



Malatya'da Beta-Talasemi Mutasyonları

Gonca Gülbay*, Elif Yeşilada*, İsmet Aydoğdu**, Ünsal Özgen***, Gonca Otlu*

* İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, Malatya

** Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Konya

*** İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Malatya

Beta-talasemi, beta-globin genindeki yaklaşık 200 farklı mutasyon nedeni ile ortaya çıkan en yaygın otozomal resesif hastalıklardan biridir. Çalışmamızda beta-talasemi tanısı ile refere edilen 38 olgunun beta-globin geninde en yaygın mutasyonlar (-87 (C>G), -30 (T>A), Cd 5 (-CT), hemoglobin C (HbC), hemoglobin S (HbS), Cd 6 (-A), Cd 8 (-AA), Cd 8/9 (+G), Cd 22 (7bp del), Cd 30 (G>C), IVS 1.1 (G>A), IVS 1.2 (T>A), IVS 1.5 (G>C), IVS 1.6 (T>C), IVS 1.110 (G>A), IVS 1.116 (T>G), IVS 1-25 (25bp del), Cd 36/37 (-T), Cd 39 (C>T), Cd 44 (-C), IVS 2.1 (G>A), IVS 2.745 (C>G)) araştırılmıştır. Çalışılan olguların 32 (%84.2)'sinde beta-globin geni mutasyonları gözlenmiştir. Bunlar arasında 6 hastanın beta-globin geni mutasyonları bakımından homozigot olduğu belirlenirken; 26 hastanın ise test edilen mutasyonlardan yalnızca birini taşıdığı bulunmuştur. Çalışmamızın sonuçlarına göre; IVS 1.110 (G>A) mutasyonu, Türkiye'nin diğer bölgelerinde olduğu gibi en yaygın mutasyon olarak belirlenmiştir. Homozigot veya heterozigot hastalarda IVS 1.110 (G>A), IVS 1.1 (G>A), IVS 2.1 (G>A), Cd 8 (-AA) ve Cd 8/9 (+G) mutasyonlarının frekansları sırası ile %47.4, %15.8 ve %7.9'dur. Cd 44 (-C) mutasyonu %5.3 olarak belirlenirken Cd 5 (-CT), Cd 22 (7bp del) ve Cd 44 (-C) mutasyonları nadir rastlanan mutasyonlar olarak tanımlanmıştır. Sonuç olarak başlangıç niteliğinde olan çalışmamız, Malatya'daki beta-talasemi mutasyonlarının heterojen yapıda olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Beta-Talasemi, Beta- Globin Geni, Mutasyon

Beta-Thalassemia Mutations in Malatya

Beta-Thalassemia is a common autosomal recessive disorder resulting from over 200 different mutations of the beta-globin genes. In this study, the most prevalent beta globin gene mutations (-87 (C>G), -30 (T>A), Cd 5 (-CT), hemoglobin C (HbC), hemoglobin S (HbS), Cd 6 (-A), Cd 8 (-AA), Cd 8/9 (+G), Cd 22 (7bp del), Cd 30 (G>C), IVS 1.1 (G>A), IVS 1.2 (T>A), IVS 1.5 (G>C), IVS 1.6 (T>C), IVS 1.110 (G>A), IVS 1.116 (T>G), IVS 1-25 (25bp del), Cd 36/37 (-T), Cd 39 (C>T), Cd 44 (-C), IVS 2.1 (G>A), IVS 2.745 (C>G)) were analyzed for 38 cases referred to our department with the diagnosis of beta-thalassemia. Of these cases, 32 (84.2%) were identified with beta globin gene mutation. Among those, 6 patients were found to be homozygote for beta globin gene mutations; 26 patients were heterozygous. According to our results; the IVS 1.110 (G>A) is the most frequent mutation type in our province the same as other geographical regions of Turkey. The most frequent mutations in heterozygous or homozygous patients were IVS 1.110 (G>A), IVS 1.1 (G>A), IVS 2.1 (G>A), Cd 8 (-AA) and Cd 8/9 (+G), comprising 47.4%, 15.8% and 7.9% of the alleles, respectively. THA CD 44 (-C) mutation accounted for 5.3% of the alleles only and Cd 5 (-CT), Cd 22 (7 bp del) and Cd 39 (C>T) mutations were rarely determined.

