TIBBİ GENETİKTE ALGORİTMALAR

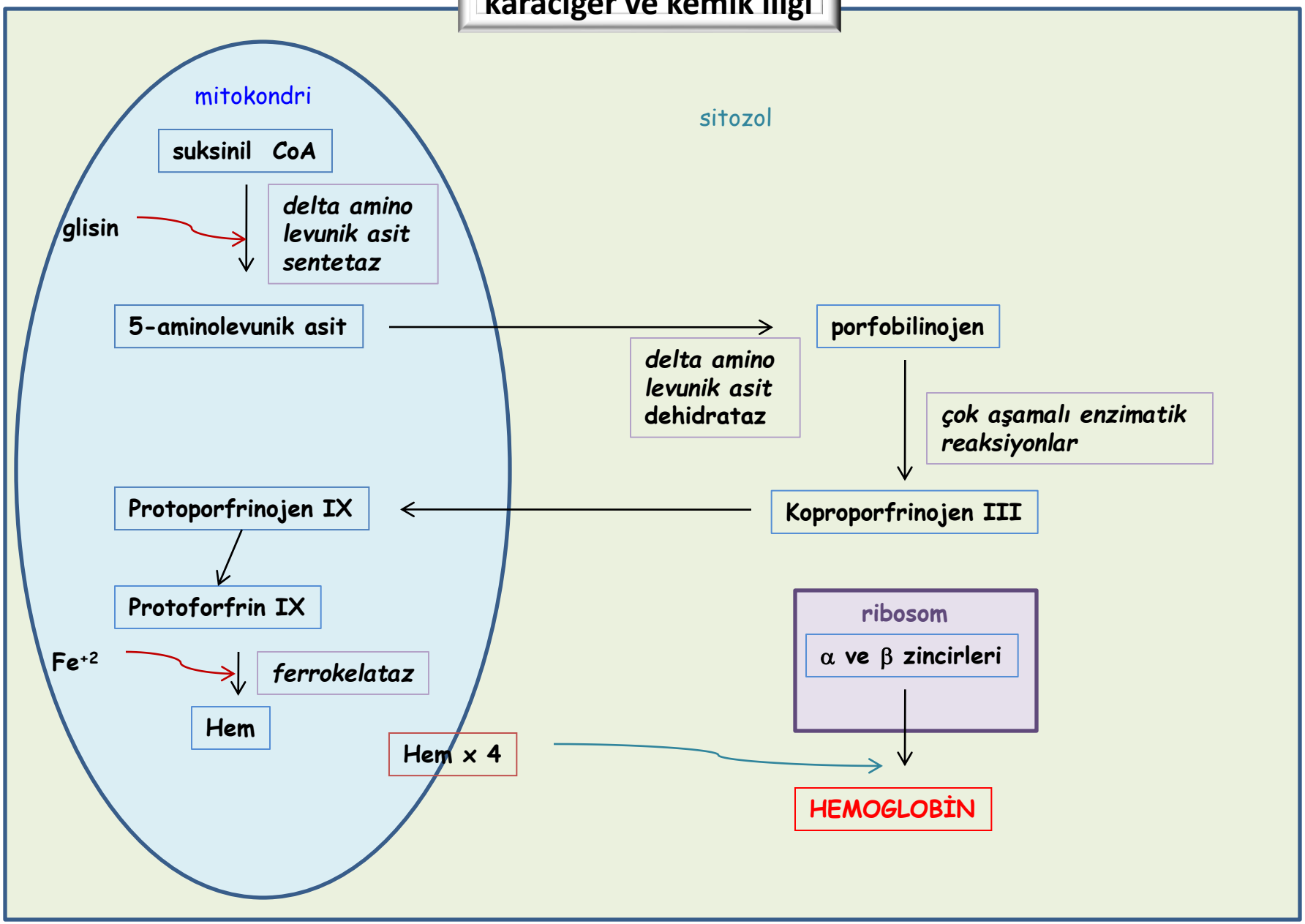
Hemoglobinopatiler

Z. Oya Uyguner
Tıbbi Genetik AD
İstanbul Tıp Fakültesi
03.06.2017-Ankara

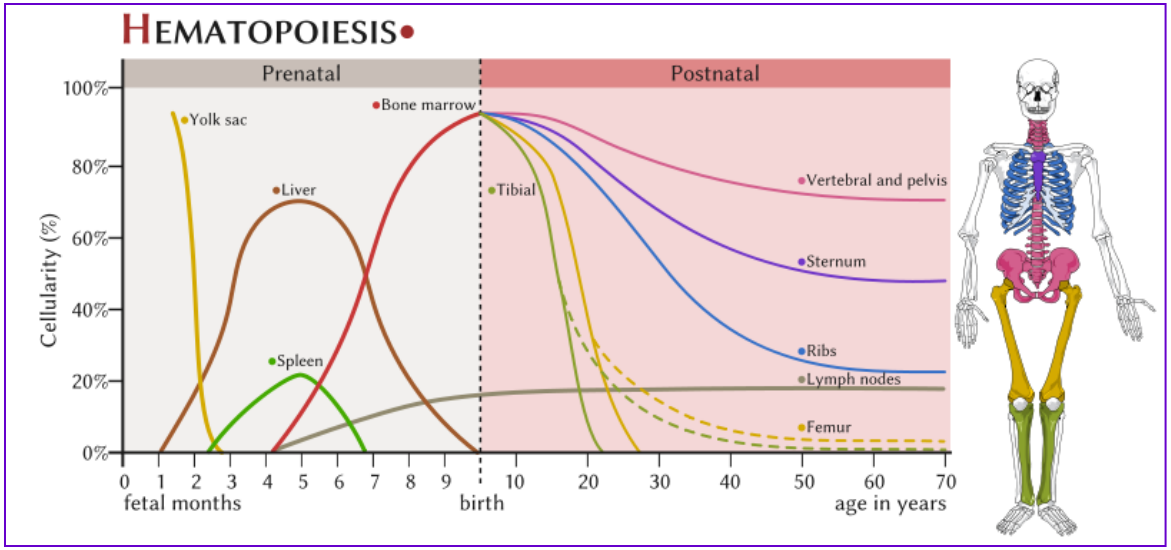
Hemoglobinopatiler

Hematopoietik sistemin bir hastalığıdır.

Hemoglobini oluşturan globin zincirlerinin sentezinde yetmezlik ve/veya fonksiyonunda anormallikler bu patoloji altında toplanır.

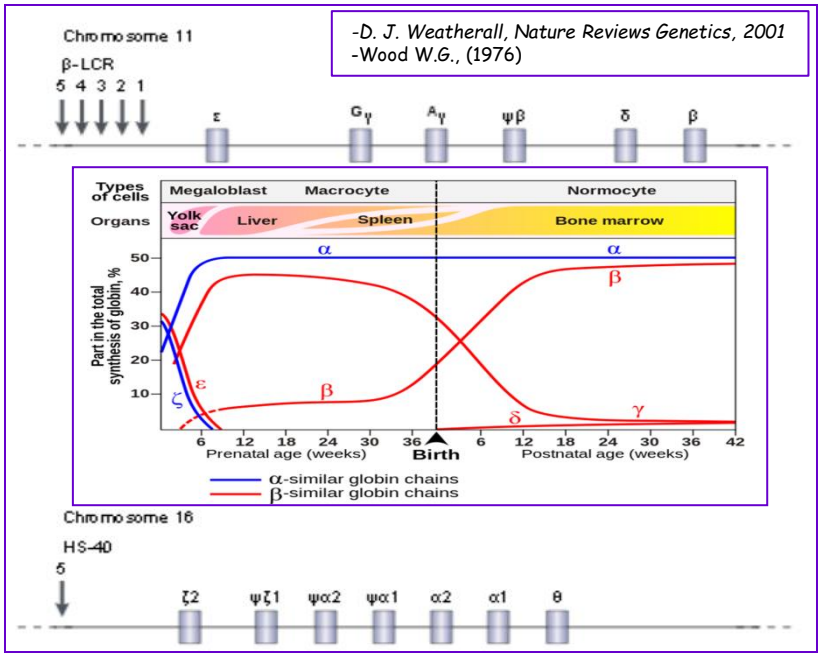

HEMOGLOBİN SENTEZİ
karaciğer ve kemik iliği
mitokondri
sitozol
suksinil CoA
glisin
delta amino levunik asit sentetaz
5-aminolevunik asit
delta amino levunik asit dehidrataz
porfobilinojen
çok aşamalı enzimatik reaksiyonlar
Protoporfrinojen IX
Koproporfrinojen III
Protoforfrin IX
Fe+2
ferrokelataz
Hem
Hem x 4
ribosom
α ve β zincirleri
HEMOGLOBİN

Globin genlerinin gelişim evrelerine ve dokuya özgün ekspresyonları, «Lokus Kontrol Bölgeleri (LCR)» ile düzenlenir



Medcial Illustratiopns by Michal Komorniczak's own work based on: B.F. Rodak, G.A. Fritsma. K. Doig: Hematology: Clinical Principles and Applications. 3rd ed.. Saunder, 2007. ISBN 9781416030065 Figure 7-1
R. Hoffman et al.: Hematology: Basic Principles and Practice, 5th ed.. Philadelphia: Churchill Livingstone, An Imprint of Elsevier, 2009. ISBN 978-0-443-06715-0.
I. Damjanov: Patofizjologia, Wrocław 2010, Elsevier Urban & Partner. ISBN 9788376092010

centromere



telomere

telomere

centromere

Embryonic

Hb Gower 1: $\zeta_2\varepsilon_2$

Hb Gower 2: $\alpha_2\varepsilon_2$

Hb Portland: $\zeta_2\gamma_2$

3-8. hafta yumurta kesesi

↓

Fetal

Hb F: $\alpha_2\gamma_2$

8-28. hafta Karaciğer, dalak

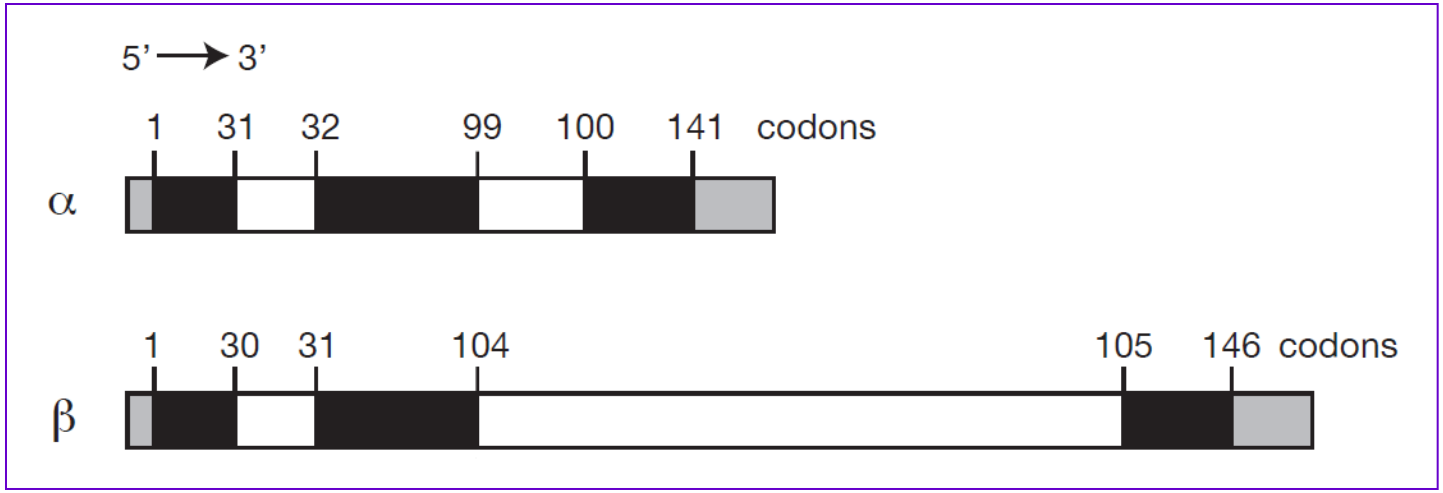
↓

Adult

Hb A: $\alpha_2\beta_2$

Hb A_2: $\alpha_2\delta_2$

yenidoğan kemik iliği


5' → 3'
1
31
32
99
100
141
codons
α
1
30
31
104
105
146
codons
β

Hemoglobinopatiler

Yapısal Varyantlar

Hemolitik anemilerle ilişkili, stabil olmayan, polimerize, rijit globin formları, orak hücre anemisi.

