II.1 (G>>A)/IVS.II.1 (G>A)	10,4	80,9	27,3	33,8	14,6	78	2,3	1,5	E	-/-	+/+	-/-
4	K	23,4	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	8	79	26,5	33,5	18,6	82,6	2,6	0,9	E	-/-	+/+	-/-
5	K	18,4	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,8	85	28,7	33,8	13,7	81,5	2,6	1,6	H	-/-	-/-	-/-
6	K	21,7	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	11	78,9	27,3	34,6	15,4	82,20	2,40	1,50	H	-/-	+/+	-/-
7	E	37,3	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,5	81,1	27,6	34	17,3	79,90	2,50	1,70	E	-/-	+/+	-/-
8	K	24,8	IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,3	80,8	28,4	35,2	14,3	82,7	2,8	1,90	H	-/-	+/+	-/-
9	E	31,4	IVS.I.110 (G>A)/FSC-5 (-CT)	8,9	79,6	28,2	35,5	16	82,7	2,6	1,50	H	-/-	+/+	-/-
10	K	22,0	IVS.I.1 (G>A)/IVS.I.110 (G>A)	9,2	82,5	28,7	34,8	14,1	83,6	2,8	1,60	H	-/-	-/-	-/-

K:Kadın, E:Erkek, HGB:Hemoglobin, MCV:Ortalama eritrosit hacmi, MCH:Ortalama eritrosit hemoglobini, MCHC: Ortalama eritrosit konsantrasyonu,RDW: Eritrosit dağılım genişliği,HbA1(%):Erişkin insan hemoglobini 1, HbA2(%):Erişkin insan hemoglobini 2, HbF(%):Fetal hemoglobin, SP:Splenektomi durumu E:Evet splenektomi yapılmış H:Hayır splenektomi yapılmamış, D1:Domain 1, D2-V1:Domain 2-Varyant 1, D2-V2:Domain 2-Varyant 2, bileşik heterozigot:D2-V1 ve D2-V2, D3:Domain 3. -/-: normal genotip, +/- heterozigot, +/- heterozigot. Antalya Adem Tolunay Talasemi ve Kan Hastalıkları Merkezi Laboratuvarlarındaki hematolojik parametreler için referans aralıkları: HGB:13.6-17.2g/dl, MCV:80.7-95.5fl, MCH:27.2-33.5pg/HÜCRE, MCHC:32.7-33.5g/dl, RDW:11.6-14.6(%).

Tablo 4.3. Tanımlanan beta globin mutasyonlarının tipi, alelik sıklığı ve genotipleri

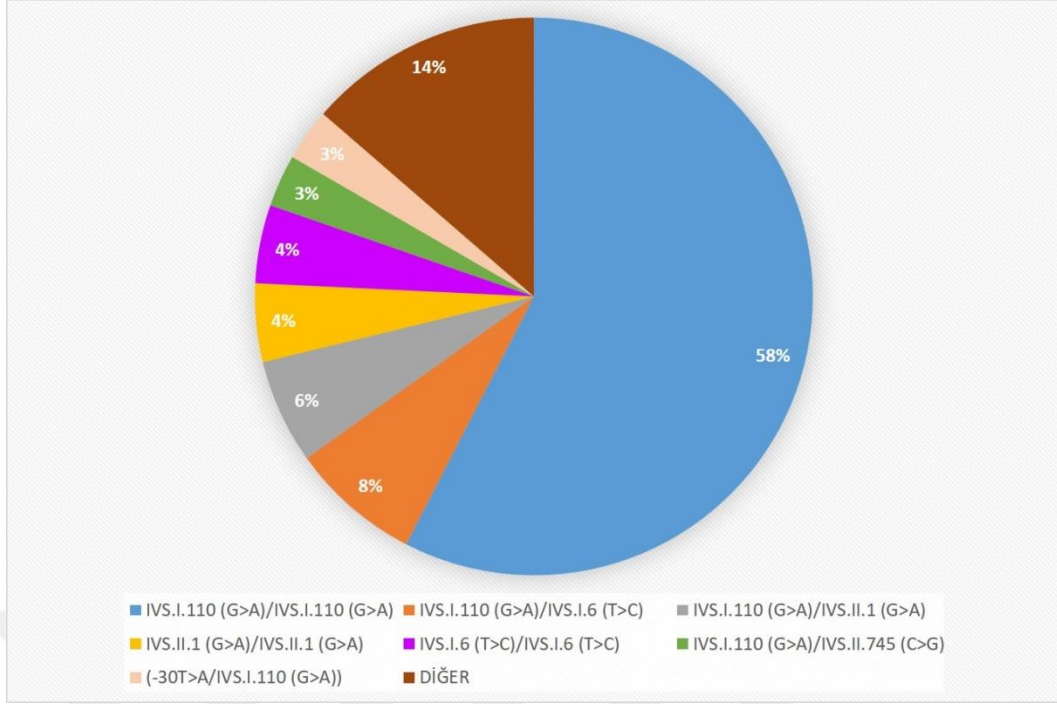
Sıra	Mutasyon Tipi	Alel(n)	%n	Homozigot(n)	Bileşik Heterozigot(n)
1	IVS.I.110 (G>A)	89	67,42	38	18
2	IVS.II.1 (G>A)	14	10,6	3	6
3	IVS.I.6 (T>C)	11	8,33	3	5
4	IVS.II.745 (C>G)	6	4,55	1	4
5	-30T>A	6	4,55	1	4
6	IVS.I.1 (G>A)	3	2,27	1	1
7	FSC 44(-C)	2	1,52	1	-
8	Hb Knossos(cod27 G>T)	1	0,76	-	1
	Toplam	132	100	48	39

4.2. Hastaların *HBB* Geni Analiz Sonuçları

Hastaların *HBB* geni mutasyon çeşitlerine bağlı genotipler ve yüzdesel sıklığı daire grafiğinde gösterilmiştir(Şekil 4.1). En sık gözlenen mutasyon %67,4 ile IVS.I.110 (G>A) ve genotip ise %58 ile IVS.I.110 (G>A)/IVS.I.110 (G>A) homozigot genotipi belirlendi.

Her biri farklı tek bireyde olan ve daire grafiğinde %14 oranında gösterilen ;

- IVS.II.1 (G>A)/IVS.II.745 (C>G),
- -30T>A/IVS.II.745 (C>G)
- IVS.I.1 (G>A)/IVS.I.110 (G>A),
- FSC 44(-C)/FSC 44(-C)
- -30T>A/IVS.II.1 (G>A)
- -30T>A/-30T>A
- IVS.I.1 (G>A)/IVS.I.1 (G>A)
- HbKnossos (Cod27 G>T)/IVS I.110 (G>A))
- IVS.II.745(C>G)/IVS.II.745(C>G) genotipleri diğer genotipler olarak adlandırılmıştır.



Şekil 4.1. 66 β -TM hastanın beta globin mutasyonlarına bağılı görülen genotipleri ve yüzdesel olarak görülme sıklığı

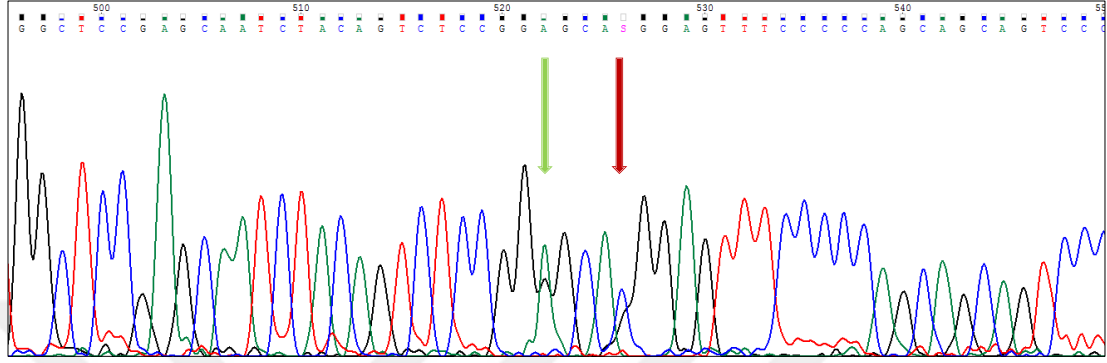
4.3. *SALL2* Geni Bağlanma Motifi Bölgesinin Mutasyon Tarama Sonuçları

HbF değeri yüksek olan 66 β -TM hastasında, *SALL2* geni Ekzon 2’de bulunan ve üç ayrı domain veya bölge şeklinde; D1, D2 ve D3 olarak isimlenen ve hedeflenen bağlanma domainleri, Sanger DNA dizileme ile analiz edildi. Evrimsel olarak hemen hemen tüm türlerde korunmuş olan *SALL2* transkripsiyon faktör geninin bağlanma bölgesinde D1 ve D3 bölgelerinde herhangi bir mutasyon ve polimorfizme rastlanmadı.

