

ÇUKUROVA BÖLGESİNDE SAPTANAN G6PD VARYANTLARININ KİNETİK ÖZELLİKLERİ

Serap YALIN¹, Erdinç YALIN², İsa ÜNLÜKURT², Kıymet AKSOY²

KINETIC PROPERTIES OF G6PD VARIANTS DETERMINED IN ÇUKUROVA REGION

Summary: In this study, investigation of kinetic properties of G6PD enzyme and determination of probable variants have been intended. Glucose-6-phosphate dehydrogenase enzymes of 25 cases included in this study were isolated and partially purified by using DE-52 anion exchange chromatography. The K_m G6P and K_m NADP values of all samples were examined, and the utilization rate of NAD, dNADP, Gal6P and 2dG6P from substrate analogs was determined. Also, the heat stability of enzymes at 46°C were studied. The initial enzyme activity of the samples ranges from 0 to 34,5 U/gHb. Among the cases, K_m values of G6P was normal in 8 cases, low in four cases, and high in 13 cases. Except in 1 case, the K_m values of NADP was found to be higher than normal range. Although, the utilization rate of analogs for some cases were found to be similar to wild type enzyme, for other cases it was found to be different. At the heat stability test for the 20 minutes incubation at 46°C, change in the enzyme activity was determined to be in between 72-100 %.

Key Words: Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADP, kinetic parameters, enzymopathy.

Özet: G6PD enziminin kinetik özelliklerinin incelenmesi ve olası varyantların tanımlanması amacıyla 25 olgunun glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi eritrositten izole edilerek, DE-52 iyon değiştirici (pH 7,0) kolon kromatografisi yöntemiyle kısmi olarak saflaştırılmıştır. Her olgunun K_m G6P ve NADP değerleri incelenmiş ve substrat analoglarından NAD, dNADP, Gal6P ve 2dG6P'in kullanım yüzdeleri saptanmıştır. Ayrıca 46°C de enzimin ısı stabilitesi çalışılmıştır. Olguların G6PD enzim aktivitesi 0-34,5 Ü/gHb arasında olup kısmi saflaştırılmış enzim preparatında K_m G6P değeri 8 olguda normal, 4 olguda düşük ve 13 olguda da yüksek bulunmuştur. K_m NADP değeri ise bir olgu dışında normalden yüksek bulunmuştur. NAD, dNADP, Gal6P ve 2dG6P kullanımı bazı olgularda G6PD B+ tipine benzer, bazı olgularda ise farklı bulunmuştur. 46°C de yapılan ısı stabilite testinde enzim aktivitesindeki değişiklik %72-100 arasında bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz, NADP, kinetik parametreler, enzimopati

GİRİŞ

Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD; EC 1.1.1.49) pentoz fosfat yolunun ilk ve düzenleyici enzimi olup, glukoz-6-fosfatın 6-fosfoglukonalaktona dönüşümünü NADP varlığında kataliz etmektedir (1,2). Pentoz fosfat yolunda oluşan riboz-5-fosfat DNA ve RNA yapımında, NADPH ise yağ asitleri, kolesterol, steroidal bileşiklerin ve amino asitlerin sentezinde, hücre zarı ve hücre proteinlerini oksidan ajanlara karşı koruyan redükte glutatyonun oluşumunda kullanılmaktadır.(3,4) Pentoz fosfat yolunun kilit enzimi olan G6PD geni X

kromozomunun q28 bölgesinde yer almakta ve 13 eksondan oluşmaktadır. Genin transkripsiyon veya translasyona bağlı hatalı sentezi veya posttranslasyonel dönemdeki bozukluğu enzim eksikliğine neden olmaktadır. Bu durum özellikle eritrositlerde oksidan ilaç ve maddelere maruz kalındığında hemolitik anemiye neden olmaktadır.(5-8).

G6PD enzim eksikliği dünya genelinde en yaygın enzimopati olma özelliği ile hemoglobinopatilerden sonra ikinci sıklıkla görülen kalıtsal bir bozukluktur ve sıtmanın endemik olduğu bölgelerde

¹ Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

² Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı



saptanmaktadır. Dünyada 400 milyon insan G6PD enzim eksikliğinden etkilenmekte, ülkemizde ise enzim eksikliği sıtmanın daha yaygın olduğu Çukurova ve Antalya bölgesinde gözlenmektedir (9,10).

