

Beta-Talasemi Hastalarında MLPA Yöntemi İle HBA Mutasyonlarının Saptanması

HBA Mutations Detected By MLPA In Beta-Thalassemia Patients

¹Yrd.Doç.Dr. Hüseyin ONAY

²Uzm.Dr. Aslıhan EKMEKÇİ

¹Dr. Esra ATAMAN

¹Dr. Mehmet AKGÜL

¹Dr. Ali VAHABİ

²Prof.Dr. Yeşim AYDINOK

³Doç.Dr. Canan VERGİN

^{1,2}Prof.Dr. Ferda ÖZKINAY

¹Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD

²Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD

³Dr.Behçet UZ Çocuk Hastanesi Hematoloji Onkoloji Birimi

Gaziantep Tıp Dergisi 2009;15(1):01-04.

Özet

Talasemi sendromları insanlarda en sık gözlenen monogenik hastalıklardır **b**-talasemi major ülkemizde gözlenen en önemli halk sağlığı problemlerinden birisidir. HBA (alfa globin), UGT1 (bilirubin metabolizması), HFE (demir metabolizması) genlerindeki mutasyonlar gibi genetik düzenleyici faktörler hastalığın ağırlığının belirlenmesinde önemli role sahiptir. HBA genindeki delesyon ya da duplikasyonlar **b**-talasemi major hastalarındaki **a**-zincir birikiminin miktarını belirlemektedir. HBA geni 16. Kromozom üzerinde lokalizedir ve gende gözlenen mutasyonları büyük oranda delesyon ve duplikasyonlar oluşturmaktadır. Multiple ligation dependent probe amplification (MLPA) tekniği, delesyon ve duplikasyonların sık olarak gözleendiği genetik hastalıkların tanısında kullanılabilen yeni, basit ve hızlı bir yöntemdir. Bu çalışmada 24 adet prob ile HBA genindeki delesyon ya da duplikasyonları saptayabilen ticari bir kit kullanılmıştır. Bu çalışmada bölümümüzde **b**-talasemi major hastalığı tanısı almış 19 hastada HBA genindeki mutasyonlar MLPA yöntemi ile araştırılmıştır. On dokuz hastanın 2' sinde (%10.5) HBA geninde delesyon saptanmıştır. Hastaların bir tanesinde delesyon HBA2 geni HBA1P arasında, diğerinde HBA1 ile HBA2 genleri arasında saptanmıştır. Bu sonuç **b**-talasemi major hastaları arasında HBA gen mutasyonlarının nadir olmadığını göstermektedir. Ayrıca MLPA tekniğinin bu kompleks gen dizisindeki mutasyonların araştırılmasında uygun bir teknik olduğu da görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: **b**-talasemi, MLPA, HBA

Abstract

Thalassemia syndromes are the most common monogenic disorders in humans and **b**-thalassemia major is one of the most important public health problems in Turkey. Many genetic factors play roles in modifying the disease severity such as mutations in the alpha globin gene (HBA), UGT1 gene (bilirubin metabolism) or HFE gene (iron metabolism). Deletions or duplications in HBA gene determine the accumulation of **a** chain in **b**-thalassemia major patients. The human alpha globin gene cluster is located on chromosome 16 and deletions or duplications are the most important mutations. Multiple ligation dependent probe amplification (MLPA) technique is a simple and rapid technique and used in many genetic disorders in which deletions and duplications are common. In this study we used a commercial MLPA kit for detecting alpha globin gene mutations. The kit contains 24 different probes in the HBA region. In this study we aimed to investigate the incidence of alpha globin gene mutations using MLPA technique in 19 **b**-thalassemia major patients which were diagnosed in our department. Alpha globin gene deletions were detected in 2 out of 19 (10.5%) **b**-thalassemia major patients. In one of the patients the deletion was located between the HBA2 gene and HBA1P gene. The deletion detected in the other patient was located between the HBA1 gene and HBA2 gene. This result suggests that alpha globin gene mutations in **b**-thalassemia major patients are not rare. MLPA technique is suitable to investigate the mutations in this complex gene cluster.

