

Univerzitet u Beogradu

Biološki fakultet

Sonja Pavlović

Molekularna genetika talasemijskih
sindroma: korelacija između
molekularne patologije i fenotipa

Doktorska disertacija

Beograd, decembar 2001. godine

91

117836



Mentor: Dr Stanka Romac, vanredni profesor,
Biološki fakultet, Beograd

Članovi komisije:

Dr Stanka Romac, vanredni profesor,
Biološki fakultet, Beograd

Dr Milena Stevanović, naučni savetnik,
IMGGI, Beograd

Dr Svetlana Radović, docent,
Biološki fakultet, Beograd

Dr Dragana Janić, docent,
Medicinski fakultet, Beograd

*"Rođeni nismo
tek da bi mogli mrijet
učini nešto
da popravimo svijet"*

Duško Trifunović

I evo me, konačno, u Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, u Laboratoriji za molekularnu hematologiju, gde, korak po korak, dijagnozu po dijagnozu osvajam talasemije. Sa mnom su, rame uz rame moje dve mlade kolegice, Jelena i Tanja, koje su radile sa mnom, učile sa mnom, padale i ponovo se podizale. Kada o njima mislim, stalno imam asocijaciju na "tri ratna druga". Bez njih zaista ne bi bilo ove teze. Kada smo u jednom trenutku pomislile da smo konačno zaglavljene u izolovanoj Srbiji pod bombama i projektilima, sa mnogo radioaktiviteta svuda, sem u izotopima za eksperimente, pojavio se deus ex machina, naš drug Dejan, koji nas je naučio da se može sekvencirati i u tako nemogućim uslovima, naročito ako imate automatski sekvencer.

Tu su i moje kolegice iz laboratorije, Jelena, Mari i Nata, koje su se naslušale o talasemijama za ceo život, a i institutske kolege koje su skoro svakodnevno pratile sinusoidu uspešnosti male grupe iz prizemlja.

Na kraju ovog puta se nalaze članovi Komisije za odbranu ove teze, koje istinski poštujem, i koji su, svaki na svoj način, uticali na moje naučno sazrevanje: Dr Stanka Romac, koja me je prva pozvala kao predavača na svoje kurseve na poslediplomskim studijama, i koja me je primerom hrabrila da izdržim u nastojanjima da se bavim molekularnom dijagnostikom, Dr Milena Stevanović, kojoj sam se obraćala za pomoć kada sam bila na eksperimentalnim stranputicama, Dr Svetlana Radović, koja me je prijateljski hrabrila da zaokružim priču o talasemijama u nas, i Dr Dragana Janić, koja me stalno podseća da to što radim ima smisla.

Svi koji su me pratili na ovom putu ugrađeni su u redove ove doktorske teze, i ja sam im beskrajno zahvalna na tome.

Na kraju, svim srcem se zahvaljujem svojoj porodici, Mami koja je čuvala decu dok sam ja sekvencirala, Voji, koji je čekao, i usput skanirao i prelamao tekst ove teze, i mojoj deci, koja nisu prestala da me vole iako nisam uvek bila s njima kad sam im bila potrebna.

Bila bih srećna ako budućnost potvrdi da se moto koji sam izabrala, zaista odnosi na ovu doktorsku tezu.

Autor

Abstract

The thalassemia syndromes are relatively common genetic disorders in the Yugoslavian population. This work represents the first systematic study on the molecular basis of thalassemia syndromes in FR Yugoslavia.

In this study we have correlated the severity of the hematological features to the type of the β -thalassemia mutations in a group of β -thalassemia heterozygotes of Yugoslavian descent. We found that a) β^{044} is very severe mutation in the Yugoslavian population b) $\beta^{-IVS I-6}$ is not a mild mutation as reported in other population studies and c) heterozygotes for β^{+87} mutations produce larger and better hemoglobinized red blood cells. Further investigation comprised the marked heterogeneity of the thalassemia syndromes and their molecular basis. Most interesting cases were reported.

This study also concerned the evaluation of β -thalassemia alleles in nearly 60 Yugoslav patients suffering from different thalassemia syndromes. 9 different mutations were observed. Hb Lepore is the most common cause of thalassemic phenotype in the Yugoslavian population. Its origin was also discussed. Three mutations (β^{039} , $\beta^{+IVS I-110}$, $\beta^{+IVS II 745}$) occurred most frequently, but four additional β -thalassemia mutations were also observed. Furthermore, Hb Sabine, a rare, unstable β -chain variant is identified in a boy of Yugoslavian descent.

Finally, all the results of these studies were considered in the strategy of carrier screening and genetic counselling, especially prenatal diagnosis, in the Yugoslavian population.

Key words: thalassemia syndromes, genotype-phenotype correlations, molecular characterization, carrier screening, prenatal diagnosis.

Apstrakt

Thalasemijski sindromi su relativno česti nasledni poremećaji u jugoslovenskoj populaciji. Ova teza predstavlja prvu sistematsku studiju molekularne osnove talasemijskih sindroma u SR Jugoslaviji.

U ovoj tezi smo pratili korelaciju između hematoloških parametara i tipa β -talasemijske mutacije kod heterozigotnih nosilaca β -talasemijskih mutacija u našoj populaciji. Otkrili smo da a) mutacija β^{044} predstavlja "tešku" talasemijsku mutaciju, b) mutacija $\beta^{+IVS I-6}$ nije u našoj populaciji "blaga" mutacija, kao što je pokazano u populacionim studijama drugih zemalja, i c) heterozigoti za mutaciju β^{+87} imaju jedva detektibilnu mikrocitozu i hipohromiju. Naša dalja istraživanja su se odnosila na molekularnu osnovu najrazličitijih talasemijskih sindroma. Najinteresantniji slučajevi su prikazani.

Ova teza obuhvata i karakterizaciju oko 60 β -talasemijskih alela kod jugoslovenskih pacijenata sa različitom kliničkom slikom. Detektovano je 9 različitih mutacija. Hb Lepore je najčešći uzrok β -talasemijskog fenotipa u jugoslovenskoj populaciji. Ovde je razmatrano i poreklo ove talasemijske hemoglobinske varijante. Tri tipa mutacija (β^{039} , $\beta^{+IVS I-110}$, $\beta^{+IVS II-745}$) su najučestalija, ali su detektovana još 4 tipa β -talasemijskih mutacija. Pored toga, kod jednog dečaka je otkriven Hb Sabine, retka, nestabilna hemoglobinska varijanta.

Konačno, svi rezultati ovih istraživanja su omogućili utvrđivanje strategije skrininga i dijagnostikovanja talasemijskih sindroma u našoj populaciji, kao i osnivanje genetičkog savetovališta za ova oboljenja i realizaciju prvih prenatalnih dijagnoza.

Ključne reči: talasemijski sindromi, korelacija genotipa i fenotipa, karakterizacija na molekularnom nivou, populacioni skrining, prenatalna dijagnoza

SADRŽAJ

UVOD	1
Hemoglobini čoveka	3
Struktura i funkcija hemoglobina čoveka.....	3
Globinski geni čoveka.....	8
Kratak pregled molekularne biologije na primeru globinskih gena	11
Globinski polipeptidi i hemoglobini čoveka	17
Patološki hemoglobini čoveka – strukturne hemoglobinske varijante.....	20
Srpasti sindromi.....	21
Nestabilni hemoglobini (hemolitička anemija udružena sa Heinz-ovim telima).....	22
Hemoglobinske varijante sa izmenjenim afinitetom prema kiseoniku	23
Hemoglobin M	24
Talasemijske strukturne varijante.....	24
Talasemijski sindromi	25
Uvod u talasemijske sindrome	25
Nomenklatura	28
Patofiziologija – opšti principi	29
Klinička i hematološka klasifikacija talasemijskih sindroma – fenotip	32
β -talasemije	32
β -talasemija minor	33
β -talasemija intermedija	37
β -talasemija major	39

α -talasemije	39
α -talasemija i mentalna retardacija (ATR sindromi)	42
Stečeni α -talasemijski sindrom	43
HPFH	43
Talasemijske hemoglobinske varijante	43
Molekularna patofiziologija talasemijskih sindroma – genotip	44
β -TALASEMIJE	45
Promotorske mutacije	45
Mutacije odgovorne za abnormalnu posttranskripcionu modifikaciju ...	47
Mutacije koje utiču na procesovanje β -globinske iRNK	48
Mutacije koje produkuju nefunkcionalnu iRNK	54
Delecije u β -globinskom genu koje rezultiraju β -talasemijskim fenotipom	55
β -globinski genski lokus i talasemije	56
Polimorfizmi u β -globinskom genskom lokusu	60
α -TALASEMIJE	63
Delecija pojedinačnog α -globinskog gena (α -talasemije-2)	63
Delecije oba α -gena na hromozomu (α -talasemija-1)	66
Nedelecione forme α -talasemija	68
Talasemijske hemoglobinske varijante	68
Hb Lepore	69
Hb E	71
Hb Constant Spring	72
Hipernestabilni hemoglobini	73
Distribucija talasemijskih mutacija	74
Hemoglobinopatije u Jugoslaviji	76
Molekularna dijagnostika talasemijskih sindroma	77
Metode za identifikaciju poznatih mutacija	77
Metode za identifikovanje nepoznatih mutacija	80
CILJ RADA	82
MATERIJAL I METODE	84
Biohemijske metode	84
Hematološki parametri	84
Pravljenje hemolizata	84
Elektroforeza na acetatnoj celulozi	85
Određivanje nivoa Hb A ₂	85
Određivanje nivoa Hb F	86
Test toplotne denaturacije (otkrivanje nestabilnih Hb)	87
Separacija globinskih lanaca HPLC-om	87
In vitro sinteza globinskih lanaca	88
Metode koje obuhvataju analize DNK	89
Izolovanje DNK iz krvi	89
Izolovanje DNK iz horionskih čupica	90
Elektroforeza DNK na agaroznom gelu	91
Elektroelucija DNK iz agaroznih gelova	91
Metoda reverznog dot blota (RDB)	92
Alel – specifični PCR (ARMS)	95
Gap PCR za Hb Lepore	100

Detekcija najčešćih mutacija u α -globinskim genima metodom PCR-a.	101
Detekcija delecije- $\alpha^{3.7}$	101
Detekcija delecije - $\alpha^{4.2}$	102
Detekcija delecije --Med	102
Detekcija delecije -(α) ^{20.5}	102
DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) za β -globinske gene	103
DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) za γ -globinske gene.	105
Sekvenciranje PCR produkta	106
Analiza D17S5 polimorfnog lokusa	108
REZULTATI	109
Korelacija genotipa i fenotipa u jugoslovenskoj populaciji	110
Tipični heterozigoti za β -talasemiju	110
Genotip +/ β^{039}	110
Genotip +/ $\beta^+ \text{ IVS I-110}$	111
Genotip +/ $\beta^0 \text{ IVS II-1}$	112
Genotip +/ $\beta^+ \text{ IVS II-745}$	113
Atipični heterozigoti za β -talasemiju	114
Genotip +/ β^{044}	114
Genotip +/ $\beta^+ \text{ IVS I -6}$	115
Genotip +/ $\beta^+ \text{ -87}$	116
Talasemijska hemoglobinska varijanta – Hb Lepore	117
Hb Sabine	121
Talasemija major	124
Mutirani β -globinski gen u kontekstu drugih globinskih gena.	126
Atipični heterozigotni nosilac mutacije za β -talasemiju	126
Heterozigotni nosilac mutacije za β -talasemiju sa kliničkim manifestacijama.	128
Fenotip "ili α -talasemija ili β -talasemija"	130
Talasemija intermedija	132
Prvi slučaj	132
Drugi slučaj	134
Molekularna karakterizacija talasemijskih sindroma u SR Jugoslaviji.	136
Poreklo Hb Lepore u jugoslovenskoj populaciji	137
Strategija skrininga talasemijskih mutacija u SR Jugoslaviji.	139
Genetičko savetovalište i prenatalna dijagnoza.	143
DISKUSIJA	147
Heterozigotna β -talasemija: korelacija između hematološkog fenotipa i tipa β -talasemijske mutacije	147
Hb Lepore – najčešći talasemijski sindrom na našim prostorima	152
Hb Sabine	154
Mutirani β -globinski gen u kontekstu drugih globinskih gena	156
β -talasemijske mutacije u SR Jugoslaviji su mediteranskog tipa.	159
Strategija skrininga talasemijskih mutacija u SR Jugoslaviji.	160
ZAKLJUČCI	162
Posle zaključka - nekad	165
Posle zaključka – sad.	166
LITERATURA	167
SADRŽAJ	195

UVOD

U literaturi se patologija molekula hemoglobina (Hb) imenuje vrlo raznoliko. Termin "hemoglobinopatije" je, bez imalo sumnje, odgovarajući. Hemoglobinopatije su vrlo heterogena grupa naslednih anemija, a posledica su mutacija u jednom ili više gena koji kodiraju globinske polipeptidne subjedinice hemoglobinskog tetramera. Hemoglobinopatije obuhvataju kvantitativne i kvalitativne poremećaje. Kvantitativni poremećaji su posledica odsustva ili smanjene sinteze globinskih lanaca i označavaju se terminom "talasemije". Za razliku od njih, kvalitativni poremećaji, koji se najčešće nazivaju hemoglobinskim varijantama ili strukturalnim hemoglobinopatijama, posledica su varijacija u aminokiselinskoj sekvenci molekula hemoglobina. Karakterišu se prisustvom normalne količine mutiranih globinskih

polipeptida, koji doprinose formiranju molekula hemoglobina izmenjenih fizičkih i hemijskih svojstava.

U praksi, ova distinkcija nije više tako rigorozna kao u prošlosti. Ogromni pomak koji je molekularna genetika unela u rasvetljavanje etiologije hemoglobinopatija, pokazao je da postoje hemoglobinske varijante (na primer Hb E, Hb Lepore, Hb Constant Spring) čiji se mutirani polipeptidi sintetišu u smanjenoj količini, pa tako predstavljaju istinski talasemijski poremećaj. Otuda pojam talasemijski sindromi, koji obuhvata sve hemoglobinopatije koje se karakterišu defektom u sintezi jednog ili više globinskih lanaca hemoglobina.

Talasemijski sindromi predstavljaju najučestalije monogenско oboljenje u svetu. U mnogim zemljama predstavljaju veliki problem za zdravstveni sistem. Biohemijska istraživanja ovih oboljenja rezultirala su izuzetno efikasnim metodama za dijagnostikovanje. Izučavanje molekularnih defekata koji stoje u osnovi talasemijskih sindroma dovelo je do najznačajnijih fundamentalnih pomaka u našem razumevanju strukture, funkcije i, naročito, regulacije ekspresije eukariotskih gena. Zbog svega toga, talasemijski sindromi nisu interesantni samo za hematologe, već posebno za armiju istraživača, biohemičare, genetičare i molekularne biologe koji svojim analizama doprinose da se rano postavi dijagnoza i tako, blagovremenim terapijskim zahvatom popravi klinička slika, tok i prognoza bolesti. Uz to, globinski geni su i danas "darežljivi" eksperimentalni model jer su nepresušni izvor novih otkrića u fundamentalnim biološkim naukama. Znanja koja stičemo u fundamentalnim istraživanjima često imaju cilj da budu primenjena u lečenju bolesti. Talasemijski sindromi su neprestano u fokusu genetičara i molekularnih biologa. Prvi pokušaj genske terapije se vezuje za β -talasemije. Do danas, ipak, nijedan pacijent oboleo od talasemijskih sindroma nije izlečen ovom metodom. Naša znanja o

globinskim genima još uvek nisu dovoljna da bismo uspeli da uspešno utičemo na regulaciju njihove ekspresije. Postoji li veći izazov za molekularnog biologa nego da nastavi da istražuje tajne koje kriju globinski geni do momenta kada će, upoznavši u potpunosti bazične zakonitosti njihovog funkcionisanja, moći da "popravi" negativan efekat mutacija koje dovode do talasemijskih sindroma. Ogromna raznolikost genetskih defekata kod pacijenata obolelih od talasemijskih sindroma i mogućnost praćenja fenotipske ekspresije tih mutacija, opredelila nas je da se bavimo proučavanjem ove grupe oboljenja i tako dođemo do nekih novih saznanja o mogućnosti delovanja na molekularne mehanizme regulacije globinskih gena.

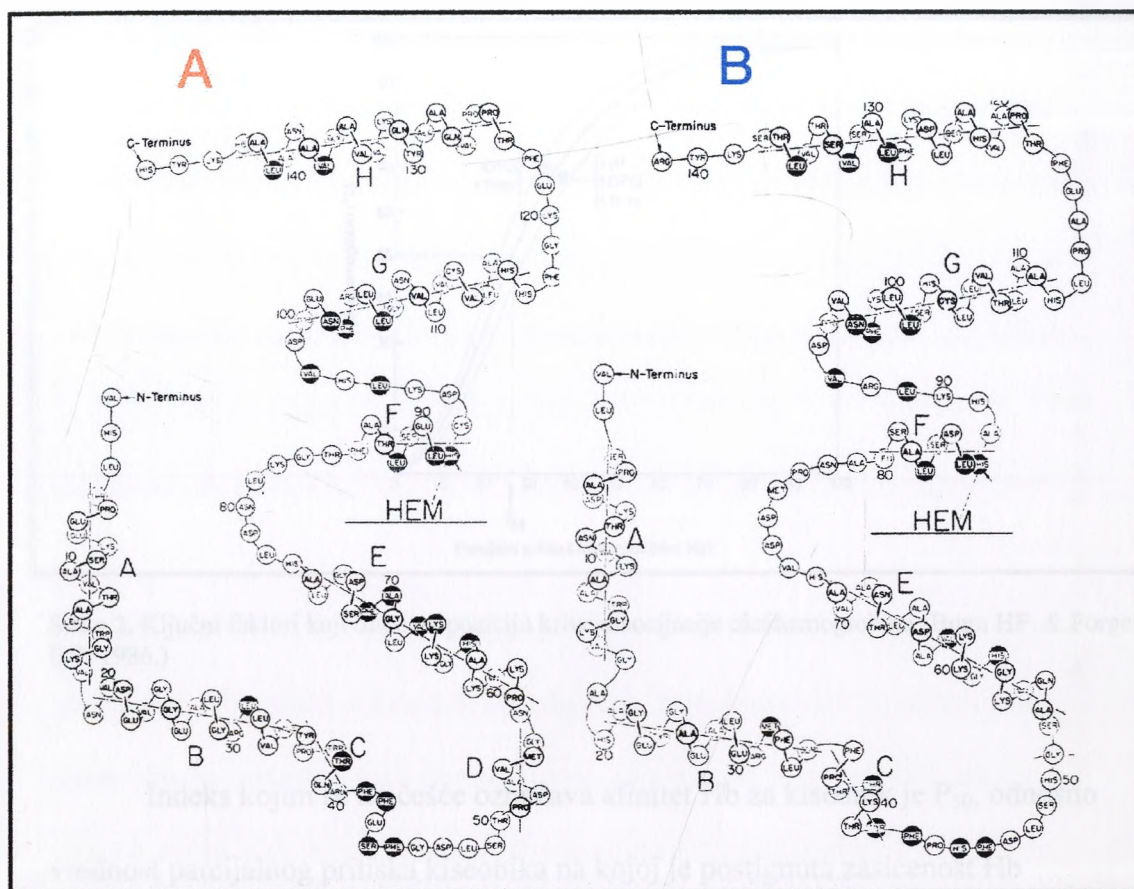
Klasifikacija, genetska osnova i patofiziologija talasemijskih sindroma je bazirana na sveukupnom razumevanju kako biosinteze humanih hemoglobina, tako i regulacije familije globinskih gena koja kodira polipeptidne subjedinice hemoglobina i funkcije hemoglobina kao pigmenata koji transportuju kiseonik. Iz tih razloga, priča o talasemijskim sindromima će početi predstavljanjem normalnih humanih hemoglobina i njihove genetske osnove.

Hemoglobini čoveka

Struktura i funkcija hemoglobina čoveka

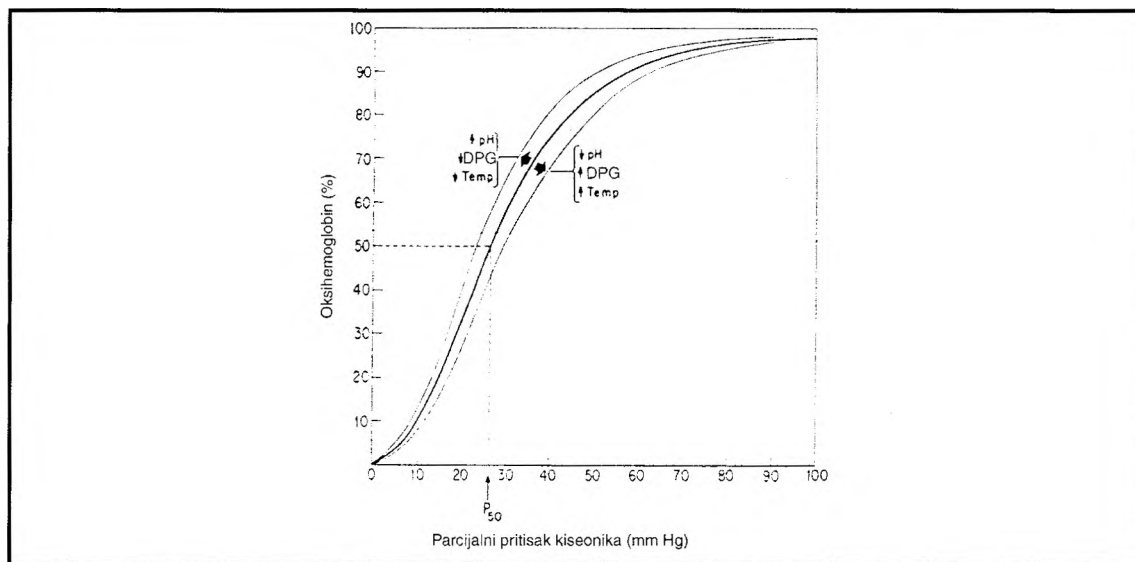
Hemoglobin (Hb) je tetramerni molekul koji se sastoji od dva para različitih globinskih polipeptidnih lanaca (α i β) i četiri prostetične hem-grupe, od kojih je svaka smeštena unutar globinskih subjedinica. Dužina α -polipeptidnih lanaca je 141

aminokiselina, dok su β -polipeptidi lanci dugi 146 aminokiselina. Oko 75 % globinskog polipeptida formira α -spiralu (Karlson P. 1978.), koja se sastoji od sedam ili osam helikalnih segmenata (A-H). Kratki polipeptidni segmenti (interhelikalni segmenti) koji nisu organizovani u α -spiralu, raspoređeni su između helikalnih segmenata. Pojedine aminokiseline u lancu se označavaju po poziciji koju zauzimaju unutar određenih helikalnih segmenata (Slika 1) (Bunn F. 1998.). Hem, feroprotoporfirin IX, sadrži gvožđe koje je kovalentno vezano za svaki globinski lanac i to sa aminokiselinom histidinom na poziciji F8. To je aminokiselina broj 87 u α -globinskom lancu i aminokiselina broj 92 u β -globinskom lancu. Aminokiseline koje imaju polarne, bazne ili kisele, bočne grupe, na primer lizin, arginin i glutaminska kiselina, pozicionirane su na površini molekula i u kontaktu su sa okolnim vodenim rastvorom. Neutralne aminokiseline su uglavnom orijentisane ka hidrofobnoj unutrašnjosti molekula i formiraju džep u kome se nalazi hem.



Slika 1. Primarna struktura β -globinskog polipeptidnog lanca (A) i α -globinskog polipeptidnog lanca (B). α -spiralni segmenti su označeni velikim slovima latinice. Obojeni krugovi označavaju aminokiseline koje su u kontaktu sa hemom (Huisman THJ & Schroeder WA, 1971.)

Uloga molekula hemoglobina u transportu kiseonika realizuje se pomoću dvovalentnog gvožđa (Fe^{2+}) koje može reverzibilno vezati gasovite ligande, kao što su kiseonik i ugljen monoksid. Pri transportu kiseonika, Fe ostaje neprestano u dvovalentnoj (fero) formi. Količina vezanog kiseonika zavisi od koncentracije kiseonika, odnosno parcijalnog pritiska kiseonika. U tkivima siromašnim kiseonikom, ovaj se otpušta. Tako objašnjavamo funkciju transporta. Vezivanje kiseonika za hemoglobin je definisano klasičnom sigmoidalnom krivom i karakteriše se svojstima: afinitetom Hb za kiseonik i kooperativnošću (Slika 2).



Slika 2. Ključni faktori koji utiču na poziciju krive disocijacije oksihemoglobina (Bunn HF & Forget BG. 1986.)

Indeks kojim se najčešće označava afinitet Hb za kiseonik je P_{50} , odnosno vrednost parcijalnog pritiska kiseonika na kojoj je postignuta zasićenost Hb kiseonikom od 50%. P_{50} zavisi od temperature, pH, organskih fosfata (2,3-difosfoglicerinska kiselina, 2,3- DPG) i parcijalnog pritiska ugljen dioksida (P_{CO_2}). U fiziološkim uslovima ($37^{\circ}C$; pH 7,40; 5 mmol/L 2,3-DPG; 40 mm Hg P_{CO_2}) P_{50} zdrave adultne krvi je 26 mm Hg.

Kriva zasićenja Hb kiseonikom ima S-oblik, i nije hiperbola kao što bi se očekivalo. To se objašnjava kooperativnim dejstvom četiri lanca Hb. Povezivanjem jednog lanca sa kiseonikom menja se konformacija molekula, zbog alosteričnog efekta, tako da afinitet za kiseonik preostalih (nezasićenih) hema u tetrameru značajno raste. Ovo se objašnjava razlikom u afinitetu prema ligandima koja postoji između dve forme Hb: deoksihemoglobina i oksihemoglobina (Perutz MF et al. 1987.). Deoksihemoglobin je stabilizovan u T formi (taut – napet, eng.) zbog dodatnih jonskih veza, koje su rezultat interakcija aminokiselina unutar jedne

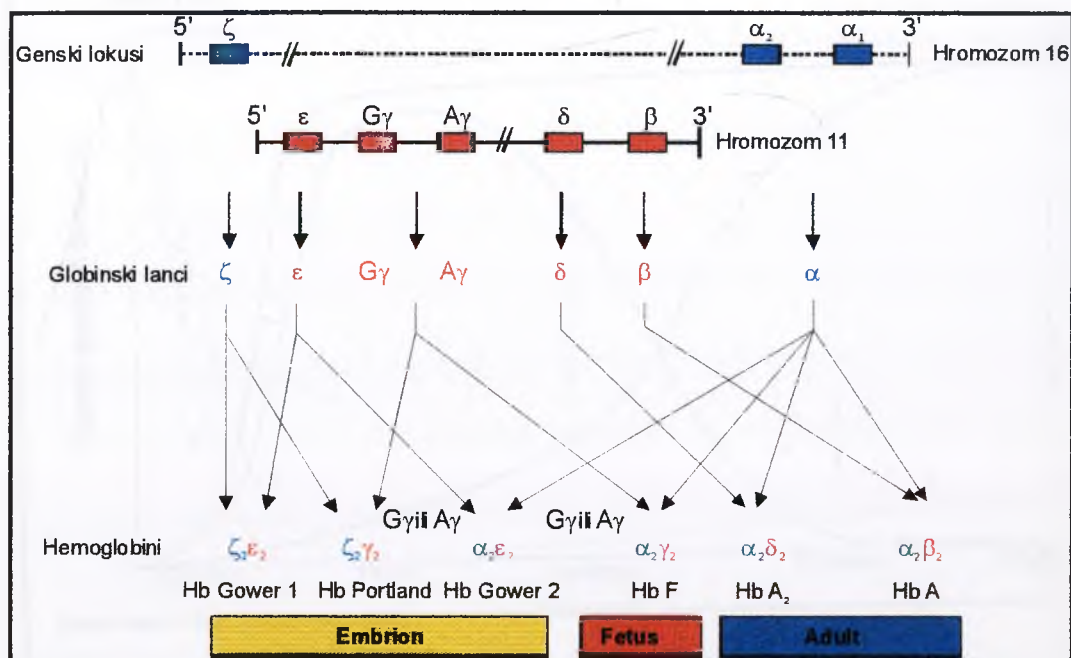
polipeptidne subjedinice ili između susednih polipepida. Jedna od tih veza je i jonska veza između histidina na poziciji β 146 i asparaginske kiseline na poziciji β 94 (Perutz MF. 1970.). Ove veze su odgovorne i za Bohr-ov efekat koji označava da afinitet Hb za kiseonik opada pri povišenju pH (povećanje P_{CO_2}) (Bohr C et al. 1904.) i za vezivanje 2,3-difosfoglicerinske kiseline koja je potentni modifikator funkcije Hb (smanjuje afinitet Hb za kiseonik) (Chanutin A & Curnish RR. 1967.; Benesch R & Benesch RE. 1967.). U procesu vezivanja 2, 3-difosfoglicerinske kiseline učestvuju još i aminokiseline: histidin β 143, lizin β 82 i histidin β 2 (Bunn HF & Briehl RW. 1970.). Pri vezivanju kiseonika, ove jonske veze se postupno prekidaju i Hb prelazi u formu R (relaksiranu, sa manjim sadržajem vezivne energije). Pri prelasku T u R formu, dolazi do pomeranja koje omogućavaju aminokiseline duž linije dodira α - i β -subjedinica (Fermi G et al. 1984.).

Ugljen dioksid se takođe transportuje pomoću Hb, i to tako što se vezuje za N terminalne aminokiseline i α - i β -polipeptida (Garby L et al. 1972.).

Prilikom oksidacije gvožđa iz Hb u trovalentno stanje, na slobodno koordinativno mesto ne mogu se više vezati gasoviti ligandi, već anjonski ligandi (cijanid, na primer). Novovastali Hb se naziva methemoglobin, ne prenosi kiseonik i ima specifičnu boju i apsorpcioni spektar.

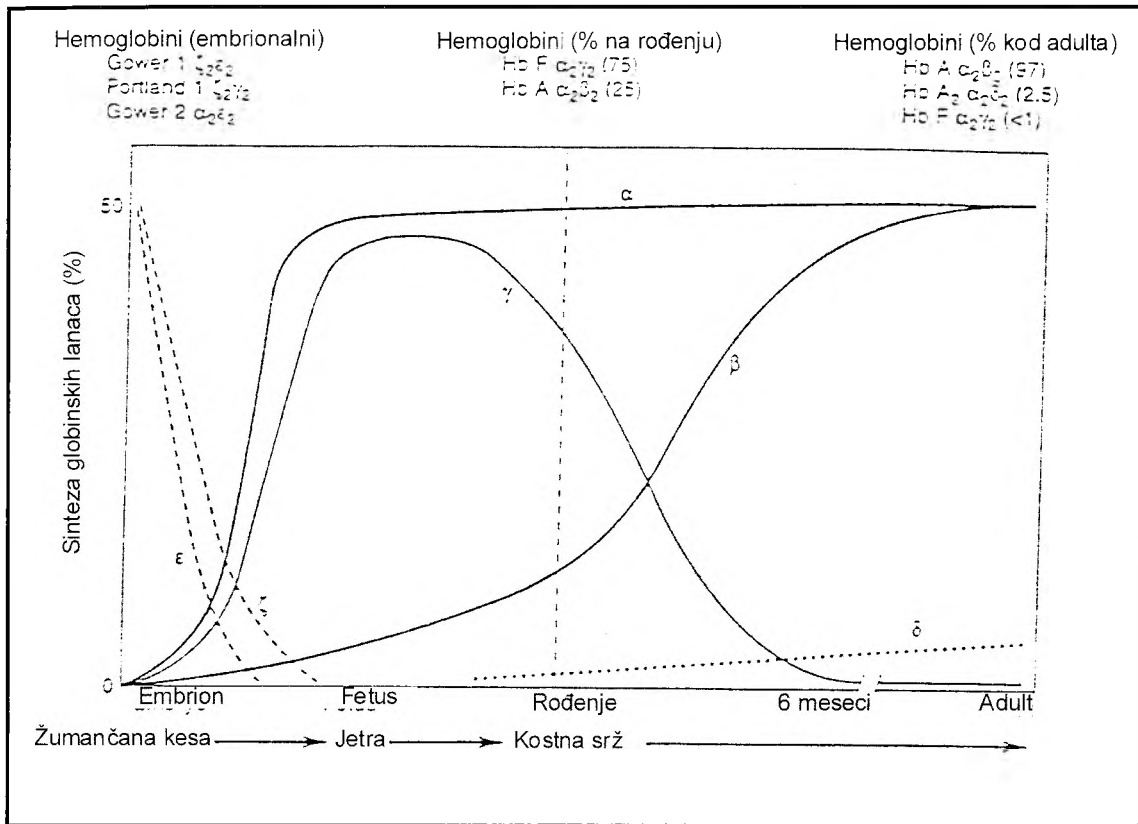
Utvrđivanje genetske osnove pojedinih hemoglobinskih varijanti i analiza fenotipa koji prati mutacije pojedinih aminokiselina, u mnogome je doprinela našim znanjima o funkciji aminokiselina na određenim pozicijama u molekulu Hb.