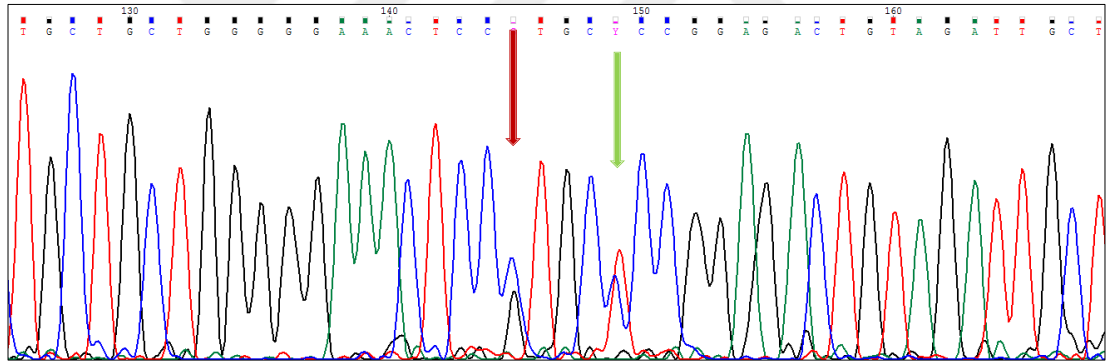
4.4. *SALL2* Geni D2 Bölgesi Mutasyon Taraması Sonuçları

HbF değeri yüksek 66 hastanın *SALL2* geni bağlanma motifi bölgesi, D2 bölgesinin DNA dizi analizi sonucu değerlendirildiğinde iki farklı değişimin olduğu tespit edildi. Bu değişimlerden biri rs61746515 G>A varyasyonu olup, g.18721G>A, c.2232G>A, p.Gly744=, Glisin Glisin sinonim değişimiydi. Diğer değişim ise rs1263810 C>G sonucu (g.18725C>G, c.2236C>G, p.Gly746Arg) olup, amino asit değişimine neden olan mutasyondur. Bu mutasyon için HUGO Genbank’ta referans dizide normal C allel olarak verilmekte olup, buna göre CC genotipi 6 hastada (%9.09), CG genotipi 34 hastada (%51.51) ve GG genotipi 26 hastada (%39.39 sıklıkla) tespit edildi. rs1263810 C>G değişime ait normal, heterozigot ve homozigot

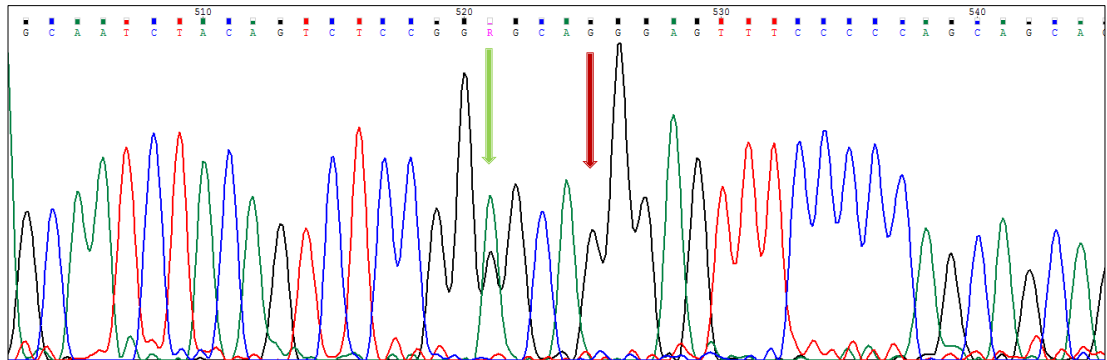
ilerisinde yerleşen rs1263810 C>G (g.18725C>G, c.2236C>G, p.Gly746Arg) varyasyonunun bileşik heterozigot genotipine sahiptiler. Bu hastaların anne-babaları çalışılmadığı için mutasyonların cis veya trans allel üzerinde yer alıp almadıkları belirlenmedi. Bileşik heterozigota sahip 2, 37 ve 41 numaralı hastaya ait elektroferogram görüntüsü Şekil 4.5, Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8’de verilmektedir.



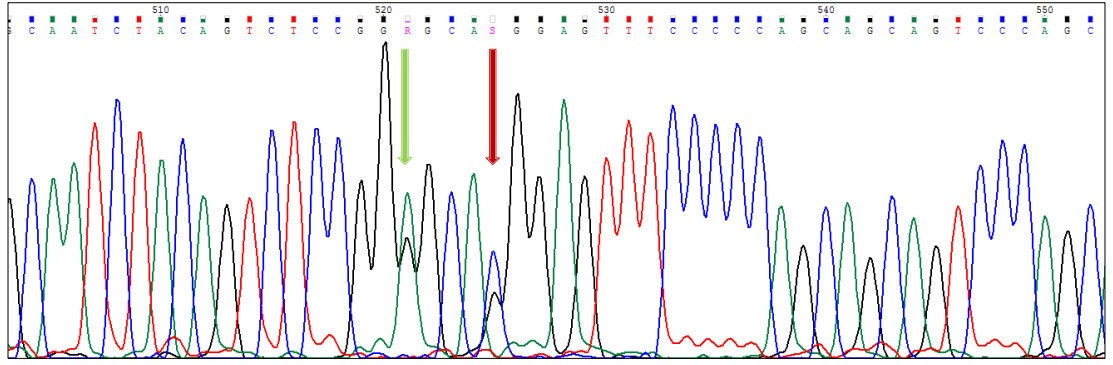
Şekil 4.5. 2 numaralı hastanın *SALL2* geni 2.Ekzon D2 bölgesinin ileri dizisinde rs1263810 C>G sonucu (g.18725C>G, c.2236C>G, p.Gly746Arg)(kırmızı ok) ve rs61746515 G>A sonucu (g.18721C>T, c.2232C>T,p.Gly744=)(yeşil ok) compound (bileşik heterozigot) genotip



Şekil 4.6. 2 numaralı hastanın *SALL2* geni 2.Ekzon D2 bölgesinin geri dizisinde rs1263810 C>G sonucu (g.18725C>G, c.2236C>G, p.Gly746Arg)(kırmızı ok) ve rs61746515 G>A sonucu (g.18721G>A, c.2232G>A,p.Gly744=)(yeşil ok) compound(bileşik heterozigot) genotip



Şekil 4.7. 37 numaralı hastanın *SALL2* geni 2.Ekzon D2 bölgesinin ileri dizisinde rs1263810 C>G sonucu (g.18725C>G, c.2236C>G, p.Gly746Arg)(kırmızı ok) ve rs61746515 G>A sonucu (g.18721G>A, c.2232G>A, p.Gly744=)(yeşil ok) compound(bileşik heterozigot) genotip



Şekil 4.8. 41 numaralı hastanın *SALL2* geni 2.Ekzon D2 bölgesinin ileri dizisinde rs1263810 C>G sonucu (g.18725C>G, c.2236C>G, p.Gly746Arg)(kırmızı ok) ve rs61746515 G>A sonucu (g.18721G>A, c.2232G>A, p.Gly744=)(yeşil ok) compound(bileşik heterozigot) genotip



5. TARTIŞMA

Beta(β) talasemi hemoglobinopatilerden olup, dünya çapında en yaygın görülen, otozomal resesif kalıtılan tek gen hastalıklarından biridir (Weatherall ve Clegg, 2001). Dünya popülasyonunun yaklaşık %7'si bir globin gen mutasyonu taşıyıcısıdır. Bazı coğrafik bölgelerdeki taşıyıcı sıklığı %25'lere, hatta daha korunmuş coğrafik bölgelerde %70'lere kadar yükselme eğilimi göstermektedir. Türkiye'de ise ilk hemoglobinopati çalışmaları 1945 yıllarında Muzaffer Aksoy ile başlamıştır (Aksoy ve ark., 1958).

