

Çukurova Bölgesinde İlk Defa Saptanan Hb Hamadan ($\beta 56$ GGC→CGC, (D7) Gly→Arg) Mutasyonunun Mikroarray Yöntemiyle Tanımlanması

[Identification of Hb Hamadan Mutation ($\beta 56$ GGC→CGC, (D7) Gly→Arg) which was detected in Çukurova Region for the First Time with Microarray Method]

¹Sedefgül YÜZBAŞIOĞLU
ARIYÜREK,

²Şule MENZİLETOĞLU YILDIZ,

¹Kıymet AKSOY

¹Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya
Anabilim Dalı, 01330 Balcalı, Adana/Türkiye
²Çukurova Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek
Yüksek Okulu, 01330 Balcalı, Adana/Türkiye

Yazışma Adresi

[Correspondence Address]

Sedefgül YÜZBAŞIOĞLU ARIYÜREK

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya
Anabilim
Dalı, 01330 Balcalı, Adana/Türkiye
Tel: 0 322 338 60 60/3466/3470
E-posta: syuzbasioglu@cu.edu.tr

Kayıt Tarihi: 10 Şubat 2009; Kabul Tarihi: 1 Eylül 2009

[Registered: 10 February 2009; Accepted: 1 September 2009]

ÖZET

Beta globin geninin 56.cı kodonunda GGC→CGC değişimi sonucunda glisin yerine arjinin amino asiti geçmekte ve hemoglobin Hamadan ortaya çıkmaktadır. Bugüne kadar Türkiye’de en yaygın olarak gözlenen HbS mutasyonu yanında nadir olarak gözlenen ve klinik olarak herhangi bir bulgu göstermeyen Hb Hamadan gibi 49 anormal hemoglobin mutasyonu bildirilmiştir. Bu çalışmada dizi analizi ile anormal hemoglobin olduğu belirlenen olgunun mutasyona neden olan baz değişimi kullanılarak ilk defa Nanogen mikroarray aleti için Hb Hamadan mutasyonuna özgü tanımlayıcı tasarımı yapılmıştır. Tasarlanan tanımlayıcılar sayesinde heterozigot ve IVS I-110 ile kombine olan Hb Hamadan mutasyonu belirlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Hemoglobin Hamadan, mikroarray, tanımlayıcı tasarımı

ABSTRACT

Hemoglobin Hamadan is the result of a glycine to arginine change due to GGC→CGC mutation at codon 56 of the beta globin gene. Until today, together with HbS which is the most common mutation in Turkey, forty nine abnormal hemoglobin mutations have been reported such as rarely observed Hb Hamadan which does not show any clinical symptom. In this study, for the first time, we designed a reporter to Hb Hamadan for Nanogen microarray instrument, by using the base change causing to the mutation of a case which was determined to have an abnormal hemoglobin by sequence analysis. Heterozygous Hemoglobin Hamadan and Hemoglobin Hamadan combined with IVS I-110 mutation was found by using the designed reporter.