Oksijen transport/afinite bozukluğu

Normal MCV
Normal MCH
α/β oranı normal
(HbE, HbO hariç)

Talasemiler

- α talasemiler (α^+, α^0)
- β talasemiler (β^+, β^0)
- $\delta\beta$ talasemiler
- $\epsilon\gamma\delta\beta$ talasemiler

Kompleks talasemiler

↓MCV
↓MCH
α/β oranı bozuk

Fetal Hemoglobin Direnci

α/β Sentezi azalan zincire göre isimlendirilirler

Delesyona uğrayan genin adı ile isimlendirilir ($\delta\beta^0$ talasemi)

Hemoglobinopatiler

Dünyada en yaygın otozomal resesif tek gen hastalığı

269 milyon insan taşıyıcı[1]

Her yıl 200.000 hasta bebek doğumu[2]

Türkiye'de 1.300.000 β-talasemi taşıyıcısı ve 4.500 talasemi hastası[3]

[1]Angastiniotis M, et al, Ann N Y Acad Sci, 1998
[2]Wong LP, et al., BMC Public Health. 2011
[3]Türk Hematoloji Derneği

Ağır seyreden , prenatal tanı ve/veya PGD gerektiren hemoglobinopati formları

Talasemi major

Bi-allelik *HBB* mutasyonları (β^0, β^+), δβ-talasemi varyantları, Hb Lepore

Orak hücre sendromu

Hb^S/Hb^S, Hb^S/Hb^C, $Hb^S/Hb\beta^\beta$,$Hb^S/Hb^{D\text{-}Punjap}$, $Hb^S/Hb^{O\text{-}Arab}$, Hb^S/Hb^{Lepore}, Hb^S/Hb^E

HbE talasemisi

Hb^E/Hb^β

Hb Bart's hidrops fetalis sendromu

α^0 (--/--), nadiren HbH hidrops fetalis sendromu (--/$\alpha^T\alpha$, $\alpha^T\alpha/\alpha^T\alpha$)

Toplumumuzda β-talaseminin sağlık yükü α-talasemiye kıyasla çok daha fazla
Ağır formları daha yaygın

Türkiye'de evlilik öncesi hemoglobinopati taramaları 41 ilde var

İl-Bölge	Olgu sayısı	β-talasemi taşıyıcılığı	Orak hücre anemisi taşıyıcılığı	Kaynak
İçel	6.746	% 3.1	% 6.4	Kılınç M., et al, 1999
Denizli	19.804	% 2.6	% 0.11	Keskin A., et al, 2000
Denizli	14.200	% 2.2		Bolaman Z., et a,l 2001
Hatay	10.207	% 3	% 8	Gali E., et al, 2001
Konya	72.918	% 2	% 0.05	Güler E., et al, 2007
Erzurum	1.610	% 0.68	0	Acemoğlu H., et al, 2007
Kahramanmaraş	11.040	% 2.3	% 0.54	Güler E et al, 2008
Kocaeli	88.888	% 0.89	%.0.05	Sarper N., et al, 2009
Kayseri	10.261	% 1.71	% 0.01	Karakukcu C ., et al, 2012
Kadirli (Osmaniye)	1.994	% 4,91	% 0.01	Ulutaş KT, et al, 2014

Hastalık ve taşıyıcılık tanısı biyokimyasal hematolojik testlerle mümkün

(1) Tam Kan sayımı

MCV (mean cell volume): Hct/RBC
toplam paketlenmiş eritrosit hacmi (hematokrit)/toplam eritrosit sayısı x 10, femtolitre/hücre
Normal erkek: 89.1±5.01, Normal dişi: 87.6±5.5

MCH (mean cell hemoglobin): ort. Hb kütlesi/RBC, pikogram/hücre
Normal erkek: 30.9±1.9, Normal dişi: 30.2±2.1

Yüksek değerler: makrositik anemi (büyük eritrosit, yetersiz hemoglobin)
Vit B_{12} ve folik asit eksikliği (Megaloblastik anemi)
Düşük değerler: mikrositik anemi (küçük eritrosit, yetersiz hemoglobin)
Sideroblastik anemi (Kalıtsal ve kazanılmış nedenlere bağlı olarak hem sentezinin bozulması)
Talasemi
Demir eksikliği
Kronik hastalıklar

RDW (red cell distribution width)
Demir eksikliği↑
Kronik hastalıklarda ve kronik hastalıklarda, normal
Talasemide normal ve veya yüksek

(1) Özgün hematolojik testler, Talasemi taraması

HbEPG (Globinlerin elektroforezi): HbA2, HbF, varyant hemoglobinleri **(HPLC ve kapiler elektroforez**)

(3) Moleküler genetik testler, (*HBB*, *HBA1* ve *HBA2*)

Beta talasemilerde hemoglobin oranları (>12 ay)

	Normal	**Etkilenmiş Major Transfüzyona bağımlı**	**Etkilenmiş İntermedia Transfüzyona bağımlı değil ya da nadiren**	**Minör Taşıyıcı Hafif anemik**
		$\beta^{\circ}/\beta^{\circ}$ β°/β^{+}	β/β^{+} talasemi ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$) β/β° talasemi ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$) β/β° (?)	β/β° β/β^{+} β/β (?)
HbA ($\alpha_2\beta_2$)	%96-98	0	% 10-30	% 92-95
HbF ($\alpha_2\gamma_2$)	< % 1	% 95-98	% 70-90	% 0.5-4
HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$)	% 2-3	% 2-5	Değişik düzeylerde artma	> % 3.5

β-talasemi taşıyıcılığı ile tutarlı olmayan ve yorumlanması gereken bulgular

Table 4 Interpretations to consider when the haematology is not consistent with typical β-thalassaemia trait

Haematological parameters	*Possible interpretation*
Reduced red cell indices (MCV < 79 fl, MCH < 27 pg), normal Hb electrophoresis/HPLC/CE, normal %Hb A_2 & %Hb F)	(i) Iron deficiency
	(ii) heterozygous α-thalassaemia
	(iii) heterozygosity for mild β-thalassaemia variants (sometimes Hb A_2 is borderline raised)
	(iv) co-inheritance of heterozygous δ- with β-thalassaemia
	(v) heterozygous eγδβ-thalassaemia
Normal/borderline reduced red cell indices with raised Hb A_2	Interaction of α- with β-thalassaemia
	Carriers of β-thalassaemia with folic acid or vitamin B12 deficiency or hepatitis
Normal or reduced red cell indices with raised Hb F (>5%) and normal or low Hb A_2	Heterozygous δβ-thalassaemia, $^{A}\gamma\delta\beta$-thalassaemia or HPFH
Normal red cell indices with normal/borderline Hb A_2	Triplication of α-genes (when implicated in family studies), KLF1 variants or mild β-thalassaemia variant
Severely reduced red cell indices and raised Hb A_2	Multiple α-globin genes (>4) and heterozygous β-thalassaemia

Note 1: Some Hb variants are not detected by electrophoretic or chromatographic procedures, but may be suspected due to the presence of abnormal haematological parameters and/or clinical symptoms. In such cases it is recommended that samples are analysed using mass spectrometry or DNA methods. Occasionally hyperunstable variants are present and these may only be found by DNA methodology as the protein produced is so unstable.
Note 2: When evaluating cases be aware of potential complex genotype interactions.

EMQN (The European Molecular Genetics Quality Network) on haemoglobinopathies-2015

Normal ve/veya sınırda HbA_2 düzeylerinin gözlendiği *HBB* varyantları

Table 5 Genetic variations associated with normal/borderline Hb A2 levels—a guideline of related haematological and biosynthetic characteristics

Variation HGVS nomenclature NM_000518.4 (HBB)	*Variation traditional nomenclature*	*MCV fl*	*MCH pg*	*Hb A_2*	*α/β ratio*
c.−151C>T	β −101 (C→T)	88.5±7.8	30.1±1.0	3.1±1.0	1.3±0.4
c.−142C>T	β −92 (C(T)	83.0±6.0	28.3±2.0	3.5±0.4	1.3±0.8
c.−18C>G	β +33 (C(G)	82.0±9.2	27.1±3.4	2.5±1.4	1.3±0.6
c.316-7C>G	βIVS2-844 (C→G)	96.0±4.0	30.3±1.8	3.2±0.2	1.0±0.6
c.*6C>G	β +1480 (C→G)	88.3±9.5	27.9±6.0	2.7±0.8	1.6±0.4
	ααα/αα	85.5±7.8	30.4±5.0	2.8±0.6	1.2±0.4
	KLF1 variants (29)	82.7±5.7	27.8±2.2	3.6±0.2	
c.−50A>C	Cap+1 (A(C)	23–26*	75–80*	3.4–3.8*	—
c.92+6T>C	β IVS1-6 (T→C)	71.0±4.0	23.1±2.2	3.4±0.2	1.9±1.0
	δ+β thalassaemia	64.3±4.0	20.9±1.4	3.6±0.2	1.7±0.6

Values (mean ±2SD or range (*)) are a guideline and represent those reported in various studies on carriers of these variants (prepared by R Galanello).
Note: It is recommended that subjects with borderline Hb A2 levels, particularly if their partner is a typical β-thalassaemia carrier, should be extensively investigated (α and β gene analysis, globin biosynthesis), although the majority usually have normal HBB and HBA genes. Borderline-raised Hb A2 levels in normal individuals are usually explained as the extreme distribution of the normal range of the Hb A2.
Furthermore, in couples where one partner is heterozygous for a severe α-thalassaemia defect and the other is a β-thalassaemia carrier, it is recommended that the *HBA* gene cluster be fully characterized in the β-thalassaemia carrier in order to preclude any risk of offspring with severe Hb H disease or Hb Bart's hydrops.

