

The investigation of distribution of hereditary alpha-thalassemia mutations in Isparta reservoir

Isparta ve Çevresinde Alfa-Talasemi Kalıtsal Mutasyonlarının Dağılımının Araştırılması

Recep Sütçü¹, Firdevs Aylak¹, Havva Koçak¹, Tansu Sipahi², Hüseyin Vural¹, Namık Delibaş¹

¹SDÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD,

²Ufuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji Bilim Dalı, Isparta, Türkiye

Eur J Basic Med Sci 2011;1 (1):28-32

Geliş Tarihi (Received): 21-12-2010

Kabul Tarihi (Accepted):17-01-2011

ABSTRACT

Thalassemia is an autosomal recessive disease characterized by the absence or decreased production of the alpha globin chain. The aim of this study was to make the valuable contributions to the map of thalassemia in Turkey and to help the clinicians who plan to cure the patients in our region. Among the individuals who applied to Hematology Department of SDU Medical Faculty with a suspected alpha thalassemia mutation, 25 were selected for present study. Mutations in alpha globin gene were detected by using a-globin StripAssay™ commercial kit. The principle of the assay is based on reverse hybridization. As a result, the most common alpha thalassemi mutations were MED double gene deletion, -20.5 kb single gene deletion, -3.7 single gene deletion and a2IVS 1-5 nt respectively, in Isparta reservoir.

Key Words: Alpha globin chain, deletions, alpha thalassemia

Yazışma Adresi (Correspondence):

Doç. Dr. Recep SÜTÇÜ

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD Isparta

Tel: +902462112074

E-posta:rsutcu@hotmail.com

ÖZET

Alfa talasemi, alfa globin zinciri üretiminde azalma ya da tamamen kaybolma ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Çalışmamızdaki bu veriler tanı koyma ve tedaviyi planlamada klinisyene yardımcı olabilir ve ülkemizin talasemi haritasının belirlenmesine katkıda bulunabilir. Bu çalışmaya dahil edilen 25 kişi, SDÜ hastanesi çocuk hematoloji polikliniğine başvuran alfa talasemi mutasyonu araştırılan hastalardan seçildi. Alfa globin genindeki mutasyonların analizi ViennaLab α -globin StripAssay™ kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntemin prensibi reverse hibridizasyon tekniğine dayalıydı. Elde ettiğimiz sonuçlara göre, Isparta ve çevresinde en yaygın görülen alfa talasemi mutasyonu MED double gen delesyonu olarak bulundu. Bunu sırasıyla -20.5 kb single gen delesyonu, -3.7 single gen delesyonu ve $\alpha 2IVS$ 1-5 nt mutasyonu takip etti.

Anahtar Kelimeler: Alfa globin zinciri, delesyonlar, alfa talasemi

GİRİŞ

Alfa globin polipeptid zincirlerinin azalması ya da tamamen yokluğu alfa talaseminin nedenidir. Bu gen defektinin neden olduğu hemoglobin bozukluğu, dünyada şu anda bilinen en önemli hemoglobin bozukluğudur (1,2). Dünya nüfusunun %5'ini etkileyen ve tüm tek gen bozukluklarının muhtemelen en yaygın olanıdır (3). Alfa talasemi sıklığı ve mutasyon dağılımının bilinmesi prenatal tanı ve hasta bakımı için daha iyi danışmanlık yapılmasını sağlar (4,5). Alfa talasemi otozomal resesif geçiş göstermekte ve hastalığın şiddeti asemptomatik taşıyıcıdan in utero ölüme kadar değişebilen bir dağılım göstermektedir (3). Hemoglobinin molekülünün yapısında yer alan alfa globin zincirlerinin sentezinden sorumlu olan alfa gen kümesi 16 numaralı kromozom üzerindedir. Normalde her bir 16 numaralı homolog kromozomda ikişer tane olmak üzere toplam dört tane alfa globin geni vardır ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Aynı kromozom üzerindeki alfa genlerine 5'-3'doğrultusunda, $\alpha 2$ ve $\alpha 1$ isimleri verilir. Bu genler yapısal olarak birbirinin kopyasıdır (duplikasyon). Bu genler üzerinde meydana gelen delesyonlar veya nokta mutasyonları sonucu globin zinciri sentezi azalmakta veya tamamen yok olmaktadır (6).

