

Talasemi Moleküler Genetiği

Dr. A. Nazlı BAŞAK

Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul

Son onbeş yılda, talasemi ve anormal hemoglobinlerin genetik tanısına yönelik çok çeşitli moleküler yöntemler geliştirildi. Özellikle polimeraz zincir tepkimesinin (PCR) 1980'li yılların ikinci yarısında devreye girmesinden sonra, teknolojik olanakları yüksek merkezlerde hayata geçirilen bu yöntemler, gittikçe basitleştirilerek rutin kullanıma alındı. Bugün artık bu yöntemlerin büyük çoğunluğu hemoglobinin genetik hastalıklarının sıklıkla görüldüğü Akdeniz Havzası, Uzak Doğu ve Afrika ülkelerinde klinik tanı laboratuvarları ortamlarında uygulanabilecek duruma gelmiştir (1). Bu yazının birinci kısmında orak hücreli anemi ve β -talasemi'nin moleküler temeli tanıtılacak, ikinci kısmında DNA tanısında kullanılan yöntemler tartışılacak ve özellikle tanı laboratuvarı düzeyinde uygulanabilen yöntemler üzerinde durulacaktır.

Hemoglobinin Genetik Hastalıkları

Tetramerik bir protein olan insan erişkin hemoglobini dört globin zincirinden oluşur ($\alpha_2\beta_2$). α ve β zincirlerinin genetik kontrolü iki ayrı gen kümesi tarafından yapılır. α gen kümesi 16., β gen kümesi 11. kromozom üzerinde yer alır. Hemoglobinin, otozomal resesif olarak kalıtılan genetik hastalıkları, iki büyük gruba ayrılır:



Bugünkü konumuzu oluşturan HbS ve β -talasemi, β -globin geni üzerindeki mutasyonlardan kaynaklanırlar.

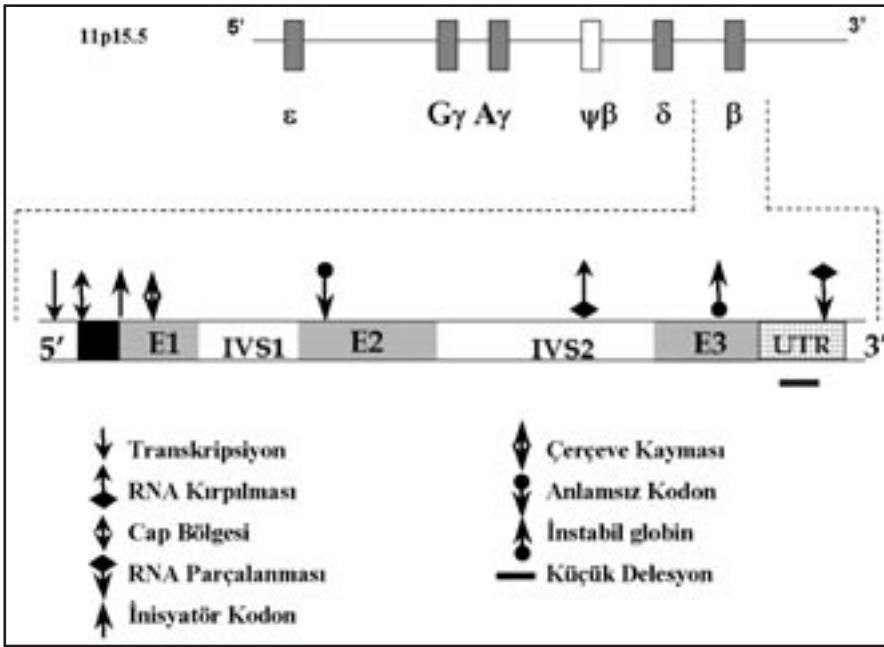
β -globin Geni

Oldukça küçük ve yapısal olarak basit bir gen olan β -globin geni, 11. kromozomun kısa kolu üzerinde (11p 15.5), β -globin gen kümesi içinde yer almaktadır. β -globin geni β -globin zincirindeki 146 aminoasidi kodlamak için gerekli bilgiyi, 3 ekson, 2 intron ve 5' ve 3' düzenleyici bölgelerden oluşan yaklaşık 1.8 kb üzerinde taşımaktadır (Resim1). β -globin geninden hemoglobinin β -globin zincirlerine giden yol üzerindeki mutasyonlar β -talasemiye, orak hücreli anemiye ya da diğer bir anormal hemoglobine neden olma potansiyeline sahiptir (2).

Anormal Hemogloblinler: HbS

Bugün yaklaşık 700 anormal hemoglobin tanımlanmıştır. (<http://globin.cse.psu.edu>). Bunların 335'i β zinciri varyantıdır (3). Anormal hemogloblinler genellikle bölge ve etnik gruba özgündürler. Türkiye'de en sıklıkla görülen anormal hemoglobin, orak hücreli anemiye neden olan HbS'dir.

HbS'e β -globin geninin 6. kodonundaki tek tip bir mutasyon neden olur. GAG'nin GTG'ye dönüşmesi sonucunda glutamik asit yerine valin aminoasitinin kodlanması HbS hastalığının nedenidir. Bozuk gen tek bir ebeveynden kalıtıldığı durumda, HbS taşıyıcılığı, her iki ebeveynden kalıtıldığı durumda orak hücreli anemi hastalığı söz konusu olur.