β-globin gen kümesindeki, *BCL11A* (2p16) ve *HBS1L-MYB* (6q23) gen bölgelerindeki polimorfizmler HbF ekspresyonuna etki eder

Kruppel-like factor (19p13); *HBB* promotırına bağlanarak HBB ifadesini düzenler

EMQN-Best Practice Guidelines_2015

Yüksek ve düşük saptanan HbA_2 düzeylerinin genetik ve edinsel nedenleri

Increase (excluding β-thalssaemia variants)	**Reduction**
Genetic	***Genetic***
KLF1 variants	δ-thalassaemia
Triplicated α gene	δ-chain variants
Some unstable variants	α-chain variants
Hb variants eluting with or close Hb A_2	Hb Lepore[1]
	α-thalassaemia[2]
	δβ and γδβ thalassaemia; some mild β thalassaemia variants
Acquired	***Acquired***
Hyperthyroidism	Severe iron deficiency anaemia
Megaloblastic anaemia	Sideroblastic anaemia
Aplastic crisis in HS	Lead poisoning
Antiretroviral drugs	Leukaemia, aplastic anaemia
Pseudoanthoma elasticum	

Note 1: a) In Hb Lepore carriers, the expected parameters are: 2.0-2.5% Hb A_2, 1-3% Hb F, 3-5% Hb Lepore-Boston-Washington. However, falsely high Hb A_2 levels may be observed (up to 10-15%) when using HPLC, since Hb Lepore co-elutes with Hb A_2.

Note 2: Co-inheritance of α-thalassaemia, particular Hb H disease may reduce Hb A_2 levels.

Prenatal tanı ve/veya PGD önerilmesi uygun olan β-talasemi formları

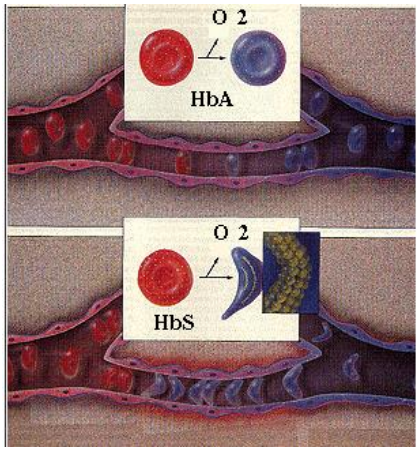
Table 1 **β-Thalassaemias and β-globin gene disorders—genotype interactions, disease states and recommendations for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis (PGD)**

Genotype interaction	*Disorder expected*	*Appropriate to offer PND*
Homozygous		
β° or severe β^{+}-thalassaemia	Thalassaemia major	Yes
Mild β^{+}-thalassaemia	Thalassaemia intermedia	Occasionally[a]
Mild β^{++}-thalassaemia (silent)	Very mild thalassaemia intermedia	No
$\delta\beta^{\circ}$-thalassaemia	Thalassaemia intermedia	Occasionally[a]
Hb Lepore	Thalassaemia intermedia to major (variable)	Occasionally[a]
HPFH	Not clinically relevant	No
Hb C	Not clinically relevant	No
Hb D-Punjab	Not clinically relevant	No
Hb E	Not clinically relevant	No
Hb O-Arab	Not clinically relevant	No
Compound heterozygous		
β°/severe β^{+}-thalassaemia	Thalassaemia major	Yes
Mild β^{+}/β° or severe β^{+}-thalassaemia	Thalassaemia intermedia to major (variable)	Occasionally[a]
Mild β^{++}/β° or severe β^{+}-thalassaemia	Mild thalassaemia intermedia (variable)	Occasionally[a]
$\delta\beta^{\circ}/\beta^{\circ}$ or severe β^{+}-thalassaemia	Thalassaemia intermedia to major (variable)	Occasionally[a]
$\delta\beta^{\circ}$/mild β^{+}-thalassaemia	Mild thalassaemia intermedia	Occasionally[a]
$\delta\beta^{\circ}$/Hb Lepore	Thalassaemia intermedia	Occasionally[a]
Hb Lepore/β° or severe β^{+}-thalassaemia	Thalassaemia major	Yes
Hb C/β° or severe β^{+}-thalassaemia	β-thalassaemia trait to intermedia (variable)	Occasionally[a]
Hb C/mild β^{+}-thalassaemia	Not clinically relevant	No
Hb D-Punjab/β° or severe β^{+}-thalassaemia	Not clinically relevant	No
Hb E/β° or severe β^{+}-thalassaemia	Thalassaemia intermedia to major (variable)	Yes
Hb O-Arab/β°-thalassaemia	Severe thalassaemia intermedia	Yes
$\alpha\alpha\alpha/\beta^{\circ}$ or severe β^{+}-thalassaemia	Mild thalassaemia intermedia	No
$\alpha\alpha\alpha\alpha/\beta^{\circ}$ and $\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha\alpha/\beta^{\circ}$-thalassaemia	Mild to severe thalassaemia intermedia (variable)	Occasionally[a]

Note: The decision to have prenatal diagnosis belongs to the couple, once they have had comprehensive counselling.
[a]Couples with genotypes that may lead to offspring with unpredictable phenotypes occasionally select to have prenatal diagnosis or PGD.

EMQN-Best Practice Guidelines_2015

Orak Hücre Anemisi
tanı için test tablosu



http://sickle.bwh.harvard.edu/scd_background.html

Anormal Globin β	> 6 aylık, saptanan hemoglobinler	Fenotip	≅ 2 yaş'da ve sonra Hematoloji değerleri	
			MCV (RBC büyüklüğü) ≥70; 6-12 aylık ≥72; 1-2 yaş ≥81; yetişkin	HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$) Normal; % 2-3
SS ($\beta^S\beta^S$)	Hb F, Hb S	6-12 aylık hemolitik anemi	Normal	<3.6%
S β°-thal ($\beta^S\beta^\circ$)			↓	>3.6%
S β+-thal ($\beta^+\beta^S$)	Hb F, Hb S, Hb A_2	Daha hafif anemi ve hemoliz	Normal / ↓	>3.6%
SC ($\beta^S\beta^C$) ($\beta^S\beta^{C,\ p.Glu7Lys}$)	Hb F, Hb S, Hb C			<3.6

Orak Hücre başka varyantlarla da görülebilir :
$\beta^S\beta^{D\text{-}Punjap,\ p.Glu121Gln}$, $\beta^S\beta^{OArab,\ p.Glu121Lys}$, β^S/β^{Lepore}, $\beta^S/\beta^{E,\ p.Glu27Lys}$ vs.

Prenatal tanı ve/veya PGD önerilmesi uygun orak hücre anemisi formları

Table 2 Sickle cell disorders—interactions and indications for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis (PGD)

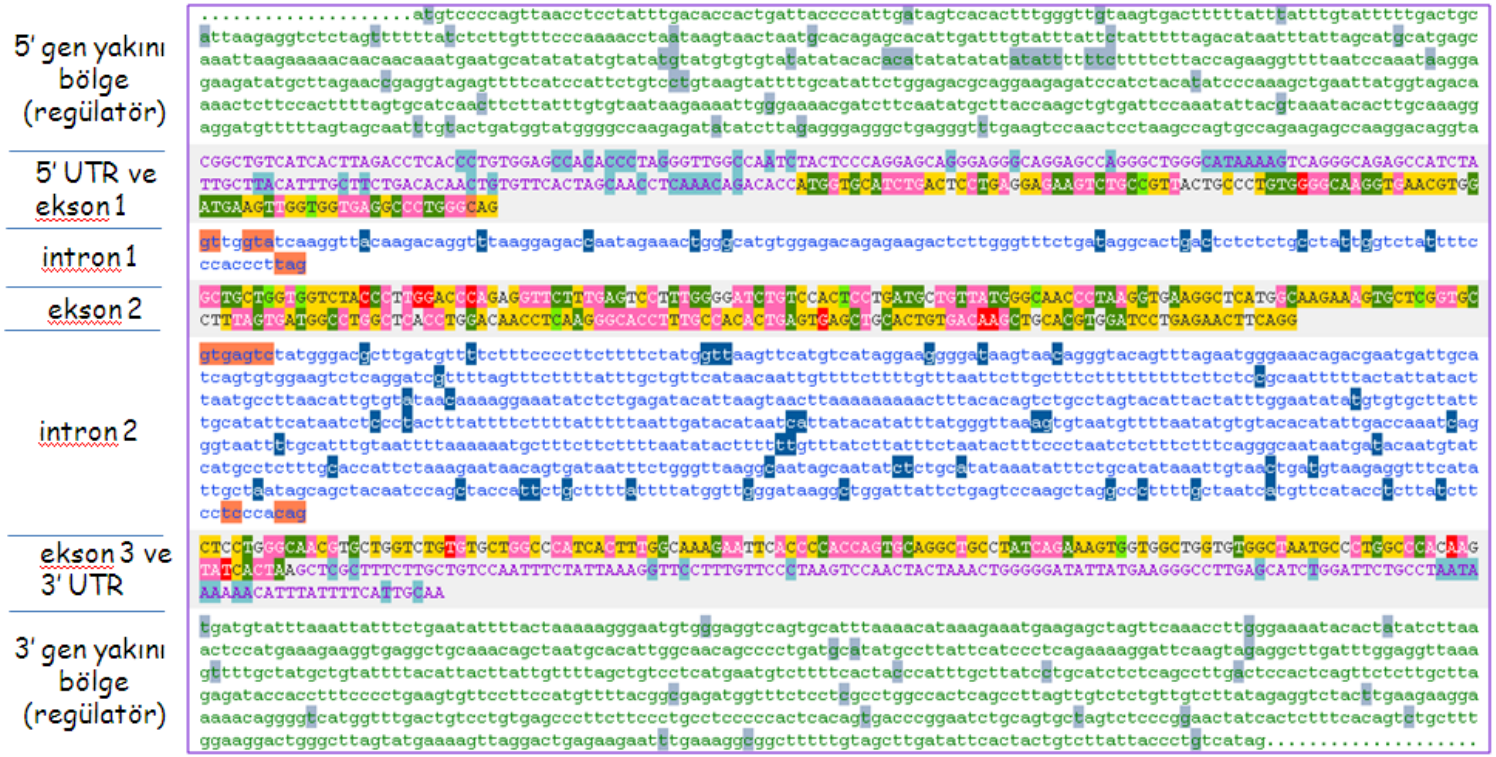
Genotype interaction	*Disorder expected*	*Appropriate to offer PND*
Homozygous		
Hb S	Sickle cell disease	Yes
Compound heterozygous		
Hb S/β° or severe β^{+}-thalassaemia	Sickle cell disease	Yes
Hb S/mild β^{+}-thalassaemia	Mild sickle cell disease	Occasionally[a]
Hb S/$\delta\beta^{\circ}$-thalassaemia	Mild sickle cell disease	Occasionally[a]
Hb S/Hb Lepore	Mild sickle cell disease	Occasionally[a]
Hb S/HbC	Sickle cell disease (variable severity)	Yes
Hb S/Hb D-Punjab	Sickle cell disease	Yes
Hb S/Hb O-Arab	Sickle cell disease	Yes
Hb S/Hbs C-Harlem, S-Southend, S-Antilles	Sickle cell disease	Yes
Hb C/Hb S-Antilles	Sickle cell disease	Yes
Hb S/Hbs Quebec-Chori, C-Ndjamena, O-Tibesi	Sickle cell disease	Yes
Hb S/Hbs I-Toulouse, Shelby, Hope, North Shore	Haemolytic anaemia	No
Hb S/Hb E	Mild to severe sickle cell disease	Occasionally[a]
Hb S/HPFH	Very mild sickle cell disease	No

Note: The decision to have prenatal diagnosis belongs to the couple, once they have had comprehensive counselling.
[a]Couples with genotypes that may lead to offspring with unpredictable phenotypes occasionally select to have prenatal diagnosis or PGD.