Key words: **b**-talasemi, MLPA, HBA

GİRİŞ

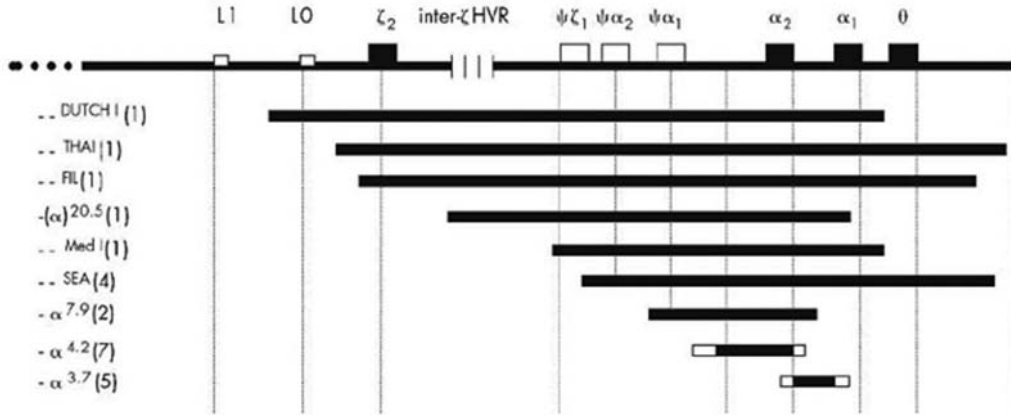
Talasemiler, hemoglobinde bulunan globin zincirlerindeki hatalı üretime bağlı olarak ortaya çıkan kalıtsal anemi sendromlarıdır. Talasemi sendromları, etkilenen globin zincirinin tipine göre isimlendirilmektedir. Erişkinlerde en önemli hemoglobin tipi Hemoglobin A' dir ve dolaşımdaki hemoglobinin %95' ini oluşturur (1). Hemoglobin A' nin 2 α ve 2 β zincirinin bir araya gelmesiyle oluşan tetramerik bir organizasyonu vardır. En sık gözlenen talasemi tipleri alfa talasemi ve beta talasemidir. Alfa talasemi α -globin zinciri üretiminde azalma ya da tamamen kaybolma ile karakterizedir (2). α -globin zincirini kodlayan HBA geni 16. kromozom üzerinde, β globin zincirini kodlayan HBB geni ise 11. kromozom üzerinde lokalizedir (3).

Normal erişkinlerde α -globin genleri 4 kopya olarak bulunur. Her DNA zinciri üzerinde birer kopya $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ genleri cis durumda bulunur. α -globin gen dizisinde gözlenen mutasyonların %80-90 kadarını delesyonlar oluşturmaktadır (Şekil 1). Daha nadir olarak da nokta mutasyonları gözlenmektedir.

Alfa talasemi hastalığının klinik ağırlığını kaç gen kopyasının mutasyona uğradığı belirlemektedir. Aynı kromozom üzerindeki bir (α^+ talasemi) ya da iki (cis durumda α^0 talasemi) gen kopyasının kaybı ya da her iki kromozom üzerindeki birer gen kopyasının kaybı (trans durumda homozigot α^+ talasemi) genellikle klinik bulgu vermez; çünkü sağlam gen kopyalarından yeterli α -globin zinciri üretimi sağlanabilir (1). Üç gen kopyasının kaybolduğu durum Hemoglobin H hastalığı olarak isimlendirilir ve talasemi intermedia tablosu gösterir. Bu kişilerde orta düzeyde anemi, splenomegali ve alyuvarlarda belirgin hipokromi ve mikrositoz bulunur (1).

Yrd.Doç.Dr. Hüseyin ONAY,
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD
Adres: Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Genetik AD 35100 Bornova İZMİR
Tel: 0232 390 39 62 / 76577 Fax: 0232 390 39 71
E-mail:huseyin.onay@ege.edu.tr



