

β - TALASEMİ'DE MOLEKÜLER TANI VE YÖNTEMLERİ

Prof. Dr. A.Nazlı BAŞAK

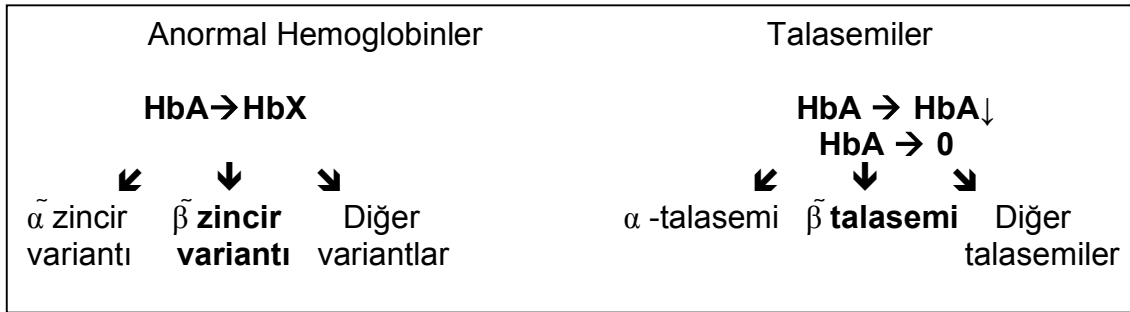
Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, İstanbul
basak@boun.edu.tr

GİRİŞ

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, Uzak Doğu ve Afrika ülkelerinde klinik tanı laboratuvarları ortamlarında uygulanabilecek duruma gelmiştir(1). Bu yazının birinci kısmında orak hücreli anemi ve β-talaseminin moleküler temeli tanıtılacak, ikinci kısmında DNA tanısında kullanılan yöntemler tartışılacak ve özellikle tanı laboratuvarı düzeyinde uygulanabilen yöntemler üzerinde durulacaktır.

HEMOGLOBİNİN GENETİK HASTALIKLARI

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. kromozom, β gen kümesi 11. kromozom üzerinde yer alır. Hemoglobinin, otozomal resesif olarak kalıtılan genetik hastalıkları, iki büyük gruba ayrılır; anormal hemoglobinler ve talasemiler:

