

Hemoglobin D- Los Angeles [β 121(GH4) Glu>Gln] Mutasyonunun Yüzeysel Plazmon Rezonans (SPR) Spektroskopisi İle Ayırıcı Moleküler Tanısı

Differential Molecular Diagnostic of the Hemoglobin D- Los Angeles [β 121(GH4) Glu>Gln] Mutation with Surface Plasmon Resonance (SPR) Spectroscopy

¹ Anzel BAHADIR

² Erol Ömer ATALAY

¹ Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, DÜZCE

² Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, DENİZLİ

Submitted/Başvuru tarihi:

15. 10. 2011

Accepted/Kabul tarihi:

25. 11. 2011

Registration/Kayıt no:

16 11 171

Corresponding Address /Yazışma Adresi:

Dr. Anzel BAHADIR

Düzce Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı, 81620 Düzce-TÜRKİYE
e-posta: anzelbahadir@duzce.edu.tr

© 2012 Düzce Medical Journal
e-ISSN 1307- 671X
www.tipdergi.duzce.edu.tr
duzcetipdergisi@duzce.edu.tr

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada, Hb D-Los Angeles anormal hemoglobin (Hb) türünün laboratuvar tanısında kullanılan moleküler yaklaşımlar irdelenerek, bu hemoglobin türünün gen düzeyinde hızlı ve güvenilir tanısında, biyosensör tabanlı yüzeysel plazmon rezonans (SPR: Surface Plasmon Resonance) spektroskopisi kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada, aralarında akrabalık ilişkisi olmayan, sağlıklı (Hb AA, n:5) ve heterozigot Hb D- Los Angeles [β 121(GH4) Glu>Gln] (n:5)'li bireyler incelenmiştir. Hb D- Los Angeles mutasyonunun protein düzeyinde tanımlanmasında, alkali/asit hemoglobin elektroforezleri, DE-52 mikrokolon kromatografisi yöntemleri kullanılmıştır. Mutasyonun gen düzeyinde saptanmasında ise, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR: Polymerase Chain Reaction) tabanlı dayalı Eco RI restriksiyon enzimi/ tek nükleotid polimorfizmi (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) ve flüoresan işaretli DNA dizi analiz yöntemleri kullanılmıştır. SPR spektroskopisi kullanılarak, Hb AA ve Hb AD- Los Angeles olgularına ait biyotininli primerler ile işaretlenmiş PCR ürünleri ile mutasyon odağına özgü Eco RI restriksiyon enzim etkileşimi gerçek zamanlı olarak incelenmiştir.

Bulgular: SPR spektroskopisi ile Hb AD-Los Angeles ve Hb AA olguları arasındaki farklılıklar gerçek zamanlı olarak belirlenmiştir. Elde edilen verilere göre, SPR spektroskopisi yöntemi, HbAA ve Hb AD- Los Angeles mutasyonu arasındaki değişiklikleri algılayabilmektedir. Bağlanma eğrilerinden, Hb AA PCR ürünü ile Eco RI restriksiyon enzimi etkileşimi sonucu 400 arc saniyelik, heterozigot Hb AD -Los Angeles olgusunda ise, EcoRI enzimi ve hedef PCR ürünleri arasında 300 arc saniyelik rezonans kayıtları alınmıştır. Aradaki 100 arc saniyelik rezonans fark, Hb D- Los Angeles mutasyonundan kaynaklanmaktadır.

Sonuç: Moleküler tanı yöntemlerinde anormal hemoglobinin bozukluklarının doğru biçimde tanımlanması önemlidir. Moleküler tanı yöntemlerinde anormal hemoglobinin bozukluklarının doğru biçimde tanımlanması önemlidir. Bu yöntemlerden protein ve gen düzeyindeki tanı yöntemlerinde, birçok hemoglobin türü benzer davranış sergilediklerinden kesin tanı yöntemi DNA dizi analizidir. DNA dizi analizi ise pahalı bir yöntem olması, analiz uzun zaman alması ve deneyimli kullanıcı gereksinimi nedeni ile her laboratuvar rutin biçimde kullanılamamaktadır. Bu doğrultuda, SPR spektroskopisi yönteminin geliştirilerek, Hb D- Los Angeles ya da benzeri anormal hemoglobinin bozukluklarının kısa sürede ve gerçek zamanlı tanısında, rutin uygulamalarda kullanılabilmesi sonucuna varılmıştır.

Anahtar kelimeler: Hb D- Los Angeles, Hemoglobin, Yüzeysel Plazmon Rezonans (SPR) Spektroskopisi

ABSTRACT:

Objective: In this study, we aimed to determine the molecular approaches used in the laboratory diagnosis of Hb D- Los Angeles and to show rapid and reliable diagnosis of the mutation by SPR (Surface Plasmon Resonance) spectroscopy based biosensor.