Alfa talasemiler delesyonel ve delesyonel olmayan olmak üzere iki gruba ayrılır. Gen delesyonları alfa talasemide en sık rastlanılan hastalık sebebidir. Delesyonların genişliği önemlidir ve klinik fenotipi etkilemektedir. Alfa talasemide en az 40 tane farklı delesyon bulunmuştur. Delesyonel olmayan mutasyonlar, delesyonel mutasyon-

lardan daha hafif bir fenotipe sahiptir (3). Önceleri alfa talasemi mutasyonlarının fenotipi doğrudan etkilenmiş alfa globin gen sayısı ile ilişkilendirilmiştir. Bir gen delesyonu sessiz taşıyıcı (alfa talasemi-2), iki gen delesyonu alfa talasemi taşıyıcı (alfa talasei-1); üç gen delesyonu Hemoglobin H ve dört gen delesyonu hidrops fötalis olarak sonuçlanmıştır. Bugün ise alfa talasemi sendromunun fenotipi ve genotipinin daha kompleks ve değişken olduğu fark edilmiştir. Fenotip çeşitleri sadece etkilenmiş alfa gen sayısına değil alfa talasemi mutasyon tipiyle de bağlantılıdır. Geniş delesyonlar, delesyonel olmayan mutasyonlar, düzenleyici bölgede değişim ve instabil mutasyonların hepsi fenotipin şiddetini arttırıcı yönde etki göstermektedir. (3).

GEREÇ VE YÖNTEM

Süleyman Demirel Üniversitesi Hastanesi çocuk hematoloji polikliniğine başvuran alfa talasemi mutasyonu araştırılan 25 hasta çalışmaya alındı. Hastalardan 2 mL venöz kan örneği EDTA içeren tüplere alındı. Bu amaçla alınan kan örneklerinden Gen polimorfizmini tespit etmek için alınan kan örneklerinden Invitex marka Invisorb Spin Blood Mini Kit (Germany) kullanılarak tam kandan DNA izolasyonu yapıldı. Alfa globin gen bölgelerine ait biotin işaretli primerler kullanılarak PCR multipleks yöntemi ile in vitro amplifikasyon yapıldı. Amplifikasyon ürünleri Alfa globin genindeki mutasyonlar reverse hibridizasyon prensibine dayalı ViennaLab α -globin StripAssay™ ticari kiti (ViennaLab Labordiagnostica, Austria) kullanılarak tespit edildi.

BULGULAR

Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Çocuk Hematolojisi polikliniğine başvuran ve alfa talasemi mutasyonu araştırılan 25 hastadan 9 tanesinin Heterozigot formunda allel taşıdığı tespit edildi. Bu hastaların 5 tanesinde MED double gen delesyonu (heterozigot mutasyon), 2 tanesinde -20.5 kb single gen delesyonu (heterozigot mutasyon), 1 tanesinde $\alpha 2IVS$ 1-5 nt delesyonu (heterozigot) ve diğer 1 tanesinde -3.7 single gen delesyonu (heterozigot) tespit edildi. Bu 25 hastadan 16 tanesinde herhangi bir mutasyona rastlanmamıştır.

TARTIŞMA

Talasemi, Hb'nin bir alt ünitesi olan globin zincirlerinin sentezinin yokluğu veya azalmasıyla karakterize genetik bozuklukların bir grubudur. Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu, Güney Asya, Sri Lanka, Maldivler, Güneydoğu Asya, Malezya, Güney Çin ve Tayvan'ı kapsayan bölgelerde yaygın olarak görülmektedir (7). Hemoglobinopatilerin önlenmesinde en etkin yöntemler taşıyıcıların tespit edilmesi, taşıyıcılara genetik danışma verilmesi ve prenatal tanı metotlarının kullanılması ile hemoglobinopatili bebek doğumunun önlenmesini kapsamaktadır (8).

Alfa globin gen mutasyonlarının ortaya çıkarılması, özellikle prenatal dönemdeki tedavi stratejilerinin belirlenmesine büyük katkı sağlayacaktır. Her ne kadar alfa globin geninin tamamında DNA dizinlemesiyle bilinmeyen mutasyonların tespiti uygulanabilir olsa da, çok pahalı olduğundan özellikle gelişmekte olan ülkelerde bu teknoloji rutin olarak uygulanamamaktadır. Bunun için dizi analizinden önce ucuz, hızlı bir moleküler tespit metoduna ihtiyaç vardır (7). Son yıllarda piyasaya çıkarılan ve şu anda üçüncü nesli geliştirilmiş olan alfa globin Strip Assay (ViennaLab) adlı kit Türkiye'de talasemi tanısını büyük oranda kolaylaştırmıştır. Bu test PCR ile çoğaltılmış DNA ürünlerinin mutasyona özgü oligonükleotid problemleriyle hibritleşmesi prensibi üzerine kurulmuştur (9).