EMQN-Best Practice Guidelines_2015

HBB (NM_000518), reverse strand (Mayıs 2017)

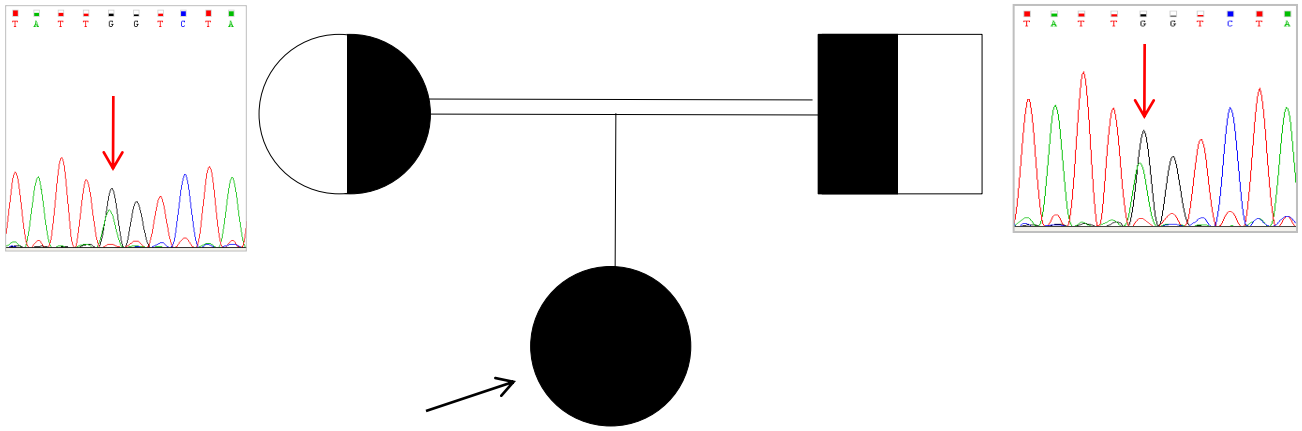
835 değişim (410 β talasemi, 312 varyant ve diğerleri)



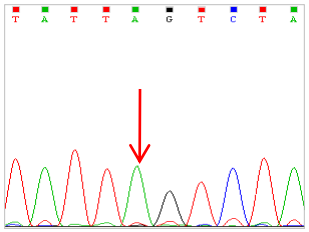
274 patojenik allelde, 35 farklı bilinen mutasyon + 2 yeni değişim

Mutasyonlar	tip	274 (n)	% (sıklık)
c.93-21G>A (IVS1+110G>A; rs35004220)	β^+	76	27
c.92+1G>A (IVS-I-1, rs33971440)	β^0	26	10
c.92+6T>C (IVS-I-6, rs35724775)	β^+	20	7
c.20A>T (p.Glu7Val, p.E7V, rs77121243, rs334)	β^S	10	7
c.25_26delAA (rs35497102, p.Lys9Valfs, CD 8 -AA)	β^0	19	7
c.135delC (p.ser45fs, rs80356820, rs35811659)	β^0	17	6
c.315+1G>A (rs33945777; IVS-II-1)	β^0	11	4
c.-80T>C (rs33980857)	β^0 ?	10	4
c.118C>T (p.Gln39Ter, p.Q40X rs11549407, rs76728603)	β^0	8	3
c.315+745C>G (rs34690599,IVS-II-745) + c.-31C>T	β^0	8	3
c.27dupG (rs35699606)	β^0	7	3
c.48G>A (p.Trp16Ter, p.W16X, rs34716011)	β^0	6	2
c.112delT (p.Trp38Glyfs, CD 36/37 -T, rs63750532)	β^0	6	2
Çeşitli boyutta delesyonlar (MLPA)	?	5	2
c.17_18delCT (p.Pro6fs, rs34889882)	β^0	5	2
c.-273T>C (rs139703273), **(MutationTaster: POLİMORFİZM, MAF % 0,01)**	?	3	1
c.364G>A (p.Glu122Lys, rs33946267, het N, Hom hafif anemik, HbS birlikteliği ağır orak hücre anemisi),, [G>C LA, Hom, het N)	variant Hb O-Arab	3	1
c.-138C>A (c.-88C>A, rs33944208)	β^+	3	1
c.90C>T (rs35578002, p.Gly30=; IVS1 ds C-T -3)	β^+	2	1
c.19G>A (HbC, HbS birlikteliği ağır hemoglobinopati)	variant HbC	2	1
c.*110T>C	β^+	2	1
c.85dupC	β^0	1	<1
c.-80T>A	β^+	1	<1
c.79G>A (rs33950507, p.Glu27Lys, homozigotluğu β/β$^+$ tablosu , başka bir mutasyonla birleşik heterozigotluğu β intermedia)	β^+ / HbE	1	<1
c.-78A>C	β^+	1	<1
c.68_74delAAGTTGG (CD 22/23/24)	β^0	1	<1
c.32C>A, het N	variant HbAnkara	1	<1
c.316-3C>A (IVSII-848, rs33913413)	β^+	1	<1
c.316-36C>T **(Mutation Taster analizi: POLİMORFİZM)**	?	1	<1
c.315+2T>A (rs63750283)	β^0 / β^+	1	<1
c.20delA (p.glufs, rs63749819)	β^0	1	<1
c.142G>A (p.Asp48Asn, rs33932070)	variant Hb G Cophenagen	1	<1
c.-137C>A (-87, rs33941377)	β^+	1	<1
c.114G>A (p.Trp37*)	β^0	1	<1
c.-151C>T (c.-101C>T, rs63751208)	β^+ or silent	1	<1
c.*111A>G (rs63751128)	β^+	1	<1

Beta Talasemi Major Tanısında Dizi Analizi Testi



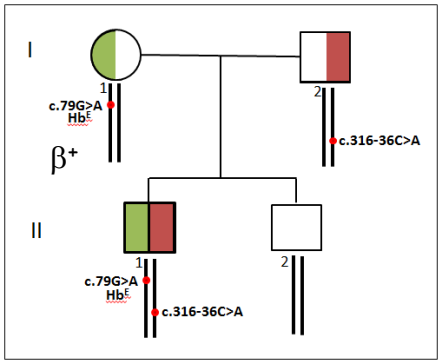
c.93-21G>A (IVS1+110G>A)



	Anne	İndeks	Baba
Mutasyon Genotip	Heterozigot B^+/B	Homozigot B^+/B^+	Heterozigot B^+/B
Hb elektr. HbA HbF HbA_2	 95,5 0,8 4,7	 74,7 23,7 2,7	 95,8 0 4,2

HBB#122

Geliş endikasyonu:
Anemi, HbE, HbA_2 yüksekliği



novel

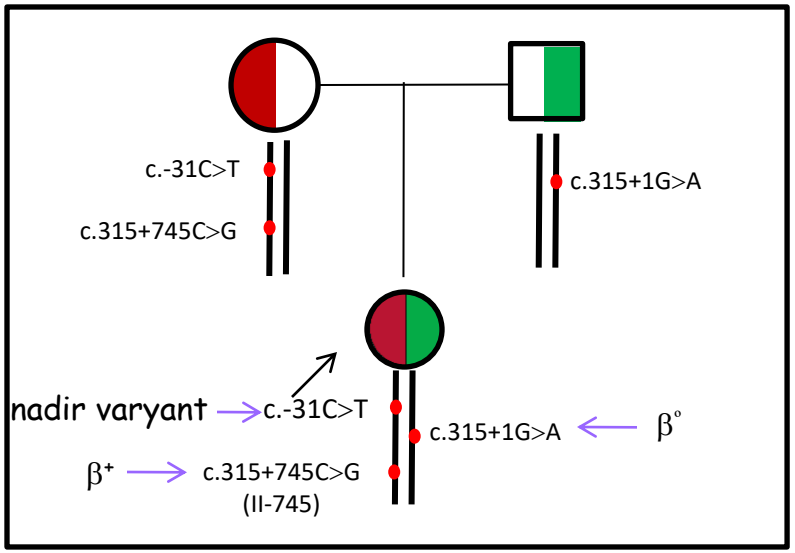
ITF,
Pediatrik Hematoloji

	Anne (I:1)	Olgu I:1 (22 aylık)	Kardeş (II:2) (28 aylık)	Baba (I:2)
Red Blood Cell (x10^6/ml)	5.37 (↑)	5.2 (↑)	5.8 (↑)	5.6
MCV fl Normal E:89.1±5.01 Normal K:87.6±5.5 Major:50-70, Minör:<79	67 (↓)	60.1 (↓)	56.1 (↓)	86.2
MCH pg Normal E:30.9±1.9 Normal K:30.2±2.1 Major:12-20, Minör:<27	22 (↓)	19.8 (↓)	17.9 (↓)	28
Hemoglobin g/dl Normal E:15.9±1.0 Normal K:14.0±0.9 Major: <7, Minör E:11.5-15.3 Minör K:9.1-14	11.8	10.4	10.3	14.2
Hemoglobin A Normal: 96%-98% b°/b°: 0, b°/b⁺ ve b⁺/b⁺:10%-30% Minör:92%-95%	75.8 (↓)	69 (↓) 75.6→Doğum	92.8	96.6
Hemoglobin F Normal: <1% b°/b°:95%-98% , b°/b⁺ ve b⁺/b⁺:70%-90%, Minör:0.5%-4%	0.5 (↑)	2.5 (↑) (1.5→doğum)	2.0	-
Hemoglobin A2 Normal: 2%-3% b°/b°:2%-5% , b°/b⁺ ve b⁺/b⁺:2%-5% , Minör:>3.5%	2.2	4.7 (↑)	3.4	3.3
Hemoglobin E	22.2	17 (22.1→doğum)		-

*Literatürde β talasemi major tanılı bir olguda kodon33/34delGTG ile *cis*, c.79G>A ile *trans* pozisyonda gösterilmiştir (Nuntakarn L, et al, Blood Cells, Molecules & Diseases, 42(1), 32-5, 2009).