Resim 1. 11. kromozomda yer alan β -globin gen kümesi ve orak hücreli anemi ve β -talasemiye yol açan mutasyon tiplerinin β -globin geni üzerindeki yerleri.

Talasemiler: β -talasemi

Talasemi sendromları oldukça geniş bir genetik yelpazeyi kapsar. Talasemiler sentezi bozulmuş olan globin zincirine göre α , β , γ , δ , $\delta\beta$, $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemi olarak adlandırılırlar. En sık görülen tipleri α ve β -talasemidir. α talasemi daha ziyade Uzak Doğu'da görülürken, β -talasemi Akdeniz ülkeleri ve Türkiye'de sıktır. Tek tip bir mutasyonun neden olduğu orak hücreli anemi'nin aksine β -talasemi moleküler düzeyde çok heterojendir (4). (<http://globin.cse.psu.edu>, <http://www.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>)

Günümüzde β -talasemiye yol açan moleküler defektler oldukça iyi bir şekilde incelenmiştir. Hastalığın en önemli nedenini, β -talasemide görülen büyük delesyonlar değil, gen içindeki nokta mutasyonları oluşturmaktadır. Bu mutasyonların ilk 40'ı β -globin geninin klonlanmasını takiben, DNA dizi analizi ile tanımlandıktan sonra, 1987 yılında rutin kullanıma giren PCR yöntemi ve direkt DNA dizi analizi ile son 20 yılda, β -talasemiye yol açtığı bilinen mutasyonların sayısı büyük bir hızla artmış ve 200'ü geçmiştir. Bu geniş moleküler çeşitliliği biraz basite indirgeyen bir faktör, tüm 200 mutasyonun her toplumda görülmemesi ve mutasyonların etnik gruplara özgün olmasıdır. Genelde bir toplumda az sayıda mutasyon (6-8) o toplumdaki β -talasemi genlerinin %90-95'ini tanımlamaktadır.

Görülen allel çeşitliliği, Sardunya adası, Kıbrıs gibi küçük ve izole etnik gruplarda daha da azalmakta, örneğin Sardunya Adasında sadece iki tip β -talasemi mutasyonu hastalık genlerinin %99'unu oluşturmaktadır (2). Akdeniz ülkeleri genelinde bakılacak olursa, yaklaşık 35 mutasyon Akdeniz Havzasına özgü olarak nitelendirilmiş olmakla beraber, bu mutasyonların dağılımı ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermektedir. Türkiye'de β -talasemi, diğer Akdeniz ülkelerine oranla daha karmaşıktır. Diğer toplumlar için tanımlanan genel kural (6-8 mutasyon=%90-95 β -talasemi tanımı) Türk toplumu için geçerli değildir (5).

β -talasemi riski taşıyan toplumlarda, aynı bölgede birçok mutasyonun birlikte bulunmasından dolayı β -talasemi hastalarının büyük kısmı iki değişik mutasyon taşırlar; bunlara iki eş mutasyon taşıyan "gerçek homozigot"lardan farklı olarak "çift heterozigot" adı verilir. Bazı mutasyonlar β -globin zincir sentezini tamamen ortadan kaldırır; bu tür iki mutasyon taşıyan bireylerin fenotipi β^0 -talasemidir; diğer bir grup mutasyon ise %5-%30 civarında β -globin sentezine izin verir; bu hastaların fenotipi β^+ -talasemidir.

β^0 -talasemide HbA sentezlenmez; β^+ -talasemide, HbA söz konusu mutasyonun izin verdiği oranda sentezlenir. Genellikle genin kodlayıcı bölgeleri ile ekzon-intron sınırındaki konservatif bölgeleri hedef alan mutasyonlar β^0 -talasemiye,

promotor bölgesinde, intronların iç kısımlarında ve genin Poli A sinyali civarında olan mutasyonlar β^+ -talasemiye yol açarlar. Bu mutasyonlar, β -globin geninden β -globin zincirlerine giden yol üzerinde gen ekspresyonunun değişik kademelerinde β -globin geninin inaktive olmasına neden olurlar ve buna göre sınıflandırılırlar: transkripsiyon, inisyasyon, RNA kırılması, RNA prosing, RNA modifikasyonu, tranlasyon, instabil globin gibi (Resim1). Klinisyen açısından bakıldığında, moleküler patoloji, hastalık tablosunun değişkenliğini büyük ölçüde yansıtmaktadır.

Türkiye'de β -talasemi

β -talasemi taşıyıcılığı oranı Türkiye genelinde %2 olmakla birlikte, bu sayı Türkiye'nin bazı yörelerinde %10'a kadar çıkmaktadır. Akraba evli-

liklerinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği, Türkiye'de beklenenin de üzerinde β -talasemili çocuk doğmasının nedenidir. Hastalık, hafif klinikli β -talasemi intermedya ile, tranfüzyona bağımlı β -talasemi majör arasında seyreden çok geniş bir yelpazede görülmekle birlikte, Türkiye'de β -talasemi majör olguları ağır basmaktadır. Halen Türk toplumunda 30'u aşkın mutasyon tanımlanmıştır; bu geniş moleküler çeşitlilik, hastalığa önlem alma stratejilerini ve programlarını önemli ölçüde güçleştirmektedir (5,6).