In conclusion, our preliminary results show the heterogeneity of the beta-thalassemia mutations in Malatya.

Key Words: Beta-Thalassemia, Beta-Globin Gene, Mutation

Giriş

Globin zincirinin yapımının azalmasına ya da yapılamamasına bağlı olarak ortaya çıkan talasemiler oldukça geniş bir genetik yelpazeyi kapsar. En sık görülen tipleri alfa (α) ve beta (β) talasemilerdir. Beta-talasemi, Türkiye ve diğer birçok Akdeniz ülkesinde sıklıkla gözlenen tek gen hastalıklarından olup, hemolitik anemi ve mikrositoz ile karakterize otozomal resesif geçiş gösteren bir hastalıktır.^{1,2}

Tetramerik bir protein olan insan erişkin hemoglobininin beta zincirine şifre veren beta-globin geni, 11. kromozomun kısa kolu üzerinde (11p 15.5), beta-globin gen kümesi içinde yer almaktadır. 3 ekson, 2 intron ile 5' ve 3' düzenleyici bölgelerden oluşan bu gendeki mutasyonlar orak hücreli anemi, beta-talasemi ya da diğer bir anormal hemoglobine neden olmaktadır.³

Günümüzde beta-globin geninde 200 den fazla mutasyonun bulunduğu belirtilmektedir. Beta-talasemi mutasyonları oldukça çeşitlidir ve genin değişik bölgelerine yayılmıştır. Bu mutasyonlar promotör bölge mutasyonları, RNA işleme (splicing) mutasyonları,

Başvuru Tarihi: 18.11.2009, Kabul Tarihi: 18.01.2010

mRNA'nın 5' ucuna kep ve 3' ucuna poli A kuyruğunun eklenmesi ile ilişkili mutasyonlar, dur kodonuna neden olan nonsens mutasyonlar ya da çerçeve kayması mutasyonları olarak sınıflandırılabilir. Beta-talasemide genin büyük bir kısmının kaybına neden olan mutasyonlar nadirdir. Beta-talasemi major, mutant bir beta-globin alleli için homozigot veya birleşik heterozigot olan bireylerde gözlenir. Hastalığın hafif bir formu olan beta-talasemi minorlül bireyler ise mutant allel bakımından heterozigottur. Türk halkında tanımlanan 40'dan fazla mutasyon vardır. Bunlar arasında en yaygın 7 mutasyon (IVS 1.110, IVS 2.1, kodon 8, IVS 1.1, IVS 2.745) tüm mutasyonların yaklaşık %72'sini oluşturmaktadır.^{4,5}

Beta-talasemi taşıyıcılığı ülkemizde %2 olarak verilmekte ancak bu oran bazı yörelerimizde %10'a kadar çıkmaktadır.^{6,7} Akriba evliliğinin sıklığı ve doğum hızının yüksekliği ülkemizde beklenenin de üzerinde beta-talasemili çocuk doğumuna neden olmaktadır.

Beta-globin gen mutasyonlarının ortaya çıkarılması, beta-talaseminin erken prenatal tanısını ya da heterozigot bireyleri içeren taşıyıcıların belirlenmesi ve tedavi projeleri için gereklidir. Bu amaçla günümüzde oligonükleotid hibridizasyonu, restriksiyon endonükleaz analizi, allele özgü primer analizleri (ARMS) tekniği ve beta-globin geninin DNA dizi analizi gibi doğrudan polimeraz zincir reaksiyonuna dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar arasında son yıllarda güvenilirliği kanıtlanan ve diğer yöntemlere kıyasla çeşitli avantajlar sunan oligonükleotid hibridizasyonunu içeren *β-globin* StripAssay kiti sıklıkla kullanılmaktadır.^{6,7}