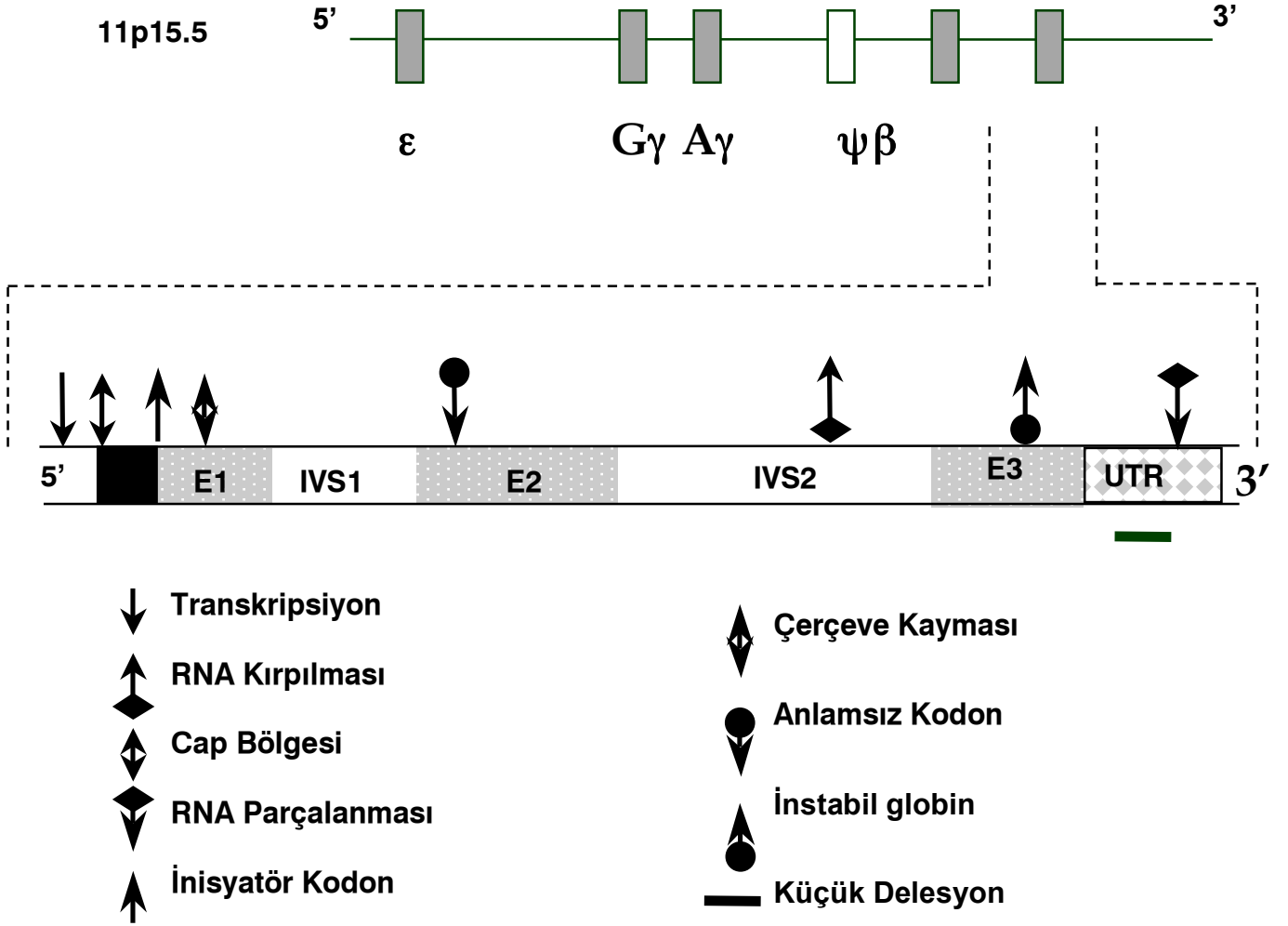


Bugünkü konumuzu oluşturan HbS ve β-talasemi, β-globin geni üzerindeki mutasyonlardan kaynaklanırlar.

β -GLOBİN GENİ

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 alır. 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 taşır (Şekil 1). 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).

Şekil1. 11. kromozomda yer alan β -globin gen kümesi; orak hücreli anemi ve β -talasemiye yol açan mutasyon tiplerinin β -globin geni üzerindeki yerleri.

ANORMAL HEMOGLOBİNLER: HbS

Bugün yaklaşık 700 anormal hemoglobin tanımlanmıştır. (<http://globin.cse.psu.edu>). Bunların 335'i β zinciri varyantıdır (3). Anormal hemoglobinler 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 hastalığın nedenidir. Bozuk gen tek bir ebeveynden kalıtıldığı durumda, HbS taşıyıcılığı, her iki ebeveynden kalıtıldığı durumda orak hücreli anemi hastalığı söz konusu olur.

TALASEMİLER: β -TALASEMİ

Talasemi sendromları oldukça geniş bir genetik yelpazeyi kapsar. Talasemiler sentezi bozulmuş olan globin zincirine göre α, β, γ, δ, ε, ζ, θ, ρ, σ, τ, υ, φ, χ, ψ, ω talasemi olarak adlandırılırlar. En sık görülen tipleri α ve β-talasemidir. α talasemi daha ziyade Uzak Doğu'da görülürken, β-talasemi Akdeniz ülkeleri, dolayısı ile Türkiye'de de siktir. Tek tip bir mutasyonun neden olduğu orak hücreli aneminin 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, α-talasemide görülen büyük delesyonlar değil, gen içindeki nokta mutasyonları oluşturur. 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 15 yılda, β-talasemiye yol açtığı bilinen mutasyonların sayısı büyük bir hızla arttı ve 200'ü geçti. 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 alel çeşitliliği, Sardunya adası, Kıbrıs gibi küçük ve izole etnik gruplarda daha da azalmaktadır, örneğin Sardunya Adasında sadece iki tip β -talasemi mutasyonu hastalık genlerinin %99'unu oluşturur (2). Akdeniz ülkeleri genelinde bakılacak olursa, yaklaşık 35 mutasyon Akdeniz havzasına özgü olarak nitelendirilmiş olmakla beraber, bu mutasyonların dağılımı ülkeler arasında büyük farklılıklar gösterir. Türkiye'de β-talasemi, diğer Akdeniz ülkelerine oranla daha karmaşıktır. Yukarıda bahsi geçen genel kural (6-8 mutasyon=%90-95 β-talasemi tanımı) Türk toplumu için geçerli değildir (5).