Tablo I'de laboratuvarımızda tanımlanmış olan 31 mutasyonun Türkiye genelindeki sıklıkları ile, Türkiye'nin altı değişik coğrafi bölgesindeki dağılımları görülmektedir. IVS-I-110 Türkiye'de en sıklıkla rastlanan β -talasemi mutasyonudur (%40); bunu IVS-I-6, FSC-8, IVS-I-1, IVS-II-745, IVS-II-1,

Tablo I. Türkiye'de görülen β -talasemi mutasyonları ve bazı anormal hemoglobinlerin bölgelere göre dağılımları ve sıklıkları. Parantez dışındaki sayılar incelenen kromozom sayısını, parantez içindeki sayılar yüzdeleri göstermektedir. Yanında *olanlar nadir, ** olanlar ilk defa tanımlanmış yeni mutasyonlardır.

Mutasyon	Tip	Marmara Bölgesi	Ege/Akdeniz Bölgesi	İç Anadolu	Güney-Doğu Anadolu	Kara-Deniz	Doğu Anadolu	Göçmen Türklere	Bilinmeyen Köken	Türkiye'deki Genel Dağılım
IVS-I-110 (G-A)	b^+	30 (34.1)	84 (42.4)	58 (52.3)	31 (26.4)	17 (31.0)	16 (27.1)	29 (47.7)	47 (44.4)	312 (39.3)
IVS-I-6 (T-C)	b^+	13 (14.8)	25 (12.6)	8 (7.2)	10 (8.5)	6 (10.9)	6 (10.2)	6 (9.8)	6 (5.7)	80 (10.1)
FSC-8 (-AA)	b^0	7 (8.0)	9 (4.6)	7 (6.3)	5 (4.3)	1 (1.8)	5 (8.4)	4 (6.6)	5 (4.7)	43 (5.5)
IVS-I-1 (G-A)	b^0	8 (9.1)	13 (6.6)	5 (4.5)	1 (0.9)	1 (1.8)	3 (5.1)	6 (9.8)	3 (2.8)	40 (5.0)
IVS-II-745 (C-G)	b^+	4 (4.6)	9 (4.6)	8 (7.2)	7 (6.0)	6 (10.9)	1 (1.7)	4 (6.6)	1 (0.9)	40 (5.0)
IVS-II-1 (G-A)	b^0	3 (3.4)	11 (5.6)	6 (5.4)	3 (2.6)	3 (5.5)	2 (3.4)	-	9 (8.5)	37 (4.7)
Cd 39 (C-T)	b^0	4 (4.6)	5 (2.5)	4 (3.6)	1 (0.9)	2 (3.6)	2 (3.4)	4 (6.6)	8 (7.6)	30 (3.8)
-30 (T-A)	b^+	-	5 (2.5)	2 (1.8)	8 (6.7)	5 (9.1)	5 (8.5)	-	-	25 (3.1)
FSC-5 (-CT)	b^0	3 (3.4)	3 (1.5)	2 (1.8)	4 (3.4)	1 (1.8)	-	-	4 (3.8)	17 (2.2)
FSC-8/9 (+G)	b^0	2 (2.3)	-	2 (1.8)	-	1 (1.8)	3 (5.1)	-	2 (1.9)	10 (1.3)
FSC-44 (-C)	b^0	1 (1.1)	-	2 (1.8)	3 (2.6)	-	1 (1.7)	-	3 (2.8)	10 (1.3)
IVS-I-5 (G-C)	b^+	-	4 (2.0)	3 (2.7)	1 (0.9)	-	1 (1.7)	-	-	9 (1.1)
-87 (C-G)	b^+	1 (1.1)	1 (0.5)	-	-	4 (7.3)	-	-	-	6 (0.8)
Poly A (TAA-TGA)	b^+	-	-	-	1 (0.9)	1 (1.8)	1 (1.7)	-	1 (0.9)	4 (0.5)
FSC-6 (-A)	b^0	1 (1.1)	-	-	1 (0.9)	-	-	-	1 (0.9)	3 (0.4)
IVS-II-848 (C-A)	b^+	1 (1.1)	-	-	1 (0.9)	-	-	1 (1.6)	-	3 (0.4)
IVS-I-116 (T-G)*	b^0	1 (1.1)	-	-	-	-	-	1 (1.6)	-	2 (0.2)
FSC-74/75 (-C)**	b^0	-	-	-	-	-	1 (1.7)	-	-	1 (0.1)
-101 (C-T)*	b^+	1 (1.1)	-	-	-	-	-	-	-	1 (0.1)
-28 (A-C)*	b^+	-	1 (0.5)	-	-	-	-	-	-	1 (0.1)
Cd 15 (G-A)*	b^0	-	-	-	-	1 (1.8)	-	-	-	1 (0.1)
Cd 27 (G-T)*	b^+	-	-	-	-	-	-	1 (1.6)	-	1 (0.1)
3'-UTR (-13 bp)**	b^+	-	-	1 (0.9)	-	-	-	-	-	1 (0.1)
FSC 22-24 (-7 bp)**	b^0	-	-	-	1 (0.9)	-	-	-	-	1 (0.1)
FSC 36/37 (-T)*	b^0	-	-	-	-	-	1 (1.7)	-	-	1 (0.1)
IVS-I-130 (G-A)*	b^0	-	-	-	-	-	-	1 (1.6)	-	1 (0.1)
-290 bp delesyon*	b^0	-	-	-	-	-	1 (1.7)	-	-	1 (0.1)
HbS	b^S	-	5 (2.5)	-	28 (23.8)	1 (1.8)	1 (1.7)	1 (1.6)	3 (2.8)	39 (4.9)
HbD Los Angeles	b^D	-	-	-	1 (0.9)	-	-	-	-	1 (0.1)
HbE Saskatoon	b^E	-	1 (0.5)	-	-	-	-	-	-	1 (0.1)
$\delta\beta$ -Talasemi	db	-	-	-	-	-	-	1 (1.6)	-	1 (0.1)
Bilinmeyen		8 (9.1)	22 (11.1)	3 (2.7)	10 (8.5)	5 (9.1)	9 (15.2)	2 (3.3)	13 (12.3)	72 (9.1)
Toplam		88 (11.1)	198 (24.9)	111 (13.9)	117 (14.7)	55 (6.9)	59 (7.5)	61 (7.7)	106 (13.3)	795 (100.0)