Globinski geni čoveka



Slika 3. Globinski geni, globinski polipeptidi i hemoglobini čoveka (Cacciari E et al. 1990.)

Različiti globinski polipeptidni lanci su kodirani čitavom serijom gena koji su organizovani u dva lokusa (Higgs DR et al. 1989.; Fritsch EF et al. 1980.). Geni tipa α – globina su lokalizovani na kraćem kraku hromozoma 16 (16p13.3), a geni β – globina su na hromozomu 11 (11p 15.5) (Diesseroth A. et al. 1977.; Diesseroth A. et al. 1978.) (Slika 3). Različiti geni iz svakog lokusa se aktiviraju tokom ontogenetskog razvoja čoveka. Poredak gena u globinskim lokusima kod čoveka odgovara redosledu njihove ekspresije tokom ontogenetskog razvoja: embrionalni geni se nalaze na 5' kraju (prvi se ekspimiraju), slede fetalni geni i, konačno, na 3' kraju su adultni geni (poslednji se ekspimiraju) (Collins FS & Weissman SM. 1984.). Ekspresija globinskih gena tokom razvića je vremenski i prostorno regulisana. Ona je u embrionalnom stadijumu ograničena na žumančanu kesu, zatim se izmešta u fetalnu jetru, a posle rođenja se događa u slezini i kostnoj srži (slika 4).



Slika 4. Sinteza globinskih polipeptida čoveka u embrionalnom, fetalnom i adultnom stadijumu (Steinberg MH. 1994.)

Lokus α – globinskih gena sadrži tri funkcionalna gena: gen ζ – koji kodira ζ – globinski lanac i koji se eksprimira samo u embrionalnom stadijumu razvitka čoveka, i gene α_2 i α_1 sa kojih se transkribuje α – globinski polipeptid od početnih faza gestacije i kasnije kroz čitav život. Lanci koji se proizvode sa poslednja dva gena su identični, samo je gen α_2 aktivniji od gena α_1 i njegov doprinos α – globinskim lancima je skoro tri puta veći (2,8 : 1) (Liebhaber SA. 1989.). U lokusu α – globinskih gena postoje i pseudogeni, evolutivni ostaci koji ne kodiraju proteine (pseudo ζ , pseudo α_2 i pseudo α_1 geni). Još jedan gen α - tipa, misteriozni θ -gen, identifikovan je, i to na samom 3' kraju lokusa (Hsu SL. et al. 1988.). Transkripcija ovog gena je detektovana u fetalnom tkivu i adultnoj kostnoj srži, mada na veoma

niskom nivou (manje od 1%) i nije identifikovan Hb koji sadrži θ -lanac (Albitar M. et al. 1989.).

Lokus β – globinskih gena sadrži pet funkcionalnih gena: ϵ gen, koji kodira embrionalni globinski lanac ϵ , dva gena $G\gamma$ i $A\gamma$, koji kodiraju fetalni γ – globinski lanac i koji se razlikuju na poziciji 136, gde se nalazi ili aminokiselina glicin ($G\gamma$) ili alanin ($A\gamma$) (Schroeder WA et al. 1968.), i konačno, gene δ i β , koji kodiraju istoimene adultne β – globinske lance. δ -globinski polipeptid se razlikuje od β u 10 od 146 aminokiselina. γ - i β - globinski lanci sadrže 39 različitih aminokiselina. I u ovom lokusu postoji pseudo gen, lociran između γ - i δ -gena u β -globinskom lokusu.

Kao što vidimo, svi geni unutar jednog lokusa pokazuju izrazitu homologiju. Homologija postoji i između gena iz α - i β -globinskog lokusa. Sve to upućuje na važan princip u evoluciji proteina, duplikaciju gena. Ovu ideju potkrepljuje otkriće da hemoglobin u krvi današnjih rečnih zmijuljica (Lamprey) ima jedan polipeptidni lanac i jedan hem, kao i prisustvo molekula mioglobina u prirodi (Lehninger AL. 1978.). Pseudogeni su nastali kasnije u evoluciji, od funkcionalnih gena u kojima su se akumulirale mutacije u kodirajućim ili kritičnim regulatornim regionima, što je rezultiralo njihovom neaktivnošću.

Svi globinski geni sadrže tri egzona i dva introna. U α -globinskoj familiji gena introni se nalaze između kodona 31 i 32, i između kodona 99 i 100, za razliku od β -globinskih gena, kod kojih prvi egzon završava kodonom broj 30, a na kraju drugog egzona je kodon 104. Iako se pozicije introna na prvi pogled razlikuju kod gena α i β tipa, treba naglasiti da su one apsolutno podudarne ako pratimo strukturu α - i β -globinskih polipeptidnih lanaca, što nam govori o njihovoj suštinskoj, funkcionalnoj homologiji (Forget BG & Pearson HA, 1995.). Prvi intron (IVS-I,

intervening sequence,eng.) je kraći i u α - i u β -globinskom lokusu od drugog (IVS-II). Ipak, oba introna α -globinskih gena su kraća (100-300 bp) od β -globinskih introna, gde IVS II dostiže dužinu od 1000-1200 bp. Drugi egzon svih globinskih gena je odgovoran za glavne komponente džepa u kojem je smešten hem, dok treći kodira aminokiseline duž linije dodira α - i β -subjedinica i značajan je za formiranje stabilnog tetramera.

Globinski geni su izolovani među prvim eukariotskim genima, kasnih sedamdesetih. Već duže je poznata kompletna sekvenca globinskih lokusa čoveka (Poncz M et al. 1983.) a i kod velikog broja vertebrata je poznata sekvenca globinskih gena (Radosavljevic D & Crkvenjakov R. 1988.; Pavlovic S et al. 1999.). Znanja stečena istraživanjem globinskih gena pokrivaju bazični kurs molekularne biologije. Kako mutacije koje leže u osnovi talasemijskih sindroma potvrđuju ova saznanja, mi ćemo u kratkim crtama predstaviti regione DNK koji imaju ključnu ulogu u ekspresiji globinskih gena.

Kratak pregled molekularne biologije na primeru globinskih gena

Za regulaciju ekspresije globinskih gena najznačajniji je transkripcioni nivo (Orkin HS. 1990.).

Identifikovana su tri transkripciona regulatorna regiona u okolini adultnih globinskih gena: promotor i dva enhensera nizvodno od njega (prvi je lociran u drugom intronu a drugi iza gena, u 3' netranslirajućem regionu) (Antoniou M et al. 1988.). Svi ovi regulatorni regiona sadrže veliki broj mesta za vezivanje transkripcionih faktora.

Sekvence potrebne za efikasnu, tačnu i inducibilnu (tokom eritroidne diferencijacije) transkripciju globinskih gena, smeštene su u regionu koji se prostire oko 1000 bp uzvodno od mesta otpočinjanja transkripcije (*cap* mesto) i predstavljaju promotor globinskog gena (Antoniou M & Grosveld F. 1990.). Tu se, u β -globinskom genu, koji je najbolje proučen, nalaze tri regulatorna elementa: TATA blok (na poziciji -30 u odnosu na mesto otpočinjanja transkripcije), CCAAT blok (na poziciji -75) i CAC (tačnije CACCC) blokovi, proksimalni i distalni (na poziciji -90 i -105) (Myers RM et al. 1986.; Charnay P et al. 1985.). GATA motiv (A/T GATA A/G) je prisutan u regulatornim regionima svih globinskih gena (Talbot D et al. 1990.). Za njega se vezuje GATA-1 protein, eritroidno-specifičan transkripcioni faktor koji je aktivan u svim stupnjevima ontogenetskog razvoja (Orkin HS, 1990.) i ima snažan pozitivan efekat na transkripciju (Evans T & Felsenfeld G. 1991.).

LCR je regulatorni region udaljen 6-20 kb uzvodno od β - globinskog lokusa (Grosveld F et al. 1987.). Sadrži prominentna hipersenzitivna mesta (Orkin HS. 1990.). Hipersenzitivna mesta LCR-a su tkivno specifična (postoje samo u eritroidnim ćelijama) i stabilna su u svim stadijumima ontogenetskog razvića (Tuan D et al. 1985.). Formiranje hipersenzitivnih mesta je neophodno za ekspresiju β -globinskih gena (Forrester WS et al. 1987.). Delecija LCR-a dovodi do inaktivacije β -globinskog gena i fenotipa β talasemije (Stamatayannopoulos G & Nienhuis AW. 1987.). Region sličan LCR-u je pronađen i 40 kb ispred α -globinskog lokusa (HS-40) (Higgs DR et al. 1990.).

LCR je regulatorni element sa tri funkcije: on organizuje globinski lokus u transkripciono aktivan hromatinski domen (otvara hromatinsku strukturu), ponaša se

kao enhenser tokom diferencijacije globinskih gena i omogućava inducibilnu ekspresiju β -globinskih gena (Stamatayannopoulos G. 1991.).

Unutrašnji transkripcioni regulatorni region, lociran u IVS-II (intervining sequence II – drugi intron, eng.) je ispitan u čoveku (LaFlame S et al. 1987.). Pokazano je da ovaj regulatorni region učestvuje u tkivno-specifičnoj regulaciji β -globinskog gena.

Humani 3'-enhenser je lokalizovan na +2200 – +2400 bp nizvodno od mesta otpočinjanja transkripcije, ima osobine pravog enhensera i vezivna mesta za GATA-1 transkripcioni faktor (Wall L et al. 1988.).

Interesantno je da se α_2 i α_1 - globinski geni (identični u kodirajućem regionu) razlikuju među sobom samo po dve bazne zamene i jednoj inserciji od 7 nukleotida u IVS-II, kao i 3' netranslirajućem regionu (Michelson AM & Orkin SH. 1983.). Merenjem nivoa iRNK, pokazano je da se sa gena α_2 produkuje 2,8 puta više α -globinske iRNK nego sa gena α_1 (Liebhaber SA et al. 1986.). Pretpostavlja se da pored ova dva regulatorna elementa i interakcija HS-40 sa proksimalnim (α_2 – genom) omogućava njegovu efikasnu transkripciju. Sve govori u prilog pretpostavci da se ovde radi o kompeticiji dva gena za LCR (HS-40). U pitanju je polarna kompeticija (važan je položaj gena u odnosu na LCR). Gen koji je bliži LCR-u može da kompetira ekspresiji udaljenog gena dok kompeticija u suprotnom smeru nije moguća (Dillon N & Grosveld F. 1993.).

Treba naglasiti da postoje i negativni regulatorni elementi (silencer, eng.) u 5' regulatornim regionima, i da je pokazano da oni posebno utiču na ekspresiju humanih embrionalnih gena (Cao SX et al. 1989.).

Mutacije u opisanim regulatornim elementima rezultiraju neefikasnom transkripcijom globinske iRNK što, po definiciji daje talasemijski fenotip.

Pored transkripcione kontrole i posttranskripcioni proces obrade primarnog transkripta, incizija introna (splicing, eng), je od suštinske važnosti u kontroli ekspresije globinskih gena. Preduslov da "splajsing" bude ispravan je prisustvo specifične nukleotidne sekvence na granici egzona i introna. Postoje dve konsenzusne sekvence koje se nalaze na 5' (donorsko mesto "splajsinga": 5' (C/A)AG ▲ GT(A/G)AGT) odnosno 3' kraju introna (akceptorsko mesto "splajsinga": (T/C)n N(C/T)AG ▲ G3') (Padgett RA et al. 1986.; Mount SM. 1982.). Označeni nukleotidni parovi GT i AG su neophodni za korektan "splajsing". Značaj ovih konsenzusnih sekvenci je posebno istaknut činjenicom da mutacije koje ih menjaju ili mutacije koje kreiraju nova mesta "splajsinga" u globinskim genima, prouzrokuju abnormalno procesovanje iRNK i stoje u osnovi mnogih tipova talasemija.

Još nekoliko konsenzusnih sekvenci ima aktivnu ulogu u regulaciji ekspresije globinskih gena. Mutacije u ovim regionima su takođe zabeležene kod talasemičnih pacijenata što je potvrdilo prirodu njihove funkcije.

Zrela globinska iRNK pored informacije za sintezu polipeptidnih lanaca, sadrži sa oba kraja netranslirajuće regione, i to na 5' kraju dužine oko 50 bp, a na 3' kraju 100-150bp. Pored toga na samim krajevima globinska iRNA je modifikovana. "Šeširić" (*cap* structure, eng.), metilovani guanozin (m_7G) je pridodat na 5' kraju, a različit broj (50-75) adenzina na 3' kraju (poly(A)). Funkcija netranslirajućih regiona nije još razjašnjena, za "šeširić" se pretpostavlja da interaguje sa specifičnim inicijacionim faktorima u sintezi polipeptida, dok poly(A) doprinosi stabilnosti i RNK (Bunn HF & Forget BG. 1986.; Collins FS & Weissman SM. 1984.).

Konsenzusna sekvenca locirana u 5' netranslirajućem regionu neophodna za otpočinjanje transkripcije na određenom mestu naziva se *cap* mesto. U globinima, ova konsenzusna sekvenca je bogata pirimidinima, a u sredini se nalaze CA nukleotidi. Ova sekvenca može regulisati ne samo tačnost, već i efikasnost transkripcione inicijacije u eukariotskim promotorima koji nemaju TATA regulatorni element i tada se naziva inicijatorski element (Inr) (Smale St & Baltimore D. 1989.). Za β -globinski gen je pokazano da *cap* mesto funkcioniše kao Inr element u *in vitro* esejima (Lewis BA & Orkin SH. 1995.). I bazne zamene u *cap* mestu rezultiraju talasemijskim fenotipom.

Poliadenilacija na 3' kraju globinske i ostalih iRNK zavisi od heksanukleotidnog signala (AATAAA na DNK) u 3' netranslirajućem regionu koji je lociran 20 bp uzvodno od poly(A). Ova sekvenca nije samo signal za poliadenilaciju nego, što je još važnije, za tačno isecanje primarnog RNK transkripta pre dodavanja poly(A), pošto primarni transkript može da se prostire nekoliko stotina nukleotida nizvodno od kraja informacije za globinske polipeptide, pa da se tek onda dogodi poliadenilacija (Wickens M. 1990.; Wahle E & Keller W. 1992.). Neki tipovi talasemija su posledica baznih zamena u ovoj konsenzusnoj sekvenci.

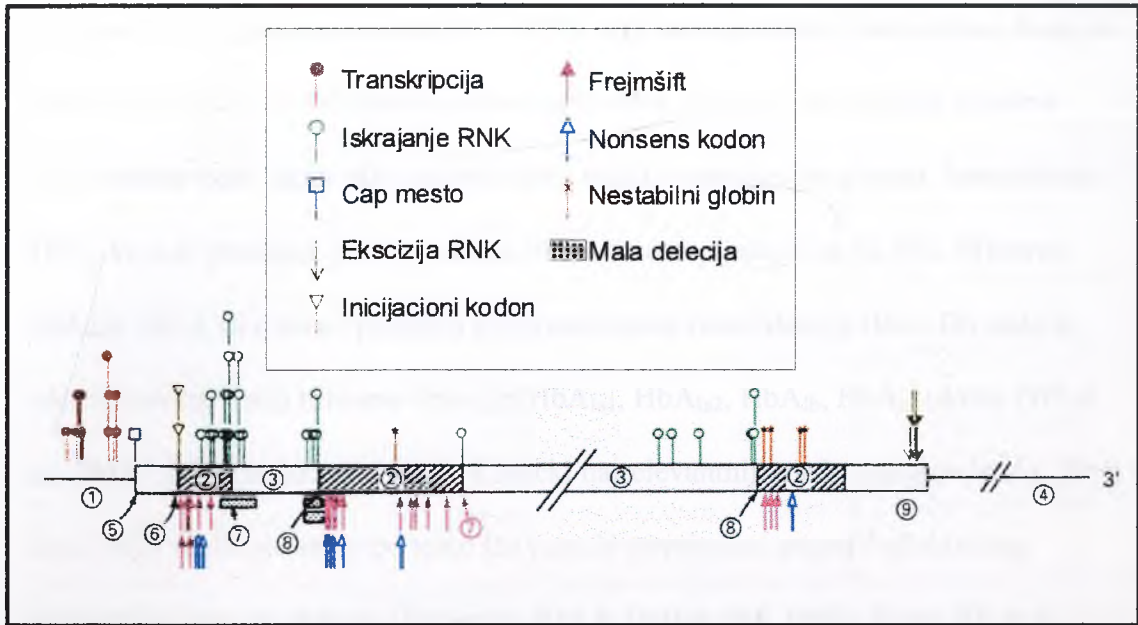
Translacija globinske (i drugih eukariotskih) iRNK počinje čitanjem tripleta AUG (ATG na DNK, kodira metionin). Ovaj N-terminalni metionin biva tokom elongacije polipeptidnog lanca isečen, sem u slučaju kada je i druga aminokiselina u nascentnom lancu metionin ili polarna aminokiselina, kao i kad je prolin treća aminokiselina u nizu (Boissel JP et al. 1985.). Poznat je čitav niz hemoglobinskih varijanti koje imaju takve aminokiselinske zamene na drugoj i trećoj poziciji, pa se na početku mutantnog lanca zadržao metionin. Mutacije u ATG kodonu rezultiraju potpunom blokadom normalne sinteze globinskih polipeptida.

Početno mesto translacije je ugnježđeno u Kozak-ovu konsenzusnu sekvencu (CC(A/G)CCATGG) koja predstavlja signal za vezivanje translacionih inicijacionih faktora i ribozoma za iRNK. Mutacije u ovoj sekvenci (naročito su važne pozicije -3 i +4, označene bold slovima) takođe srećemo kod talasemijskih sindroma (Kozak M. 1989.).

Terminacija translacije polipeptidnog lanca događa se na terminacionim kodonima (UAA; UAG; UGA). Mutacije u ovim kodonima imaju za posledicu translaciju i 3' netranslirajućeg regiona, odnosno abnormalno produžen polipeptidni lanac, dok translaciona mašinerija ne naiđe ponovo na sekvencu terminacionog kodona, kao što je slučaj kod nekih hemoglobinskih varijanti sa karakteristikama α -talasemije (Clegg JB et al. 1971.).

Mnoge mutacije (tačkaste ili frameshift) unutar kodona narušavaju integritet kodirajuće sekvence i dovode do sinteze nekompletnog lanca (nonsense, eng. mutacije) ili mutiranog lanca sa izmenjenim svojstvima (naročito nestabilnog), što najčešće i čini genetsku osnovu talasemijskih sindroma.

Na slici 5 su prikazane sve specifične sekvence i cis-regulatorni elementi bitni za regulaciju ekspresije globinskih gena. Mutacije u ovim sekvencama dovode do potpunog odsustva ili redukcije sinteze globinskih polipeptida, što rezultira patološkim fenotipom nazvanim talasemijskim sindromima. Na kraju je potrebno istaći da narušavanje bilo koje od faza u regulaciji globinske ekspresije (transkripcija gena, obrada primarnog transkripta, transport iRNK iz nukleusa u citoplazmu, stabilnost iRNK, translacija i formiranje Hb iz polipeptidnih subjedinica) može za posledicu imati jedan od talasemijskih sindroma.



Slika 5. Lokacija različitih tačkastih mutacija koje uzrokuju β -talasemiju, uzimajući u obzir važne strukturne elemente β -globinskog gena: 1. promotor, 2. egzoni, 3. introni, 4. enhenseri, 5. *cap* mesto, 6. mesto inicijacije translacije, 7. donorsko mesto za "splajsing", 8. akceptorsko mesto za "splajsing", 9. mesto za isecanje i poliadenilaciju RNK. (Kazazian HH Jr & Boehm CD. 1988.)

Globinski polipeptidi i hemoglobini čoveka

Molekuli hemoglobina kod zdravog čoveka su raznovrsni. Uvek ih čine par α – globinskih lanaca i par β – globinskih lanaca. U embrionalnom stadijumu iz α – globinskog lokusa se aktiviraju ζ i α geni, a iz β – globinskog lokusa ϵ i delimično γ – globinski geni. Embrionalni hemoglobini nastaju kombinacijom lanaca nastalih sa ovih gena: Hb Gower 1 ($\zeta_2 \epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) i Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$). U fetalnom stadijumu, neki od ovih gena se isključuju, a vrlo su aktivna dva, koja čine fetalni hemoglobin HbF ($\alpha_2 \gamma_2$). Posle rođenja, predominantni Hb F (fetalni hemoglobin) biva zamenjen adultnim hemoglobinima: HbA ($\alpha_2 \beta_2$) i Hb A₂ ($\alpha_2 \delta_2$).

Glavni hemoglobin u eritrocitima odraslog čoveka je Hb A. Sve uvodne napomene o strukturi i funkciji molekula Hb se odnose, u stvari, na ovu njegovu

frakciju. On je zastupljen sa oko 95 – 98 % svih hemoglobina u hemolizatu. Kada se analiziraju hemoglobini zdravog odraslog čoveka, uočavaju se različite minorne komponente koje imaju nižu izoelektričnu tačku u odnosu na glavnu komponentu HbA, koja se ponekad označava i kao HbA₀, a zastupljena je sa 92,5%. Minorne frakcije Hb A su u stvari produkti posttranslacione modifikacije HbA. Do sada su identifikovane četiri minorne frakcije: HbA_{Ia1}, HbA_{Ia2}, HbA_{Ib}, HbA_{Ic} (Allen DW et al. 1958. ; McDonald MJ. 1978.). Klinički najrelevantniji među njima je HbA_{Ic}, koji se od HbA razlikuje samo po tome što je za N-terminalnu grupu β-globinskog polipeptida vezana glukoza (Bookchin RM & Gallop PM. 1968.; Bunn HF et al. 1975.). Pacijenti oboleli od diabetes mellitusa imaju dva do tri puta uvećanu ovu frakciju. Ona je najpouzdaniji kriterijum za procenu uspešnosti kontrole dijabetesa, jer ne zavisi od fluktuacija količine glukoze u krvi (Trivelli LA et al. 1971.).

Hb A₂ (α₂ δ₂) je minorna adultna frakcija Hb, zastupljena sa 2,5 – 3,5 %, zbog čega je u fiziološkim uslovima irelevantna, iako ima funkcionalne karakteristike (afinitet za kiseonik, Bohr-ov efekat, kooperativnost, odgovor na 2,3 DPG) identične onima kod HbA (deBruin SH & Janssen LHM. 1973.; Bunn HF & Briehl RW. 1970.). Pokazano je da je uzrok niske zastupljenosti Hb A₂ izrazito smanjena sinteza δ-globinskog lanca u odnosu na β (Roberts AV et al. 1972.). Kasnije je utvrđeno da je regulacija poremećena na transkripcionom nivou i da su za to odgovorne razlike koje postoje između promotora i IVS-II δ- i β-globinskih gena (Proudfoot NJ et al. 1980.; Kosche K et al. 1984.). Uz to, i formiranje α/β dimera je favorizovano u odnosu na α/δ dimere (Bunn HF. 1987.). Naime, α-globin ima ukupno pozitivno površinsko naelektrisanje, dok su β-globini negativno naelektrisani. δ-globinski gen ima manje negativno naelektrisanje od β-gena, tako da dimerizuje sa α-globinskim lancima u manjem stepenu.

Iako minorna, ova frakcija uživa ekstremnu "popularnost", jer predstavlja najbolji marker za diferencijalno dijagnostikovanje nekih bolesti, među kojima prednjače talasemijski sindromi.

Hb A₂ se sintetiše u svim eritroidnim progenitorima i stoga je njegova distribucija u krvi pancelularna (Heller P & Yakulis V. 1968.). Suprotno ovome, pokazano je da fetalni hemoglobin, HbF, nije ravnomerno distribuiran u ćelijama crvene loze (Boyer SH et al. 1974.). Samo 0,1 % do 7% ćelija ove loze sadrži detektibilne količine HbF. Ove ćelije se nazivaju F ćelijama i sadrže oko 5 pg HbF, što predstavlja 20% totalnog sadržaja Hb u ćeliji. Produkcija i zastupljenost F ćelija su genetski kontrolisane (Dover GJ et al. 1990.).

Posle osme gestacione nedelje, HbF postaje predominantni hemoglobin, zamenjujući embrionalne hemoglobine. Neposredno po rođenju on je zastupljen sa 75% u krvi. Šest meseci posle rođenja Hb F je prisutan u hemolizatu sa manje od 5%, a kasnije spada na ispod 1%.

Oko 20% HbF u fetusu ima posttranslacionu mutaciju: N terminus γ -globinskog lanca je acetilovan (Schroeder WA et al. 1962.). Zbog toga 2,3 DPG slabije interaguje sa HbF, što rezultira povišenim afinitetom za kiseonik koji ima ova Hb frakcija. Ova karakteristika HbF olakšava transport kiseonika kroz placentu. HbF je rezistentan na denaturaciju u ekstremno visokim pH (alkalnim) uslovima. Ova osobina HbF se uspešno koristi za određivanje njegove zastupljenosti u hemolizatu.

Embrionalni hemoglobini, Hb Gower 1 ($\zeta_2 \epsilon_2$), Hb Gower 2 ($\alpha_2 \epsilon_2$) i Hb Portland ($\zeta_2 \gamma_2$), se produkuju u žumančanoj kesi od treće do osme nedelje gestacije (Stamatoyannopoulos G & Nienhuis AW. 1994.). Svi imaju sposobnost kooperativnog vezivanja kiseonika (Huehns ER & Farooqui AM. 1975.), za razliku

od HbH (β_4) i Hb Bart (γ_4) koji se sreću kod nekih α -talasemija. Hb Bart je prisutan u maloj količini i kod novorođenčadi. Da bi hemoglobin funkcinisao fiziološki, mora sadržati po 2 lanca α - odnosno β -tipa. HbH i Hb Bart su tetrameri lanaca β -tipa, nemaju sposobnost kooperativnog vezivanja a afinitet za kiseonik im je veoma visok, što ih čini neefikasnim transporterima koseonika.

Dosad opisani hemoglobini se sreću u cirkulaciji zdravih individua. Postoji i ogroman broj mutiranih hemoglobinskih formi, čije prisustvo u cirkulaciji daje najrazličitiji spektar patoloških simptoma. Takvi hemoglobini se najčešće označavaju kao strukturne hemoglobinske varijante.

Patološki hemoglobini čoveka – strukturne hemoglobinske varijante

Hemoglobinske varijante su "kvalitativni" poremećaji hemoglobina. To su hemoglobini koji se sintetišu u normalnim količinama ali imaju izmenjen aminokiselinski sastav, jer nastaju zbog mutacija u kodirajućim regionima globinskih gena. Usled izmenjenog aminokiselinskog sastava ovi hemoglobini imaju izmenjene fizičke i hemijske karakteristike. Kliničko ispoljavanje hemoglobinskih varijanti je veoma različito, obično je blaže nego kod talasemija, ali neke od njih daju izrazito tešku kliničku sliku.

Hemoglobinske varijante su rezultat različitih molekularnih lezija kao što su: pojedinačne supstitucije aminokiselina, delecije aminokiselina, fuzije gena (kao što je Hb Lepore, koji nastaje nejednakim krosing overom između δ - i β -gena), mutacije terminalnih kodona koje dovode do sinteze produženog globinskog lanca (Hb Constant Spring). Registrovano je 731 različitih strukturnih varijanti, među njima

216 varijanti α -lanca, 348 varijanti β -lanca, 70 varijanti γ -lanca, 30 varijanti δ -lanca, 10 fuzionisanih hemoglobina, 25 hemoglobina sa delecijama i/ili insercijama, 13 hemoglobina sa produženim lancima, 19 hemoglobina sa više od jedne tačkaste mutacije u jednom lancu (Carver MFH & Huisman THJ. 1997.). Među ovim varijantama samo neke su klinički relevantne.

Pojedine β -varijante se sintetišu istom efikasnošću kao i HbA i nisu nestabilne. Ipak, najveći broj uobičajenih β -varijanti su zastupljene u hemolizatu sa manje od 50%. Varijante sa pozitivnim lancem, kao što su Hb S, Hb C, Hb D, Hb E čine manje od 50% hemoglobina u heterozigotnom stanju i njihova količina se smanjuje u prisustvu α -talasemije zbog smanjenog afiniteta ovako izmenjenih β -lanaca za α -globinske lance. S druge strane, varijante sa negativnim lancem su zastupljene sa više od 50% u heterozigotnom stanju i njihova količina raste u prisustvu α -talasemije zbog njihovog većeg afiniteta za α -globinski lanac u odnosu na normalan β -globinski lanac. Neke β varijante su zastupljene sa manje od 25% zbog nestabilnosti ili niskog nivoa sinteze (Hb Lepore).

Pošto normalne individue imaju četiri α -globinska gena, varijante α -lanca mogu činiti samo 25% od ukupne količine Hb u ćeliji. Razlike u zastupljenosti vezane su i za tip α -gena koji je mutiran (α_2 gen produkuje veću količinu Hb varijante nego α_1 gen).

Srpasti sindromi

Hb S je najrasprostranjeniji izmenjeni hemoglobin u kome je na poziciji 6 β -polipeptidnog lanca glutaminska kiselina zamenjena valinom. Najveća učestalost se sreće među afričkim crncima i crncima iseljenim u druge zemlje. U prisustvu velike količine Hb S (80-95%) dolazi do deformacije eritrocita-dobijaju srpast izgled.

Zahvaljujući ovom izgledu eritrocita, Hb S je prva otkrivena hemoglobinska varijanta. Klinička slika se karakteriše brojnim bolnim krizama koje su uslovljene okluzijama arteriola i infarktima tkiva (srpast oblik eritrocita izaziva smetnje u mikrocirkulaciji i povećava viskoznost krvi) (Milner PF. 1983.).

Nestabilni hemoglobini (hemolitička anemija udružena sa Heinz-ovim telima)

Nestabilne hemoglobinopatije se nasleđuju po autozomalno dominantnom modelu. Do danas je poznato oko 100 strukturnih varijanti sposobnih da produkuju kliničku sliku nestabilne hemoglobinopatije. U 75% slučajeva radi se o mutaciji u β -globinskom lancu.

Značajan deo ovih varijanti nastaje zbog neutralnih aminokiselinskih supstitucija u blizini džepa hema. Ove mutacije dovode do značajnih poremećaja u unutrašnjosti molekula. Zbog toga što ne dolazi do promene električnog naboja lanca, elektroforetska pokretljivost ovih hemoglobina odgovara elektroforetskoj pokretljivosti Hb A. Jedna petina svih nestabilnih varijanti nastaje zbog supstitucije različitih aminokiselina iz α interhelikalnih segmenata prolinom. Nestabilnost je rezultat izmenjene sekundarne strukture, a ona se javlja zbog toga što prisustvo prolinskih ostataka u interhelikalnim segmentima otežava formiranje α -heliksa. U mnogim slučajevima hem se gubi iz molekula. Nestabilnost dovodi do precipitacije hemoglobina. Precipitati se nazivaju Heinz-ova tela. Heinz-ova tela sadrže jednaku količinu α i β lanca i odgovarajuću količinu hema. Usled prisustva Heinz-ovih tela, crvena krvna zrnca gube elastičnost, i stoga se zadržavaju u mikrocirkulaciji, gde ih selektivno uništavaju ćelije retikuloendotelnog sistema (Milner PF. 1983.).

Neki hemoglobini su toliko nestabilni (hipernestabilni) da se ne mogu detektovati hematološkim pregledom. Te varijante u heterozigotnom stanju daju sliku talasemije intermedije.

Karakteristike kliničke slike su: hemolitička anemija, splenomegalija, tamna boja urina zbog prisustva dipirola, koji su posledica aberantnog, neenzimskog katabolizma hema. Dijagnoza se zasniva na detektovanju Heinz-ovih tela, i nestabilnosti hemoglobina testom toplotne denaturacije. Nestabilni hemoglobini često imaju izmenjen afinitet za kiseonik. Elektroforetska pokretljivost nekih varijanti odgovara Hb A, druge varijante imaju jednu ili više traka sa izoelektričnom tačkom različitom od Hb A. Izostanak trake je posledica ispadanja hema iz Hb ili njegovog premeštanja u džepu.

Hemoglobinske varijante sa izmenjenim afinitetom prema kiseoniku

Poznato je oko 50 varijanti sa povećanim afinitetom prema kiseoniku. Aminokiselinske supstitucije lokalizovane u C terminusu, ili regionu $\alpha 1-\beta 2$ kontakta imaju za posledicu promenu odnosa ekvilibrijuma oksid- i deoksid-forme hemoglobina. Ove mutacije stabilizuju tetramer u "oksid" konfiguraciji, čime je povećan afinitet hemoglobina prema kiseoniku, a oslabljeno njegovo otpuštanje u tkivima pri niskom parcijalnom pritisku kiseonika. Druge varijante nastaju zbog supstitucije aminokiselina koje učestvuju u vezivanju 2,3-DPG-a. 2,3-DPG je glavni intracelularni modulator afiniteta hemoglobina prema kiseoniku. U njegovom prisustvu afinitet hemoglobina prema kiseoniku progresivno opada. Ukoliko hemoglobin, zbog supstitucija aminokiselina, nije u stanju da vezuje 2,3-DPG, dolazi do povećanja afiniteta prema kiseoniku. Klinička slika se karakteriše povećanom produkcijom eritropoetina i kompenzatornom eritrocitozom. Hemoliza crvenih

krvnih zrnaca zbog njihove izmenjene morfologije nije prisutna. Dijagnoza se postavlja elektroforetskom analizom hemoglobina i analizom krive disocijacije hemoglobina.

