



### Derleme/Review

## Talasemi ve ilgili hemoglobinopatilerin Moleküler Tanı Yöntemleri:

### Günümüz ve Gelecek

Gülizar ÖZBOLAT<sup>1</sup>, Abdullah Tuli<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Çukurova University Faculty of Medicine, Department of Biochemistry, Adana, Turkey

### Özet

Hemoglobinopati, otozomal resesif geçişli monogenik bozuklukların en sık görülen grubudur. Hemoglobin (Hb) molekülünün alfa ( $\alpha$ ) ve beta ( $\beta$ ) globin zincirlerini kodlayan genlerde mutasyonlar veya delesyonlar ile karakterizedir ve genel olarak anormal hemoglobin ve talasemi olarak sınıflandırılır. Günümüzde, anormal hemoglobin ve talasemi mutasyonların tespiti için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Mutasyon tespitindeki teknolojik ilerlemelere rağmen, mutasyonların tanınmasında doğru tanıya ulaşabilmek için hematolojik ve moleküler tekniklerin birlikte kullanılması gerekir. Bu derlemede, mevcut standart hematolojik teknikler ve tanı yöntemleri ile yeni moleküler teknikler hakkında bilgi verdik.

**Anahtar Sözcükler:** Hemoglobinopati, Talasemi, hematolojik teknikler, moleküler yöntem, tanı yöntemleri

### Yazışmadan Sorumlu Yazar

**Gülizar ÖZBOLAT**

Çukurova University Faculty of Medicine,  
Department of Biochemistry, Adana , TURKEY.

Tel : +0 90

Email: [gulizarozbolat@gmail.com](mailto:gulizarozbolat@gmail.com)

DOI: 10.30569/adiyamansaglik. 396211

**Geliş Tarihi: 17.02.2018**

**Kabul Tarihi: 24.03.2018**

---

## **Molecular Diagnostics Methods of Thalassemia and Related Hemoglobinopathies: Present and Future**

### **ABSTRACT**

Hemoglobinopathies, inherited as autosomal recessive are the most common monogenic disorder. They are characterized by mutations in the genes encoding the alpha ( $\alpha$ ) and beta ( $\beta$ ) globin chains of the human hemoglobin (Hb) molecule and are broadly classified as abnormal hemoglobin and thalassemia. Several methods are now available for detection of abnormal hemoglobin and thalassemia mutations. Despite the technological advances in mutation detection, hematological and molecular techniques must be used together to achieve accurate diagnosis in the screening of mutations. In this review, we have inform the current standard hematological techniques and diagnostic methods as well as more novel molecular techniques that have become.

**Key Words:** Hemoglobinopathy, Thalassemia, hematological techniques, molecular method, diagnostic methods

## Giriş

Hemoglobinopatiler ve globin gen bozuklukları, dünyadaki yaygın olarak görülen ve her yıl giderek artan küresel bir yüke neden olan resesif monogenik (tek gen) hastalıkları oluşturur (1,2). Bu duruma ya globin zincirlerinin (talasemi) sentezini etkileyen ya da hemoglobin (hemoglobin varyantları ya da anormal hemoglobinler) yapı ve özelliklerini değiştiren 1700'den fazla farklı mutasyon neden olur (3).

Bunlar otozomal resesif bozukluklardır ve tarama programlarında tanımlanmaları için kullanılan çeşitli hematolojik özellikler içermektedir. Homozigot ve bileşik heterozigot mutasyon içermeleri durumlarında, her biri değişen fenotipik özellikler ve hastalık şiddeti sergileyen;

- $\alpha$ -talasemi sendromu,
- $\beta$ -talasemi sendromu;  $\delta\beta$ -talasemi ve Hb E/ $\beta$  talasemi dahil olmak üzere,
- Orak hücre sendromları (major genotipler Hb S/S, Hb S / C ve Hb S/ $\beta$ -tal ve daha az yaygın genotipler Hb S/ D Punjab, Hb S O Arab ve Hb S/Lepore),
- Hemolitik anemi, polisitemi ve daha nadiren siyanozla sonuçlanan Hb varyantları gibi dört temel klinik durum ile sonuçlanır (4).

Bu fenotiplerin değerlendirilmesi nedeniyle,  $\beta$ -talasemi ve Hb S için homozigot durumların önlenmesi, hematoloji taraması, moleküler tanı, genetik danışmanlık ve prenatal tanı veya preimplantasyon genetik tanı ile mutasyon tespiti, bu hastalıkların tedavisinde önemli bir bileşen oluşturmaktadır. Hemoglobinopati mutasyonlarının tümünün tespit edilmesine olanak tanıyan, çok çeşitli Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) temelli moleküler tanı teknikleri uygulanması, birçok gelişmekte olan ülkede kapsamlı ulusal önleme programlarının oluşturulmasına yol açmıştır. Birkaç istisna dışında, hematoloji yöntemleri birkaç yıldır

değişmeden kalmıştır ve 20 yıl önce tasarlanan PCR tabanlı DNA yöntemlerinin birçoğu belki de bazı durumlarda küçük değişikliklerle hala yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun birlikte; hemoglobinopatiler, talasemi ve eř zamanlı olarak etkileşen, genellikle doğru olarak yorumlanması güç olan hematolojik fenotiplerin karmaşık bir grubunu oluşturan anormal hemoglobin genotipleri nedeniyle, heterojen bir gruptur. Dahası, bazı fenotipler heterozigot  $\alpha^0$  talasemi ve homozigot  $\alpha^+$  talasemi gibi birkaç farklı genotiplerden ortaya çıkabilmesi yüzünden ve genotipler basit hematolojik parametrelerle ayırt edilemezler. Mutasyon tespitindeki teknolojik ilerlemelere rağmen, hemoglobinopatilerin taranmasında doğru tanıya ulaşabilmek için hematolojik ve moleküler tekniklerin birlikte kullanılması gerekir. Dolayısıyla birçok taşıyıcı tarama testinde, doğru teşhis için, hematolojik sonuçların yorumlanması ve DNA analizi veya kütle spektrometresi gibi yöntemlerle genotiplerin teyit edilmesi gerekir. Bu yöntemler hematolojik ve biyokimyasal sonuçlar belirsiz olduğunda yarar sağlayacaktır. Ayrıca maternal plazmada fetal DNA iğeren son ęalıřmalar ve dijital PCR ve yeni nesil dizileme gibi son hassas teknolojilerin uygulanması fetusa noninvaziv globin gen bozukluklarının rutin prenatal teşhisine olanak sağlar (5-8).