Cd39, -30 ve FSC-5 mutasyonları takip etmektedir (6,7). IVS-I-110'un Türkiye genelinde %40 olan sıklığı, Orta Anadolu'da %50'yi aşmakta, buna karşılık Doğu ve Güney Doğu Anadolu'da %25'lere düşmektedir. Türkiye'nin coğrafi bölgeleri, mutasyon sıklığı ve çeşitliliği açısından kıyaslandığında, ülke nüfusunun %50'sini barındıran Batı Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin, Türkiye genelindeki dağılımla uyumlu olduğu, ve Kuzey, Güney ve Doğu Anadolu bölgelerinin daha az heterojen olduğu, ve kendilerine özgü mutasyonlar içerdiği görülmektedir (-30, -87, FSC8/9, IVS-II-745 gibi) (6,7).

Boğaziçi Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünde 1988 yılından beri β -talasemi ve orak hücreli aneminin moleküler tanısı rutin olarak yapılmaktadır (8,9). Bu süre içinde, hem Türkiye'de β -talasemi moleküler düzeyde tanımlanmış, hem de hastalık tanısında kullanılan yöntemler gelişmiş, ekonomikleşmiş ve otomatizasyon olanakları artmıştır. İdeal durum, özellikle araştırma laboratuvarlarında, birçok yöntemin paralel olarak kullanılabilmesi yönündedir. Nitekim Tablo II' de gösterilen yöntemlerin hepsi laboratuvarımızda birbirini tamamlayıcı nitelikte ve rutin olarak uygulanabilmektedir. Klinik ortamda durum farklıdır. Yazımın bundan sonraki kısmında, β -talasemi ve orak hücreli anemi tanısında etkin olarak kullanılan yöntemler kısaca tanıtıldıktan sonra, klinik laboratuvarlarda uygulamaya elverişli, tek aşamalı ve radyoaktivite gerektirmeyen restriksiyon enzimi analizi yöntemi ve hibridizasyona dayalı bir kit tanıtılacaktır.

DNA Analiz Yöntemleri İle β -talasemi Tanısı

Son yıllarda moleküler genetik alanında kaydedilen gelişmeler birçok kalıtsal hastalığın gen düzeyinde tanımlanmasını sağlamış, bunun sonucunda da bu hastalıkların tanısı DNA düze-

yinde yapılabilir hale gelmiştir. En önemli ve hızlı gelişme talasemi ve anormal hemoglobinerde ve bu gruptaki hastalıkların, moleküler mekanizmalarının ve mutasyonlarının anlaşılmasında olmuş, kazanılan bilgi birikimi ile yeni DNA analiz ve tanı yöntemleri geliştirilmiş ve bunlar sadece çocuk ve erişkine değil fetal DNA'ya da uygulanabilecek hale gelmiştir. DNA analiz ve tanısında gittikçe daha basit, kolay, tekrarlanabilen, tek aşamalı, radyoaktivite gerektirmeyen, ekonomik ve tanı laboratuvarı ortamında da uygulanabilen yöntemler tercih edilmektedir. DNA analizi ve tanısı klinik ve biyokimyasal yaklaşımları tamamlayıcı niteliktedir, çok hassastır ve %100'e yakın kesinlikte sonuç vermektedir.

Tümü PCR'a dayalı olan bu yöntemler, talasemi ve anormal hemoglobinerin taşıyıcı ve doğum öncesi erken tanısında hızlı, ekonomik ve kolay uygulanabilir olmaları dolayısı ile bir çığır açmış, ve özellikle bu hastalıkların yaygın olarak görüldüğü toplumlarda önem kazanmışlardır. Bu yazı çerçevesinde, Tablo I' de görülen nokta mutasyonları ve küçük delesyon ve insersiyonları tanımlamakta kullanılan yöntemler tarif edilecektir. β -talasemi'de nadir görülen büyük delesyonların tanısı genellikle Southern Blot Analizi ile yapılmaktadır, dolayısı ile araştırma laboratuvarına kısıtlı kalmaya şimdilik mahkumdur.