Beta-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 "hakiki homozigot"lardan farklı olarak "çift heterozigot" adı verilir.

Bazı mutasyonlar β-globin zincir sentezini tamamen ortadan kaldırır; bu tür iki mutasyon taşıyan bireylerin fenotipi β⁰-talasemidir; diğer bir grup mutasyon ise %5-%30 civarında β-globin sentezine izin verir; bu hastaların fenotipi β⁺ talasemidir.

Beta⁰-talasemide HbA sentezlenmez; β⁺talasemide, HbA söz konusu mutasyonun izin verdiği oranda sentezlenir. Genellikle genin kodlayıcı bölgeleri ile ekson-intron sınırındaki evrim boyunca korunmuş bölgeleri hedef alan mutasyonlar β⁰-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 anlatımının değişik kademelerinde β-globin geninin inaktive olmasına neden olurlar ve buna göre sınıflandırılırlar: transkripsiyon, inisyasyon, RNA kırılması, RNA prosesing, RNA modifikasyonu, tranlasyon, instabil globin gibi (Şekil1). Klinisyen

açısından bakıldığında, moleküler patoloji, hastalık tablosunun değişkenliğini büyük ölçüde yansıtmaktadır.

TÜRKİYE'DE β -TALASEMİ

Beta-talasemi taşıyıcılığı oranı Türkiye genelinde %2 olmakla birlikte, bu sayı Türkiye'nin bazı yörelerinde %10'a kadar çıkmaktadır. Akraba evliliklerinin 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 daha sıktır. 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, Cd39,-30 ve FSC-5 mutasyonları takibetmektedir (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 mutasyon çeşitliliği açısından kıyaslandığında, ülke nüfusunun %50'sini barındıran Batı Anadolu ve Akdeniz bölgelerinin, Türkiye genelindeki dağılımla uyumlu olduğu, buna karşılık Kuzey, Güney ve Doğu Anadolu bölgelerinin daha az heterojen olduğu, ve kendilerine özgü mutasyonlar içerdiği görülür (-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 ANALİZ YÖNTEMLERİ İLE β -TALASEMİ TANISI

Son yıllarda moleküler genetik alanında kaydedilen gelişmeler birçok kalıtsal hastalığın gen düzeyinde tanımlanmasını sağlamış, bunun sonucunda da bu hastalıkların tanısı DNA düzeyinde yapılabilir hale gelmiştir. En önemli ve hızlı gelişme talasemi ve anormal hemoglobinlerde ve bu gruptaki hastalıkların, moleküler mekanizmalarının ve mutasyonlarının anlaşılmasında olmuş, kazanılan bilgi birikimi ile yeni DNA analiz ve tam 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.