Bu çalışmada Malatya İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezi'nde teşhis ve tedavisi yapılmakta olan beta-talasemi hastalarının beta-globin geninde taşınan mutasyonlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu amaçla laboratuvara gelen hasta kan örnekleri beta-globin geninde rastlanan en yaygın 22 mutasyon (-87 (C>G), -30 (T>A), kodon 5 (-CT), hemoglobin C (HbC), hemoglobin S (HbS), kodon 6 (-A), kodon 8 (-AA), kodon 8/9 (+G), kodon 22 (7bp del), kodon 30 (G>C), IVS 1.1 (G>A), IVS 1.2(T>A), IVS 1.5 (G>C), IVS 1.6 (T>C), IVS 1.110 (G>A), IVS 1.116 (T>G), IVS 1-25 (25bp del), kodon 36/37 (-T), kodon 39 (C>T), kodon 44 (-C), IVS 2.1 (G>A), IVS 2.745 (C>G)) bakımından taranmıştır.

Gereç ve Yöntem

Çalışma grubumuz İnönü Üniversitesi Turgut Özal Tıp Merkezine başvurmuş ve beta-talasemi tanısı almış hastalar arasından akrabalıkları olmayanlardan seçilmiştir.

Beta-talasemi minor olan ve heterozigot genotipte olması beklenen bireylerde çalışmaya dahil edilme kriteri olarak HbA düzeyinin %95.5'in altında; HbA2 düzeyinin % 3,5'in ve/veya HbF düzeyinin %1'in üzerinde olması dikkate alınmıştır.

Çalışmaya alınan ve 1-50 yaş aralığında olan 6 major ve 32 minor hastanın olası beta-globin gen mutasyonlarını taramak için EDTA'lı tüplere kan örnekleri alınmıştır.

Çalışmalarda pratik ve güvenilir bir çalışma olanağı sağlayan ters hibridizasyon yöntemini temel alan *β-globin* StripAssay kiti (ViennaLab) kullanılmıştır.

Bu yöntem beş aşamadan oluşmaktadır. Bu aşamalarda sırası ile aşağıdaki işlemler yapılmıştır. (a) Kan örneklerinden standart yöntem ile DNA izole edilmiştir, (b) *in vitro* multipler amplifikasyon (multiplex PCR)'un ardından (c) %2 lik agaroz jelde 251, 596, 738 bp bantların gözlenmesi ile multipler PCR kontrol edilmiştir. Daha sonra (c) 12 tane wild-type (normal) ve 22 tane de mutant-spesifik immobilize oligonükleotid problemlerini taşıyan bir test şeridine amplifikasyon ürünlerinin hibridizasyonu sağlanmıştır. Hibridizasyon sonrasında (e) streptavidin alkalen fosfat kullanılarak ilgili gen dizilerine ait bantların renk gelişiminin gözlenmesi ile sonuçlar analiz edilmiştir.

Bulgular

Beta-talasemi ön tanısı ile refere edilen 38 olgunun 32'sinde mutasyon belirlenmiştir (% 84.2). Mutasyonlar çeşitlilik göstermektedir. Beta-talasemi major tanısı olan 4 birey IVS 1.110 (G>A) ve 2 birey de IVS 1.1 (G>A) bakımından homozigot bulunmuştur. Beta-talasemi minor olarak refere edilen bireyler ise IVS 1.110 (G>A) (N=10), IVS 2.1 (G>A) (N=3), IVS 1.1 (G>A) (N=2), Cd 8 (-AA) (N=3), Cd 8/9 (+G) (N=3), Cd 5 (-CT) (N=1), Cd 22 (7 bp del) (N=1), Cd 39 (C>T) (N=1), Cd 44 (-C) (N=2) mutasyonları bakımından heterozigot olarak tanımlanmıştır.