Dünyada bugüne kadar 400'ün üzerinde G6PD varyantı rapor edilmiştir (11-13); ülkemizde ise 20'ye yakın varyant rapor edilmiş olup bunların büyük bir kısmı Çukurova ve Antalya bölgesinde saptanmıştır. Dünyada en yaygın olarak gözlenen G6PD varyantı Gd-Akdeniz'dir. Ülkemizde Gd-Akdeniz varyantının Çukurova ve Antalya bölgesinde yaygın olduğu moleküler düzeydeki çalışmalar ile de gösterilmiştir. Aksoy ve arkadaşları 1987'de Çukurova bölgesinde yaptıkları kinetik çalışmada G6PD Adana, G6PD Samandağ ve G6PD Balcalı varyantlarını tarif etmişlerdir. Daha sonra Gd Adana varyantının Gd-Akdeniz ve 1311 polimorfik mutasyonu taşıdığı gösterilmiştir (14). Aynı çalışma grubu 1989 yılında birisi ısıya dayanıklı üç yeni varyant daha tanımlamışlardır (15,16). Diğer taraftan, G6PD enziminin yeni doğanlarda tanımlanması ve yeni doğan sarılığında ortaya çıkan bilirubin ile ilişkileri bireyin gelecekteki yaşantısı açısından önem taşımaktadır (17). Tüm bu özellikleri ile G6PD geni, ekspresyonu ve protein olarak G6PD enzimi konusunda gerek erken tanımlama ve gerekse de regülasyonu açısından güncel bir ilgi odağı haline gelmiştir.

Çalışmamızda enzim eksikliğinin yoğun olduğu Çukurova bölgesinde eritrosit içi G6PD enziminin kinetik özellikleri incelenmiş ve G6PD Adana, Samandağ, Antakya ve Balcalı varyantlarının kinetik özellikleri ile karşılaştırılarak farklı özellik gösteren olgular saptanmaya çalışılmıştır.

MATERYAL VE METOD

Hemolizat hazırlama

25 olgudan EDTA'lı tüplere alınan 5 mL kan örnekleri +4°C de 2500 rpm de 5 dakika santrifüj edilip plazmaları ayrıştırılmıştır. Eritrosit pelletleri

üzerine 3-4 katı hacimde soğuk serum fizyolojik eklenip tüpler dikkatlice karıştırılmış ve tekrar santrifüj edilip süpernatant atılmıştır. İşlem en az üç kez (tamamen berrak süpernatant oluşana dek) tekrarlanmıştır.

Eritrositlerin hemolizi aşağıdaki oranlar uygulanarak yapılmıştır:

1 hacim eritrosit pelleti

2 hacim 5mM pH 7,0 Na-Fosfat tamponu (20mmol NADP, 1mM b-merkaptöetanol, 1mM EDTA içeren)

2 hacim % 0,02 Digitonin

Elde edilen hemolizatın G6PD enzim aktivitesi ve Hb değeri saptanmıştır (18-20).

G6PD enzim aktivitesinin kantitatif ölçümü

Enzim aktivitesi Beutler'in yöntemine göre saptanmıştır. Glukoz-6-fosfat, G6PD enzimi varlığında 6-fosfoglukanolaktone dönüşmektedir. Yöntem bu dönüşüm sırasında indirgenen NADP'nin 340 nm'deki absorbans değişikliğinin belirli bir süre (5 dak) ölçümü temeline dayanmaktadır. Reaksiyon 37°C'de, ışık yolu 1 cm olan kuvarz küvetlerde gerçekleştirilmekte ve hesaplamalar absorbans artışının 5 dakika boyunca doğrusal olduğu zaman aralığında optik dansite değerleri dikkate alınarak yapılmıştır.

Enzim aktivitesi 0,01M MgCl₂, 0,6mM G6P ve 0,2mM NADP içeren 0,1M Tris-HCl pH 8,0 tamponu içerisinde ölçülmüştür.

