

Hb D ve Hb O Arab Benzeri Anormal Hemoglobünlerinin Moleküler Tekniklerle Belirlenmesi

MOLECULAR IDENTIFICATION OF Hb D AND Hb O ARAB
LIKE ABNORMAL HEMOGLOBINS

Dr.Ceyda GÜRMAN*, Dr.Özden VURAL", Dr.Ayten ARCASOY***,
Prof.Dr.Şükrü CİN***, Doç.Dr.Nejat AKAR*

AÜTF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Klinik Moleküler Patoloji BD, ANKARA

** Edirne Tıp Fakültesi, iç Hastalıkları ABD, EDİRNE

*** AÜTF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD, Hematoloji BD, ANKARA

ÖZET

Hb S'den sonra ülkemizde en sık rastlanan anormal hemoglobinler Hb D Los Angeles ve Hb O Arab'dır. Bu anormal hemoglobin varyantları p-globin geninin III, exonundaki 121. kodonda meydana gelen tek baz değişimleri sonucunda ortaya çıkmaktadırlar.

Selüloz Asetat Elektroforezi sonrası Hb D benzeri veya Hb E benzeri olarak belirlenen örnekler, mutasyon tespiti için moleküler düzeyde incelenmiştir. Periferik kandan ayrılan mononükleer hücrelerden DNA elde edilmiş ve DNA p-globin geninin III. exonundaki 121. kodonu içine alacak şekilde polimeraz zincir reaksiyonu ile amplifiye edilmiştir. Amplifiye DNA, EcoR I restriksiyon enzimi ile kesilerek mutasyon analizi yapılmıştır.

Sonuçta, incelenen 21 örnekten 11 tanesi Hb O Arab; 10 tanesi Hb D Los Angeles veya Hb Beograd olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelime: Hemoglobin

TKlin Pediatri 1993, 2:1-4

SUMMARY

Hb S, Hb D Los Angeles and Hb O Arab are the most common abnormal hemoglobins in Turkey.

Hb D Los Angeles and Hb O Arab are formed by a single base substitution at the 121st codon of the third exon of the Beta globin gene.

The samples which were identified as Hb D Like or Hb E Like following cellulose acetate electrophoresis, were further examined at the molecular level.

The DNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells and the third exon of p-globin gene was amplified by polymerase chain reaction (PCR) so as to include the CD 121 for mutation analysis, and PCR product was digested with EcoR I.

Of the 21 samples; 11 samples were defined as Hb O Arab and 10 samples were defined as either Hb D Los Angeles or Hb Beograd. Further refinement of the latter is needed.

Key Word: Hemoglobin

Anatolian J Pediatr 1993, 2:1-4

Anormal Hemoglobinler hematolojik hastalıklar içerisinde önemli bir grubu oluştururlar. Halen tespit edilmiş anormal hemoglobin sayısı 500'ün üzerinde olup, bu sayı gün geçtikçe artmaktadır. Türkiye'de anormal hemoglobinler içinde Hb S (orak hücreli anemi) özellikle Akdeniz bölgesinde önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Diğer anormal hemoglobinler ise seyrek görülmekle birlikte; bazı durumlarda teşhis zorlukları ile karşılaşılmaktadır (1).

Geliş Tarihi: 10.2.1993

Kabul Tarihi: 8.3.1993

Yazışma Adresi: Doç.Dr.Nejat AKAR

Yargıç sok. 11/4

06590 Cebeci, ANKARA

Anormal hemoglobinler; değişik pH ve vasatlarda yatay ya da dikey elektroforez, değişik kromatografi teknikleri (kolon kromatografisi, high performance liquid chromatography), amino asit fingerprinting, isoelectric focusing ve rekombinant DNA teknikleri kullanılarak tespit edilebilirler (2).

Bazı basit laboratuvar yöntemleri (sickling ve solubilité) ile teşhis konulabilen Hb S'in dışındaki anormal hemoglobinlerin karakterizasyonu için mutlaka ileri tekniklerden birisinin kullanılması gerekmektedir.