Klinik olarak beta-talasemi minör tanısı olan 6 olguda ise çalışma kapsamımızda bulunan hiçbir mutasyona rastlanmamıştır. Beta-talasemi ön tanılı hastalarda beta-globin genotipleri Tablo 1'de verilmiştir. Beta-globin mutasyonlarını homozigot ya da heterozigot olarak taşıyan olgularda (N=32) beta-talasemi allellerinin frekansı ise Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tartışma ve Sonuç

Günümüzde beta-globin geninde tanımlanmış olan yaklaşık 200 mutasyon vardır. Bu geniş çeşitliliği biraz basite indirgeyen bir faktör, tüm mutasyonların her toplumda görülmemesi mutasyonların etnik gruplara özgü olmasıdır. Genelde bir toplumda belirlenen az

Malatya’da Beta-Talasemi Mutasyonları

sayıdaki mutasyon o toplumdaki tüm mutant beta-globin genlerinin %90-95’ini oluşturmaktadır. Türkiye’de moleküler genetik temele dayalı çalışmaların başlaması beta-talasemi araştırmalarına önemli katkılar sağlamıştır. Bu çalışmalarda, Türk toplumunda beta-talaseminin genetik temelini diğer popülasyonların aksine oldukça heterojen olduğu belirlenmiştir.⁴⁻¹⁴

Bu çalışma Malatya yöresinde beta-talasemi mutasyonlarının belirlenmesine yönelik olan ilk çalışma olup çeşitli araştırmacılar tarafından ülkemizde sıklıkla rastlandığı belirtilen 22 mutasyonu kapsamaktadır. Çalışma sonucunda 9 farklı beta-globin geni mutasyonu (IVS 1.110 (G>A), IVS 2.1 (G>A), IVS 1.1 (G>A), Cd

Tablo 1. Çalışma kapsamında bulunan mutasyonlar bakımından tüm olgulardaki beta-globin geni genotipleri.

Genotipler		Hasta Sayısı
Kromozom 1	Kromozom 2	
IVS 1.110 (G>A)	IVS-1-110 (G>A)	4
IVS 1.1 (G>A)	IVS-1-1 (G>A)	2
IVS 1.110 (G>A)	wt ^a	10
IVS 1.1 (G>A)	wt	2
IVS 2.1 (G>A)	wt	3
Cd 8 (-AA)	wt	3
Cd 8/9 (+G)	wt	3
Cd 5 (-CT)	wt	1
Cd 22 (7 bp del)	wt	1
Cd 39 (C>T)	wt	1
Cd 44 (-C)	wt	2
wt	wt	6
Toplam		38

^awt, yabancı tip, normal allel

Tablo 2. Belirlenen beta-globin gen mutasyonlarını taşıyan kromozomların frekansı

Mutasyon Tipi	Kromozom	
	Sayısı	%
IVS 1.110 (G>A)	18	47.4
IVS 1.1 (G>A)	6	15.8
IVS 2.1 (G>A)	3	7.9
Cd 8 (-AA)	3	7.9
Cd 8/9 (+G)	3	7.9
Cd 44 (-C)	2	5.3
Cd 5 (-CT)	1	2.6
Cd 22 (7 bp del)	1	2.6
Cdon 39 (C>T)	1	2.6
Toplam	38	100

8 (-AA), Cd 8/9 (+G), Cd 5 (-CT), Cd 22 (7 bp del), Cd 39 (C>T), Cd 44 (-C)) belirlenmiştir.

Çalışmamızda en sık rastlanan mutasyon IVS 1.110 (G>A) olup, tüm mutant allellerin %47.4’nü oluşturmaktadır.

Ayrıca çalışma grubu içerisinde bu mutasyonu taşıyan 4 homozigot ve 10 heterozigot birey bulunmaktadır. Bu mutasyonun Akdeniz’in doğusunda baskın olan bir mutasyon olduğu belirtilmektedir.