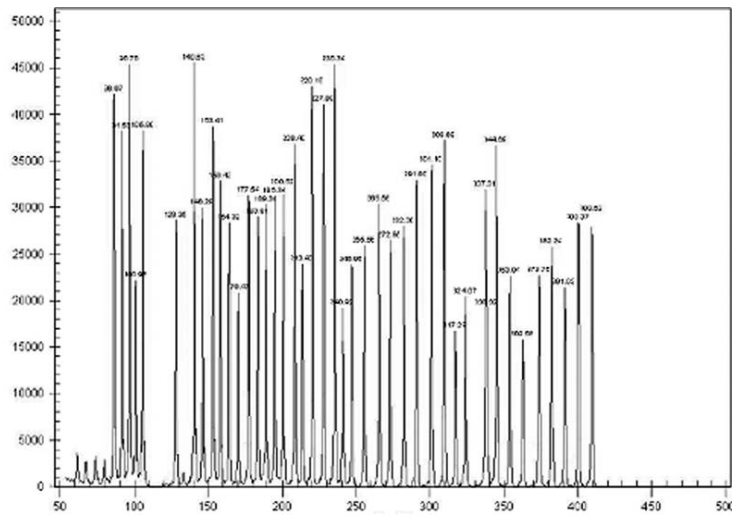


Şekil 1. 16p13.3 bölgesine lokalize α-globin gen dizisi ve sık gözlenen mutasyonların şematik gösterimi (4).

Dört gen kopyasının mutasyona uğradığı durumda ise Hemoglobin Barts' a bağlı hidrops fetalis tablosu gözlenir. Bu, in utero dönemde ciddi anemi ile seyreden ve gestasyonun son dönemlerinde ya da doğumdan hemen sonra ölümle sonuçlanan ağır bir tablodur (1).

Beta talasemi hastalığı ise HBB genindeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan ve en sık gözlenen tek gen hastalıklarından bir tanesidir. Genetik olarak alfa talasemi kadar karışık olmamasına rağmen β-globin gen dizisinin karmaşıklığı nedeniyle bazı tabloları aydınlatmak ileri testler ve tecrübe gerektirmektedir. Ayrıca beta talasemi hastalığındaki önemli problemlerden bir tanesi de hastalığın ağırlığını belirleyen genetik düzenleyici faktörlerdir (5). Bu faktörler arasında elbette en önemlisi HBB geninde hastalığa yol açan mutasyonun lokalizasyonu ve mutasyonun tipidir. HBB genindeki mutasyonların birçoğu için oldukça sağlam genotip-fenotip ilişkisi kurulmuş durumdadır. İkinci önemli düzenleyici faktör ise α-globin gen kopya sayısıdır. Çünkü beta talasemi hastalarında kliniğin ortaya çıkmasındaki önemli nedenlerden bir tanesi de fazla α-globin' in dokularda birikimidir. Bu nedenle α-globin kopya sayısının azlığı (delesyonlar ve mutasyonlar) ya da fazlalığı (gen triplikasyonu ya da kuadrplikasyonu) beta talasemi hastalığının klinik seyrini etkilemektedir.

Biz bu çalışmada beta talasemi major tanısı almış hastalarda α-globin gen mutasyonlarını araştırmayı ve bu mutasyonların hastalığın kliniği üzerine etkilerini araştırmayı amaçladık. Bu çalışmaya 2007 ve 2008 yıllarında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik AD' nda beta talasemi major tanısı almış 19 olgu dahil edilmiştir. Prenatal tanıda beta talasemi major saptanan olgular çalışmaya dahil edilmemiştir. Eğer ailede birden fazla beta talasemi majorlü birey varsa, sadece bir tanesi çalışmaya dahil edilmiştir. HBA genindeki mutasyon ve delesyonları araştırmak için Multiple Ligation Dependent Probe Amplification (MLPA) yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla MRC Holland firmasının HBA kiti kullanılmıştır. Bu kit HBA geni üzerindeki 24 bölgeye spesifik prob içermektedir ve bu bölgelerdeki delesyonları saptayabilmektedir. MLPA yöntemi hastalığın meydana gelmesinde gendeki delesyonların önemli olduğu birçok hastalıkta son yıllarda yoğun olarak kullanılan ucuz ve etkili bir yöntemdir. Yöntem kısaca floresan işaretli universal problemler eklenmiş dizilerin, eşer eşleniği olduğu DNA' da delesyon yoksa amplifiye olmasına ve bunun genetik analizlerle tepitine dayanır. Universal primerler kullandığı için bir PCR ile 45 kadar bölgenin aynı anda çoğaltılıp, bu bölgelerde delesyon olup olmadığının araştırılması mümkündür.



Şekil 2. MLPA-HBA kitinde görülmeleri beklenen normal pikler.

Normal kişilerde HBA MLPA kiti Şekil 2' deki paterni vermektedir. Buradaki her pik HBA geni üzerinde çoğaltılan bir bölgeye karşılık gelmektedir (Şekil 2). Genetik analizörde yürütülen örneklerden elde edilen datalar ücretsiz Coffalyser (<http://www.mlpa.com/coffalyser/>) yazılımı ile analiz edilmektedir.