Bu çalışmamızda selüloz asetat elektroforezinde Hb D benzeri ve Hb E benzeri olarak tanımlanan anormal hemoglobinlerdeki mutasyonların; rekombinant DNA teknolojisi yöntemlerinden olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve Restriksiyon Endonükleaz haritalaması ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

MATERYEL VE METOD

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatrik Hematoloji ve Moleküler Patoloji Bilim Dalları ile Trakya Üniversitesi Edirne Tıp Fakültesince takip edilmekte olan ve Selüloz Asetat Hemoglobin Elektroforezinden sonra Hb D benzeri veya Hb E benzeri olarak tanımlanan 21 birey çalışma kapsamına alınmıştır.

Çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Kliniği Hematoloji ve Moleküler Patoloji Bilim Dalı Laboratuvarlarında gerçekleştirilmiştir.

Selüloz asetat elektroforezi, sickling ve solubilité testleri yapılarak Hb S ayrımı gerçekleştirilmiştir (2,3). Hücre ayrımı, DNA ekstraksiyonu, agaroz jel elektroforezi daha önce tanımlandığı gibi yapılmıştır (4).

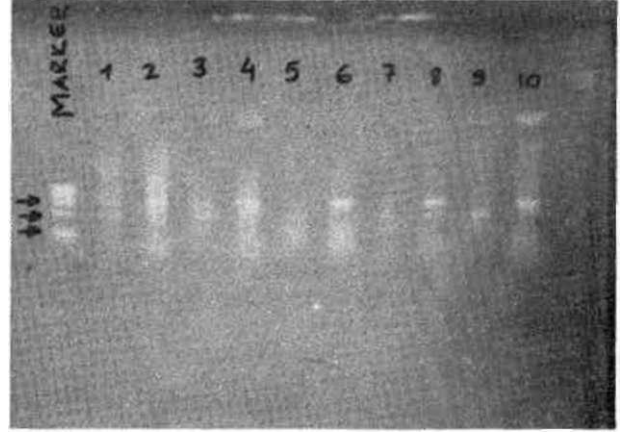
Elde edilen DNA, 11. kromozomdaki B globin geninin III. exonunu içine alacak şekilde, forward ve reverse primerlerle (Primer A: 5' - CAATGTATCATGCC TCTTGCACC - 3'; Primer B: 5' - TCCTGCATCTCT-CAGCCTTGACTC - 3') kullanılarak amplifiye edildi.

Taq Polimeraz (Promega), 10X tampon (500 mM KCl; 100mM Tris-HCl, pH:9; 15mM MgCl₂; %0.1 jela-tin; %1 Triton X-100), 200uM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ve primerler (20uM A ve B) eklenerek PCR için gerekli karışım hazırlandı. Araştırılacak DNA örneği de karışım üzerine konup, üzerine bir damla Mineral oil (Sigma) eklenerek örnekler PCR cihazına (Coy, A.B.D.) yerleştirildi. PCR siklusları şu şekilde gerçekleştirildi. 94°C'de 7 dakika denatürasyonu takiben, 35 siklus; 94°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2.5 dakika bekletildi. Son siklusta 72°C'de 5 dakika bekletildikten sonra, örneklerin oda ısısına inmeleri sağlandı.

Amplifiye edilen bölge 121 (GAA) ve 122 (TTC) kodonlarını ihtiva etmekteydi. Bu 5'-GAATTC-3' bölgesi EcoR I restriksiyon endonükleazın tanıma bölgesidir (Şekil 1). Bu noktadan hareketle amplifiye B globin örnekleri, EcoR I enzimi (BRL, A.B.D.) ile 37°C'de EcoR I'e uygun tampon (100mM Tris-HCl pH:7,5; 50mM NaCl; 10mM MgCl₂) içinde 8 saat süreyle muamele edildi, %1'lik agar jel elektroforezinden sonra UV ışık altında incelendi. Normal amplifiye DNA bu enzimle muameleden sonra iki fragmana ayrılır. Oysa Hb O Arab, B globin geninin 121. kodonundaki tek baz sübs-

	5'	AAA	EcoR I GAA (121)	TTC	ACC	3'
Hb D LA	5'	AAA	CAA	TTC	ACC	3'
Hb O Arab	5'	AAA	AAA	TTC	ACC	3'
BThal 121	5'	AAA	IAA	TTC	ACC	3'
Hb St. Francis	5'	AAA	GEA	TTC	ACC	3'
Hb Beograd	5'	AAA	GIA	TTC	ACC	3'