Materials and Methods: In this study, we were investigated with heterozygote Hb D- Los Angeles [β 121(GH4) Glu>Gln] (n:5) and healthy (Hb AA, n:5) individuals. These individuals were unrelated with each other. For the determination of the Hb D- Los Angeles mutation alkaline/acid electrophoresis DE-52 microcolumn chromatography procedures were applied at the protein level. This mutation were determined by Eco RI restriction enzyme/SNP (Single Nucleotide Polymorphism) and labelled fluorescence automated DNA sequencing methods based on PCR (Polymerase Chain Reaction) at the gene level. We were examined by using SPR spectroscopy as real-time interactions in between biotinylated PCR products and the restriction enzyme Eco RI.

Results: Differences between Hb AD-Los Angeles and Hb AA samples were determined with SPR spectroscopy as the real-time. According to our results, SPR spectroscopy method can detect the changes in between Hb AA and Hb AD Los Angeles mutation. The resonance recordings have been given 400 arc second as a result of interaction HbAA PCR products with Eco RI restriction endonuclease, whereas between Eco RI enzyme and target PCR products have been given 300 arc second in the case of heterozygous Hb D Los Angeles from the binding curves. In between them, 100 arc second of the resonance difference were caused by Hb D- Los Angeles mutation.

Conclusion: Molecular diagnostic methods are important tools for the identification of the abnormal hemoglobins. Since abnormal hemoglobins present some similar results with electrophoretic and chromatographic methods, precise identification method is DNA sequencing analysis. DNA sequence analysis is not used to every laboratory routinely, because of the need for an experienced user, to give long term results and to be expensive. In this regard, we have been concluded that SPR spectroscopy can be used as routine applications in short period of time and real-time detection in the model of Hb D Los Angeles. Similar approaches based on SPR can be also developed for the abnormal hemoglobins.

Key Words: Hb D- Los Angeles, Hemoglobin, Surface Plasmon Resonance (SPR) Spectroscopy

GİRİŞ

Hemoglobinopatiler, ülkemizde ve dünya da sıklıkla gözlenen kalıtsal kan hastalıklarından biridir. Bu hastalıklar kendi içinde başlıca, anormal hemoglobin bozuklukları ve talasemiler olarak iki gruba ayrılmaktadır. Normal globin zincirlerinin birinin amino asitlerinden bir veya birkaçının yerine başka amino asit geçmesi ile tanımlanan çok sayıdaki anormal hemoglobin bozukluklarının varlığı birçok araştırmacı tarafından tanımlanmıştır (1). Dünya çapında 700'ün üzerinde farklı anormal hemoglobin belirlenmiştir (2, 3). Türk popülasyonunda ise en yaygın gözlenen anormal hemoglobinler; Hb S [$\beta 6(A3) \text{Glu} > \text{Val}$], Hb C [$\beta 6(A3) \text{Glu} > \text{Lys}$], Hb D-Los Angeles [$\beta 121(\text{GH4}) \text{Glu} > \text{Gln}$] ve Hb E [$\beta 26(\text{B8}) \text{Glu} > \text{Lys}$] gibi hemoglobin türleri olmak üzere toplam 42 anormal hemoglobin bildirilmiştir (4, 5). Yapılan araştırmalara göre Türkiye genelinde Hb D- Los Angeles, Hb S mutasyonundan sonra ikinci en yaygın (%0.2) hemoglobin olarak belirlenir iken, Denizli ilinde ise bu anormal hemoglobin %57.8 sıklıkla ilk sırada yer almaktadır (4-6). Ayrıca Hb Tunis [$\beta 124(\text{H2}) \text{Pro} > \text{Ser}$], Hb D- Ouled Rabah [$\beta 19(\text{B1}) \text{Asn} > \text{Lys}$] anormal hemoglobin türleri Türkiye'de ilk olgu ve Hb J- Iran [$\beta 77(\text{EF1}) \text{His} > \text{Asp}$] hemoglobin türü ise ülkemizde dördüncü olgu olarak Denizli ilinde tanımlanmıştır (6-8). Ayrıca nadir anormal hemoglobin türlerinden Hb Yaizu [$\beta 79(\text{EF3}) \text{Asp} > \text{Asn}$] ve Hb Beograd [$\beta 121(\text{GH4}) \text{Glu} > \text{Val}$] gibi anormal hemoglobin türlerine de Denizli ilinde rastlanması nedeni ile bu bölge anormal hemoglobin sıklığı ve çeşitliliği açısından geniş bir spektrum göstermektedir (10, 11).