Spektrofotometrede (Shimadzu UV-260) 340 nm'deki absorbans değişikliği 5 dakika süresince kaydedilmiş ve elde edilen değerler aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

$$\text{Aktivite (U/ml)} = \frac{\text{OD}_{340}}{\text{Süre (dak.)}} \times \frac{\text{Son Hacim}}{\text{Enzim Hacmi}} \times \frac{1}{6,22^*}$$

(*) 1µmol NADP, 1 cm ışık yoluna sahip küvette 6,22 OD₃₄₀ değeri vermektedir.

Bu formüle göre hesaplanan G6PD enzim

aktivitesi \dot{U}/gHb olarak verilmiştir. Bunun için hemolizatın hemoglobin miktarı siyanmethemoglobin yöntemi ile saptanmıştır.(18-20)

DE-52 reçinenin hazırlanışı

DE-52 selüloz anyon değiştirici reçine 5mM pH:7,0 Na P tamponunda bir gece şişirilmiştir (herbir gram protein için 1 gram reçine şişirilmiştir). Şişirilen reçine pH'sı 7,0 oluncaya kadar tamponla yıkanmış, hemolizat ve reçine (1/3 oranında) düşük devirli magnetik karıştırıcı ile +4°C'de bir gece karıştırılarak bağlanmıştır. Reçineye bağlanmayan proteinler 5mM pH:7,0 Na-P tamponu ile yıkandıktan sonra kolona aktarılmıştır (18-21).

Reçineden enzim elüsyonu

DE-52 reçinesine bağlanan proteinler 0,25M KCl içeren 5mM pH:7,0 Na-P tamponu ile elüve edilmiş ve protein miktarı yüksek olan elüsyonların G6PD enzim aktiviteleri tayin edilmiştir. En yüksek G6PD enzim aktivitesine sahip elüsyon kinetik çalışmada kullanılmıştır (18-21).

Kinetik çalışma

a) Km Çalışmaları

KmG6P çalışması

Her örneğin ayrı ayrı Km değerleri hesaplanmıştır. Bunun için sabit enzim ve NADP varlığında, 20-200 μ M G6P değişim aralığında enzim aktivitesi saptanmıştır. Elde edilen enzim aktiviteleri Lineweaver-Burk grafiğine dönüştürülerek KmG6P değeri saptanmıştır (18,19).

KmNADP çalışması

Her örneğin sabit enzim ve G6P varlığında 6,6-40 μ M NADP değişim aralığında enzim aktivitesi incelenmiş, Lineweaver-Burk grafiğinden KmNADP değeri hesaplanmıştır(18,19)

b) Analog kullanımları

Glukoz-6-fosfat analogları

Kantitatif G6PD aktivite tayin şartları

uygulanarak NADP ve G6P ile elde edilen enzim aktivitesi %100 kabul edilmiş, G6P yerine aynı molar konsantrasyonda Gal6P (galaktoz-6-fosfat) ve 2dG6P (2-deoksiglukoz-6-fosfat) ile elde edilen enzim aktivitesi başlangıç değeri ile orantılanmıştır (18,19).

NADP analogları

NADP ve G6P varlığında saptanan G6PD enzim aktivitesi %100 aktivite olarak kabul edilip NADP yerine analogları NAD (nikotinamid adenin dinükleotid) ve dNADP (deamino NADP) aynı molar konsantrasyonda uygulandığında elde edilen aktiviteler oransal olarak değerlendirilmiştir(18,19).

c) Isı stabilitesi

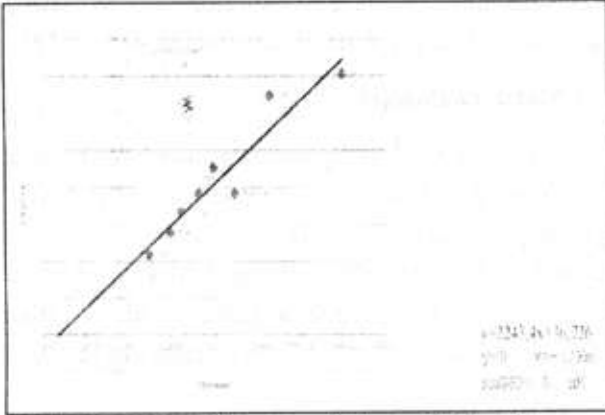
Enzim aktivitesi en yüksek olan elüsyon 46°C'de 10, 20 ve 60 dakika inkübe edilerek enzim aktivitesi ölçülmüştür. 0.dakikada elde edilen enzim aktivitesi %100 kabul edilip diğer dakikalardaki % değişim hesaplanmıştır(18,19).