Ülkemizde hemoglobinopatilere ilişkin yapılan çalışmalar günümüze kadar, yöntem birliği olmaksızın birkaç büyük ildeki hastanelerde çalışılmıştır. Ayrıca bölgesel verilerin de kısıtlı olmasıyla en sağlıklı verinin beta talasemiye ait olduğu belirtilmiştir. Beta talasemi ülkemizde %2,1 sıklıkla görülür. Ülkemizde yapılan bölgesel çalışmalarda özellikle Akdeniz bölgesinin güneyi ve akdeniz bölgesinin doğuya bağlandığı yerlerde beta talasemi sıklığı %0,7 ile %13 arasında değişmekte olup, en sık gözlenen mutasyonun %48 oranında IVS.I.110 (G>A) olduğu bildirilmektedir (Keser ve ark., 2004). Bu çalışmamızda ise β -TM hastalarında en sık görülen mutasyonun %67 sıklıkla IVS.I.110 (G>A) ve bu mutasyonun homozigot genotipinin de %58 sıklıkta olduğu görülmüştür. Bu da bize Antalya ve Akdeniz bölgesinde olduğu gibi ülkemizde de en sık gözlenen mutasyonun IVS.I.110 (G>A) olduğunu göstermektedir. IVS.I.110 (G>A) mutasyonun sık olması β -TM hastalarının gelecekte CRISPR/Cas9 gibi yeni tedavi seçeneklerinde, genetik ve epigenetik olarak düzenlenmesinde önemli bir hedef oluşturabilir. Örneğin, IVS.I.110 (G>A) için homozigot olan 13 hastanın HbF için etkili olan XmnI polimorfizmini taşımamaları (Yunus, 2016), β -TM hastalarının büyük bir grubunda HbF yüksekliğinde *SALL2* geni gibi modifiye edici genlerin rol oynayabileceğini de göstermektedir.

Beta talasemideki genetik heterojenite, farklı klinik bulgular ile farklı fenotipte bireyler oluşturur. Bu klinik farklılıklar, genellikle asemptomik formu olan beta talasemi minörden ciddi transfüzyon bağımlısı β -TM'e kadar fenotipleri içermektedir. β -TM fenotipinde genellikle yaşamın ilk yıllarında ciddi hemolitik

anemi görülür. Hasta bireyler olup, düzenli transfüzyon ve dikkatli tıbbi müdahale gerektirir (Karimi ve ark., 2014).

β -TM hastalarının transfüzyon ihtiyacını azaltmak için çeşitli klinik ve laboratuvar araştırmaları yapılmaktadır. Bu araştırmalar kemik iliği transplantasyonundan gen tedavi protokollerine kadar yaşamsal riskleri yüksek birçok araştırma ve çalışmaları kapsamaktadır (de Dreuzy ve ark., 2016). Son yıllarda hasta için riski düşük ve yan etkisi olmayan tedavi seçenekleri gündeme getirilmiştir. İnsan genom projesinin her geçen gün daha da aydınlatılması, hastalıkların tedavisinde, hastalıkla ilgili gen veya lokusların genetik ve epigenetik düzenlemeleri ön plana çıkmaya başlamıştır. Tek gen hastalığı olan hemoglobinopatilerde de aynı mutasyonu taşıyan bireylerdeki klinik farklılıkların dikkat çekmesi, klinik etkiyi modifiye eden gen ve lokusların varlığını işaret etmiştir (Thein, 2005). Bu çerçeveden bakışla, beta talasemi majör hastalarında HbF indüksiyonuna yönelik yapılan çalışmalar gündeme gelmiştir.

Beta globin lokusunda γ (gama) globinin embriyonik dönemde sentezi başlar, fetal dönemde sentezi artar ve doğumdan sonra %1-2 oranında görülmektedir (Higgs ve ark., 2012). γ globinin sentezlenmesini regüle eden genetik ve epigenetik mekanizmalar devreye sokulması ile mutant beta globinin baskılanması, azaltılması ve alfa zincirlerinin oransal artışının azaltılması ve çökmesinin engellenerek, HbF oluşumunun artırılması temel hedeflerden biri olmuştur. Bunun gerçekleştirilmesi için farklı farmakolojik ajanlar HbF için indükleyici olarak kullanılmışlardır (de Dreuzy ve ark., 2016). Ancak bireysel genetik yapının etkileri ve kullanılan kimyasalların yan etkileri dikkate alındığında, HbF indüksiyon yolağında görev alan transkripsiyon faktörleri, aktivatörleri ve inhibitörleri hedef haline gelmişlerdir.

Sheehan, Crosby ve arkadaşlarının (2014) beta-globin zincirinde kodon 6'daki A-T mutasyonu ile karakterize orak hücreli anemili (OHA) hastalarda tüm ekzon taramasında, *SALL2* geninde P840R varyantına sahip hastalarda, hidroksiüre (HU)'ye yanıt olarak HbF seviyesindeki değişimin arttığı gösterilmiştir. *SALL2* geninin HbF indüksiyonunda modifiye edici bir gen olacağı ileri sürülmüştür. Bugüne kadar da literatürde β -TM hastalarında *SALL2* geni ile ilgili bir çalışma yer almamaktadır (06.06.2017 tarihli literatür taraması dahil). Buradan yola çıkarak, HbS'e neden olan GAG>GTG mutasyonunun, beta-globin geni üzerinde olmasından dolayı, HbF seviyesi yüksek olan β -TM'li hastalarda, modifiye edici *SALL2* geninin

bağlanma motifi bölgesinde mutasyon olup olmadığını açıklığa kavuşturmayı planladık. Bunun için araştırmamızda; HbF seviyesi yüksek(%2>) olan β -TM'li hastalarda, *SALL2* geninin bağlanma motifindeki HbS'li hastalardaki gibi tanımlanmış veya olası tanımlanmamış mutasyonları taramayı amaçladık.

İnsan Genom Projesi (HUGO) çalışmaları ve GenBank verilerinden yola çıkarak, kromozom 14'ün q11.2-q12 bölgesinde 16.137 bp alanda yerleşen *SALL2* geni 2 ekzon ve 1 introndan oluştuğu, 1007 aminoasitlik protein kodladığı, proteinin MW=105.3 KDa olduğu, proteinin hematogenezin de içinde bulunduğu insan gelişiminde rol oynayan bir transkripsiyon faktörü olduğu görülmektedir (<http://www.genecards.org/>, <http://www.genenames.org/> Erişim Tarihi: 23Mart 2017).

SALL2 transkripsiyon faktörünün insan gelişim basamaklarında hemoglobin tetramerinin şekillenmesinde işe karışan, özellikle HbF'i baskılayan *BCL11A*, *KLF1*, *HDAC1/2* gibi faktörlerle ilişkisi olduğu, bu ilişkiyi bağlanma domainleri aracılığı ile gerçekleştirdiği, bu domainlerde meydana gelecek değişikliklerin HbF'i baskıdan kurtaracağı ve HbF seviyesinin artacağını düşündürmüştür. Bu nedenle evrimsel süreçte çok iyi korunmuş olan *SALL2* genindeki her mutasyon ve varyasyon HbF düzeyinin artışı ile ilişkilendirilebilecektir.