Talasemiler moleküler düzeyde oldukça heterojen olup, alfa talasemili hastalarda, alfa globin geninin 40'dan fazla farklı mutasyonu tespit edilmiştir. Önemli olarak, dünyada yüksek sıklığa sahip popülasyonların her birinin özellikle belli bir bölgede sadece birkaç yaygın mutasyonu taşıdığı görülmektedir, bunun yanında nadir olanlarda görülebilir. 40 mutasyonun tümünün her toplumda görülmemesi ve mutasyonların etnik gruplara özgün olması, bu geniş moleküler çeşitliliği biraz basite indirgeyen bir faktör olmuştur (9).

Dünyada ve Türkiye'de alfa talasemi mutasyonlarının sıklığı ve dağılımı üzerine çok sayıda çalışma yapılmıştır. Çukurova bölgesinde Çürük MA. ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada, her iki alfa globin genini içine alan üç büyük delesyon (--/αα) ve tek alfa genini kapsayan (-α/αα) iki küçük delesyon belirlenmiştir. Delesyonel olmayan alfa talasemi mutasyonlarından α2 geni üzerinde iki farklı PolyA mutasyonu ve bir tane de 5 nükleotidlik (-5nt) küçük delesyon ile α1 geni üzerindeki nokta mutasyonu sonucu meydana gelen HbAdana, HbH hastaları ve onların aile çalışmaları sırasında tespit edilmiştir(10). Adana ve

çevresinde yenidoğan bebeklerden kordon kanı alınarak yapılan tarama çalışmasında alfa talasemi taşıyıcı oranı %2.9 olarak rapor edilmiştir (11). Alfa talasemi konusundaki genotip çalışmaları, HbH hastaları ve aileleri üzerinde yapılmış olup, Akdeniz ülkelerinde görülen beş farklı gen delesyonu belirlenmiştir (12,13,14,15). Bunlardan üç tanesi (26.5kb, 20.5kb ve 17.4kb) aynı allel üzerindeki α2 ve α1 genlerini içine alan ağır alfa talasemi delesyonları (α-thal-1: --/αα), diğerleri (-3.7 kb ve -4.2 kb) ise sadece bir alfa genini içine alan (α-thal-2:-α/αα) sessiz alfa talasemi delesyonlarıdır. Çukurova bölgesinde alfa talasemi mutasyonlarından -26.5 kb (Med II) ve -4.2 kb delesyonları ender olarak 20.5 kb, 17.4 kb ve 3.7 kb lik delesyonlar ise yaygın olarak görülmüştür (13,14,15,16). Delesyonel olmayan alfa talasemi mutasyonlarından PolyA kuyruğu üzerinde bulunan PA1: AATAAA-AATAAG ilk kez Arap ülkelerinde yaşayan hastalarda (HbH) karakterize edilmiştir (17). PA2: AATAAA-AATGAA mutasyonu ise ilk kez Adana'da yaşayan HbH hastalarının analizi sırasında Med II delesyonu ile birlikte bulunmuştur (14). Alfa-2 genindeki IVS1'in donör kısmında bulunan 5 nükleotidlik delesyon (-5 nt: -TGAGG) da diğer bir HbH hastasında Med II delesyonu ile kombine görülmüştür. Bu üç farklı nondelesyonel alfa talasemi mutasyonu komşu ülkelerde de HbH hastalığı ile birlikte rapor edilmiştir (13,14,18,19).

Alfa globin genlerinin üzerinde bulunan ve aminoasit değişimi ile meydana gelen dayanıksız Hb varyanlarının da alfa talasemiye neden olduğu tespit edilmiştir. -α3.7 tek gen delesyonu dünya çapında bir dağılıma sahip olup, Afrika, Akdeniz ve Asya popülasyonunda en dominant mutasyon olarak karşımıza çıkmaktadır (20). Doğu Malezya'da Jin-AiMary Anne Tan ve ark.'nın yaptıkları bir çalışma ile single α-globin gen delesyonunun (-α3.7) yaygın olduğu gösterilmiştir (20).

