



BETA TALASEMİ MUTASYON TİPLERİNİN MOLEKÜLER ANALİZİ

MOLECULAR GENETIC ANALYSES OF BETA-THALASSEMIA PATIENTS

Berna YILMAZ¹ Zuhal BALIM¹ Ferda ÖZKINAY² Cumhuri GÜNDÜZ¹ Nuray ALTINTAŞ¹
Yeşim AYDINOK³ Nejat TOPÇUOĞLU¹

¹E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Bornova, izmir

²E.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Genetik ve Teratoloji Bilim Dalı, Bornova, izmir

³E.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hematoloji Bilim Dalı, Bornova, izmir

Anahtar Sözcükler: beta talasemi, mutasyon

Key Words: beta thalassemia, mutation

ÖZET

Tek gen hastalıkları arasında en çok bilineni ve yaygın olanı hemoglobinopatilerdir. Talasemi sendromları ve anormal hemoglobinopatiler özellikle italya, Yunanistan, Kıbrıs ve Türkiye gibi Akdeniz ülkelerinde olmak üzere Orta Doğu' dan Uzak Doğu' ya kadar uzanan bir kuşak boyunca yüksek oranda görülür.

fi-talasemi mikrositozis ve hemolitik anemi ile karakterize otozomal resesif bir hastalıktır. Bu hastalık, hemoglobinin fi-globin zincirinin normal sentezini bozan veya azaltan çeşitli moleküler defektlerle ortaya çıkar. Bu güne kadar 180 nin üzerinde ji-talasemi mutasyonu tanımlanmış olup, bunların analizi değişik moleküler yöntemlerle yapılmaktadır.

Çalışmamızda, ji-talasemi mutasyonlarını saptamak amacıyla 35 talasemili olgudan alınan periferik kandan DNA izole edilmiş ve Amplification Refractory Mutation System (ARMS) tekniği ile mutasyon tayinine gidilmiştir. Türkiye' de en sık rastlanılan ji-talasemi mutasyonları olan IVS-I-110 mutasyonu (%32.85) en yüksek oranda gözlenmiştir. Bunu izleyen mutasyonlar; IVS-I-6 (%7.14), IVS-I-1 (%7.14) ve IVS-II-745 (%4.28) 'dir.

Bu çalışmadaki amacımız, talasemi mutasyon tiplerinin ortaya konabilmesi için gerekli olan laboratuvar standardizasyonunu sağlamak ve bu aşamadan sonra prenatal tanı için gereken laboratuvar çalışmalarına geçebilmektir.

SUMMARY

Among the genetic diseases the most common disorders are hemoglobinopathies.

Thalassemia and abnormal hemoglobinopathies are distributed living along the countries from Middle East to the Far East especially Mediterranean countries such as Italy, Greece, Cyprus and Turkey.

(i-thalassemia is an autosomal recessive disorder characterized by microcytosis and hemolytic anemia. The disorder comes out with various molecular defects that demolished or reduced ji-globin chain synthesis.

Yazışma adresi: E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
Bornova, izmir

Makalenin geliş tarihi: 06. 07. 2000; kabul tarihi:13. 10. 2000

Recent molecular studies on *p*-thalassemia genes revealed the presence of more than 180 different mutations associated with the disorder by different molecular analyses.

In this study, to describe the mutations on *p*-thalassemia homozygotes and heterozygotes, DNA extracted from peripheral blood samples and presence of the mutations was shown by amplification refractory mutation system (ARMS). IVS-I-110 (%32.85) mutation which is the most common *p*-thalassemia defect in Turkey is observed high frequency, followed in IVS-I-6 (%7.14), IVS-I-1 (%7.14), IVS-II-745 (%4.28).

The aim of this study is getting the standardization of laboratory and methodology for mutation analyses on *p*-thalassemia patients and traits and then to establish a prenatal diagnosis program in our laboratory.

GİRİŞ

Talasemi sendromları ve hemoglobinopatiler özellikle italya, Yunanistan, Kıbrıs ve Türkiye gibi Akdeniz ülkelerinde olmak üzere Orta Doğu' dan Uzak Doğu' ya kadar uzanan bir kuşak boyunca yüksek oranda görülür. Türkiye genelinde yapılan çalışmalar, nüfusumuzun ortalama %2 den fazlasının (5 talasemi geni taşıyıcısı olduğunu ortaya koymuştur (1,2).

Ülkemizde, akraba evliliklerinin fazla olduğu bazı yörelerde, taşıyıcıların birbirleri ile evlenme olasılıkları da artmaktadır.