Biz de bu çalışmamızda, *SALL2* geni bağlanma motiflerini (domainlerini) 3 farklı PZR ampliconu(D1, D2 ve D3) olarak çoğaltıp, DNA dizileme yöntemi ile inceledik.

5.1. *SALL2* Geni D1 Bölgesi Mutasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

SALL2 geni bağlanma motifi D1 bölgesinin DNA dizileme analizi sonucunda çalışılan 66 hasta ve 10 kontrol hastasında herhangi bir mutasyon ve varyasyon tespit edilmedi. Bu bulgu bize genin korunmuş ve sistem biyolojisi bakımından bir öneme sahip olduğunu göstermektedir. Güncel literatür taramasında da beta-talasemi hastaları ile ilgili bir çalışmanın yer almadığı, bu bulgunun populasyon genetiği açısından önemli olduğunu düşünmekteyiz.

5.2. *SALL2* Geni D2 Bölgesi Mutasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

SALL2 geni D2 bölgesi DNA dizileme analizi için değerlendirmeye alınan 66 hastada iki farklı varyasyon tanımlandı.

D2 domaininde tanımlanan 2 varyasyondan birincisi; rs61746515 (g.18721G>A, c.2232G>A, p.Gly744=) varyasyonu olup, tezimizde D2-V1 varyantı olarak isimlendirildi (Tablo 4.1). Çalışmaya alınan hastalardan 63'ünde (%95.46) GG, 3'ünde (%4.54) GA heterozigot genotipi tespit edildi. Yapılan alelik frekans hesaplamasında G alelin %97,72 A alelin ise %2,28 sıklıkta görüldüğü ortaya konuldu. Bu veriler bize, *SALL2* geninin evrimsel süreç içinde çok iyi korunmuş olmasına rağmen, değişen çevresel koşullara göre korunmuş olan bağlanma motiflerinin düşük sıklıkta da olsa değişebileceğini göstermektedir. Literatürde bu varyasyon glisin-glisin sinonim varyantı olarak tanımlanmış, protein düzeyinde *SALL2*'de bir etkisi beklenmemektedir. Ancak, DNA düzeyindeki pürin-pürin (G>A) transisyonunun, *SALL2* geninin transkripti üzerinde etkili olup olamayacağı henüz açıklık kazanmamıştır. Ayrıca bu değişim, 3 hastada da hemen 3 nükleotid yakınında yer alan rs1263810 C>G (g.18725C>G) Gly746Arg mutasyonu ile bileşik heterozigot olarak tespit edildi (Tablo 4.1). Bu hastaların anne-babaları çalışılmadığından, bu iki değişimin cis veya trans alel konumunda olup olmadıkları belirlenmedi. Bu üç hastanın ortalama HbF düzeylerinin 8.6 olduğu, her üçünün de rs61746515 (g.18721G>A, c.2232G>A, p.Gly744=) ve rs1263810 C>G (g.18725C>G) Gly746Arg değişimlerini bileşik heterozigot olarak taşıdıkları görülmektedir. Hasta sayısı ve gruplama kriterleri homojenize edildiğinde, bu birlikteliğinin önemi daha iyi tartışılabilir.

D2 domaininde tanımlanan varyasyondan ikincisi ise; rs1263810 (g.18725C>G, c.2236C>G, p.Gly746Arg) varyasyonu olup, tez yazımında D2-V2 varyantı olarak isimlendirildi (Tablo 4.1). Bu yanlış anlamlı (missense) mutasyona bağlı olarak 6 hastanın homozigot CC, 34 hastanın CG heterozigot ve 26 hastanın ise GG homozigot genotiplerine sahip olduğu görüldü. HUGO çerçevesinde ve GenBank verilerinde C alelinin yabancıl tip (wild type) olduğu, G ve A alellerinin mutant tipler olduğu belirtilmiştir. Ancak, vaka sayısının az olmasına karşın, 66 hastanın genotipik bulguları sırasıyla, CC, CG, GG %9.09, %51.51, %39.39 iken, C alelinin frekansını %34,84 ve G alelinin ise %65,16 olduğunu ortaya koymaktadır. Hem çalışma grubundaki 66 β -TM hastalarında hem de HbF düzeyi $\%2 \leq$ olan kontrol grubu β -TM hastalarında mutant A aleline rastlanılmamıştır. Ayrıca kontrol grubunda, CC genotipine 2 hastada, CG genotipine 1 hastada, GG genotipine 7 hastada rastlanılmıştır. Bu veriler bize, G alelinin Türk populasyonunda daha yaygın

olduğunu göstermekle birlikte, HbF'i normal sınırlarda olan sağlıklı bireylerde bu değişim oranına bakılması düşüncesindeyiz. Çünkü biz HbF'i yüksek β -TM'li hastalarda baktığımız için G mutant aleli ile ortaya çıkan glisin arjinin değişimi (c.2236C>G, p.Gly746Arg), HbF'i indükleyen bir mutasyon olarak değerlendirilebilir. Ayrıca, SALL2 proteininin korunmuş, sekans spesifik DNA bağlayan bir kritik transkripsiyon faktörü olduğu göz önüne alındığında, bağlanma motifindeki 746. pozisyondaki glisin aminoasitinin normal biyokimyasal koşullarda, non-polar (nötral) alifatik R-gruba sahip olduğu için genelde proteinin iç kısmında lokalize olduğu buna karşın mutasyonla dönüştüğü arjinin amino asitinin ise pozitif yüklü ve bazik olduğu, R-grubunun genelde proteinin dış kısmında yerleştiği, proteine fleksibilite (esneklik) kazandırma gibi biyokimyasal özellikler yüklediği görülmektedir (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Class/Structure/aa/aa_explorer.cgi Erişim Tarihi: 10 Nisan 2017). Literatürde SALL2 proteini fonksiyon çalışmaları henüz bulunmamasına rağmen, bağlanma domaininde meydana gelen bu değişikliğin hematopoezde, HbF indüksiyon yolağında etkili olabileceğini göstermektedir. Çünkü arjinin amino asitinin proteine esneklik kazandırması, SALL2 proteinin BCLL11A, KLF1 ve HDAC1/2 gibi γ globin sentezini baskılayan faktörlere bağlanmada sorun yaşayacağı ve böylece HbF'i baskılayamadığı için β -TM'li hastalarda HbF artışına sebep olacağı fikrini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla bu değişimin SALL2 proteini ve onun BCLL11A, KLF1 ve HDAC1/2 gibi proteinlerle etkileşiminin HbF üzerine etkisini göstermek için ek fonksiyon çalışmalarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle çalışmamız, yeni araştırma konularına ve alanlarına zemin oluşturmakta, bilime ve literatüre önemli katkı sunmaktadır.

Literatür taramasında Hepatit C Virus (HCV)nun HCV1b genotipi ile enfekte Çinli 105 karaciğer hastasında yapılan tüm ekzom taramasında 64.449 SNP bulunmuştur. Aynı HCV1b genotipine sahip hastalarda HCV spontan klirensi ve karaciğere bağlı hastalıkların ilerleyişini etkileyen en önemli 20 SNP içerisinde çalışmamızda bulduğumuz SALL2 geni 2.Ekzon D2 bölgesinde rs1263810 (g.18725C>G, c.2236C>G, p.Gly746Arg) varyasyonu da yer almış ve istatistiksel olarak çalışma grubundaki hastalarda karaciğere bağlı hastalıkların ilerleyişi arasında anlamlı bir ilişki bulunmuştur (You ve ark., 2014). Bu mutasyona, rs1263810 (g.18725C>G, c.2236C>G, p.Gly746Arg), SALL2, sekans spesifik DNA bağlayan bir transkripsiyon faktör aktivitesine sahip olduğundan, bağlanma motifindeki mutasyonlar veya

motifin tümünden kaybı, ilgili doku ve organlarda ciddi klinik tablolara neden olmaktadır. Örneğin erken stop(dur) kodon mutasyonuna (c.85G>T) bağlı olarak, bağlanma motifi bulunmayan SALL2 proteini, embriyonik göz gelişiminde, dünyada çocuklarda görme kaybına neden olan en önemli hastalıklardan biri olan koloboma neden olduğu bildirilmektedir (Kelberman ve ark., 2014).