Određen broj hemoglobinskih varijanti, kao što su Hb Kansas i Hb Beth Israel, imaju smanjen afinitet prema kiseoniku. Kod njih je odnos ekvilibrijuma oksid i deoksi-forme pomeren prema deoksi-formi, zbog čega dolazi do smanjenja afiniteta prema kiseoniku i pojačanog otpuštanja kiseonika i pri nižem parcijalnom pritisku kiseonika. Ove varijante povremeno produkuju sliku analognu onoj koja se javlja usled prisustva Hb M.

Hemoglobin M

Hemoglobine M čini grupa od sedam varijanti, koji se nasleđuju po autozomalno dominantnom modelu. Šest od ovih varijanti nastaju zbog supstitucije proksimalnog (F8) ili distalnog (E7) histidina tirozinom u blizini hema. Tirozin funkcioniše kao interni ligand i stabilizuje gvožđe u feri obliku. Fundamentalna karakteristika ovih varijanti je snižen afinitet prema kiseoniku.

Klinička slika se karakteriše cijanozom. Krv ima karakterističnu plavu boju. Elektroforeza hemoglobina pokazuje jednu traku izmenjene pokretljivosti, bliže anodi. Hb A i Hb M se lako mogu razdvojiti ukoliko se hemolizat pre elektroforeze prevede u methemoglobin. Apsorpcioni spektri su slični ali ne i identični sa apsorpcionim spektrom methemoglobina.

Talasemijske strukturne varijante

Neke hemoglobinske varijante se karakterišu kako prisustvom biosintetskog defekta, tako i abnormalnom strukturom. Mogu davati fenotip β -talasemije i, ređe,

fenotip α -talasemije. One predstavljaju relativno retke uzročnike talasemijskih sindroma i o njima će se posebno govoriti u narednim poglavljima.

Talasemijski sindromi

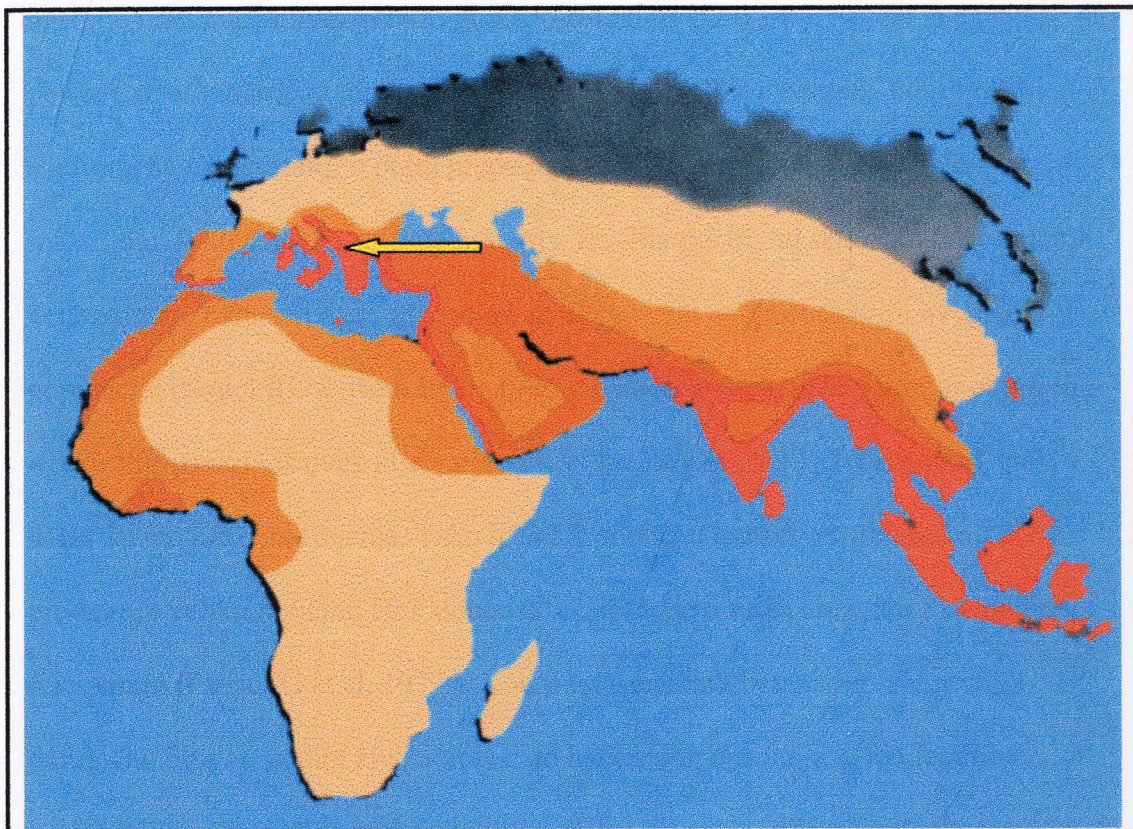
Uvod u talasemijske sindrome

Patologija molekula hemoglobina (hemoglobinopatije) obuhvata i talasemijske sindrome. Talasemijski sindromi su grupa naslednih oboljenja koja se karakteriše poremećajem u sintezi jednog ili više polipeptidnih lanaca hemoglobina. Posledica su mutacija u genima za globinske lance i predstavljaju autozomna recesivna oboljenja. Ako je sinteza α -globinskog lanca redukovana, radi se o α -talasemijama, dok je kod β -talasemija smanjena ili potpuno odsutna sinteza β -globina.

Reč "talasemija" je poreklom od grčke reči koja označava "more". Naziv je prvi put upotrebljen za anemije karakteristične za područje Mediterana (Whipple GH & Bradford WL. 1932). I zaista, iako su zabeležene u svim etničkim grupama i na svim geografskim lokacijama, talasemijski sindromi su bolest Mediterana i ekvatorijalnih zona Azije i Afrike. "Talasemijski pojas" se proteže duž obala Sredozemnog mora, preko Arapskog poluostrva, Turske, Irana, Indije i jugoistočne Azije (Livingstone FB. 1967.). Frekvencija talasemičnih gena je u ovom pojasu od 2,5-15%. (Slika 6).

Prevalencija talasemija je karakteristična za različite populacije (Livingstone FB. 1985.). U južnoj Italiji, Siciliji i Grčkoj 10% stanovništva predstavlja

heterozigote za β -talasemije. Na nekim grčkim ostrvima i delovima Sardinije ova učestalost se penje i do 20, odnosno 30% (Frazer GR et al. 1964.). U jugoistočnoj Aziji učestalost β -talasemijskih mutacija je oko 5%, a kod američkih i afričkih crnaca 1,5%.



Slika 6. Distribucija i prevalencija talasemijskih sindroma u svetu. Intenzitet crvene boje označava procenat zastupljenosti talasemijskih sindroma u pojedinim regionima. Intenzivno crvena boja označava "talasemijski pojas". Smanjenje intenziteta crvene boje je znak sve manje učestalosti mutacija koje stoje u osnovi ovih sindroma. Strelicom je označena SR Jugoslavija.

α -talasemije su verovatno najčešće monogeno oboljenje na svetu (Higgs DR et al. 1989.). Najčešće se sreću u jugoistočnoj Aziji. Na Tajlandu je prevalencija α -talasemija 20-30%, u pojedinim delovima Nove Gvineje i do 80% (Oppenheimer SJ et al. 1984.). I u crnačkoj populaciji (naročito zapadna Afika) su česte α -talasemije (20-30%) (Dozy AM et al. 1979.). U Mediteranu su α -talasemije mnogo ređe nego β -talasemije, sa incidencijom od oko 5% (Kanavakis E et al. 1988.).

Nasuprot ovome, frekvencija α -talasemija je manja od 0,01% u Velikoj Britaniji i Japanu (Flint J et al. 1986.; Shimizu K et al. 1986.).

Ovakva, skoro endemska, distribucija letalnih (pa stoga i dovoljno aparentnih da se mogu pratiti) talasemijskih sindroma, kao i distribucija srpaste anemije i deficita dehidrogenaze glukozo-6-fosfata (G-6-PD), navela je naučnike da postave tzv. "malaričnu hipotezu" (Weatherall DJ. 1987.). Naime, talasemijski sindromi su najučestaliji u onim predelima koji su u prošlosti bili pogođeni malarijom. Pretpostavlja se da je malarija izvršila pozitivnu selekciju talasemičnih heterozigota, odnosno da je ova bolest manje uticala na reprodukciju ovog dela populacije (Nagel RL & Roth EFJr. 1989.). Celularni mehanizam koji bi objasnio ovu pretpostavku još uvek nije u potpunosti razjašnjen. Neki eksperimenti ipak sugerišu moguća objašnjenja. Tako je pokazano da u kulturi eritrocita koji proizvode veliku količinu HbF dolazi do retardacije u rastu i razviću *Plasmodiuma falciparum* (Pasvol G et al. 1977.). Kod β -talasemičnih heterozigota u prvoj, i delimično drugoj, godini života dolazi do usporenog opadanja nivoa fetalnog hemoglobina, što može imati protektivni efekat od potencijalno fatalne malarije u ranom detinjstvu. Alternativno objašnjenje uzima u obzir činjenicu da je membrana ćelija crvene loze kod talasemija izrazito susceptibilna na oštećenja izazvana oksidativnim stresom, a kako infekcija malaričnim parazitom doprinosi da oksidativni stres dostigne kritični nivo, dolazi do lize inficiranih ćelija, što rezultira smrću parazita i protektivnim efektom (Friedman MJ & Traeger W. 1981.).

Nomenklatura

Talasemijski sindromi obuhvataju talasemije i talasemijske hemoglobinske varijante.

Talasemije se obično klasifikuju prema tipu globinskog lanca koji odsustvuje (α^0 odnosno β^0 -talasemije) ili je prisutan u smanjenim količinama (α^+ odnosno β^+ -talasemije). Osnovne grupe čine $\alpha - i \beta -$ talasemije a ređe su, i klinički manje relevantne, δ talasemije. Postoje i kompleksne forme β -talasemije. One sadrže seriju mutacija koje mogu zahvatiti većinu gena iz β -globinskog lokusa. To su : $\gamma\delta\beta$ -talasemije i $\delta\beta$ -talasemije. U heterozigotnom obliku ovako mutirani β -globinski lokusi – genotipovi ne daju tešku kliničku sliku.

Neke mutacije narušavaju normalni patern isključivanja γ -globinskog gena i uključivanja β -globinskog gena (switching, eng). Nasledno zadržavanje fetalnog hemoglobina (HPFH- hereditary persistence of fetal hemoglobin, eng.) je grupa poremećaja koji se manifestuju nastavkom sinteze Hb F i u odraslih osoba. Ovi poremećaji nisu povezani sa kliničkim simptomima, a ipak se izučavaju u okviru talasemijskih sindroma, zbog svoje modulatorske uloge u nekim teškim oblicima talasemije i srpaste anemije. U slučaju udruženog nasleđivanja HPFH i talasemijskih sindroma vezanih za β -globinske gene, može se pratiti modulatorski efekat HPFH na fenotip.

Pored talasemija, talasemijski sindromi obuhvataju i **talasemijske hemoglobinske varijante**. To su hemoglobinopatije čiji polipeptidni lanci imaju izmenjeni sastav ("kvalitativni" poremećaji hemoglobina), ali zbog izuzetnih molekularnih mehanizama koji počinju da deluju izazvani prirodom mutacije, ovi polipeptidi se sintetišu i u manjoj količini, pa rezultiraju talasemijskim fenotipom

("kvantitativni" poremećaji hemoglobina). Ovde se ubrajaju Hb Lepore, HbE, Hb Constant Spring i više hemoglobinskih varijanti koje pokazuju ekstremnu nestabilnost.

Patofiziologija – opšti principi

Klinički sindromi vezani za talasemiju su posledice:

- 1) nedovoljne akumulacije hemoglobina što rezultira hipohromijom i mikrocitomom, i
- 2) neizbalansirane akumulacije pojedinih globinskih subjedinica (polipeptida) što vodi ka neefektivnoj eritropoezi i hemolitičkoj anemiji (Benz EJ Jr. 1988.).

Primarna lezija kod svih oblika talasemija i talasemijama sličnih sindroma je odsustvo ili smanjena produkcija jednog ili više globinskih lanaca. Klinički su relevantni samo α - i β -globinski polipeptidi, neophodni za sintezu HbA (drastično smanjena sinteza γ -, ϵ - i ζ -globinskih lanaca je letalna *in utero*). Najznačajnija i odmah uočljiva posledica je deficit HbA u talasemičnim eritrocitima, odnosno njihova hipohromija i mikrocitoza. U blažim kliničkim formama, ovaj fenomen se jedva uočava.

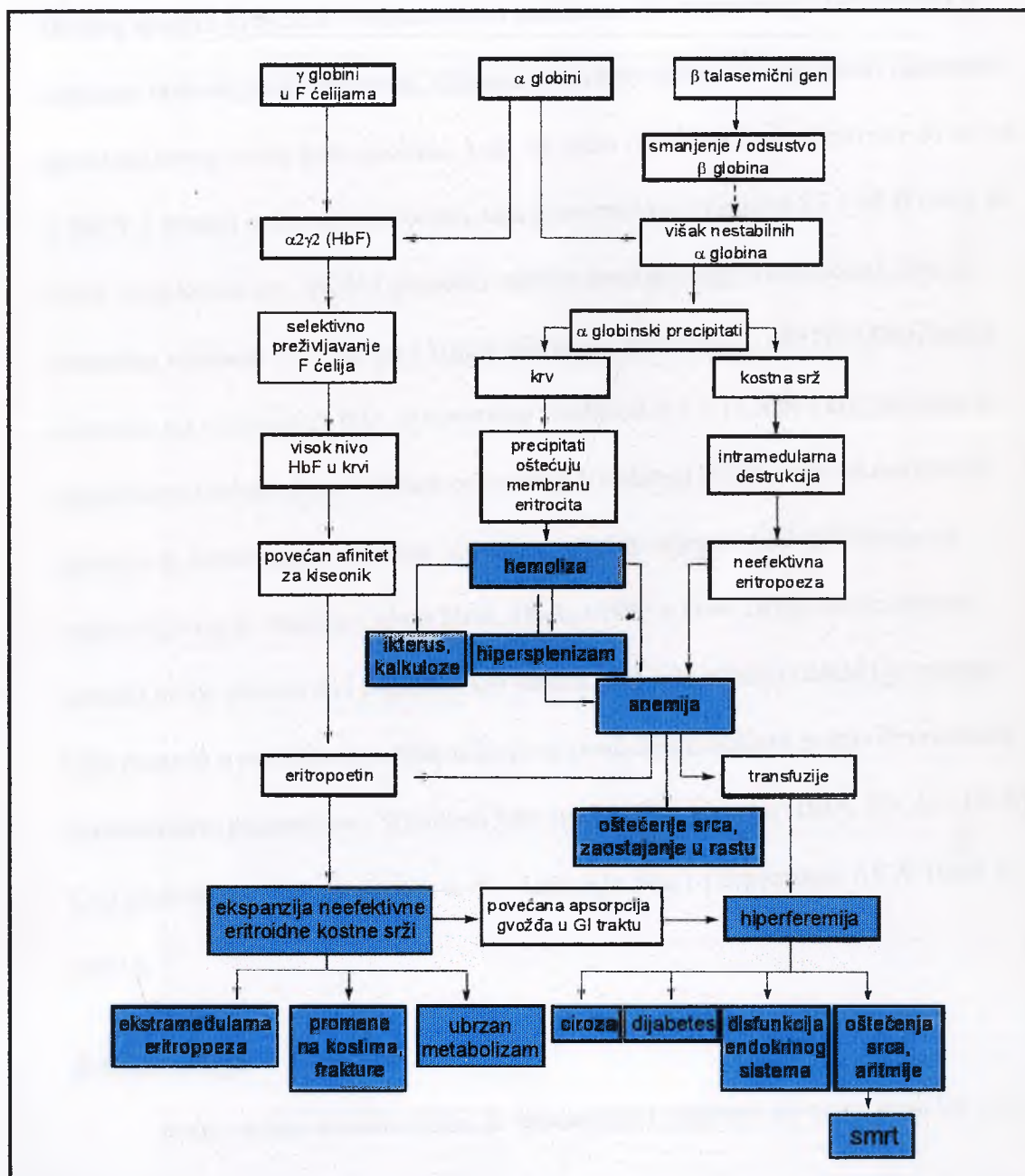
Druga posledica smanjene biosinteze α - ili β -globinskog lanca je akumulacija lanca koji se normalno sintetiše. Hemoglobinski tetrameri su vrlo solubilni, za razliku od slobodnih, odnosno nesparenih globinskih lanaca, koji su vrlo nesolubilni i formiraju nestabilne agregate koji bivaju oksidisani i precipitiraju u ćeliji. Kod β -talasemija, agregati α -lanaca se nazivaju inkluzionim telima, ili, češće ali nepravilno, Heinz-ovim telima (prava Heintz-ova tela sačinjavaju precipitirani

molekuli HbA ($\alpha_2 \beta_2$). Kod α -talasemija se formiraju homotetrameri (HbH (β_4) i HbBart (γ_4)-intrauterino), koji su nešto stabilniji od α -globinskih agregata i precipitiraju mnogo sporije. Ovi precipitati dovode do fizičkog i oksidativnog oštećenja ćelijske membrane, što izaziva prevremenu destrukciju eritroidnih ćelija (hemoliza). Ćelijske membrane pokazuju i veći rigiditet i viskozitet, što i uslovljava lizu ovih ćelija u retikuloendotelskom sistemu slezine (Schrier SL et al. 1989.). Povećana aktivnost slezine rezultira i hipersplenizmom, tako karakterističnim za ova oboljenja. Proces formiranja agregata i njihova precipitacija se događaju intenzivno i u eritroidnim prekursorima kostne srži, i odgovorni su za izraženu neefektivnu eritropoezu i intramedularnu destrukciju eritroidnih ćelija. Treba napomenuti da neizbalansirana akumulacija dominira u patofiziologiji teških oblika talasemijskih sindroma i doprinosi joj mnogo više od niskog nivoa produkcije funkcionalnog hemoglobina.

Dominantni cirkulišući hemoglobin u momentu rođenja je HbF. Iako se inaktivacija γ -globinskog gena i istovremena aktivacija β -globinskog gena (γ/β zamena) događa pre rođenja (Stamatoyannopoulos G. 1991.), hemoglobinski sastav periferne krvi se menja znatno kasnije zbog dugog životnog veka ćelija crvene loze. Hb F se, stoga, relativno sporo zamenjuje adultnim hemoglobinom (HbA), tako da deca do 4-6 meseci ne zavise mnogo od HbA. Patofiziološka posledica toga je da su α -talasemije simptomatične *in utero* i odmah po rođenju (α -globinski lanci učestvuju i u formiranju HbF), a da su abnormalnosti β -globinskog lanca asimptomatične u prvih 4-6 meseci života (HbF preuzima ulogu HbA)..

Osnovna klinička posledica patofizioloških procesa kod talasemija je anemija. Kliničke manifestacije anemije izazvane talasemijama variraju od asimptomatske hipohromije i mikrocitoze, pa sve do teške anemije koja je fatalna *in*

utero ili u ranom detinjstvu, ako se ne leči. Transfuzija je terapijska mera predupređenja pogoršanja kliničke slike. Međutim, primena čestih transfuzija, kao i intenzivirana apsorpcija gvožđa u gastrointestinalnom traktu, dovodi do ogromnog viška gvožđa u plazmi, što opet doprinosi oštećenju mnogih vitalnih organa (srca, jetre), i na kraju do smrti (Weatherall DJ & Clegg JB, 1981.) (Slika7).



Slika 7. Patofiziologija teškog oblika β-talasemije. Obojeni blokovi označavaju kliničke manifestacije (Weatherall DJ & Clegg JB, 1981.)

Klinička i hematološka klasifikacija talasemijskih sindroma – fenotip

Talasemijski sindromi su posledica ogromnog broja najrazličitijih mutacija, koje se mogu naslediti u heterozigotnom obliku, homozigotnom obliku i u međusobnim kombinacijama (dvostruki heterozigoti), tako da se manifestuju u vidu širokog spektra kliničkih i hematoloških sindroma. Pri razmatranju hematoloških aspekata talasemijskih sindroma, uzimaju se u obzir sledeći hematološki parametri: pored sniženog nivoa hemoglobina, koji ne mora biti naročito indikativan, to su još i: MCV (srednji volumen eritrocita), čija je normalna vrednost 85 – 95 fl i koji je mera za mikrocitozu, MCH (prosečni sadržaj hemoglobina u eritrocitu), čija je normalna vrednost 27 – 32 pg i koji je mera za hipohromiju, i RDW (distribucija eritrocita po volumenu), čije su normalne vrednosti 8,5 – 11,5 % i koji je mera za anizocitozu (nejednakost veličina eritrocita). Vrednosti RDW veće od normalnih ukazuju na talasemijski sindrom. Za diferencijalnu dijagnostiku talasemija od neprocenjivog su značaja i nivoi HbA, HbA₂ i HbF u krvi. Utvrđivanje odnosa između nivoa sinteze α - i β -globinskih lanaca (α/β biosintetski indeks) je metoda koja pomaže u razrešavanju dilema koje su pred dijagnostičara postavili vrednosti hematoloških parametara i vrednosti hemoglobinskih frakcija (HbA, Hb A₂ i Hb F). Kod zdravih ljudi odnos sinteze α/β – lanaca je oko 1 (Braverman AS & Bank A. 1969.).

β -talasemije

Prema težini kliničke slike β -talasemijski sindromi se mogu podeliti u tri grupe:

- 1) talasemija minor ili "trait" – blaga, neprogresivna, hipohromna i mikrocitna anemija, heterozigotni nosioci;
- 2) talasemija intermedija – srednje težak poremećaj, dvostruki heterozigoti za "benignije", blaže mutacije, koje ne uzrokuju značajno smanjenje sinteze odgovarajućeg globinskog lanca;
- 3) talasemija major, Cooley-eva anemija – težak poremećaj, izrazita, kontinuirana zavisnost od transfuzija krvi, najčešće homozigoti ili dvostruki heterozigoti.

β-talasemija minor

Kod heterozigotnih nosilaca β – talasemija (β-talasemija minor ili "trait") nivo hemoglobina nije značajno snižen (1-2 g/dL manje nego kod zdravi ljudi istog uzrasta i pola). MCV i MCH su značajno sniženi. Njihove vrednosti zavise od uzrasta i pola (Galanello R & Melis MA. 1979) (Tabela 1). Povećanje hemoglobinske frakcije A₂ (normalne vrednosti su od 2,5 do 3,5 %) je jedan od najindikativnijih pokazatelja β – talasemija (one se čak i zovu " A₂ talasemije"). Nivo HbA₂ kod β-talasemije minor tipa varira od 3,5% do 7,1% (najčešće je oko 5,1%). I nivo HbF je kod nekih tipova β-talasemije minor blago povišen, najčešće ne više od 5%. U retikulocitima periferne krvi izmeren biosintetski odnos β/α globina varira od 0,5-0,7 (α/β=1,4-2,0).

Uzrast (godine)	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	HbA ₂ (%)
0,5 – 2	107± 8	60± 3	19,1± 1,7	5,1± 0,5
2 – 6	107± 10	61± 4	19,0± 1,6	5,3± 0,6
6 – 12	114± 1	62± 5	19,3± 1,9	5,2± 0,6
Adult M	133± 8	67± 6	21,9± 2,3	5,0± 0,5
Adult Ž	118± 9	66± 4	21,9± 1,6	5,0± 0,5

Tabela 1. Hematološki parametri kod heterozigotnih nosilaca β-talasemičnih mutacija u funkciji uzrasta (Cao A i Galanello R, 1994.)

β -talasemija minor tipa ima veoma blage simptome. Najčešće se otkriva tokom trudnoće (ponekad potrebne transfuzije u poslednjem trimestru) ili drugih ekstremnih nefizioloških situacija (hirurške intervencije, velika fizička naprezanja), kada osobe koje nose ovo genetičko opterećenje reaguju patološki u odnosu na zdrave ljude. Postoje čak i asimptomski nosioci (silent carrier, eng.) čije su mikrocitoza i disbalans u sintezi α - i β -lanaca nedektabilni, a nivo Hb A₂ je normalan. Ovi nosioci bivaju registrovani posle analize porodica kod kojih postoji obolelo dete sa mnogo težim oblikom β -talasemije od onoga koji ima drugi roditelj, za koga je već utvrđeno da je nosilac β -talasemične mutacije (Schwartz E. 1969.). Za prividno zdravog roditelja, u ovim slučajevima se dokaže da je asimptomski nosilac mutacije u β -globinskom genu. Asimptomaska β -talasemija je uzrokovana molekularnim defektima koji izazivaju neznatnu redukciju β -globinske sinteze (promotorske mutacije, mutacije u *cap* mestu) (Ristaldi MC et al. 1990.).

Iako se diferencijalna dijagnostika β -talasemije minor tipa bazira na mikrocitozi, izrazito povišenom nivou HbA₂ i blago povišenom nivou HbF, postoje mnogi podtipovi kod kojih variraju ovi parametri. Ovi različiti fenotipovi su u vezi sa različitim molekularnim lezijama koje ih izazivaju.

Tako, kod β -talasemije minor tipa nivo HbA₂ može biti normalan, a mikrocitoza i hipohromija su i dalje prisutne (a ne kao kod asimptomskih nosilaca). Ovakav fenotip predstavlja istovremeno prisustvo mutacija koje narušavaju funkciju i β - i δ -globinskog gena (udružena β - i δ -talasemija) (Moi P et al. 1988.).

Slične su i $\delta\beta$ talasemije, kompleksne forme β -talasemija, koje su izazvane velikim delecijama (zahvataju veći deo kodirajućih regiona i δ - i β -globinskih gena). I one se karakterišu mikrocitozom i hipohromijom, ali je sada nivo Hb A₂ ispod normalnog a Hb F je izrazito visok (5%-15%). Delecija δ - i β -gena *in cis* omogućava

regulatornim elementima γ -globinskog gena ekskluzivnu interakciju sa LCR-om. Visok nivo HbF ublažava kliničku sliku kod homozigota za $\delta\beta$ -talasemiju i individua koje su uz $\delta\beta$ alel nasledile i tipični β -talasemijski alel. Povišen nivo HbF kod talasemija koje imaju istovremeno neaktivne i δ - i β -globinski gen (bilo *in cis* ili *in trans*), ne treba mešati sa istom pojavom kod naslednog zadržavanja fetalnog hemoglobina (HPFH). Radi se, naime, o talasemičnim alelima (mikrocitoza, hipohromija) čiji je efekat ublažen kontinuiranom produkcijom HbF.

Još jedna kompleksna forma β -talasemije je $\gamma\delta\beta$ -talasemija. Mikrocitoza, hipohromija i normalni nivoi Hb A₂ i HbF su karakteristike heterozigota koji nose ovakve velike delecije (Pirastu M et al. 1983.). Ovakvu kliničku sliku imaju i α -talasemije, pa treba obratiti pažnju na mogućnost pogrešne dijagnoze. Sve nedoumice se razrešavaju dijagnostikovanjem molekularnog defekta koji je u osnovi patologije.

Jasno je da kompleksne forme β -talasemije (sadrže seriju mutacija koje mogu zahvatiti većinu gena iz β -globinskog lokusa) u heterozigotnom obliku daju fenotip β -talasemije minor.

Postoji i varijanta β -talasemije minor koja ima izrazito visok nivo i Hb A₂ i HbF (5% -20%) (Diaz-Chico JC et al. 1988.). Ova varijanta ima deletiran β -globinski gen i njegove regulatorne elemente. Kako su δ - i γ -globinski geni ostali intaktni, a ne kompetiraju više sa β -regulatornim elementima za interakciju sa transkripcionom faktorima i LCR-om, njihova transkripcija je mnogo efikasnija (Popovich BW et al. 1986.).

Kod heterozigotnih β -talasemija, uočen porast hemoglobinske frakcije HbA₂ predstavlja i relativno (procentualno) i apsolutno (od normalnog nivoa 0,6-0,7 pg po

ćeliji, do 1,0 pg po ćeliji kod β -talasemija minor) uvećanje sadržaja Hb A₂. Ovaj fenomen izgleda ima dvojaku prirodu. Prvo, može se objasniti efikasnijom inkorporacijom δ -globinskih lanaca u hemoglobinske dimere ($\alpha\delta$), što je posledica deficijencije β -globinskih lanaca (Bunn HF. 1987.). Međutim, pokazano je da se δ -globinski gen efikasnije transkribuje kod β -talasemija uzrokovanih genetskim lezijama u regulatornim regionima β -globinskog gena. LCR interaguje sa promotorima gena u β -globinskom lokusu po principu kompeticije (Orkin SH. 1990.). Kada odsustvuje funkcionalni β -globinski promotor, LCR je u mogućnosti da deluje kao enhenserski element na δ -gen. Najrazličitije druge mutacije u regulatornim regionima β -gena mogu uticati pozitivno na transkripciju ostalih gena iz lokusa *in cis* i to preko vezivanja transkripcionih faktora (posebno GATA-1). Verovatnoća vezivanja GATA-1 za δ -globinske regulatorne elemente može biti veća ako ovaj transkripcioni faktor nije angažovan na LCR-om i hromatinskom strukturom favorizovanim regulatornim elementima β -globinskog gena (Tsai SF et al. 1989.). Takođe, DNK rearanžmani nastali kao posledica mutacija u regionu β -gena, mogu formirati efikasnija vezivna mesta (konformacione promene) za transkripcione faktore koji će pozitivno regulisati transkripciju δ -globinskog gena. Isti princip važi i za povećanu transkripciju γ -globinskog gena koja prati različite talasemijske sindrome (β -talasemiju, $\delta\beta$ -talasemiju i HPFH) (Ohi S et al. 1990.).

Da se ne bi stekao utisak kako je naučnicima sve potpuno jasno u vezi sa fenomenom povišenog nivoa Hb A₂ kod heterozigotnih nosilaca β -talasemija, tu je i podatak da je poreklo viška δ -globinskog lanca sa oba hromozoma, a ne samo onog koji sadrži mutaciju u β -globinskom genu. Ovo je zaključeno iz ispitivanja porodica u kojima je postojala i strukturna δ -globinska varijanta koja je segregirala nezavisno od mutacije koja je uzrokovala β -talasemiju (Codrington Jf et al. 1990.). Tako

transkripcioni nivo prestaje da bude jedini odgovoran, već je u igri i izvesna posttranslaciona modifikacija, koja povećava afinitet δ -globinskih lanaca za α -globinske lance. Time prva tvrdnja o efikasnijoj inkorporaciji δ -globinskih lanaca u hemoglobinske dimere ($\alpha\delta$) kao posledici deficijencije β -globinskih lanaca (Bunn HF. 1987.), biva u mnogome upotpunjena.

Nedostatak gvožđa snižava nivo HbA₂ što može maskirati dijagnozu β -talasemije minor. Adekvatna terapija preparatima gvožđa će rezultirati realnim nivoom HbA₂ (Alperin JB et al. 1977.).

β -talasemija intermedija

Pet do 10% pacijenata koji su homozigoti ili dvostruki heterozigoti za mutacije u β -globinskom genu, nemaju ni približno tešku kliničku sliku u odnosu na onu koja se predviđa na osnovu patologije na DNK nivou. Niz talasemijskih sindroma sa srednje teškom kliničkom slikom, ili, bolje rečeno, ublaženom kliničkom slikom označava se imenom β -talasemija intermedija. Nivo Hb ne niži od od 6-8 g/dL (češće 9-10 g/dL) i relativno normalan život bez režima transfuzija su kriterijumi za β -talasemiju intermediju (Pearson HA. 1964.). Obično je nivo HbF uvećan (iznad 10%) (Cao A & Galanello R. 1994.).