BULGULAR

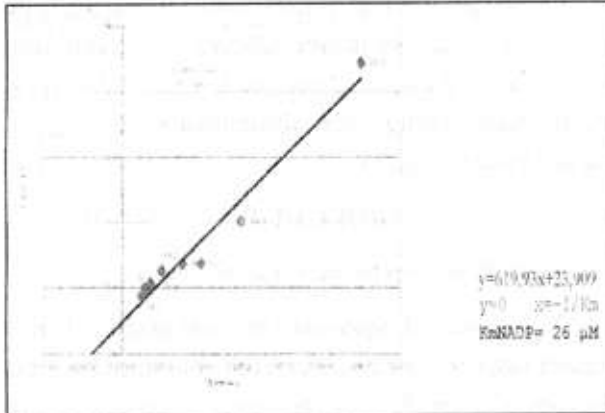
Aktivite ve kinetik çalışma bulguları

25 olgunun ilk aşamada kantitatif eritrosit G6PD enzim aktivitesi ölçülmüştür. İkinci aşamada ise kan örnekleri DE-52 mikrokolon kromatografisi kullanılarak kısmi olarak saflaştırılmış, saflaştırılan örneklerden G6PD enziminin kinetik özellikleri çalışılmıştır. G6PD enzim aktivitesi çalışmasında en düşük aktivite değeri 0 \dot{U}/gHb , en yüksek değer ise 34,5 \dot{U}/gHb bulunmuştur (Tablo I). G6PD enziminin Km çalışmalarında kısmen saflaştırılmış enzimler kullanılmış, gerek KmG6P gerekse KmNADP değerlerinin saptanmasında Lineweaver-Burk grafiklerinden yararlanılmıştır. Değişik substrat konsantrasyonlarında değişen enzimatik aktivite esas alınarak bulunan Km değerleri ve hemolizat enzim aktiviteleri Tablo I'de verilmiştir.. KmG6P değeri olgu 18'de en yüksek (1170 μ M) olgu 3'de en düşük (20 μ M) bulunmuştur. KmNADP çalışmasında en yüksek değer olgu 18'de (414 mM) en düşük değer

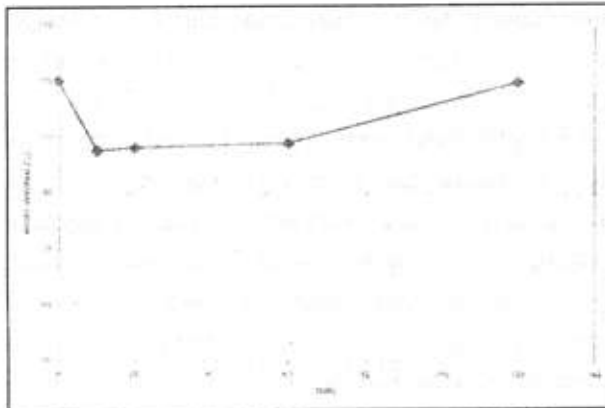
ise olgu 5'de ($3 \mu\text{M}$) bulunmuştur. Olgu 2 ye ait Lineweaver-Burk hız grafiği ve ısı stabilite grafiği Şekil 1-3'de verilmiştir.



Şekil 1. KmG6P için Lineweaver-Burk grafiği (olgu 2)



Şekil 2. KmNADP için Lineweaver-Burk grafiği (olgu 2)



Şekil 3. Isı stabilite grafiği (olgu 2)

Analog kullanımı

NAD kullanım oranları incelendiğinde en düşük

oran olgu 18 (%0) ve en yüksek oran olgu 13'de (%993) bulunmuştur. Enzimlerin dNADP kullanımında %0 ile %217 arasında değişim gözlenmiş, olgu 13'ün dNADP kullanımı çok yüksek (%217) bulunmuştur. Tablo 1'de gözlemlendiği gibi 2dG6P kullanımı oldukça farklı bulunmuştur. En düşük oran olgu 1,11,19,22 ve 24'de (%0) en yüksek oran olgu 12'de (%213) saptanmıştır. Gal6P kullanım oranları da %0-40 arasında değişmekte olup 4 olgunun (olgu 4,17,18,23) Gal6P'ı kullanmadığı, olgu 3'ün ise %40 oranında kullandığı gözlenmiştir.