5.3. SALL2 Geni D3 Bölgesi Mutasyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Çalışmamızın hipotezinde çıkış noktası olan ve 130 HbS (OHA) hastalarında yapılan tüm ekzon çalışmasında, genelde 25 varyant bulunmuş, bunlardan 13 tanesinin hidroksiüre indüksiyonunda yüksek HbF ile yanıt gösterdiği 13 varyanttan birinin de SALL2 genindeki rs61743453 bölgesindeki P840R değişiminin ise en yüksek HbF yanıtı verdiği görülmüştür (Sheehan ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda yer alan hasta grubumuz HbS ilişkili orak hücre anemili değil beta talasemi majör olup, HbF'i yüksek 66 bireyde ve 10 kontrol grubunda rs61743453 P840R varyantına rastlanılmamıştır. Bu varyantın orak hücre anemili hastalarda bulunması, bir ko-segregasyon oluşturduğu fikrini desteklemektedir. Bunun için toplumumuzdaki OHA hastalarında bu varyantın taranması önerilmektedir. Ancak çalışmamızda beta talasemi majör hastalarından biri bir anormal hemoglobin varyantı olan HbKnossos (Cod 27 G>T)'ı IVS.I.110(G>A) mutasyonu ile bileşik heterozigot genotipine sahip ve HbF değeri %19,4'tü. Bu hastada D2-V2 varyantı heterozigot olarak tespit edilmişti. Bu da bize, HbS ve HbKnossos başta olmak üzere, yaygın görülen diğer anormal hemoglobin gruplarında SALL2 geni bağlanma motifi mutasyon ve polimorfizmlerinin taranması gerektiğini göstermektedir.

Çalışmamızda HbF değeri normal olan ($\%2 \leq$) 10 beta talasemi majörlü hasta kontrol grubu olarak çalışıldı ve SALL2 bağlanma motifleri değerlendirildi. Kontrol grubunda D1, D2-V1(rs61746515G>A, c.2232G>A, p.Gly744=) ve D3 domainlerinde mutasyon ve varyasyona rastlanılmazken, D2-V2 (rs1263810C>G, c.2236C>G p.Gly746Arg) yanlış anlamlı (missense) mutasyona 7 hastada homozigot GG, 1 hastada heterozigot CG, 2 hastada homozigot CC genotipi gözlemlendi. Çalışılan örnek sayısı az olmasına rağmen bu vakalar β -TM fenotipinde oldukları için, normal bireyleri temsil edemezlerse de, HbF ile ilişkisi bakımından bu sonuçlar bize HUGO'nun C alelin normal alel olduğunun tersine bizim toplumda G alelinin daha yaygın olduğunu göstermektedir. Bunun açıklığa kavuşturulması için, HbF değeri

normal olan ve herhangi bir hastalığı bulunmayan bireylerin dahil edildiği, istatistiksel değerlendirme için yeterli örneklem evrenine sahip araştırma yapılmalıdır.

Sonuç olarak, tek gen hastalığı olan ve hemoglobinopatiler içerisinde en sık görülen, geniş klinik ve genetik heterojeniteye sahip olan beta talasemi majörde, klinik şiddeti modifiye eden genlerden biri olarak karşımızda duran sekans spesifik DNA bağlayan transkripsiyon faktörü aktivitesi gösteren, hematopoezde etkili olan *SALL2* geninin bağlanma motifleri, ülkemizde ilk defa altın standart olan DNA dizileme yöntemi ile analiz edilmiştir. Bu popülasyonumuz açısından önemlidir. Hastalarımızda direkt veya dolaylı olarak HbF düzeyini değiştirebilecek, *SALL2* geninin transkripsiyonunda etkili olabilecek, protein yapı ve fonksiyonunda değişikliklere neden olan sinonim varyasyon (rs61746515G>A, c.2232G>A, p.Gly744=) ve yanlış anlamlı (missense) mutasyon (rs1263810C>G, c.2236C>G, p.Gly746Arg) ortaya çıkarılmıştır. Çalışmamızın sonuçlarının, ülkemizdeki β -TM hasta popülasyonu bakımından, HbF'i modifiye eden genlere ilişkin çalışma yapmak isteyen araştırmacılara ve literatüre önemli katkılar sunacağı düşüncesindeyiz.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Beta talasemi, dünyada ve ülkemizde önemli bir sağlık sorunu olarak devam etmektedir. Hastalığın önlenmesine yönelik ciddi çalışmalar yapılsa da, hasta doğanların tedavisine yönelik çeşitli stratejiler geliştirilmektedir. Bu stratejilerden en önemlisi, hastaya yaşamsal risk getirmeyen ve en az yan etkiye maruz bırakan HbF indüksiyonunu sağlayan tedavi stratejileridir.

Biz de çalışmamızda; HbF'i yüksek olan beta talasemi majör hastalarında, normal koşullarda HbF'i baskılayarak normal seviyede tutan, ancak mutasyona uğradığında HbF'i yükselten *SALL2* genine ait bağlanma motiflerinde mutasyon taraması gerçekleştirdik. Prospektif 100 hastada planlanan çalışmamız, 66 araştırma ve 10 kontrol grubu olmak üzere 76 hastada gerçekleştirilmiş, kalan 24 hastanın çalışması proje final raporuna eklenecektir.

Beta talasemi majörde klinik farklılıklara neden olan modifiye edici genlerden ve güncel literatür taramasına göre dünyada ve Türkiye'de ilk defa altın standart yöntem DNA dizileme ile *SALL2* modifiye edici genin bağlanma motifleri mutasyon taraması önemli veriler ortaya koymuştur. Özellikle *SALL2* Ekzon 2 bölgesindeki 3 bağlanma motifinden D1 ve D3'de mutasyon bulunmaması kadar, D2 bağlanma motifindeki biri sinonim varyasyon rs61746545(p.Gly744=) ve diğeri rs1263810(p.Gly746Arg) yanlış anlamlı (missense) mutasyonu bizim toplumumuzda ve beta talasemi hastalarında dünyada ilk veriler olması da önemlidir.

- 1- Çalışmamızda kendi popülasyonumuzdaki hastaların *SALL2* geni bağlanma motiflerinin DNA dizi analizi gerçekleştirildi. D2 bölgesinde rs1263810, g.18725 C>G yanlış anlamlı (missense) mutasyonundaki C yabancı tip alel yerine, bizde G aleli yabancı tip olarak görülmektedir. Bu popülasyon genetiği bakımından da oldukça değerlidir.
- 2- Çalışılacak hasta sayısı artırılarak, HbF indüksiyonu üzerine etkili olabilecek bu değişimin frekansı belirlenmelidir.
- 3- Yine *SALL2* Ekzon 2'de D2 bağlanma bölgesinde rs61746515 g.18721 G>A, Gly746=, sinonim değişimi, GA heterozigot olarak 3 hastada görülmüş, A alelinin frekansı %2,28 olarak bulunmuştur. Bunun proteine etkisi

düşünülmezken, *SALL2* geni transkriptini etkileyen bir faktör olabileceği düşünülebilir.