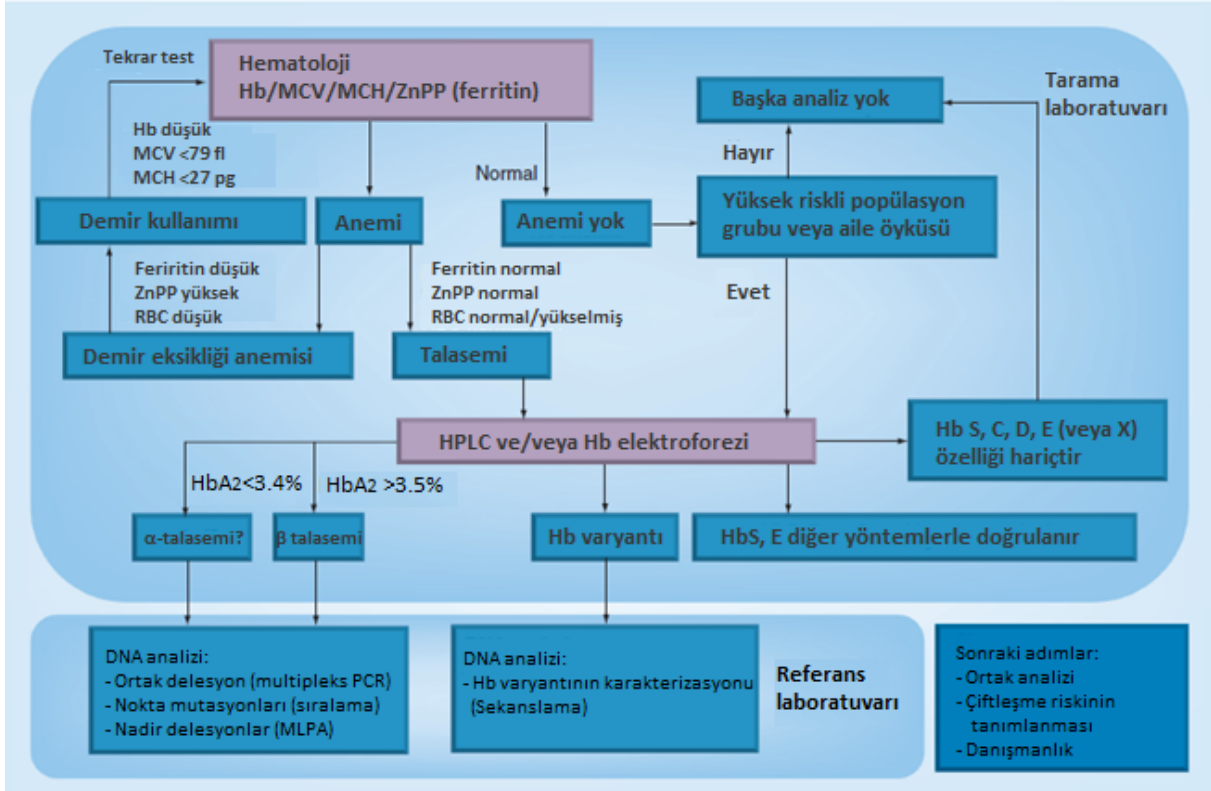
Bu derlemeyle talasemi ve anormal hemoglobin tespitinde hematolojik, biyokimyasal, moleküler tanı yaklaşımlarında yaygın kullanılan günümüzdeki teknikler, gelecekte kullanılacak tanı yaklaşımları ile son gelişmeleri tartışma ve aktarmaya ęalıřtık.

## **Globin Bozukluklarında Hematolojik ve Moleküler Tanı Teknikleri**

### **1- Hematolojik yöntemler: geleneksel**

Talasemi taşıyıcılarını tanımlarken değerlendirilmesi gereken değişkenler **Şekil.1'de** özetlenmiştir. Çoğu değişkenin ölçülmesine yönelik yöntemler ve destek teknolojileri son yıllar boyunca önemli ölçüde gelişme göstermemiştir. Hematolojik yöntemler, eritrosit indeksleri, Hb A<sub>2</sub> ve Hb F kantifikasyonu ve Hb elektroforez ayırımı hepsi kullanılmıştır.

Eritrosit indekslerinin belirlenmesi, en yaygın laboratuvar testidir ve genellikle otomatik elektronik hücre sayacı tarafından gerçekleştirilir. Hematolojik yöntemlerde, Eritrosit indeksleri, HbA<sub>2</sub> ve HbF kantifikasyonu ve Hb elektroforez ayrımı olmak üzere hepsi kullanılmıştır. Bununla birlikte ortalama eritrosit hacmi (MCV), eritrosit hücresi başına düşen ortalama hemoglobin miktarı (MCH) ve hemoglobin (Hb) derişimi gibi hemoglobinopati ön taraması için oldukça kullanışlı olan birçok değişken önemlidir. Demir eksikliği anemisi olanlara kıyasla talasemi taşıyıcılarında RBC değeri arttığı için önemlidir. Talasemi için muhtemel heterozigotu belirten önemli eşik değer (cut off), test edilen popülasyonun etnik kökenine ve hastanın yaşına göre değişebilmesine rağmen, 79 fl 'nin altında MCV ve 27 pg'nin altında bir MCH içerir. Demir eksikliği, hipokrom mikrositer aneminin en yaygın nedeni olduğundan, demir eksikliği anemisi ile talasemi arasında ayırım yapmak için demir parametrelerini ölçmek esastır. Demir eksikliğini göstermek için ferritin ölçümü en yaygın testtir. Bununla birlikte, ferritin, enfeksiyon, inflamasyon sırasında veya neoplaziden veya karaciğer hastalığından dolayı yanlışlıkla yükselebilir. Günümüzde demir eksikliği anemisi ve talasemi arasında ayırt etmek için transferrin doygunluğu kullanılır, ancak demir eksikliğinde enfeksiyonların da ve inflamasyon da yanlışlıkla değerler düşebilir. Alternatif olarak basit ve hızlı bir analiz yöntemi olarak çinko protoporfirininin (ZnPP) heme oranını ölçen hematoflorometre kullanılır. Çinko protoporfirin (ZPP) ölçümü demir eksikliğinde eritrositlerde hipokrom mikrositer anemi için bir tanı testi olarak kullanılır. Demir eksikliği veya bozulmuş demir kullanımı varlığında çinko, protoporfirin ile ferroşelataz aracılı şelasyon için demirin alternatifi olur ve ZnPP oluşumunu arttırır. ZnPP demir eksikliğinde (uzun vadede) yükselir, ancak yanlışlıkla kurşun zehirlenmesinde yüksek olabilir (5-8).