D- Punjab, D-Nort Carolina, D-Portugal, D-Chicago ve Oak Ridge isimleri ile de bilinen Hb D- Los Angeles anormal hemoglobin bozukluğu, beta globin zinciri 121. kodonunda G>C baz yer değiştirmesi sonucu, glutamik asit (GAA) yerine glutamin (CAA) gelmesi sonucu oluşan amino asit farklılığından kaynaklanmaktadır (12). Hb D- Los Angeles klinik olarak belirti vermemekle birlikte, eritrosit sayısı, ortalama eritrosit hacmi gibi eritrosite ilişkin parametrelerde alt sınırlarda bir tablo sergilemektedir. Diğer taraftan orak hücre anemisi (Hb S) gibi diğer anormal hemoglobin türleri ile olası kombinasyonlarda hematolojik sorunlar doğmasına neden olmaktadır (13, 14).

Rutin hemoglobinopati taramalarında, Hb D- Los Angeles'ın protein düzeyinde ayırıcı tanısında, iyon değiştirici DE-52 (Dietyl amino etil) selüloz kolon kromatografisi ve hemoglobin elektroforez teknikleri kullanılmaktadır (15). Fakat protein düzeyinde gerçekleştirilen tanımlamalarda, birçok hemoglobin türü benzer elektroforetik ve kromatografik davranış

sergilediklerinden, gen düzeyinde uygulanan PCR tabanlı dayalı Eco RI restriksiyon enzimi/ tek nükleotid polimorfizm ve flüoresan işaretli DNA dizi analiz yöntemlerinden yararlanılmaktadır (16). Gen düzeyindeki uygulamalarda ise, gendeki olası değişiklikleri inceleyebilmek amacı ile izotop, enzim gibi herhangi bir işaretleyiciye gereksinim duyulmaktadır.

SPR spektroskopisi; optik ilkelere dayalı biçimde geliştirilmiş, herhangi bir işaretleyiciye (enzim, radyoaktif madde v.b) gereksinim duymaksızın, iki molekül arasındaki biyomoleküler etkileşimin doğası hakkında bilgi veren, gerçek zamanlı bir biyosensördür(17). SPR analizinden elde edilen veriler, zamana (saniye) bağlı rezonans açısındaki değişimler (arc saniye) şeklinde ifade edilen kinetik eğriler olarak tanımlanmaktadır. SPR spektroskopisi, biyolojik moleküllerin yapı ve işlev ilişkilerinin moleküler düzeyde tanımlayarak, çok kısa bir zaman diliminde moleküler etkileşim türünü belirleyebilen yaygın kullanım alanlarına sahiptir. Bu nedenle SPR analizleri, protein-protein, ilaç-reseptör, antijen-antikor, DNA/RNA-protein, DNA-DNA, hücre - protein gibi moleküler etkileşim ilişkilerini incelemek için önemli araştırmalar yapılarak moleküler tanıma kullanılabilirliği üzerinde gelişmeler sağlanabilmesine olanak tanımaktadır (17, 18). Bu bağlamda, talasemi ve anormal hemoglobin gibi kalıtsal hastalıklara neden olan mutasyonların tespit edilmesi, hızlı ve güvenilir sonuçların gerçek zamanlı alınması amacı ile SPR kullanımı bildirilmiştir (19-21). Bu çalışmada, Denizli ilinde yüksek sıklıkla gözlenen Hb D-Los Angeles anormal hemoglobinin laboratuvar tanısında kullanılan moleküler yaklaşımlar irdelenerek, bu hemoglobin türünün gen düzeyinde hızlı ve güvenilir tanısında biyosensör tabanlı SPR spektroskopisinin tek başına kullanımı ile ilgili sonuçlar aktarılmaktadır.

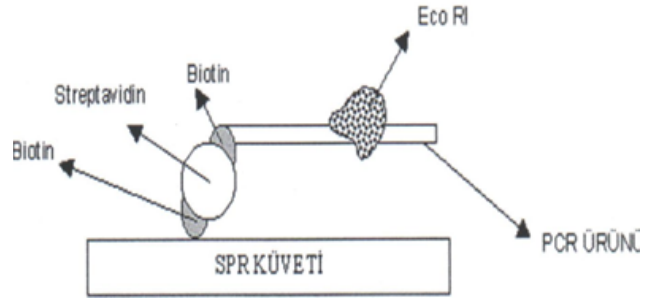
GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada kullanılan heterozigot Hb D- Los Angeles [$\beta 121(\text{GH4}) \text{Glu} > \text{Gln}$] (n:5) ve sağlıklı (Hb AA, n:5) bireylere ait DNA örnekleri, Pamukkale Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyofizik Anabilim Dalı'nda "Bilgilendirilmiş Hasta Onay Formu" ile yazılı onayları alınmış bireylerin periferik kan hücrelerinden elde edilmiştir. Potasyum-EDTA (K_3EDTA)'lı tüplere toplanan 2 ml tam kan örneklerine standart fenol-kloroform ekstraksiyon yöntemi uygulanarak, her bir bireye ait DNA örnekleri izole edilmiştir (22). Kullanılan DNA örnekleri Pamukkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı DNA bankasından alınmıştır.