BULGULAR

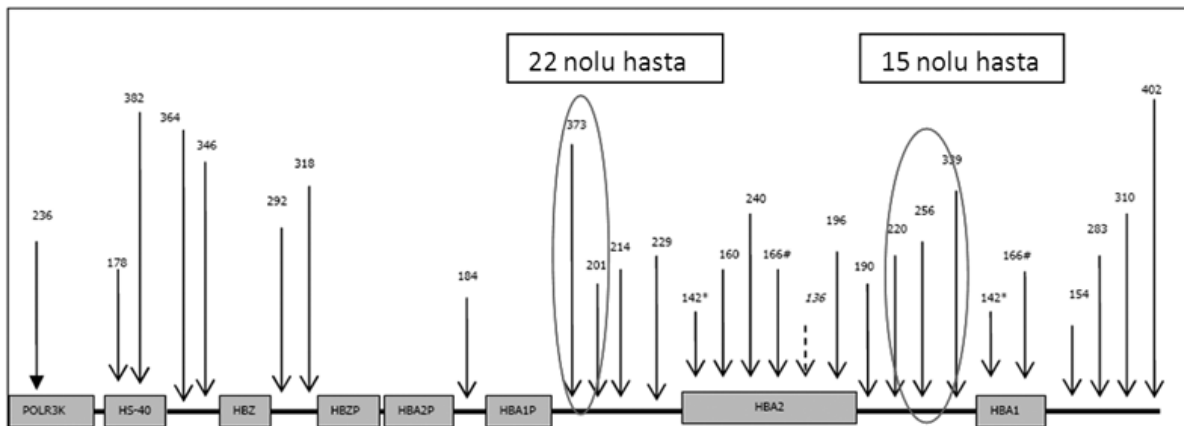
Bu çalışmada bölümümüzde β -talasemi major hastalığı tanısı almış 19 hastada HBA genindeki mutasyonlar MLPA yöntemi ile araştırılmıştır. On dokuz hastanın 2' sinde (%10.5) HBA geninde delesyon saptanmıştır. Hastaların bir tanesinde (22 nolu hasta) delesyon HBA2 geni HBA1P arasında (2 bölgede), diğerinde (15 nolu hasta) HBA1 ile HBA2 (3 bölgede) genleri arasında saptanmıştır (Şekil 3).

TARTIŞMA

Talasemi sendromları insanlarda en sık gözlenen monogenik hastalıklardır β -talasemi major ülkemizde gözlenen en önemli halk sağlığı problemlerinden birisidir. β -talasemi major genetiği en iyi aydınlatılmış hastalıklardan bir tanesidir. Neredeyse bilinen bütün mutasyonların genotip-fenotip korelasyonu sağlanmış durumdadır. Bu bilgiler sayesinde hem oluşacak klinik tablonun ağırlığı saptanabilmekte hem de prenatal tanıda gebelik terminasyonu konusunda sağlıklı kararlar verilebilmektedir. Hastalığın klinik ve genetiği bu kadar iyi bilinmesine rağmen son yıllarda hastalığın kliniğini değiştirebilen bazı genetik düzenleyiciler önem kazanmıştır. Hastalığın kliniğini belirleyen faktörlerden elbette en önemlisi HBB geninde saptanan mutasyonun yeri ve tipidir. İkinci önemli faktör de HBA geninde meydana gelen mutasyonlar sonucu α -globin gen kopya sayısında artma ya da azalmadır. Ekstra α -globin gen kopya sayıları ($\alpha\alpha\alpha$, $\alpha\alpha\alpha\alpha$ ile sonuçlanan gen triplikasyon ya da kuadriplikasyonları nadir değildir ve hastalık tablosunu olumsuz yönde etkiler.