**Şekil.1** Tarama ve referans laboratuvarlarında taşıyıcı durumunu değerlendirmek için potansiyel olarak gerekli olan testlerin kombinasyonu. fl: Fento litre; Hb: Hemoglobini; MCH: Ortalama eritrosit hemoglobini; MCV: Ortalama eritrosit hacmi; MLPA: Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu; pg: Pikogram; RBC: Eritrosit; tal: Talasemi; ZnPP: Çinko Protoporfirin

Hematoloji yöntemlerinde, dikkate değer ilerlemeler gören tek alan, hemoglobin ayrımı ve nicelik değerlendirmesidir. Anormal hemoglobin değişkenleri veya  $\beta$ -talasemi taşıyıcılarının belirlenmesi için, farklı hemoglobin fraksiyonlarını ayıran çeşitli yöntemler bugün kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemler, pH 8.6' da selüloz asetat membran kullanılarak hemoglobin elektroforezi veya sitrat agar jelini kullanarak pH 6.0'da hemoglobin elektroforezini içerir. Bu geleneksel yöntemin temeli, farklı pH değerlerinde değişken yüklere sahip olan hemoglobinlerin elektriksel alandaki hareketlerine dayanmaktadır. Selüloz asetat elektroforez yöntemiyle Hb A, Hb E, Hb S / Hb G / Hb D, Hb C / Hb E / Hb O-Arab, Hb H ve daha az rastlanan hemoglobin varyantlarından bazıları tespit edilebilir. Hb S bandı tespit edildiğinde oraklaşma testi ile doğrulanmalıdır. Sitrat agar elektroforezinde Hb C, Hb S, Hb

F, ve Hb A türü hemoglobinler birbirinden ayrılırken, Hb S ve Hb D elektroforez aynı yerde bant vermektedirler. Bu yöntemlerin yanında izoelektrik odaklama yöntemleri, normal ve değişken Hb fraksiyonlarının daha keskin çözünürlüğü sağladığı için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, teşhis laboratuvarlarının çoğu, Hb kantitatif hem de Hb varyant taramasında HPLC kullanmaktadır. Bu yöntem, hemoglobinlerin ve hemoglobin varyantlarının nitel olarak ayrılmasının yanı sıra ayrılan fraksiyonların doğru bir şekilde nitelendirilmesine izin verir. Normal deneklerde Hb A<sub>2</sub> için referans aralıkları genellikle %2.0 ila %3.3 arasında iken,  $\beta$  talasemi taşıyıcılarındaki Hb A<sub>2</sub> seviyeleri genellikle %3.5'in üzerindedir. Hb A<sub>2</sub> değerleri, % 3.1 ila % 3.5 arasında sınır çizgisi olarak kabul edilir ve sınır çizgisi olan örnekler, normal Hb A<sub>2</sub> talasemi potansiyel formları için daha fazla araştırmaya ihtiyaç duyar. Hb S taşıyıcıları, genellikle, glikatlanmış Hb S fraksiyonunun devrinden dolayı yanlışlıkla yükselmiş bir Hb A<sub>2</sub> ile bulunur. Ayırma profilinde glikolatlı fraksiyonlar görülmediğinden, kapiler elektroforez bu dezavantaja sahip değildir (9-12).

Son zamanlarda kapiler elektroforez (CE) ve kütle spektrometresi (MS) gibi hemoglobin ayırımında daha ileri teknolojiler ortaya çıkmaktadır. Hb model analizi için nispeten yeni bir gelişme olan otomatik kapiller bölge elektroforezi (CE) hemoglobinin ve varyantların rutin olarak saptanması ve ölçümü için HPLC için tamamlayıcı bir tarama tekniğidir. HPLC'nin aksine, yöntem, glikozlanmış fraksiyonlar gibi hemoglobin türevlerini ayırmadığından, CE kalıpları basit ve okunması kolay olduğu için analizör popüler hale gelmeye başlamaktadır. Esasen hem HPLC hem de CE, pratikte az farkla varsayımsal bir Hb varyant teşhisi sağlar. Son zamanlarda yapılan bir diğer tarama yöntemi, Güneydoğu Asya'da  $\beta$ -talasemi ve Hb E taşıyıcılarının taranmasında yararlı olduğu gösterilmiş, hemoglobinler için otomatik kapiller izo-elektrik odaklama (İEF) analizcisinin geliştirilmesidir. Son 30 yılda, klinik kimya, laboratuvar tıbbı ve araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir teknik olan kütle

spektrometresi (Mass Spectrometry: MS) Hb analizi alanına girdi. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI)' nun yumuşak iyonizasyon tekniklerinin geliştirilmesi, bozulmamış globin zincirlerini incelemek için MS'i kullanmayı mümkün hale getirdi. MS tekniklerinin kullanımı, 60'tan fazla yeni mutasyonun keşfedilmesine yol açtı ve bozulmamış Hb tetrameri dahi bir nano elektrosprey iyonlaştırma-kütle spektrometresi (ESI-MS) tekniği kullanılarak analiz edilebilir. Ayrıca, Matris Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu-Uçuş Zamanlı-Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF) tek bir kırmızı kan hücresinden Hb zincirlerinin analizini mümkün kılan oldukça hassas bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır. Günümüzde bir varyantın nihai tanımlanması, moleküler biyoloji teknikleri veya MS'in artık kilit bir konumda olduğu protein dizisi analizi ile elde edilmektedir (12-14).

