

Molecular analysis of gamma-globin promoters, HS-111 and 3'HS1, in beta-thalassemia intermedia patients associated with high levels of Hb F.

Mohammad Hamid, Frouzandeh Mahjoubi, Mohammad T Akbari, Aida Arab, Sirous Zeinali, Morteza Karimipoor

► **To cite this version:**

Mohammad Hamid, Frouzandeh Mahjoubi, Mohammad T Akbari, Aida Arab, Sirous Zeinali, et al.. Molecular analysis of gamma-globin promoters, HS-111 and 3'HS1, in beta-thalassemia intermedia patients associated with high levels of Hb F.. Hemoglobin, Informa Healthcare, 2009, 33 (6), pp.428-38. 10.3109/03630260903336479 . pasteur-00751249

HAL Id: pasteur-00751249

<https://hal-riip.archives-ouvertes.fr/pasteur-00751249>

Submitted on 13 Nov 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Molecular Analysis of HS-111 and 3' HS1 Variations in β -Thalassemia Intermedia Patients with High Levels of HbF

Mohammad Hamid, M.Sc.^{1,2}, Morteza Karimipoor, Ph.D.², Sirous Zeinali, Ph.D.²,
Mohammad taghi Akbari, Ph.D.³, Leila Kokabi, M.Sc.², Frouzandeh Mahjoubi, Ph.D.^{1*}

1. Clinical Genetics Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran
2. Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
3. Medical Genetics Department, Faculty of Medical science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

* Corresponding Address: P.O.Box: 14965/161, Clinical Genetic Department, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Karaj High Way, Pajouhesh Rd, Tehran, Iran
Email: Frouz@nigeb.ac.ir

Received: 2/Jan/2009, Accepted: 5/May/2009

Abstract

Objective: To study the possible association between high levels of fetal haemoglobin (HbF) in β -thalassemia intermedia patients and HS-111 and 3'HS1 sequence variations.

Materials and Methods: In this study, the 3' HS-1 and HS-111 regions of 30 β -thalassaemia intermedia patients (β^0/β^0) with high levels of HbF, 21 β -thalassemia major patients and 40 normal Iranian individuals were analyzed by single-strand conformation polymorphism (SSCP) and polymerase chain reaction (PCR) sequencing.

Results: Two nucleotide variations in 3' HS111 (-21A>G) and 3'HS1 (179C>T) were identified. The most frequent sequence variation was 3' HS111 (-21A) in the intermedia patients and 3'HS111 (-21G) in the major thalassemia patients. In contrast to the 3'HS1 marker, both 3'HS111 A and G variants showed a correlation with each studied group.

Conclusion: The HS111 marker in conjunction with other parameters could be used as appropriate genetic markers to discriminate β -thalassemia intermedia patients (β^0/β^0) with high levels of HbF from β -thalassemia major patients.

Keywords: β -Thalassemia, Fetal Haemoglobin, Single-Strand Confirmation Polymorphism

Yakhteh Medical Journal, Vol 11, No 4, Winter 2010, Pages: 418-423

بررسی ارتباط مولکولی نواحی HS1³ و HS-111 در افزایش بیان ژن گاما گلوبین در بیماران مبتلا به تالاسمی اینترمدیا

محمد حمید^۱، M.Sc.؛ مرتضی کریمی پور^۲، Ph.D.؛ سیروس زینلی^۳، Ph.D.؛ محمد تقی اکبری^۴، Ph.D.؛ لیلا کوبکی^۵، M.Sc.؛ فروزنده محجوبی^۶، Ph.D.*

۱. پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک پزشکی، تهران، ایران
 ۲. انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، گروه پزشکی مولکولی، تهران، ایران
 ۳. دانشگاه تربیت مدرس، بخش ژنتیک پزشکی، تهران، ایران

* آدرس نویسنده مسئول: تهران، صندوق پستی: ۱۴۹۶۵/۱۶۱، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، گروه ژنتیک پزشکی
 پست الکترونیک: Email: Frouz@nigeb.ac.ir