HBB#63

Geliş endikasyonu:
βTalasemi major



	Olgu (5 aylık) [c.-31C>T + c.315+745C>G] + [c.315+1G>A] Nadir varyant β⁺ β⁰
Red Blood Cell (x10⁶/ml)	3.66
MCV fl Normal E:89.1±5.01 Normal K:87.6±5.5 , Major:50-70, Minör:<79	74.1 (↓)
MCH pg Normal E:30.9±1.9 Normal K:30.2±2.1 , Major:12-20, Minör:<27	26 (↓)
Hemoglobin g/dl Normal E:15.9±1.0 Normal K:14.0±0.9 , Major: <7, Minör E:11.5-15.3 Minör K:9.1-14	9.53 (↓)
Hemoglobin A Normal: 96%-98%, b°/b°: 0, b°/b⁺ ve b⁺/b⁺:10%-30% Minör:92%-95%	
Hemoglobin F Normal: <1%, b°/b°:95%-98% , b°/b+ ve b+/b+:70%-90%, Minör:0.5%-4%	85
Hemoglobin A2 Normal: 2%-3%, b°/b°:2%-5% , b°/b+ ve b+/b+:2%-5% , Minör:>3.5%	2.2

Kompleks Talasemiler

▪*HBB* gen kümesindeki delesyonlar ile ilişkilidir.

•Delesyona uğrayan genin adı ile isimlendirilir ($\delta\beta^0$ talasemi).

•$\delta\beta^0$ olan homozigotlarda δ ve β globin zinciri üretilmez (HBF↑). Bu durumu γ ekspresyonu kompanze etmeye çalışır. Talasemi intermedia kliniği beklenir.

•5' bölgesini ortadan kaldıran delesyonlar →HBF↑ + HBA2↑, hafif anemik.

•$\gamma^A\delta\beta^0$ heterozigotlarda γ^G ekspresyonu vardır. $\varepsilon\gamma\delta\beta^0$ ve $\gamma\delta\beta^0$ heterozigotları anemik tablo sergilerler.

•HPFH

•c.-210C>T (Gγ-158C>T) (en yaygın)

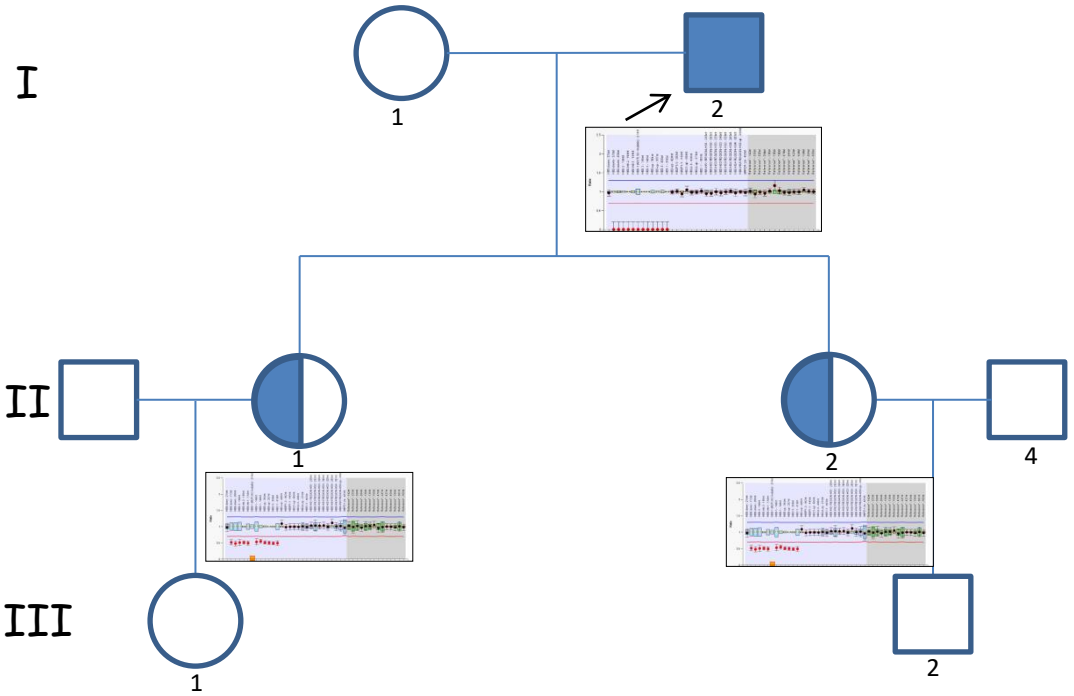
→ [β/β, β/β^+, β/β°] + eritropoetik stres → HBF↑ (Talasemi major fenotipi)

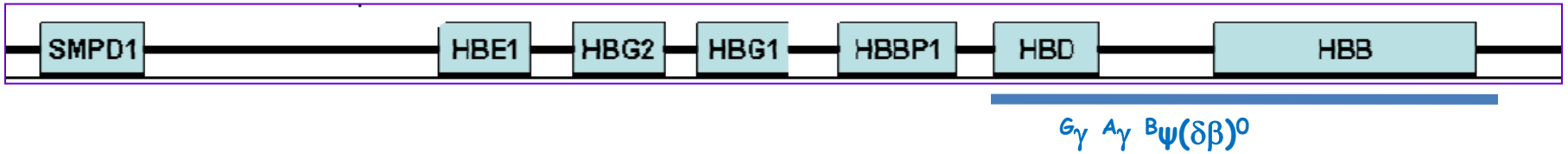
•Bazı HBB varyantları ile birlikteliği hafif fenotipe yol açar.

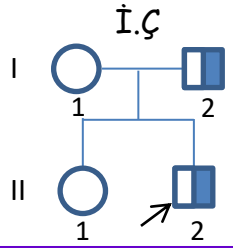
MLPA ekzon ve daha büyük boyuttaki delesyon/duplikasyonları gösteren en geçerli yöntemdir

	Klinik	R B C	MCV	MCH	Hg	Hb A, %	Hb F, %	Hb A2, %
I-2 66 yaş	Sekonder Hemokromatozis Hemoglobinopati	3,7	84↓	27,1↓	9,9	98,2 Abn Hg	87,2↑	1,8
II-I 45 yaş	halsizlik/solgunluk	5,5↑	68↓	21,6 ↓	11,9	85,6↓	12,2↑	2,2
II-3 41 yaş	halsizlik/solgunluk	?	?	?	?	?	?	?

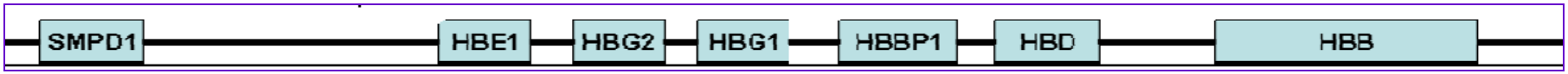
<u>İndeks</u>
- ✓ 66 yaş
- ✓ HFE'de mutasyon yok
- ✓ Eritrosit transfüzyonu almamış



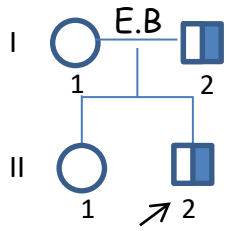




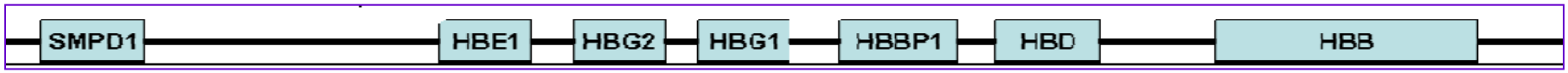
	RBC	MCV	MCH	Hb	HbA	HbF	HbA2
II:2	5,28	62,4↓	20,5↓	10,8↓	87,4↓	9,1↑	3,4



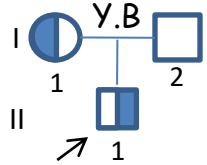
$^{G}\gamma(^{A}\gamma^{B}\psi\delta\beta)^{0}$



	RBC	MCV	MCH	Hb	HbA	HbF	HbA2
I:2	6,8	46,9↓	22,6↓	15,5↓	?	10,2↑	2,3
II:2	5,7	59↓	18,9↓	9,8↓	79,2↓	18,5↑	2,3



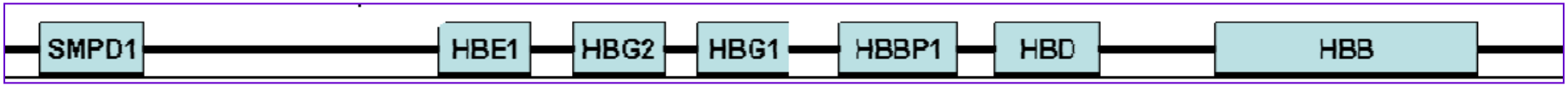
$^{G}\gamma\ ^{A}\gamma\ ^{B}\psi(\delta\beta)^{0}$



6 yaş

β talasemi taşıyıcılığı ?

	RBC	MCV	MCH	Hb	HbA	HbF	HbA2
I:1	4,18	84,9	29,1	12,2	97,1	?	2,8
II:1	5,1	59,6↓	19.7	10.1↓	N	?	3,1

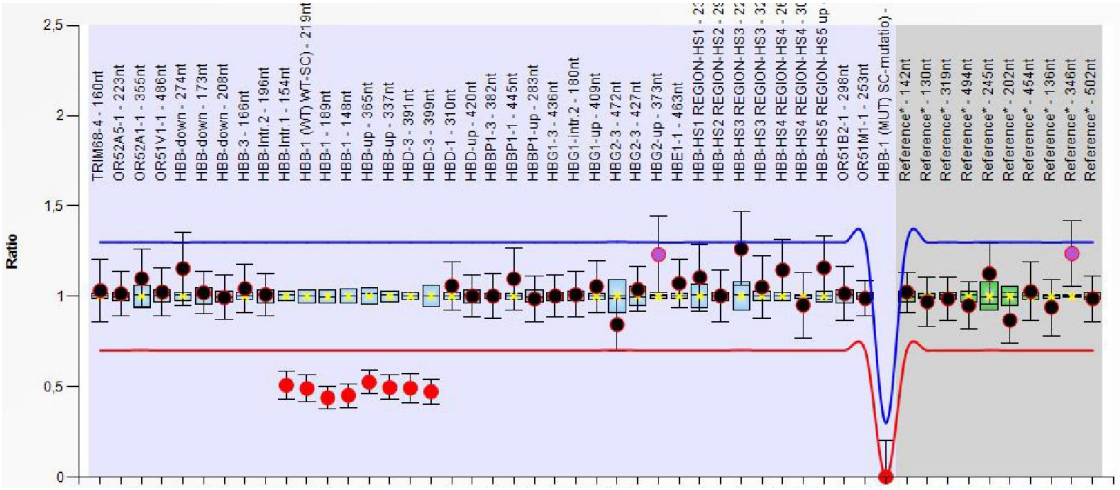


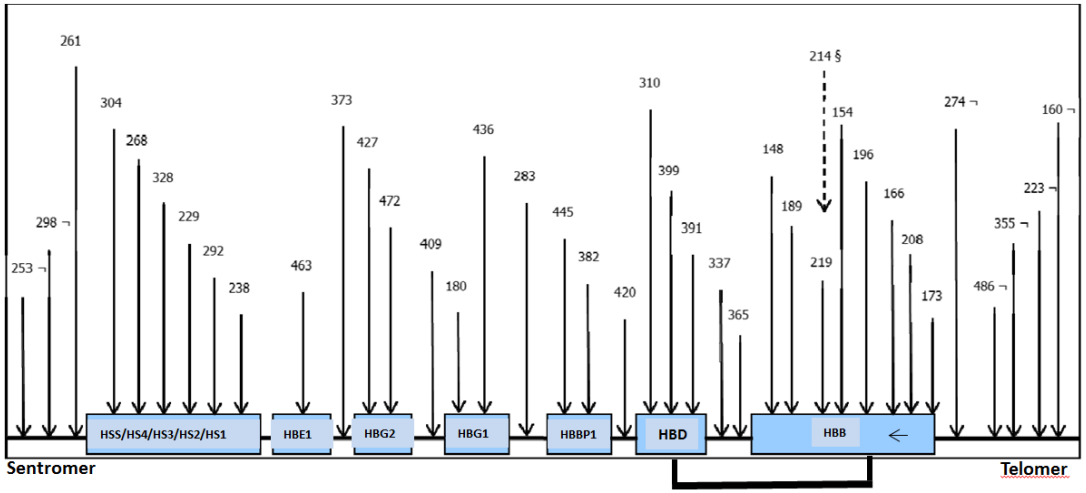
HBB promoter (2,5-1,8 kb ?)