- 4- g.18725 C>G yanlış anlamlı (missense) mutasyonu *SALL2* proteininde Glisin (G) 'den Arjinine (R) dönüşüm olarak yansımakta, aminoasitlerin farklı yapı, elektriksel yük ve katlanmalarla fonksiyonunu etkileyerek HbF indüksiyonunda etkili olabileceğini düşündürmektedir.
- 5- Bu değişimin etkisinin olup olmadığını ortaya koymak için, HbF'i normal sınırlarda olan, talasemik ve başka hematolojik hastalıkları olmayan sağlıklı bireylerde *SALL2* geni taraması yapılmalıdır.
- 6- Çalışmamızda bulunan g.18725 C>G yanlış anlamlı (missense) mutasyonu sonucu *SALL2* proteinindeki Glisin (G)'den Arjinine (R) dönüşümünün etkisi, protein fonksiyon çalışmaları ile açıklığa kavuşturulmalıdır.
- 7- Hematopoez yolağında önemli görevi olan ve sekans spesifik DNA bağlayan *SALL2* transkripsiyon faktörü, *BCL11A*, *KLF1*, *HDAC1/2* ve *DMT1* gibi diğer HbF baskılayıcı faktörlerle etkileştiği için, yeni bir modifiye edici aday gen olarak görülmektedir.
- 8- β -globin geni mutasyonları, *SALL2* geninin bağlanma motifleri ve yakın bölgelerindeki değişikliklerin HbF indüksiyonunu düzenleme etkisi, *SALL2* genini CRISPR/Cas9 gibi yeni yöntemlerin hedefi haline getirecek, gelecekte hastalara yan etkisi olmayan tedavi olanakları sunabilecektir.
- 9- Hemoglobinopatilerden en sık ve klinik etkisi en ağır olan beta-talasemide HbF indüksiyonunun kontrolünde *SALL2* ile birlikte mikroRNA ve kodlamayan (non-coding) RNA'ların çalışılması bireye özgü genetik düzenlemelerin hedeflenmesi, yeni tedavi seçeneklerini ortaya çıkaracaktır.
- 10- Bulgularımız, hem ülkemizde hem de dünyadaki β -TM hastalarında HbF indüksiyonu ile çalışmalara ve araştırmalara yeni pencereler açacak, bilimsel verilere ve literatüre katkı sunacaktır.

KAYNAKLAR

Abolhasani Foroughi A., Ghaffari H., Haghpanah S., Nazeri M., Ghaffari R., Bardestani M. ve Karimi M. Comparative study of radiographic and laboratory findings between Beta thalassemia major and Beta thalassemia intermedia patients with and without treatment by hydroxyurea. *Iran Red Crescent Med J.* 2015 Feb;17: e23607.

Aksoy M., Ikin E. W., Mourant A. E. ve Lehmann H. Blood Groups, Haemoglobins, and Thalassaemia in Turks and Eti-Turks. *British medical journal.* 1958 2: 937.

Al-Baradie R., Yamada K., Hilaire C. S., Chan W.-M., Andrews C., McIntosh N., Nakano M., Martonyi E. J., Raymond W. R. ve Okumura S. Duane radial ray syndrome (Okhiro syndrome) maps to 20q13 and results from mutations in SALL4, a new member of the SAL family. *The American Journal of Human Genetics.* 2002 71: 1195-1199.

Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. *Blood.* 2006 107: 435-443.

Bauer D. E., Kamran S. C. ve Orkin S. H. Reawakening fetal hemoglobin: prospects for new therapies for the beta-globin disorders. *Blood.* 2012 Oct 11;120: 2945-2953.

Brameier M., Krings A. ve MacCallum R. M. NucPred—predicting nuclear localization of proteins. *Bioinformatics.* 2007 23: 1159-1160.

Cao A. ve Galanello R. Beta-thalassemia. *Genet Med.* 2010 Feb;12: 61-76.

Chai L. The role of HSAL (SALL) genes in proliferation and differentiation in normal hematopoiesis and leukemogenesis. *Transfusion.* 2011 51: 87S-93S.

de Celis J. F. ve Barrio R. Regulation and function of Spalt proteins during animal development. *International Journal of Developmental Biology.* 2009 53: 1385-1398.

de Dreuzy E., Bhukhai K., Leboulch P. ve Payen E. Current and future alternative therapies for beta-thalassemia major. *Biomedical journal.* 2016 39: 24-38.

Flint J., Harding R. M., Boyce A. J. ve Clegg J. B. The population genetics of the haemoglobinopathies. *Baillieres Clin Haematol.* 1998 Mar;11: 1-51.

Forget B. G. ve Bunn H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013 Feb 01;3: a011684.

Foroughi A. A., Ghaffari H., Haghpanah S., Nazeri M., Ghaffari R., Bardestani M. ve Karimi M. Comparative Study of Radiographic and Laboratory Findings Between Beta Thalassemia Major and Beta Thalassemia Intermedia Patients With and Without Treatment by Hydroxyurea. *Iranian Red Crescent Medical Journal.* 2015 17:

Galanello R., Sanna S., Perseu L., Sollaino M. C., Satta S., Lai M. E., Barella S., Uda M., Usala G., Abecasis G. R. ve Cao A. Amelioration of Sardinian beta⁰ thalassemia by genetic modifiers. *Blood.* 2009 Oct 29;114: 3935-3937.

Gallienne A. E., Dréau H. M., Schuh A., Old J. M. ve Henderson S. Ten novel mutations in the erythroid transcription factor KLF1 gene associated with increased fetal hemoglobin levels in adults. *haematologica.* 2012 97: 340-343.

Giorgetti A., Montserrat N., Aasen T., Gonzalez F., Rodríguez-Pizà I., Vassena R., Raya A., Boué S., Barrero M. J. ve Corbella B. A. Generation of induced pluripotent stem cells from human cord blood using OCT4 and SOX2. *Cell stem cell.* 2009 5: 353.

Haldane J. B. The relative importance of principal and modifying genes in determining some human diseases. *Journal of Genetics.* 1941 41: 149-157.

Harteveld C. L. ve Higgs D. R. α -Thalassaemia. *Orphanet journal of rare diseases.* 2010 5: 13.

Hermosilla V. E., Hepp M. I., Escobar D., Farlas C., Riffo E. N., Castro A. F. ve Pincheira R. Developmental SALL2 transcription factor: a new player in cancer. *Carcinogenesis.* 2017 Apr 18;

Higgs D. R., Engel J. D. ve Stamatoyannopoulos G. Thalassaemia. *Lancet.* 2012 Jan 28;379: 373-383.

Higgs D. R. The molecular basis of α -thalassemia. Cold Spring Harbor perspectives in medicine. 2013 3: a011718.

Karimi M., Cohan N., De Sanctis V., Mallat N. S. ve Taher A. Guidelines for diagnosis and management of Beta-thalassemia intermedia. Pediatric hematology and oncology. 2014 31: 583-596.

Kelberman D., Islam L., Lakowski J., Bacchelli C., Chanudet E., Lescai F., Patel A., Stupka E., Buck A. ve Wolf S. Mutation of SALL2 causes recessive ocular coloboma in humans and mice. Human molecular genetics. 2014 23: 2511-2526.

Keser I., Sanlioglu A., Manguoglu E., Guzeloglu Kayisli O., Nal N., Sargin F., Yesilipek A., Simsek M., Mendilcioglu I. ve Canatan D. Molecular analysis of beta-thalassemia and sickle cell anemia in Antalya. Acta haematologica. 2004 111: 205-210.

Kohlhase J., Schuh R., Dowe G., Kühnlein R. P., Jäckle H., Schroeder B., Schulz-Schaeffer W., Kretzschmar H. A., Köhler A. ve Müller U. Isolation, Characterization, and Organ-Specific Expression of Two Novel Human Zinc Finger Genes Related to the Drosophila Genes spalt. Genomics. 1996 38: 291-298.

Kohlhase J., Hausmann S., Stojmenovic G., Dixkens C., Bink K., Schulz-Schaeffer W., Altmann M. ve Engel W. SALL3, a new member of the human spalt-like gene family, maps to 18q23. Genomics. 1999 62: 216-222.

Kohlhase J., Taschner P. E., Burfeind P., Pasche B., Newman B., Blanck C., Breuning M. H., Leo P., Maaswinkel-Mooy P. ve Mitulla B. Molecular analysis of SALL1 mutations in Townes-Brocks syndrome. The American Journal of Human Genetics. 1999 64: 435-445.

Kohlhase J., Altmann M., Archangelo L., Dixkens C. ve Engel W. Genomic cloning, chromosomal mapping, and expression analysis of msal-2. Mammalian genome. 2000 11: 64-68.

Kohne E. Clinical Manifestations, Diagnosis, and Treatment. significance. 2011 5: 12.

Lauberth S. M. ve Rauchman M. A conserved 12-amino acid motif in Sall1 recruits the nucleosome remodeling and deacetylase corepressor complex. *Journal of Biological Chemistry*. 2006 281: 23922-23931.