دریافت مقاله: ۱۵/۱/۸۷، پذیرش مقاله: ۱۵/۲/۸۸

چکیده

* **هدف:** بررسی ارتباط بین افزایش میزان هموگلوبین جنینی (Haemoglobin Fetal; HbF) در بیماران تالاسمی اینترمدیا و تغییرات به دست آمده در نواحی HS1³ و HS-111 واقع در پایین و بالادست خوشه ژنی بتا گلوبین
 * **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه نواحی HS1³ و HS-111 به ترتیب پایین و بالادست خوشه ژنی بتا گلوبین با استفاده از روش SSCP Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) و تعیین توالی در ۳۰ بیمار مبتلا به تالاسمی اینترمدیا دارای دو موتاسیون ۴^b، ۲۱ بیمار تالاسمی ماژور و ۴۰ فرد نرمال مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه به صورت مورد شاهدهی بوده و روش انتخاب بیماران به روش سرشماری تصادفی صورت گرفته است.
 * **یافته‌ها:** در بررسی نواحی HS-111 و HS1³ دو نوع تغییر HS111(-21A>G) و HS1(179C>T³) مشاهده گردید که بیشترین فراوانی در بیماران تالاسمی اینترمدیا مربوط به HS111(-21A) و در بیماران تالاسمی ماژور مربوط به HS111(-21G) می‌باشد. بر خلاف مارکر HS1³ هر دو واریانت A و G مارکر HS111 در سه گروه مورد مطالعه ارتباط معنی‌داری را نشان دادند.
 * **نتیجه‌گیری:** مارکر HS111 به همراه فاکتورهای دیگر موثر در اریتروپویز را می‌توان به عنوان مارکر ژنتیکی مناسب و کاربردی در رابطه با افتراق بیماران مبتلا به تالاسمی اینترمدیا و ماژور ایرانی معرفی کرد.

* **کلیدواژگان:** تالاسمی بتا، هموگلوبین جنینی، SSCP

فصلنامه پزشکی یافته، سال یازدهم، شماره ۴، زمستان ۸۸، صفحات: ۴۲۳-۴۱۸

مقدمه

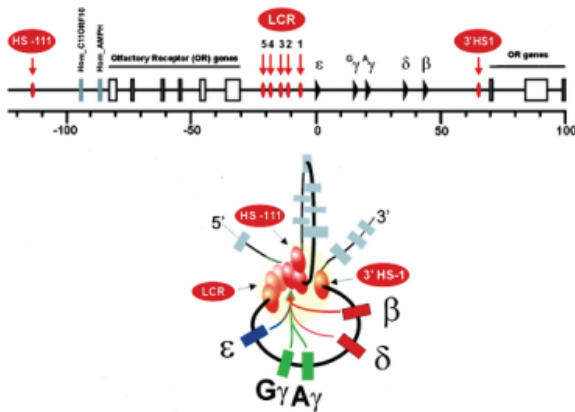
بیماری تالاسمی اینترمدیا به بیماری‌های اطلاق می‌شود که شدت بیماری در آنها از تالاسمی ماژور خفیف تر و از تالاسمی مینور شدیدتر می‌باشد. تعریف تالاسمی اینترمدیا یک تعریف بالینی بوده و از نظر ژنوتیپ بسیار متنوع است. به طور کلی دلایل ایجاد تالاسمی اینترمدیا را می‌توان به سه دسته کلی تقسیم کرد:
 ۱. تالاسمی اینترمدیا که در اثر جهش‌های ملایم در ژن گلوبین بتا ایجاد می‌گردد، همراه با تولید میزان قابل توجهی از زنجیره بتا می‌باشد. این نوع جهش‌ها را تحت عنوان β^{+} و β^{++} معرفی می‌کنند.
 ۲. همراهی تالاسمی بتا با تالاسمی آلفا در نتیجه جهش در ژن‌های آلفا گلوبین تولید زنجیره آلفا کاهش یافته که این امر به نوبه خود سبب کاهش عدم تعادل زنجیره‌های آلفا و بتا در ساختار هموگلوبین می‌شود.
 ۳. بیماران تالاسمی بتا دارای موتاسیون β^0 / β^0 بوده که همراه با افزایش هموگلوبین جنینی (Haemoglobin Fetal; HbF) می‌باشند (۱). البته مکانیسم‌های دیگری که سبب ایجاد تالاسمی اینترمدیا می‌شود نیز گزارش شده است که از فراوانی کمتری برخوردار می‌باشد (۲).
 افزایش بیان هموگلوبین جنینی یکی از فاکتورهایی است که باعث کاهش شدت بیماری تالاسمی ماژور و تبدیل آن به تالاسمی اینترمدیا