Bu hastalıkta tedavi yerine bir çok ülkede hastalıktan korunmaya önem verilmektedir. Korunmada, taşıyıcıları ortaya çıkaracak tarama yöntemlerinin yanısıra, hasta çocuk doğmasını önlemek amacıyla doğum öncesi tanı yöntemleri de geliştirilmiştir.

Bu çalışmadaki amacımız, talasemili hasta ve taşıyıcılarındaki mutasyonların ortaya konabilmesi için gerekli olan laboratuvar standardizasyonunu sağlamak ve bu aşamadan sonra prenatal tanı için gereken laboratuvar çalışmalarına geçebilmektir. Çalışılacak mutasyon sayısının artırılması ve DNA dizi analizi yapıncaya kadar, saptanmayan mutasyonlar için, örneklerin referans laboratuvarlara gönderilmesi planlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Beta talasemi mutasyonlarını saptamak amacıyla 35 talasemili olgudan, antikoagulant olarak EDTA içeren tüplere alınan 10 mi periferik kandan DNA izole edilmiştir (3). izole edilen DNA' nın miktarının ve saflığının ölçülmesi için 260nm ve 280nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçüm yapılmıştır. 260/280 oranı 1.5-2 arası olan DNA'lar kullanılmıştır. DNA örnekleri, kalitelerinin değerlendirilmesi için de, %2 lik 0.5^g/mL etidyum bromidli agaroz jelde 5V/cm olacak şekilde, 1 saat 0.5xTBE tamponunda yürütülmüştür.

Mutasyon tayini, Amplification Refractory Mutation System (ARMS) tekniği ile yapılmıştır (4). *p*-globin gen mutasyon-

larının incelenmesinde, izole edilen DNA'nın amplifikasyonu için, mutasyonlara göre farklı primerler ve PCR' da farklı sıcaklık ve döngüler uygulanmıştır.

Primerler:

IVS 1-110

ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACC Normal
ACC AGC AGC CTA AGG GTG GGA AAA TAC ACT Mutant

IVS II-745

TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGC Normal
TCA TAT TGC TAA TAG CAG CTA CAA TCG AGG Mutant

IVS I-6

TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATA Normal
TCT CCT TAA ACC TGT CTT GTA ACC TTC ATG Mutant

IVS I-1

TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAC Normal
TTA AAC CTG TCT TGT AAC CTT GAT ACG AAT Mutant

Döngü ve sıcaklıklar:

IVS I-110 94°C, 1'; (93°C,1'; 69°C, 1';72°C, 1'30") 27 döngü
IVS-II-745 94°C, 1'; (93°C,1'; 66°C, 1';72°C, 1'30") 27 döngü
IVS-I-6 94°C, 1'; (94°C,1'; 64°C, 1';72°C, 1'30") 30 döngü
IVS-I-1 94°C, 1'; (93°C,1'; 66°C, 1';72°C, 1'30") 27 döngü

PCR sonucu elde edilen ürün %1 lik 0.5^g/mL etidyum bromidli agaroz jelde 5V/cm olacak şekilde, 1 saat 0.5xTAE tamponunda yürütülmüş, UV ışığı altında DNA normal ve/veya mutant bantları görünür halde iken polaroid fotoğrafları çekilerek değerlendirilmiştir.

BULGULAR

Çalışmamızda, klinik olarak talasemi tanısı almış 35 hastanın mutasyonu ARMS yöntemi ile saptanmıştır. Hastaların 7 tanesinde homozigot IVS-I-110, 2 tanesinde homozigot IVS-I-1, 1 tanesinde homozigot IVS-II-745, 1 tanesinde homozigot IVS-I-6 mutasyonları, 1 tanesinde birleşik heterozigot IVS-I-110/IVS-II-745, 9 tanesinde heterozigot IVS-I-110/, 3 tanesinde heterozigot IVS-I-6/, 1 tanesinde heterozigot IVS-I-1/ mutasyonu saptanmış, 11 tanesinde ise çalışılan mutasyonların hiçbirine rastlanmamıştır. Çalışmaya alınan hastalar ve saptanan sonuçlar Tablo 1'

de gösterilmiştir. 35 hastada, toplam 70 alleldeki mutasyonlar ve görülme sıklıkları da Tablo 2 'de verilmiştir.