## 2- $\alpha$ -Talasemi: Moleküler Tanı Teknikleri

Çoğu  $\alpha$ -talasemi, bir veya daha fazla HBA geninin delesyonundan ve bu delesyonlardan etkilenen popülasyonların da yaygın olmasından dolayı, moleküler tanı teknikleri bu ortak delesyonların gösterilmesine odaklanmıştır. Geçmişte DNA blot analizi gibi yöntemler globin gen mutasyonlarını saptamak için kullanılmıştır. Bugünde mutasyon teşhisinde kullanılan en yeni moleküler tekniklerin geliştirilmesinde bir prototip olarak görülmüş ve şu anda globin gen mutasyonlarını saptamak için kullanılan veya kullanılmış çok sayıda PCR tabanlı teknik oluşturulmuştur (15,16).

**Multiplex gap-PCR:** Günümüzde gap-PCR kullanan polimeraz zincir reaksiyonu yöntemleri halen yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu teknik  $\alpha^+$  talasemi ve  $\alpha^0$  talasemi delesyon mutasyonları için güvenilir bir tanı testi olarak yaygın olarak uygulanmaktadır. En yaygın  $\alpha$ -talasemi delesyonları, tek bir multipleks Gap-PCR ile saptanabilir [yani  $-\alpha$  3.7,  $-\alpha$  4.2,  $-(\alpha)$  20.5,--MED, --SEA, --FIL, --THAI allelleri ]. Gap-PCR, yeni bir  $\alpha$  talasemi delesyon



mutasyonlarının kesme noktalarını tanımlamak için de kullanılabilir, çünkü Çinli bir taşıyıcıda yeni bir 6.3 kb  $\alpha^+$  talasemi delesyon haritalandırılması ile gösterilmiştir (17-19).

**Çoklu Ligasyona Bağlı Prob Amplifikasyonu (MLPA) :** Delesyonları karakterize etmek için alternatif bir teknik, MLPA'dır. Bu yaklaşım, tek bir testte herhangi bir  $\alpha$  talasemi delesyonlarının (bilinmesi ve bilinmemesi) tanımlanmasına izin verdiği için çok yararlıdır. MPLA'da DNA'ya bağlanan bir dizi oligonükleotid prob çiftleri, uygun aralıklarla ilgili kromozom alanını örtecek şekilde tasarlanır. Oligonükleotidler hedef sekanslarına bağlandığında, DNA ligaz bitişik bölgelerdeki problemleri kovalent olarak bağlar ve sonuçta ortaya çıkan bağlanmış sekanslar PCR ile amplifiye edilir. PCR ürününün miktarı hedef kopya sayısı ile orantılıdır, bu nedenle delesyon bölgeleri belirli bir prob çiftinde azaltılmış sinyal ile tanımlanır. Bu teknik aynı zamanda üçlü ve dördü  $\alpha$  globin gen allellerini teşhis etmek için de kullanılmaktadır (20-22).

**Dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon (aCGH):** Dizi karşılaştırmalı genomik hibridizasyon teknolojisi şimdi globin gen kümesindeki yeniden düzenlemelerin ayrıntılı karakterizasyonu için kanıtlanmış bir yöntemdir. Mikrodizilerin kullanıldığı bu yöntemde, DNA miktarındaki değişiklikleri yüksek çözünürlükte incelemesinden dolayı oldukça güvenilir bir yöntemdir. Bu mikrodiziler, küçük miktarlarda DNA'nın (prob olarak bilinir) bir cam slayt gibi katı bir destek üzerine düzenli bir şekilde depolanması ve hareketsizleştirilmesi ile oluşturulur. Başlangıçta kanserdeki genetik dengesizlikleri araştırmak için bir araştırma aracı olarak geliştirilen aCGH, o zamandan beri çok çeşitli hastalık genleri ve gen lokusundaki kopya sayısı varyasyonunun genetik teşhisinde düzenli olarak kullanılmıştır. Birçok yayın, bu tekniğin geleneksel sitogenetik yöntemlere kıyasla Kopya sayısı Değişimleri (Copy Number Variations: CNV) tespit etmesindeki avantajlarını vurgulamıştır. Prob tipi ne olursa olsun, aCGH analizi için temel metodoloji tutarlıdır. İlk olarak DNA, bir test örneğinden (örneğin, kan, cilt, fetüs hücreleri) çıkarılır. Test DNA'sı daha sonra belirli bir

renkte bir flüoresan boya ile etiketlenirken, normal kontrol (referans) numunedeki DNA farklı bir renkte bir boya ile etiketlenir. İki genomik DNA, test ve referans, daha sonra birlikte karıştırılır ve bir mikrodiziye uygulanır. DNA'lar denatüre edildiği için tek sarmallılar; problarla hibridleşmeye çalışırlar. Daha sonra, dijital görüntüleme sistemleri, her bir hedefe hibritlenen etiketli DNA problemlerinin floresan yoğunluklarını yakalamak ve ölçmek için kullanılır. Test ve referans hibridizasyon sinyallerinin flüoresan oranı, genomdaki farklı konumlarda belirlenir ve normal genom ile karşılaştırıldığında test genomundaki dizilerin nispi kopya sayısı hakkında bilgi sağlar. İnsan genomunun son dizilimi ve katı bir yüzey üzerinde genetik materyali robotik olarak sıralamanın yüksek verimli yöntemlerinin geliştirilmesi, benzeri görülmemiş bir seviyede submikroskopik kromozomal delesyonların ve kopyalamanın keşfedilmesine olanak sağlamıştır. Yeniden düzenlemelerin detaylı analizi için aCGH'nin kullanılmasında çözünürlükte gözle görülür gelişme, prob aralığını 100'den 20 baz çifti veya daha düşük bir seviyeye düşürmek ve oligonükleotit sondalarını 60-80 nt'ye kadar bir uzunluğa uzatmak suretiyle elde edildi ve böylece problemler arasında bir çakışma oluşmasıyla olan bölgeyi kapsamaktadır (23-25).