Keywords: Hemoglobin Hamadan, microarray, probe design

Giriş

Dünya genelinde olduğu gibi ülkemizde de en yaygın olarak gözlenen Hb S'in yanı sıra diğer anormal hemoglobinlerden Hb D, Hb E ve Hb C de gözlenmektedir (1). Kılınç çalışmasında Çukurova'da en yüksek oranda görülen HbS mutasyonu sıklığının %3-47 arasında değiştiğini rapor etmiştir (2). Türkiye'de bugüne kadar yaygın olarak görülen mutasyonların yanısıra nadir ve ilk defa belirlenen 40'dan fazla anormal hemoglobin tipi tanımlanmıştır. Altay çalışmasında 14 α , 25 β ve 1 γ globin zincir mutasyonu ile oluşan ve 2 de hibrit hemoglobin olmak üzere toplam 42 anormal hemoglobin rapor etmiştir (3). Akar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise bunlara ek olarak 2002 yılından sonra Türkiye'de 2 α , 4 β ve 1 δ globin zinciri mutasyonu sonucu oluşan anormal hemoglobin tipleri bildirilmiştir (4). Nadir görülen bir mutasyon olan Hb Hamadan Türkiye'de ilk defa Dinçol ve arkadaşları tarafından Batı Trakya'lı bir erkek olguda bildirilmiştir (5) ve bu hemoglobin tipi beta globin geninin 56.cı kodonunda GGC→CGC değişimi sonucu (D7) Gly→Arg değişimi nedeniyle ortaya çıkmaktadır (6). Akar ve arkadaşlarının 2003 yılında Ege Bölgesi'nde yaptıkları çalışmada dizi analizi ile belirledikleri Hb Hamadan mutasyonunu restriksiyon enzim kesimi ile de göstermişlerdir (7). Bu çalışmada doğum öncesi tanı merkezimize başvuran bir ailede HPLC ile anormal hemoglobin varlığı belirlenmiştir ve dizi analizi ile bu anormal hemoglobinin Hb Hamadan olduğu saptanmıştır. Bunun üzerine hızlı ve güvenilir bir yöntem olan mikroarray için tanımlayıcı tasarımı yapılmış ve yöntem geliştirilmiştir. Tasarlanan tanımlayıcılar kullanılarak heterozigot ve IVS I-110 ile kombine olan Hb Hamadan olguları saptanmıştır.

Hasta ve Yöntem

Doğum öncesi tanı merkezine başvuran aileden EDTA'lı tüplere alınan tam kan örneklerinde kan sayımı Coulter Counter T890 ile yapıldı. Hemoglobin tiplendirmesi HPLC ile yapıldı. MagnaPure otomatik DNA izolasyon aleti ile elde edilen DNA'lar moleküler analizler için kullanıldı. IVS I-110 mutasyonu ARMS yöntemi ile belirlendi (8). Applied Biosystem otomatik dizi analizörü ile Hb Hamadan mutasyonu belirlendi. Mikroarray cihazı için mutasyonlara özgü tanımlayıcı tasarımı yapıldı (9). Hb Hamadan ve IVS I-110 mutasyonlarına özgü tanımlayıcılar kullanılarak mikroarray cihazı ile de bu mutasyonlar tanımlandı.

Tablo 1. Olguların hematolojik verileri

Olgu	Yaş	RBC (10 ¹² /L)	Hb (g/dl)	Hct (%)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	Hb Hamadan %	HPLC Hb A	Hb A ₂ %	Hb F %	Hb Diğer %
Anne	25	4.39	12.1	35.7	81.5	27.6	33.8	46	45	2.3	0.7	6
Baba	31	7.06	13.7	43.6	61.7	19.4	31.4	79	12	2.3	1.5	5.2
Çocuk	3	6.17	11.0	35.5	57.6	17.9	31.1	78	12	2.4	0.8	6.8