Daha önce yapılan birçok çalışmada da ülkemizde en fazla gözlenen mutasyon olduğu rapor edilmektedir. Bu mutasyon farklı bölgelerimizi kapsayan çeşitli çalışmalarda %21.1-60 arasında değişen oranlarda rapor edilmektedir.⁴⁻¹⁴

Çalışmamızda %15.8 ile ikinci sıklıkta olan IVS 1.1 (G>A) mutasyonu için çalışma grubumuzda 2 homozigot ve 2 de heterozigot birey belirlenmiştir. Bu mutasyon Ülkemizin farklı bölgelerinde yapılan çalışmalarda %2.58-28.2 arasında değişen oranlarda belirlenmiştir.^{6,9,10,12-14}

IVS 2.1 (G>A), Cd 8 (-AA) ve Cd 8/9 (+G) mutasyonlarına ise çalışmamızda aynı sıklıkta (%7.9) rastlanmıştır. Bunlardan IVS 2.1 mutasyonunun Türkiye’de bulunan sıklığı çeşitli araştırmalarda %2.7-11.6^{6,9,12,14} ve Cd 8 mutasyonunun ise %3.87-8.4¹²⁻¹⁴ arasında değiştiği belirtilmektedir. Cd 8 mutasyonunun Akdenizlilerde, Cd 8/9 mutasyonunun ise özellikle Çin, Hindistan ve İran’da yaygın bir mutasyon olduğu belirtilmektedir.^{4,13} Cd 8/9 mutasyonunun ülkemiz için sıklığının farklı bölgelerde yapılan çalışmalarda % 0-5.1 arasında değiştiği belirtilmektedir.^{6,13,14}

Çalışmamızda heterozigot genotipte olan iki olguda rastladığımız Cd 44 (-C) mutasyonunun sıklığı 5.3 olarak hesaplanmıştır. Bu mutasyonun farklı bölgelerimizdeki çalışmalarda belirlenen sıklığı %1.7-3 arasında değişmektedir.^{7,13,14}

Cd 5 (-CT), Cd 22 (7 bp del) ve Cd 39 (C>T) mutasyonları % 2.6 sıklıkta olmak üzere heterozigot genotipte olan birer olguda belirlenmiştir. Cd 5 mutasyonunu Tadmouri ve arkadaşları Akdeniz bölgesini kapsayan çalışmalarında % 3.3 sıklıkta rapor etmişlerdir.¹⁵ Cd 39 mutasyonu çeşitli çalışmalarda 1.29-9.1 arasında değişen frekanslarda rapor edilmektedir.^{6,9,12-14}

Ülkemiz genelinde %3.8 frekansla rapor edilen bu mutasyonun Yunanistan, Bulgaristan ve Romanya gibi Balkan ülkelerinden köken aldığı belirtilmektedir.¹³ Çalışmamızda bir olguda rastlanan bu mutasyonu

taşıyan kişi ile yapılan görüşmelerde Ülkemizin güneybatı bölgesinden olduğu öğrenilmiştir.

Çalışma kapsamımız içerisinde bulunmasına rağmen -30, -87, hemoglobin S, hemoglobin C, Cd 30, IVS 1.116, IVS 1-25, Cd 36/37, IVS 2.745 mutasyonlarına olgularımızda rastlanmamıştır. Bu mutasyonlardan IVS 1.6 ülkemizde sıklıkla rastlanan mutasyonlardan biri olarak refere edilmektedir.¹³ Ayrıca bazı araştırmacılar^{8,13,16} tarafından değişen oranlarda rapor edilen -290 bp del, poly A (TAA>TGA), Cd -74/75 (-C), IVS 2.848 (C>A), -101,-28, Cd 15, Cd 27, 3'UTR (-13bp), Cd 22-24 (-7bp), IVS 1.130 mutasyonları çalışma kapsamımızda bulunmamaktadır.

Bu konu ile ilişkili olarak talasemi minor tanısı almış ve çalışma grubumuza dahil edilmiş olan 6 olguda yukarıdaki olası mutasyonların biri ya da farklı bir mutasyonun varlığı söz konusu olabilir. Bu hastalarda β-globin geni için DNA dizi analizinin yapılması olası diğer mutasyonların taranması açısından yararlı olacaktır.