می‌شود. این افزایش بیان در بیماران مبتلا به حذف‌های بزرگ در ناحیه بتا گلوبین نظیر بیمارانی که همواره سطح بیان بالایی از هموگلوبین جنینی (Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin; HPFH) دارند و نیز بیماران مبتلا به تالاسمی دلتا-بتا دیده شده است. همچنین در برخی از بیماران که در ناحیه تنظیمی ژن گاما گلوبین آنها تغییرات نوکلئوتیدی اتفاق افتاده، گزارش شده است (Non-Deletional HPFH) (۳-۶). افزایش بیان هموگلوبین جنینی تحت تاثیر تغییرات پلی مورفیسمی ناحیه تنظیمی ۱۵۸-ژن G گاما گلوبین که محل اثر آنزیم هضمی XmnI است، نیز قرار می‌گیرد (۷). خوشه ژنی بتا گلوبین انسان دارای پنج ژن عملکردی است (5'-ε-Gγ-Aγ-β-3-δ') که در دوران تکوین به ترتیب بیان می‌شود. از مهم‌ترین عوامل کنترل این خوشه ژنی، ناحیه Locus Control region (LCR) است که حدود ۲۰-۶ کیلوباز بالادست ژن ایسیلون خوشه ژنی بتا قرار گرفته و دارای پنج جایگاه حساس به آنزیم DNase I (HS1-5) می‌باشد (۸، ۹). همچنین نواحی دیگر DNase I تحت عنوان HS-111 و HS1³ که به ترتیب در بالادست و پایین دست خوشه ژنی بتا گلوبین قرار گرفته‌اند، در بیان ژن‌های خوشه ژنی بتا گلوبین تاثیر دارند به طوری که براساس مطالعات انجام شده بر روی وضعیت کروموزومی خوشه ژنی بتا گلوبین در انسان و موش نشان داده شده است که این نواحی در

اولیه، ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴۵ ثانیه، ۵۹ درجه سانتی گراد به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۵ ثانیه در ۳۲ سیکل و بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه بود. پس از انجام تکثیر، محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد الکتروفورز شده و باندهای مربوطه پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید توسط نور ماوراء بنفش رویت گردید.

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار گرفته شده برای تکثیر نواحی HS-111 و 3'HS1 (۸).

اندازه محصول	توالی (۵'-۳')
۴۸۰ جفت باز	HS111R 5'-GAGAACCCTGTGAGTAAGGA-3' HS111F 5'-GCTTGGTGAAGTAGGAGATTTC-3'(8)
۳۶۴ جفت باز	3'HS1-R 5'-ACATTCTATTTGCCAAGG-3' 3'HS1-F 5'-GCCTACTT CAGGTTTGTGG-3'



شکل ۱: همکنش انواع مختلف نواحی حساس به آنزیم DNase I (HS) و ژنهای بتاگلوبین در سلولهای رده اریتروبییدی (۱۱).

غربالگری موتاسیون ها با استفاده از روش Single-Strand Confirmation Polymorphism (SSCP)

پس از تایید محصول PCR به وسیله الکتروفورز و اطمینان از عدم وجود باندهای غیراختصاصی، ۵ میکرولیتر از محصول PCR را با ۷ میکرولیتر از بافر بارگذاری SSCP (Bromophenol blue 0.05%, NaOH 10mM, Formamide 95%, Xylene cyanol 0.05%) مخلوط کرده و پس از حرارت در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه، بلافاصله به یخ منتقل شد. سپس در ژل ۸ درصد پلی آکریل آمید با نسبت ۲۹ به ۱ آکریل آمید/ بیس آکریل آمید با ولتاژ ۳۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت یک شب الکتروفورز انجام شد. جهت ظهور باندها از رنگ آمیزی نیترات نقره استفاده شد (۱۶).

تعیین توالی

در رابطه با ناحیه 3'HS1 بعد از تعیین تفاوت حرکتی در شرایط نرمال، هموزیگوت و هتروزیگوت در SSCP، تعدادی از نمونه‌ها که دارای الگوی حرکتی متفاوت و تکرارپذیر بودند با تعیین توالی و نتایج SSCP مقایسه شدند. با توجه به همخوانی نتایج، بقیه نمونه‌ها در این ناحیه

هم کنش با ناحیه HS5 در LCR و ژنهای خوشه ژنی بتاگلوبین، فرم فعال Chromatin Hub (CH) را تشکیل داده و باعث بیان مناسب ژنهای خوشه ژنی بتاگلوبین در زمان مناسب می‌شوند (۱۰-۱۲).

طی بررسی بیماران تالاسمی اینترمدیا در جمعیت ایران نشان داده شده است که درصدی از این بیماران در نتیجه موتاسیون β^0 بوده که در این شرایط هیچ گونه بیان یا بیان بسیار کمی از ژن بتاگلوبین ندارند و باید فنوتیپ این بیماران به صورت ماژور باشد اما به دلیل افزایش بیان هموگلوبین جنینی، به تالاسمی با شدت کمتری به نام تالاسمی اینترمدیا تبدیل شده‌اند. تنها فاکتوری که در رابطه با افزایش هموگلوبین جنینی در این جمعیت مورد بررسی قرار گرفته، فاکتور پلی مورفیک XmnI است که درصد بالایی از بیماران تالاسمی اینترمدیا در ارتباط مستقیم با پلی مورفیسم XmnI +/- بودند. اما با توجه به حضور این پلی مورفیسم در افراد نرمال عوامل دیگری در افزایش هموگلوبین جنینی نقش دارند (۱۳، ۱۴).