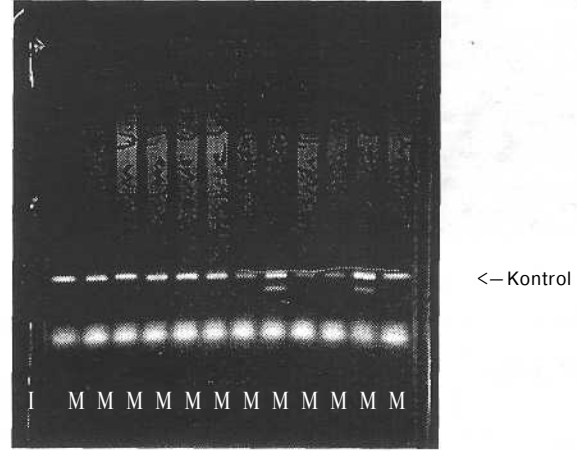
Tablo 1. Çalışmaya alınan hastaların mutasyon tipleri. *Çalışılan mutasyonların hiçbiri saptanamadı.

Mutasyon	Allel sayısı	Yüzdesi
IVS-I-110	23	32.85
IVS-I-1	5	7.14
IVS-I-6	5	7.14
IVS-II-745	3	4.28
Bilinmeyen	34	48.57
Toplam	70	100

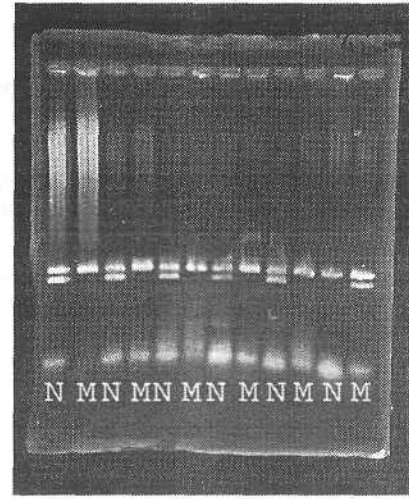
Tablo 2. Mutasyonlara göre allel sayısı ve yüzdeleri.

Adı Soyadı	IVS-I-110	IVS-I-1	IVS-I-6	IVS-II-745
Y.D.				++
A.K.			+	
İ.K.			+	
Ş.B.	++			
F.T.*				
A.D.	++			
H.S.*				
T.E.	+			
Ö.K.		++		
U.Ö.	+			
Ö.Y.			++	
S.T.		+		
CM.	+			+
B.K.	+			
A.Y.	+			
T.E.*				
S.K.	+			
C.A.			+	
N.U.	+			
C.K.	+			
D.Ç.*				
H.Ç.*				
İ.A.		++		
Ö.İ.	+			
Ö.Ö.*				
A.Y.'				
H.Y.	++			
E.Ç.*				
G.Ç.	++			
Ö.U.*				
EA*				
F.K.	++			
S.Ç.	++			
A.K.-				
T.M.	++			

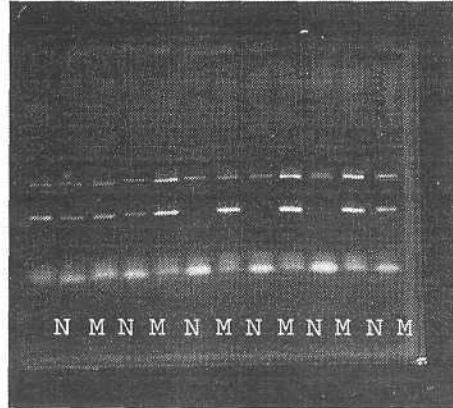
Bulduğumuz mutasyonların ARMS tekniği ile, %1 lik agaroz jel elektroforezinde tanımlanmasına ait görüntüler aşağıda verilmiştir (Resim 1,2,3,4).



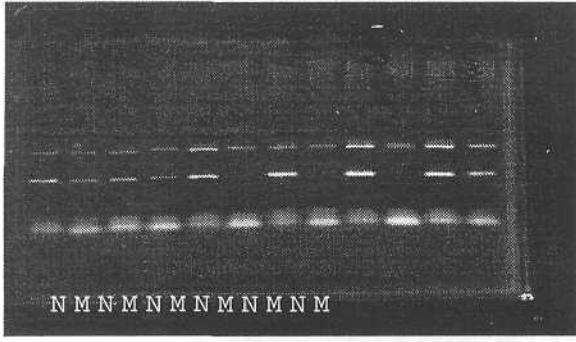
Resim 1. IVS-I-110 mutasyonu için %1 lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (M=Mutant).



Resim 2. IVS-II-745 mutasyonu için %1 lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (N=Normal M=Mutant).



Resim 3. IVS-I-6 mutasyonu için %1 lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (N=Normal M=Mutant).