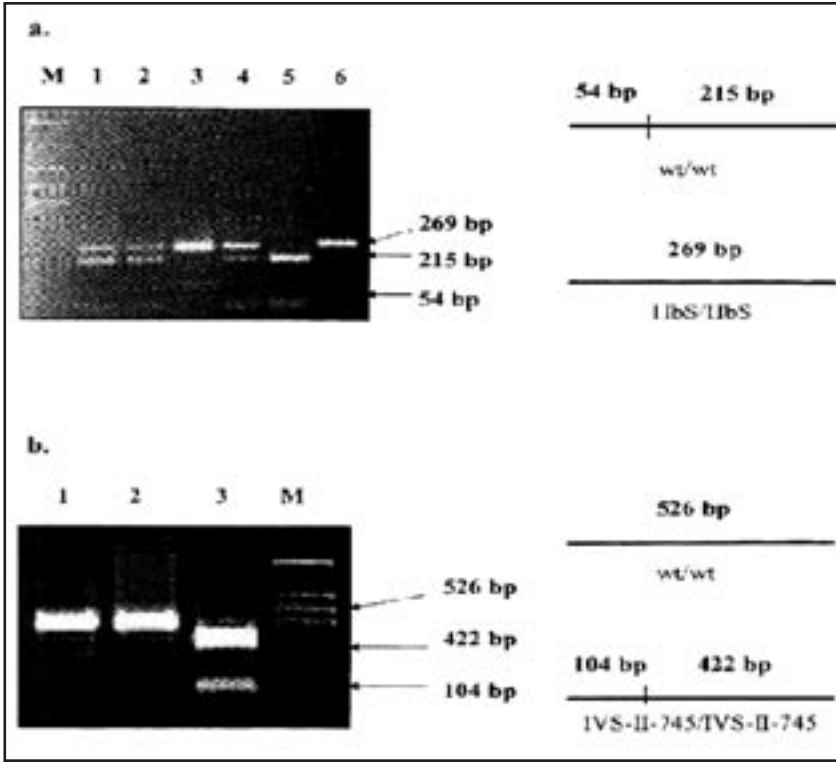
Restriksiyon Enzimi Analizi ile Orak Hücreli Anemi ve β -talasemi Tanısı

Orak Hücreli Anemi (HbS): Her zaman tek tip bir nokta mutasyonunun neden olduğu HbS'in DNA analizi en etkin ve ekonomik şekilde DdeI restriksiyon enzimi ile yapılır. Bunun için β -globin geninin 5' ucunda, 1. Ekzonu kapsayan bir bölge oraya özgün primer çifti ile çoğaltılır; elde edilen PCR ürünü DdeI restriksiyon enzimi ile kesilir. %1,5'luk agaroz gelinde üç değişik migrasyon şeması elde edilir: sağlıklı birey, taşıyıcı birey ve orak hücreli anemi'li, yani HbS'i her iki geninde taşıyan birey (Resim2).

Beta-talasemi: β -globin geninin mutasyon taşıyan bölgesi uygun primer çifti kullanılarak çoğaltılır; PCR ürünü mutasyona özgü restriksiyon enzimi ile kesildikten sonra %1,5'luk agaroz gelinde incelenir. Tablo III restriksiyon enzimi analizi ile incelenmesi mümkün olan bazı mutasyonları, bu mutasyonlara özgü restriksiyon enzimlerini ve tanı bölgesinin ne şekilde etkilendiğini göstermektedir.

Tablo II. β -globin geni analiz yöntemleri

1. Kandan ya da fetal dokudan DNA izolasyonu	
2. β -globin gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması	
3. PCR ürününün analizi	
a) Bilinen mutasyonlar:	b) Bilinmeyen mutasyonlar:
• ARMS	• DGGE
• Heterodüpleks analizi	• SSCP
• Restriksiyon enzimi analizi	• Manüel DNA dizi analizi
• Dot-blot analizi	• Otomatik DNA dizi analizi
• Reverse dot-blot analizi (β -Globin Strip Assay)	



Resim 2. a) %1,5'luk agaroz gelinde Ddel enzimi ile HbS tanısı; M: DNA uzunluk markörü 1,2,4: HbS taşıyıcısı; 3: HbS homozigotu; 5: sağlıklı birey; 6: PCR ürünü, **b)** %1,5'luk agaroz gelinde RsaI ile β -talasemi tanısı; 1: PCR ürünü; 2: sağlıklı birey; 3: IVS-II-745 homozigotu; M: DNA uzunluk markörü

Tablo III. Restriksiyon enzimi ile tanımlanabilen bazı β -talasemi mutasyonları (+ tanı bölgesi oluşuyor; - tanı bölgesi kalkıyor)

Mutasyon	Enzim	Tanı Bölgesi
Cd 39	RmaI	+
Cd 74/75	HaeIII	-
IVS-I-1	BspMI	-
IVS-II-1	HphI	-
IVS-I-6	SfaNI	+
FSC-5	Ddel / TaqI	- / +
FSC-6	Ddel	-
13 bp del	HinfI	-
-87	AvrII	-
IVS-II-745	RsaI	+

B.Ü. Moleküler Biyoloji Ve Genetik Bölümündeki Tanı Stratejileri

Yakın zamana kadar merkezimizde β -talasemi taraması, dot-blot hibridizasyonu ve ARMS yöntemleri paralel olarak kullanılarak yapılır. Tablo III' de gösterilen mutasyonlar restriksiyon enzimi kullanılarak doğrulanırdı. Adı geçen üç yöntem de son derece güvenilirdir. Fakat, özellikle doğum öncesi erken tanı söz konusu olan durumlarda Türk toplumu gibi, birçok mutasyon olasılığı olan toplumlarda bu yöntemleri zaman baskısı altında uygulamak kolay değildir. Genelde en sıklıkla görülen mutasyondan başlanıla-

rak, daha az görülen mutasyonlara doğru bir araştırma başlatılır; bu arada ailelerin geldikleri yöredeki mutasyon dağılımı da göz önünde bulundurulur.