از این رو در این مطالعه فاکتورهای HS-111 و 3'HS1 انتخاب شد که ارتباط تغییرات نوکلئوتیدی آنها با افزایش بیان ژنهای گاماگلوبین در بیماران تالاسمی اینترمدیا (دارای موتاسیون β^0 به صورت هموزیگوت یا هتروزیگوت ترکیبی همراه با افزایش هموگلوبین جنینی) و بیماران تالاسمی ماژور و نمونه‌های کنترل مقایسه و آنالیز آماری مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها بیماران

در این مطالعه ۳۰ بیمار تالاسمی اینترمدیا (دارای دو موتاسیون β^0 به صورت هموزیگوت یا هتروزیگوت ترکیبی)، ۲۱ بیمار تالاسمی ماژور (با توجه به داده‌های خون شناسی و الکتروفورز هموگلوبین و یافته‌های بالینی مانند سن شروع تزریق خون و دفعات آن بر اساس نظر پزشک متخصص) و ۴۰ نمونه کنترل نرمال انتخاب شدند. این بیماران از بین بیماران مراجعه کننده به بیمارستان حضرت علی اصغر و کلینیک ژنتیک انستیتو پاستور ایران با روش سرشماری تصادفی انتخاب شدند.

پس از گرفتن تایید کمیته اخلاق انستیتو پاستور ایران و رضایت نامه از بیماران یا والدین آنها ۵ الی ۱۰ میلی لیتر خون از افراد گرفته و در لوله‌های حاوی Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid (EDTA) نگهداری شد.

تخلیص DNA

بعد از نمونه گیری، تخلیص DNA از لوکوسیت‌های خون محیطی با استفاده از روش Salting Out انجام شد (۱۵).

تکثیر نواحی HS111 و 3'HS1 با روش PCR

برای تکثیر نواحی مورد مطالعه واکنش PCR با محتویات زیر در حجم نهایی ۵۰ میکرولیتر انجام شد: ۱۰۰۰-۵۰۰ نانوگرم از DNA ژنومیک در محلول PCR شامل پنج میکرولیتر از بافر PCR (با غلظت نهایی ۵۰ میلی مولار KCl، ۱۰ میلی مولار Tris-HCl و MgCl_2 (50 Milli molar)، dNTP از ۲ میکرولیتر از (pH= ۸/۳)، ۰/۲ میلی مولار، ۱۰ پیکومول از هر کدام از پرایمرهای Forward و Reverse، آنزیم Taq DNA Polymerase به مقدار ۰/۵ واحد (سیناژن، ایران) اضافه شد. با استفاده از پرایمرهای جدول شماره ۱ قطعات ۴۸۰ جفت بازی HS-111 و ۳۶۴ جفت بازی 3'HS1 تکثیر شد. واکنش PCR طبق برنامه دمایی زیر صورت گرفت: ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۴ دقیقه به عنوان دمای واسرشت

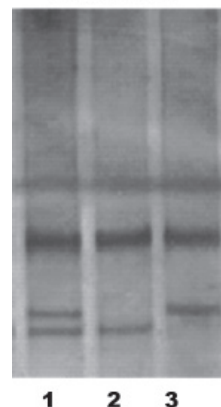
جدول ۲: اطلاعات ژنتیکی و هماتولوژی بیماران تالاسمی اینترمدیا و ماژور

موتاسیون‌های ژن بتاگلوبین تالاسمی اینترمدیا (تعداد)	میانگین HbF (%)	HS-111 (-21 A>G)	3'HS-1 (179 C>T)
۱۴ IVSII-1 (G>A)/IVSII-1 (G>A)	۶۷/۵	۹ A/A ۳ A/G ۲ G/G	11 C/C 3 C/T
۱ IVSII-1 (G>A)/CD22/23/24 -7bp (-AAGTTGG)	۶۲	A/A	C/C
۲ IVSII-I (G>A)/IVSI-110 (G>A)	۶۴	G/G	C/C
۲ IVSII-1 (G>A)/CD5-CT	۷۵	A/A G/G	C/C
۲ CD30 (G>C)/CD 30(G>C)	۷/۶۴	A/A	C/C
۱ IVSII-1 (G>A)/CD36/37 -T	۶۳	A/A	C/C
۱ IVSI-110 (G>A)/IVSI-11(G>A)	۵/۵	G/G	C/C
۱ IVSI-5(G>A)/IVSI-5(G>A)	۷۵	A/A	C/C
۱ IVSII-1 (G>A)/CD8/9 +G	۴	A/A	C/T
افراد نرمال (تعداد)			
۴۰	-	۱۴ A/A ۱۷ A/G ۹ G/G	۲۹ C/C ۱۱ C/T
تالاسمی ماژور (تعداد)			
۵ IVSI-5(G>A)/IVSI-5(G>A)	۱/۳	2 A/A 3 A/G	1 C/T
۲ IVSII-1 (G>A)/IVSII-1 (G>A)	۴	G/G	C/C
۲ CD8/9 +G/ CD8/9 +G	۱	G/G	C/C
۲ IVS1 -25 bp /IVS1 -25 bp	۱/۷	A/G A/G	C/C
۲ CD36/37 -T/ CD36/37 -T	۷	G/G	C/C
۲ IVSI-110 (G>A)/IVSI-110 (G>A)	۳	G/G	C/C
۱ CD30(G>C)/CD74/75-C	۴	G/G	C/T
۱ IVSII-745 (C>G)/CD36/37 -T	۳	A/G	C/C
۱ IVSII-I(G>A)/IVSI-110(G>A)	۳/۵	G/G	C/C
۱ CD36/37-T/CD8/9+G	۲/۵	A/A	C/T
۱ CD44-C/CD44-C	۲	A/A	C/C