Hb D- Los Angeles mutasyonunun protein düzeyinde tanımlanmasında, bireylere ait hazırlanan hemolizat örnekleri ile asit ve alkali pH'ya sahip agaroz tabanlı kitler (Helena Biosciences Europe, Sunderland, Tyne & Wear, UK) kullanılarak, hemoglobin elektroforezleri yapılmıştır. Anormal hemoglobin ve Hb A2 miktarlarının kantitatif ölçümleri için DE-52 anyon değiştirici mikrokolon kromatografisi ile yüzde hemoglobin değerleri 415 nm'lik dalga boyunda ELISA (ELx 800TM Absorbance Microplate Reader, Biotek) sisteminde okutulularak hesaplanmıştır (23).

PCR yöntemi ile, Hb AA ve Hb AD Los Angeles mutasyonlu bireylere ait DNA örnekleri kullanılarak, beta globin geninin 121. kodonu içeren 861 bp uzunluğundaki gen bölgesi, çoğaltılmıştır. PCR işleminde, PAM200(5'-Biotin-AAATTAGGATCCCAATGTATCATGCCTCTTTG C-3') ve PAM201(5'-TATAATAAGCTTGAGTCAAGGCTGAGAGATGC AGGA-3') primerleri kullanılmıştır. PCR karışımı, ısıl döngü cihazında (Technegene Thermo Cycler), 94oC 30 sn denatürasyon, 65oC 15 sn primer bağlanması, 72oC 30 sn uzama adımlarından oluşan 30 döngülü programa konulmuştur. Çoğaltım sonrası elde edilen PCR ürünlerinin büyüklükleri, %1'lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme cihazında görüntülenmiştir.

Hb D- Los Angeles'ın gen düzeyinde ayırıcı tanısı için PCR tabanlı dayalı Eco RI restriksiyon enzimi/ SNP analizi gerçekleştirilmiştir. Çünkü normal β - globin geni 121. kodonu GAA, 122. kodonu TTC baz dizisine sahiptir. Hb D- Los Angeles mutasyonunda ise, 121. kodon CAA, 122. kodon TTC nükleotid dizilimi gösterdiğinden, gen düzeyinde yapılan bu analizde çift iplikli DNA (dsDNA: double stranded DNA) üzerinde yer alan 5'-G↓AATTC-3' dizisini tanıyarak kesen, EcoRI restriksiyon endonükleaz kullanılmıştır. Gece boyu 37 oC'de bekletme sonucu elde edilen enzim kesim ürünlerinin büyüklükleri ise, %1'lik agaroz jelde yürütülerek jel görüntüleme cihazında belirlenmiştir. Hb D- Los Angeles mutasyonunu taşıyan heterozigot örnekler, DNA bankasına alınmadan dizi analizi ile doğrulanmıştır. Hb D- Los Angeles mutasyonunun daha hızlı ve güvenilir molekül sel tanısı için, bu çalışmada yüzey plazmon rezonans fiziksel prensibine dayalı IASys SPR (IASys Plus Affinity Sensors, Cambridge, UK) optiksel biyosensör cihazı kullanılmıştır. Cihazın deney parametreleri; sıcaklık 22 oC, karıştırıcı hızı % 85, örnekleme aralığı 1 sn olarak ayarlanmıştır. SPR yöntemi uygulamasında, iki tane mikro kanal içeren biyotin küvet kullanılarak, cihaz el kitabındaki 1.4 nolu protokol uygulanmıştır (18). Bu deney protokolü



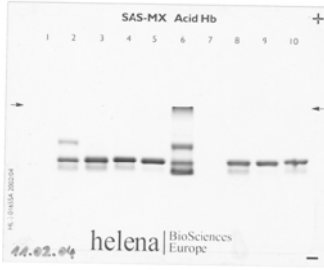
Resim 1: SPR küvetinde deneysel a amaların ematik gösterimi

üç temel aşamadan oluşmaktadır. Birinci aşamada, 5'ucu biyotinlenmiş PCR ürünlerinin etkin bir şekilde yakalanması için önceden literatürde tanımlanmış streptavidin-biotin etkileşiminden yararlanılarak, biyotin küvete 40 μ l streptavidin molekülü ile kaplanmıştır (24). İkinci aşamada, streptavidin kaplı biyotin küvetin birinci kanalına 10 μ l sağlıklı (HbAA), ikinci kanalına ise 10 μ l heterozigot Hb D- Los Angeles PCR ürünleri yüklenmiştir. Son aşamada ise, biyotinlenmiş PCR ürünlerinin 8 μ l EcoRI (20 U) restriksiyon endonükleaz enzimi ile etkileşimi, gerçek zamanlı olarak zamana (saniye) karşı rezonans açısındaki değişimler (arc saniye) şeklinde kinetik eğriler şeklinde incelenmiştir. SPR yönteminin deneysel şeması Resim 1'de gösterilmektedir.