Najrazličitiji molekularni mehanizmi mogu ublažiti manjak β -globinskih lanaca koji se javlja u ćeliji kod koje su mutirani β -globinski geni na oba hromozoma i time ublažiti simptome od kliničke slike talasemije major do talasemije intermedije (Cao A et al. 1990a.):

- 1) homozigotnost za "blagu" β -talasemičnu mutaciju, odnosno mutaciju koja ne uzrokuje značajno smanjenje sinteze β -globina (neke promotorske

- mutacije), kao i kombinacija "blage" i "teške" mutacije, s tim što u drugom slučaju dolazi do znatno dramatičnijeg toka bolesti,
- 2) istovremeno prisustvo homozigotne/dvostruko heterozigotne β -talasemije i α -talasemije karakteriše se smanjenom produkcijom β - ali i α -globinskog polipeptida, rezultira smanjenjem biosintetskog α/β disbalansa i dovodi do blaže kliničke slike – talasemije intermedije,
 - 3) istovremeno prisustvo homozigotne/dvostruko heterozigotne β -talasemije i genetičke determinante koja dovodi do kontinuirane produkcije γ -globinskog lanca i u adultnom periodu (HPFH) predstavlja mehanizam kojim se kompenzuje nedostatak β -globinskih polipeptida tako što γ -globinski lanci interagiju sa viškom α -globina,
 - 4) u retkim slučajevima, jedan β -talasemični alel može biti povezan sa mnogo težom kliničkom slikom od β -talasemije minor. U ovim slučajevima se β - talasemija intermedija često naziva dominantnom β -talasemijom. Radi se naime o mutacijama u trećem egzonu, koje dovode do produkcije nestabilnih β -globinskih lanaca (Kazazian HHJr et al. 1989.). Ovakvi nestabilni β -globinski lanci i precipitirani α -lanci u višku formiraju inkluzionna tela (Thein SL et al. 1990.) Agregacije inkluzionih tela sa ćelijskom membranom potenciraju oštećenje membrana i dovode do težeg oblika β -talasemije.
 - 5) udružene heterozigotnost za β -talasemiju i rearanžman u α -globinsom lokusu koji na jednom hromozomu sadrži tri α -gena. Disbalans α/β nastao zbog β -talasemije, uvećan je ekstremno povećanom produkcijom α -gena, što rezultira fenotipom β -talasemije intermedije.

β -talasemija major

Oba mutirana β -globinska alela daju tešku kliničku sliku mikrocitne, hipohromne, hemolitičke anemije koja, ukoliko nije kompenzovana permanentnim transfuzijama, dovodi do letalnog ishoda. Ovaj sindrom nosi ekskluzivan naziv talasemija major (ne postoji α -talasemija major) ili Cooley-eva anemija, po lekaru koji je 1925. prvi put opisao više dece sa sličnim radiografskim i hematološkim abnormalnostima (Cooley TB & Lee P. 1925.; Cooley TB et al. 1927). Talasemija major se karakteriše izraženom patološkom morfologijom ćelija crvene loze, anizocitozom (nejednakost veličine eritrocita), poikilocitozom (nejednakost oblika eritrocita), kao i prisustvom ćelija karakterističnog izgleda, podsećaju na metu (target, eng.). Nivo HbA je ekstremno snižen (od 0% do 20%). Ostatak, odnosno glavni hemoglobin kod ovih pacijenata je HbF. Nivo HbA₂ obično prati nivo HbA. Ipak, odnos HbA /HbA₂ je 20:1 kod obolelih od talasemije major, za razliku od normalnih odnosa gde je odnos 30:1. Biosintetski disbalans $\alpha/\beta+\gamma$ je ogroman i iznosi 3, ako je oboljenje uzrokovano β^+ mutacijama, odnosno 4, ako su u osnovi bolesti β^0 mutacije.

Dete obolelo od β -talasemije major nije anemično neposredno po rođenju, ali nivo hemoglobina progresivno opada tokom prvih meseci života, da bi oko prve polovine prve godine spao čak do nivoa od 3- 4 g/dL, i tada se kod deteta pojavljuju i ostali simptomi i postavlja dijagnoza.

α -talasemije

α -talasemije su heterogena grupa naslednih autozomno recisivnih poremećaja uzrokovanih defektnom sintezom α -globinskih lanaca. Weatherall i saradnici su predložili vrlo informativnu nomenklaturu za α -talasemijske sindrome (Weatherall DJ

& Clegg JB. 1981.). Kao što je ranije opisano, postoje 4 aktivna α -globinska gena, po 2 na svakom hromozomu. Tako se zdrave individue označavaju sa ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$) gde uvek prva pozicija na hromozomu predstavlja α_2 -gen (odgovoran za sintezu 75% ukupnih α -globinskih lanaca). Sa kliničkog i hematološkog stanovišta razlikujemo četiri različita tipa α -talasemija (Tabela 2):

- 1) asimptomski nosilac (silent carrier, eng.) u α -globinskom lokusu ima jedan inaktivisan ili delimično aktivan gen ($-\alpha/\alpha\alpha$). Ovaj tip α -talasemije se tradicionalno naziva α -talasemija-2. Hematološki parametri su ili normalni ili su mikrocitoza i hipohromija jedva detektabilni. Biosintetski odnos α/β je od 0,8% do 0,95%. Neonatusi mogu imati 1-2% Hb Bart u cirkulaciji (γ_4). Asimptomski nosioci α -talasemija se otkrivaju tako što su imaju potomka sa HbH (β_4) bolešću ($--/-\alpha$), a drugi roditelj ima dva funkcionalna α -gena (Embury SH. et al. 1980.).
- 2) α -talasemija trait, tzv. α -talasemija-1 je posledica inaktivacije dva α -globinska gena in *cis* ($--/\alpha\alpha$) ili in *trans* ($-\alpha/-\alpha$). Klinička slika se karakteriše hipohromijom i mikrocitozom, a nivoi HbA₂ i HbF su normalni ili blago sniženi.. Biosintetski indeks α/β je 0,55-0,75. Retko se mogu na razmazu periferne krvi videti i inkluziona tela (HbH). Hematološki parametri mogu uneti konfuziju pri diferencijalnoj dijagnostici α -talasemije trait, $\gamma\delta\beta$ -talasemije i dvostrukih heterozigota za β - i δ - talasemiju.
- 3) Bolest hemoglobina H (HbH disease, eng.) je mikrocitozna, hipohromna, hemolitička anemija. Predstavlja težu formu α -talasemijskih sindroma. Klinička slika se može okarakterisati kao talasemija intermedija. Njenu genetsku osnovu čine tri inaktivna α -gena ($--/-\alpha$). Biosinteza globinskih

peptida je značajno poremećena (α/β je manje od 0,5). Ogroman višak β -globinskih lanaca formira tetramere HbH, koji je ovde zastupljen sa 5% do 30% (Jone RT & Schroeder WA. 1963.). HbH ne pokazuje kooperativnost za vezivanje kiseonika i stoga je vrlo neefikasan za transport kiseonika u fiziološkim uslovima (Benesch RE et al. 1961.). Stoga, pacijenti sa značajnom količinom HbH imaju izraženije probleme nego što bi izmerena koncentracija hemoglobina mogla sugerisati. HbH čini ćelije crvene loze osetljivim na oksidativni stres, a precipitiran doprinosi preranoj lizi eritrocita (Shinar E & Rachmilewitz EA.1990.). HbH bolest je primarno hemolitička anemija. Inkluzije HbH se retko sreću u kostnoj srži, a eritropoeza je prilično efektivna (Fessas P & Yataganas X.1968.). Karakteristično za neonatuse je da sadrže oko 25% Hb Bart.

- 4) Hidrops fetalis je sindrom inkompatibilan sa životom, a nastaje usled neaktivnosti sva četiri α -globinska gena. Fetusi sa ovim genetskim poremećajem nisu sposobni da sintetišu α -globinske lance, i njihova krv sadrži samo HbH, Hb Bart i male količine Hb Portland (Todd D et al. 1970.). Nedonoščad se najčešće rađaju između 30 i 40 nedelje trudnoće, i umiru ubrzo po rođenju (Liang ST et al. 1985.). Ove bebe su izrazito edematozne (hidropne) zbog urođene srčane mane izazvane teškom anemijom.

Oznake α^+ i α^0 ovde označavaju hromozome sa kojih je produkcija α -polipeptida smanjena ili potpuno odsutna (Higgs Dr. 1993.). Tako je α -talasemija-2 sinonim za α^+ -talasemiju, a α -talasemija-1 sa oba α -gena inaktivisana *in cis* je α^0 -talasemija.

Tip α -talasemije	Genotip (delecija)	Fenotip (klinički)	Hematologija
α -talasemija-2	$-\alpha/\alpha$	asimptomski	Hb Bart 1-2% na rođenju
α -talasemija -1 (trait)	$--/\alpha\alpha$	asimptomski	hipohromija, mikrocitoza, HbA2 i HbF su normalni, Hb Bart 3-10% na rođenju
Bolest HbH	$--/-\alpha$	hemolitička hronična anemija, splenomegalija (talasemija intermedija)	mikrocitna, hipohromna anemija sa brojnim inkluzionim telima (HbH). Hb Bart do 25% na rođenju
Hidrops fetusa	$--/--$	Hidrops, anemija, letalno <i>in utero</i> ili odmah posle rođenja	eritroblastozna, anemija, anizopoikilocitoza, Hb Bart (do 80%). Nema HbA.

Tabela 2. Genotip i fenotip kod α -talasemija

α -talasemija i mentalna retardacija (ATR sindromi)

Dve forme α -talasemija povezane sa mentalnom retardacijom je opisano: ATR-16 i ATR-X (Gibbons RJ & Higgs DR. 1996.). ATR-16 je sindrom izazvan gubitkom DNK (1-2 megabaze) na kraju kraćeg kraka hromozoma 16 (pri čemu je deletiran i α -globinski lokus). Sindrom se karakteriše blagom α -talasemijom, blagom ili umerenom mentalnom retardacijom i čitavim nizom morfoloških i razvojnih abnormalnosti.

Druga forma ATR je uzrokovana genetskim defektom na hromozomu X i nije uopšte povezana sa α -globinskim genskim lokusom (Gibbons RJ et al. 1995.). Karakteriše se teškim oblikom α -talasemije, mentalnom retardacijom i neverovatno uniformnim fenotipom. Dokazano je da XH2 gen lociran na Xq13.3 kodira transkripcioni faktor, koji je važan pozitivan regulator u transkripciji α -globinskih gena (Gibbons RJ et al. 1995.).

Stečeni α -talasemijski sindrom

Retka, atipična forma HbH bolesti se može razviti tokom evolucije preleukemije ili mijeloproliferativne bolesti (najčešće u starijem dobu) (Higgs DR et al. 1981.). Ovi pacijenti imaju i dalje funkcionalne α -globinske lokuse, što znači da defekt nije lociran *in cis* (Helder J & Diesseroth A. 1987.). Smatra se da je neki transkripcioni faktor odgovoran i za ovaj fenomen .

HPFH

Nasledno zadržavanje fetalnog hemoglobina (HPFH – hereditary persistence of fetal hemoglobin, eng.) je poremećaj koji se manifestuje nastavkom sinteze γ -globinskih polipeptida i u odraslih osoba. Nije povezan sa relevantnim kliničkim simptomima, ali homozigoti za HPFH imaju blagu mikrocitozu i blago neizbalansiran odnos α/β -globinske sinteze (Friedman S et al. 1976.). Tako se ovaj poremećaj sa pravom ubraja u talasemijske sindrome. Njegov efekat na tok bolesti kod ostalih talasemijskih sindroma je veliki i značajan, naročito kad je udružen sa drugim β -talasemijskim mutacijama. U tom slučaju γ -globinski lanci preuzimaju ulogu nedostajućih β -globinskih lanaca i formiraju tetramere sa viškom α -globinskih lanaca. Tako se smanjuje stvaranje inkluzionih tela, a samim tim i hemoliza. Slabo funkcionalni HbF koji se tada formira, ne predstavlja značajan patološki momenat za organizam, ali zato njegovo predupređivanje hemolize ublažava kliničku sliku β -talasemije toliko, da se o njemu već duže razmišlja kao o najozbiljnijem genetskom terapijskom sredstvu kod ovih oboljenja.

Talasemijske hemoglobinske varijante

Hemoglobinske varijante najrazličitije molekularne etiologije mogu da proizvode fenotip sličan talasemiji. Mutacije koje pogađaju β - odnosno α -globinske

gene, mogu se ponašati kao klasični β -talasemijski ili α -talasemijski alel. Već se može pretpostaviti da to znači da, u heterozigotnom obliku, ove mutacije rezultiraju anemijom, mikrocitozom, pojavom inkluzija sličnih Heintzovim telima i, ako se radi o varijantama izazvanim mutacijom u β -globinskom genu, povišenim nivoom HbA₂. U kombinaciji sa drugim talasemijskim sindromima, ove varijante doprinose kliničkoj slici talasemije intermedije ili talasemije major. HPFH ublažava patologiju poreklom od ovih Hb varijanti.

Najrasprostranjenije i najbolje izučene talasemijske Hb varijante su: hemoglobini Lepore tipa, HbE i grupa ekstremno nestabilnih varijanti, Hb Terre Haute, Hb Showa-Yukuskiji, Hb Cagliari, koje pripadaju β -talasemijskim Hb varijantama, i Hb Constant Spring i Hb Quong Sze koji su najčešće varijante koje produkuju α -talasemijski fenotip.

Postoje i nestabilne hemoglobinske varijante koje izazivaju hipohromiju i mikrocitozu, ali se ne formiraju inkluziona tela, već Heintzova tela, koja uzrokuju hemolizu. Ovakve Hb varijante daju blage simptome talasemije minor tipa (Hb Sabine).

Molekularna patofiziologija talasemijskih sindroma – genotip

Talasemijski sindromi su posledice mutacija koje smanjuju produkciju α - ili/ β -globinskih lanaca hemoglobina. Kloniranje, sekvenciranje DNK i funkcionalne analize kloniranih gena postali su oruđe za disekciju talasemijskih sindroma. Analize su otkrile impresivnu heterogenost promena na DNK koje dovode do ovih kliničkih sindroma.

β -TALASEMIJE

β -talasemije su rezultat mutacija koje utiču na svaki korak u regulaciji ekspresije β -globinskih gena: transkripcija gena, obrada primarnog transkripta, transport iRNK iz nukleusa u citoplazmu, stabilnost iRNK, translacija i formiranje Hb iz polipeptidnih subjedinica. Većina tipova β -talasemija u osnovi ima tačkaste (point, eng.) mutacije, i do sada ih je registrovano više od 125 (Kazazian HH Jr & Boehm CD. 1988.). Samo 15 od njih pokriva ogromnu većinu pacijenata, a ostale su karakteristične za nekolicinu pacijenata iz pojedinačnih porodica.

Male delecije unutar β -globinskog gena, kao i velike delecije, koje uklanjaju ceo β -globinski gen ili više gena iz ovog lokusa, su retke. Na slici 5 su prikazana mesta i tipovi mutacija koje uzrokuju β -talasemiju. Lokacija mutacija u različitim funkcionalnim regionima gena određuje težinu kliničke slike, pa su tako mutacije i podeljenje na : promotorske mutacije, mutacije odgovorne za abnormalnu posttranskripcionu modifikaciju, mutacije koje utiču na procesovanje β -globinske iRNK, mutacije koje produkuju nefunkcionalnu iRNK.

Mutacije se označavaju ili samo brojevima, ako se mutacija nalazi u egzonima, i tada broj označava redni broj kodona u kome se mutacija nalazi, ili oznakom za intron (IVS-I ili IVS-II) i brojem koji, u ovom slučaju, označava poziciju mutacije u okviru introna.

Promotorske mutacije

Mutacije u regulatornim promotorskim elementima smanjuju afinitet vezivanja transkripcionih faktora za ta mesta. To dovodi do smanjenja nivoa transkripcije. Do sada je otkriveno ukupno 18 promotorskih mutacija (Kazazian HH Jr & Boehm CD. 1988.). Ove mutacije su koncentrisane u sledećim regionima:

1) TATA bloku, na pozicijama od -28 do -32 uzvodno od *cap* mesta.

Posledica ovih mutacija je neefikasna interakcija transkripcionog faktora TBP sa ovim regulatornim elementom, što ometa inicijaciju transkripcije (Huang SZ et al. 1986.),

2) proksimalnim i distalnim regulatornim CACCC sekvencama, lociranim na pozicijama oko -90 i oko -105 uzvodno od *cap* mesta β -globinskog gena. Pokazano je da se za ove elemente vezuju transkripcioni faktori Sp1 i EKLF (Nuez B et al. 1995.). Smanjenje transkripcije β -globinskog gena izazvanom mutacijama u ovim regulatornim elementima je vrlo blago, jer drugi CACCC blok funkcioniše normalno (Orkin SH et al. 1984b.).

Iako je CAAT blok visoko konzervisan u globinskim promotorima, nisu identifikovane mutacije u ovom elementu kod talasemija. Takođe još nisu otkrivene mutacije u transkripcionim faktorima koje bi davale talasemični fenotip.

Sve promotorske mutacije su relativno blage (β^+) i pacijenti koji su homozigoti za ove mutacije ili dvostruki heterozigoti za promotorsku i bilo koju drugu β -talasemičnu mutaciju, pokazuju fenotip β -talasemije intermedije.

Ukoliko se promotorska mutacija nalaze izvan regulatornih elemenata, odnosno vezivnih mesta za transkripcione faktore (na primer, supstitucija C→T na poziciji -101), njen patološki efekat je neznatan (asimptomski, "silent") (Gonzales Redondo JM et al. 1989.).

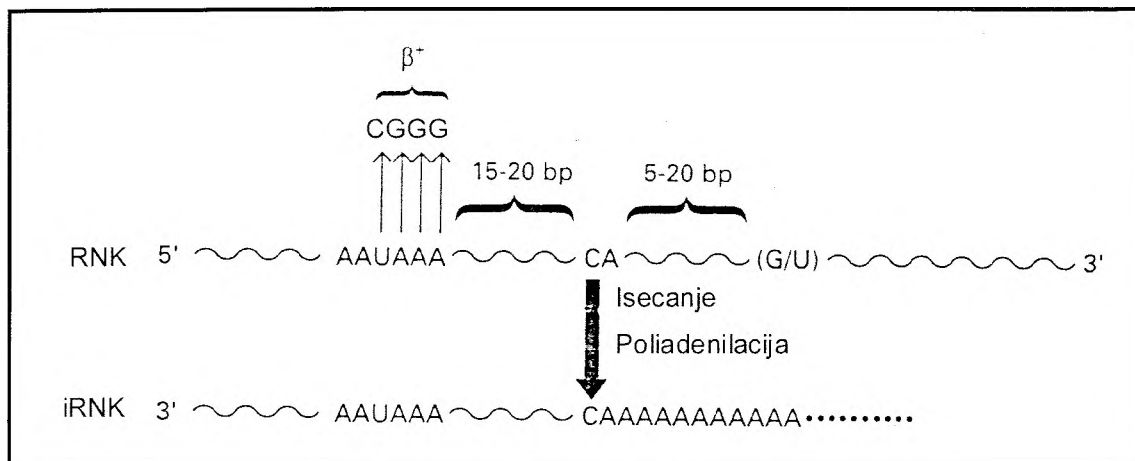
Kao što je već naglašeno, mesto inicijacije transkripcije (*cap* mesto, označeno kao +1) je deo konzervisanog regulatornog elementa (Inr) koji preuzima ulogu inicijatora transkripcije od TATA bloka. Nejasno je da li *cap* mesto ima funkciju Inr u β -globinskim promotorima. Takođe *cap* mesto učestvuje u posttranskripcionoj

modifikaciji nascentnog iRNK lanca (dodavanje "šeširića"). Na poziciji +1 u β -globinskom genu je otkrivena mutacija (A→C). Posledica ove mutacije je jedva detektibilna β -talasemija (asimptomatska, "silent"). Bez obzira koji od mehanizama (defektna transkripcija ili "capping" –posttranskripciona modifikacija sa indirektnim uticajem na translaciju) učestvuje u formiranju patološkog fenotipa, njegov učinak na β -globinsku ekspresiju nije veliki (Wong C et al. 1987.).

Mutacije odgovorne za abnormalnu posttranskripcionu modifikaciju

Samo jedna talasemična mutacija u *cap* mestu, 5' targetu za posttranskripcionu modifikaciju, je do sada otkrivena. Opisana je među promotorskim mutacijama jer nije jasno na koji način utiče na smanjenje nivoa β -globina u ćelijama.

Na drugoj strani, na 3' kraju, gde se uobičajeno dodaje poly(A) repić na iRNK, zabeleženo je nekoliko mutacija (uglavnom tipa baznih zamena, ali i dve manje delecije) koje rezultiraju β -talasemičnim fenotipom (Orkin SH et al. 1985.). Mutacije su koncentrisane u regionu AAUAAA, koji je, pored toga što predstavlja poliadenilacionu signalnu sekvencu, neophodan i za pravilno isecanje iRNK. Ove mutacije značajno, ali ne u potpunosti smanjuju efikasnost poliadenilacije i ekscizije, zbog čega su povezane sa β^+ -talasemijskim fenotipom. Samo 10% iRNK je pravilno obrađen, dok se ostali transkripti produžavaju do sledećeg poliadenilacionog signala, koji se nalazi 0,9 -3 Kb nizvodno (Orkin SH et al. 1985.) (Slika 8). Ovako produženi transkripti su nestabilni jer je pokazano da u eritroidnim ćelijama predstavljaju samo minornu frakciju, što rezultira smanjenom β -globinskom sintezom i fenotipom β -talasemije.



Slika 8. Ekscizija i poliadenilacija RNK se događa 15 – 20 bp nizvodno od poliadenilacionog signala, AAUAAA. Mutaciona analiza u β -globinskom genu zeca je otkrila da je sekvenca locirana nizvodno od mesta za poliadenilaciju, nazvana G/U grupa (cluster, eng.), takođe neophodna za efikasno isecanje i poliadenilaciju RNK. Mutacije na jednom od nekoliko nukleotida unutar AAUAAA sekvence rezultiraju fenotipom β^+ -talasemije (Orkin SH & Nathan DG, 1998.)

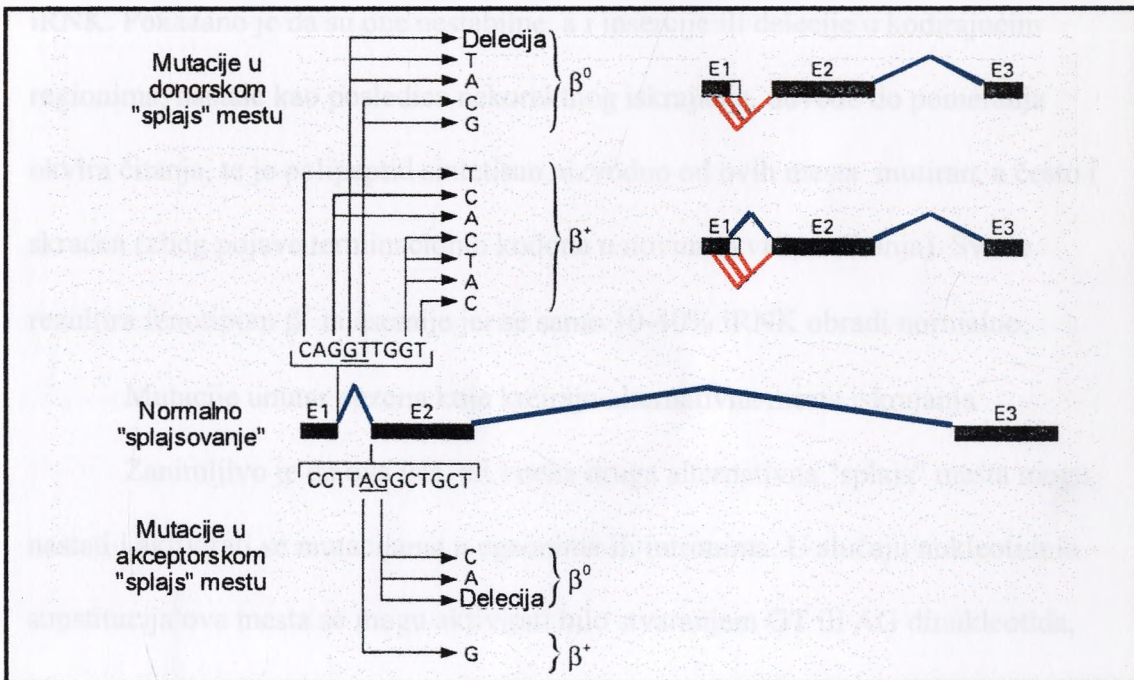
Mutacije koje utiču na procesovanje β -globinske iRNK

Mutacije koje menjaju mesta iskrajanja

Jedan od ključnih procesa u obradi primarnog transkripta iRNK je iskrajanje introna i spajanje egzona (splicing, eng.). Pored uloge u formiranju funkcionalne iRNK, "splajsing" doprinosi stabilnosti iRNK (Brinster RL et al. 1988.) i verovatno učestvuje u transportu RNK iz nukleusa u citoplazmu (Chang DD & Sharp PA. 1990.). Isecanje introna zahteva veliku preciznost koja se ostvaruje zahvaljujući postojanju 5' donorskih (GT) (pozicije IVS I-1, IVS I-2 i IVS II-1, IVS II-2) i 3' akceptorskih (AG) dinukleotida na krajevima introna β - globinskog gena (pozicije IVS I-129, IVS I -130 i IVS II -849, IVS II-850) Mutacije koje menjaju bilo koje od ova dva mesta blokiraju produkciju zrelih, funkcionalnih iRNK tako da se β -globinski polipeptidi uopšte ne mogu sintetisati (β^0 talasemije). Registrovano je ukupno 16 mutacija tipa baznih zamena ili malih delecija koje pogađaju invarijantne

dinukleotide β -globinskih introna (Triesman R et al. 1982.; Gonzales Redondo JM et al. 1989.) .

Neke se mutacije javljaju u konsenzusnim sekvencama koje okružuju donorsko i akceptorsko mesto za "splajsing". One smanjuju efikasnost normalnog "splajsinga" od 70% do 95% (β^+ talasemije). Tako se mutacija na poziciji 6 u 5' donorskoj konsenzusnoj sekvenci prvog introna (IVS I-6) karakteriše relativno visokim nivoom normalno procesovane iRNK i blagom kliničkm slikom (Orkin SH et al. 1982a.). Mutacije na određenim pozicijama su mnogo teže (na primer, IVS I-5 (Atweh GF e al. 1987.), a ima i onih koje toliko narušavaju procesovanje, da se ubrajaju u β^0 -talasemije (dinukleotidna delecija IVS II-4,5 (Faustino P et al. 1992.) (Slika 9).



Slika 9. Primeri abnormalnog iskrajanja iRNK koje je rezultat mutacija u konsenzusnim sekvencama za "splajsing" u prvom intronu. Egzoni su označeni tamnim okvirima. Put normalnog "splajsinga" je označen plavom bojom. Mutacije u krucijalnom GT dinukleotidu donorskog "splajs" mesta rezultuju talasemijom β^0 tipa, dok mutacije preostalih pozicija u konsenzusu proizvode β^+ fenotip. Mutacije u donorskom "splajs" mestu su povezane sa abnormalnim "splajsingom" koje se događa sa kriptičnih donorskih "splajs" mesta lociranih u prvom egzonu. Abnormalni "splajsing" je označen crvenom bojom. Slične manifestacije imaju i mutacije u akceptorskom mestu za "splajsing" (Orkin SH & Nathan DG, 1998.)

Treći tip mutacija u okviru ovih konsenzusnih sekvenci favorizuje procesovanje na "pogrešnim" mestima označenim kao kriптиčna "splajs" mesta. Kriптиčna "splajs" mesta su sekvence u intronu ili egzonu koje su slične konsenzus sekvencama ali pod normalnim uslovima nisu aktivne ili se ne koriste (Kazazian HHJr. 1990.). Tako mutacije u donorskoj konsenzusnoj sekvenci IVS I aktiviraju tri kriптиčna "splajs" mesta (dva u prvom egzonu i treće, u IVS I) (Treisman R et al. 1983.). Zabeležena je i mutacija u istom regionu u IVS II koja aktivira "splajsing" sa pozicije koja je locirana uzvodno od normalnog donorskog "splajs" mesta. Isti fenomen je uočen i u prisustvu specifičnih mutacija u akceptorskim konsenzusnim sekvencama za procesovanje iRNK (Antonarakis SE et al. 1984.). Jasno je da iskrajanje iRNK na ovim mestima dovodi do produkcije nefunkcionalne β -globinske iRNK. Pokazano je da su one nestabilne, a i insercije ili delecije u kodirajućim regionima, nastale kao posledica nekorektnog iskrajanja, dovode do pomeranja okvira čitanja, te je polipeptid sintetisan nizvodno od ovih mesta mutiran, a često i skraćen (zbog pojave terminacionih kodona u novim okvirima čitanja). Sve to rezultira fenotipom β^+ talasemije jer se samo 10-40% iRNK obradi normalno.

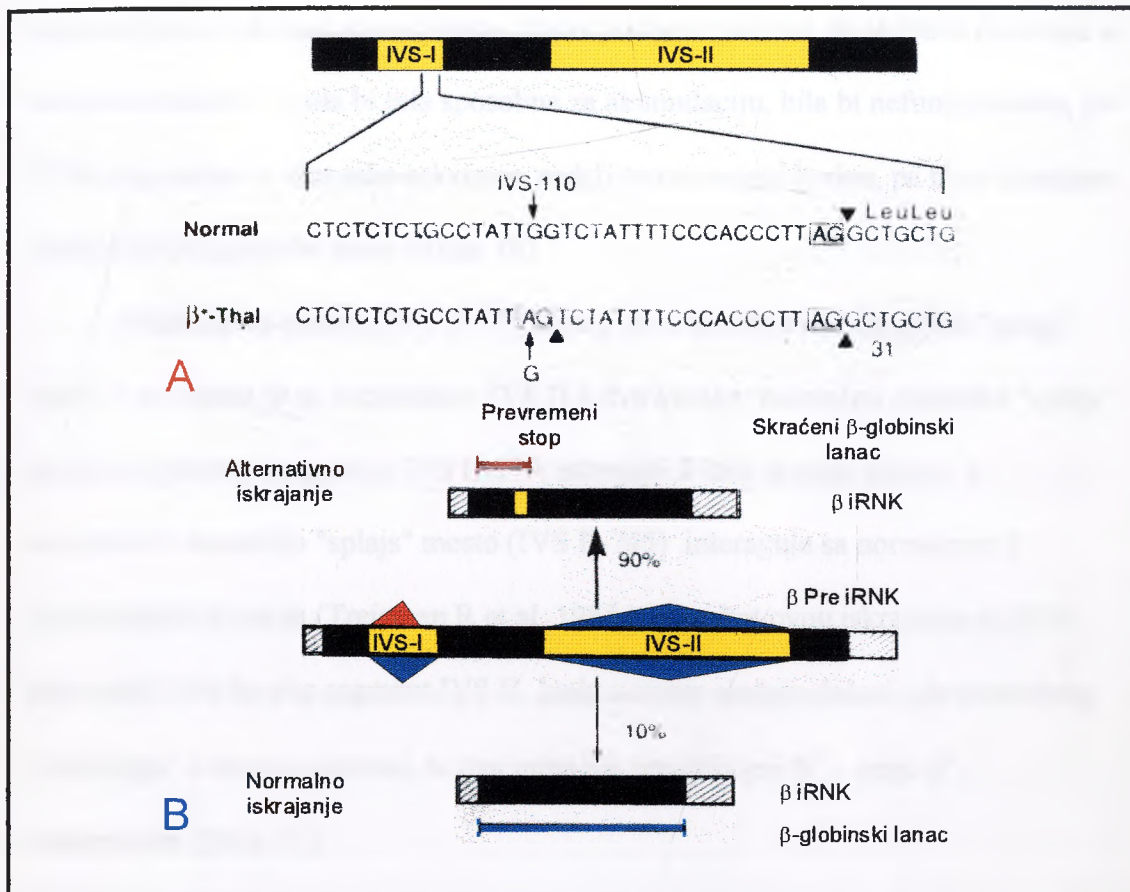
Mutacije unutar egzona koje kreiraju alternativna mesta iskrajanja

Zanimljivo je da ova ista, ali i neka druga alternativna "splajs" mesta mogu nastati i aktivirati se mutacijama u egzonima ili intronima. U slučaju nukleotidnih supstitucija ova mesta se mogu aktivirati bilo stvaranjem GT ili AG dinukleotida, bilo stvaranjem dovoljno jakih konsenzus sekvenci koje će stimulisati "splajsing" baš na tim mestima. Tako kriптиčno "splajs" mesto u prvom egzonu (kodoni 24-27) aktivirano mutacijom u donorskoj konsenzusnoj sekvenci IVS I, može biti aktivirano i pojavom četiri nezavisne mutacije u navedenim kodonima (u prisustvu normalnog, nemutiranog donorskog "splajs" mesta). Ove mutacije povećavaju sposobnost

kriptičnih mesta da kompetiraju sa normalnim "splajs" mestima i izazivaju posledice čiji je patofiziološki efekat identičan onom opisanom kod prethodnog tipa aktiviranja kriptičnih mesta za iskrajanje, kao i fenotip β^+ -talasemije. Mutacija u kodonu 26, pored uloge u alternativnom "splajsingu", dovodi do amino kiselinske zamene koja, u normalno procesovanim transkriptima, rezultira hemoglobinskom varijantom HbE (Orkin SH et al. 1982a.). Ovo je talasemična hemoglobinska varijanta, jer se, zbog aberantnog iskrajanja, polipeptid proizvodi u redukovanim količinama i rezultira β^+ -talasemijom. Postoje još dve talasemične hemoglobinske varijante, Hb Knossos (kodon 27) i Hb Malay (kodon 19), koje produkuju sličan fenotip (Orkin SH et al. 1984a.; Yang KG et al. 1989.).