Son senelerde piyasaya çıkarılan ve şu anda üçüncü nesli geliştirilmiş olan β -Globin Strip Assay (Vienna Lab - Labordiagnostika GmbH) adlı kit Türkiye'de talasemi tanısını büyük oranda kolaylaştırmıştır. Sistemin güvenilirliği bir yüksek lisans tezi çerçevesinde kanıtlandıktan sonra laboratuvarımızda rutin uygulamaya giren β -Globin Kiti şu anda mutasyon tanımlanmasında laboratuvarımızda en sıklıkla ve öncelikli olarak kullanılan yöntemdir (10). Gelen örnekler bu kit ile tanımlandıktan sonra ikinci bir yöntemle (ARMS ya da restriksiyon enzimi analizi) konfirme edilmektedir. Eğer β -globin kiti mutasyonu çözümülemiyorsa, başvurulacak bir sonraki yöntem DNA dizi analizidir.

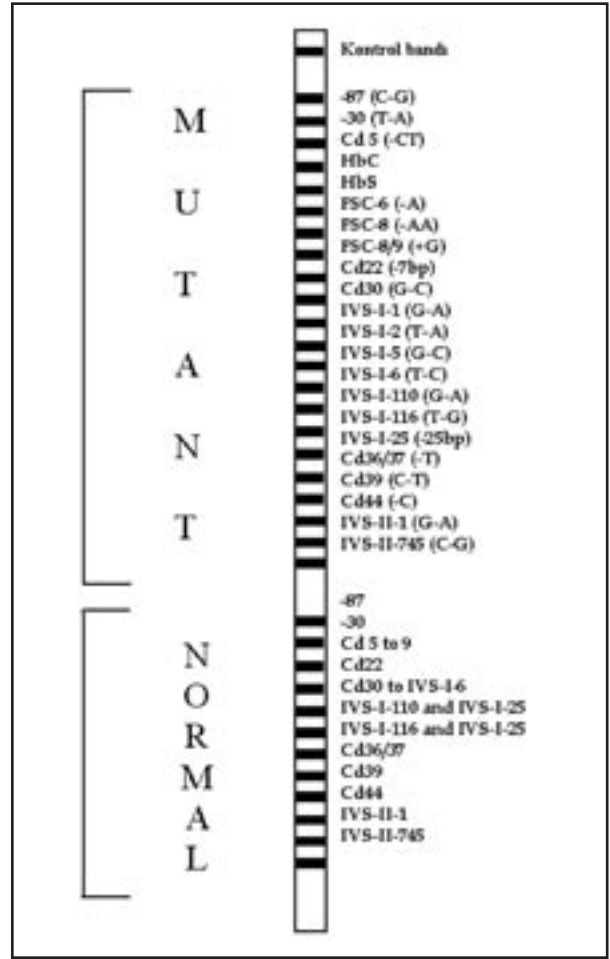
β -globin Strip Assay ile β -talasemi Tanısı

β -Globin Strip testi PCR ile çoğaltılmış DNA ürünlerinin mutasyona özgü oligonükleotid problemleriyle hibritleşmesi prensibi üzerine kurulmuştur. Normal Dot-Blot hibridizasyonunda DNA örnekleri membrana sabitleştirilirken, bu yöntemde oligonükleotid problemleri membrana sabitleştirilmiş durumdadır. Test üç ana aşamadan oluşmaktadır:

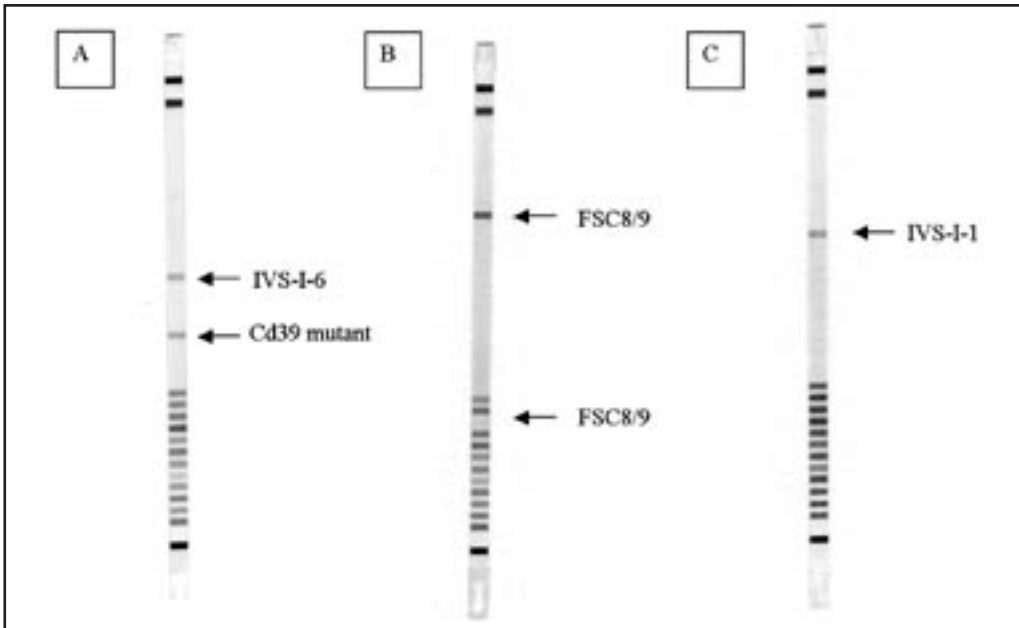
1. Kandan DNA izolasyonu
2. β -globin geninin biyotin ile işaretlenmiş primerlerle amplifiye edilmesi
3. PCR ürününün normal ve mutant problemleri paralel bantlar şeklinde taşıyan, hazır membranla hibridizasyona sokulması
4. Renk reaksiyonu ile görüntüleme