واریانت مورد مطالعه دیگر HS-111 (-21A) می‌باشد که فراوانی آلل‌های همراه این واریانت در بیماران مبتلا به تالاسمی اینترمدیا $n=38$ (۶۳/۳ درصد)، تالاسمی ماژور $n=14$ (۳۳/۳ درصد) و افراد کنترل $n=45$ (۵۶/۳ درصد) است. همچنین در رابطه با واریانت HS-111(-21G) بیشترین فراوانی آن مربوط به بیماران تالاسمی ماژور $n=28$ (۶۶ درصد) بوده است. آنالیز آماری در رابطه با واریانت‌های A و

با استفاده از SSCP مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۲). همچنین ناحیه HS-111 در همه نمونه‌های مورد مطالعه بعد از تکثیر PCR تعیین توالی شد. برای تعیین توالی ۵۰ میکرولیتر از محصول PCR با استفاده از کیت (کیازن) خالص‌سازی شده با روش ختم زنجیره در دستگاه ABI 3730 XL sequencer به صورت تجاری انجام شد (۱۷).

3' HS1 C>T



شکل ۲: بخشی از ژل SSCP بر روی بیماران تالاسمی ماژور و اینترمدیا که پس از تعیین توالی تغییرات مربوط به ناحیه 3' HS1(179C>T) به صورت: ۱. هموزیگوت C/T، ۲. هموزیگوت T/T، ۳. هموزیگوت C/C نشان داده می‌شود.

آنالیز آماری

در آنالیز آماری برای تحلیل متغیرهای کیفی داده‌های به دست آمده، از تست Chi-Square و استفاده از نرم‌افزار SPSS (12/0) پردازش انجام شد که در پردازش تحلیلی مقادیر $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ژنوتیپ بیماران تالاسمی اینترمدیا انتخاب شد که به صورت هموزیگوت یا همترزیگوت ترکیبی بوده که ۴۶ درصد از بیماران دارای موتاسیون IVSII-1(G>A)/ IVSII-1 (G>A) بودند. این موتاسیون شایع‌ترین موتاسیون ژن بتاگلوبین است که در جمعیت بیماران تالاسمی ایران گزارش شده است (۱۸). در بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور بیشترین فراوانی موتاسیون ژن بتاگلوبین مربوط به IVS1-5 (G>C) در حالت هموزیگوت است (۲۵ درصد). همچنین حدود مقادیر هموگلوبین جنینی در بیماران مبتلا به تالاسمی اینترمدیا بین ۴ الی ۷۰ درصد و در تالاسمی ماژور پایین‌تر از ۳ درصد گزارش شد (جدول ۲).

در این مطالعه با استفاده از تکنیک SSCP و تعیین توالی، نواحی HS-111 و HS1*3 در ۳۰ بیمار تالاسمی اینترمدیا، ۲۱ بیمار تالاسمی ماژور و ۴۰ نمونه کنترل مورد بررسی قرار گرفت که نتایج به دست آمده نشان دهنده حضور دو نوع تغییر

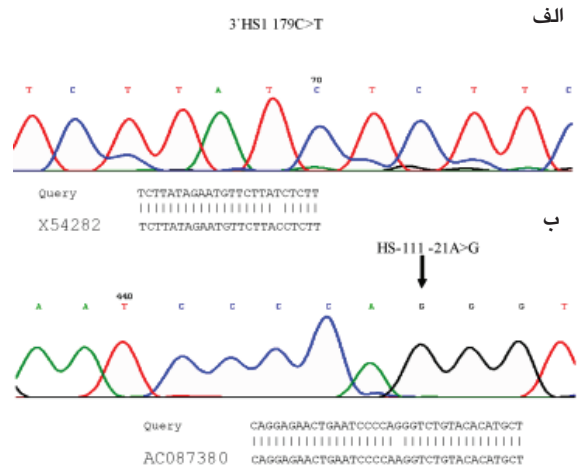
HS-111 (-21 A>G) (GeneBank ACC.NO.: AC087380) و 3' HS1 (+179 C>T) (GenBank Acc. No. : X54282) بوده است (شکل‌های ۲ و ۳).