Mutacije unutar introna koje kreiraju alternativna mesta iskrajanja

Treću kategoriju mutacija koje utiču na korektno iskrajanje iRNK sačinjavaju mutacije u intronima koje generišu nove "splajs" signale. Identifikovane su dve ovakve mutacije u IVS I, i tri u IVS II kod talasemičnih pacijenata (Metherall JE et al. 1986.). Interesantno je da se ova alternativna mesta koriste preferencijalno za "splajsing" u odnosu na normalna "splajs" mesta, pa se čak ponekad iskrajanje događa isključivo na alternativnim mestima (Cheng TC et al. 1984.). U poslednjem slučaju, rezultirajući talasemijski fenotip je tipa β^0 . Razlika između afiniteta enzimatskog kompleksa odgovornog za procesovanje iRNK za alternativno i normalno mesto "splajsinga", određuje stepen patologije fenotipa β -talasemije.



Slika 10. Alternativno iskrajanje prekursorske β -globinske i RNK izazvano mutacijom u IVS I-110 rezultuje β^+ -talasemijom (Bunn HF & Forget BG, 1993.)

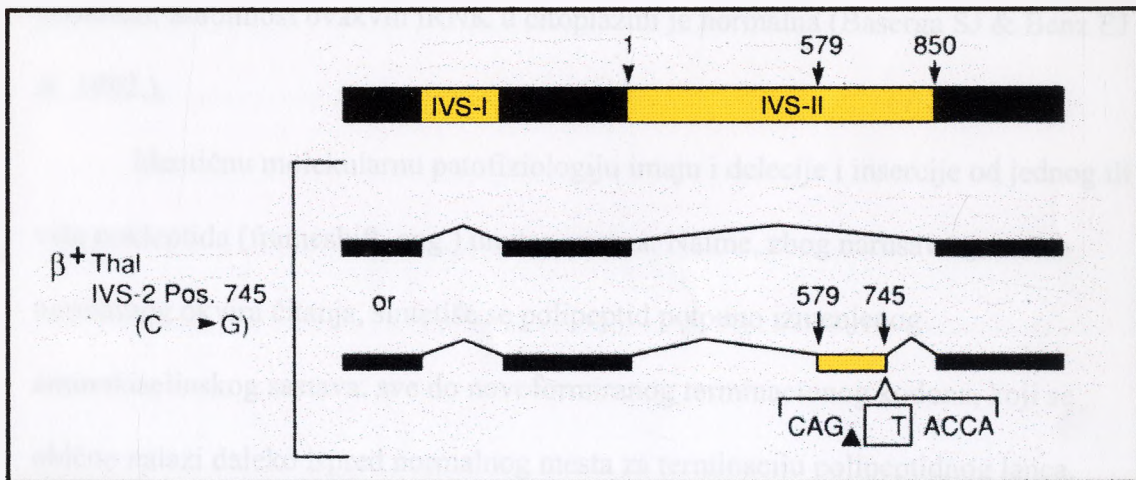
A. Diagram β -globinskog gena (egzoni su predstavljeni crnim, a introni žutim okvirima) koji pokazuje DNK sekvencu na 3' kraju prvog introna i baznu zamenu na poziciji 110, koja kreira AG dinukleotid u potencijalnom akceptorskom "splajs" mestu (označeno strelicama).

B. Shematski prikaz alternativnog "splajsinga" izazvanog mutacijom IVS I-110. Žutom bojom unutar obrađene RNK je označen deo IVS I koji je, zbog abnormalnog "splajsinga" postao deo β -iRNK. Plava boja označava normalni put "splajsinga", a crvena – "alternativni".

Prva bazna supstitucija identifikovana u β -talasemijksom sindromu bila je na poziciji IVS I-110 (Westaway D & Williamson R. 1981.). Ova mutacija, odgovorna za najčešću formu β -talasemije u Mediteranu, aktivira alternativno akceptorsko "splajs" mesto blizu 3' kraja prvog introna (Spritz RA et al. 1981.). Osamdeset do 90% transkripata kod ovih pacijenata je nastalo iskrajanjem na alternativnom, a 10% do 20% na normalnom "splajs" mestu, te oni imaju fenotip β^+ -talasemije (Busslinger M et al. 1981.). Mutirana iRNK je nestabilna ili se neefikasno

transportuje iz nukleusa u citoplazmu, što objašnjava podatak da se jedva detektuje u ćelijama obolelih. I kada bi bila sposobna za akumulaciju, bila bi nefunkcionalna, jer 19 bp dug segment intronske sekvence sadrži terminacioni kodon, pa bi se sintetisao skraćeni β -polipeptidni lanac (Slika 10).

Mutacija na poziciji IVS II-745 kreira novo alternativno donorsko "splajs" mesto, i povezana je sa iskrajanjem IVS II u dva koraka: normalno donorsko "splajs" mesto i kriptično, na poziciji IVS II-579, iskrajaju 5' kraj drugog introna, a novonastalo donorsko "splajs" mesto (IVS II-745) interaguje sa normalnim 3' akceptorskim mestom (Treisman R et al. 1983.). Rezultat ovog iskrajanja je iRNK koja sadrži 166 bp dug segment IVS II. Ipak, u ovom slučaju dolazi i do normalnog "splajsinga" u drugom intronu, te ova mutacija rezultira pre β^+ – nego β^0 – talasemijom (Slika 11).



Slika 11. Put "splajsinga" povezan sa β -talasemijskom mutacijom IVS II-745 (Bunn HF & Forget BG, 1986.).

Egzoni su označeni tamnim, a introni žutim okvirima. Prisutna su dva alternativna "splajsing" mesta: prvo, u kome učestvuju normalno donorsko mesto sa početka drugog egzona i kriptično akceptorsko mesto IVS II-579, i drugo, u kome su angažovani mutacija β IVS II-745, u ulozi novog alternativnog donorskog mesta i normalno akceptorsko mesto na kraju IVS II. Deo IVS II, koji se zadržao u procesovanoj iRNK je označen žutim okvirom.

Mutacije koje produkuju nefunkcionalnu iRNK

Preвременa terminacija iRNK

Zamena samo jedne baze koja menja kodon u terminacioni kodon, "nonsens" mutacije (nonsense, eng.), uzrok su prevremenog završetka translacije iRNK transkribovanih sa takvih gena. Tako nastali, skraćeni globinski polipeptidi se obično ne detektuju u ćeliji, i fenotip koji daju "nonsens" mutacije je β^0 -talasemija.

Jedna od prvih okarakterisanih "nonsens" mutacija je mutacija u kodonu 39 (CAG→TAG) (Trecartin RF et al. 1981.). Ova mutacija je izuzetno frekventna u Mediteranu. Kao i kod drugih "nonsens" mutacija, i u ovom slučaju je mutirana β -globinska iRNK jedva detektibilna u eritroidnim ćelijama (zastupljena je sa 5%-10%) (Benz EJ Jr et al. 1978.). Transkripcija teče normalno, ali je stabilnost kraćih iRNK u nukleusu značajno smanjena, a i njihov transport kroz nukleusnu membranu je otežan. Stabilnost ovakvih iRNK u citoplazmi je normalna (Baserga SJ & Benz EJ Jr. 1992.).

Identičnu molekularnu patofiziologiju imaju i delecije i insercije od jednog ili više nukleotida (frameshift, eng.) unutar egzona. Naime, zbog narušavanja normalnog okvira čitanja, sintetiše se polipeptid potpuno izmenjenog aminokiselinskog sastava, sve do novoformiranog terminacionog kodona, koji se obično nalazi daleko ispred normalnog mesta za terminaciju polipeptidnog lanca. Nedovršeni mutirani β -globinski polipeptidi su nestabilni i brzo se degraduju. Mutacija $\beta^0 44$ pripada tipu "frameshift" mutacija (-C, delecija jednog nukleotida) (Kinniburgh AJ et al. 1982.). Izmereno je da je poluživot β -globinske i RNK kod nosilaca ove mutacije izuzetno kratak (30 minuta) (Maquat LE et al. 1981.). Uzrok ove ekstremne nestabilnosti iRNK nije jasan, ali je potvrđeno da je eritroidno-

specifičan, jer je β^0 44 iRNK u HeLa ćelijama stabilna (Maquat LE & Kinniburgh AJ. 1985.).

Mutacije u inicijacionom kodonu

Translacija iRNK počinje inicijacionim (AUG) kodonom koji je lociran unutar Kozakove konsenzusne sekvence. Registrovane su četiri mutacije u inicijacionom kodonu (Forget BG & Pearson HA. 1995.). Sve su uzrok β^0 – talasemije. U β -globinskom genu postoje još dva uzvodna ATG kodona, od kojih samo jedan unutar Kozakove konsenzusne sekvence (kodon 55). Čak i ako bi se upotrebio ovaj kodon za inicijaciju, dobijao bi se nefunkcionalan i nestabilan β -globinski lanac.

Mutacije u terminacionom kodonu

UAA je normalni terminacioni kodon za translaciju β -globinske iRNK. 3' netranslirajući region je dug 132 nukleotida. Mutacije u ovom kodonu mogu stvoriti novi terminacioni kodon ili omogućiti inkorporaciju aminokiseline na toj poziciji, a zatim translaciju kroz 3' netranslirajući region, do sledećeg stop kodona, što rezultira produženjem β -globinskog polipeptida. Ovako nastaju Hb varijante koje nemaju uvek talasemijski efekat. Postoji ipak mutacija (inercija dva nukleotida u kodonu 147) koja produžava β -globinski lanac do dužine od 157 aminokiselina (Hb Tak), i koja daje kliničku sliku β^+ -talasemije (Lehman H et al. 1975.). Mehanizam koji uzrokuje talasemiju u prisustvu β^{Tak} mutacije nije razjašnjen, ali se pretpostavlja da je u pitanju nestabilnost iRNK.

Delecije u β -globinskom genu koje rezultiraju β –talasemijskim fenotipom

Iako je većina slučajeva β -talasemija uzrokovana tačkastim mutacijama, zabeleženo je nekoliko slučajeva kod kojih su parcijalne ili totalne delecije β -

globinskog gena odgovorne za fenotip β^+ -talasemije (Craig JE et al. 1992.). Ove delecije zahvataju samo β -globinski gen i njegove okolne sekvence, a ne neki od susednih gena iz β -globinskog lokusa. Veličina β -talasemijskih delecija varira od 290 bp do 12,6 Kb, a registrovane su i manje intragenske delecije (od 17 do 44 bp). Već je naglašeno da je zajednička odlika ovih mutacija neobično visok nivo HbA₂ u cirkulaciji.

β -globinski genski lokus i talasemije

Delecije u β -globinskom genskom lokusu često dovode do talasemije. Većina ih je udružena sa izuzetno visokim nivoom HbF, po čemu su različite od uobičajenih varijeteta β -talasemija nastalih kao posledica mutacija u samom β -globinskom genu. Ovi sindromi se dele u dve kategorije (kompleksne β -talasemije, koje obuhvataju $\delta\beta$ -talasemije $\gamma\delta\beta$ -talasemije, i HPFH). Najznačajnija razlika među njima je što heterozigoti za kompleksne forme β -talasemije imaju mikrocitne, hipohromne ćelije crvene loze, dok su kod heterozigotnih HPFH vrednosti za sve hematološke parametre normalne ili skoro normalne. Jedina abnormalnost koju heterozigoti za HPFH ispoljavaju je nivo HbF (od 15% -30%). Kod kompleksnih β -talasemija nivo HbF retko dostiže vrednost od 15%. Interesantno je da je distribucija ovog ekstremnog porasta sinteze γ -globinskog polipeptida kod HPFH uniformna, pancelularna. Za razliku od toga, kod kompleksnih β -talasemija, povećanje nivoa HbF je ograničen samo na određen tip ćelija, odnosno, dolazi do uvećanja broja F ćelija.

1. Kompleksne β -talasemije

Delecione mutacije β -globinskog genskog lokusa predstavljaju *in vivo* eksperimente koje priroda sama vrši, a, za nauku, eksperimentalne modele od

neprocenjive važnosti. Klinička slika je povezana sa delecijom nekih od mnogobrojnih regulatornih elemenata lociranih duž čitavog β -globinskog lokusa. Preko 30 ovakvih delecionih mutacija je opisano (Henthorn PS et al. 1990.). One mogu inaktivirati različite gene iz lokusa, pa se po tome i dele na: $A\gamma^0$, δ^0 , $(\delta\beta)^0$, $(A\gamma\delta\beta)^0$, $(\gamma\delta\beta)^0$. Neke od njih su ogromne (više od 100 Kb kod nekih $\gamma\delta\beta$ -talasemija) (Fearon ER et al. 1983.). Sindrom $\gamma\delta\beta$ -talasemija može biti posledica dve potpuno različite kategorije velikih delecija: ekstremno velike delecije koje uklanjaju ceo β -globinski lokus, odnosno sve strukturne gene (Orkin SH et al. 1981.), i delecije kod kojih su strukturni geni intaktni, a uklonjeni su regulatorni elementi iz LCR-a (Driscoll MC et al. 1989.). U drugom slučaju, intaktni geni na hromozomu se ne ekspimiraju jer su smešteni u neaktivnom hromatinu, koji je metilovan i rezistentan na dejstvo DNase I. Studije ovih delecija obezbedile su najubedljivije dokaze o neophodnosti LCR-a za normalnu transkripciju gena iz β -globinskog lokusa.

2. HPFH

Individue heterozigotne ili homozigotne za mutacije koje povećavaju produkciju HbF kod adulta su potpuno asimptomatske. One se otkrivaju slučajno, u rutinskim skrining programima, ili pri analizi porodica čiji su članovi nosioci mutacija u drugim globinskim genima. Naime, HPFH mutacije značajno ublažavaju simptome kod srpaste anemije i β -talasemija, jer sinteza γ -globina u višku kompenzuje manjak β -globinskog polipeptida. Osobe homozigotne za HPFH, kod kojih je HbF zastupljen sa 100% (odsustvuje HbA), imaju normalnu koncentraciju hemoglobina (ili čak i malo uvećanu zbog povećane eritropoeze), jedva primetnu mikrocitozu i hipohromiju, i nemaju nikakve patološke simptome, iako HbF ima povećan afinitet za kiseonik (Friedman S et al. 1976.). Ove osobe su ubedljivi dokaz

da bi sprečavanje ili reverzija hemoglobinske γ/β zamene predstavljalo efikasnu terapiju kod β -talasemija i srpaste anemije.

Dva glavna tipa HPFH je opisano: pancelularni tip HPFH se karakteriše veoma visokom nivoom sinteze fetalnog hemoglobina i njegovom uniformnom distribucijom u svim ćelijama crvene loze. Heterocelularni tip HPFH je rezultat genetski determinisanog povećanja broja F ćelija.

Pancelularni tip HPFH se može podeliti u dve klase: prvu, koja nastaje kao posledica delecija, i drugu, u čijoj osnovi leže tačkaste mutacije. Delecione forme su posledica velikih delecija unutar β -globinskog lokusa koje na 5' kraju otpočinju između $A\gamma$ - i δ -globinskog gena i obuhvataju: δ - i β - globinske gene, ili deo intergenskog regiona između γ - i δ -globinskih gena, ili izrazito veliki region DNK, tako da se protežu nizvodno od 3' kraja β -globinskog lokusa (Tuan D et al. 1980.). Objašnjenje koje se može ponuditi za povećanu ekspresiju i pancelularnu distribuciju HbF kod ovih sindroma, je činjenica da ovakvi genski rearanžmani dovode udaljene enhansere (nizvodno od deletiranih gena – 3' enhenseri), u blizinu γ -globinskih gena, i do interakcije pozitivnih regulatora γ -globinskih gena sa dodatnim enhenserom. *In vitro* eksperimenti su potvrdili ovu hipotezu (Feingold EA & Forget BG. 1989.).

Nedelecione forme HPFH su najčešće rezultat zamene jedne baze u promotorima $G\gamma$ ili $A\gamma$ - globinskih gena (Gelinis R et al. 1986.; Gilman JG & Huisman THJ. 1985.). Za razliku od delecionih HPFH formi, u kojima su oba γ -globinska gena preeksprimirana, kod ovih HPFH sindroma povećana je sinteza samo onog γ -globinskog gena u čijem se promotoru nalazi mutacija. Postoje tri promotorska regiona $G\gamma$ i $A\gamma$ -gena u kojima se javljaju mutacije sa posledicom povećane transkripcije γ -globina:

- 1) region na poziciji -200 bp od *cap* mesta (mutacije na poziciji -202 u G γ -globinskom promotoru i mutacije na pozicijama -202, -198 i -195 u A γ -globinskom promotoru),
- 2) region na poziciji -175 uzvodno od *cap* mesta može biti mutiran i kod G γ - i kod A γ -HPFH sindroma,
- 3) region na poziciji -117 uzvodno od *cap* mesta (mutacije -117, -114 i druge).

Model koji objedinjuje ove različite mutacije pretpostavlja da ove bazne zamene utiču na promene u obrascu vezivanja transkripcionih faktora za promotore γ -globinskih gena, što opet sprečava normalnu postnatalnu supresiju ekspresije γ -globinskih gena (Ottolenghi S et al. 1989.). Mutacije mogu sprečavati vezivanje negativnih regulatornih faktora ili omogućavati vezivanje pozitivnih proteinskih regulatora transkripcije.

Sva tri istaknuta regiona sadrže regulatorne elemente koji vezuju mnoštvo transkripcionih faktora. Prvi region (-202) sadrži vezivno mesto za opšti (ubiquitous, eng.) transkripcioni faktor Sp1. Za neke od ovih mutacija je jasno pokazano da povećavaju afinitet za vezivanje ovog transkripcionog faktora (Sykes K & Kaufman R 1989.), dok za druge važi obrnuto (Fischer KD & Novock J. 1990.). Region u kome je registrovana mutacija -175, sadrži vezivna mesta za opšti transkripcioni faktor, OCT 1, i eritroidno-specifični GATA-1. Različiti *in vitro* eseji nisu rešili sve dileme, ali, izgleda da se za ovako mutirani regulatorni element OCT-1 vezuje smanjenim afinitetom, a GATA-1 povećanim (Mantovani R et al. 1988.). Region na poziciji -117 je distalni CCAAT blok, koji vezuje opšte CP1 i CDP transkripcione faktore i eritroidno-specifične: GATA-1 i NF-E3. Mutacije u ovom regionu dovodi do slabije interakcije CCAAT bloka i eritroidno-specifičnih transkripcionih faktora,

dok se sa opšti faktori ponašaju suprotno ovome (Superti-Furga G. 1988.). Kao što se vidi, povećana transkripcija γ -globinskih gena kod promotorskih mutacija još uvek nije u potpunosti objašnjena, ali su svi relevantni faktori ovog procesa poznati.

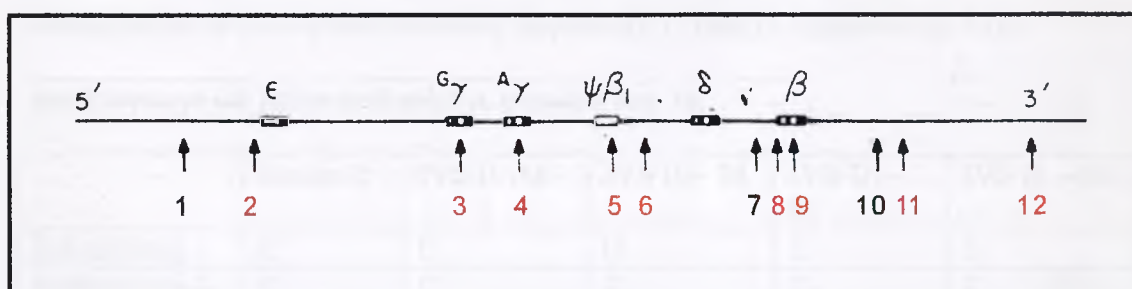
Heterocelularni tip HPFH često je posledica mutacija van β -globinskog lokusa, a za neke je pokazano da su na X hromozomu (Forget BG. 2000.). Pacijenti koji se karakterišu ovim sindromom sadrže ekstremno veliki broj F ćelija u adultnom periodu života. Nivo HbF je obično znatno niži nego kod pancelularnog tipa HPFH. Ovde pripadaju i mutacije za koje se misli da su odgovorne za povišeni nivo sinteze HbF, ali se pojava ispoljava samo u prisustvu faktora koji izazivaju eritroidni stres (kao što su srpasta anemija (HbS/HbS), HbS/ β -talasemija, homozigotan β -talasemija). Takva je i mutacije -158 (C \rightarrow T) u $G\gamma$ -globinskom genu (Gilman JG & Huisman THJ. 1985.). Heterozigoti za ovu mutaciju nemaju povišeni nivo HbF, ali u prisustvu drugih mutacija u globinskom genima koje daju talasemijski fenotip, dolazi do izrazito povišenog nivoa sinteze HbF, i to pretežno $G\gamma$ tipa. Uloga -158 mutacije u ovom tipu HPFH nije razjašnjena.

Polimorfizmi u β -globinskom genskom lokusu

Sekvence u kodirajućim regionima β -globinskih gena su vrlo konzervisane, i među pojedincima se ovde gotovo nikada ne otkriva varijabilnost. Varijabilnost u egzonima rezultirala bi patološom formom globinskog polipeptida. Za razliku od egzona, intergenska i intronska DNK mogu da variraju značajno, od osobe do osobe, (jedan na 200-400 nukleotida ekstragenske DNK se razlikuje kod bilo koje dve osobe). Ova varijabilnost, najčešće asimptomatska (silent,eng.) se koristi u genetičkim studijama, kao vrsta genetičkog markera karakterističnog za pojedinca. Detektuje se najčešće digestijom totalne celularne DNK restrikcijom enzimima. Pri tome nastaju

fragmenti DNK različite dužine kod različitih osoba (restriction fragment length polymorphisms- RFLP, eng.). U β -globinskom lokusu je otkriven veliki broj polimorfizama (Orkin SH & Kazazian HH Jr. 1984.). Polimorfna mesta su otkrivena u intergenskim i intronskim regionima β - globinskog lokusa, a jedno polimorfno mesto je čak prisutno u drugom kodonu β -globinskog gena, ali se pri tom ne menja aminokiselina na toj poziciji (direktna posledica izrođenosti koda). Većina ovih polimorfizama je karakteristična za rasne grupe.

Polimorfna mesta se mogu kombinovati nasumično. Međutim, Orkin i saradnici su uočili preferencijalne asocijacije pojedinih polimorfizama (Antonarakis SE et al. 1985.). Takve kombinacije polimorfnih restrikcionih mesta se nazivaju haplotipovi. Analiza haplotipova u β -globinskom lokusu je pokazala da se nekoliko kombinacija polimorfnih mesta javlja sa mnogo većom verovatnoćom nego što se očekuje (Antonarakis et al. 1982a.). Orkin je okarakterisao 12 takvih haplotipova (Slika 12). Devet od njih je karakteristično za mediteransku populaciju.



Slika 12. Lokacija 12 polimorfnih restrikcionih mesta u β -globinskom genskom lokusu, označenih na fizičkoj mapi. Mesta su numerisana i označavaju sledeća restrikciona mesta: 1= Taq I; 2 = Hinc II; 3,4 = Hind III; 5 = Hinc II; 6 = Hinc II; 7 = Hinf I; 8 = HgiA; 9 = Ava II; 10 = Hpa I; 11 = Bam HI; 12 = Rsa I. Devet od ovih mesta, označenih crvenom bojom, su zajednički za sve rase, i među njima nema polimorfizma koji je zastupljen sa manje od 5%. Preostala 3 haplotipa (1,7 i 10) su "privatnog" tipa, i otkriveni su samo u crnačkoj populaciji, (Orkin SH et al., 1984c.)

Interesantno je da su polimorfizmi u β -globinskom lokusu analizirani u kontekstu njihove povezanosti (linkage analysis,eng.) sa mutantnim β -globinskim

genima, i da su čak i prve prenatalne dijagnoze ovako postavljene (Kazazian HH Jr et al. 1980.). Danas je haplotipska analiza u potpunosti zamenjena modernim metodama analize DNK.

Ipak, i danas je zanimljivo pratiti polimorfizam u samom β -globinskom genu. Naime, poznato je da i u samom β -globinskom genu postoje polimorfna mesta. Ona su limitirana na određene pozicije nukleotida. Analizom velikog broja β -gena u mediteranskoj populaciji, ustanovljeno je da postoje 3 različita "normalna" β -globinska gena, nazvana subhaplotipovi (frameworks, eng.) (Orkin SH et al. 1982b.). Oni su prikazani u Tabeli 3. Najčešće sekvenca β -globinskog gena (više od 50%) korespondira sa sekvencom normalnog gena koju su objavili Lawn i saradnici (Lawn RM et al. 1980.), i nazvana je subhaplotip 1. Subhaplotip 2, zastupljen sa oko 30%, ima samo jednu baznu zamenu u odnosu na subhaplotip 1 (G→T, u drugom intronu na poziciji 74). Subhaplotip 3, koji pored polimorfizma iz subhaplotipa 2, sadrži još četiri izmene (kodon 2, i u drugom intronu pozicije 16, 81 i 666), zastupljen je sa 20% u mediteranskoj populaciji. U Indiji i Jugoistočnoj Aziji detektovan je još jedan subhaplotip, označen kao 3a.

	Kodon 2	IVS II -16	IVS II – 74	IVS II – 81	IVS II – 666
Subhaplotip 1	C	C	G	C	T
Subhaplotip 2	C	C	T	C	T
Subhaplotip 3	T	G	T	T	C
Subhaplotip 3a	T	G	T	C	C

Tabela 3. Nukleotidni sastav koji definiše subhaplotipove (frameworks, eng.) u β -globinskom genu

Subhaplotipove je neophodno poznavati, kako nas njihovo prisustvo ne bi dovelo do pogrešne pretpostavke da smo dijagnostikovali mutacije koje su uzrok

patologije. Posebno je zanimljivo preko ovih polimorfizama pratiti poreklo i rasprostiranje β -talasemijskih mutacija.

α -TALASEMIJE

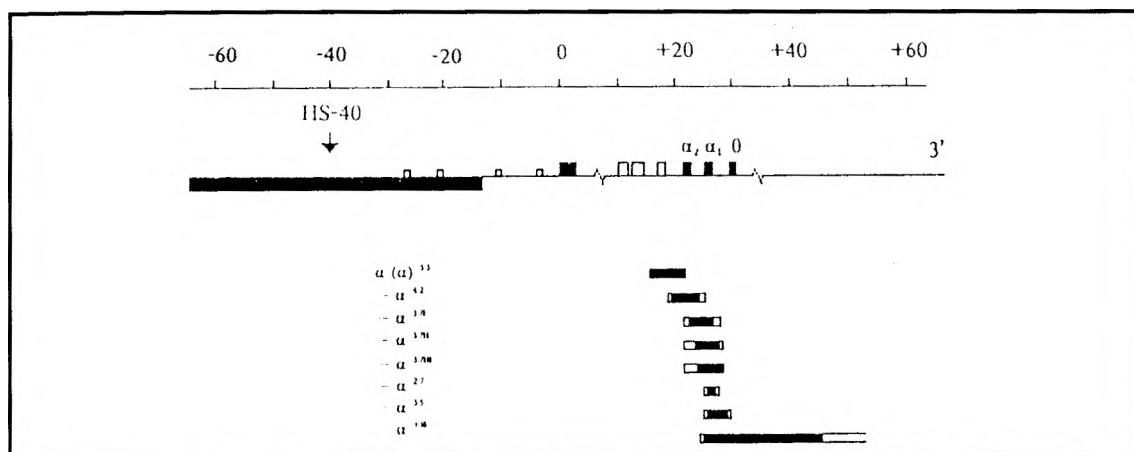
Za razliku od β -talasemija, kod kojih je većina slučajeva izazvana tačkastim mutacijama, u osnovi većine α -talasemija su delecije koje uklanjaju jedan ili oba α -globinska gena sa hromozoma 16. Ipak, okarakterisani su i brojni nedelecioni slučajevi α -talasemija, koje su uzrokovane tačkastim mutacijama i čiji su molekularni patološki mehanizmi slični onima kod β -talasemijskih mutacija.

Delecija pojedinačnog α -globinskog gena (α -talasemije-2)

Delecija jednog α -globinskog gena je uzrok α -talasemije-2, odnosno α^+ -talasemije. Označava se kao $-\alpha$. Dosad je okarakterisano šest tipova delecija koje zahvataju samo jedan od adultnih α -globinskih gena na hromozomu ($\alpha 2$ ili $\alpha 1$), a drugi gen je intaktan i funkcionalan (slika 13). To su:

- 1) Delecija od 3,7 Kb, daleko najčešći uzrok α -talasemija i u Mediteranu, i u Aziji i u crnačkoj populaciji. Označava se kao $-\alpha^{3,7}$ -delecija (Embury SH et al. 1980.).
- 2) Delecija od 4,2 Kb, česta u jugoistočnoj Aziji. Označava se kao $-\alpha^{4,2}$ -delecija (Embury SH et al. 1980.).
- 3) Retka delecija ($-\alpha^{3,5}$) kod koje je 3' α -globinski gen, odnosno $\alpha 1$ -globinski gen potpuno deletiran (Kulozik AE et al. 1988.).
- 4) Retka delecija ($-\alpha^{2,7}$) koja takođe uklanja čitav $\alpha 1$ -gen (Zhao JB et al. 1991.).
- 5) Otkrivena je i delecija koja zahvata samo deo $\alpha 2$ -globinskog gena i koja se označava (α) $\alpha^{5,3}$ -delecija (Lacerra G et al. 1991.).

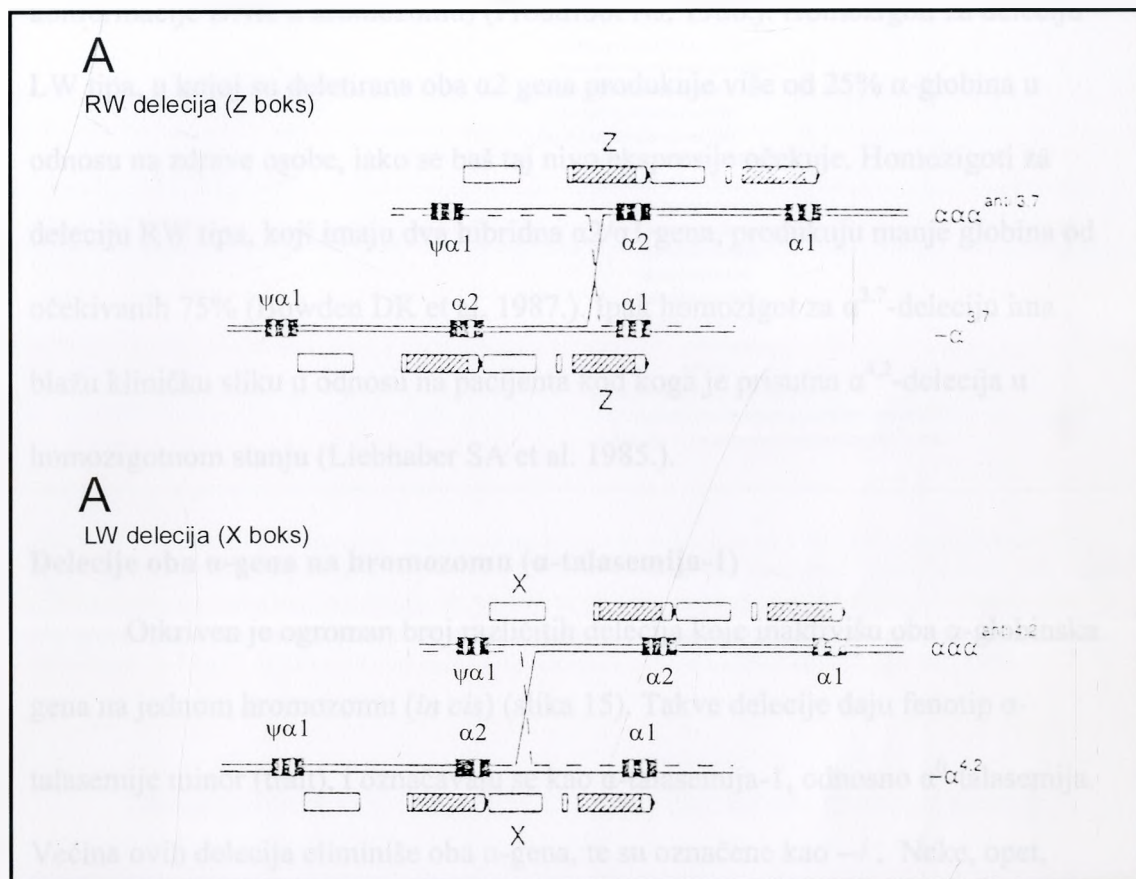
6) Velika delecija (više od 18 Kb) zahvata gene $\alpha 1$ i $\theta 1$ identifikovana je u češkoj porodici (Indrak K et al. 1993.).



Slika 13. Fizička mapa humanog α -globinskog lokusa je prikazana na vrhu. Geni su prukazani kao crni, a pseudogeni kao prazni okviri. Pozicija HS -40 je označena strelicom. Delecije koje su u osnovi α' -talasemije su označene kao tamni okviri koji se protežu duž delecije. Ako krajevi delecije nisu precizirani, na krajevima se nalaze prazni okviri. Znak "-" označava da je ceo gen deletiran, a "(α)", da je samo deo gena deletiran (Higgs DR, 1993.).