Şekil 1. Kodon 121'de meydana gelen tek nokta mutasyonlarının sebep olduğu hemoglobinopatiler



Marker. 0.1/Hae III kesilmiş

1. Hb O Arab (heterozigot) (A+B+C)
2. Enzimle kesilmemiş kontrol (A)
3. Hb O Arab (heterozigot) (A+B+C)
4. Enzimle kesilmemiş kontrol (A)
5. Hb O Arab (heterozigot) (A+B+C)
6. Enzimle kesilmemiş kontrol (A)
7. Enzimle kesilmiş normal kişi (B+C)
8. Enzimle kesilmemiş kontrol (A)
9. Enzimle kesilmiş normal kişi (B+C)
10. Enzimle kesilmemiş kontrol (A)

Şekil 2. B-globin geni 3.ekson PCR ürününün, EcoR I enzimi ile muamelesinin, agaroz jel elektroforezinde (%1) inceleme sonuçları.

titüsyonu sonucu oluştuğundan EcoR I kesim bölgesi ortadan kalkar ve amplifiye DNA bir kromozomda intact olarak kalırken, diğer kromozomda EcoR I kesimi gerçekleşir ve böylece Hb O Arab taşıyıcılardan elde edilen amplifiye DNA agar jel üzerinde 3 fragman olarak görülür (Şekil 2).

Hb C, B geninin CD 6'sına, Hb E B geninin CD 26'sına işaret ettiğinden ve PCR ile bu bölgeler çoğaltılmadığından Hb O Arab'dan ayrılır.

p 121'de ayrıca Hb D Los Angeles ve Hb Beograd varyantları da EcoR I enzim kesim noktasını ortadan kaldırdığından, bu hemoglobinlerin varlığı saptanabilir. Ancak bu iki Hb varyantını birbirinden ayırt etmek restriksiyon endonükleaz yöntemi ile şimdilik olası değildir (Şekil 1).

SONUÇLAR

21 anormal hemoglobin örneği PCR ve Restriksiyon Endonükleaz haritalaması ile incelenmiş ve mutasyonları belirlenmiştir.

Çalışmaya alınan 21 olgunun hiçbirinde, aynı mutasyonu her iki kromozomunda da (homozigot) taşıyan bireye rastlanmamıştır.

11 olgunun Hb O Arab taşıyıcısı olduğu teşhis edilmiştir.

10 olgunun Hb D Los Angeles veya Hb Beograd taşıyıcısı oldukları saptanmıştır. Bugün için bu mutas-

yonların birbirlerinden ayrılması için dizi analizi; amplification refractory mutation system (ARMS) veya single strand conformation polymorphism gibi tekniklere gereksinim bulunmaktadır.

Anne, baba ve çocuk olarak incelediğimiz 3 olgumuzda ise; annenin Hb D Los Angeles/Beograd, babanın Hb S ve çocuğun da bu kombinasyonu taşıdığı belirlendi.

TARTIŞMA

Anormal hemoglobinler Türkiye'de B-thalassaemia'dan sonra en sık görülen hemoglobinopatilerdendir (1,2). a, p, 6 veya y zincirlerindeki aminoasitlerdeki substitüsyon veya çeşitli füzyon ve mutasyonlar neticesi ortaya çıkan, çok sayıdaki hemoglobin varyantı Türk Populasyonunda şimdiye kadar değişik araştırmacılarca tanımlanmıştır. Türkiye'de en sık rastlanan anormal hemoglobin Hb S'dir (2).

Bu anormal hemoglobinlerden, populasyonda en sık görülenler Hb S'den sonra, Hb D Los Angeles (p-121) ve Hb O Arab (p-121)'dir. Diğer anormal hemoglobinler ise nadiren bir ya da iki olguda belirlenmiştir. Bu nedenle Beta zincirinin 121. aminoasitindeki değişikliklerin araştırılması öncelik kazanmaktadır.