Tablo II: β-globin geni analiz yöntemleri

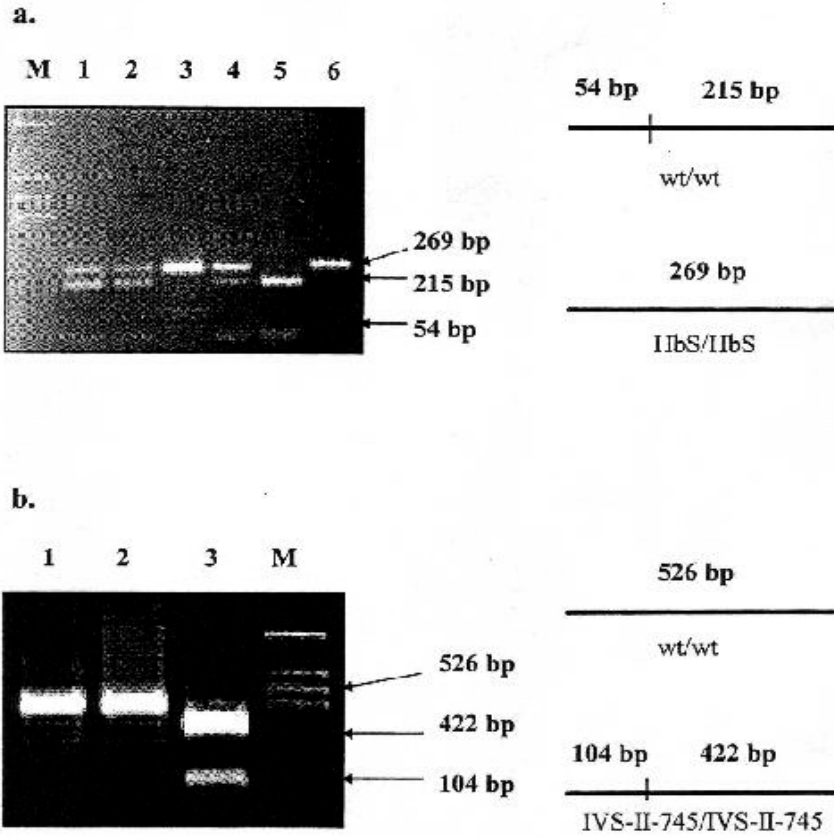
Kandan ya da fetal dokudan DNA izolasyonu	
β-globin gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması	
PCR ürününün analizi	
Bilinen mutasyonlar:	Bilinmeyen mutasyonlar:
ARMS	DGGE
Heterodüpleks analizi	SSCP
Restriksiyon enzimi analizi	Manüel DNA dizi analizi
Dot-blot analizi	Otomatik DNA dizi analizi
Reverse dot-blot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

Tümü PCR'a dayalı olan bu yöntemler, talasemi ve anormal hemoglobinlerin 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 mutasyonlarını 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.

RESTRIKSİYON ENZİMİ ANALİZİ İLE ORAK HÜCRELİ ANEMİ VE β -TALASEMİ TANISI

Orak Hücreli Anemi : Her zaman tek tip bir nokta mutasyonunun neden olduğu HbS'in DNA analizi en etkin ve ekonomik şekilde Ddel restriksiyon enzimi ile yapılır. Bunun için β globin geninin 5' ucunda, 1. eksonu kapsayan bir bölge özgün primer çifti ile çoğaltılır; elde edilen PCR ürünü Ddel restriksiyon enzimi ile kesilir. %1,5'luk agaroz gelinde üç değişik migrasyon şeması elde edilir: sağlıklı birey, taşıyıcı birey ve orak hücreli anemili, yani HbS'i her iki geninde taşıyan hasta birey (Şekil 2.).



Şekil 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

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

MUTASYON	ENZİM	TANI BÖLGESİ
Cd 39	Rmal	+
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	Hinfl	-
-87	AvrII	-
IVS-II-745	RsaI	+

B.Ü. MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜNDEKİ TANI STRATEJİLERİ

İlk zamanlarda merkezimizde β-talasemi taraması, dot-blot hibridizasyonu ve ARMS yöntemleri paralel olarak kullanılarak yapıldı. 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 başlanarak, daha az görülen mutasyonlara doğru bir araştırma başlatılır; bu arada ailelerin geldikleri yöredeki mutasyon dağılımı da göz önünde bulundurulurdu.

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 (10,11, 12). Gelen örnekler bu kit ile tanımlandıktan sonra ikinci bir yöntemle (ARMS ya da restriksiyon enzimi analizi) konfirme edilmektedir. Eğer β-globin kiti mutasyonu çözümülemiyorsa, başvuru yöntem DNA dizi analizidir.