İran'da Kerman vilayetinin'de Nasrollah Saleh-Gohari ve ark.'nın yaptıkları bir çalışmada da α-globin genine ait mutasyonlar arasında -α3.7mutasyonunun en yaygın mutasyon olduğu gösterilmiştir. Bunu takiben α-globin gene defektlerinden sırasıyla kodon 19 (α2) ve -5 nt/αα (α2) mutasyonlarının sıklıkla görüldüğü bildirilmiştir (21).

Hadavi ve ark (22) güney ve güneydoğu İranda sırasıyla -α3.7 ve polyadenylation signal site 2 (poly A2) (α2) mutasyonlarının en sık görülen α-globin gen mutasyonları olduğunu bildirmişlerdir (22). -α3.7 mutasyonu İran'da en yaygın α-globin gen mutasyonu olarak

önceden bildirilmiştir. Alfa talasemi sıklığı ve mutasyon spektrumunun bilinmesi prenatal tanı ve takip için daha iyi bir danışmanlık sağlar. Kerman vilayetinde 566 bireyin incelenen kromozomlarında 8 farklı mutasyon bulundu. - α 3.7 mutasyonu en yaygın mutasyondur. Bu mutasyonların büyük çoğunluğu heterozigot durumda bulundu (- α 3.7/ $\alpha\alpha$). ikinci ve üçüncü sırada en sık görülen α -globin gen defekti sırasıyla kodon 19 (5.7%) ve IVS-1, -5 nt (4.2%) nokta mutasyonlarıydı. Bu iki mutasyon homozigot ve heterozigot durumda da bulundu. Mutasyona uğramış allellerin yaklaşık %3.7'si - α 4.2 : %1.8 heterozigot ve %0.35 homozigot durumdaydı. Geri kalan mutasyonlar kodon 142/ $\alpha\alpha$ (α 2) (1.3%), polyA2/ $\alpha\alpha$ (α 2) (0.5%), polyA1/ $\alpha\alpha$ (α 2) (0.5%) ve -MED (0.3%) idi. Vakaların %4.2'sinde herhangi bir mutasyon bulunamadı (21).

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlara göre, Isparta ve çevresinde en yaygın görülen alfa talasemi mutasyonu MED double gen delesyonu olarak bulundu. Bunu -20.5 kb single gen delesyonu, -3.7 single gen delesyonu ve α 2 IVS 1-5 nt mutasyonu takip etti. Çalışmamız, Isparta ve çevresindeki mutasyonların tipini ve dağılımını belirlemek suretiyle, moleküler patolojiye göre klinik seyri, hastalığın tespit edilme aşamasında tahmin edebilmesinde klinisyene yardımcı olacak, hastalığa önlem alma stratejilerine ve programlarına katkıda bulunacaktır. Ayrıca bu çalışmadaki veriler hastaların klinik takiplerindeki verilerle birleştirilirse ve katılımcı sayısı artırılırsa hastalığın genetik geçişinin moleküler mekanizması ile fenotip arasındaki bağlantı hakkında çok daha yararlı bilgiler elde edileceğini düşünmekteyiz. Türkiye'nin alfa talasemi mutasyon haritasına da katkısı olacaktır. Genetik danışmanlık esnasında moleküler patolojinin bilinmesi sayesinde kişiye daha açık ve güvenilir bilgiler verilebilecek dolayısıyla çocuk sahibi olma kararlarında alınabilecek erken önlemlerle gerek tıbbi abortusların uygulanma gerekliliği gerekse hasta çocuk doğma riski azaltılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Chong SS, Boehm CD, Higgs DR, Cutting GR. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of α -thalassemia. *Blood*. 2000; 95: 360-362.
2. Kan YW. Molecular pathology of α -thalassemia. *Ann NY Acad Sci*. 1985;445: 28-36.
3. Vichinsky E. Complexity of alpha thalassemia: growing health problem with new approaches to screening, diagnosis, and therapy. *Ann N Y Acad Sci*. 2010; 1202: 180-187.