Mikroarray İçin Mutasyona Özgü Tanımlayıcı Tasarımı

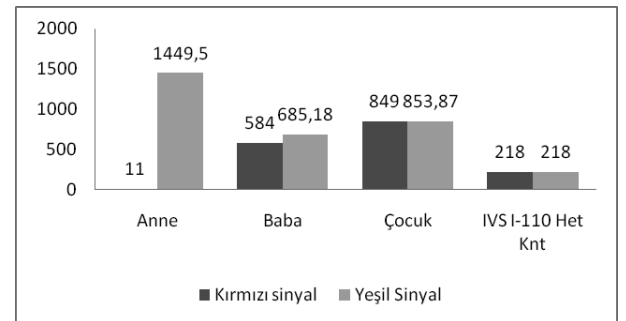
İnsan β globin geni üzerinde IVS I-110 ve Hb Hamadan mutasyonlarının bulunduğu gen bölgeleri sırasıyla 5'GTTACAAGACAGGTTTAAGGAGACC3' ve 5'GCAGCTCACTCAGTGTGGC3' ile 5'GACAGGTACGGCTGTCATCACT3' ve 5'TCTCTGTCTCACATGCCCA3' bölgesine özgü primer çiftleri kullanılarak gen parçası çoğaltıldı. Tanımlayıcının işaretleyici parçası için her iki mutasyon noktasından 3'→5' yönünde tasarım yapıldı. Mutantlar kırmızı normaler yeşil floresan işaretli olmak üzere IVS I-110 mutant allel için 3'TTA TCT GAT TAT5', normal allel için 3'TTA TCT GGT TAT5' ve Hb Hamadan mutant allel için 3'GCG TTG GGA TTC5', normal allel için 3'CCG TTG GGA TTC5' olarak işaretleyiciler belirlendi. Mutasyon noktasının ampikon üzerinde saç tokası (hairpin) yapısının içinde kalmaması için sabitleyici olarak IVS I-110 ve Hb Hamadan için sırasıyla 5'AGACTCTGGGTTTCTGATAGGCACTGACT3' ve 5'CAT AAC AGC ATC AGG AGT GGA CAG ATC CCC AAA GGA3' dizileri belirlendi.

Bulgular

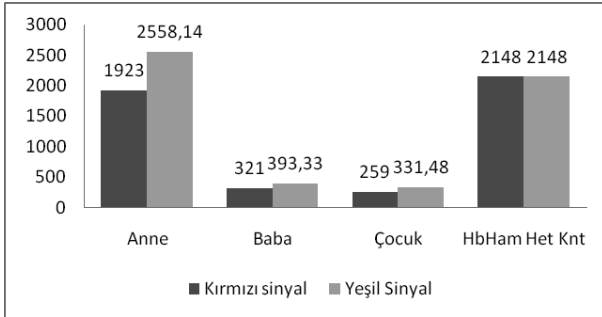
Olguların hematolojik verileri Tablo 1'de verilmiştir. Annenin HPLC ile Hb Hamadan oranının %46 ve MCV değerinin normal olduğu gözlenmiştir. Mikroarray cihazı ile Hb Hamadan taşıyıcısı olduğu teyit edilmiştir. Baba ve çocuğun Hb Hamadan oranları sırasıyla %79 ve %78, MCV değerlerinin ise 80 fl'nin altında olduğu gözlenmiştir.

Mikroarray analizi sonucunda baba ve çocuğun Hb Hamadan ile kombine olarak IVS I-110 mutasyonu içerdikleri saptanmıştır (Şekil 1,2).

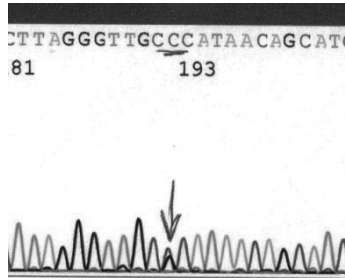
Mikroarray analizinin sonucu dizi analizi ve ARMS yöntemleri ile de teyit edilmiştir (Şekil 3,4).



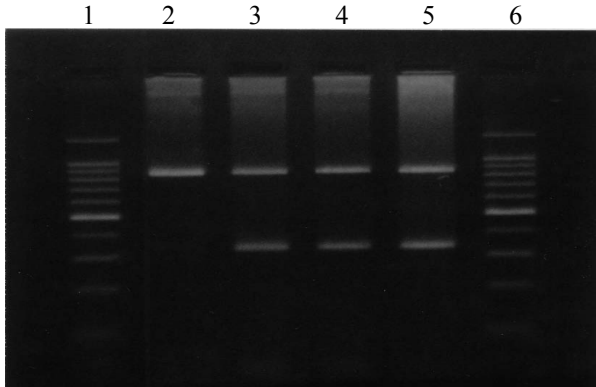
Şekil 1: Mikroarray analizinde IVS I-110 tanımlayıcısı ile alınan sinyallerin bar grafiği (IVS I-110 Het Knt: IVS I-110 heterozigot kontrol, Kırmızı sinyal: Mutant allelden alınan sinyal ve değeri, Yeşil sinyal: Normal allelden alınan sinyal ve değeri gösterir).