HBB-MLPA, nadir varyantların moleküler tanısına yardımcı olur. Hemoglobin LEPORE

Beta globin gen bölgesi için yapılan MLPA analizinde ***HBD*** **geni ekzon 3'den başlayarak** ***HBB*** **geni intron 1 bölgesine kadar uzanan heterozigot delesyon** saptandı.

Bu sonuç, **heterozigot HBD-HBB gen füzyonu ve Hb-Lepore varyantı** ile uyumludur.





$\varepsilon^{G}\gamma^{A}\gamma^{B}(\delta\beta)^{o}$

Beta talasemide fenotip-genotip korelasyonu

-çok etmenli ve kompleks-

1. düzey

Mutasyon çeşitliliği ve etki gücü

Hafif → Ağır

beta globinin az üretilmesinden hiç üretilmemesine kadar geniş bir spektrum

(β^+/β^+, β^+/β°, β°/β°, β^E/β^E, β^E/β°, β^E/β^+)

2. düzey

HBA dozu

HbF perzistanslığı

modifiye edici genler

3. düzey

Globin genleri dışındaki faktörler

Güçlü *HBB* mutasyonları beklenen β talasemi fenotipini ağırlaştırır

Genelde ekson 3 de
çerçeve kayması, ‘dur’ kodonu ve ‘indel’ mutasyonları

Hiper unstabil hemoglobin
(İnklüzyon cisimcikli β talasemi)

‘α globin doz artışı’
beklenen β talasemi fenotipini ağırlaştırır

α-globin gen kümesi duplikasyonu
‘aaa /aaa’ ya da ‘aaaa/aa’

+

β^+/β

↓

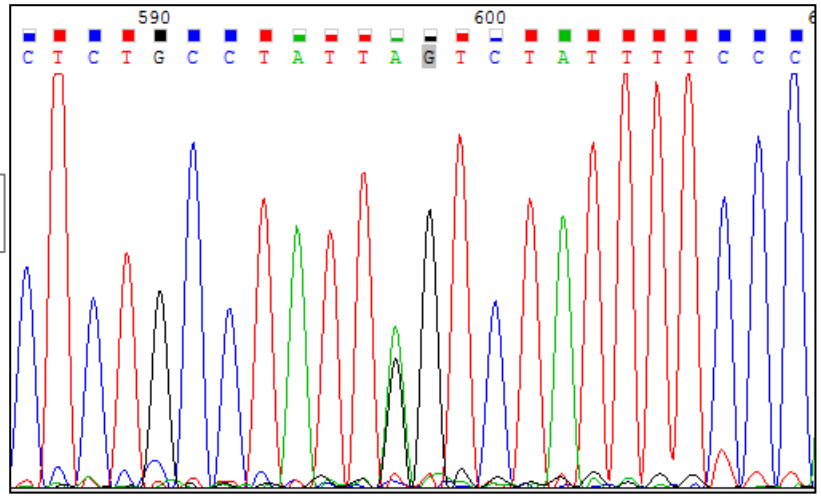
β talasemi intermedia

Fenotipin Genotip İle Uyumlu Olmadığı Durumlarda Başka Testler Önerilebilir

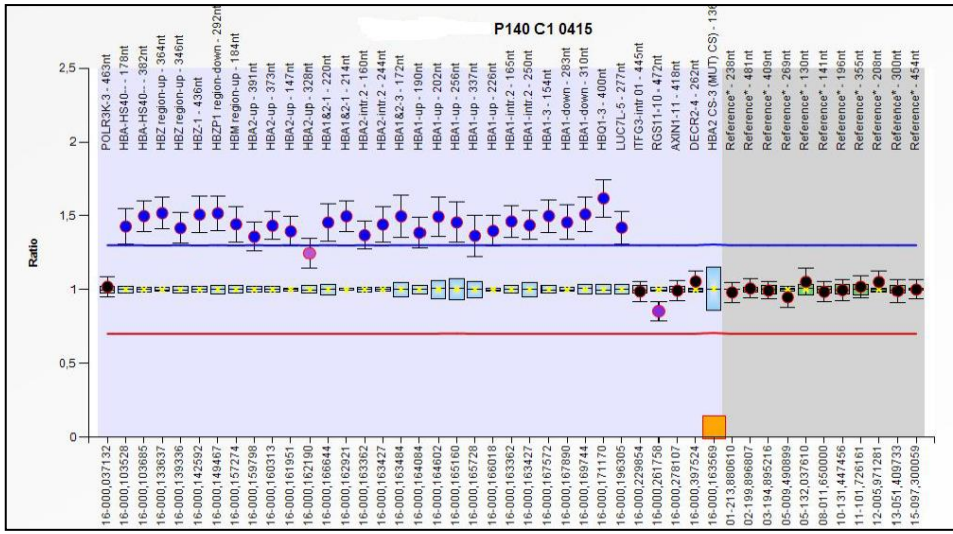
Endikasyon: Beta Talasemi intermedia

heterozigot
c.93-21G>A (IVS-I-110)

β/β⁺

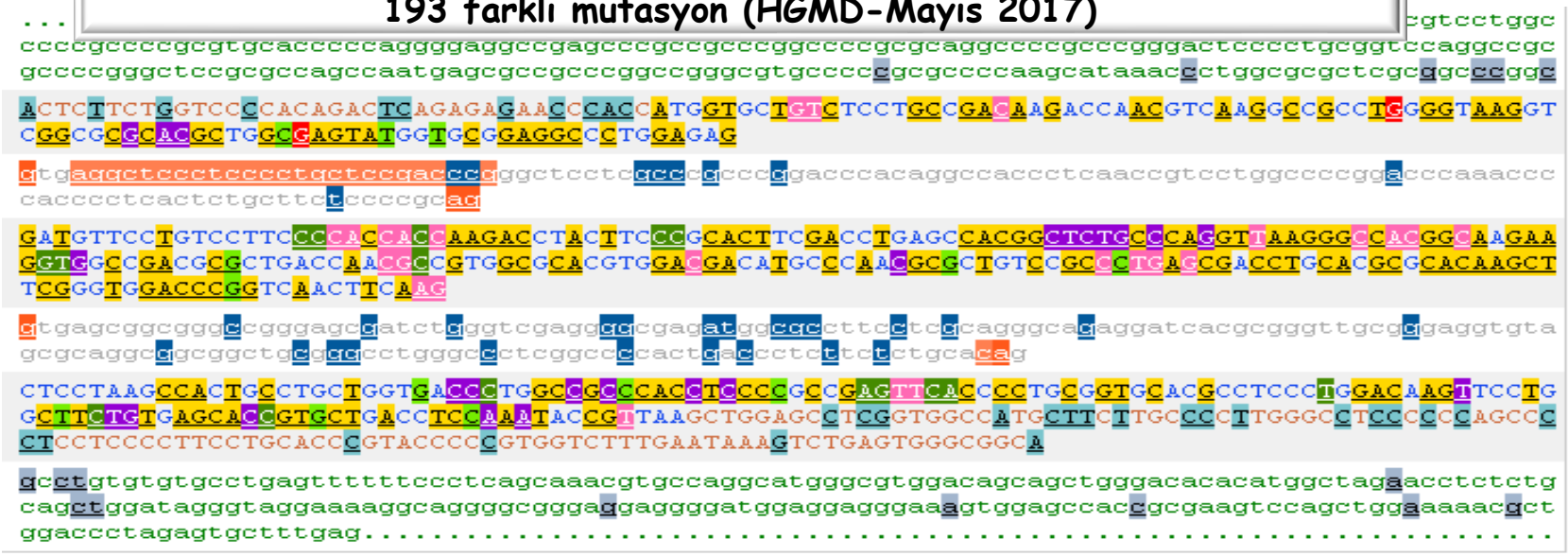


Alfa triplikasyon



α gen dozundaki artış **α/β** oranının artmasına yol açacağından, bu incelemede elde edilen sonuçlar **Beta Talasemi İntermedia kliniği** ile uyumludur.

HBA1 (NM_000558), forward strand
193 farklı mutasyon (HGMD-Mayıs 2017)



HBA2 (NM_000517), forward strand
259 farklı mutasyon (HGMD-Mayıs 2017)

α TALASEMİ

İki önemli kliniği vardır

Hemoglobin Barts (γ_4)
En ağır formudur.
α genlerinin dördü de yoktur.
ABO ve Rh uyumsuzluğu sorunu yokken
13-14 GH da işaret verir
22-28 GH da USGde belli olur:
- Ödem
- Asit
- Plevral ve perikardiyal efüzyon
- Ağır hipokromi