Mehanizam nastanka delecija koje uklanjaju samo jedan α -globinski gen odnosi se na homolognu rekombinaciju za koju u regionu u kome se nalaze $\alpha 2$ i $\alpha 1$ geni postoji velika predispozicija. Naime, duplicirani α -globinski geni su ugnježdjeni u dve visoko homologne jedinice dužine 4 Kb (Zimmer EA et al. 1980.). Homologni regioni su uočeni kao 3 bloka, X, Y, Z, i razdvojeni su nehomolognim regionima (Slika 14) (Hess JF et al. 1984.). Najčešći rearanžman koji zahvata α -globinske gene i rezultira α -talasemijom je delecija locirana između $\alpha 2$ i $\alpha 1$ gena i duga je 3,7 Kb. Ovaj nejednaki, ali homologni krosing over događa se između homolognih Z segmenata i naziva se "desnom delecijom" (RW – rightward, eng.). Zavisno od mesta gde se dogodio krosing over, razlikuju se tri tipa RW rekombinacija, koje se mogu identifikovati digestijom restrikcionim enzimom Apa I, ali ove tri forme ne daju različite fenotipe (Bowden DK et al. 1987.).

"Leva delecija" (LW-leftward, eng.) nastaje usled nejednake homologne rekombinacije između X segmenata, kojom se deletira 4,2 Kb, uključujući kompletan $\alpha 2$ -gen (Embury SH et al. 1980.).



Slika 14. Mehanizam nastanka delecija koje izazivaju α^+ -talasemiju. X, Y i Z predstavljaju homologne regione u kojima se događa rekombinacija.

"Desna delecija" (RW) nastaje kad se dogodi rekombinacija između nejednako postavljenih (misaligned, eng.) Z regiona. Tako nastaju $-\alpha^{3,7}$ i $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7}$ hromozomi.

"Leva delecija" (LW) nastaje kad se dogodi rekombinacija između nejednako postavljenih X regiona. Tako nastaju $-\alpha^{4,2}$ i $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 4,2}$ hromozomi (Higgs DR, 1993.)

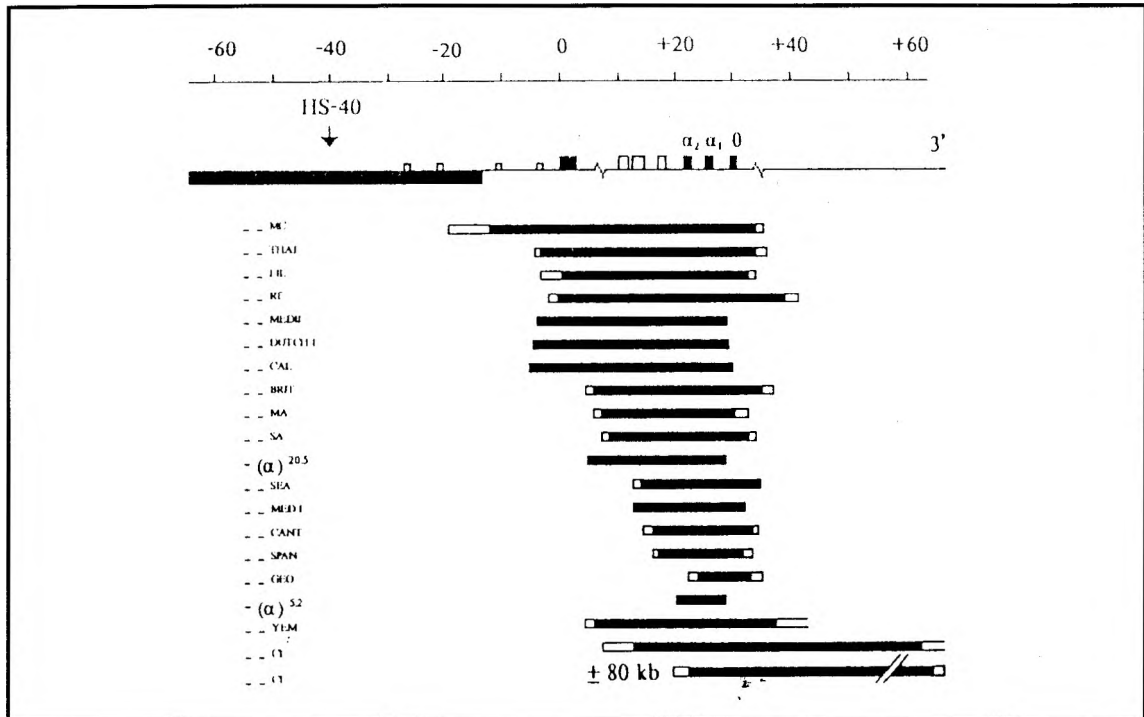
U recipročnim događajima nastaju α -triplikacije ($\alpha\alpha\alpha^{3,7}$ i $\alpha\alpha\alpha^{4,2}$). Ove triplikacije su izuzetno retke (Trent RJ et al. 1981.).

Poznato je da se $\alpha 2$ i $\alpha 1$ geni različiti eksprimiraju: 5' gen ($\alpha 2$) se eksprimira u oko tri puta većem nivou nego 3' gen ($\alpha 1$). Očekuje se, zbog toga, da fenotip kod α -talasemija uzrokovanih inaktivacijom $\alpha 2$ -gena ima teže simptome. To je po pravilu

tako kada su nedelecione forme u osnovi α -talasemije. Kod delecionihi formi je situacija mnogo kompleksnija jer se uključuju različiti, zasad nedovoljno definisani, kompenzatorni mehanizmi (aktiviranje novih regulatornih elemenata, promena konformacije DNK u hromozomu) (Proudfoot NJ. 1986.). Homozigoti za deleciju LW tipa, u kojoj su deletirana oba $\alpha 2$ gena produkuje više od 25% α -globina u odnosu na zdrave osobe, iako se baš taj nivo ekspresije očekuje. Homozigoti za deleciju RW tipa, koji imaju dva hibridna $\alpha 2/\alpha 1$ gena, produkuju manje globina od očekivanih 75% (Bowden DK et al. 1987.). Ipak homozigot za $\alpha^{3,7}$ -deleciju ima blažu kliničku sliku u odnosu na pacijenta kod koga je prisutna $\alpha^{4,2}$ -delecija u homozigotnom stanju (Liebhaber SA et al. 1985.).

Delecije oba α -gena na hromozomu (α -talasemija-1)

Otkriven je ogroman broj različitih delecija koje inaktiviraju oba α -globinska gena na jednom hromozomu (*in cis*) (slika 15). Takve delecije daju fenotip α -talasemije minor (trait), i označavaju se kao α -talasemija-1, odnosno α^0 -talasemija. Većina ovih delecija eliminiše oba α -gena, te su označene kao --/. Neke, opet, sadrže deo jednog od α -globinskog gena, kao na primer, delecija $-(\alpha)^{20,5}$ (Nicholls RD et al. 1985.). U osnovi mehanizma nastanka ovih delecija je nehomologna rekombinacija. Precizno definisana mesta prekida za 16 delecija omogućila je postavljanje hipoteze o mehanizmu njihovog nastanka (Harteveld CL. 1998.). Među njima, izgleda da ih je pet rezultat prekida i ponovnog spoja bez bilo kakve homologije u roditeljskim lancima, pet je nastalo rekombinacijom između vrlo homolognih Alu ponovaka, a šest je posledica skraćivanja samog kraja kraćeg kraka hromozoma 16 (16p13,3), što su događaji vezani za funkcionisanje telomere (270).



Slika 15. Fizička mapa humanog α -globinskog lokusa je prikazana na vrhu. Geni su prikazani kao crni, a pseudogeni kao prazni okviri. Pozicija HS-40 je označena strelicom. Delecije koje su u osnovi α^0 -talasemije su označene kao tamni okviri koji se protežu duž delecije. Ako krajevi delecije nisu precizirani, na krajevima se nalaze prazni okviri. Znak "--" označava da su oba gena na hromozomu deletirana, a "-(α)", da je samo deo jednog od adultnih α -gena nedeletiran (Higgs DR, 1993.)

Homozigotnost za α -talasemije -2 ($-\alpha/-\alpha$) daje takođe fenotip α -talasemije minor tipa. Tako se, u crnačkoj populaciji kao uzrok α -talasemije minor tipa, skoro isključivo javlja homozigotnost za α -talasemiju-2, *in trans* kombinacija neaktivnih, deletiranih gena ($-\alpha/-\alpha$ genotip) (Dozy AM et al. 1979.). U Aziji je uzrok α -talasemije minor tipa najčešće heterozigotna α -talasemija-1, *in cis* kombinacija neaktivnih gena ($--/\alpha\alpha$). Zbog toga je u azijskog populaciji pojava HbH bolesti ($--/-\alpha$) i fetalnog hidropsa ($--/--$) vrlo česta, za razliku od crnačke populacije, kod koje se ovi teški oblici α -talasemija ekstremno retko sreću (prevalentni homozigotni genotip je $-\alpha/-\alpha$).

Još jedan tip delecija uzrokuje fenotip povezan sa α^0 -talasemijom. To su delecije u regulatornom regionu HS-40, lociranom 40 Kb uzvodno od α -globinskog

lokusa. Funkcija ovog regulatora je naslućena kod pacijenta obolelog od α -talasemije, čiji su α -globinski geni bili intaktni, a detektovana je delecija u regionu uzvodno od njih (Hatton C et al. 1990.).

Nedelecione forme α -talasemija

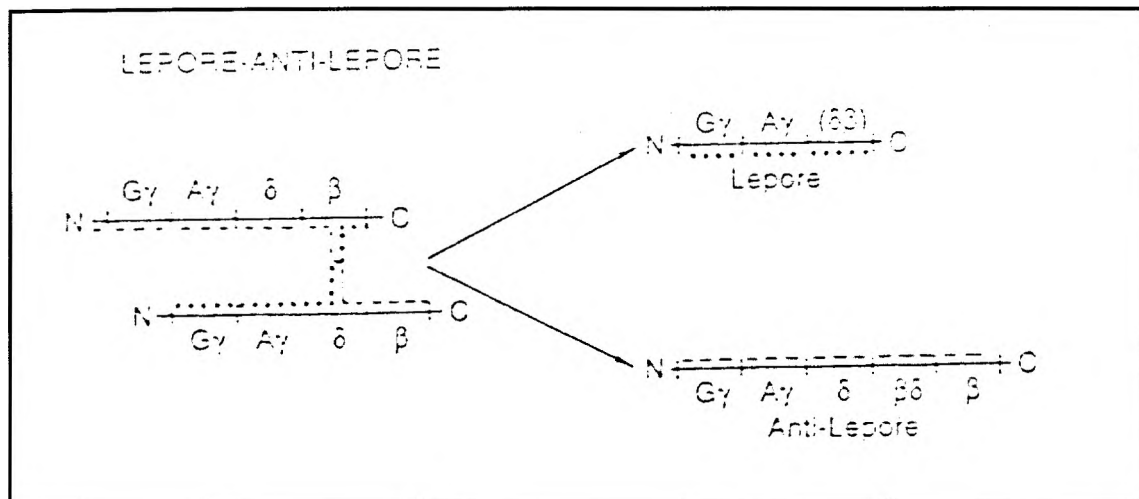
Iako tačkaste mutacije ređe predstavljaju osnovu α -talasemija, ipak je okarakterisan značajan broj takvih mutacija (više od 20, oko 15% ukupnih mutacija) (Higgs DR. 1993.). Sve mutacije su locirane u okviru α -globinskog gena, i ne događa se nikakva promena ekspresije preostalog aktivnog gena (kao kod delecija tipa $-\alpha$) (Higgs DR. 1993.). Stoga su, uglavnom, nedelecione forme α^+ -talasemija odgovorne za veću redukciju α -globinske sinteze nego $-\alpha$ hromozomi. Molekularna patofiziologija kod ovog tipa α -talasemija je slična onoj kod β -talasemija. Mutacije su detektovane u inicijacionom kodonu, mestima za "splajsing", terminacionom (stop) kodonu, poliadenilacionoj signalnoj sekvenci. One su takođe i uzročnici sinteze nefunkcionalne iRNK ("nonsens" mutacije u kodonima) kao i nastanka izrazito nestabilnih hemoglobina koji se ubrajaju u grupu talasemijskih Hb varijanti. Njima je posvećeno sledeće poglavlje.

Talasemijske hemoglobinske varijante

Pojedine strukturne hemoglobinske varijante se karakterišu prisustvom biosintetskog defekta, kao i abnormalnom strukturom (Adams JG & Coleman MB. 1990.). Talasemične hemoglobinopatije su neobične forme talasemijskih sindroma izazvanih takvim strukturnim varijantama.

Hb Lepore

Hb Lepore je hemoglobinopatija uzrokovana defektom (mutacijom) u β -globinskim genima. Prototip je grupe hemoglobinskih varijanti koje se karakterišu fuzionisanim globinskim lancima. Naime, β -globinski polipeptidni lanci koji ulaze u sastav Hb Lepore počinju normalnom aminokiselinskom sekvencom δ -globinskog lanca, a završavaju normalnom aminokiselinskom sekvencom β -globinskog lanca. Na nivou gena se dogodila nejednaka rekombinacija (crossover, eng) koja je fuzionisala proksimalni deo δ -globinskog gena sa distalnim delom β -globinskog gena (Baglioni C. 1962.). Oba gena su locirana na hromozomu blizu jedan drugom i strukturno su veoma slični, pa je nastanak ovakvog genskog rearanžmana moguć u mejozi. Posledica ove genske fuzije je gubitak (delecija) DNK koja se nalazi normalno između ova dva gena, što je iskorišćeno za detekciju ove mutacije molekularno-genetičkim metodama. Druga posledica ovog rearanžmana je nizak nivo sinteze Lepore globina. Naime, ovaj fuzionisani gen (polipeptid) je pod kontrolom promotorskih regulatornih elemenata koji pripadaju δ -globinskom genu, a poznato je da se kod odraslih osoba δ -globinski polipeptid sintetiše do nivoa od 2,5% u odnosu na β -globinski polipeptid. Nivo Hb Lepore u krvi je 4 – 16% (Marinucci M et al. 1979.). Zbog toga se Hb Lepore naziva "talasemijskom" hemoglobinskom varijantom. On spada i u "kvalitativne" i u "kvantitativne" hemoglobinopatije. Pored Lepore hromozoma, dolazi i do nastanka anti-Lepore hromozoma, koji sadrži recipročni fuzioni produkt (proksimalni deo je iz β -, a distalni iz δ -globinskog gena) (Hb Miyada), kao i intaktne δ - i β -globinske gene (slika 16) (Schwartz E et al. 1996.).



Slika 16. Mehanizam nastanka Lepore i antiLepore hromozoma (Benz EJ Jr, 1988.)

Heterozigotni nosioci Hb Lepore (prisustvo Lepore gena na samo jednom hromozomu) imaju kliničku sliku talasemije minor (talasemija trait) (Marinucci M et al. 1979.). Kombinacija Hb Lepore i talasemične mutacije (na drugom hromozomu) daje težak oblik talasemije, najčešće talasemije major (Efremov DG et al. 1988.). Anti-Lepore gen nije povezan sa fenotipom β -talasemije, zbog prisustva intaktnog i funkcionalno normalnog β -globinskog gena na istom hromozomu (Forget BG. 2000.).

Opisano je više formi Hb Lepore koji se razlikuju po poziciji na kojoj se dogodila tranzicija između δ - i β -globinske aminokiselinske sekvence: Hb Lepore-Hollandia (Wayne JS et al. 1994.), Hb Lepore-Baltimore (Ribeiro ML et al. 1997.), i Hb Lepore-Boston-Washington (Fioretti G et al. 1992.).

Hb Lepore-Hollandia je pronađen kod nekoliko porodica u Novoj Gvineji i u Kanadi. Do rekombinacije dolazi između kodona 22 δ -globinskog gena i nukleotida 16 prvog introna β -globinskog gena, ili na aminokiselinskom nivou, posle 22.

aminokiseline δ -globinskog polipeptida dolazi 50. aminokiselina β -globinskog polipeptida (Wayne JS et al. 1994.).

Hb Lepore- Baltimore se sreće uglavnom u španskim porodicama. Otkriven je i kod osoba afričkog porekla, i kod 4 člana u tri generacije jedne porodice u Jugoslaviji. Do rekombinacije dolazi između kodona 68 δ -globinskog gena i kodona 84 β -globinskog gena, odnosno posle 50. aminokiseline iz δ -globinskog polipeptida nastavlja se 86. aminokiselina iz β -globinskog polipeptida (Ribeiro ML et al. 1997.).

Hb Lepore –Boston-Washington je uglavnom pronađen u italijanskim porodicama, ali je uočen i u drugim populacijama (Rumunija, Jugoslavija, Grčka, Kipar). To je najčešći fuzionisani hemoglobin a rezultat je rekombinacije između kodona 87 δ -globinskog gena i nukleotida na poziciji 8 u drugom intronu β -globinskog gena (Ribeiro ML et al, 1997.; Fioretti G et al. 1992.). Prevedeno na aminokiselinski nivo, posle 87. aminokiseline iz δ -globinskog polipeptida, nastavlja se 116. aminokiselina iz β -globinskog polipeptida.

Hb E

Hb E je vrlo česta varijanta (15 -30% populacije) u jugoistočnoj Aziji i Kini. U heterozigotnom stanju daje kliničku sliku vrlo blage β -talasemije minor tipa (trait), dok su homozigoti, iako sa izraženom mikroцитozom (MCV=50-60fL), i dalje bez simptoma težeg oblika talasemije (Cunningham TM. 1982.). Dvostruki heterozigoti za β -talasemiju i Hb E imaju kliničku sliku talasemije major ili talasemije intermedije (Wasi P. 1981.).

Jedina promena u nukleotidnom sastavu kod β^E - gena je bazna zamena u kodonu 26, koja uzrokuju aminokiselinsku supstituciju (Glu→Lys). Ova mutacija pogađa potencijalno kriptično "splajs" mesto i ono biva aktivirano. Alternativno

iskrajanje iRNK događa se na ovoj poziciji sa velikim afinitetom (oko 40-50 %), generišući pri tome strukturno abnormalnu globinsku iRNK koja ne može da uđe u proces translacije (talasemični efekat). Ostali prekursori iRNK, iskrojani na pravom mestu, generišu funkcionalno normalnu iRNK, koja biva translirana u β^E - globinski lanac, zato što zrela iRNK zadržava baznu zamenu koja kodira Lys u kodonu 26 (efekat strukturne varijante).

Hb E je očigledan primer plejotropnog efekta koji tačkasta mutacija ima na količinu i tip genskog produkta dobijenog od jednog mutiranog gena.

Hb Constant Spring

Hb Constant Spring je produžena α -globinska varijanta koja nastaje usled mutacije u normalnom translacionom terminacionom kodonu (Clegg JB et al. 1971.). Poliribozomi čitaju ovako izmenjen stop kodon i inkorporiraju dodatnu 31 aminokiselinu, dok ne stignu do sledećeg terminacionog kodonu u 3' netranslirajućem regionu. Količina α^{CS} -globinske iRNK je značajno redukovana, a α^{CS} -globinski polipeptid se sintetiše u neznatnim količinama (Hunt DM et al. 1982.). Od šest mogućih mutacija terminacionog kodona (TAA) prisutnog u normalnom $\alpha 2$ -globinskom genu koje mogu rezultirati stvaranjem "sens" kodona (Forget BG & Pearson HA. 1995.), pet je identifikovano. Sve se one karakterišu nestabilnom iRNK i malom količinom varijantnog polipeptida. Sve zahvataju $\alpha 2$ -globinski gen, te je output normalnog α -globina sa α^{CS} -gena samo 1%. Zbog toga se taj gen tretira kao α -talasemični gen.

α^{CS} -globinski alel je veoma čest u Jugoistočnoj Aziji. Identifikovan je samo na hromozomima koji imaju *in cis* funkcionalni $\alpha 1$ -globinski gen (genotip $\alpha^{CS}\alpha/$, a ne $\alpha^{CS}-/$). Zbog toga su α -talasemija -2 i Hb H bolest vezane za Hb Constant Spring, a

hidrops fetalis je nemoguć. Heterozigotnost za ovu varijantu dovodi do teške forme HbH bolesti (Milner PF et al. 1971.).

Hipernestabilni hemoglobini

Mnoge tačkaste mutacije uzrokuju zamenu aminokiseline na poziciji koja je ključna za stabilnost globinskog polipeptida. Tako nastaju nestabilne hemoglobinske varijante koje rezultiraju fenotipom sličnim talasemiji. Neki polipeptidni lanci su toliko nestabilni, da se uopšte ne može detektovati tetramerni molekul Hb koji sadrži ove subjedinice. U ovu grupu hemoglobinopatija se ubrajaju Hb varijante sa nestabilnim β -globinskim lancem, čija je nestabilnost produkt mutacija u trećem egzonu, gde je locirana većina $\alpha\beta$ kontakata (Hb Terre Haute (Leu→Pro u kodonu 106), Hb Showa Jakushiji (Leu→Pro u kodonu 110), itd.) (Coleman MB et al. 1991.; Kobayashi Y et al. 1987.). Hb Quong Sze je hemoglobinska varijanta kod koje je α -globinski lanac ekstremno nestabilan, a posledica je mutacije u kodonu 125 (Leu→Pro) (Goosens M et al. 1982.).

Hb Sabine, nestabilna hemoglobinska varijanta, posledica je mutacije u kodonu 91 (Leu→Pro) β -globinskog gena (Schneider RG et al. 1969.; Bogoevski P et al. 1983.; Gasperini D et al. 1992.). Histidin na poziciji 92 (F8), formira jedinu kovalentnu vezu hema i β -globinskog lanca. Uvođenje prolina u α spiralu na poziciji β 91 (Hb Sabine) narušava helikalnu strukturu tog regiona. Uz to i leucin na poziciji β 91 učestvuje u formiranju džepa hema i stabilizuje vezu hema i globina. Posledice aminokiselinske supstitucije kod Hb Sabine su dvostruke: povećana tendencija gubitka hema iz mutirane subjedinice, i povećana susceptibilnost za oksidaciju hema, pri čemu se formira metHb, a potom slede prepoznatljivi simptomi- formiranje hemihroma i njihova precipitacija u vidu Heinzovih tela (Hull D et al. 1998.).

Distribucija talasemijskih mutacija

Utvrđivanje frekvencije specifičnih talasemičnih mutacija u različitim etničkim grupama je posebno relevantno za strategiju skrininga i prenatalne dijagnostike talasemijskih sindroma.

Od ogromnog broja β -talasemijskih mutacija, samo ih je 15 karakteristično za veliku većinu pacijenata, dok ostale predstavljaju ekskluzivitet pojedinih porodica (Forget BG. 2000.). Interesantna je pojava da su određene mutacije karakteristične za etničku grupu, odnosno geografsku regiju i da 5 ili 6 mutacija obično pokriva više od 90% slučajeva β -talasemija (Kazazian HH Jr & Boehm CD. 1988.; Kazazian HH Jr. 1990.) (Tabela 4). Ovo je posebno izraženo na Sardiniji, gde je mutacija u kodonu 39 (β^{039}) zastupljena sa 95%, a β^{06} mutacija predstavlja preostalih 4% (Rosatelli MC et al. 1985.). Treba istaći da je preostalih 5-10% mutantnih alela u etničkoj grupi raspoređeno na veliki broj retkih alela. Tako, kod Kineza, 4 alela pokriva 90% β -talasemijskih mutacija, a 11 retkih alela čini preostalih 10% (Kazazian HH Jr et al. 1986.). Molekularna dijagnostika talasemijskih sindroma je značajno olakšana ako se ove činjenice uzmu u obzir.

Interesantno je da su pojedine mutacije nastale nezavisno u različitim etničkim grupama, što je potvrdila analiza haplotipskog miljea (background, eng.) ovih mutacija.

Kao posledica ogromnog broja β -talasemijskih mutacija prisutnih u pojedinim populacijama, većina individua sa teškim oblicima β -talasemije su dvostruki heterozigoti za različite talasemijske mutacije.

Populacije, rase, geografska područja	Tip mutacije
Mediteran	IVS I-110 kodon 39 IVS I-1 IVS II-745 IVS I-6 IVS II-1
Crna rasa	-29 -88 poly (A)
Jugoistočna Azija	kodoni 41/42 IVS II-654 -28
Indija	IVS I-5 delecija 619 bp kodoni 8/9 kodoni 41/42 IVS I-1

Tabela 4. Uobičajene i najzastupljenije mutacije u različitim populacijama, rasama, geografskim područjima (Kazazian HH Jr i Boehm CD, 1988.)

Kod α -talasemija postoji karakteristična distribucija genotipova. Naime, u Aziji su izrazito česti genotipovi od kojih su oba α -globinska gena inaktivisana *in cis* (na istom hromozomu) ($--/\alpha\alpha$). U crnačkoj populaciji, ovakav genotip predstavlja izuzetak. Kod njih su, najčešće dva gena inaktivirana *in trans* ($-\alpha/-\alpha$) (Dozy EM et al. 1979.). Jasno je zašto HbH bolest ($-\alpha/\alpha\alpha$) i hidrops fetalis ($--/--$) predstavljaju veliki zdravstveni problem u Aziji, dok su u crnačkoj populaciji ove bolesti veoma retko otkrivane.

Meditranska populacija sadrži i "teži" i "lakši" α -globinski genotip. Ipak, u Italiji, na primer, genotip $-\alpha/-\alpha$ se često sreće, dok je genotip $--/\alpha\alpha$ prava retkost (Cao A & Galanello R. 1994.; Galanello R et al. 1992.).

Hemoglobinopatije u Jugoslaviji

U bivšoj SFR Jugoslaviji je još sedamdesetih godina otpočeo populacioni skrining na talasemijske sindrome. Najveći doprinos izučavanju hemoglobinopatija na tim prostorima dao je GD Efremov. 1992. godine, ovaj autor je objavio rezultate svog dvadesetpetogodišnjeg istraživanja (Efremov GD. 1992.).

Utvrđeno je da su β -talasemije u proseku zastupljene sa 1.2% (2.9% u južnoj Makedoniji, a 0.8% na severozapadu Hrvatske). Ispitano je više od 250 β -talasemičnih hromozoma i u preko 90% je otkriveno o kojoj mutaciji je reč. Registrovano je 18 različitih mutacija od kojih se 3 (IVS-I-110, G→A; IVS-I-6, T→C; IVS-I-1, G→A) javljaju u preko 70% slučajeva. Okarakterisane su i četiri nove mutacije (-87 C→A; IVS- II-850, G→C; mutacija u inicijacionom kodonu T→C; mutacija u poliadenilacionoj sekvenci AATAAA→AATGAA) i jedna nova delecija (1605 bp). Frekvenca $\delta\beta$ talasemija je 0,2%, a HPFH – 0,4%. Studije α -talasemija su bile ograničenog karaktera. Učestalost strukturnih varijanti hemoglobina u bivšoj SFRJ je bila 0,3%. Uočeno je 5 različitih varijanti α -polipeptidnog lanca, 15 varijanti β -polipeptidnog, 1 varijanta δ -polipeptidnog lanca, 1 varijanta sa delecijom i 2 tipa Hb Lepore.

Oko 1980. godine radjena su istraživanja koja su obuhvatila 3500 osoba sa područja Republike Srbije (istraživanjima su uglavnom obuhvaćena deca školskog uzrasta, a u manjem procentu i deca mlađa od 7 godina) (Beksedić D et al. 1980.). Na osnovu dobijenih rezultata, procenat otkrivenih nosilaca gena za patološki hemoglobin iznosio je 1,9%. β i $\delta\beta$ talasemije su bile zastupljene sa 1,39%, hemoglobin Lepore sa 0,8%, hemoglobin Srbija sa 0,26% (α 112 (G19) His→Arg) (Beksedić D et al. 1980.), hemoglobin O Arabija sa 0,11%, hemoglobin D sa 0,13%,

hemoglobin S sa 0,13%. Još jedna Hb varijanta je otkrivena na ovim prostorima: Hb Beograd (β 121 (GH4) Glu→Val) (Efremov GD et al. 1973.).

Molekularna dijagnostika talasemijskih sindroma na prostorima SRJugoslavije (Republika Srbija i Republika Crna Gora) nije rađena do 1999. godine, te su podaci o molekularnoj patologiji hemoglobinopatija na ovim prostorima izuzetno oskudni (pojedinačni slučajevi dijagnostikovani u laboratorijama van zemlje).

Molekularna dijagnostika talasemijskih sindroma

Procedure za identifikaciju talasemičnih mutacija se dele u dve grupe: prva grupa obuhvata tehnike kojima se identifikuju poznate mutacije, a drugu čine metodi koji se koriste za definisanje nepoznatih ili retkih mutacija. Sve tehnike i metode se baziraju na amplifikaciji DNK putem lančane reakcije polimeraze DNK (PCR – eng. Polymerase Chain Reaction) (Mullis KB et al. 1986.).

Metode za identifikaciju poznatih mutacija

1. Direktna analiza amplifikata elektroforezom (gap PCR)

Ova metoda je idealna za otkrivanje delecija u genu. Izaberu se prajmeri koji se nalaze sa jedne i druge strane mesta gde se dogodila delecija (breakpoint). Ako se radi o malim delecijama, dužina fragmenta pokazuje da li delecija postoji ili ne. Ako se radi o velikim delecijama, pozicije prajmera na normalnom hromozomu su veoma

udaljene jedna od druge. PCR reakcija će biti moguća ako delecija postoji, jer se ovako dizajniranim PCRom ne mogu generisati produkti veličine nekoliko desetina kilobaza. U ovom slučaju odsustvo amplifikata signalizira odsustvo delecije (normalan alel).

2. Direktna analiza amplifikata elektroforezom posle digestije restrikcionim enzimom.

Postoje tačkaste mutacije koje tako promene niz nukleotida u DNK sekvenci da on postane mesto koje prepoznaje neki od restrikcionih enzima. Posle PCR reakcije, produkt digeriramo restrikcionim enzimom koji je karakterističan za mutaciju koju očekujemo.

3. Dot-blot oligonukleotidima koji su specifične probe za određene mutacije (ASO – alel specifični oligonukleotidi)

Tačkaste mutacije se mogu detektovati hibridizacijom DNK pacijenta i sonde proba za te mutacije (ASO probe). Probe mogu biti obeležene radioaktivno i neradioaktivno, što nam omogućava da detektujemo gde je do hibridizacije uopšte došlo. Sekvenca DNK u kojoj tražimo mutaciju se amplifikuje PCRom, a potom se amplifikat veže za najlonsku ili nitroceluloznu membranu. Zatim se sukcesivno vrše hibridizacije probama specifičnim za svaku mutaciju ponaosob. Uslovi hibridizacije su tako podešeni da samo proba koja ima 100% homologiju može hibridizovati sa DNK pacijenta. Proba koja uspešno hibridizuje nam otkriva mutaciju koju sadrži analizirana DNK.

Sve dobro definisane tačkaste mutacije u β – globinskom genu se ovako dijagnostikuju.

Negativna strana ove metode je što svaka proba posebno mora da prođe kroz proces hibridizacije sa amplifikovanom DNK, što metodu čini vrlo dugotrajnom, ako imamo

na umu koliko različitih mutacija postoji u β – globinskom genu. Zato se u novije vreme koristi metoda reverznog dot-blot.

4. Reverzni dot – blot

Ova metoda ima isti princip kao i prethodna, samo je obrnuta: niz proba za različite mutacije se veže za membranu, a DNK koju analiziramo, pri amplifikaciji obeležimo (uvek neradioaktivno – biotinom). Jednom jedinom hibridizacijom identifikujemo mutaciju koju sadrži amplifikovani fragment DNK. β – talasemija se u poslednje vreme najčešće ovako dijagnostikuje. Ovom metodom se vrši i skrining populacije na β – talasemiju, jer je metoda brza, bezbedna (neradioaktivna) i rentabilna (Zhang Y et al. 1991.).

5. Alel-specifični PCR (ARMS- amplification refractory mutation system)

Zahvaljujući velikoj specifičnosti PCRa, moguće je tako dizajnirati prajmer, da on u sebi sadrži tačkastu mutaciju. Takav "mutiran" prajmer će se vezivati samo za mutiranu sekvencu, a produkt ćemo dobiti samo ako je prajmer našao sebi komplementarnu sekvencu. Za ovu vrstu PCR analiza se koriste tri prajmera: jedan je zajednički, a druga dva se razlikuju samo po jednom nukleotidu koji predstavlja tačkastu mutaciju ili normalan (zdrav) alel. Analiza se vrši putem dve reakcije (jedna za normalni alel, druga za mutirani, što nam omogućava detekciju heterozigota, odnosno homozigota za datu mutaciju). Ako je u DNK koja se amplifikuje prisutna mutacija, amplifikacija se može realizovati samo uz pomoć "mutiranog" prajmera. Ako se radi o normalnom fragmentu DNK, amplifikacija se može postići samo normalnim prajmerom (prajmerom koji u sebi ne sadrži mutaciju). "Mutirani" i "normalni" prajmeri su dizajnirani za sve česte talasemijske mutacije (Old JM et al.

1990.; Newton CR et al. 1989.). Metoda se često koristi za dijagnostifikovanje β – talasemija. Ravnopravna je sa metodom reverznog dot – blota.