Şekil 2: Mikroarray analizinde Hb Hamadan tanımlayıcısı ile alınan sinyallerin bar grafiği (Hb Ham Het Knt: Hb Hamadan heterozigot kontrol, Kırmızı sinyal: Mutant allelden alınan sinyal ve değeri, Yeşil sinyal: Normal allelden alınan sinyal ve değeri gösterir).



Şekil 3: Hb Hamadan mutasyonunun otomatik dizi analizi sonucu



Şekil 4: ARMS ile IVS I-110 mutasyonunun %2'lik agaroz jel görüntüsü (1:DNA ladder , 2:Anne, 3:Baba, 4:Çocuk, 5:(+)Kontrol, 6:DNA ladder)

TARTIŞMA

Türkiye kıtalar arası coğrafi konumu nedeni ile tarihten günümüze kadar pek çok etnik grubun birbiriyle kaynaştığı önemli bir noktada yer almaktadır. Gen çeşitliliği fazla olan Türkiye'de en yaygın olarak görülen anormal hemoglobin HbS olmakla birlikte nadir olarak görülen 49 tane anormal hemoglobin tipi belirlenmiştir (3,4). Bu mutasyonların belirlenmesinde çoğunlukla dizi analizi yöntemi ve bunun yanında ARMS, RFLP ve globin zincir sentezi gibi çeşitli geleneksel moleküler analiz yöntemleri kullanılmıştır (7).

Tarama çalışmalarında mutasyonların belirlenmesi için kullanılan geleneksel yöntemlerin yanı sıra yeni teknolo-

jilerden faydalanılan yöntemler geliştirilmektedir (10). Hızlı ve güvenilir bir yöntem olan mikroarray ile çok sayıda örneğin kısa zamanda mutasyon tarama analizlerinin yapılabilmesi için tanımlayıcı tasarımlarının yapılması gerekmektedir. Dizi analizi ile anormal hemoglobin mutasyonu belirlenen örnekler kullanılarak ilk defa Hb Hamadan ve IVS I-110 mutasyonlarına özgü tanımlayıcı tasarımı yapılmış ve yöntem geliştirilmiştir. Bugüne kadar β talasemiye neden olan 200'den fazla beta globin geni mutasyonu tanımlanmış olup ülkemizde 30'dan fazla tipine rastlanmıştır ve Türkiye'de en sık rastlanan mutasyon ise IVS-I-110'dur (11). Yüregir ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada Çukurova bölgesi için β talasemi sıklığını %3,5 ve en yaygın mutasyon tipinin de IVS I-110 olduğunu bildirmişlerdir (12,13).

Hb Hamadan daha önce İran, Fransa, Japonya ve Türkiye'de birkaç ailede bildirilmiştir (5-7). Türkiye'de ilk olarak 1984 yılında Dinçol ve arkadaşları tarafından heterozigot bir olguda tanımlanmıştır (5). Akar ve arkadaşları 2003 yılında -29 G→A β talasemi mutasyonu ile birlikteliğini ve homozigot olgularını restriksiyon enzim kesimi yöntemi ile belirlemişlerdir (7).

Hemoglobin mutasyonlarının doğum öncesi tanı çalışmalarında güvenli biçimde tanımlanması gerekmektedir. Günümüzde kalıtsal kan hastalıkları için radikal bir tedavi bulunmaması nedeni ile toplumdan eradikasyonu için doğum öncesi tanı çalışmaları önem kazanmaktadır. Doğum öncesi tanı ya da çok sayıda örneğin incelendiği tarama çalışmalarında zaman ve güvenilirlik açısından yüksek teknolojinin kullanıldığı yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bunlardan biri olan mikroarray yöntemi ile çok sayıda örneğin pek çok mutasyon için tanımlamaları hızlı ve güvenilir olarak yapılabilmektedir (14,15). Özellikle çok farklı mutasyonların bulunduğu ülkemizde bu yöntemlerin geliştirilmesinin yararlı olacağı düşünülmektedir. Ayrıca bu tip aletlerle ileriye dönük olarak epigenetik çalışmaların da hızla yapılacağı düşünülmüştür.