MLPA ile karşılaştırıldığında, aCGH, daha kesin kesme noktası eşlemesine olanak tanıyan artan bir çözünürlüğe sahiptir. Bununla birlikte, sekans seviyesindeki delesyonların veya duplikasyonların kırılma noktalarını karakterize etmek için, kırılma noktasına olabildiğince yakın oligonükleotid primerlerinin tasarımı, PCR için ve kesme noktasının sonraki dizilimi için hala zorunludur. Bazen seçilen primerler, büyük tekrarlayan elementlerin veya inversiyonların / translokasyonların katılımından dolayı kırılma noktasından bir parçanın amplifikasyonunda başarısız olur. aCGH bu yeniden düzenlemeleri ayırt edemez ve tekrarlanan elementler spesifik olmayan sinyaller üretebileceğinden prob tasarımı esas olarak lokusa özgü benzersiz sekanslarla sınırlanır. Birçok yayın, aCGH'nin alfa-globin gen

kümesindeki delesyon noktalarının karakterizasyonunda yararlı bir araç olduğunu göstermiştir (26,27).

Delesyon mutasyonlarının hızlı, basit, hızlı, doğru ve maliyet etkin yöntemlerinin taranması için başka yaklaşımlar da geliştirilmiştir. Örneğin  $\alpha^0$  talasemi delesyonları için gerçek zamanlı gap-PCR, yüksek çözünürlüklü erime analizi, 3.7 kb ve 4.2 kb  $\alpha^+$  talasemi delesyonlarını saptamak için oligonükleotid mikrodizisinin kullanılması gibi. Non-delesyonel  $\alpha^+$  talasemi (iki mutasyon, küçük delesyon veya iki  $\alpha$ -globin geninden birine eklemelerini tanımlayan bir terim) tanısı için en yaygın kullanılan yaklaşım, her  $\alpha$ -globin geninin seçici amplifikasyonudur ardından PCR ürününün analizidir. Bilinmeyen mutasyonların taranması için DNA sekans analizi altın standart yöntemdir. Bilinen mutasyonların teşhisi için çoğaltılan ürünün reverse dot blot, Amplifikasyon Refrakter Mutasyon Sistemi (ARMS-PCR) ve pirosekanslama gibi birçok başka yöntem uygulanmıştır (28).

### 3- $\beta$ -Talasemi: Moleküler Tanı Teknikleri

$\beta$ -talasemi hastalığının moleküler temelinde çok heterojen bir yapıya sahiptir.  $\beta$ -talasemi hastalarında, normal  $\beta$ -globin gen transkripsiyonunu, RNA işlemlerini ve translasyonu etkileyen yaklaşık 200 mutasyon karakterize edilmiştir.  $\beta$ -talasemi mutasyon spektrumu için tarama yapan birçok diagnostik laboratuvarlardaki tanı stratejisi, ortak mutasyonların eşzamanlı olarak saptanmasına izin veren basit ve ucuz bir PCR tabanlı tekniği kullanmaktadır. B-globin gen nokta mutasyonlarının taranması için şaşırtıcı bir çeşitlilikte PCR teknolojisi geliştirilmiş ve uygulanmış olsa da, çoğu tanılama laboratuvarı halen, allele özgül oligonükleotid hibridizasyona veya allele özgül hazırlamaya dayanan örneğin reverse dot-blotting veya ARMS basit ve ucuz bir teknikler kullanıyor. Bugün birçok ülkede moleküler tanısal laboratuvarların, prenatal teşhis için hızlı bir şekilde geniş bir mutasyon çeşidi tespit etmesi için teknik uzmanlığa, ekipmana ve teşhis stratejisine sahip olmasından dolayı bu

laboratuvarlarda  $\beta$ -talasemi nokta mutasyonlarının teŖhisi için temel tarama yöntemi olarak DNA dizi analizi kullanılmaktadır (29,30).

**Primer-spesifik amplifikasyon:** Primer-spesifik amplifikasyon ilkesine dayalı olarak  $\beta$ -talasemi mutasyonlarını saptamak için bir dizi PCR tekniği geliŖtirilmiŖtir. En yaygın kullanılan yöntem ARMS olarak bilinir. Bu yöntem, ucuz ve yüksek teknoloji gerektiren veya özel aletler gerektirmeyen hızlı bir tarama testi sunmaktadır. ARMS primerleri, tüm ana etnik grupların ortak  $\beta$ -talasemi mutasyonlarını taramak için geliŖtirilmiŖtir (31).

**Reverse Dot Blot (RDW):** RDB yaygın kullanım elde etmek için ilk PCR yöntemi oldu ve hala bazı laboratuvarlarda bugün kullanılır. Genellikle, yüksek mutasyon spektrumunda, hemoglobin C (Hb C), hemoglobin E (Hb E), hemoglobin S (Hb S) ve talasemi teŖhis veya taŖıyıcı durum değerlendirmesi için tanı genotiplerinin sağlanması kullanılır. Bu teknik, yaygın  $\beta$ -talasemi mutasyonları için bir primer panel kullanılarak iki aŖamalı hibridizasyon prosedürü kullanılarak tarama için en uygun strateji ile uyumludur ve bunu nadir bulunan mutasyonlar için takip eder ve Akdeniz, Afrikalı Amerikalılar ve Taylandlı bireylerde  $\beta$  talasemi mutasyonlarının teŖhisi için uygulanmıŖtır. Bu teknik, globin gen mutasyonlarının teŖhisi için ticari olarak geliŖtirilen birkaç yöntemden biridir (32).

**Oligonükleotid mikroarray:** Reverse dot blotlama ilkesi, çoklu beta-talasemi mutasyonlarının eŖzamanlı olarak saptanması için oligonükleotit mikroarraylerin geliŖtirilmesi ile günümüze kadar getirilmiŖtir. Bu yaklaŖım hem  $\beta$ -talasemi hem de  $\beta$  zincir varyantlarına neden olan tüm olası  $\beta$ -globin gen mutasyonlarının tanımlanması için tek adımda bir strateji vaat etmektedir. Birçok alıŖma grubu bugün  $\beta$  talasemi taŖıyıcılarını ve hastalarını genotiplendirmek için kullanılan bir DNA array platformunun ayrıntılarını yayınlamıŖlardır. Bu alıŖmalarından bir tanesinde Akdeniz popülasyonunda yaygın olarak bulunan 17 mutasyonun ( $\beta$  + -101 (C→T);  $\beta$  + -87 (C → G);  $\beta_0$  kodonu 6 (-A);  $\beta_0$  kodonu 39

(C→T);  $\beta_0$ -IVSI-1 (G→A);  $\beta^+$ -IVSI-6 (T→C);  $\beta^+$ -IVSI-110 (G→A);  $\beta_0$ -IVSII-1 (G → A);  $\beta^+$ -IVSII-745 (C→G);  $\beta^+$ -IVSII-844 (C→G) tespiti için bir mikro-dizi tabanlı oluşturmuştur. Bununla birlikte,  $\beta$ -globin geninde birkaç bin muhtemel DNA sekansı değişikliklerinin herhangi birini eşzamanlı olarak belirleyecek olan tek dizinin gelişimi halen beklemektedir (33-35).