Metode za identifikovanje nepoznatih mutacija

Ako brzi metodi za detekciju poznatih mutacija u globinskim genima ne otkriju mutaciju, a klinička slika ukazuje na moguću hemoglobinopatiju, neophodno je sekvencirati gen ili deo gena na koji ukazuje patologija.

Kako je sekvenciranje DNK dugotrajna i skupa metoda, prvo se koriste metode koje sužavaju region koji treba sekvencirati (metoda elektroforeze na gelu denaturišućeg gradijenta – DGGE i konformacioni polimorfizam jednolančane DNK (SSCP).

1. Elektroforeza na gelu denaturišućeg gradijenta (DGGE)

Ako samo na jednom od hromozoma postoji mutacija u globinskom genu (heterozigot), u PCR amplifikatu su prisutna dva tipa sekvence: mutirani i normalni. Ako se denaturišu ta dva različita dvolančana PCR produkta, pa im se omogući spontana renaturacija, formiraće se dva homodupleksa (prvi je dvolančani DNK molekul koji sadrži oba lanca koji imaju mutirani nukleotid ili region, a drugi sadrži oba lanca sa normalnom sekvencom) i dva heterodupleksa (dobijeni sparivanjem dva mutirana lanca sa dva normalna lanca). Ako se radi o zdravom genotipu ili homozigotu za istu mutaciju (na oba hromozoma ista mutacija), formiraće se jedan homodupleks. Ovako formirana četiri, odnosno jedan tip dvolančanih DNK se razlikuju po stepenu stabilnosti, odnosno temperaturi topljenja, denaturacije (T_m). Ako se nanese na poliakrilamidni gel koji sadrži rastuće koncentracije denaturišućeg agensa (formamid, urea), brzina putovanja svakog od njih će se razlikovati i zavisice od toga koliko se lako svaki od dupleksa denaturišu. Različita mobilnost u gelu lako

se detektuje, a može biti posledica razlike u jednom jedinom nukleotidu u fragmentima (tačkasta mutacija). Rep od 30-40 bp (GC-clamp, eng.) se dodaje na jedan od prajmera, kako bi PCR produkt imao bazalnu temperaturu denaturacije. Ako se podeli β – globinski gen na više delova, svaki deo umnoži PCRom i potom svaki od amplifikata analizira metodom DGGE, biće otkriven fragment koji sadrži mutaciju i koji treba da se sekvencira (Ghanem N et al. 1992.). Ovako se višestruko smanjuje dužina DNK fragmenta koji treba sekvencirati da bi se otkrila mutacija u datom slučaju.

2. Sekvenciranje amplifikovanog fragmenta

Najčešće se sekvencira metodom Sangera (Sanger F et al. 1977.). Danas je moguće pročitati sekvencu željenog fragmenta DNK bez mukotrpnog kloniranja. Naime, PCR obezbeđuje dovoljne količine DNK za sekvenciranje. Sekvenciranjem otkrivamo sve vrste mutacija u genima. Ova metoda, ne samo što stoji na kraju svih molekularnodijagnostičkih puteva, nego je i omogućila molekularnu dijagnostiku i razvitak svih brzih metoda kojima se može lako otkriti mutacija. Naime, poznavanje kompletne sekvence globinskih lokusa omogućilo je otkrivanje mutacija i njihovu korelaciju sa patološkim talasemičnim fenotipom. Mnogobrojna sekvenciranja globinskih gena talasemičnih pacijenata otkrila su postojanje mutacija koje su uobičajene i za koje su dalje razvijani brzi i jeftini metodi za dijagnostikovanje. Sekvenciranje je i dalje "kraljica metoda" jer kada sve ostale metode "zaćute", ono će otkriti mutaciju koju tražimo.

CILJ RADA

Naša istraživanja su imala dva osnovna fokusa: prvi, korelaciju genotipa i fenotipa, kako kod jugoslovenskih pacijenata, tako i kod pacijenata različitog porekla sa atipičnim talasemijskim sindromima, i drugi, utvrđivanje tipova β -talasemijskih mutacija i njihovih frekvenci u jugoslovenskoj populaciji, kao i njihovu implikaciju u prenatalnoj dijagnostici. Oba tipa rezultata (koji se odnose na jugoslovensku populaciju) odredili su strategiju skrininga i dijagnostikovanja talasemijskih sindroma u nas.

Kako su talasemijski sindromi relativno učestala oboljenja u SR Jugoslaviji, neophodno je uvesti u našu medicinsku praksu karakterizaciju ovih oboljenja na molekularnom nivou. Molekularna dijagnostika talasemijskih sindroma je najpouzdaniji način da se postavi dijagnoza u najranijem uzrastu i da se,

blagovremenom primenom modernih metoda lečenja ove bolesti, popravi klinička slika, tok i prognoza bolesti. Praćenje genetskih markera u porodici omogućava prenatalnu dijagnostiku ovih bolesti i smanjenje broja obolelih od najteže forme talasemijskih sindroma – talasemije major.

Osnovna saznanja o zastupljenosti pojedinih mutacija odgovornih za pojavu talasemičnog fenotipa u našoj populaciji, omogućavaju dizajniranje brzih i rentabilnih metoda za dijagnostikovanje talasemijskih sindroma, kao i uspostavljanje strategije za skrining naše populacije na talasemijske sindrome.

Korelacija genotipa i fenotipa izučavana u ovom radu doprinosi razvitku metoda za detekciju nosilaca talasemičnih mutacija i boljem i tačnijem genetičkom savetu. Naime, razumevanje atipičnih formi talasemijskih sindroma, koje mogu biti propuštene u uobičajenim procedurama skrininga za talasemične mutacije, omogućava dizajniranje odgovarajućih metoda za njihovu detekciju. Poznavanje korelacija genotipa i fenotipa, usmerava ka odgovarajućim genetskim analizama, što omogućava otkrivanje svih komponenata genetske osnove oboljenja, i vice versa, u genetičkim savetima doprinosi tačnijoj predikciji fenotipa koji će ispoljavati potomci.

Studije o genetskim modifikujućim faktorima, sposobnim da ublaže kliničku sliku talasemije major, su istinski neophodne, jer će nam one omogućiti jedinu isceliteljsku terapiju za ovu bolest – gensku terapiju.

MATERIJAL I METODE

Biohemijske metode

Hematološki parametri

Hematološki parametri su određivani na automatskom analizatoru Technicon ili Coulter model S (Coulter Electronics).

Pravljenje hemolizata

Krv za analizu se uzima sa EDTA ili 3,8% Na-citratom kao antikoagulansima.

5 ml krvi centrifugirati 5min na 3000rpm (centrifuga Heraeus). Posle centrifugiranja odbaciti plazmu. Talog rastvoriti u 5ml fiziološkog rastvora (0,9% NaCl) i centrifugirati 5min na 3000rpm. Posle centrifugiranja odbaciti supernatant.

Talog na ovaj način isprati još dva puta (ukupno 3 ispiranja). Istaložene eritrocite hemolizirati dodavanjem 1 volumena hemoliznog pufera (EDTA 2,5 g + KCN 0,05 g u destilovanoj vodi do finalnog volumena 1 L).

Elektroforeza na acetatnoj celulozi

Koristi se hemolizat koncentracije 8-12 g/dL.

Ekvilibrirati membranu od acetatne celuloze (Titan III cellulose acetate plates, Helena Lab.) 20min u puferu TBE (TBE 0,08 M pH 8,4). Odstraniti višak pufera sa membrane filter papirom. Naneti odmah uzorke koristeći plastični aplikator. Uvek naneti i kontrolni uzorak (hemolizat zdravog čoveka). Staviti membranu u kadnicu za elektroforezu. Uslovi elektroforeze: 320 V, 25min. Pufer: TBE 0,08M pH 8,4.

Posle elektroforeze, potopiti membranu u boju 5min (boja Crvena Ponceau S 0,5 g u 100 ml vodenog rastvora sa 5% trihlorsirćetne kiseline). Odbojavati u više koraka u odbojivaču, dok acetatno celulozna membrana skroz ne pobeli (odbojivač 5% sirćetna kiselina u destilovanoj vodi). Membrane se mogu čuvati posle sušenja i konzervacije.

Procedura za konzervaciju: potopiti membranu u metanol 2min, a potom 5min u 20% rastvor sirćetne kiseline u metanolu. Osušiti 2min na vazduhu, a zatim nekoliko minuta u pećnici (NCCLS. 1986.)

Određivanje nivoa Hb A₂

Nivo Hb A₂ je određivan na dva načina: metodom HPLC (high performance liquid chromatography, eng.) i elucijom iz gela frakcije Hb A₂ i spektrofotometrijskim merenjem njenih vrednosti.

HPLC je rađena pomoću potpuno automatizovanog HPLC sistema (VARIANT β -thalassemia Short Program, BIO-RAD). Metod za kvantifikaciju Hb

A₂ HPLC-om je obuhvatao automatizovanu elektroforezu i hromatografiju kroz anjon-izmenjivačku kolonu (Mosca A. et al. 1989.)

Za kvantitativno određivanje frakcije Hb A₂ iz gela od acetatne celuloze, koristi se elucija (Marengo-Rowe AJ. 1965.). Potrebno je iseći deo gela koji sadrži ovu frakciju, i staviti ga u epruvetu sa 4 ml destilovane vode. Isečena frakcija HbA se stavi u sud sa 20 ml destilovane vode. Elucija traje 30 minuta. Vrednosti absorbancije čitamo na spektrofotometru, na 413 nm, i izračunavamo:

$$\text{Hb A}_2 (\%) = \text{OD Hb A}_2 / \text{OD HbA} \times 5 - \text{OD Hb A}_2$$

Određivanje nivoa Hb F

Nivo Hb F je određivan na dva načina : HPLC-om i metodom alkalne denaturacije.

HPLC je rađena pomoću potpuno automatizovanog HPLC sistema (VARIANT β -thalassemia Short Program, BIO-RAD). Metod za kvantifikaciju Hb F je obuhvatao automatizovanu elektroforezu, alkalnu denaturaciju i radijalnu imunodifuziju (RID).

Metoda alkalne denaturacije (Pembrey ME et al. 1972.) za određivanje Hb F se bazira na osobini ove frakcije da je mnogo rezistentnija na alkalije od ostalih Hb frakcija.

Koristi se hemolizat koncentracije 8-10 g/dL.

Pomešati 0,6 mL hemolizata i 10 mL Drabkinovog rastvora (0,05% K₃F(CN)₆ + 0,05% KCN) pri čemu se Hb transformiše u cijanmet- Hb. Preneti 2,8 mL rastvora u vodeno kupatilo na 20 °C ± 2 °C, i dodati 0,2 mL alkalne solucije (1,2 N NaOH). Posle 2 minuta dodati 2 mL zasićenog rastvora amonijum sulfata (70,6 % (NH₄)₂ SO₄). Sačekati 5-10 minuta, filtrirati kroz filter papir i meriti absorbanciju

(HbF). Kontrola (totalni Hb) je 1,4 mL rastvora cijanmet- Hb u rastvoru sa 1,6 mL destilovane vode i 2 mL zasićenog rastvora amonijum sulfata. Ova kontrolna solucija se razredi 1:10 u destilovanoj vodi (K). Na 415 nm se čita absorbanca i određuje udeo Hb F u hemolizatu:

$$\text{HbF(\%)} = (\text{HbF} / \text{K} \times 20) \times 100$$

Test toplotne denaturacije (otkrivanje nestabilnih Hb)

Normalni hemoglobini precipitiraju u minimalnim količinama kada se inkubiraju 60' na 50 °C, dok se nestabilni Hb u tim uslovima potpuno denaturišu.

U 5 mL hemolizata dodati 5 mL 0.01 M fosfatnog pufera pH 7,4, Centrifugirati 10' na 3000 rpm. Supernatant se inkubira na 50 °C, u tri faze od po 60'. U isto vreme se vrši reakcija i u kontroli (zdrav subjekt). Vizuelnom metodom konstatujemo eventualno formiranje flokula ili taloga kod pacijenta u različitim vremenskim periodima.

Separacija globinskih lanaca HPLC-om

Inverzni HPLC (reverse phase HPLC)(Huisman THJ. 1987.) se koristi za razdvajanje globinskih lanaca. Separacija u sistemu koji je korišćen zavisi isključivo od razlike u hidrofobnosti koja postoji među globinskim lancima. U principu, polarniji lanci (manje hidrofobni) se eluiraju pre sa kolone. Ako se radi o aminokiselinskoj zameni u globinskom lancu, ona će uticati na promenu vremena zadržavanja mutiranog polipeptida na koloni, te će on biti lako uočljiv.

Za analizu su neophodni: HPLC sistem (Backman Gold System), kolona (Merck LiChrosphere), i eluenti A (acetonitril-metanol-NaCl 0,155 M, pH2,7 (68:4:28) i B (acetonitril-metanol-NaCl 0,077 M, pH 2,7 (26:33:41).

Posle stabilizacije kolone, nanose se uzorci, a potom se primeni linearni gradijent od 20% do 60% rastvora A, pri protoku 0,8 mL/min i u trajanju od 60-90 minuta. Hromatografska kolona treba da bude na 48 °C.

Posle prvog pika, poreklom od hema, slede globinski lanci sledećim redom : β , δ , α , $A\gamma$ i $G\gamma$. Hemoglobinske varijante se ovako dijagnostikuju, jer čak i ista aminokiselinska substitucija, locirana na različitim mestima, doprinosi različitom elucionom vremenu. Ovim metodom se detektuje i koji je od γ -globinskih lanaca aktiviran datom HPFH mutacijom.

In vitro sinteza globinskih lanaca

Ova metoda je relativno kompleksna i koristi se samo kad je neophodna, to jest kada treba utvrditi odnos između sinteze α - i β - globinskih lanaca (Clegg JB. 1983.). Princip metode je sledeći: retikulociti se inkubiraju u smesi aminokiselina, među kojima je Leu obeležen tricijumom (^3H). Novosintetisani globinski polipeptidi, radioaktivno obeleženi, precipitiraju se kiselim acetonom i onda se razdvoje na hromatografskoj koloni CM 52. Inkorporirani radioaktivitet se meri u svakom lancu, i to u scintilacionom brojaču.

Obično se koristi venozna krv sa heparinom kao antikoagulantom.

Inkubacija radioaktivnim leucinom. Čelije crvene loze se ispiraju 3 puta na +4 °C rastvorom KRP (Krebs-Ringer-fosfatni rastvor: 0,15 M NaCl + 0,10 M fosfatni pufer pH 7,4.). Na kraju se 0,5 ml ćelija crvene loze rastvori u 0,5 mL inkubacione smeše (0,5 mL KRP + 0,5 mL plazma AB Rh (+) + 2 mg glukoze + po 20 nM svake od 19 aminokiselina (sem Leu) + 50-100 mCi ^3H -Leu). Inkubacija traje 2h, na temperaturi od 37 °C. Posle inkubacije, ćelije se operu 3 puta hladnim fiziološkim rastvorom, a onda liziraju u 0,005 M MgCl_2 . Liza se zaustavlja rastvorom saharoze.

Precipitacija globinskih lanaca. Globini se precipitiraju dodavanjem 20-30 volumena ledenog kiselog acetona, kap po kap, uz stalno mešanje. Suspenzija stoji na -20°C , 30 minuta. Precipitat se sakupi centrifugiranjem 10', brzinom od 3000 rpm na $+4^{\circ}\text{C}$, a zatim 3 puta ispiri acetonom. Globinski lanci se na kraju osuše ispiranjem etrom.

Separacija globinskih lanaca. Priprema globina: 50 mg globina se rastvori u 2 mL inicijalnog pufera pH 6,7 (Na HPO_4 + 2-merkaptoetanol + 8,3 M urea). Globini se dijalizuju u istom puferu 3 h. Priprema kolone CM52: karboksimetilcelulozna smola se rastvara u inicijalnom puferu i taloži. Na kraju se ekvilibriše inicijacionim puferom. Hromatografija se događa na pH 6,7. Separacija polipeptida se postiže elucionim gradijentom (molaritet fosfata u puferu raste od 5 – 30 m M). Brzina protoka kroz kolonu je 20 mL/h. Sakupljaju se frakcije od po 5 ml.

Merenje aktiviteta. Optička gustina svake frakcije se meri na 280 nm. U isto vreme, deo frakcije se meri u scintilacionom brojaču. Rezultati merenja OD služe za crtanje grafika distribucije globinskih polipeptida, a na isti grafik se dodaju i rezultati merenja aktiviteta za date frakcije.

Na kraju se računa odnos između vrednosti aktiviteta koje se poklapaju sa α -globinskim pikom odnosno β -globinskim pikom, i dobijamo biosintetski koeficijent α/β -globinskih lanaca.

Metode koje obuhvataju analize DNK

Izolovanje DNK iz krvi

(Goosens M et al. 1983.)

U corex epruvetu od 30ml se sipa 2.5ml nekoagulisanog uzorka krvi i doda se 22.5ml Lysis buffer-a (0.32M Sucrose, 10mM TRIS HCl pH 7.5, 5mM MgCl₂, 1% Triton x 100). Ovo se nežno promućka i stavi na led 15min. Zatim se vrši centrifugiranje 10min na 4000rpm na 4°C (centrifuga SORVALL RC-5B, rotor SS-34). Talog se ispira dva puta sa po 5ml Fisio buffer-a (0.075M NaCl, 0.025M EDTA). Posle svakog ispiranja vrši se centrifugiranje (10min, 4000rpm, 4°C). Na kraju se talog rastvori u 750 µl 1xTE i prebaci u ependorf epruvetu, a zatim se doda 25µl 20% SDS-a i 125µl proteinaze K (10mg/ml u 1%SDS, 2mM EDTA) i inkubira se 1 sat na 65°C. Posle inkubacije se doda 250µl zasićenog NaCl-a (6M), vorteksuje se 15s, a onda se vrši centrifugiranje na 6000rpm, 15min na 4°C (mikrofuga EPPENDORF 5417R). Supernatant se prebaci u nove ependorf epruvete i ostavi da stoji preko noći na +4°C. Ponovo se izvrši centrifugiranje 15min na 6000rpm na 4°C. Supernatant se prebaci u novu ependorf epruvetu i doda se jedna zapremina izopropanola, pa se vrši inkubacija jedan sat na sobnoj temperaturi. Posle ovoga DNK se namotava uz pomoć staklenog štapića, koji se zatim potopi u 70% etanol, pa se kratko suši i rastvori u 250µl 1xTE.

Izolovanje DNK iz horionskih čupica

Horionske čupice (svetle, prozirne, razgranate) se, posle biopsije, čiste pod mikroskopom od decidue (tamnije, kompaktnije tkivo). Krvni sudovi kojima su prožete se ne moraju otklanjati. Čupice se zatim isperu 3 puta u fiziološkom rastvoru. U uzorak (10 µg) se dodaje 559 µL ekstrakcione smeše (500 µL 10 mM TrisHCL pH 8,0, 2 mM EDTA + 17 µL 10% SDS + 42 µL proteinaze K – 10 mg/mL), i mehanički usitne čupice. Inkubacija na 65 °C traje 1h. Zatim se doda 167 µL

zasićenog 6 M Na Cl. Promućkati snažno (vorteks). Centrifugirati na 12000 rpm u Eppendorf centrifugi, 15 minuta na sobnoj temperaturi. DNK precipitirati iz supernatanta sa 726 μ L izopropanola. Posle 20 minuta precipitacije, centrifugirati, dva puta isprati 70% etanolom, osušiti i rastvoriti u 30 μ L TE pufera (1 mM TrisCl pH 7,5 + 1 mM EDTA pH 7,4).

Elektroforeza DNK na agaroznom gelu

(Maniatis T et al. 1989.)

Elektroforeze DNK su rađene na horizontalnim 1% agaroznim gelovima. Kao pufer za pripremanje gelova koristi se 1x koncentrovan TAE pufer (0.04M Tris-acetat; 0.002M EDTA pH8.0). Isti pufer je bio i pufer za elektroforezu. I u gel i u pufer se dodaje etidijum bromid u finalnoj koncentraciji 0.5 μ g/ μ L. Etidijum bromid je fluorescentna boja koja se interkalira u DNK i predstavlja najpogodnije sredstvo za vizualizaciju DNK u agaroznom gelu. Za upoređivanje dužine DNK fragmenata korišćen je marker λ DNK-BstE II (fragmenti dužine: 8454, 7242, 6369, 5686, 4822, 4324, 2323, 1929, 1371, 1264, 702 bp), i DNK λ faga digerirana *Hind* III restrikcionim enzimom pri čemu su dobijani fragmenti dužine: 23130 bp, 9416 bp, 6557 bp, 4361 bp, 2322 bp, 2072 bp, 564 bp i 125 bp;

Elektroelucija DNK iz agaroznih gelova

(Maniatis T et al. 1989.)

Da bi se izolovale velike količine prečišćenih molekula DNK korišćena je metoda elektroelucije DNK iz 1% preparativnih agaroznih gelova (31).

Preparativne elektroforeze puštane su 2 h pri jačini struje 50 mA i naponu od 50 V

kako bi se postiglo što bolje razdvajanje fragmenata na gelovima opterećenim velikim količinama DNK.

Deo gela u kome se nalazi željena traka DNK je, po završetku elektroforeze, isecan i prenošen u dijalizno crevo, prethodno napunjeno 0,5 x TAE puferom (0,04 M Tris-acetatč 0,002 M EDTA pH 8,0). Zatvoreno crevo za dijalizu se potapa u kadicu za elektroforezu sa istim (0,5 x TAE) puferom. U pufer za eluciju se ne stavlja EtBr.

Elektroelucija je izvođena pri naponu od 100 V, a struja je proticala u smeru u kome je išla i pri elektroforezi. Elucija traje oko 60 minuta ili više, sve dok se pod UV svetlom ne vidi da je celokupna količina DNK izašla iz gela u pufer. Pufer sa rastvorenom DNK je centrifugiran 5 minuta na 13000 rpm/min (centrifuga Ependorf). Ovako se oslobađamo eventualno zaostalih komadića agaroze koji ostaju u talogu. U supernatantu je eluirana DNK koja se ekstrahuje fenol/hloroformom, a zatim precipitira etanolom. DNK se rastvara u dd H₂O ili TE puferu pH 7,5 (10 mM Tris-Cl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0).

DNK je dodatno prečišćena na kolonici za prečišćavanje PCR produkta (QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN).

Metoda reverznog dot blota (RDB)

(Zhang Y et al.1991.)

Oligonukleotidne probe:

- NH₂-β⁺IVS-I-110-N: 5'-NH₂ GAAAATAGACCAATAGGCAGA-3'
- NH₂-β⁺IVS-I-110- M: 5'-NH₂ TCTGCCTATTAGTCTATTTTC-3'
- NH₂-β⁰39-M: 5'-NH₂ AGAACCTCTAGGTCCAAGG-3'
- NH₂-β⁺IVS-II-745-M: 5'-NH₂ ACAATCCAGGTACCATTCT-3'
- NH₂-β⁰6-M: 5'-NH₂ TGACTCCTGGGAGAAGTCT-3'
- NH₂-β⁺(-87)-M: 5'-NH₂ CAACCCTAGCGTGTGGCT-3'
- NH₂-β⁰IVS-II-1-M: 5'-NH₂ GAACTTCAGGATGAGTCTAT-3'

- NH₂-β⁰IVS-I-1-M : 5'-NH₂ CCTGGGCAGATTGGTATCA-3'
- NH₂-β⁺IVS-I-6-M: 5'-NH₂ GCAGGTTGGCATCAAGGTT-3'

Prajmeri:

- R95 : 5'-TAAGCCAGTGCCAGAAGAGC-3'
- R61: 5'-GACTGACCTCCCACATTCCC-3'

PCR:

U finalnu smešu od 50μl se stavljaju sledeće komponente:

- DNK 0.5-1μg
- 10x pufer (Perkin Elmer)
- MgCl₂ 1.5mM
- dNTP (dATP, dGTP, dCTP- svaki 200μM, dTTP-175μM)
- biotin-11-dUTP (Boehringer) 25μM,
- prajmeri R95 i R61 10pmol svaki,
- (0.5mM spermidin + 1mg/ml BSA) 2.5μl,
- AmplyTaq (Perkin Elmer) 1.5U.

Uslovi PCR reakcije su sledeći:

- 10 min na 98°C (hot start)
- 2 min na 72°C (međukorak za dodavanje polimeraze),
- 30 sec na 94°C – denaturacija,
- 30 sec na 65°C – "aniling",
- 1min na 72°C – elongacija.

Reakcija sadrži 25 ciklusa (denaturacija, "aniling" i elongacija) i na kraju se elongacija događa još 10min na 72°C.

RDB

1. PRIPREMANJE OLIGONUKLEOTIDNIH PROBA

Pre nanošenja na membranu probe se moraju rastvoriti u Na₂CO₃/NaHCO₃ pH8.4 puferu (0.5M NaHCO₃ čiji se pH doteruje sa 0.5M Na₂CO₃).

2. PRIPREMANJE MEMBRANE (aktiviranje membrane i nanošenje oligonukleotidnih proba)

3. 2g 16% EDC (etil-dimetil-aminopropil-karbamid) se rastvori u 20ml ddH₂O.U odgovarajuću plastičnu kadicu se stavi membrana (Pall Biodyn C, najlonska) i prelije ovim rastvorom.Kadica se poklopi folijom i mućka na klackalici 15min.Zatim se membrana ispere sa ddH₂O nekoliko puta i ostavi se da se suši 10min.Posle sušenja membrana se stavi u aparat za bloting ('Hybri-Dot Manifold' (BRL)) na 3 nakvašena filter papira i drži se 5min na vakuum pumpi.Nakon toga se na membranu nanese određene koncentracije oligonukleotidnih proba (po 50μl)- pumpa je sve vreme uključena- i ostave 15min na vakuum pumpi.Na kraju se membrana ispere 10min u 0.1N NaOH, zatim se ispere vodom,osuši i iseče na odgovarajuće trake.Ovako pripremljena membrana je spremna za hibridizaciju.

Oligonukleotidne probe se nanose u sledećim koncentracijama:

- NH₂-β⁺ IVS-I-110-N 20pmol
- NH₂-β⁺ IVS-I-110-M 3-5pmol
- NH₂-β⁰39-M 3-5pmol
- NH₂-β⁺ IVS-II-745-M 10pmol
- NH₂-β⁰6-M 5pmol
- NH₂-β⁺ (-87)-M 5pmol
- NH₂-β⁰ IVS-II-1-M 40pmol i više
- NH₂-β⁰ IVS-I-1-M 10pmol
- NH₂-β⁺ IVS-I-6-M 5pmol

3.HIBRIDIZACIJA

Hibridizacioni pufer (SSC 2x pH7, SDS 0.1%) se zagreje nekoliko minuta u vodenom kupatilu sa "šejkerom" (55°C).Zatim se preko svake membrane sipa po 3ml prethodno zagrejanog hibridizacionog pufera i vrši se prehibridizacija 15min.Za to vreme se izvrši denaturacija (10min na 95°C) biotinom obeleženog amplifikata.U 3ml pufera u kome se vršila prehibridizacija se stavi 20μl amplifikata i vrši se hibridizacija 1h.Nakon ovoga se membrane isperu (nekoliko sekundi) u po 5ml prethodno zagrejanog Wash Solution-a (5xSSC, 0.5% SDS).Zatim se u svaki well

sa membranom sipa po 3.3ml hibridizacionog pufera i 27 μ l enzimskog konjugata HRP-SA (Perkin Elmer) i to se ostavi 5min u vodenom kupatilu (55°C, sa "šejkiranje").

Opet se izvrši ispiranje sa po 5ml Wash Solution-a (nekoliko sekundi), a zatim se ponovo doda po 5ml Wash Solution-a i ostavi se 12min u vodenom kupatilu (55°C, sa "šejkiranje").Ponovo se vrši ispiranje (nekoliko sekundi) sa po 5ml Wash Solutiona da bi se posle ovog membrane prelile sa po 5ml citratnog pufera (0.1M natrijum citrat pH5 -dobija se rastvaranjem u vodi dihidratnog natrijum citrata ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) čiji se pH podešava monohidratnom citričnom kiselinom ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)) i ostave na klackalici 5min na sobnoj temperaturi.Nakon ovoga se membrane preliju sa po 5ml Color Development Solution-a (5ml citratnog pufera + 5 μ l 3% H_2O_2 + 0.25ml Chromogen:TMB SOLUTION (Perkin Elmer)) i ostave na klackalici, u mraku 15-30min (dok se na membranama ne razvije boja).

Alel – specifični PCR (ARMS)

(Old JM et al. 1990.; Newton CR et al. 1989.)

Zahvaljujući velikoj specifičnosti PCR-a, moguće je tako dizajnirati prajmer da on u sebi sadrži tačkastu mutaciju. Takav mutirani prajmer će se vezati samo za mutiranu sekvencu, odnosno produkt reakcije će se dobiti samo u slučaju prisustva mutacije.

Za detekciju tačkastih mutacija ARMS PCR – om, PCR reakcije se rade u dve ependorf epruvete. U jednoj ependorf epruveti je prisutan mutirani prajmer (prajmer sa tačkastom mutacijom), a u drugoj normalan prajmer (prajmer komplementaran sa normalnim alelom). Ova dva prajmera se razlikuju samo po

jednom nukleotidu. I jedan i drugi prajmer se kombinuju sa istim, zajedničkim prajmerom.

Pored ovih prajmera u reakciji su prisutna još dva prajmera. Njihov produkt je kontrolni fragment, a njegovo prisustvo govori o uspešnosti PCR reakcije.

Dužina fragmenata je različita (zavisi od prajmera koji se koriste).

Izvođenje PCR reakcija u dve ependorf epruvete je važno jer omogućava detekciju heterozigotnih nosilaca mutacija.

U finalnu PCR smešu od 25 μ l se stavljaju sledeće komponente:

- DNK 0.5-1 μ g
- 10x pufer (Perkin Elmer)
- MgCl₂ 1.5mM
- dNTPs – svaki po 200 μ M
- prajmeri kontrolne reakcije,
- prajmeri M ili N i zajednički prajmer (koncentracija je karakteristična za svaki ARMS)
- 0,5 mM spermidin / 1mg/ml BSA 2,5 μ l
- AmplyTaq (Perkin Elmer) 1,5U

Uslovi PCR reakcije su sledeći:

- 10 min na 98°C (hot start)
- 2 min na 72°C (međukorak za dodavanje polimeraze),
- 30 sec na 94°C – denaturacija,
- 30 sec na 65°C – "aniling",
- 1 min na 72°C – elongacija.

Reakcija sadrži 25 ciklusa (denaturacija, "aniling" i elongacija) i na kraju se elongacija događa još 10 min na 72°C.