Isı stabilizasyonu

Bu grup çalışmada G6PD enzimi 46°C de 20 dakika inkübe edilerek aktivite ölçülmüş ve başlangıç aktivitesine oranlanmıştır. Aktivitenin % 72-100 arasında değiştiği gözlenmiştir. Çok fazla aktivite kaybının olmaması bu enzimlerin ısıya dayanıklı olduğunu göstermektedir.

TARTIŞMA

Yaşam için gerekli ürünlerin redüklenmesinde önemli işlev gören NADPH, temel olarak pentoz fosfat yolunun ilk ve hız sınırlayıcı enzimi olan G6PD tarafından sentezlenir(22,23). NADPH'nin oluşumuna katkılarından dolayı G6PD, eritrositlerin stabilitesinin ve yaşam sürelerinin teminatıdır (24). Farklı seviyelerde de olsa tüm organizmaların G6PD enzimi içermeleri yani evrim sürecinde G6PD'nin muhafaza edebilmiş olması, bu enzimin biyolojik açıdan önemini ortaya koymaktadır. Ayrıca eksikliğinin 400 milyondan fazla insanı etkilemesi ve en bilinen enzimopatiye yol açıyor olması G6PD ile ilgili çalışmalara hız kazandırmıştır (25,26). Yapılan ilk çalışmalar G6PD eksikliğinin öncelikle eritrositleri etkileyen, sekse bağlı geçiş gösteren kalıtsal bir enzim eksikliği olduğunu ortaya koymuştur(8,27). Akdeniz havzasında yer alan Çukurova'da enzim eksikliğinin halk sağlığı sorunu oluşturacak kadar sık olduğu saptanmıştır. Yerleşim alanına göre farklılık gösterse de Çukurova bölgesi genelinde enzim eksikliği %8,2 dir (28,29). Enzimin

Tablo 1. G6PD enziminin kinetik özelliği

Olgu	G6PD enzim aktivitesi (Ü/gHb)	Km (µM)		Analog kullanımı (%)				İlk 20 dak. için aktivite değişikliği (%)
		G6P	NADP	NAD	dNADP	2dG6P	Gal6P	
1. M.K.	0	56	22	25	0	0	29	72
2. E.O.	0	61	26	59	89	39	9	88
3. A.E.	0,2	20	18	40	122	4	40	91
4. S.M.	0,7	153	14	27	46	5	0	88
5. B.Y.	2,2	67	3	66	84	19	5	98
6. F.E.	3,4	77	50	36	30	76	8	94
7. F.S.	3,5	25	8	47	65	38	2	97
8. M.K.	3,9	37	5	39	26	7	2	97
9. T.M.	4,1	56	40	45	60	40	26	86
10. A.M.	4,6	77	33	52	62	12	10	97
11. H.K.	4,8	105	5	81	58	0	13	82
12. M.U.	5,4	72	4	67	171	213	47	96
13. K.B.	6,8	54	6	993	217	16	39	96
14. K.B.	6,9	360	9	238	88	13	21	97
15. G.B.	7,3	66	9	310	185	14	25	100
16. A.M.	7,9	31	20	57	74	35	32	91
17. Z.E.	8,4	71	40	44	50	15	0	87
18. F.B.	11,2	1170	414	0	7	16	0	98
19. B.B.	12,8	80	40	59	95	0	205	99
20. S.A.	13,5	71	8	69	20	6	10	100
21. U.A.	14,2	114	29	43	11	4	2	93
22. O.B.	20,7	67	14	14	71	0	7	88
23. İ.A.	20,8	337	12	43	16	17	0	86
24. K.B.	23	53	77	14	76	0	9	97
25. Y.A.	34,5	172	5	13	71	8	10	100
G6PD Adana	0	210	13		147	38	27	0
G6PD Samandağ	0	25	18			5		60
G6PD Balcalı	93 (%)*	38	3			0		60
G6PD Antakya	51 (%)*	667	25		53	5	2	
Normal değerler	>7	50-70	2-4	<1	55-60	<4	7-15	

* % aktivite

biyokimyasal ölçütler ışığında yapılan kinetik çalışmada, değişik G6PD fenotiplerinin saptanmasını sağlamış ve enzimin bölgede heterojen bir yapı gösterdiğini ortaya koymuştur. Çalışmamızda 25 olgunun G6PD enzim düzeyi araştırılmış 0-34,5 Ü/gHb arasında olduğu bulunmuştur.