**Yeni nesil sıralama (NGS: Next generation sequencing):** Beta-talasemi defektlerinin çoğunluğu beta-globin geninde nokta mutasyonlarından kaynaklanır ve bu nedenle globin gen kodlama bölgelerinin sıralanması için özel bölmeler (custom panes) kullanılarak potansiyel olarak teşhis edilebilir. 2015 yılında yapılan bir çalışmada yeni doğanda talasemi genlerini taramak için yeni nesil sıralama teknolojisi kullanılmıştır. Test edilen 206 yeni doğan olgusunda, 22 olguda talasemi gen mutasyonları için taranmış; bunlar arasında 11 alfa talasemi, 11 beta-talasemi, 5 yeni mutasyon grubu saptanmış. Alfa talasemi tanısı konan 11 olgudan 7'sinin gen delesyonu olduğu ve % 64'ünün (7/11) sorumlu olduğu kanıtlanmış ve spesifik genotip dağılımı şöyledir: 4 olguda  $\alpha\alpha / \alpha$  (3.7), 2 olgu  $\alpha\alpha$ -SEA, 1 vaka  $\alpha\alpha / -\alpha$  (4.2), kalan 4 nokta mutasyonlu olgu (4/11,% 36): Hb Part-Dieu hibrid, Hb Quong Sze melez, Hb Westmead hibrid, HBA1: c. 95 + 9 c> .  $\beta$  talasemi vakalarının tamamında beta zincir noktası mutasyonları olduğu, 7 çeşit mutasyon genotipi olduğu ve CD17 (A-> T) en sık görülen nokta lokus mutasyonu olup % 27 (3/11) , ve 1 olguda 2 olguda 50 G> A hibrid, 1 olguda Hb Hamilton hibrid, IVS-II-654 (C-> T) idi. Kalan 4 olgu yeni gen nokta mutasyonudur, sırasıyla şunlar bulunmuştur: HBB: c. 316-116 c> A, HBB: c.316-248G> T, HBB: c.315 + 63T> c, HBB: c. -23 A> G. Yeni nesil sıralama teknolojisi, talasemi gen tiplerini etkili bir şekilde saptamakla kalmayıp aynı zamanda yeni gen mutasyonları arayabilen talasemi genetik mutasyonu için de kullanılabilir. Bu yöntemin avantajları kolay örnek toplama, hassas sonuç ve klinik tanı için geniş kullanım içerir, bu nedenle muhtemelen talasemi için erken bir tanı

sağlar. Yapılan bir çalışmada özel bir NGS tahlili (Ion Torrent PGM kullanılarak), beta-globin mutasyonlarının saptanması için yalnızca tasarlanmıştır. Test, mutasyona elverişsiz olduğu bilinen küçük bir intronik bölge haricinde 5' promoter bölgesi, komple eksonlar ve intronlar ve 3'UTR'yi kapsayan tam beta-globin genini kapsamıştır. Amaç, NGO'nun Ion Torrent platformunu kullanarak fizibilitesini test etmek ve aynı anda büyük kohort topluluklarını taramaktır. Yaklaşık 300 taşıyıcı ve hasta her biri 90 dakikada üç kez güvenilir şekilde tarandı ve 400 katın üzerinde kapsama alanı, 300 kişiye kadar olan barkodlu adaptörlerin artışıyla birlikte, işletme maliyetlerini önemli ölçüde azaltarak tek bir seferde analiz edilebileceğini gösterilmiştir. Bununla birlikte NGS, aynı zamanda, beta-globin gen kümesindeki delesyonların kırılma noktalarını haritalamak için de kullanılmaktadır (36,37).

### **$\delta\beta$ -Talasemi, HPFH ve $\delta\delta\beta$ - Talasemi**

$\beta$ -globin gen kümesini etkileyen delesyonlar,  $\beta$  talasemi, kalıtsal kalıcı fetal hemoglobin (HPFH),  $\delta\beta$ -talasemi ve  $\gamma\delta\beta$ -talasemi sendromlarına neden olur.  $\delta\beta$  talasemi özellikleri ( $\delta\beta$ -TT),  $\beta$  ve  $\delta$  genlerinin delesyonlarından kaynaklanır ve normal hemoglobin (Hb)A<sub>2</sub> değerleriyle fetal hemoglobin (HbF) yükselmesi ile karakterizedir. Heterozigot durumda olan hastalar asemptomatiktir veya hafif dereceli anemi gelişirken, homozigotlar genellikle talasemi intermedia'lıdır.  $\delta\beta$ -talasemi,  $\delta\delta\beta$ -Talasemi, HPFH ve Hb Kenya delesyon mutasyonları önce Southern blotlama ve restriksiyon enzim haritalaması ile karakterize edildi ve delesyon mutasyonunun kırılma noktalarını kapsayan karakteristik anormal DNA fragmanları ile tanımlandı. Bu zaman alıcı tekniği, gap-PCR ve ardından MLPA tanıtılana kadar tek moleküler tanı yöntemi idi. Artık hem gap-PCR hem de MLPA moleküler tanı için rutin olarak kullanılmaktadır. Gap-PCR, ayrıca Hb Lepore,  $\delta\beta$ -talasemi ve HPFH delesyon mutasyonlarını belirlemek için kullanılır. Bununla birlikte, gapPCR yalnızca kesme noktalarının karakterize edildiği delesyon işlemleri için mümkündür. Primerler altı ortak  $\delta\beta$  talasemi (Çin, Sicilya, İspanyol, Vietnam / Güney Asya ve Türk ve Hint inversiyon / delesyon

mutasyonları) ve üç ortak HPFH delesyon - Afrika HPFH-1 ve 2 için ve Hindistan HPFH-3 için dizayn edilmiştir. MLPA ise nadir veya yeni delesyon allellerini saptamak için kullanılır, ancak belirli bir popülasyonda  $\delta\beta$  globin gen kümesi delesyon mutasyonlarının spektrumunu ve frekansını tanımlamak için yararlıdır (38-40).