BULGULAR

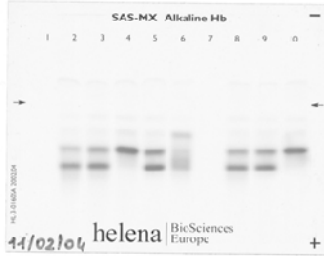
Denizli'de yüksek sıklıkla gözlenen heterozigot Hb D- Los Angeles ve sağlıklı bireylerin protein ve gen düzeyinde analizleri yapılmıştır. Protein düzeyinde gerçekleştirilen analizlere göre, Hb AD- Los Angeles mutasyonu taşıyan bireylerde, alkali hemoglobin elektroforezinde (pH: 8.2-8.6) Hb S, asit hemoglobin elektroforezinde (pH:6.0-6.2) Hb A gibi davranan bantlar gözlenmiştir (Resim 2, 3). DE-52 mikrokolon kromatografisi yöntemi ile, Hb D- Los Angeles mutasyonuna sahip bireylerin ortalama yüzde (%) hemoglobin miktarları; %2.2 Hb A2, %36.5 Hb X ve %61.3 Hb A olarak bulunmuştur. Sağlıklı bireylerin ise ortalama yüzde (%) hemoglobin miktarları %2.5 Hb A2 ve %97.5 Hb A olarak saptanmıştır.

Gen düzeyinde HbD Los Angeles mutasyonun molekül sel belirlemeleri için, 121. kodondaki Hb D Los Angeles mutasyonunda, G yerine C nükleotidinin değişmesi ile karakterize edilen bölge PCR/EcoRI SNP analizi ile incelenmiştir. Sağlıklı (Hb AA) ve heterozigot Hb D Los Angeles'lı bireylerden elde edilen 861 bp'lik PCR ürünlerine EcoRI restriksiyon enzim kesim reaksiyonu uygulandığında; Hb AA'lı bireylerde 552 bp, 309 bp uzunluğunda, Hb AD Los Angeles'lı bireylerde ise 861 bp, 552 bp, 309 bp



Resim 2: Asit hemoglobin elektroforezi

1: AS Hemoglobin Kontrol
6: AFSC Hemoglobin Kontrol



Resim 3: Alkali hemoglobin elektroforezi

2,5,8,9: Hb D Los Angeles Heterozigot (Hb AD)
4,10: Hb S homozigot (Hb SS)

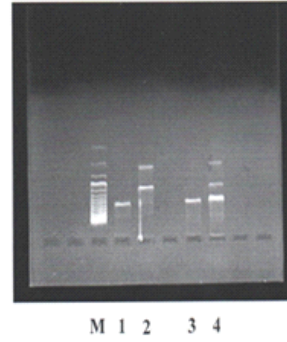
uzunluklarında bantlar gözlenmiştir (Resim 4). Diğer taraftan kullanılan örneklerdeki Hb D- Los Angeles mutasyonu taşıyan örnekler DNA bankasına alınmadan dizi analizi ile doğrulanmıştır.

SPR analiz sonuçlarından, birinci kanala yüklenen sağlıklı (Hb AA) PCR ürünü ile Eco RI restriksiyon enzim etkileşimi sonucu, yaklaşık 400 arc saniyelik (2000 arc sn-1600 arc sn) bir rezonans kaydı alınır iken, ikinci kanala yüklenen heterozigot Hb AD -Los Angeles olgusunda ise, EcoRI - hedef PCR ürünü etkileşimi ile 300 arc saniyelik (1800 arc sn-1500 arc sn) bir SPR kaydı algılanmıştır. Aradaki 100 arc saniyelik rezonans fark, Hb D- Los Angeles mutasyonundan kaynaklanmaktadır (Resim 5).

TARTIŞMA

Talasemiler ve anormal hemoglobin bozuklukları, dünyada ve özellikle ülkemizin de yer aldığı Akdeniz kuşağında, en yaygın kalıtsal hastalıklardan biridir (1-5). Denizli ilinde yüksek sıklıkta gözlenen anormal hemoglobin türleri; Hb D- Los Angeles (%57.8), Hb S (%21.9), Hb G- Coughatta (%15.6), Hb E- Saskatoon (%3.1) ve Hb C (%1.6) olarak bildirilmiştir (6). Bu ilde en yüksek sıklıkta gözlenen Hb D- Los Angeles, beta globin zinciri 121. kodonunda G>C baz yer değiştirmesi sonucu, glutamik asit (GAA) yerine glutamin (CAA) gelmesi sonucu oluşan amino asit farklılığından kaynaklanmaktadır (12).