Lette G. The search for genetic modifiers of disease severity in the β -hemoglobinopathies. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. 2012 2: a015032.

Lette G. The search for genetic modifiers of disease severity in the beta-hemoglobinopathies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012 Oct;2:

Levings P. P. ve Bungert J. The human β -globin locus control region. *The FEBS Journal*. 2002 269: 1589-1599.

Li D., Dower K., Ma Y., Tian Y. ve Benjamin T. L. A tumor host range selection procedure identifies p150sal2 as a target of polyoma virus large T antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001 98: 14619-14624.

Li D., Tian Y., Ma Y. ve Benjamin T. p150Sal2 is a p53-independent regulator of p21WAF1/CIP. *Molecular and cellular biology*. 2004 24: 3885-3893.

Liu D., Zhang X., Yu L., Cai R., Ma X., Zheng C., Zhou Y., Liu Q., Wei X. ve Lin L. KLF1 mutations are relatively more common in a thalassemia endemic region and ameliorate the severity of β -thalassemia. *Blood*. 2014 124: 803-811.

Liu D., Zhang X., Yu L., Cai R., Ma X., Zheng C., Zhou Y., Liu Q., Wei X., Lin L., Yan T., Huang J., Mohandas N., An X. ve Xu X. KLF1 mutations are relatively more common in a thalassemia endemic region and ameliorate the severity of beta-thalassemia. *Blood*. 2014 Jul 31;124: 803-811.

Liu G.-H., Qu J., Suzuki K., Nivet E., Li M., Montserrat N., Yi F., Xu X., Ruiz S. ve Zhang W. Progressive degeneration of human neural stem cells caused by pathogenic LRRK2. *Nature*. 2012 491: 603-607.

Ma Y., Li D., Chai L., Luciani A. M., Ford D., Morgan J. ve Maizel A. L. Cloning and characterization of two promoters for the human HSAL2 gene and their transcriptional repression by the Wilms tumor suppressor gene product. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 276: 48223-48230.

Marlin S., Toublanc J. E. ve Petit C. Two cases of Townes-Brocks syndrome with previously undescribed anomalies. *Clinical dysmorphology*. 1998 7: 295-298.

Menzel S., Garner C., Gut I., Matsuda F., Yamaguchi M., Heath S., Foglio M., Zelenika D., Boland A. ve Rooks H. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nature genetics*. 2007 39: 1197-1199.

MWers S., Dykes D. ve Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids res.* 1988 16: 1215.

Nadeau J. H. Modifier genes and protective alleles in humans and mice. *Current opinion in genetics & development*. 2003 13: 290-295.

Nishino K., Toyoda M., Yamazaki-Inoue M., Fukawatase Y., Chikazawa E., Sakaguchi H., Akutsu H. ve Umezawa A. DNA methylation dynamics in human induced pluripotent stem cells over time. *PLoS Genet*. 2011 7: e1002085.

Roy P., Bhattacharya G., Mandal A., Dasgupta U. B., Banerjee D., Chandra S. ve Das M. Influence of BCL11A, HBS1L-MYB, HBBP1 Single Nucleotide Polymorphisms and the HBG2 Xmn I Polymorphism On Hb F Levels. *Hemoglobin*. 2012 36: 592-599.

Rund D. ve Rachmilewitz E. Beta-thalassemia. *N Engl J Med*. 2005 Sep 15;353: 1135-1146.

Sagar C. S., Kumar R., Sharma D. C. ve Kishor P. Alpha hemoglobin stabilizing protein: Its causal relationship with the severity of beta thalassemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. 2015 55: 104-107.

Saito S., Onuma Y., Ito Y., Tateno H., Toyoda M., Hidenori A., Nishino K., Chikazawa E., Fukawatase Y. ve Miyagawa Y. Possible linkages between the inner and outer cellular states of human induced pluripotent stem cells. *BMC systems biology*. 2011 5: S17.

Sankaran V. G., Xu J., Ragozy T., Ippolito G. C., Walkley C. R., Maika S. D., Fujiwara Y., Ito M., Groudine M. ve Bender M. Developmental and species-divergent globin switching are driven by BCL11A. *Nature*. 2009 460: 1093-1097.

Sheehan V. A., Crosby J. R., Sabo A., Mortier N. A., Howard T. A., Muzny D. M., Dugan-Perez S., Aygun B., Nottage K. A. ve Boerwinkle E. Whole exome sequencing identifies novel genes for fetal hemoglobin response to hydroxyurea in children with sickle cell anemia. *PloS one*. 2014 9: e110740.

Somervaille T. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 2001 94: 602-603.

Sperger J. M., Chen X., Draper J. S., Antosiewicz J. E., Chon C. H., Jones S. B., Brooks J. D., Andrews P. W., Brown P. O. ve Thomson J. A. Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003 100: 13350-13355.

Taher A. T., Musallam K. M., Karimi M., El-Beshlawy A., Belhoul K., Daar S., Saned M. S., El-Chafic A. H., Fasulo M. R. ve Cappellini M. D. Overview on practices in thalassemia intermedia management aiming for lowering complication rates across a region of endemicity: the OPTIMAL CARE study. *Blood*. 2010 Mar 11;115: 1886-1892.

Taher A. T., Musallam K. M., Cappellini M. D. ve Weatherall D. J. Optimal management of β thalassaemia intermedia. *British journal of haematology*. 2011 152: 512-523.

Taher A. T., Musallam K. M., Cappellini M. D. ve Weatherall D. J. Optimal management of beta thalassaemia intermedia. *Br J Haematol*. 2011 Mar;152: 512-523.

Thein S. L. Genetic modifiers of beta-thalassemia. *haematologica*. 2005 90: 649-660.

Thein S. L. Genetic association studies in β -hemoglobinopathies. *ASH Education Program Book*. 2013 2013: 354-361.

Weatherall D. J. ve Clegg J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. *Bull World Health Organ.* 2001 79: 704-712.

Weerd M., Simone A., Willems P. J., Mandema H. M. ve Kate L. P. A new family with the Townes-Brocks syndrome. *Clinical genetics.* 1988 34: 195-200.

Williams T. N. ve Weatherall D. J. World distribution, population genetics, and health burden of the hemoglobinopathies. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* 2012 2: a011692.

You H., Liu S., Xie Y., Cong R., Sun Y., Ren J., Wei K., Jin X., Shi Y. ve Zhang H. Novel host genetic variations associated with spontaneous clearance of a single-source outbreak of HCV1b infections. *BMJ Open Gastroenterology.* 2014 1: e000010.

Yunus A. Beta Talasemi Majorlü Hastalarda HbF İndüksiyonu İçin Genetik ve Epigenetik Çalışmalar. A.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 2016, Antalya (Danışman: Prof. Dr. İ. Keser).

EKLER

EK 1. AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

Katılımcı / Gönüllünün Protokol Numarası:

1. Araştırmayla İlgili Bilgiler:

a. Araştırmanın Adı:

“Beta Talasemi Majör Hastalarında Modifiye Edici *SALL2* Geni Bağlanma Motifinde Mutasyon Taranması”

b. Araştırmanın İçeriği:

Beta(β) talasemi; kanın temel yapısı olan hemoglobinin bozukluğu olup, dünya çapında en yaygın görülen, otozomal resesif (çekinik) kalıtılan tek gen hastalıklarından biridir. Hemoglobinin yapısında bulunan iki alfa ve iki beta globin zincirlerinin az(β^+) ya da hiç (β^0) sentezlenmemesi durumu ile karakterizedir. Bu zincir dengesizliği beta talasemiye neden olur ve hemolitik anemiye yol açar.

Beta-talasemi majör fenotipinde genellikle yaşamın ilk yıllarında, beta zincir sentezindeki dengesizlik kısa ömürlü kırmızı kan hücre oluşumuna neden olur ve ciddi hemolitik anemi görülür. Bu bireyler hasta olup, yaklaşık her ay düzenli kan almak (transfüzyon) zorunda kalırlar.