فراوانی آلل‌های HS1 (179 T>3) در بیماران تالاسمی اینترمدیا، تالاسمی ماژور و افراد کنترل مورد بررسی قرار گرفت که به ترتیب، فراوانی آن در بیماران تالاسمی اینترمدیا $n=12$ (۲۰ درصد)، تالاسمی ماژور $n=3$ (۷/۱ درصد) و افراد کنترل $n=11$ (۱۳/۸ درصد) بوده است که از نظر آماری در هیچ کدام از گروه‌های مورد مطالعه معنی‌دار نبود ($p=0/186$).

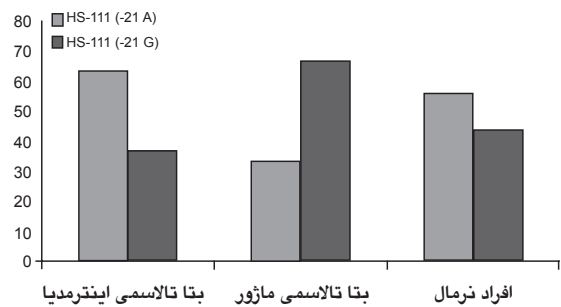
پلی مورفیسم GY-158 (C>T)، نواحی پروموتوری در ژن‌های Aγ و Gγ در بیماران HPFH همچنین ارتباط هاپلوتیپ‌های خوشه ژنی بتاگلوبین با افزایش هموگلوبین جنینی اشاره کرد (۸، ۲۰، ۲۱). تعیین مارکرهایی برای افتراق بیماران تالاسمی اینترمدیا β° همراه با افزایش هموگلوبین جنینی از بیماران تالاسمی ماژور در زمان تشخیص بسیار حایز اهمیت است. زیرا با انتخاب روش درمانی مناسب از عوارض افزایش میزان آهن در نتیجه تزریق زودرس و مستمر خون در بیماران تالاسمی اینترمدیا و یا عوارض ناشی از عدم دریافت به موقع و مستمر خون در بیماران تالاسمی ماژور جلوگیری می‌شود. اهمیت دیگر این مارکرها در ارتباط با همراهی آنها با پاسخ به درمان بیماران تالاسمی است. به طور مثال در رابطه با فاکتور پلی مورفیک XmnI در بیماران که این فاکتور در ژن Gγ آنها به صورت ++ باشد، پاسخ بهتری نسبت به داروی هیدروکسی اوره می‌دهد. این حالت بیشتر در بیمارانی دیده می‌شود که دارای ژنوتیپ IVSII-II/IVSII-I در ژن بتا بوده و به صورت تالاسمی اینترمدیا دیده می‌شوند (۲۲). اما مارکر XmnI (++) یک پلی مورفیسم است و در جمعیت نرمال نیز وجود دارد بنابراین اگر چه تمام فاکتورهای ژنتیکی ذکر شده در مطالعات کنونی مورد استفاده قرار می‌گیرند اما به تنهایی کافی نبوده و نتایج ضد و نقیضی ارائه می‌دهند. این مارکرها برای تقویت و تکمیل و تعیین فاکتورهایی ذکر شده است که در تمایز بیماران تالاسمی اینترمدیا از ماژور نقش داشته باشند. همچنین جهت بررسی مکانیسم افزایش هموگلوبین جنینی در بیماران تالاسمی اینترمدیا با ژنوتیپ β° و بررسی مارکرهای دیگر در داخل و خارج خوشه ژنی بتاگلوبین و همچنین در کروموزوم‌های دیگر از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. بنابراین با توجه به مطالعات گزارش شده در سال ۲۰۰۷ (۸) مارکرهای جدیدی تحت عنوان HS-111 و 3'HS1 مورد بررسی قرار گرفت. در مطالعه فوق مارکر 3'HS1(179 T) به عنوان واریانته جدید معرفی شد که ارتباط معنی‌داری با بیماران تالاسمی اینترمدیا در جمعیت یونانی داشت و این امر به طور کامل با نتایج به دست آمده ما متفاوت بود. به گونه‌ای که مارکر فوق در سه گروه از افراد مورد مطالعه معنی‌دار نبوده و در برابر مارکر HS111(-21 A>G) ارتباط معنی‌داری با بیماران تالاسمی اینترمدیا و ماژور داشته است. به صورتی که واریانته A در بیماران تالاسمی اینترمدیا و واریانته G در بیماران تالاسمی ماژور بیشترین فراوانی را داشته و ارتباط معنی‌داری را با این دو گروه از بیماران نشان می‌دهد.