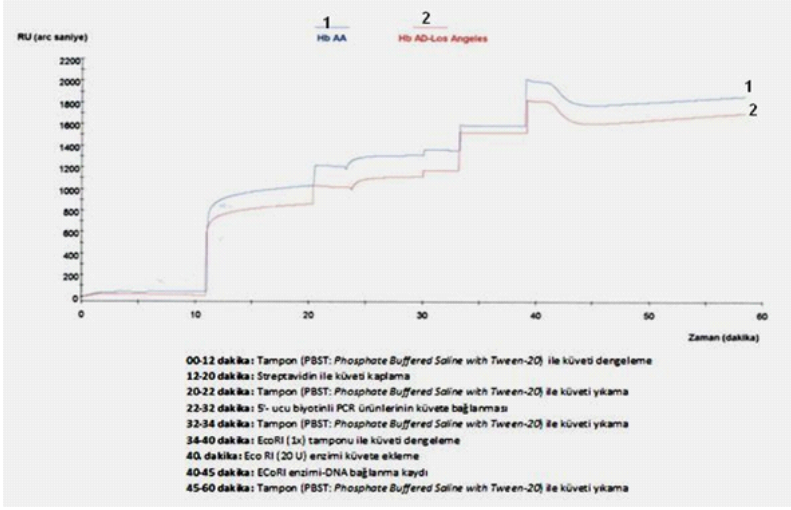
Hemoglobin bozuklukları, protein ve gen düzeyindeki molekülse yöntemler ile tanımlanmaktadır (15, 16). Protein düzeyindeki molekülse tanı yöntemleri olan elektroforetik ve kromatografik yöntemlerde; Hb D- Los Angeles [β 121(GH4) Glu>Gln] ve benzeri anormal hemoglobin türleri (Hb G- Coughatta [β 22(B4) Glu>Ala], Hb- Beograd [β 121(GH4)



Resim 4: EcoRI enzim kesimi ile HbAA ve Hb AD-Los Angeles mutasyonlu bireylerin kesim elektroforezi

Glu>Val] vb), orak hücre anemisine neden olan Hb S [β 6(A3) Glu>Val] ile karışabilmektedir. Bu karışıklığın nedeni, bu tür anormal hemoglobinlerin alkali ortamda Hb S gibi davranarak, benzer elektroforetik ve kromatografik özellikler göstermesinden kaynaklanmaktadır. Gen düzeyindeki molekülse tanı sistemlerinden olan restriksiyon endonükleazlar kullanılarak gerçekleştirilen SNP analizlerinde ise karşılaşılan temel sorun, enzim tanıma bölgesinde yer alan başka mutasyonların da benzer sonuçlar vermesidir. SNP analizi ile Hb D- Los Angeles [β 121(GH4) Glu>Gln] mutasyonunun gen düzeyinde tanımlanmasında kullanılan EcoRI restriksiyon enzimi (5'-G↓AATTC-3'), bu mutasyonun 121. kodonunda gelişen GAA>CAA değişimi nedeni ile kesim reaksiyonunu gerçekleştirememektedir (Şekil 4). Diğer taraftan, normal beta globin genine ait 121. kodonda GAA dizisinde farklı bir mutasyon olduğunda da (Hb- Beograd [β 121(GH4) Glu>Val, GAA>GTA] vb) elde edilen sonuç Hb D- Los Angeles gibi gözükcektir. Bu nedenle, benzer elektroforetik davranış ve Eco RI enzim kesimleri nedeni ile bu gibi anormal hemoglobin bozukluklarının ayrıca molekülse tanısı için DNA dizi analizi yönteminin yapılması gerekmektedir. DNA dizi analizi ise; pahalı bir yöntem olması, analiz uzun zaman alması ve deneyimli kullanıcı gereksinimi nedeni ile her laboratuarda rutin biçimde kullanılamamaktadır.

SPR spektroskopisi, birbiri ile etkileşim kurabilen iki molekül arasındaki etkileşimlerin tanımlanmasında, herhangi bir işaretleyiciye (izotop, enzim vb) veya örneklerin saflaştırılmasına gerek duymaksızın, canlı hücreleri doğal ortamlarında, gerçek zamanlı analiz edebilen bir biyosensördür (17, 18). SPR biyosensörünün, talasemi ve anormal hemoglobin türlerinin molekülse tanısında kullanımına yönelik birkaç çalışma yapılmıştır. Bu yöntemi kullanarak, Feriotto ve arkadaşları, İtalya'da gözlenen; β^0 Kodon 39 (C>T), β^0 IVS1/n.t 1 (G>A), β^+ IVS1/n.t 6 (T>C)



Resim 5: Eco RI restriksiyon enzimi ile biyotinlenmiş PCR ürünlerinin kinetik bağlanma eğrileri

ve β^+ IVS1/n.t 110 (G>A) gibi farklı beta talasemi mutasyonlarının, homozigot ve heterozigot formlarının birbirinden ayırt edilmesinde SPR kinetik eğrilerinden elde edilen rezonans kayıtlarını incelemiştirler (19, 20). SPR yönteminin, beta talasemi mutasyonları modelinde kullanılmış ilk uygulamasından sonra Atalay ve arkadaşları ise, Denizli'de gözlenen heterozigot ve homozigot Hb S [$\beta^6(A3)$ Glu>Val] mutasyonlarının SPR sistemi ile gen düzeyinde ayrıcı tanısının yapılabileceğini göstermişlerdir (21).