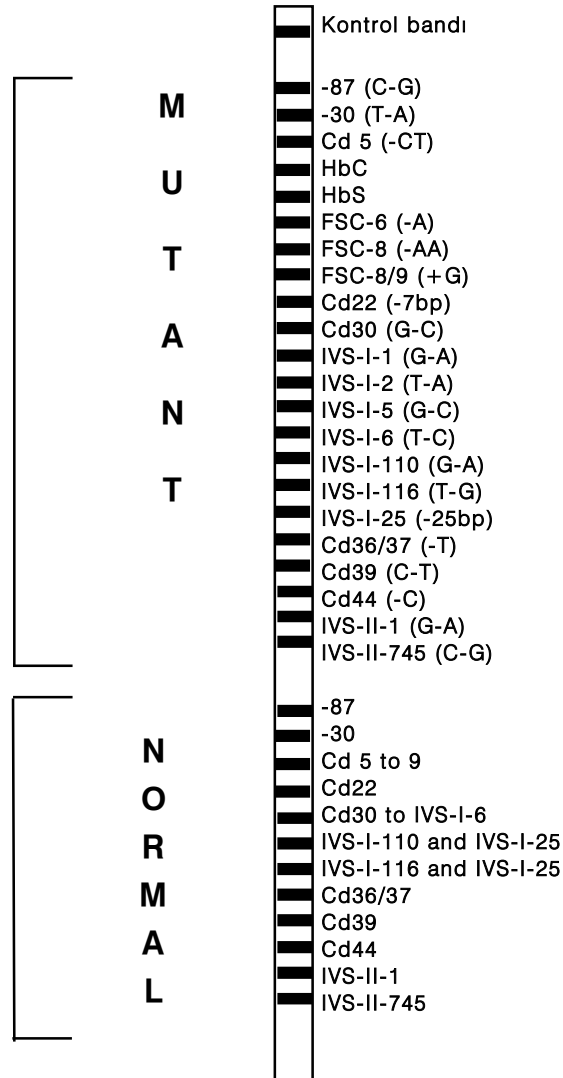
BETA-GLOBİN STRİP ASSAY İLE β -TALASEMİ TANISI

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

Test dört 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 membranla, hibridizasyona sokulması
4. Renk reaksiyonu ile görüntüleme