Dünyada normal enzim olarak kabul edilen GdB+'nin yanında GdA+, GdA- ve GdAkdeniz'in polimorfik frekansta olduğu rapor edilmiştir

(6,13,30,31). Benzer durum Çukurova bölgesinde de gözlenmiştir. G6PD enziminin varyant analizlerinde, birçok parametre kullanılmaktadır(18,19); bunlardan eritrosit G6PD enzim aktivitesi, kısmi saflaştırılan enzimde kinetik çalışmalar, substrat analoglarının kullanımı ve ısı inaktivasyonu en çok kullanılan kriterlerdir. G6PD enziminin substratlarına ilgisini değerlendirmek için Km verileri ölçüldüğünde, olguların KmG6P değeri 20-1170 mM arasında, KmNADP ise 3-414 mM arasında bulunmuştur. KmG6P değeri 4 olguda düşük, 8 olguda normal sınırdan ve 13 olguda da yüksek bulunmuştur. KmNADP

değeri ise bir olgu dışında normal sınırdan yüksek bulunmuştur. Çukurova bölgesinde bulunan dört varyantın özellikleriyle karşılaştırıldığında KmG6P si Antakya varyantından daha yüksek 1 olgu (18 nolu), Samandağ ile aynı Km değerine sahip 1 olgu (7 nolu) ve Balcalı varyantına yakın Km değerine sahip 1 olgu (8 nolu) saptanmıştır. KmNADP değerleri incelendiğinde Balcalı varyantına yakın 1 olgu (5 nolu), Adana varyantına yakın 2 olgu (4 ve 22 nolu), Antakya ve Samandağ varyantına yakın 1'er olgu (2 ve 3) bulunmuştur (Tablo I).



G6PD enziminin kinetik özelliklerinin belirlenmesinde substrat analogları olarak NAD, dNADP, Gal6P ve 2dG6P kullanılmıştır. Çalışmamızda koenzim NADP'nin analogu olarak NAD ve dNADP kullanılmıştır. WHO'ya göre GdB+'nin dNADP kullanım yüzdesinin %55-60 arasında olduğu belirtilmiştir (18). 3,12,13 ve 15 nolu olguların dNADP kullanım yüzdesi WHO'nun verdiği sınıra oldukça üzerinde bulunmuş ve 13 nolu olguda çok yüksek (%217) dNADP kullanım oranı saptanmıştır. Fakat, 1 nolu olgunun dNADP'yi hiç kullanmadığı gözlenmiştir. 11 ve 17 nolu olguların G6PD Antakya varyantına yakın kullanım %'si verdikleri gözlenmiştir.

WHO tarafından insan eritrosit G6PD enziminin NAD kullanımı % 1 olarak belirtilmiştir (18). Çalışmamızda 18 nolu olgu analog olarak NAD'yi hiç kullanmamış, diğer olgular NAD'yi %1'den daha fazla kullanmışlardır. 13,14 ve 15 nolu olguların çok yüksek oranda NAD kullandığı gözlenmiştir (% 993, 238, 310).

G6PD enziminin diğer önemli substrat analogları G6P'nin analogları olan 2dG6P ve Gal6P'tir. 2dG6P Akdeniz varyantının tanımlanmasında çok önemlidir. 2dG6P kullanım oranı WHO tarafından %4'ün altı olarak bildirilmiştir(18). 21 nolu olgunun değerleri WHO tarafından bildirilen değere uyum göstermiş, ancak 2,6,7 ve 9 nolu olgulara ait değerler yüksek bulunmuştur. 12 nolu olgunun normalden oldukça yüksek oranda 2dG6P kullandığı gözlenmiştir (%213). 1,11,19,22 ve 24 nolu olgular G6P Balcalı varyantı gibi analog olarak 2dG6P'yi hiç kullanmamış, 4 nolu olgunun ise G6PD Antakya ve G6PD Samandağ'a benzediği, 7 nolu olgunun G6PD Adana varyantıyla aynı oranda 2dG6P kullandığı saptanmıştır. GdB+ enziminin Gal6P kullanımını %7-15 arasındadır. Bizim çalışmamızda Gal6P kullanım oranı %0-205 arasında değişmektedir. Ancak 8 olguda kullanım oranı normal sınırlar içinde saptanmış, 19 nolu olguda çok yüksek (%205), 4,17,18 ve 23 nolu olgularda Gal6P kullanımının % 0