Bu çalışmada uygulanan SPR analizinde; streptavidin-biyotin etkileşiminden yararlanılarak, Hb AA ve Hb AD- Los Angeles olgulara ait DNA örnekleri, 5'-ucu biyotin ile işaretlenmiş primerler kullanılarak PCR yöntemi ile çoğaltıldıktan sonra, elde edilen PCR ürünleri ile Eco RI restriksiyon enzim etkileşimine ait rezonans kayıtları, kinetik bağlanma eğrilerinden elde edilmiştir. Kinetik eğrilerden elde edilen sonuçlarda, EcoRI restriksiyon enzimi ile 5'-ucu biyotinlenmiş PCR ürünü etkileşimine verilen bağlanma cevabının, Hb AA ve Hb AD-Los Angeles örneklerinde farklı olduğu gözlenmiştir. Aradaki 100 arc saniyelik rezonans farkı, Hb D- Los Angeles mutasyonundan kaynaklanmaktadır. Gen düzeyinde, heterozigot Hb D- Los Angeles mutasyonunu, eşit oranda mutant ve normal dizi taşımaktadır. Başka bir deyişle, sağlıklı (Hb AA) örneklerde, bu bireyler her iki ebeveynden gelen normal DNA dizilerine, heterozigot Hb D- Los Angeles (HbAD) örneklerinde ise bu bireyler bir ebeveynden aldığı bir normal ve diğer ebeveynden aldığı bir mutant diziye sahiptir. Bu nedenle SPR spektroskopisinde bu iki olgu arasında %50'lik bir fark gözlenmesi beklenmektedir. Kuramsal olarak, Hb AA örneğinden elde edilen rezonans kayıtlarının, Hb AD- Los Angeles örneğinden elde edilen rezonans kayıtlarının iki katı olarak alınması gerekmektedir.

Çalışmada elde edilmiş olan 100 arc saniyelik farkın kuramsal beklentiden az olmasının nedeni, Eco RI enziminin PCR ürünlerini tanıdıktan sonra kesmeye başlaması ve kesilen çift iplikli DNA dizilerinden ayrılması sırasında, zamansal olarak meydana gelen gecikmeden kaynaklanan molekülse etkileşimin rezonans kaydındaki azalmaya yol açması ile açıklanabilmektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada; Hb D- Los Angeles'ın gen düzeyindeki tespitinde kullanılan DNA dizi analizi yerine SPR spektroskopisi yönteminin geliştirilerek, SPR yönteminin mutasyonun kesin, güvenilir, ucuz ve hızlı tanısında kullanılabileceği düşüncesine varılmıştır. Bu nedenle gelecek çalışmalarda, enzim-PCR ürünü etkileşiminde süreklilik sağlanması ve kararlılık zamanlarının ayarlanması koşulu ile, homozigot Hb D- Los Angeles olguları kinetik bağlanma eğrilerinden elde edilen veri analizlerinin de irdelenmesi, ayrıca birçok farklı anormal hemoglobin bozukluklarının da incelenmesi öngörülmektedir. SPR spektroskopisi teknolojisinin daha da geliştirilerek rutin uygulamalarda kullanılmasının, özellikle hemoglobinopati kontrol programında yer alan premarital ve prenatal tarama çalışmaları olmak üzere, birçok kalıtsal hastalıkların tanısında değerli katkılar sunabileceği düşünülmektedir.

*Bu çalışma Pamukkale Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından 2002TPF017 nolu proje çerçevesinde desteklenmiştir. Ayrıca bu çalışmada yer alan veriler; Pamukkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü bünyesinde Dr. Anzel BAHADIR tarafından gerçekleştirilen Biyofizik Yüksek Lisans Tez çalışmasında elde edilen verileri içermektedir.