β -globin Strip testi β -globin geninde sıklıkla görülen ve Akdeniz ülkelerine özgü 22 mutasyonu kapsamaktadır. Bunların iki tanesi anormal hemoglobin (HbS ve HbC), 20 tanesi ise β -talasemi mutasyonudur (Resim3). Membranın üst kısmında toplam 22 mutant dizi, alt kısmında ise 12 tane normal dizi vardır. Test şeridindeki mutasyonların bazıları birbirine çok yakın oldukları için, bunlara tek bir normal oligonükleotid probu kullanılmıştır; dolayısıyla 22 mutasyon sadece 12 normal prob ile tanımlanabilmektedir.

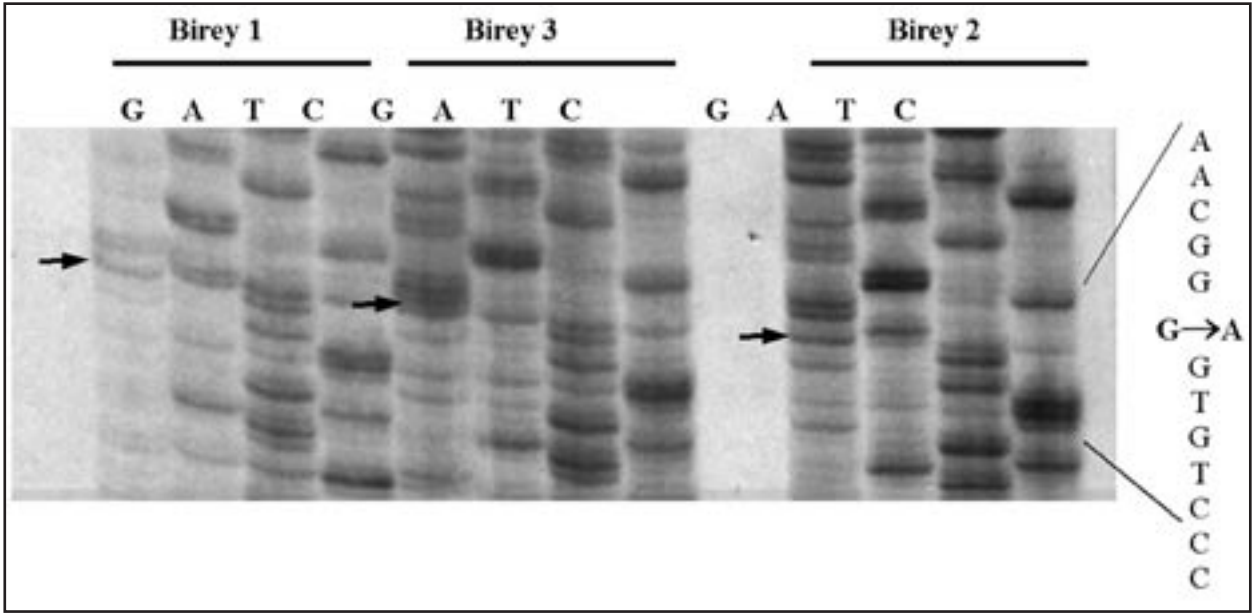
Resim 4'de bu yöntem kullanılarak yapılmış üç DNA tanısı görülmektedir. β -globin genotipini tanımlamak için, Resim 3'de görülen referans membranı kullanılmakta, test membranında elde edilen bantlar referans ile kıyaslanmaktadır. Resim 4A'da IVS-I-6 / Cd 39 için çift heterozigot olan bir birey, 4B'de FSC 8/9'u her iki kromozomunda taşıyan bir birey, 4C'de ise bir kromozomunda IVS-I-1, diğerinde ise test membranındaki mutasyonların hiçbirini taşımayan bir birey örnek olarak gösterilmiştir. Bu birey sadece β -talasemi taşıyıcısı olabileceği gibi, nadir veya yeni bir



Resim 3. β -Globin Strip Assay: Mutant ve normal oligonükleotid problemlerinin pozisyonlarını gösteren referans membranı



Resim 4. Test membranı örnekleri.
A: çift heterozigot (IVS-I-6/Cd39),
B: gerçek homozigot (FSC8/9-FSC8/9),
C: heterozigot (IVS-I-1/N)



Resim 5. DNA dizi analizi ile Türk toplumunda nadir görülen bir β -talasemi mutasyonunun tanımlanması: Cd 15 (TGG→TGA). 1 ve 2 numaralı bireylerde bu mutasyon homozigot olarak bulunmaktadır. 3 numaralı birey Cd 15 (TGG→TGA) mutasyonunu taşımamaktadır

mutasyon da taşıyor olabilir. Hastalık / taşıyıcı tanısının hematoloji birimlerinde DNA analizinden önce kesin olarak konması önemli bir husustur.