p zincirinin 121. aminoasitindeki değişiklikler sonucu ortaya çıkan Hb varyantlarının klinik olarak, homozigot formları ile veya talassemialar ve diğer hemoglobinopatiler ile birlikte semptomlara sebep olmalarının yanısıra genetik-antropolojik çalışmalar için iyi birer materyal teşkil etmeleri, taşıyıcı ve hastaların genetik olarak araştırıldığı birçok araştırma yapılmasına neden olmaktadır. Bunlardan Hb D Los Angeles (p 121 Glu-Gln) ilk kez Punjab'da İngiliz ve Hintli karışımı bir ailede keşfedildikten sonra kimyasal yapısı 1972'de belirlendi. Orijini belirsiz olan bu anormal Hb, Pakistan, kuzeybatı Hindistan, Punjab ve Çin'in belirli bölgelerinde yüksek sıklıkta olmak üzere dünyanın birçok yerinde görülmüştür (5,6,7). Ülkemizde de Hb D nadir değildir. Heterozigot Hb D olguları ülkemizin değişik yerlerinde saptanmış ve hatta homozigot şekli de tanımlanmıştır (1,8,9,10,11). Aynı pozisyondaki bir diğer varyant olan Hb Beograd'da ise 121. kodonda Glutamik asit -> Valin değişimi söz konusudur ve bir Balkan göçmeni ailede talassemia ile kombine olarak tanımlanmıştır (12,13). p zincirinin 121. kononunda Glutamik asit yerine Lizin gelmesi ile oluşan Hb O Arab; Amerikan zencileri, Araplar, Sudanlılar, Bulgarlar gibi farklı etnik gruplarda ve Türk halkı ile Kıbrıs Türklerinde bildirilmiştir (14-20).

p 121'i ilgilendiren bir diğer hemoglobin ise Hb St. Francis (Glu →Gly) olup, daha önce Türk populasyonunda tanımlanmamıştır (21).

Pollmeraz Zincir Reaksiyonu ve ardından Restriksiyon Endonukleaz Haritalaması yöntemleri, gerekli malzeme temin edildiğinde, özellikle Türkiye'de Hb S'den sonra en sık görülen anormal hemoglobin olan

Hb D Los Angeles ve Hb O Arab'ın tespitinde kolay ve diğer tekniklerle mukayese edildiğinde de çabuk ve kesin sonuç veren tekniklerdir.

Hb D Los Angeles ve Hb O Arab'ın ülkemizde tanımlanması şimdiye kadar Selüloz Asetat Eiektroforez yöntemi ve Sitrat Agar Jel Eiektroforez! ile Hb D benzeri veya Hb E benzeri şeklinde yapılabilmekte, daha ileri incelemeler için yurtdışına gönderilmekteydi (9.11,16,17).

Bu çalışmada ise Selüloz Asetat Eiektroforez! sonrası Hb D benzeri veya Hb E benzeri olduğu tespit edilen 21 kişiye, polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon endonukleaz uygulamasından sonra 11 kişiye Hb O Arab kesin tanısı konulmuştur. Diğer 10 kişide ise 121. kodonu ilgilendiren bir mutasyon olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada 121. kodonu ilgilendiren Hb D Los Angeles, Hb O Arab ve Hb Beograd'ın, DNA Amplifikasyonu ve ardından Restriksiyon Endonukleaz Haritalaması ile çabuk ve kesin olarak bellenebileceği gösterilmiştir. Ancak, Hb D Los Angeles ile Hb Beograd'ın birbirlerinden ayrılması için ya da yeni bir mutasyonun varlığının saptanabilmesi için dizi analizi; amplification refractory mutation system (ARMS) veya Single Strand conformation polymorphism tekniklerine gereksinim bulunmaktadır.

Anormal hemoglobinlerin prenatal tanısı için, kolay ve tercih edilen bir yöntem işlerlik kazanmış; bu tür anormal hemoglobinlerin tespiti açısından yurtdışına olan bağımlılık da ortadan kalkmıştır.