KAYNAKLAR

1. Lukens J.N. The abnormal hemoglobins: General principles. In: Lee GR, Foerster J, Lukens J, Proskov F, Greer J, Rodgers GM. Eds. *Wintrobe's Clinical Hematology*, 10th ed., Eyg: Mass Publishing Co. 1999; 1329-1343.
2. Husiman T.H.J., Carver M.F.H., Efremov G.D. A syllabus of human hemoglobin variants. The Sick cell anemia foundation in Augusta, 1996; GA, USA.
3. Globin gene server. <http://globin.cse.psu.edu>.
4. Altay Ç. Abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk. J. Hematol.* 2002; 19(1): 63-74.
5. Akar E, Akar N. A review of abnormal hemoglobins in Turkey. *Turk. J. Hematol.* 2007; 24(4): 143-145.
6. Atalay E.Ö., Koyuncu H., Turgut B., Atalay A., Yıldız S., Bahadır A., Köşeler A. High incidence of Hb D- Los Angeles [121(GH4) Glu>Gln] in Denizli province. *Hemoglobin.* 2005; 29(4): 307-310.
7. Koseler A., Koyuncu H., Ozturk O., Bahadır A., Demirtepe S., Atalay A., Atalay E.Ö., First observation of Hb Tunis [124(H2) Pro>Ser] in Turkey. *Turk. J. Hematol.* 2010; 27(1): 120-122.
8. Koseler A., Bahadır A., Koyuncu H., Atalay A., Atalay E.Ö., First observation of Hb D- Ouled Rabah [19 (B1) Asn>Lys] in Turkish population. *Turk. J. Hematol.* 2008; 25(1):51-53.
9. Koseler A., Atalay A., Koyuncu H., Turgut B., Bahadır A., Atalay E.Ö., Molecular identification of a rare hemoglobin variant, Hb J- Iran [β 77(EF1) His>Asp]. *Turk. J. Hematol.* 2008; 25(1):51-53.
10. Atalay E.Ö., Atalay A., Koyuncu H., Ozturk O., Koseler A., Özkan Bahadır A., Demirtepe S. Rare hemoglobin variant Hb Yaizu observed in Turkey. *Med. Princ. Pract.* 2008; 17(4): 321-324.
11. Atalay A., Koyuncu H., Koseler A., Özkan Bahadır A., Atalay E.Ö. Hb Beograd [121(GH4) Glu>Val] in Turkish population. *Hemoglobin.* 2007; 31(4): 491-493.
12. Zeng Y.T., Huang S.Z., Ren Z.R., Li H.J. Identification of Hb D- Punjab gene: application of DNA amplification in the study of abnormal hemoglobins. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 44(6): 886-889.
13. Schneider R.G., Ueda S., Alperin J.B., Levin W.C., Jones R.T. Hemoglobin D Los Angeles in two Caucasian families: Hemoglobin SD disease and hemoglobin D thalassemia. *Blood.* 1968; 32(2):250-259.
14. Perea F.J., Casas-Castaneda M., Villalobos-arámbula A.R., Barajas H., Alveraz F., Camacho A., Hermosillo R.M., Ibarra B. Hb D-Los Angeles associated with Hb S or β -thalassemia in four Mexican Mestizo families. *Hemoglobin.* 1999; 23(3):231-237.
15. Hartwell S.K., Srisawang B., Kongtawelert P., Christian D., Grudpan K. Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. *Talanta.* 2005; 65(5): 1149-1161.
16. Bahadır A., Köşeler A., Atalay A., Koyuncu H., Akar E., Akar N., Atalay E.Ö., Hb D- Los Angeles [121(GH4) Glu>Gln] and Hb Beograd [121(GH4) Glu>Val]: Implications for their laboratory diagnosis and genetic origins. *Turk. J. Hematol.* 2009; 26(2): 17-20.
17. Mc Donnell J. Surface plasmon resonance : towards an understanding of the mechanisms of biological molecular recognition. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (5): 572-577,2001.
18. IAsys Plus Technical Resources. Thermo Lab systems. Part Number: LAS860001 Issue 3. 37-40.
19. Feriotto G., Breveglieri G., Finotti A., Gardenghi S., Gambari R. Real-time multiplex analysis of four beta thalassemia mutations employing surface plasmon resonance and biosensor technology. *Lab. Inves.* 2004; 84: 796-803.
20. Feriotto G., Breveglieri G., Finotti A., Gardenghi S., Gambari R. Surface plasmon resonance and biosensor technology for real time molecular diagnosis of beta^o 39 thalassemia mutation. *Mol. Diagn.* 2004; 8(1): 33-41.
21. Atalay E.Ö., Ustel E., Yıldız S., Atalay A. Surface plasmon resonance based molecular detection of Hb S [6(A3) Glu>Val, GAA>GTG] at the gene level. *Hemoglobin.* 2006; 30(3): 385-391.
22. Poncz M., Solowiejczyk D., Harpel B., Mory Y., Schwartz E., Surrey S., Construction of human gene libraries from small amounts of peripheral blood: analysis of -like globin genes. *Hemoglobin.* 1982; 6(1): 27-36.
23. Efremov G.D., Quantification of hemoglobins by microchromatography. In: Huisman THJ, ed. *The hemoglobinopathies.* Edinburgh: Churchill Livingstone. 1986; 72-90.
24. Leblond Francillard M., Dreyfus M., Rougeon F. Isolation of DNA-protein complexes based on streptavidin and biotin interaction. *Eur. J. Biochem.* 1987; 166 (2):351-355.