olduğu saptanmıştır. 7 ve 8 nolu olguların G6PD Antakya varyantıyla aynı oranda Gal6P, 9 nolu olgunun ise G6PD Adana varyantına benzediği bulunmuştur.

Isı stabilitesi, eritrosit G6PD enziminin özelliklerinin araştırılmasında kullanılan bir diğer parametredir. 15, 20 ve 25 nolu olguların aktivitelerinde hiç kayıp olmadığı, bu enzimlerin ısıya uzun süre dayanıklı oldukları gözlenmiştir.

Eksikliğine sıklıkla rastlanılan G6PD enzimine ait en az 442 varyantın olduğu rapor edilmiştir(32). Varyantların tespitinde elektroforezde kat edilen yol, Km değerleri, substrat analoglarını kullanabilme yetenekleri, inhibitörler, ısı stabilite ve optimum pH kriterleri kullanılmaktadır (14). Fakat son yıllarda bu yöntemlere ilaveten, enzimin amino asit dizisinden ve cDNA dizisindeki nükleotit farklılığından yararlanılarak moleküler düzeyde varyant analizi yapılmaya başlanmıştır(12). Bugüne dek rapor edilen G6PD varyantlarında ancak 46 farklı mutasyon bulunmuştur. Varyant oldukları rapor edilmiş bazı olguların moleküler düzeyde aynı mutasyonu içerdikleri gösterilmiştir (12,32).

Bu çalışmada da gözlemlendiği gibi 25 olgunun kinetik özellikleri tamamen birbirinden farklı olup yeni varyant özelliği göstermektedir. Ancak bu olgular moleküler düzeyde incelenerek mutasyonlarının farklı olup olmadığının araştırılması gerekecektir.

KAYNAKLAR

1. Beutler, E. (1983) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. The metabolic basis of the inherited diseases (Derleyen: Stanbury, J.B.), s.1629-1653, Mc Graw Hill, New York.
2. Ulusu, N.N., Kuş, M.S., Tezcan, E.F. (1997) Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz: Moleküler ve kinetik özellikleri. *Biyokimya Dergisi*. 22 (2),25-33.
3. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*, s.558-559, Worth publishers, New York.
4. Murray, R.K., Granner, D.K., Mayes, P.A., Rodwell,