در نتیجه می‌توان مارکر HS111(-21 A>G) را به عنوان مارکر پلی‌مورفیک دیگری معرفی کرد تا در کنار مارکرهای دیگر نظیر XmnI Gγ برای تمایز بیماران مبتلا به تالاسمی اینترمدیا با ژنوتیپ β° از بیماران تالاسمی ماژور ایرانی مورد استفاده قرار گیرد. شاید بتوان مکانیسم این پدیده را این گونه توجیه کرد که تغییر نوکلئوتیدی HS111(-21 A>G) ممکن است با تشکیل و فعال کردن Chromatin Hub با همکاری عوامل دیگر خوشه ژنی بتا باعث افزایش بیان ژن گاما گلوبین در نتیجه هم‌کنش بین این مارکر با LCR و پروموتور ژن گاما گلوبین شود. هر چند افزایش بیان هموگلوبین جنینی در نتیجه مکانیسم‌های پیچیده‌ای رخ می‌دهد و عوامل گوناگونی از جمله عوامل مربوط به توالی‌های Cis-acting و عناصر Trans-acting در شرایط استرس اریتروپویز در آن نقش دارند. اهمیت کلینیکی این یافته نشان می‌دهد که در ایران جمعیت افراد مبتلا به تالاسمی اینترمدیا بالا بوده بنابراین افتراق بیماران مبتلا به تالاسمی اینترمدیا از بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور به کمک این مارکر ژنتیکی معرفی شده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. همچنین این تحقیق دومین مطالعه بعد از مطالعه ژرینوز و همکاران است (۱۱) که نتایج متفاوتی

G ناحیه HS-111 در سه گروه مورد مطالعه معنی‌دار بود (p= ۰/۰۰۹) (جدول ۲ و نمودار ۱).



شکل ۳: الکتروفوروگرام تغییرات به دست آمده و Alignment توالی‌ها الف. تغییر در ناحیه 3'HS1 179C>T ب. تغییر در ناحیه HS-111 -21A>G



نمودار ۱: توزیع فراوانی آللهای HS-111 (-21 A/G) در سه گروه بیمار مورد مطالعه شامل بیماران تالاسمی اینترمدیا، تالاسمی ماژور و افراد کنترل نرمال

بحث

بیان ژن گاما گلوبین تحت تاثیر انواع فاکتورهای ژنتیکی، غیر ژنتیکی و ترکیبات دارویی مختلف قرار می‌گیرد. با افزایش بیان هموگلوبین جنینی حاصل از بیان ژن گاما گلوبین، می‌توان زنجیره‌های غیر متصل آلفا و عدم تعادل ایجاد شده را که منجر به رسوب هموگلوبین‌های غیرطبیعی و اریتروپویز غیر موثر می‌شود، را خنثی کرد. القای تولید هموگلوبین جنینی یکی از روش‌های درمانی مناسب برای بیماران مبتلا به تالاسمی ماژور است (۱۹). در این مطالعه بیشتر بیماران تالاسمی اینترمدیا انتخاب شده، دارای موتاسیون β° بوده و همانند بیماران تالاسمی ماژور حداقل بیان را داشته یا هیچ گونه بیانی از ژن بتا را نداشتند. تنها تفاوت آنها در میزان بیان ژن گاما گلوبین یا همان هموگلوبین جنینی است که درصد آن در بیماران تالاسمی اینترمدیا بالاتر بود.

علت افزایش هموگلوبین جنینی در بیماران تالاسمی اینترمدیا و انواع دیگر بیماری تالاسمی، ارتباط آن با فاکتورهای ژنتیکی متنوع بوده که در این زمینه مطالعات فراوانی صورت گرفته است. از جمله این تغییرات می‌توان به تغییرات نوکلئوتیدی بالادست ژن گاما گلوبین همانند

با قاطعیت بیشتری راجع به رابطه این تغییر ژنتیکی و بیماری تالاسمی اینترمدیا نظر داد. همچنین مطالعه بر روی جمعیت بیشتر مبتلایان می تواند محققین را به یک مجموعه مارکر جهت پیش گویی ایجاد تالاسمی اینترمدیا و یا پاسخ به داروهایی مانند هیدروکسی اوره راهنمایی کند.

تقدیر و تشکر

از همکاری کلیه بیماران و خانواده‌های محترم آنها، به خاطر در اختیار گذاشتن نمونه‌ها و همچنین از مساعدت همکاران گروه پزشکی مولکولی مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران تشکر و قدردانی می گردد.