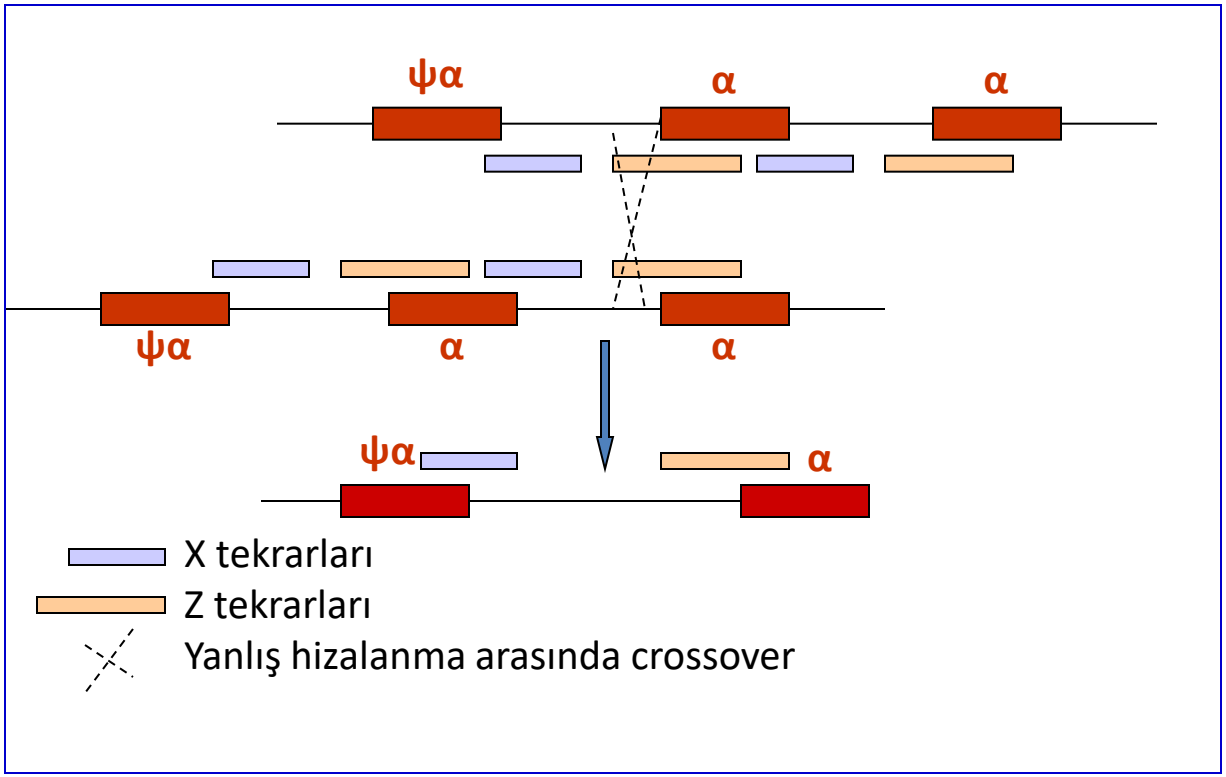
Neonatal periyotta fetal kayıp.

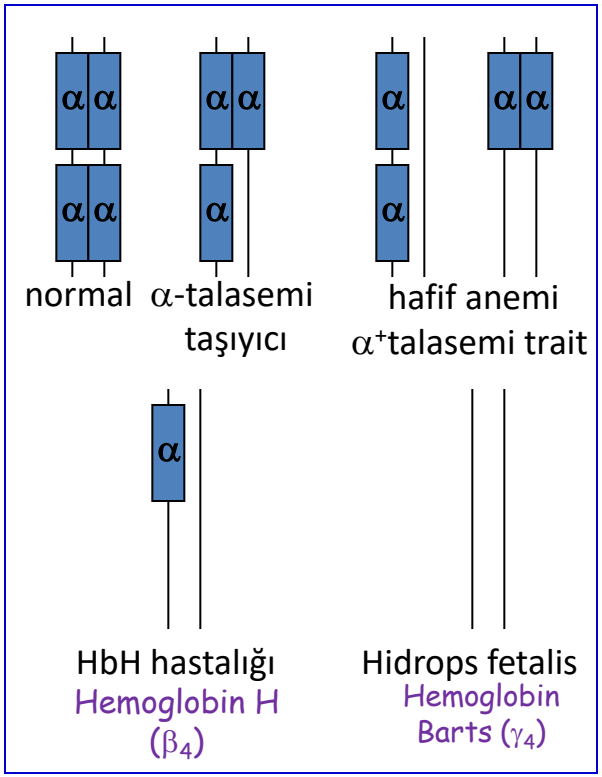
Hemoglobin H (β_4)
Bebeklik, çocukluk ya da yetişkin evrede ortaya çıkabilir.
Bir α geni vardır.
Hafif ve orta şiddette Mikrositik, hipokromik, hemolitik anemi, hafif talasemik kemik değişimleri

Hemoglobin Type	Normal	Affected		Carrier	
		Hb Bart hydrops fetalis syndrome [1]	HbH disease [2]	Alpha-thalassemia trait [3]	Alpha-thalassemia silent carrier [4]
HbA ($\alpha_2\beta_2$)	96%-98%	0	60%-90%	96%-98%	96%-98%
HbF ($\alpha_2\gamma_2$)	<1%	0	<1.0%	<1.0%	<1.0%
Hb Bart (γ_4)	0	85%-90%	2%-5%	0	0
HbH (β_4)	0	0	0.8%-40%	0	0
HbA2 ($\alpha_2\delta_2$)	2%-3%	0	<2.0%	1.5%-3.0%	2%-3%

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1435/

NON-ALLELIK Homolog Rekombinasyon (NAHR)
α-Talasemide α globin gen delesyonu, tekrarlayan X ve Z dizilerinin mayozda yanlış eşleşmesi sonucu ortaya çıkar





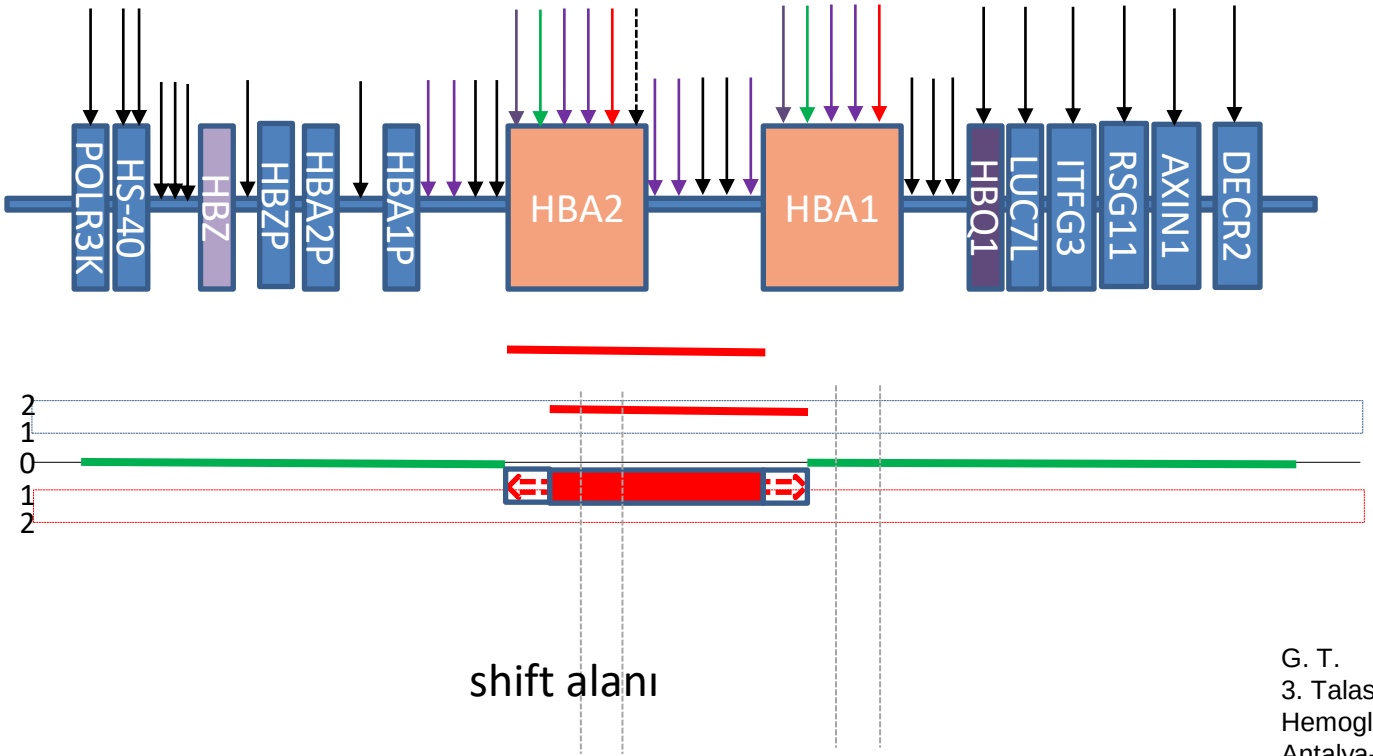
Rekombinasyonda, yanlış eşleşme farklı kromozom bölgesinde aynı diziye sahip bölgeler arasında gerçekleşir.

Hastalıkla ilişkili mutasyonların % 90 ı delesyon (MLPA), % 10 u HBA1 ve HBA2 (Dizi) genlerindeki mutasyonlarla ilişkilidir.

α Talasemi tanısına moleküler yaklaşım

MLPA ve dizi analiz uygulamaları ile etkili sonuçlar almak mümkün

- -α3.7^{D} delesyonları kendi arasında ne kadar klinik değişiklik gösteriyor ?
- -α3.7^{D} ve -α$^{20.5}$ delesyonlarını taşıyan bireyler arasında fenotipik benzerlik ?
- Duplikasyonların alfa talasemi fenotipindeki ağırlığı?



71 olgu; Alfa talasemi, mikrositer anemi, hipokromik mikrositer anemi, anemi
(32 olguda mutasyon %45; % 6,4 nokta mutasyonu, % 93,6 delesyon)

n	mutasyon	genotip	Fenotip	HBA2	HBA	HBF	HBS	RBC	Hgb	MCV	MCH	MCHC
12*	Het. del -$\alpha^{20.5}$	- - /αα	Trait	2,3	77,5	0,3	0	5,4	10,4	59,9 (55,9-62,4)	18,9	31,5
8	Het. -α3.7^{D}	- α/αα	Sessiz	2,1	97,4	0,4	0	5,0	11,5	69,6 (66,5-72,9)	22,9	32,8
2	Homozigot -α3.7^{D}	- α/- α	Trait	2,05	97,95	-	-	5,3	11,65	68,8	21,85	31,75
1	α 4,2^{B}/MED^{1}	- α/- -	HbH	1,9	98,1	0	0	5,1	7,8	54	15,3	28,3
1	-α3.7^{D}/-α20.5	- α/- -	HbH	1,5	98,4	0,1	0	5,7	9,9	57,2	17,4	30,5
1	HBA2 intron1 heterozigot c.95+2_95+6del (rs41474145) Alpha-thal-2 (-5nt) /het del -$\alpha^{20.5}$	- -/αα$^{(-5nt)}$	HbH	1,7	98,3	0,8	-	5,5	9,9	62,4	18,1	29
2	Triplication type α3.7 ^{A}	ααα/αα	α/β bozulma	2,75	96,8	0	0	4,5	10,7	75,5	47,4	31,4
2	HBA2 intron1 heterozigot c.95+2_95+6del (rs41474145) Alpha-thal-2 (-5nt)	αα/αα$^{(-5nt)}$	Sessiz	2,6	96,3	0,8		5,3	9,4	59,9	17,9	29,0
2	het c.226G>c (p.Asp76Hi5) Hb Q-İran	αα/αα$^{Hb\ Q\text{-}İran}$	Hb varyant	0,3	78,7	1,9	19,1	5,09	13	79,5	26,1	32,8
1	dup 159 kb/ large dup2 >360 kb	αααα/αααα ζζ/ζζ μμ/μμ θθ/θθ	α/β bozulma	2,8	95,0	1,2	0	4,99	11,5	70,3	23,1	32,8

**HBA1* 5' regülatör bölgede heterozigot novel varyant (c.-235G>A) ve büyük delesyonu ($\alpha^{20,5)}$) birleşik heterozigot formda

Kliniği ağır olan ve prenatal tanı önerilmesi gereken α-talasemi formları

Table 3 α-Thalassaemias—interactions and indications for prenatal diagnosis and preimplantation genetic diagnosis

Genotype interaction	*Disorder expected*	*Appropriate to offer PND*
Homozygous		
α°-thalassaemia ($-/-$)	Hb Bart's hydrops fetalis	Yes
α^{+}-thalassaemia ($-\alpha/-\alpha$)	Not clinically relevant	No
α^{+}-thalassaemia ($\alpha^{T}\alpha/\alpha^{T}\alpha$)	Severe α-thalassaemia carrier to severe Hb H disease	Occasionally[a]
Compound heterozygous		
α°-thal/α^{+}-thal ($-/-\alpha$)	Hb H disease	No

Note: The decision to have prenatal diagnosis belongs to the couple, once they have had comprehensive counselling.
[a]Couples with genotypes that may lead to offspring with unpredictable but potentially severe phenotypes occasionally select to have prenatal diagnosis or PGD. Reported examples of potentially severe phenotypes include genotype combinations involving variants in the polyadenylation signal in the *HBA2* gene, Hb Adana, Hb Agrino, Hb Constant Spring and Hb Taybee (see Supplementary Table S1 for HGVS nomenclature).