- V.W. (2000) Harper's Biochemistry, s.219-221, Appleton&Lange, Stamford, Connecticut.
5. Luzzatto, L. (1987) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: Genetic haematological aspects. *Cell. Bio. Fun.* 5,101-107.
 6. Beutler, E. (1990) The genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Semin. Hematol.* 27,137-164.
 7. Vulliamy, T.J., Kaeda, J.S., Ait-Chafa, D., Mangerini, R., Roper, D., Barbot, J., Mehta, A.B., Athanassio-Metaxa, M., Luzzatto, L., Mason, P.J. (1998) Clinical and haematological consequences of recurrent G6PD mutations and a single new mutation causing chronic nonspherocytic haemolytic anemia. *Br. J. Haematol.* 101,670-675.
 8. Beutler, E. (1991) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *N. Engl. J. Med.* 324,169-173.
 9. Aksoy, K. (2000) Phage display ile ilgili klinik uygulamalar: G6PD enzimi. XVI.Ulusal Biyokimya Kongresi-İkinci Uluslararası Biyobilim Günleri, İzmir.
 10. Beutler, E. (1989) Glucose-6-phosphate dehydrogenase: New perspectives. *Blood.* 73,1397-1401.
 11. Yoshida A, Beutler E, Motulsky A. (1971) Human glucose-6-phosphate dehydrogenase variants. *WHO Bull.* 45,243-253.
 12. Beutler, E., Westwood, B., Melemed, A., Dorgo, P.D., Margolis, D. (1995) Three new exon 10 glucose-6-phosphate dehydrogenase mutations. *Blood Cells, Molecules and Diseases.* 30,64-72.
 13. Kurdi-Haidar, B., Mason, P.J., Berrebi, A., Ankra-Badu, G., Al-Ali, A., Oppenheim, A., Luzzatto, L. (1990) Origin and spread of the glucose-6-phosphate dehydrogenase variant (G6PD-Mediterranean) in the middle east. *Am. J. Hum. Genet.* 47,1013-1019.
 14. Aksoy, K., Yüregir, G.T., Dikmen, N., Ünlükurt, İ. (1987) Three new G6PD variants, G6PD Adana, G6PD Samandağ and G6PD Balcalı in Çukurova, Turkey. *Hum. Genet.* 76,199-201.
 15. Aksoy, K., Yüregir, G.T., Dikmen, N., Ünlükurt, İ. (1990) Türkiye'de saptanan yeni bir G6PD B+ varyantı : G6PD Antakya. *Ç.Ü. Tıp Fak. Dergisi.* 15(2),186-191.
 16. Aksoy, K., Yüregir, G.T., Dikmen, N., Ünlükurt, İ. (1989) Isıya dayanıklı yeni bir glukoz-6-fosfat dehidrogenaz enzim eksikliği. *Ç.Ü. Tıp Fak. Der.* 2,202-206.
 17. Burtis, C.A., Ashwood, E.R. (1999) Tietz Textbook of Clinical Chemistry (Derleyen: Fairbanks, V., Klee, G.G.), s. 1643-1649, W.B. Saunders company, Philadelphia.
 18. World Health Organization. (1967) Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *WHO Tech. Rep. Ser.* 366, 1-53.
 19. Beutler, E. (1984) *Red Cell Metabolism: A Manual of Biochemical Methods*, s. 68-71, Grune & Stratton, Inc., Orlando.
 20. Yüregir, G.T., Aksoy, K. (1987) *Klinik Biyokimya Laboratuvar Teknik ve Yöntemleri*, s. 66-79, Çukurova Üniversitesi Basımevi, Adana.
 21. Yoshida, A. (1970) Enzyme purification by selective elution with substrate analog from ion-exchange columns. *Anal. Biochem.* 37, 357-367.
 22. Senozan, N.M., Thielman, A.C. (1991) Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *J. Chem. Edu.* 68 (1),7-10.
 23. Luzzatto, L., Battistuzzi, G. (1984) Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Adv. Hum. Genet.* 14, 217-329.
 24. Arese, P., Flora, A. (1990) Pathophysiology of hemolysis in G6PD deficiency. *Sem. Hem.* 27,1-30.
 25. Beutler, E., Vulliamy, T., Luzzatto, L. (1996) Hematologically important mutations: Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Blood Cells, Molecules and Diseases (BCMD).* 22(4),49-56.
 26. Vulliamy, T., Mason, P., Luzzatto, L. (1992) The molecular basis of G6PD deficiency. *Tre. Gen.* 8,138-143.
 27. Levy, R.H. (1979) Glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Adv. Enzymol.* 48, 92-192.
 28. Yüregir, G.T., İsbir, T. (1984) Incidence and interaction of HbS and G6PD deficiency in Çukurova, Turkey. *Doğa.* 2,232-243.
 29. Yüregir, G.T., Aksoy, K., Dikmen, N., Ünlükurt, İ. (1989) Heterogeneity of glucose-6-phosphate dehydrogenase in Çukurova, Turkey. *Biochim. Clin.* 13,933-935.
 30. Modiano, G., Battistuzzi, G., Esan, G.J.F. (1979) Genetic heterogeneity of "normal" human erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase: An isoelectrophoretic polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 76, 852-856.
 31. Stamatoyannopoulos, G., Voigtlander, V., Kotsakis, P. (1971) Genetic diversity of the Mediterranean glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency phenotype. *J. Clin. Invest.* 50, 1253-1261.
 32. Beutler, E. (1994) G6PD deficiency. *Blood.* 84(11),3613-3636.