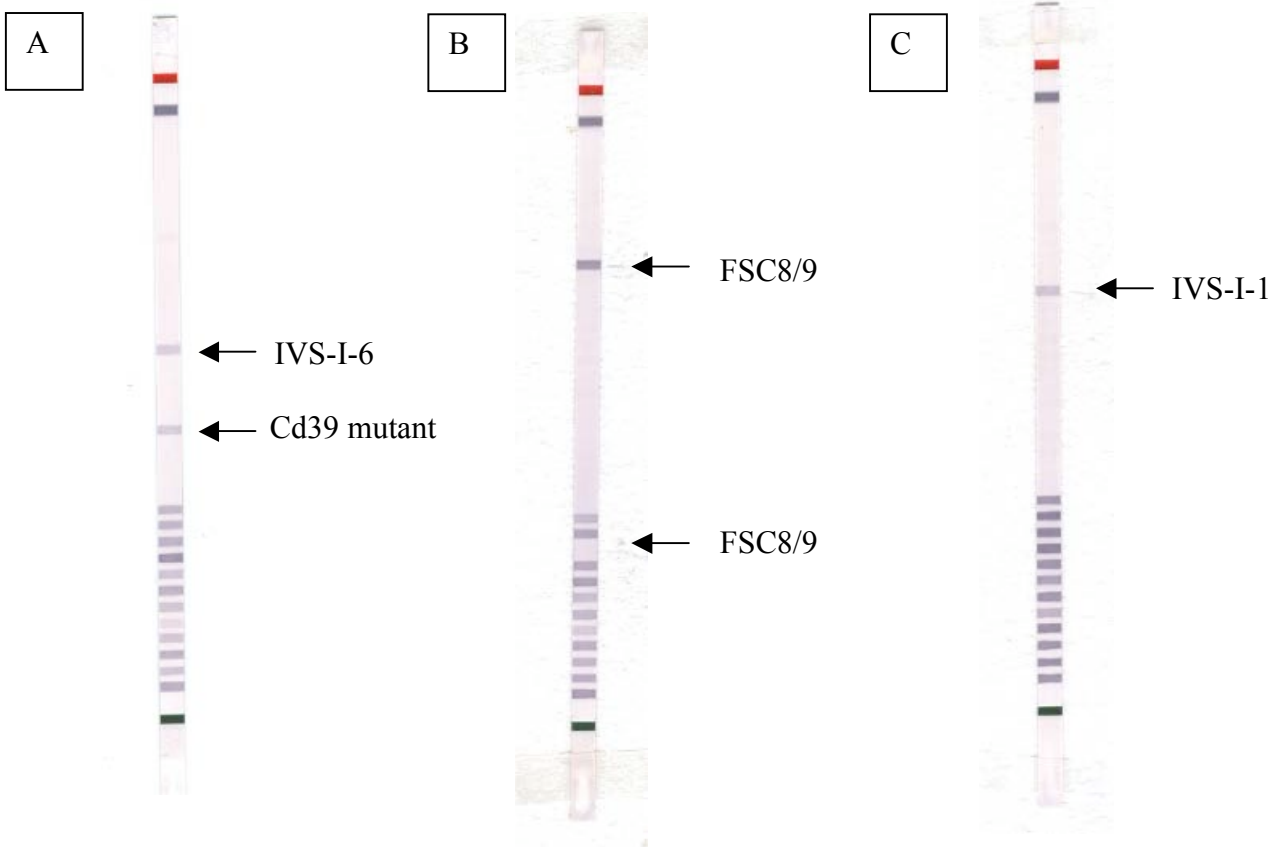
β -globin Strip testi β -globin geninde sıklıkla görülen ve Akdeniz ülkelerine özgü 22 mutasyonu kapsamaktadır. Bunların iki tanesi anormal hemoglobin (HbS ve HbC), 20 tanesi ise β -talasemi mutasyonudur (Şekil 3). Membranın üst kısmında toplam 22 mutant dizi, alt kısmında ise 12 normal dizi vardır. Test şeridindeki mutasyonların bazıları birbirine çok yakın oldukları için, bunlara tek bir normal oligonükleotid probe kullanılmıştır; dolayısıyla 22 mutasyon sadece 12 normal prob ile tanımlanabilmektedir.



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

Şekil 4'de bu yöntem kullanılarak yapılmış üç DNA tanısı görülmektedir. β-globin genotipini tanımlamak için, Şekil 3'de görülen referans membranı kullanılmakta, test membranında elde edilen bantlar referans ile kıyaslanmaktadır. Şekil 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 mutasyon da taşıyor olabilir. Hastalık / taşıyıcı tanısının hematoloji birimlerinde DNA analizinden önce kesin olarak konması önemli bir husustur.

Şekil 4: Test membranı örnekleri. A: çift heterozigot (IVS-I-6/Cd39),



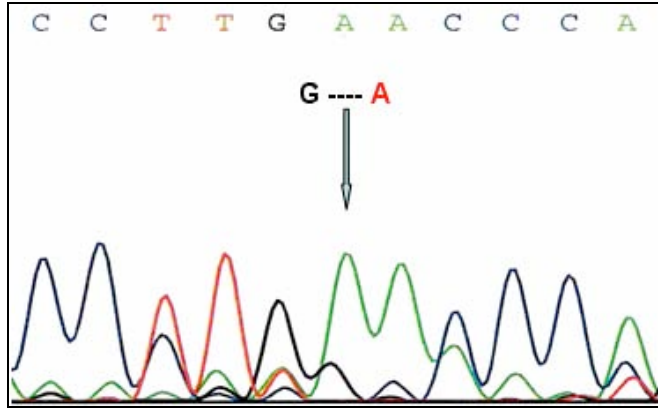
B: gerçek homozigot (FSC8/9-FSC8/9), C: heterozigot (IVS-I-1/N)

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.