Sonuç

Mikroarray cihazında Hb Hamadan ve IVS I-110 mutasyonların tanımlanması için tasarlanan özgün tanımlayıcılar kullanılarak Çukurova bölgesinde ilk defa Hb Hamadan mutasyonu belirlenmiştir. Mikroarray yöntemi ile mutasyonları belirlenen ailede Hb Hamadan ile birlikte IVS I-110 mutasyonunun kombine olarak bulunduğu saptanmıştır.

Kaynaklar

- [1] Lukens JN, Lee GR. (1993) The Abnormal Hemoglobins. In: Wintrobe's Clinical Hematology, Eds Lee GR, Bithell CT, Foester J, Athens JW, Lukens JN. Lee and Febiger Com, Pennsylvania.
- [2] Kılınç Y. (2006) Hemoglobinopathies in Turkey. Turkish J Hematol 23:214-216.
- [3] Altay Ç. (2002) Abnormal hemoglobins in Turkey. Turkish J Hematol 19(1): 63-74.

- [4] Akar E, Akar N. (2007) A review of abnormal hemoglobins in Turkey. *Turkish J Hematol* 24:143-145
- [5] Dincol G, Aksoy M, Dincol K, Kutlar A, Wilson JB, Huisman TH. (1984) Hemoglobin Hamadan or alpha 2 beta 256(D7) Glyo-Arg in a Turkish family. *Hemoglobin* 8(4): 423-5.
- [6] Rahbar S, Nowzari G, Haydari H, Daneshmand P. (1975) Hae-moglobin Hamadan: alpha-2A beta-2 56 (D7) glycine yields arginine. *Biochim Biophys Acta* 379(2): 645-8.
- [7] Akar E, Özdemir S, Timur İS, Akar N. (2003) First Observation of Homozygous Hemoglobin Hamadan (B 56 (D7) GLY-ARG) and Beta Thalassemia (-29 G>A)- Hemoglobin Hamadan Combination in a Turkish Family. *Am J Hematol* 74:280-282.
- [8] Altunkılıç S. (2004) Anamur yöresinin β -talasemi mutasyon tiplendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, ÇÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Nanogen guide.
- [9] Nanogen guide.
- [10] Bowden JR, Brennan PA. (2004) DNA microarray technology: insights for oral and maxillofacial surgeons. *Br J Oral Maxillofac Surg* 42: 542-545.
- [11] Tadmouri G, Başak N. (2001) β thalassemia in Turkey: A review of the clinical, epidemiological, molecular, and evolutionary aspects. *Hemoglobin* 25(2): 227-239.
- [12] Yüregir GT, Arpacı A, Aksoy K, Azar AM, Tanrıverdi K. (1993) Çukurova'da beta talasemik gen sıklığının taranması ve mutasyon odaklarının belirlenmesi. TÜBİTAK, TAG:0758
- [13] Yüregir GT, Arpacı A, Aksoy K, Tuli A, Dikmen N, Özgünen T, Kılınç Y. (1995) Population at risk for hemoglobinopathies in Çukurova. Türkiye: Need for prenatal diagnosis. *Ann Med Sci* 4:61-60.
- [14] Cremonesi L, Ferrari M, Giordano PC, Harteveld CL, Kleanthous M, Pappasava T, Patrinos GP, Traeger-Synodinos J. (2007) An overview of current microarray-based human globin gene mutation detection methods. *Hemoglobin* 31(3): 289-311.
- [15] Foglieni B, Galbiati S, Ferrari M, Cremonesi L. (2008) Prenatal Diagnosis, s. 169-182, Humana Press, Totowa NJ.