Tam tersi şekilde α -globin sentezini azaltan durumlarda hastalık kliniği daha hafif seyretmektedir (5). Bunun yanında β -globin zinciri ile birleşemeyen α -globin'lerin γ -globin ile birleşip fetal hemoglobin (HbF) oluşturması da hastalığın kliniğini hafifletebilmektedir. Bu nedenle γ -globin sentezini arttıran 3 QTL (Quantitative Trait Loci) (Xmn1-G γ , HMIP ve BCL11A) HbF sentezini arttırarak klinik üzerine olumlu etki yapmaktadır (6). Bunların dışında globin zincir üretimini etkilemeden hastalıkta gözlenen komplikasyonların ağırlığını belirleyen ikincil genetik düzenleyiciler de bulunmaktadır. UGT1 (bilirubin metabolizması), HFE (demir metabolizması); VDR, COL1A1, COL1A2, TGFB1 (kemik metabolizması); HLA grubu (enfeksiyonlara yatkınlık) genlerindeki mutasyonlar ya da polimorfizmler de hastalığın ağırlığı üzerinde önemli etkiye sahiptir. HBA gen mutasyonlarının, beta talasemi hastalarındaki modifiye edici etkisine dair literatürde çok fazla çalışma bulunmamaktadır. Han ve ark. ile Cai ve ark.' larının yaptıkları iki çalışmada da beta talasemi heterozigotlarında HBA mutasyonları araştırılmıştır (7,8). Kanavakis ve ark. yayınladıkları bir olguda ağır HBB mutasyonları taşıyan bir olguda aynı zamanda bulunan HbH hastalığı nedeniyle kliniğin daha hafif seyrettiği belirtilmektedir (9). Bunun dışında da tek tek olgular ile HBA mutasyonlarının beta talasemi majorlülük olgularındaki etkisi gösterilmiştir. Biz çalışmamızda hem alfa talasemi gibi genetik olarak çalışılması zor bir hasta grubunda MLPA yöntemini kullandık hem de önemli bir hasta grubunda alfa talasemi mutasyon sıklığını saptamaya çalıştık. İki prob bölgesinde delesyon saptanan 22 nolu hasta IVS 2.745 (CG) /Codon 8/9 (+G) mutasyonlarını taşımaktadır. Üç prob bölgesinde delesyon saptanan 15 nolu hasta ise homozigot IVS 1.110(GA) mutasyonunu taşımaktadır ve erken hastalık başlangıcı olan bu olgunun senelik 10-12 transfüzyon ihtiyacı bulunmaktadır.

Sonuç olarak saptanan küçük delesyonların hastaların kliniği üzerinde bir etkisi olmadığı görülmüştür. Bu durumun büyük ihtimalle delesyonların, genler arasındaki bölgelere denk gelmesi nedeniyle, α -globin gen kopya sayısını değiştirememesine bağlı olduğu düşünülmektedir.



Şekil 3. Saptanan delesyonların şematik gösterimi.

KAYNAKLAR

1. Leung WC, Leung KY, Lau ET, Tang MH, Chan V, Alpha-thalassaemia. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2008;13:215-222.
2. Puehringer H, Najmabadi H, Law HY, Krugluger W, Viprakasit V, Pissard S, et al. Validation of a reverse-hybridization StripAssay for the simultaneous analysis of common alpha-thalassemia point mutations and deletions. *Clin Chem Lab Med.* 2007;45(5):605-10.
3. Apak H. Hemoglobinopatiler ve Talasemiler. *Anemiler Sempozyumu*, 19-20 Nisan 2001, İstanbul, s. 149-162
4. Hartevelde CL, Voskamp A, Phylipsen M, Akkermans N, den Dunnen JT, White SJ, et al. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing alpha- and beta-thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet.* 2005;42:922-931.
5. Thein SL. Genetic modifiers of the beta-thalassaemias. *Br J Haematol.* 2008;141:357-366.
6. Menzel S, Garner C, Gut I, Matsuda F, Yamaguchi M, Heath S, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet.* 2007;39:1197-1199.
7. Han J, Zeng R, Hu B, The prevalence of beta-thalassaemia heterozygotes compound alpha-thalassaemia in Guangdong district. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi.* 2001;22:514-516.
8. Cai YL, Zheng YM, Tang MZ, Li J, Li SW, Molecular detection and haematological analysis of heterozygotes in beta-thalassaemia combining deletional alpha-thalassaemia. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2007;15(1):195-197.
9. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J, Lafioniatis S, Lazaropoulou C, Liakopoulou T, Paleologos G, et al. A rare example that coinheritance of a severe form of beta-thalassaemia and alpha-thalassaemia interact in a "synergistic" manner to balance the phenotype of classic thalassaemic syndromes. *Blood Cells Mol Dis.* 2004;32:319-324.