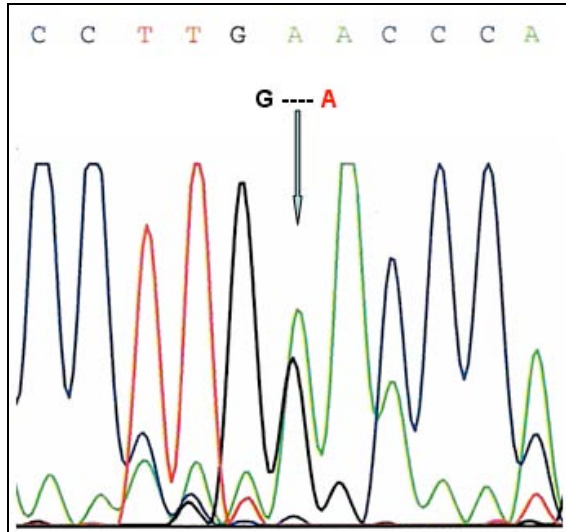
Bugünkü piyasa iç-alım fiyatı 1600 \$ olan kit ile 20 test yapılabilir (80 \$/test). 20 mutasyonu aynı anda taradığı gözönünde bulundurulduğu vakit, bu test pahalı değildir. Buna mukabil HbS tanısı için laboratuvarımızda daha ekonomik olan restriksiyon enzimi analizi kullanılmaktadır.

DNA DİZİ ANALİZİ

DNA dizi analizi, DNA'nın birincil yapısının en yüksek çözünürlüğüdür. Diğer yöntemlerle tanımlanamayan mutasyonları incelemenin en etkin yoludur. Radyoaktiviteyle çalışılan manüel şekli, son yıllarda yerini floresan markalı kimyasallarla çalışılan otomatik yöntemle 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 elverişlidir. Şekil 5'te floresan markalı dNTP'ler kullanılarak yapılmış, otomatik DNA dizi analizi örneği görülmektedir.



Birey 1: Cd37 (TGG-TGA) / Cd37 (TGG-TGA) (Trp – Stop)



Birey 2: Cd37 (TGG-TGA) / β^A

Şekil 5: DNA dizi analizi ile Türk toplumunda nadir görülen bir β -talasemi mutasyonunun tanımlanması: Cd37(TGG→TGA). Birey 1'de bu mutasyon homozigot olarak bulunmaktadır. Birey 2 Cd37 (TGG→TGA) taşıyıcısıdır; bir alelinde TGG, diğerinde TGA bulunmaktadır.

SONSÖZ

β -talasemi ve orak hücreli anemi Türkiye'de önemli bir sağlık sorunu oluşturur. Bu hastalıkların henüz kesin tedavileri yoktur, dolayısı ile moleküler tanı ve doğum öncesi

erken tanı riskli aileler için büyük önem taşır. β-talaseminin moleküler düzeyde çok heterojen olması, bundan 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. yüzyılda moleküler biyoloji ve genetiğin tıpta eşi görülmemiş bir devrimin öncüsü olduğuna şahit olmaktayız. 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 talasemi ve hemoglobinin diğer kalıtsal bozukluklarını ülke sağlık politikaları çerçevesinde benimsemesi çok önemlidir. 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 Thalassaemia 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, B-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 βGlobin Strip Assay: A novel diagnostic approach,Yüksek Lisans Tezi, Boğaziçi Üniversitesi(1996).
11. Onur Bilenoglu, Beta-Thalassemia in Turkey: Molecular Analysis of The Beta-Globin Gene And The Effect of The Beta – A 13 Mutation on Gene Expression, Doktora Tezi, Boğaziçi Üniversitesi (2002)

12. Ayőe Latif, Molecular Analysis of Hemoglobinopathies and Construction of a Database; Identification of a Novel IVS-II-2 (T-A) Mutation, Yüksek Lisans, Boęazięi Üniversitesi (2006)

TEŐEKKÜR

Bu yazının Şekil ve tablolarının hazırlanmasında ve bilgisayara geğirilmesinde bana yardımcı olan ęrencilerim Dr. Ghazi O. Tadmouri, Onur Bilenoęlu ve İlknur Yıldız'a candan teŐekkür ederim.