4. Hartevelde CL, Refaldi C, Cassinero E, Cappellini MD, Giordano PC. Segmental duplications involving the α -globin gene cluster are causing β -thalassemia intermediate phenotypes in β -thalassemia heterozygous patients. *Blood Cells Mol Dis*. 2008; 40: 312-316.
5. Giordano PC, Bakker-Verwij M, Hartevelde CL. Frequency of α -globin gene triplications and their interaction with β -thalassemia mutations. *Hemoglobin*. 2009; 33: 124-131.
6. Higgs DR. Alpha thalassemia: An Overview, Ed. Stuart Roath, in *Current Views on Thalassemia*. Harwood Academic Publishers, Switzerland. 1992: 31-40.
7. Chinchang W, Viprakasit V, Pung-amritt P, Tanphaichitr VS, Yenichitsomanus P. Molecular analysis of unknown beta globin gene mutations using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) technique and its application in Thai families with beta thalassemias and beta globin variants. *Clin Biochem*. 2005; 38: 987-996.
8. Gümrük F. Hemoglobinopatilerin Tanı ve Tedavisinde Yenilikler. *Türk Hematoloji Derneği 9. mezuniyet sonrası eğitim kursu 2006*; 62-64.
9. Basak AN. Talasemi Moleküler Genetigi. *Türk Hematoloji Derneği Temel Moleküler Hematoloji Kursu 12-13 Mart 2005*; 99-106.
10. Çürük MA, Genç A, Huseynova P, Zeren F, Aksoy K. Çukurova'da Alfa Talasemi Genotipleri ve HB H Hastalığı. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci* 2007; 3: 17-23.
11. Kılınç Y, Kümi M, Gürgey A, Altay Ç. Adana bölgesinde doğan bebeklerde kordon kanı çalışması ile alfa talasemi, G6PD enzim eksikliği ve HbS sıklığının araştırılması. *Doğru Tr Tıp ve Ecz D*. 1986; 10: 162.
12. Huisman THJ, Carver MFH, Baysal E. *A Syllabus of Thalassemia Mutations (1997)*. Augusta: The Sickle Cell Anemia Foundation, 1997 .
13. Öner C, Gürgey A, Öner R, Balkan H, Gümrük F, Baysal E, et al. The molecular basis of Hb H disease in Turkey. *Hemoglobin* 1997; 21: 41-51.
14. Yüregir GT, Aksoy K, Çürük MA, Dikmen N, Fei YJ, Baysal E, et al. Hb H disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional alpha-thalassaemia-1 and a newly discovered poly A mutation. *Br J Haematol* 1992; 80: 527-532.
15. Çürük MA. HbH diseases in Southern Turkey. *Hemoglobin*. 2007; 31: 265-271.
16. Aluouch JR, Kılınç Y, Aksoy M, Yüregir GT, Bakioglu I, Kutlar A, et al. Sickle cell anemia among Eti-Türks; haematological, clinical and genetic observations. *BJ Haematol*. 1986; 64: 45.
17. Thein SL, Wallace RB, Pressley L, Clegg JB, Weatherall DJ, Higgs DR. The polyadenylation site mutation in the alpha-globin gene cluster. *Blood* 1988; 71: 313-319.
18. Kan YW, Dozy AM, Stamatoyannopoulos G, Hadjiminias MG, Zachariades Z, Furbetta M, et al. Molecular basis of hemoglobin H disease in the Mediterranean population. *Blood* 1979; 54: 1434-1438.
19. Galanello R, Aru B, Dessi C, et al. Hb H disease in

- Sardinia; molecular, hematological and clinical aspects. *Acta Haematol.* 1992; 88: 1-6.
20. Tan JA, Lee PC, Wee YC, Tan KL, Mahali NF, George E, et al. High prevalence of alpha- and beta-thalassemia in the Kadazandusuns in East Malaysia: challenges in providing effective health care for an indigenous group. *J Biomed Biotechnol.* 2010;
21. Saleh-Gohari N, Khosravi-Mashizi A. Spectrum of α -globin gene mutations in the Kerman province of Iran. *Hemoglobin.* 2010; 34: 451-460.
22. Hadavi V, Taromachi AH, Malekpour M, Gholami B, Law HY, Almadani N, et al. Elucidating the spectrum of α -thalassemia mutations in Iran. *Haematologica.* 2007; 92: 992-993.
23. Saleh-Gohari N, Khosravi-Mashizi A. Spectrum of α -globin gene mutations in the Kerman province of Iran. *Hemoglobin.* 2010; 34: 451-460.