Böyle çalışmalar özellikle belirgin klinik öyküsü olmayan beta-talasemi minor hastaların belirlenmesini sağlayacaktır. Böylece akraba evliliklerinin yaygın olduğu bölgemizde olası riskler anlatılarak bu durumdaki ebeveynlerin prenatal tanıya yönlendirilmesi beta-talaseminin önlenmesi bakımından önemlidir.

Teşekkür

Bu çalışma İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından desteklenmiştir.

Kaynaklar

1. Tüzmen Ş, Schechter AN. Genetic diseases of hemoglobin: Diagnostic methods for elucidating β- thalassemia mutations. *Blood Reviews* 2001;15: 19-29.
2. Kazazian HH, Boehm C. Molecular basis and prenatal diagnosis of β-thalassemia. *Blood* 1988;72:1107-16.
3. Günçag D. Hemolitik Anemiler. *Klinik Hematoloji*. Dinçol G, Pekçelen Y, Atamer T, Sargın D, Nalçacı M, Aktan M, Besisik SK (editör) İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi 2003; s: 87-152.

4. <http://www.hemoglobin.org.tr/bilgi/kitap/hemokitap4.asp>
5. Tadmouri GO, Başak AN. β- Thalassemia in Turkey: A Review of the Clinical, epidemiological, Molecular and Evolutionary Aspects. *Hemoglobin* 2001; 25(2):227-34.
6. Yıldız S, Atalay A, Bağcı H, Atalay EÖ. Beta-thalassemia mutations in Denizli province of Turkey. *Turk J Hematol* 2005; 22: 19-23.
7. Keser İ, Manguoğlu E, Kayışlı ÖG, et al. Prenatal diagnosis of β-thalassemia in the Antalya Province. *Turk J Med Sci* 2005; 35: 251-253.
8. Basak AN. Talasemi Moleküler Genetiği. Türk Hematoloji Derneği Temel Moleküler Hematoloji Kursu 12-13 Mart 2005; 99-106.
9. İnce HH, Ayyıldız O, Kalkanlı S, et al. Moleküler basis of beta-thalassemia mutations in Diyarbakır in the southeastern region of Turkey. *Hemoglobin* 2003; 27(4): 275-8.
10. Keser I, Şanlıoğlu AD, Manguoğlu E, et al. Molecular Analysis of Beta Thalassemia and Sickle Cell Anemia in Antalya. *Acta Haematologica* 2004; 111: 2005-10.
11. Tadmouri GO, Bilenoğlu O, Kutlar F, et al. Identification of the Chinese IVS-II-&54 (C>T) beta-thalassemia mutation in an immigrant Turkish family: recurrence or migration. *Hum Biol* 1999; 71(2): 295-302.
12. Çürük MA, Arpacı A, Atilla G, et al. Genetic Heterogeneity of β-thalassemia at Çukurova in Southern Turkey. *Hemoglobin* 2001;25(2): 241-5.
13. Tadmouri GO, Tuzmen S, Özçelik H et al. Molecular and Population Genetic Analyses of β -Thalassemia in Turkey. *AmuJ Hematol* 1998; 57: 215-20.
14. Cüre MC. İsparta ve Çevresindeki Beta-Talasemi Kalıtsal Mutasyonlarının Dağılımının Araştırılması. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Uzmanlık Tezi. 2008.
15. Tadmouri GO, Garguier N, Demont J, et al. History and Origin of β-talassemia in Turkey: sequence haplotype Diversity of β-Globin Genes. *Human Biology* 2001; 73(5): 661-74.
16. Kese İ, Manguoğlu E, Kayışlı ÖG, Kurt F, et al. Prenatal Diagnosis of β -Thalassemia in the Antalya Province. *Turk J Med Sci* 2005; 35: 251-3.

İletişim Adresi

Doç.Dr. Elif YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi, Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı, MALATYA
Tel: 0422 341 06 60 (12 47)
Cep: 0 533 422 05 37
E-Mail: eyesilada@inonu.edu.tr