EMQN-Best Practice Guidelines_2015

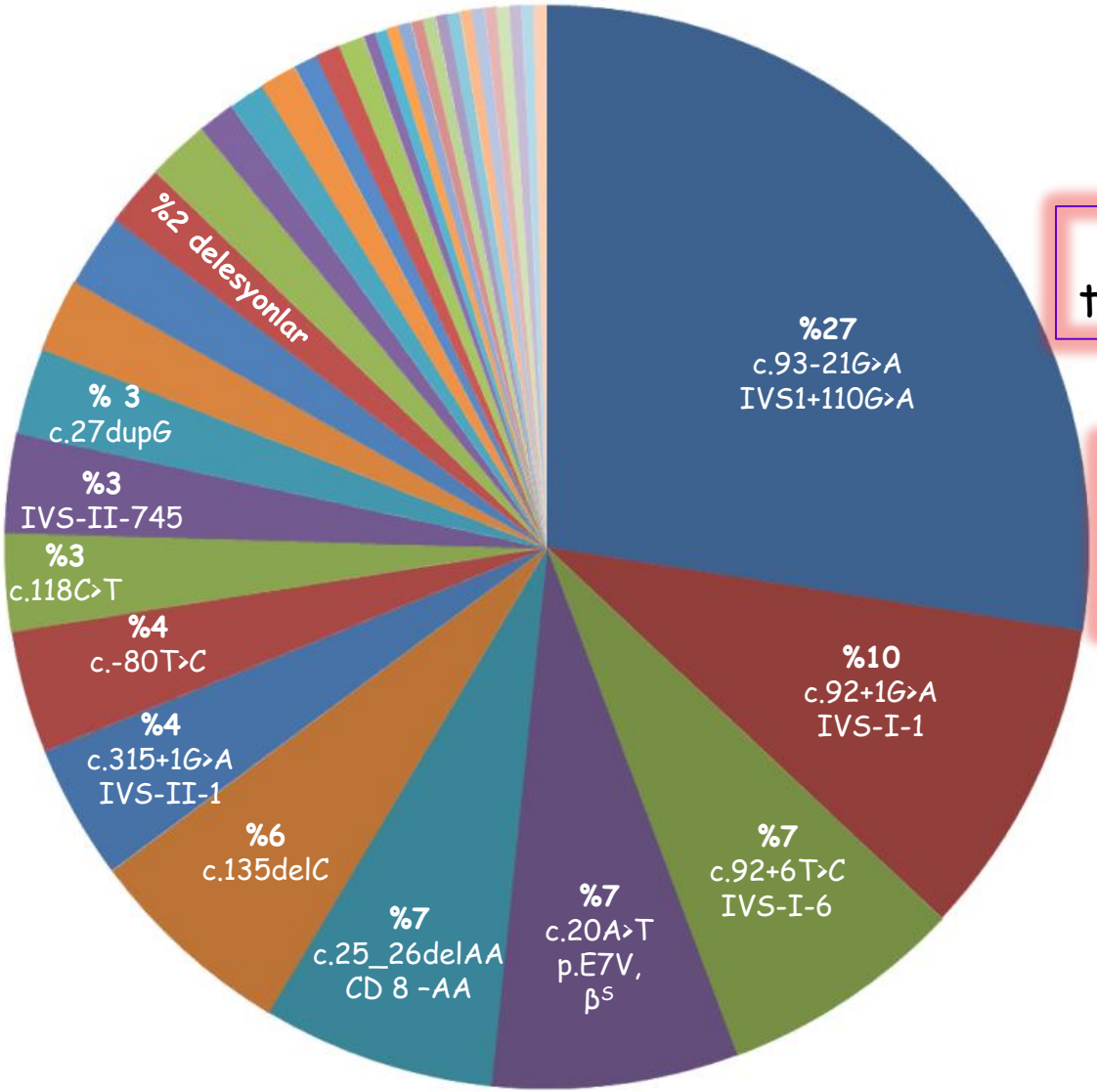
Globin genlerinde küçük mutasyonların taranması için kullanılan yöntemler

Reverse dot blot hibridizasyon
ARMS-PCR (amplification-refractory mutation system)
RE+PCR
rtPCR
DGGE (Denaturing gradient gel electrophoresis)
HRMA (High-resolution melting analysis)
Sanger dizileme → Küçük mutasyonların saptanmasında jenerik, otomatize yöntem
Pyrosequencing

Globin genlerinde büyük delesyon/duplikasyon saptama yöntemler

GAP-PCR
MLPA → Basit, hızlı, otomatize yöntem (DNA kalitesi, RNA kontaminasyonu kritik)
Mikro-array
Southern blot

Mutasyon analizine moleküler yaklaşım



ekzon 1 ve intron 1'in dizisi tüm mutasyonların ~%73'ünü saptar

+

ekzon 2, intron 2 promoter, 5' ve 3' dizisi mutasyonların ~%98'ini saptar

+

MLPA mutasyonların ~%100'ünü saptar

ß-Talasemi (Akdeniz) (coverage: % 87.1)

- 101 [C>T] (%0.4)
- 87 [C>G]
- 30 [T>A]
codon 5 [-CT] (%1.4)
hemoglobin C (% 0.4)
hemoglobin S (% 4.7)
codon 6 [-A]
codon 8 [-AA] (%12)
codon 8/9 [+G] (% 2.8)
codon 15 [tgG>tgA] (% 2.8)
codon 27 [G>C] [Hb Knossos]
IVS 1.1 [G>A] (% 7.5)
IVS 1.5 [G>C]
IVS 1.6 [T>C] (%6.1)
IVS 1.110 [G>A] (% 31.7)
IVS 1.116 [T>G]
IVS 1.130 [G>C]
codon 39 [C>T] (% 2.8)
codon 44 [-C] (%6,6)
IVS 2.1 [G>A](% 4,2)
IVS 2.745 [C>G] (% 3.3)
IVS 2.848 [C>A] (%0.4)

ß-Talasemi (SEA-Güney Asya) (coverage: % 7.4)

-31 [A>G]
- 29 [A>G]
- 28 [A>G]
cap+1 [A>C]
init codon [ATG>AGG]
codon 8/9 [+G] (% 2.8)
codon 17 [A>T]
codon 15[tGa>tAg]
codon 19 [A>G] (Malay)
codon 26 [G>A] (HbE) (% 0,4)
codon 27/28 [+C]
IVS 1.1 [G>T]
IVS 1.5 [G>C]
codon 41/42 [-TTCT]
codon 43 [G>T]
codon 71/72 [+A]
codon 89/90 [-GT]
codon 90 [G>T]
codon 95 [+A]
IVS 2.1 [G>A](% 4,2)
IVS 2.654 [C>T]
codon 121 [G>T]

ß-Talasemi (IME-Hint-Ortadoğu) (coverage: % 85.4)

cap+1 [A>C]
codon 5 [-CT] (% 1.4)
hemoglobin S (% 4.7)
codon 8 [-AA] (% 12)
codon 8/9 [+G] (% 2.8)
codon 15 [tGa>tAg]
codon 16 [-C]
Codon 22 [7 bp del]
codon 30 [G>C]
IVS 1.1[G>A] (% 7.5)
IVS 1.1 [G>T]
IVS 1.5 [G>C]
IVS 1.6 [T>C] (% 6.1)
IVS 1.110 [G>A] (% 31.7)
IVS 1- 25 [25bp del]
codon 36/37 [-T] (% 2,3)
codon 39 [C>T] (% 2.8)
codon 41/42 [-TTCT]
codon 44 [-C] (%6,6)
IVS 2.1 [G>A](% 4,2)
IVS 2.745 [C>G] (% 3.3)
619 bp del [exon 3]

Tartışma

- ✓ Genetik analizden önce hematolojik testler mutlaka yapılmış olmalı. Taşıyıcılık tanısı için genetik teste ihtiyaç yoktur.
- ✓ Hemoglobinopatiler arasında beta Talasemi ülkemizde en sık görüleni, çok çeşitli mutasyonların varlığı ile kliniği heterojen olan bir hastalıktır. Genetik analizde saptanan mutasyondan beklenen genotip ve fenotip ile uyum mutlaka değerlendirilmelidir.
- ✓ Mutasyon HGVS önerilerine göre yazılmalı ancak tradisyonel yazım şekli de parantez içinde belirtilmelidir.
- ✓ Sanger dizide tek yönden okuma yapılabilse de, ileri ve geri primerlerin her ikisi ile de dizi yapılmalıdır.
- ✓ Genetik analiz kompleks olan, hematolojik /biyokimyasal testlerle açıklanamayan olgulara, prenatal tanı , PGD gibi olanaklardan yararlanmak isteyen taşıyıcı çiftlere önerilmelidir.
- ✓ Mutasyon saptanan ailelere genetik danışma verilmeli, detaylı aile ağacı değerlendirmesi yapılmalı, olası taşıyıcılar araştırılmalı ve riskli çiftlere prenatal tanı olanakları sunulmalıdır.
- ✓ Birleşik heterozigotluk saptanan olgularda parental analizlerle biparental kalıtım gösterilmelidir.
- ✓ Prenatal tanı planlanan olgularda, ebeveynlerdeki taşıyıcılık testleri gebelikten önce tamamlanmış olmalıdır.
- ✓ Prenatal tanıda maternal kontaminasyon dışlaması testi mutlaka yapılmalıdır (CVS ve AS, direkt ya da kültür)
- ✓ Hastaların tanısında, son dört ay içinde kan transfüzyonu yapılmamış olmasına dikkat edilmelidir.

TEŞEKKÜRLER