β -globin strip testi Türkiye’de β -talasemi tanısını büyük ölçüde kolaylaştırmıştır. Olguların %90’ı tek aşamada %100 güvenilirlik ile tanımlanabildiği gibi, yöntemin klinik laboratuvar ortamında uygulanabilirlik gibi çok önemli bir avantajı daha vardır. DNA izolasyonundan tanıyı almaya kadar olan süre toplam yarım gündür.

Bugünkü piyasa iç-alım fiyatı 1600 \$ olan kit ile 20 test yapılabilir (80 \$/test). 20 mutasyonu aynı anda taradığı gözönünde bulundurulduğu vakit, bu test pahalı değildir. Buna mukabil HbS tanısı için laboratuvarımızda daha ekonomik olan restriksiyon enzimi analizi kullanılmaktadır.

DNA Dizi Analizi

DNA dizi analizi, DNA’nın birincil yapısının en yüksek rezolüsyonudur. Diğer yöntemlerle tanımlanamayan mutasyonları incelemenin en etkin yoludur. Radyoaktiviteyle çalışılan manüel şekli, son yıllarda yerini floresan markalı kimyasallarla çalışılan otomatik yönteme bırakmıştır. Türkiye’de sadece birkaç laboratuvarında bulunan yüksek maliyetli cihaz, şimdilik sadece gelişmiş araştırma ünitelerine kısıtlı olmakla birlikte, bir teknisyen gözetiminde klinik ortamda da kullanılmaya elve-

rişlidir. Resim 5’te manüel sistem kullanılarak yapılmış bir örnek görülmektedir.

Sonsöz

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

21.yüzyıla girerken moleküler biyoloji ve genetiğin tıpta eşi görülmemiş bir devrimin öncüsü olduğuna şahit olmaktadır. Tam teşekküllü ve DNA analizine dayalı bir talasemi tanı programı, diğer Akdeniz ülkelerinde olduğu gibi, artık Türkiye’de de sayılı birkaç referans laboratuvarına sınırlı kalmamalıdır. Ülke çapında, güvenilir, etkili ve sistemli bir moleküler ve doğum öncesi erken tanı programı ve stratejisinin belirlenmesinde hükümete büyük görev düşmektedir. Sağlık Bakanlığı’nın talasemiyi ve hemoglobinin diğer kalıtsal bozukluklarını ülke sağlık politikaları çerçevesinde benimsemesi çok önemli bir gelişmedir. Bu programların gerçekleşmesi için, halkın yoğun şekilde

eğitilmesi ve bilinçlendirilmesinin yanında, az sayıdaki araştırma merkezlerindeki bilgi birikimi, teknik altyapı ve tecrübenin klinik laboratuvarlara özveri ile aktarılması kaçınılmazdır. Bu aşamada, bu merkezlere, gerek tekniklerin aktarılması safhasında, gerekse de daha sonraki etaplarda danışman olarak önemli görevler düşmektedir.

Kaynaklar

1. Ş.Tüzmen, A. N. Schechter, Genetic diseases of hemoglobin: Diagnostic methods for elucidating β -thalassemia mutations, Blood Reviews (2001) 15, 19-29
2. Swee-Lay Thein, β -thalassemia, Bailliere's Clinical Haematology 6/1 (1993) 151-175, The Haemoglobinopathies, Editors:D.R. Higgs, D. J. Weatherall.
3. T. H. J. Huisman, M. F. H. Carver, G. D. Efremov, A Syllabus of Hemoglobin Variants, The Sickle Cell Anemia Foundation (1996).
4. T. H. J. Huisman, M. F. H. Carver, E. Baysal, A Syllabus of Thalassemia Mutations, The Sickle Cell Anemia Foundation (1997).
5. G. O Tadmouri, Ş. Tüzmen, H. Özçelik, A. Özer, S. M. Baig, E. B. Senga, A. N. Başak, Molecular and Population Genetic Analyses of β -thalassemia in Turkey, Am. J. Hemat. 57 (1998), 215-220.
6. Ghazi O. Tadmouri, A. Nazlı Başak, β -thalassemia in Turkey; A review of the clinical epidemiological molecular and evolutionary aspects, Hemoglobin 25/2, (2001) 227-239.
7. Ghazi O. Tadmouri, β -thalassemia in Turkey; Distribution, diversity, evolution and phenotype-genotype correlations, Doktora Tezi, Boğaziçi Üniversitesi (1999).
8. Ş.Tüzmen, G. O Tadmouri, A. Özer, S. M. Baig, H. Özçelik, S. Başaran, A. N. Başak, Prenatal Diagnosis of B-thalassemia and Sickle Cell Anemia in Turkey, Prenatal Diagnosis 16 (1996), 252-258.
9. A. Nazlı Başak, Hemoglobinopatilerin Prenatal Tanısı ve Türkiye'de β -Talasemi'nin Moleküler Temeli, Prenatal Tanı ve Tedavi, Editör: Kılıç Aydın (1992).
10. Onur Bilenoglu, Molecular Analysis of β -thalassemia and Hemoglobins by the β -Globin Strip Assay: A novel diagnostic approach, Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi (1996).

Teşekkür

Bu çalışmalar Boğaziçi Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmektedir. Yazının şekil ve tablolarının hazırlanmasında ve bilgisayara geçirilmesinde bana yardımcı olan öğrencilerim Dr. Ghazi O. Tadmouri, Onur Bilenoglu, Ceylan Eken ve Ayşe Latif'e candan teşekkür ederim.