Aynı mutasyona sahip beta talasemi hastalarında, bazen klinik şiddet ve hastalığın seyri farklılık göstermektedir. Bu klinik seyir, hemen hemen asemptomik bulgular ile hayatı tehdit edici durumlar arasında değişmektedir. Bu klinik çeşitlilik, hastalıktan sorumlu genler üzerine etkili olan, genomdaki diğer modifiye edici genlerden kaynaklanmaktadır. Artan HbF seviyesi ve eşlik eden α -talasemi, β -talaseminin klinik ve hematolojik şiddetini iyileştirebilen iki ana modifiye edicidir. HbF seviyesini arttıran, BCLL11A [B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein)], KLF1 [Kruppel-like factor 1 (erythroid)], HMIP [human mitochondrial intermediate peptidase], Xmn1-HBG2 [gama globin geninde Xmn1 polimorfizmi] gibi modifiye edici genler çeşitli çalışmalarda tanımlanmıştır.

Sheehan, Crosby ve arkadaşlarının (2014) beta-globin zincirinde kodon 6'daki A-T mutasyonu ile karakterize orak hücreli anemili hastalarında tüm ekzom taramasında, *SALL2* (*spalt like transcription factor*) geninde *P840R* varyantına sahip hastalarında hidroksiüre (HU)'ye yanıt olarak HbF seviyesindeki değişimin arttığı gösterilmiştir. *SALL2* geni, yeni bir modifiye edici gen olarak tanımlanmıştır.

SALL2 geni, hematopoetik hücrelerin olgunlaşmasında ve hücre döngüsünde rol alan multi-zinc finger transkripsiyon faktörü olup, kromozom 14q11.1-q12'de lokalizedir. *SALL2*, HbF' in yapısındaki γ -globinin co-represörü olarak rol oynadığı bilinmektedir. *SALL2* varyantı, proteinin 840. pozisyonunda prolin arginin değişikliğine yol açar ve bu protein fonksiyonuna zarar verir. *SALL2*'deki motifde oluşacak mutasyonlar beta talasemi majör hastalarında, HDAC1 ve HDAC2'nin motive bağlanamaması yüzünden, *SALL2* γ -globin ekspresyonunu uyarır. Bu da HbF seviyesindeki artışa yol açar. Bu durumun belirlenmesi, HbF indüksiyonunda önemli

bir kritik noktayı oluşturmaktadır. Bu bölgedeki değişikliklerin belirlenmesi, ilerdeki araştırmalara ışık tutarak, hastalığın tedavisinde yeni yollar açabilecektir.

c. Araştırmanın Amacı:

Bu projemizin amacı; beta talasemi majör hastalarında *SALL2* geni bağlanma motifi mutasyonlarının taranarak, genin modifiye edici özelliğinin tespit edilmesini takiben, hastalardaki HbF düzeyini artırıcı tedavi olanaklarına yönlendirici veriler elde etmektir.

d. Araştırmanın Nedeni:

() Bilimsel araştırma

(X) Tez çalışması

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

f. Araştırmaya Katılması Beklenen Katılımcı/Gönüllü Sayısı:

100

g. Araştırmada İzlenecek Deneysel İşlemler:

-Örneklerden DNA izolasyonu

-Araştırılacak genlere özgül tasarlanan primerlerle ilgili genlerin amplifikasyonu (PCR yöntemi ile)

-Amplifiye edilen bölgelerin DNA dizi analizi

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

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

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

3. Gönüllüler/Katılımcılar İçin Araştırmadan Beklenen Yarar:

Beta talasemi majör hastalarındaki HbF düzeyini artırıcı tedavi olanaklarına yönlendirici veriler elde etmektir.

4. Araştırma Konusundaki Soruların Cevaplandırılması:

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

Adı- Soyadı: Prof.Dr. İbrahim KESER

Telefon: 249 69 73

Arş. Gör. Tuğba KARAMAN

249 69 76

5. Zararların Karşılanması:

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

6. Araştırma Giderleri:

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

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

- Araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama altında olmaksızın gönüllü olarak katılıyorum.
- Araştırmaya katılmayı reddetme hakkına sahip olduğum bana bildirildi.
- Sorumlu araştırmacıya haber vermek kaydıyla, hiçbir gerekçe göstermeksizin istediğim anda bu çalışmadan çekilebileceğimin bilincindeyim.
- Çalışmanın yürütücüsü olan araştırmacı ya da destekleyen kuruluş, çalışma programının gereklerini yerine getirmedeki ihmali nedeniyle ya da araştırma prosedürüne bağlı olarak onayımı almadan beni çalışma kapsamından çıkarabilir.**

9. Gizlilik:

Çalışma süresince tutulan bütün kayıtlar ve dosya bilgileri gerektiğinde,firması ve yöneticilerine ulaştırılacaktır. Bu çalışmadan elde edilen bilgiler, verilere gereksinimi olan öteki ülkelerin hükümetlerine ve ilgili birimlerine iletebilir. Çalışmanın sonuçları bilimsel toplantılar ya da yayınlarda sunulabilir. Ancak, bu tür durumlarda kimliğim kesin olarak gizli tutulacaktır.

10. Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmadan önce gönüllüye / katılımcıya verilmesi gereken bilgileri gösteren Aydınlatılmış Onam Formu adlı metni kendi anadilimde okudum ya da bana okunmasını sağladım. Bu bilgilerin içeriği ve anlamı, yazılı ve sözlü

olarak açıklandı. Aklıma gelen bütün soruları sorma olanağı tanındı ve sorularına doyurucu cevaplar aldım. Çalışmaya katılmadığım ya da katıldıktan sonra çekildiğim durumda, hiçbir yasal hakkımdan vazgeçmiş olmayacağım. Bu koşullarla, söz konusu araştırmaya hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın gönüllü olarak katılmayı kabul ediyorum.

Bu metnin imzalı bir kopyasını aldım.

Gönüllünün / katılımcının Adı- Soyadı:

Yaş ve Cinsiyeti:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

Velayet ya da vesayet altında bulunanlar için;

Veli ya da Vasinin Adı- Soyadı:

İmzası:

Adresi (varsa telefon ve/veya fax numarası):

.....

.....

Tarih:

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

İmzası:

Tarih:

Adı-Soyadı: Arş. Gör. Tuğba KARAMAN

İmzası:

Tarih:

Onam alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin

Adı- Soyadı: Prof. Dr. Erdal KURTOĞLU

İmzası:

Görevi:

Tarih:

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Tuğba	Uyruğu	TC
Soyadı	KARAMAN	Tel no	05439368113
Doğum tarihi	01.02.1990	e-posta	tkaraman07@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Karatay Lisesi	2008
Lisans	Akdeniz Üniversitesi	2013
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi	
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
stajyer		
Öğretim Elemanı	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD	2017-Devam

Yabancı Dilleri	Sınav türü	Puanı
İngilizce	YDS	62,5

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Beta Talasemi Majör Hastalarında Modifiye Edici <i>SALL2</i> Geni Bağlanma Motifinde Mutasyon Taranması	BAP	2016-2017

Proje Deneyimi

Burslar-Ödüller:

Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Bölüm İkinciliği 2012-2013
Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Fakülte Üçüncülüğü 2012-2013
Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Yüksek Onur Belgesi 2012-2013

Hakemli Kongre/Sempozyum Bildiri Kitaplarında Yer Alan Yayınlar

1. I.Keser, Y.Arikan, T.Karaman, T.Bilgen, D.Canatan, A. Kupesiz “Alpha globin gene mutations and rare variants in Antalya Province, Turkey.” ESHG Conference in Barcelona 21-24 May 2016, p18.055, pp.537-537
2. Arikan Y., Bilgen T., Karaman T., Canatan D., Keser İ., “Antalya ve Çevresinde Alfa Globin Gen Mutasyonlarının Araştırılması”, 14.ULUSAL TIBBİ BİYOLOJİ ve GENETİK KONGRESİ, MUĞLA, TÜRKİYE, 26-30 Ekim 2015, ss.346-346