Teşekkür

Bu çalışmanın yapılabilmesi için primer setlerini veren Çağliari Üniversitesi'nden Dr.Mario Pirastu ile Boğaziçi Üniversitesi'nden Prof.Nazlı Başak'a ve selüloz asetat elektroforezlerini yapan Teknisyen Nurcihan Yeşil'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Arcasoy A. Hemoglobinopatris in Turkey. Hemafoley Reviews and Communications 1992; 6:61-7.
2. Arcasoy A, Çavdar AO, Gözdaşoğlu S, Çin Ş, Babacan E, Erten J, Ertem U, Göğüs S. Türkiye'de thalassaemia ve anormal hemoglobin insidansı. "Türkiye'de Thalassaemia ve Anormal Hemoglobin İnsidansı Kitabı" 1978; 3-26.
3. Hottman R, Benz EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ. Hematology basic principles and practica, New York: Churchill Uvingstone İne, 1991: 291-302, 1891.
4. Akar N, Çavdar AO, Arcasoy A, Pirastu M, Loi A, Cao A. Türk toplumunda beta talassemiartın prenatal tanısında DNA polimortizmlemlerinin ve sentetik oligonükleotidlerin kullanılması değeri. Doğa (Tıp) 1988; 12:1-11.
5. Zeng Y, Huang S, Ren Z, Li H. Identification of Hb D punjab gene: application of DNA ampliftcation in the study of abnormal hemoglobins. Am J Hum Gene! 1989; 44:688-9.

6. Zago MA, Costa FF. Hb D-Los Angeles in Brazil: simple heterozygotes and associations with B-thalassaemia and with Hb S. *Hemoglobin* 1988; 12(4):399-403.
7. Benzer S, Ingram WM, Lehman H. Three variants of human haemoglobin D, *Nature* 1958; 182:852-4.
8. Özsoylu Ş, homozygous Hb D. Punjab. *Acta Haematol* 1970; 43:353-9.
9. Çavdar AO, Arcasoy A. Hb D Punjab-Alpha Thalassaemia combination in a Turkish Family. *Scand J Haemat* 1974; 13:313-9.
10. Yalçın A, Gürgey A, Gürbüz A, Aıtay C. Momozigot Hb D Punjab hastalığı olgusu. *Hematoloji Kongresi El Kitabı* 1986; 222-5.
11. Canatan D, Akar N, Arcasoy A. Hb D Los Angeles/B+İVS-1 # 110 (G-A) combination in a Turkish woman. *Doğa-Tr.J. of Medical Sciences* 1992; 16:585-6.
12. Efremov GD, Duma H, Ruvic R, Roiovsc Z, Wilson **JB**, Huisman THJ. Hemoglobin Beograd. *Biecheim Biophys Acta* 1973; 328:81-3.
13. Aksoy M, Kutlar A, Kutlar F, Dinçol G, Erdem Ş, Wilson JB, Huisman THJ. Hemoglobin Beograd-B° thalassaemia in a Turkish family from Yugoslavia. *Hemoglobin* 1984; 2:417.
14. Kantchev KN, Tcholakov B, Bagiiioni C, Colomba B. Haemoglobin O-Arab Bulgaria. *Nature* 1965; 205:187-8.
15. Prozorova-Zamani V, Özsoylu Ş, Aksoy M, et al. Hb E and Hb E iike variants in individuals from Turkey. *Hemoglobin* 1981;5:743-8.
18. Cin Ş, Akar N, Arcasoy A, Çavdar AO, Dedeoğlu S. Haemoglobin O-Arab (B 121 Glu-Lys) in Turkish Cypriot population. *J Med Genet* 1984; 21 (2): 158.
17. Cin Ş, Akar N, Arcasoy A, Çavdar AO. Abnormal hemoglobins in Turkish Cypriots. *Hemoglobin* 1988; 12(4):423-5.
18. Altay Ç, Gürgey A, Huisman THJ. Homozygosity for hemoglobin O Arab. *Turk J Pediatr* 1986; 28:67.
19. Aksoy M, Kutlar A, Kutlar F, Dinçol G, Erdem Ş, Baştesbihci Ş, Survey on haemoglobins variants, B thalassaemia, G6PD deficiency and haptoglobin types in Turks from western thrace. *J Med Genet* 1985; 22:288-91.
20. Aksoy M, Pala Ö, Say A, Erçil G. Sickle-cell Hb O Arab disease in a Turkish family from western thrace. In: Aksoy M, Huisman THJ, eds. North Cyprus symposium on abnormal hemoglobins and thalassaemia 10-11 October 1983 Girne, Cyprus. Ankara: TÜBİTAK Publ 1984; 605:89-92.
21. Abourzik NN, Conion M, Zordon G, Hine TK, Johnson MH, Jue DL, Moo-Penn WF. Hb St. Francis [B 121 (GH4) Glu-Gly] A new mutation at the same site as Hb D-Los Angeles. *Hemoglobin* 1991; 15(142) 115-7.