### **Sonuç**

Hemoglobinopatiler ve globin gen bozuklukları, dünyadaki yaygın olarak görülen resesif monogenik hastalıkları oluşturur. Bu duruma ya globin zincirlerinin (talasemi) sentezini etkileyen ya da hemoglobin (hemoglobin varyantları ya da anormal hemoglobinler) yapı ve özelliklerini değiştiren 1700'den fazla farklı mutasyon neden olur<sup>1,2,3</sup>. Hemoglobinopatiler için taşıyıcı tarama, hematolojik ve moleküler tanı tekniklerinde bugüne kadar birçok teknolojik gelişme geçirdi. Özellikle HPLC'nin yaygın şekilde benimsenmesi, maliyet baskısı olan gelişmekte olan ülkelerde, Hb A<sub>2</sub> ve Hb F'nin daha doğru ölçülmesi yoluyla taramanın doğruluğunu geliştirmiştir. Kılcal elektroforez gibi daha yeni teknikler Hb varyantlarının taranması için geliştirilmiştir. Hemoglobinopati mutasyonlarının tümünün tespit edilmesine olanak tanıyan çok çeşitli PCR temelli moleküler tanı teknikleri uygulanması, birçok gelişmekte olan ülkede kapsamlı ulusal önleme programlarının oluşturulmasına yol açmıştır. Mutasyon tespitindeki teknolojik ilerlemelere rağmen, hemoglobinopatilerin taranması doğru tanıya ulaşabilmek için hematolojik ve moleküler tekniklerin birlikte kullanılmasını gerektirir ve etkileşimlerden kaynaklanan çok sayıda kompleks fenotip nedeniyle genotip /fenotip ilişkileri konusunda uzman bilgi gerektirir. Gelecekte, yeni nesil dizileme ile sadece  $\alpha$  ve  $\beta$  globin gen kümelerini sıralayarak taşıyıcı taraması, herhangi bir sekans değişikliği yapılmadan tanı koymak için çekici bir yol gibi görünmektedir. Ancak hematoloji ve Hb paterni analizi verilerine hala ihtiyaç vardır. Günümüzde hemoglobinopati tanı laboratuvarlarının çoğu, hemoglobinopatilerin karmaşıklığı ve heterojenliğinden dolayı, globin gen mutasyonu analizi için birkaç ticari kitin başarılı bir

şekilde geliştirildiği ve pazarlandığı için DNA analizi için kurum içi protokolleri kullanmaktadır. Bunların birçoğu gelecek nesil dizileme gibi yeni gelişmelerle ve değiştirilecektir, ancak mevcut tekniklerin bazılarının ucuzluğu ve basitliği, uzun yıllar dünya çapında birçok teşhis laboratuvarında kullanılmaya devam etmelerini sağlayacaktır. Yeni nesil sıralama teknolojisine yönelik şu anki çaba çokça hedef zenginleştirme ve hastalık gen panellerine konulsa da, bunlar genomun küçük bölümlerine sınırlama getiren bir teşhis yaklaşımının geliştirilmesine yönelik sadece ilave adımlardır. Genetik teşhis konusundaki teknolojik ilerlemenin açık bir şekilde, hastanın genom dizisini kapsayan hızlı ve ucuz bir bütün olarak moleküler tanı konusunun gelişimi gelecekte gerçekleşebilir.

#### **Kaynaklar:**

1. Modell B, Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*. 2008;86(6):480-7.
2. Synodinos JT. Hartevelde HC. Preconception carrier screening and prenatal diagnosis in thalassemia and hemoglobinopathies: challenges and future perspectives. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2017; 17(3): 281-291.
3. Giardine B, Borg J, Viennas E, Pavlidis C, Moradkhani K, Joly P, et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. *Nucleic acids research*. 2014;42(Database issue):D1063-9.
4. Clark BE. Them SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin. Lab. Haem*. 2004, 26, 159–176.
5. Ryan K. Bain BJ. Worthington D, et al. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br. J. Haematol*. 2010; 149(1), 35–49.
6. Labbe RF. Vreman HJ. Stevenson DK. Zinc protoporphyrin: a metabolite with a mission. *Clin. Chem*. 1999; 45(12), 2060–2072.
7. Buch AC. Karve PP. Panicker NK et al. Role of red cell distribution width in classifying microcytic hypochromic anaemia. *J. Indian Med. Assoc*. 2011; 109(5), 297–299.
8. Old J. Hartevelde CL. Traeger-Synodinos J, et al. Prevention of thalassaemias and other haemoglobin disorders. In: *Laboratory Protocols. II (2nd Edition)*. Thalassaemia International Federation, Nicosia, Cyprus, 2012.
9. Kohn J. Separation of haemoglobins on cellulose acetate. *J. Clin. Pathol*. 22(1), 109–111.
10. Lorey F, Cunningham G, Shafer F et al. Universal screening for hemoglobinopathies using high-performance liquid chromatography: clinical results of 2.2 million screens. *Eur. J. Hum. Genet*. 1994; 2(4), 262–271.
11. Old JM. Screening and genetic diagnosis of hemoglobin disorders. *Blood Reviews*. 2003; 17(1):43-53.