Resim 4. IVS-I-1 mutasyonu için,%1 lik agaroz jel elektroforez görüntüsü (N=Normal M=Mutant).

TARTIŞMA

p-globin gen mutasyonlarını analiz etmek için yöntemlerdeki ilerlemeler (3-talaseminin oluş sebebindeki moleküler mekanizmaları anlamayı olanaklı hale getirmiştir. Bir çok ülkede (3-talasemiden sorumlu olan moleküler değişikliklerin temelini ortaya koymak için çalışmalar yürütülmüştür (5,6,7,8,9).

Tadmouri ve arkadaşları, dot-blot hibridizasyonu ile (3-globin geninin PCR amplifikasyonuna dayanan teknik, denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), restriksiyon endonükleaz analizleri ve amplification refractory mutation system (ARMS) yöntemleri ile Türk toplumundaki mutasyonları çalışmışlardır. Mutasyonlar ve sıklıkları sırasıyla; IVS-I-110 (%39.3), IVS-I-6 (%10), IVS-I-1 (%5), IVS-II-745 (%5) ve sıklığı %2 nin üstündekiler IVS-I-6 (T-C), FCS-8 (-AA), IVS-I-1 (G-A), IVS-II-745 (C-G), IVS-II-1 (G-A), Cd 39 (C-T), -30 (T-A) ve FCS-5' olarak bulunmuştur (10).

Başak ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, oligonükleotid hibridizasyonu, restriksiyon endonükleaz analizi ve amplifiye genomik DNA' nın direkt dizi analizi yöntemlerini kullanmışlardır. En sık rastlanan IVS-I-110 (%35.9), IVS-I-6, FCS-8, IVS-I-1, -30 ve FCS-5 mutasyonları, hastalık genlerinin yalnızca %69.3'ünden sorumlu olduğu, incelenen 26 mutasyonun ise hastalık genlerinin %85.8' inden sorumlu olduğu bulunmuştur (11).

Tüzmen ve arkadaşları tarafından, Türk popülasyonunda en çok bilinen 12 mutasyonun moleküler incelenmesi, amplifiye edilen DNA' nın allel spesifik oligonükleotid (ASO) hibridizasyonu ile yapılmıştır. Bu yöntem kullanılarak, incelenen kromozomların %95' inde mutasyonlar tanımlanmıştır. Genomik dizi analizi de, az rastlanan Cd 44(-C), IVS I-5 (G-C) ve IVS 1-116 (T-G) mutasyonlarının saptanmasına olanak tanımıştır (12).

Altay ve arkadaşları genotipi ve fenotipi çalışılan 31 HbS- [3-talasemi hastasında, IVS-I-110 mutasyonunu %46 oranında bulmuşlardır (13).

Öner ve arkadaşlarının bir çalışmasında, 191 (3-talasemili hasta ve bu hastaların 182 heterozigot yakınlarında, (3-talasemi allelleri incelenmiştir 27 farklı mutasyon için spesifik olan sentetik problemlerle dot-blot hibridizasyon ve gen amplifikasyonu ile inceleme yapılmıştır. Gözlenen 18 mutasyonun 6 tanesi, talasemili hastalarda %83 oranında saptanmıştır (14).

Aulehla ve arkadaşları, restriksiyon endonükleaz analizleri, oligonükleotid hibridizasyonu ve amplifiye genomik DNA nın direkt dizi analizi ile, Türkiye'de beta-talasemi için homozigot 26 hastada, DNA daki 11 farklı mutasyon göstermişlerdir. Bu çalışmada en sık gözlenen mutasyonlar, IVS 1-110, IVS-I-6 ve FCS-8 'dir. Ayrıca, direkt dizi analizi ile daha önce Türk popülasyonunda tanımlanmayan, çerçeve kayması (frameshift) +1 codon 9/10 ve anlamsız (nonsense) mutasyon codon 15 olmak üzere, 2 tane çok nadir mutasyonu karakterize etmişlerdir: (15).

Efremov' un beta-talasemili 102 Türk hastayla yaptığı bir çalışmada da, Türklere en çok rastlanılan mutasyonlar sırasıyla IVS-I-110, IVS-I-6, IVS-II-1 ve Codon 8 olarak bulunmuştur (5).

Nişli ve arkadaşları Ege bölgesindeki (3-talasemili 54 hastada yaptıkları çalışmada, IVS-I-110 (G-A), IVS-I-6 (T-C), IVS-I-1 (G-A), IVS-II-745 (C-G), Cd39 (C-T) ve FCS8 mutasyonlarının, talasemi mutasyonları içinde %80.6 sıklıkla bulunduğunu göstermişlerdir (16).