References

1. Taher A, Isma'eel H, Cappellini MD. Thalassemia intermedia: revisited. *Blood Cells Mol Dis.* 2006; 37(1): 12-20.
2. Camaschella C, Cappellini MD. Thalassemia intermedia. *Haematologica.* 1995; 80(1): 58-68.
3. Oggiano L, Guiso L, Frogheri L, Loudianos G, Pistidda P, Rimini E, et al. A novel Mediterranean "delta beta-thalassemia" determinant containing the delta (+) 27 and beta (0) 39 point mutations in cis. *Am J Hematol.* 1994; 45(1): 81-84.
4. Blau CA, Stamatoyannopoulos G. Hemoglobin switching and its clinical implications. *Curr Opin Hematol.* 1994; 1(2): 136-142.
5. Katsube T, Fukumaki Y. A role for the distal CCAAT box of the gamma-globin gene in Hb switching. *J Biochem.* 1995; 117(1): 68-76.
6. de Vooght KM, van Wijk R, Ploos van Amstel HK, van Solinge WW. Characterization of the -16C>G sequence variation in the promoters of both HBG1 and HBG2: convergent evolution of the human gamma-globin genes. *Blood Cells Mol Dis.* 2007; 39(1): 70-4.
7. Gilman JG, Huisman TH. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. *Blood.* 1985; 66(4): 783-787.
8. Papachatzopoulou A, Kaimakis P, Pourfarzad F, Menounos PG, Evangelakou P, Kollia P, et al. Increased gamma-globin gene expression in beta-thalassemia intermedia patients correlates with a mutation in 3'HS1. *Am J Hematol.* 2007; 82(11): 1005-1009.
9. Feng YQ, Warin R, Li T, Olivier E, Besse A, Lobell A, et al. The human beta-globin locus control region can silence as well as activate gene expression. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(10): 3864-3874.
10. Tolhuis B, Palstra RJ, Splinter E, Grosveld F, de Laat W. Looping and interaction between hypersensitive sites in the active beta-globin locus. *Mol Cell.* 2002; 10(6): 1453-1465.
11. Patrinos GP, de Krom M, de Boer E, Langeveld A, Imam AM, Strouboulis J, et al. Multiple interactions between regulatory regions are required to stabilize an active chromatin hub. *Genes Dev.* 2004; 15; 18(12): 1495-1509.
12. Palstra RJ, Tolhuis B, Splinter E, Nijmeijer R, Gros-

veld F, de Laat W. The beta-globin nuclear compartment in development and erythroid differentiation. *Nat Genet.* 2003; 35(2): 190-194.

نتیجه گیری

پیشنهاد می شود بررسی بر روی این مارکر بر روی تعداد بیشتری از بیماران تالاسمی ماژور و اینترمدیا در مراکز دیگر کشور انجام شود تا بتوان

13. Haghi M, Feizi AA, Hartevelde CL, Pouladi N, Feizi MA. Homozygosity for a rare beta 0-thalassemia mutation [frameshift codons 25/26 (+T)] causes beta-thalassemia intermedia in an Iranian family. *Hemoglobin.* 2009; 33(1): 75-80.
14. Neishabury M, Azarkeivan A, Oberkanins C, Esteghamat F, Amirzadeh N, Najmabadi H. Molecular mechanisms underlying thalassemia intermedia in Iran. *Genet test.* 2008; 12(4): 549-556.
15. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3): 1215.
16. Karimipour M, Zeinali S, Nafissi N, Tuddenham EG, Lak M, Safaee R. Identification of factor IX mutations in Iranian haemophilia B patients by SSCP and sequencing. *Thromb Res.* 2007; 120(1): 135-139.
17. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology.* 1992; 24: 104-108.
18. Kiani A, Shirkhani Y, Delfan B, Kashi M, Mortazavi Y, Zeinali S. The Molecular analysis of β -thalassemia Mutations in Lorestan Province, Iran. *Yakkteh.* 2006; 8(2): 88-95
19. Papadakis MN, Patrinos GP, Tsaftaris P, Loutradi-Anagnostou A. A comparative study of Greek nondeletional hereditary persistence of fetal hemoglobin and beta-thalassemia compound heterozygotes. *J Mol Med.* 2002; 80(4): 243-247.
20. Samakoglu S, Philipsen S, Grosveld F, Luleci G, Bagci H. Nucleotide changes in the gamma-globin promoter and the (AT)_xNy(AT)_z polymorphic sequence of beta LCRHS-2 region associated with altered levels of HbF. *Eur J Hum Genet.* 1999; 7(3): 345-356.
21. Papachatzopoulou A, Kourakli A, Makropoulou P, Kakagianne T, Sgourou A, Papadakis M, et al. Genotypic heterogeneity and correlation to intergenic haplotype within high HbF beta-thalassemia intermedia. *Eur J Haematol.* 2006; 76(4): 322-330.
22. Akbari MT, Izadi P, Izadyar M, Kyriacou K, Kleanthous M. Molecular basis of thalassemia intermedia in Iran. *Hemoglobin.* 2008; 32(5): 461-470.