12. Van Delft P, Lenters E, Bakker-Verweij M et al. Evaluating five dedicated automatic devices for haemoglobinopathy diagnostics in multi-ethnic populations. *Int. J. Lab. Hematol.* 2009; 31(5), 484–495.
13. Troxler H, Kleinert P, Schmutge M et al. Advances in hemoglobinopathy detection and identification. *Adv. Clin. Chem.* 2012; 57, 1–28.
14. Hachani J, Duban-Deweere S, Pottiez G et al. MALDI-TOF MS profiling as the first-tier screen for sickle cell disease in neonates: matching throughput to objectives. *Proteomics, Clin. Appl.* 2011; 5(7–8), 405–414.
15. Liu YT, Old JM, Miles K. et al. Rapid detection of  $\alpha$ -thalassaemia deletions and  $\alpha$ -globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. *Br J Haematol.* 2000;108:295-299.
16. Old J, Henderson S. Molecular diagnostics for haemoglobinopathies. *Expert opinion on medical diagnostics.* 2010;4(3):225-40.
17. Chong SS, Boehm CD, Cutting GR, et al. Simplified multiplex-PCR diagnosis of common southeast Asian deletional determinants of alpha-thalassemia. *Clin Chem* 2000; 46: 1692-1695.
18. Karnpan R, Fucharoen G, Fucharoen S, et al. Accurate prenatal diagnosis of Hb Bart's hydrops fetalis in daily practice with a double-check PCR system. *Acta haematologica.* 2009;121(4):227-33.
19. Wang XY, Lin MX, Lin M. A novel 6.3 kb deletion and the Rare 27.6 kb Deletion Causing alpha+-Thalassemia in two Chinese Patients. *Hemoglobin.* 2016;40(5):365-8.
20. Harteveld CL, Voskamp A, Phylipsen M. et al. Nine unknown rearrangements in 16p13.3 and 11p15.4 causing  $\alpha$ - and  $\beta$ -thalassaemia characterised by high resolution multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Med Genet.* 2005;42:922-931
21. Harteveld CL, Refaldi C, Cassinerio E, et al. Segmental duplications involving the alpha-globin gene cluster are causing beta-thalassemia intermedia phenotypes in beta-thalassemia heterozygous patients. *Blood cells, molecules&diseases.* 2008;40(3):312-6.
22. Kipp BR, Roellinger SE, Lundquist PA. et al. Development and clinical implementation of a combination deletion PCR and multiplex ligation-dependent probe amplification assay for detecting deletions involving the human  $\alpha$ -globin gene cluster. *J Mol Diagn.* 2011;13:549-557.
23. Staaf J, Torngren T, Rambech E, et al. Detection and precise mapping of germline rearrangements in BRCA1, BRCA2, MSH2, and MLH1 using zoom-in array comparative genomic hybridization (aCGH). *Human mutation.* 2008;29(4):555-64.
24. Shaffer LG, Bejjani BA, Torchia B, et al. The identification of microdeletion syndromes and other chromosome abnormalities: Cytogenetic methods of the past, new technologies for the future. *American Journal of Medical Genetics.* 2007; 145: 335–345.
25. Blattner A, Brunner-Agten S, Ludin K, et al. Detection of germline rearrangements in patients with alpha- and beta-thalassemia using high resolution array CGH. *Blood cells, molecules & diseases.* 2013;51(1):39-47.
26. Liu S, Jiang H, Wu MY. Thalassemia Intermedia Caused by 16p13.3 Sectional Duplication in a beta-Thalassemia Heterozygous Child. *Pediatric hematology and oncology.* 2015;32(5):349-53.
27. Phylipsen M, Chaibunruang A, Vogelaar IP, et al. Fine-tiling array CGH to improve diagnostics for alpha- and beta-thalassemia rearrangements. *Human mutation.* 2012;33(1):272-80.

28. Foglietta E, Bianco I, Maggio A, Giambona A. Rapid detection of six common Mediterranean and three non-Mediterranean alpha-thalassemia point mutations by reverse dot blot analysis. *American journal of hematology*. 2003;74(3):191-5.
29. Old JM. Screening and genetic diagnosis of haemoglobinopathies. *Scand J Clin Lab Invest*. 2006;66:1–16.
30. Henderson SJ, Timbs AT, McCarthy J, et al. Ten Years of Routine alpha- and beta-Globin Gene Sequencing in UK Hemoglobinopathy Referrals Reveals 60 Novel Mutations. *Hemoglobin*. 2016;40(2):75-84.
31. Old JM, Khan SN, Verma, et al. A multi-centre study to further define the molecular basis of beta-thalassemia in Thailand, Pakistan, Sri Lanka, Mauritius, Syria, and India, and to develop a simple molecular diagnostic strategy by amplification refractory mutation system polymerase chain reaction. *Hemoglobin*. 2001;25:397.
32. Maggio A, Giambona A, Cai SP, Wall J, Kan YW, Chehab FF. Rapid and simultaneous typing of hemoglobin S, hemoglobin C, and seven Mediterranean beta-thalassemia mutations by covalent reverse dot-blot analysis: application to prenatal diagnosis in Sicily. *Blood*. 1993;81(1):239-42.
33. Cremonesi L, Ferrari M, Giordano PC, et al. An overview of current microarray-based human globin gene mutation detection methods. *Hemoglobin*. 2007;31(3):289–311.
34. Van Moorsel CH, van Wijngaarden EE, Fokkema IF, et al. Beta-Globin mutation detection by tagged single-base extension and hybridization to universal glass and flow-through microarrays. *European Journal Human Genetics*. 2004;12:567–573.
35. Bang-Ce Y, Hongqiong L, Zhuanfong Z, et al. Simultaneous detection of alpha-thalassemia and beta-thalassemia by oligonucleotide microarray. *Haematologica*. 2004;89:1010–1012.
36. Barreto R, Arrizabalaga B, De la Hoz AB, et al. Detection of new pathogenic mutations in patients with congenital haemolytic anaemia using next-generation sequencing. *International journal of laboratory hematology*. 2016;38(6):629-38.
37. Lee ST, Yoo EH, Kim JY, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification screening of isolated increased HbF levels revealed three cases of novel rearrangements/deletions in the beta-globin gene cluster. *British journal of haematology*. 2010;148(1):154-60.
38. Ryan K, Bain BJ, Worthington Det al. British Committee for Standards in Haematology. Significant haemoglobinopathies: guidelines for screening and diagnosis. *Br J Haematol* . 2010;149:35–49.
39. Clark BE, Them SL. Molecular diagnosis of haemoglobin disorders. *Clin. Lab. Haem*. 2004, 26, 159–176.
40. Gallienne AE, Dreau HM, McCarthy J, et al. Multiplex ligation-dependent probe amplification identification of 17 different beta-globin gene deletions (including four novel mutations) in the UK population. *Hemoglobin*. 2009;33(6):406-16.