Bizim çalışmamızda da, genomik DNA' nın PCR amplifikasyonunu takiben, Amplification Refractory Mutation System (ARMS) tekniği ile mutasyon tayinine gidilmiştir. Türkiye' de en sık rastlanılan mutasyonlardan olan IVS-I-110 mutasyonu (%32.85) en yüksek oranda gözlenmiştir.

Bunu izleyen mutasyonlar; IVS-I-6 (%7.14), IVS-I-1 (%7.14) ve IVS-II-745 (%4.28) 'dir. IVS-I-110 mutasyon sıklığının bir miktar düşük bulunması ve diğer mutasyon sıklıklarındaki farklılıklar çalışma grubumuzdaki hasta sayısının az olmasına bağlanmıştır.

Bununla birlikte bu sonuçlar, diğer araştırmacıların ortaya koyduğu sonuçlarla benzerlik göstermektedir.

Sonuç olarak çalışma grubumuzda, (3-talasemi için Türkiye'de daha önce yapılmış olan mutasyon dağılımına uyan sonuçlar elde edilmiş ve bu çalışmada kullanılan ARMS yönteminin, laboratuvarımızda (3-talasemi mutasyonlarının aranmasında rutin olarak kullanılabileceği kanısına varılmıştır. Bu amaçla, talasemili hastalarda mutasyonların yaklaşık %90 oranında saptanmasını sağlayan sekiz primer kullanılması planlanmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Çavdar A, Arcasoy A. The incidence of p-thalassemia and abnormal hemoglobin in Turkey, *Açta Haematol* 1971; 45:312-318.
2. Kavaklı K. Beta Talasemide Klinik Bulgular. Nişli G, ed. Beta Talasemi, Ayın Kitabı 75, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Yayın Bürosu, 1995; 4-11.
3. Kawasaki ES. Sample preparation from blood, cells and other fluids. Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. PCR protocols, a guide to methods and applications. San Diego: Academic Press, 1990; 146.
4. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, et.al. Analysis of point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 1989; 17(7):2503-16.
5. Efromov GD. Beta-delta beta-thalassemia and Hb lepore among Yugoslav, Bulgarian, Turkish and Albanian. *Haematologica* 1990;75(3):31-41.
6. Efromov GD. Hemoglobinopathies in Yugoslavia: an update. *Hemoglobin* 1995; 16(6): 531-44.
7. Fonseca-SF, Kerbauy J, Escrivao C, et.al. Genetic analysis of beta-thalassemia major and beta-thalassemia intermedia in Brazil. *Hemoglobin* 1998;22(3):197-207.
8. Petkov GH, Efromov GD, Efromov DG, et.al. Beta-thalassemia in Bulgaria. *Hemoglobin* 1990; 14(1):25-33.
9. Schinvo G, Di-Gregorio F, Samperi P, et.al. Genetic heterogeneity of beta-thalassemia in Southeast Sicily. *Am J Hematol* 1995;48(1):5-11.
10. Tadmouri GO, Tuzmen S, Özceik H, et. al. Molecular and Population Genetic Analyses of β 5-Thalassemia in Turkey. *Am J Hematol* 1998;57,215-220.
11. Başak AN, Özçelik H, Özer A, et.al. The Molecular Basis of β 5-Thalassemia in Turkey. *Hum Genet* 1992;89,315-318.
12. Tuzmen S. Tadmouri GO, Özer A, et.al. Prenatal diagnosis of beta-thalassemia and sickle cell anaemia in Turkey. *Prenat Diagn* 1996;16(3):252-8.
13. Altay C, Öner R, Mesci L, et.al. Genotype- phenotype analysis in HbS-beta thalassemia. *Hum-Hered* 1997;47(3):161-4.
14. Öner A, Altay C, Gurgey A, et.al. β 3-Thalassemia in Turkey. *Hemoglobin* 1990;14,1-13.
15. Aulehia-Schoiz C, Başaran S, Agaoglu L, et.al. Molecular Basis of β J-Thalassemia in Turkey: Dedection of Rare Mutations by Direct Sequencing. *Hum Genet* 1990;84,195-197.
16. Nisli G. Kavaklı K, Aydınok Y, et.al. Beta-Thalassemia Allels in Region of Turkey: Effect on Clinical Severity of Disease. *Pediatr Hematol Oncol* 1997;14:59-65.

*Bu çalışma E.Ü. Araştırma Fon Saymanlığı tarafından desteklenmiştir