Spisak zajedničkih i kontrolnih prajmera:

- A 5'-CAATGTATCATGCCTCTTTGCACC-3'
(IVS II-590 do IVSII-614)
- B 5'-GAGTCAAGGCTGAGAGATGCAGGA-3'
(poz. 361-338 iza 3' polyA)
- C 5'-ACCTCACCCCTGTGGAGCCAC-3'
- R37 5'-CCAATCTACTCCCAGGAGCA-3'
(-76 do -56)

- R47 5'-CACTCAGTGTGGCAAAGGTG-3'
(kodon 89 – kodon 83)
- R96 5'-TCGGCCCATCACTTTGGCAA-3'
(kodon 114 – kodon 120)
- D 5'-CAACTTCATCCACG TTCACC-3'
- R61 5'-CACTGACCTCCCACATTCCC-3'

Fragment AxB=861 bp se koristi kao kontrolni za analize (*) mutacija

Fragment R37xR47=527 bp se koristi kao kontrolni za analize (**) mutacija

Fragment R96xB=675 bp se koristi kao kontrolni za analize (***) mutacija

Lista ARMS prajmera za detekciju najučestalijih β -talasemijskih mutacija u mediteranskoj populaciji

Mutacija	ARMS prajmeri	sa	Bp
β^+ IVSI-110 (G→A)*	M: 5'-ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACT-3' N: 5'-ACCAGCAGCCTAAGGGTGGGAAAATACACC-3'	C C	390 390
β^0 IVSI-1 (G→A)*	M: 5'-TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACGAAT-3' N: 5'-TTAAACCTGTCTTGTAACCTTGATACGAAC-3'	C C	281 281
β^+ IVSI-6 (T→C)*	M: 5'-TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATG-3' N: 5'-TCTCCTTAAACCTGTCTTGTAACCTTCATA-3'	C C	286 286
β^0 39 (C→T)*	M: 5'-CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACCTGTA-3' N: 5'-CAGATCCCCAAAGGACTCAAAGAACTGTG-3'	C C	436 436
β^0 6 (-A)*	M: 5'-CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCC-3' N: 5'-CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCT-3'	C C	207 208
β^0 IVSII-1 (G→A)*	M: 5'-AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAT-3' N: 5'-AAGAAAACATCAAGGGTCCCATAGACTGAC-3'	C C	634 634
β^+ IVSII-745 (C→G)**	M: 5'-TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGG-3' N: 5'-TCATATTGCTAATAGCAGCTACAATCGAGC-3'	B B	738 738
β^+ -87 (C→G)***	M: 5'-CACTTAGACCTCACCCCTGTGGAGCCACCCG-3' N: 5'-CACTTAGACCTCACCCCTGTGGAGCCACCCC-3'	D D	239 239
β^0 44 (-C)*	M: 5'-CAGCATCAGGAGTGGACAGATCCCGAAAGA-3' N: 5'-CAGCATCAGGAGTGGACAGATTCCGAAAGG-3'	C C	451 451
β^0 76 (-C)*	M: 5'-GGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCAGCT-3' N: 5'-GGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCAGCC-3'	C C	548 548
β^+ -101 (C→T)***	M: 5'-GGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCAGCT-3' N: 5'-GGTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCAGCC-3'	D D	253 253
HbS (A→T)*	M: 5'-CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCT-3' N: 5'-CCCACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTGCA-3'	C C	208 208
β^0 5 (-CT)*	M: 5'-CACAGGGCAGTAACGGCAGACTTCTCCTCG-3'	C	204
β^0 8 (-AA)*	M: 5'-CCTTGCCCCACAGGGCAGTAACGGCACACC-3'	C	214

Koncentracije prajmera za detekciju β -talasemijskih mutacija u mediteranskoj

populaciji metodom ARMS

Mutacija	Prajmer A	Prajmer B		Prajmer C	Prajmer N ili M
β^0_{39}	20 pmol	20 pmol		9 pmol	9 pmol
$\beta^0_{IVSII-1}$	20 pmol	20 pmol		20 pmol	20 pmol
β^0_{IVSI-1}	20 pmol	20 pmol		25 pmol	25 pmol
$\beta^+_{IVSI-110}$	20 pmol	20 pmol		15 pmol	15 pmol
β^0_6	20 pmol	20 pmol		10 pmol	10 pmol
β^+_{IVSI-6}	20 pmol	20 pmol		50 pmol	50 pmol
β^0_{76}	20 pmol	20 pmol		25 pmol	25 pmol
HbS	20 pmol	20 pmol		10 pmol	10 pmol
β^0_8	20 pmol	20 pmol		25 pmol	25 pmol
β^0_{44}	20 pmol	20 pmol		25 pmol	25 pmol
β^0_5	20 pmol	20 pmol		12,5 pmol	12,5 pmol

Mutacija	Prajmer R96	Prajmer B		Prajmer D	Prajmer N ili M
β^+_{-101}	25 pmol	25 pmol		25 pmol	25 pmol
β^+_{-87}	25 pmol	25 pmol		25 pmol	25 pmol
Mutacija	Prajmer R37	Prajmer R47		Prajmer B	Prajmer N ili M
$\beta^+_{IVSII-745}$	30 pmol	30 pmol		25 pmol	25 pmol

Gap PCR za Hb Lepore

(Craing JE et al. 1994.)

Gap PCR je PCR koji omogućava detekciju većih delecija, kao što je ona koja se javlja kod Hb Lepore. PCR analiza se radi sa tri prajmera: A, B i R37. Prajmer B je lociran iza β -globinskog gena. Prajmer A potiče iz δ -globinskog gena. PCR produkt A i B prajmera je dužine 356 bp i on detektuje samo fuzionisani $\delta\beta$ -globinski (Lepore) gen. Prajmer R37 se nalazi u promotoru β -globinskog gena, i to u delu koji je u normalnom hromozomu prisutan, a u slučaju rekombinacije koja je rezultovala fuzionisanim (Lepore) genom ne postoji (deletiran). PCR produkt B i R37 prajmera je dužine 751 bp i on detektuje samo normalni β -globinski gen.

U finalnu smešu od 50 μ l se stavljaju sledeće komponente:

- DNK 0.5-1 μ g
- 10x pufer (Perkin Elmer)
- MgCl₂ 1.5mM
- dNTPs – svaki po 200- 250 μ M
- prajmeri R37 (0,24 μ g), A (0,32 μ g), B (0,4 μ g)
- AmplyTaq (Perkin Elmer) 2U

Uslovi PCR reakcije su sledeći:

- 10 min na 98°C (hot start)
- 2 min na 72°C (međukorak za dodavanje polimeraze),
- 30 sec na 94°C- denaturacija,
- 30 sec na 55°C – "aniling",
- 1 min na 72°C – elongacija.

Reakcija sadrži 30 ciklusa (denaturacija, "aniling" i elongacija) i na kraju se elongacija događa još 10 min na 72°C.

Detekcija najčešćih mutacija u α -globinskim genima metodom PCR-a

(Dode C et al. 1993.; Bowden DK et al. 1992)

U finalnu PCR smešu od 50 μ l se stavljaju sledeće komponente:

- DNK 0.5-1 μ g
- prajmeri 50pmol svaki
- dNTP 400 μ M svaki
- magnezijum hlorid 6,7 mM
- BSA 16 μ g
- amonijum sulfat 16.6mM
- Na₂EDTA 67 μ M
- DMSO 10%
- Tris HCl pH 8.8 67mM
- β merkaptotanol 10mM
- Amply Taq (Perkin Elmer) 1,5 U

Uslovi PCR reakcije su sledeći:

- 98°C 10 minuta (hot start)
- 72°C 2 minuta (međukorak za dodavanje polimeraze)
- 94°C 1 minut-denaturacija
- 60°C 1 minut – "aniling"
- 72°C 1 minut 30 sekundi – elongacija

Reakcija se sastoji od 30 ciklusa (denaturacija, "aniling" i elongacija) i na kraju se elongacija događa još 10 minuta na 72°C.

Uslovi PCR reakcije kao i komponente reakcione smeše su identične za detekciju svih mutacija koje će ovde biti navedene.

Detekcija delecije- α ^{3,7}

Za detekciju ove mutacije u PCR reakciji se koriste sledeći prajmeri u dve odvojene reakcije:

- C10: 5'-GATGCACCCACTGGACTCCT-3'
- C3: 5'-CCATTGTTGGCACATTCCGG-3'
- C2: 5'-CCATGCTGGCACGTTTCTGA-3'

Prajmerima C10 i C3 će biti umnožen α_2 gen što će, u odsustvu delecije dati fragment dužine 1.9 Kb, dok će prajmerima C10 i C2, takođe u odsustvu delecije biti umnožen α_1 gen, što daje fragment dužine 2.1 Kb. U prisustvu gore navedene delecije prajmeri C10 i C2 će dati fragment dužine 1.9 Kb.

Prajmeri C10 i C3 će prepoznati gene generisane u recipročnom, triplikacionom događaju ($\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$), tako što će davati i fragment dužine 2.1 Kb.

Detekcija delecije - $\alpha^{4,2}$

Detekcija ove mutacije se vrši metodom PCR-a u jednoj reakciji u kojoj se koriste sledeći prajmeri:

- 5'-CTATCAGGGACCACAGTCA-3'
- 5'-CAGCTCCAGATGAAGAACGT-3'
- 5'-TTAAGCTAGAGCATTGGTGGTC-3'
- 5'-GGTTTCTACATGTTGATCAGGG-3'

Prajmerima 1 i 2 se dobija kontrolna traka dužine 0.3 Kb a prajmeri 3 i 4 će raditi samo u prisustvu delecije i dati traku dužine 1.3 Kb.

Detekcija delecije --Med

Detekcija ove mutacije se vrši metodom PCR-a u jednoj reakciji u kojoj se koriste sledeći prajmeri:

- 5'-ACAGTCACTCCTGAGGCCAGTC-3'
- 5'-TACAGCAGAGTGAGTGCTGCAT-3'
- 5'-GGAGAAGTAGGTCTTCGTGGC-3'

Prajmeri 2 i 3 će u odsustvu mutacije dati umnoženi fragment dužine 1 Kb, a prajmeri 1 i 3 će raditi samo u prisustvu mutacije i dati fragment dužine 0.6 Kb.

Detekcija delecije - $(\alpha)^{20,5}$

Za detekciju ove mutacije u PCR reakciji se koriste sledeći prajmeri u dve odvojene reakcije:

- 5'-GGCAAGCTGGTGGTGTACACA-3'
- 5'-TGGAGGGTGGAGACGTTCCCTG-3'
- 5'-CCATGCTGGCACGTTTCTGAGG-3'

Prajmerima 2 i 3 se u odsustvu delecije dobija PCR produkt dužine 1.1 Kb, dok će se prajmerima 1 i 3 samo u prisustvu delecije dobiti PCR produkt dužine 1.2 Kb.

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) za β -globinske gene

(Cai SP & Kan YW. 1990.; Ghamen N et al. 1992.)

Čitav β -globinski gen je podeljen na 9 fragmenata koji se nezavisno umnožavaju u PCR reakcijama.

Lista DGGE prajmera za detekciju mutacija u okviru β - globinskog gena

Fragment	Prajmeri	Pozicija
IA	5'-GTACGGCTGTCATCACTTAGACCTCA-3' 5'-(GC)45-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3'	-129→ -104 egzon I: kodon 21→17
IB	5'-(GC)40-CTGTCATCACTTAGACCTCA3' 5'-CAACTTCACCCACGTTCCACC-3'	-123→ -104 egzon I: kodon 21→17
II	5'-(GC)40-CTGTCATCACTTAGACCTCA-3' 5'-AAAATAGACCAATAGGCAG-3'	-123→ -104 IVS I (nt 119→ 101)
IIIA	5'-AAGGAGACCAATAGAAACTG-3' 5'-(GC)45-AGAAAACATCAAGGGTCCCA-3'	IVS I: nt 29→ 48 IVS II: nt 30→ 11
IIIB	5'-(GC)40-CTGCCTATTGGTCTATTTTC-3' 5'-GCCATCACTAAAGGCACCG-3'	IVS I:nt 101→ 120 egzon II: kodon 74→ 68
IIIC	5'-(GC)40-CTGCCTATTGGTCTATTTTC-3' 5'-AGAAAACATCAAGGGTCCCA-3'	IVS I: nt 101→ 120 IVS II: nt 30→ 11
IV	5'-CTGCATATAAATTGTAAGT-3' 5'-(GC)45-TCTGATAGGCAGCCTGCACT-3'	IVS II: nt 684→ 703 egzon III: kodon 132→125
V	5'-GTGTACACATATTGACCAAA-3' 5'-AGCACACAGACCAGCACGTT-3'	IVS II: nt 457→ 476 egzon III: kodon 114→108
VI	5'-CTGGCCCATCACTTTGGCAA-3' 5'-CACTGACCTCCCACATTCCC-3'	egzon III: kodon 114→120 od nt 60 do nt 40 3' od mesta poliadenilacije

GC clamp:

45(GC): 5'-GCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCGCGGCGGGGCGGGGCGGGGG-3'

40(GC): 5'-GCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCGCGGCGGGGCGGGGC-3'

U finalnu PCR smešu od 50 μ l se stavljaju sledeće komponente:

- DNK 0.5-1 μ g
- prajmeri 20pmol svaki
- dNTP 1,5 mM svaki
- magnezijum hlorid 6,7 mM
- BSA 16 μ g
- amonijum sulfat 16.6mM
- Na₂EDTA 67 μ M
- DMSO 10%
- Tris HCl pH 8.8 67mM
- β merkaptotanol 10mM
- (0.5mM spermidin + 1mg/ml BSA) 2.5 μ l
- Amply Taq (Perkin Elmer) 1,5 U

Uslovi PCR reakcije su sledeći:

- 98°C 10 minuta (hot start)
- 72°C 2 minuta (međukorak za dodavanje polimeraze)
- 94°C 15 sekundi – denaturacija
- 52°C 15 sekundi – "aniling"
- 72°C 30 sekundi – elongacija

Reakcija se sastoji od 30 ciklusa (denaturacija, "aniling" i elongacija) i na kraju se elongacija događa jos 10 minuta na 72°C.

PCR produkti se analiziraju na denaturišućim gradijentnim akrilamidnim gelovima. Gelovi su 6% i sadrže linearno povećanje koncentracije denaturišućeg agensa (urea, formamid) (100% denaturišući agens = 7M urea/ 40% formamid (v/v)).

Temperatura tokom elektroforeze je 60 °C. Za fragmente IA,IB, IIIA, IIIB,IIIC gradijent linearno raste od 42% do 72% denaturišućeg agensa; za fragmente

II i IV – od 33% do 63% ; i za fragmente V i VI – od 25% do 55% denaturišućeg agensa. Elektroforeza traje 16 h, a V=70V.

Posle elektroforeze gel se boji etidijum bromidom koncentracije 0,5 µg/mL, 30 minuta, a onda se analizira UV iluminatorom.

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) za γ -globinske gene

(Gottardi E et al. 1992.)

PCR teče u dva koraka. U prvom se umnožavaju neovisno A γ -gen (prajmeri A i D) i G γ -gen (prajmeri B i D). U sekundarnom PCR-u se umnožavaju užii regioni oba fragmenta (prajmeri B + 20 GC repić (clamp, eng.) i C).

Lista DGGE prajmera za detekciju mutacija u γ -globinskom genu

Prajmer	Sekvenca
A za A γ	5'-ACTGTGGCCTTTATGAAAATTGT-3'
A za G γ	5'-ACTGTTGCTTTATAGGAT-3'
B	5'-TCAGACGTTCCAGAAGCGA-3' + 20 GC clamp
C	5'-GACTGAATCGGAACAAGGCAA-3'
D	5'-GGACTAGGAGCTTATTGAT

PCR smeša se sastavlja na identičan način kao kod DGGE reakcija za β -globinske gene.

Uslovi PCR reakcija u prvom koraku su sledeći:

- 98°C 10 minuta (hot start)
- 72°C 2 minuta (međukorak za dodavanje polimeraze)
- 95°C 1 minuti – denaturacija
- 45°C 2 minuta – "aniling"
- 60°C 2 minuta – elongacija

Reakcija se sastoji od 30 ciklusa (denaturacija, "aniling" i elongacija) i na kraju se elongacija događa jos 10 minuta na 72°C.

Uslovi PCR reakcija u drugom koraku su sledeći:

- 98°C 10 minuta (hot start)
- 72°C 2 minuta (međukorak za dodavanje polimeraze)
- 94°C 1 minut – denaturacija
- 60°C 30 sekundi – "aniling"
- 60°C 2 minuta – elongacija

Reakcija se sastoji od 26 ciklusa (denaturacija, "aniling" i elongacija) i na kraju se elongacija događa još 10 minuta na 72°C.

PCR produkti se analiziraju na denaturišućim gradijentnim akrilamidnim gelovima. Gelovi su 6% i sadrže linearno povećanje koncentracije denaturišućeg agensa (urea, formamid) (100% denaturišući agens = 7M urea/ 40% formamid (v/v)).

Temperatura tokom elektroforeze je 60 °C. Za prvu grupu PCR produkata se koristi gradijent 25% – 55%, a za drugu PCR reakciju se pravi gradijent 40-70%.

Elektroforeza traje 16 h, a V=50V, I=30 mA.

Posle elektroforeze gel se boji etidijum bromidom koncentracije 0,5 µg/mL, 30 minuta, a onda se analizira UV iluminatorom.

Sekvenciranje PCR produkta

Sekvenciranje PCR produkta rađeno je kitom Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Kit (Pharmacia Biotech), na automatskom sekvenceru ALFexpress DNA sequencer (Pharmacia Biotech).

Sekvenciranje PCR produkta je sekvenciranje u PCR reakciji (sekundarni PCR). Za prečišćeni PCR produkt (eluiran iz gela) izvode se 4 odvojene reakcije sekvenciranja (za svaku vrstu nukleotida posebno). Reakcije se rade sa samo jednim prajmerom tako da se kao produkt reakcije dobija serija jednolančanih fragmenata (asimetrični PCR). U reakciju se, pored deoksiribonukleotida, stavljaju i dideoksinukleotidi. Dideoksinukleotidi nemaju OH grupu na 3' poziciji, zbog čega .

nemaju sposobnost vezivanja sledećeg nukleotida, pa njihovom ugradnjom dolazi do terminacije polimerizacije. Dideoksinukleotidi su obeleženi bojom Cy5, čime je omogućena detekcija fragmenata u sekvenceru.

Veoma je važno da PCR produkt bude prečišćen, jer broj pročitanih baznih parova zavisi od kvaliteta matrice koja se sekvencira.

Temperatura "anilinga" se mora eksperimentalno odrediti za svaku kombinaciju prajmer/matrica, ali se može proceniti na osnovu baznog sastava prajmera koji se koristi u reakciji sekvenciranja po formuli: $T_m = \frac{\{(G+C) \times 4\} + \{(A+T) \times 2\}}{2}$ (u °C). Količina amplifikovane DNK koja se stavlja u reakciju zavisi od dužine fragmenta: uzima se 0.2-0.5 µg po kilobazi prečišćenog PCR produkta i kombinuje sa 2-5 pmol prajmera.

U cilju dobijanja što tačnijeg rezultata (što preciznijeg čitanja sekvence) neophodno je prečistiti produkte reakcije sekvenciranja (precipitacijom ili kolonicama AutoSeq G-50). Mi smo se odlučili za etanolnu precipitaciju.

Pravljenje poliakrilamidnog gela i elektroforeza

Reakcije sekvenciranja su analizirane na 6% denaturišućem poliakrilamidnom gelu. 60 ml gela se pravi na sedeći način: 7 M ureu (25,2 g) rastvoriti u 44 ml ddH₂O, zatim dodati 12 ml akrilamidnog rastvora (30% rastvor, 19:1 akrilamid:N’N’metilen-bis akrilamid u vodi), 3,6 ml 10 x TBE pufera (0,89 M Tris-Cl, 0,89 M borna kiselina i 0,5 M EDTA pH 8,0). Ovu smešu deaerisati pomoću vakum pumpe. Nakon deaeracije dodati inicijatore polimerizacije: 40 µl TEMED-a i 175 µl 10% amonijum persulfata.

Uslovi elektroforeze su: jačina struje-38 mA, napon-1500 V, snaga-34 W, temperatura-50°C, interval laserskog očitavanja-2 sec, vreme elektroforeze-420 min. Puffer za elektroforezu je 0,6 x TBE.

Obrada podataka

Pošto automatski sekvencer ALFexpres DNA sequencer (Pharmacia Biotech) ima softverski paket 2.10, za obradu podataka je korišćena opcija extended shift. Ova opcija je pogodna za obradu fragmenata sekvenciranih kitom koji smo mi koristili.

Analiza D17S5 polimorfnog lokusa

PCR-om umnoženi D 17 S5 polimorfni lokus (Deka R et al. 1992.), analiziran je na 8% akrilamidnom gelu, a zatim bojen srebrom, radi vizualizacije fragmenata (Zarovni N et al. 1999.)

REZULTATI

Istraživanja opisana u ovom radu sprovedena su, uglavnom na subjektima iz SR Jugoslavije koji su identifikovani kao anemični, i kod kojih terapija preparatima gvožđa nije rezultovala poboljšanjem simptoma (isključena sideropenijska anemija), kao i kod članova njihovih porodica. Deo rezultata se odnosi na pacijente različitog porekla (uglavnom italijanskog), kod kojih je konstatovano prisustvo talasemijskih mutacija, ali je neobična klinička slika zahtevala dodatna istraživanja genetičkog konteksta u kome se našao mutirani gen.

Naša istraživanja molekularne osnove β -talasemijskih sindroma u jugoslovenskoj populaciji su otpočela od sledećih pretpostavki: kako naša zemlja pripada Mediteranskoj regiji, gde su talasemije detaljno okarakterisane na genetskom nivou, izabrali smo "bateriju" proba na mediteranske mutacije, koji su poslužile u

analizama prvih subjekata suspektnih na talasemijske sindrome. U početna istraživanja su uključene i probe na mutacije otkrivene u susednim zemljama, kao i na mutacije karakteristične za populacije sa kojima smo kroz istoriju bili povezani.

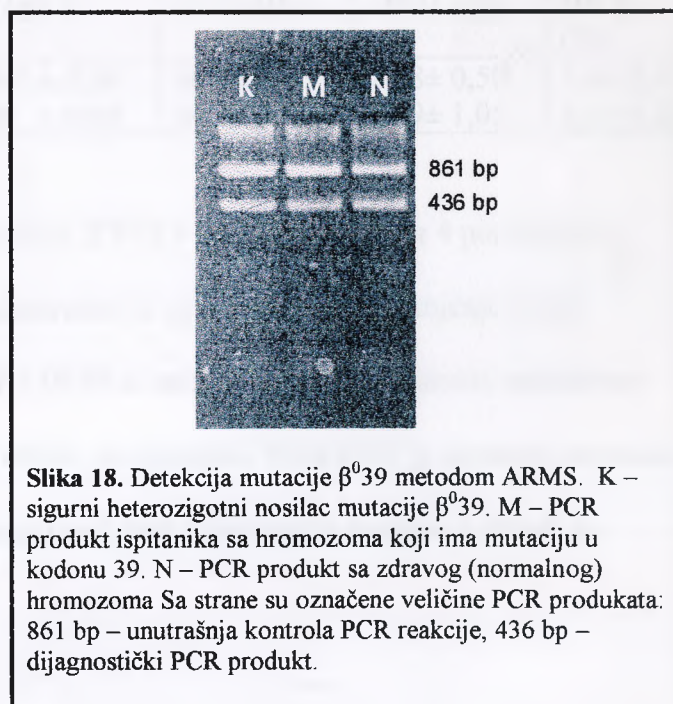
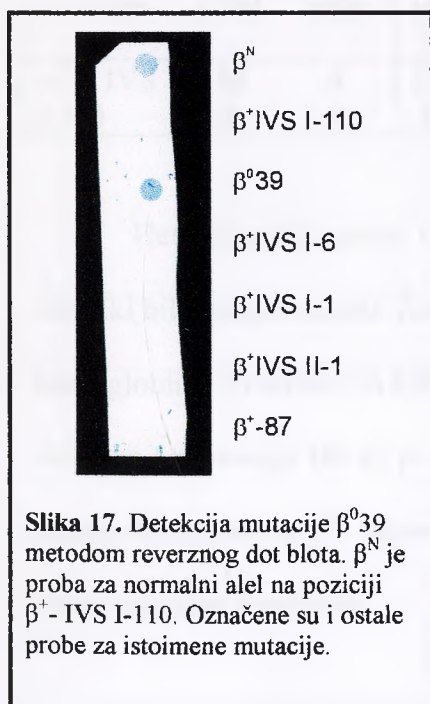
Korelacija genotipa i fenotipa u jugoslovenskoj populaciji

Tipični heterozigoti za β -talasemiju

U istraživanjima naše populacije ovo je bio genotip koji je najčešće dijagnostikovao. Rezultati su prikazani za svaku β -talasemijsku mutaciju pojedinačno. Predstavljani su u tabelama u kojima podaci imaju vrednosti (M (aritmetička sredina) \pm σ (standardna devijacija)).

Genotip +/- β^039

Heterozigoti za mutaciju β^039 (C \rightarrow T) detektovani su metodom reverznog dot blota (RDB) (Slika 17) i alel-specifičnog PCR (ARMS) (Slika 18).



Genotip	Pol	Broj	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	Hb A ₂ (%)
+/ β^0 39	M	5	109 ± 1,50	67,4 ± 3,90	22,6 ± 0,98	5,0 ± 0,25
	Ž	5	91 ± 0,73	67 ± 0,33	22,1 ± 0,33	4,6 ± 0,50

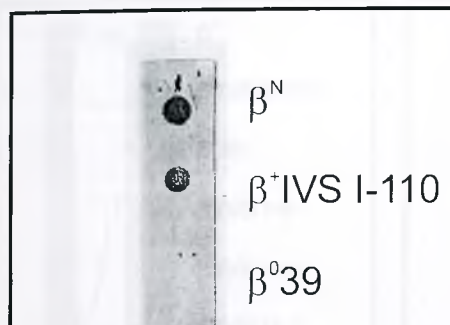
Svi analizirani subjekti (10, iz 5 različitih porodica) su imali izraženu anemiju. Ostali klinički simptomi anemije uzrokovane talasemijskim mutacijama su bili slabo izraženi. Treba ipak naglasiti da su pojedini članovi ovih porodica bili zavisni od transfuzija u specifičnim traumatskim situacijama (kasna trudnoća, saobraćajna nesreća). Za mutaciju ovoga tipa (β^0) mikrocitoza i hipohromija su neobično slabo izražene. Povećanje sadržaja Hb A₂ je markatno, što je u skladu sa očekivanjima. Svi nosioci su imali povišeni nivo Hb F (2,9% – 3,2 %).

Genotip +/ β^+ IVS I-110

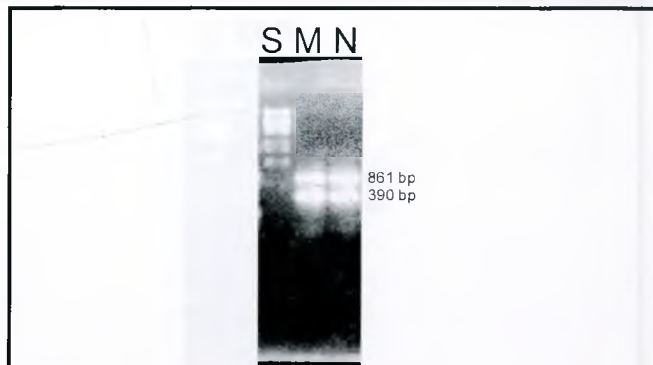
Heterozigoti za mutaciju β^+ IVS I-110 (G→A) detektovani su metodom reverznog dot blota (RDB) (Slika 19) i alel-specifičnog PCR (ARMS) (Slika 20).

Genotip	Pol	Broj	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	Hb A ₂ (%)
+/ β^+ IVS I-110	M	4	128,5 ± 0,50	66,1 ± 1,66	20,8 ± 0,50	4,3 ± 0,15
	Ž	4	126 ± 0,90	64,1 ± 3,35	20,9 ± 1,05	4,2 ± 0,20

Heterozigotni nosioci mutacije β^+ IVS I-110 (ukupno 8, iz 4 porodice) su klinički bili asimptomatski. Konstatovano je relativno blago smanjenje nivoa hemoglobina. Vrednosti za MCV i MCH su snižene, ali u očekivanom, umerenom stepenu. I povećanje Hb A₂ je uočljivo, ali umereno. Nivo Hb F je neznatno povećan. Molekularna osnova (β^+ -talasemija) kod ovih subjekata je potpuno u skladu sa eksprimiranim fenotipom.



Slika 19. Detekcija mutacije β^+ IVS I-110 metodom reverznog dot blota. β^N je proba za normalni alel na poziciji β^+ -IVS I-110. Označene su i ostale probe za istoimene mutacije.



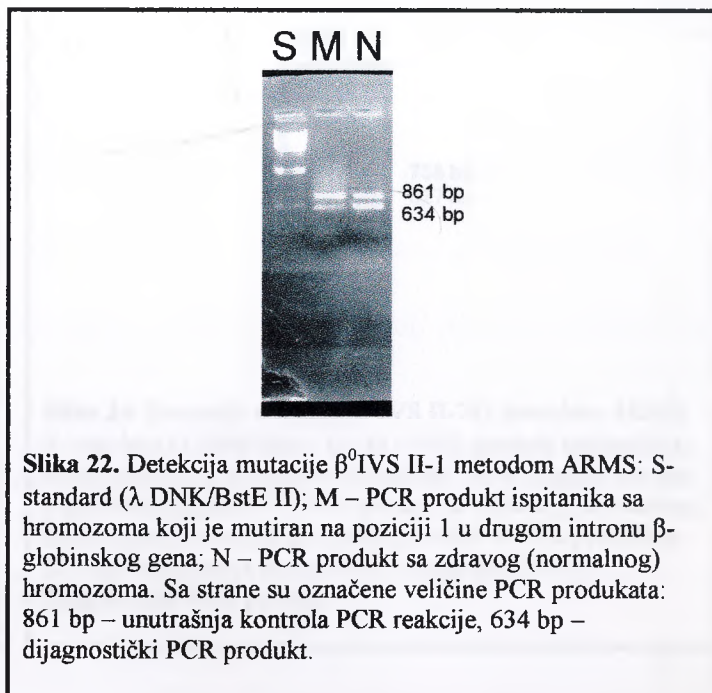
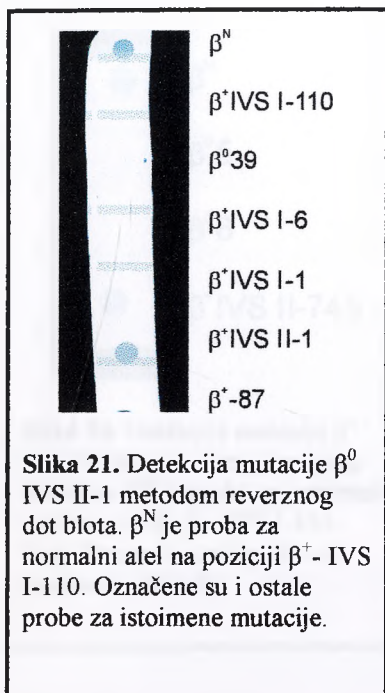
Slika 20. Detekcija mutacije β^+ IVS I-110 metodom ARMS. S- standard (λ DNK/BstE II); M – PCR produkt ispitanika sa hromozoma koji je mutiran na poziciji 110 u prvom intronu β -globinskog gena; N – PCR produkt sa zdravog (normalnog) hromozoma. Sa strane su označene veličine PCR produkata: 861 bp – unutrašnja kontrola PCR reakcije, 390 bp – dijagnostički PCR produkt.

Genotip +/- β^0 IVS II-1

Mutacija u donorskom mestu za "splajsing", β^0 IVS II -1(G→A), detektovana je kod jedne porodice. Slike 21 i 22 potvrđuju da se radi o heterozigotnim nosiocima ove mutacije.

Genotip	Pol	Broj	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	Hb A ₂ (%)
+/ β^0 IVSII-1	D	1	98	58,8	19,2	4,1
	Ž	1	107	57,6	17,9	5.0

Pored anemije, ikterus i bilirubinemija (posledica hemolize) su bili posebno izraženi. Svi hematološki parametri pokazuju značajna odstupanja od normale, što je potpuno očekivano kod mutacije ovog tipa (β^0). Nivo Hb A₂ je značajno povišen. I sadržaj Hb F je veći od normalnog, kod deteta naročito (6,1 %).

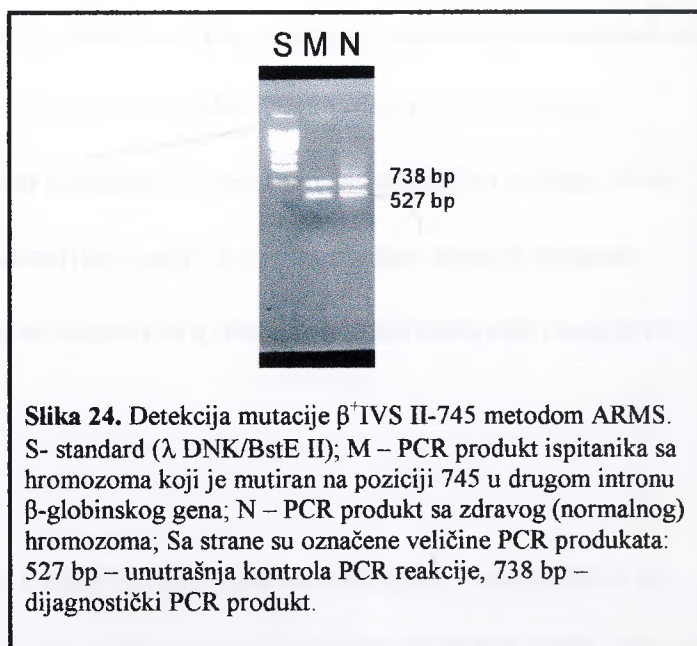
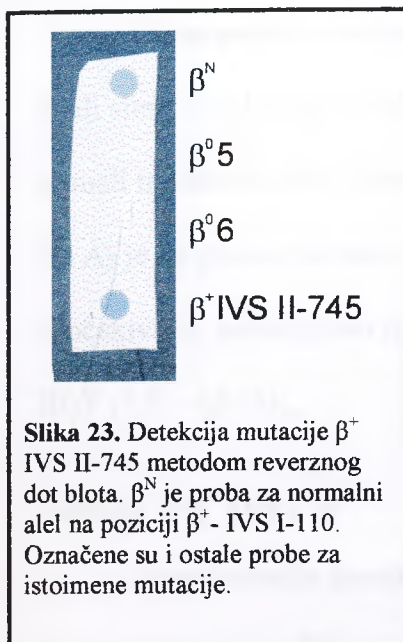


Genotip +/- β^+ IVS II-745

Heterozigotni nosioci mutacije koja kreira novo, alternativno donorsko mesto za "splajsing" na poziciji 745 u drugom intronu β -globinskog gena (C→G), detektovani su metodom reverznog dot blota (RDB) (Slika 23) i alel-specifičnog PCR (ARMS) (Slika 24).

Genotip	Pol	Broj	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	Hb A ₂ (%)
+/- β^+ IVSII-745	M	3	102 ± 4,00	62,5 ± 0,50	19,5 ± 0,13	4,7 ± 0,26
	Ž	3	98,5 ± 1,50	63,6 ± 1,70	19,9 ± 0,60	4,0 ± 1,50

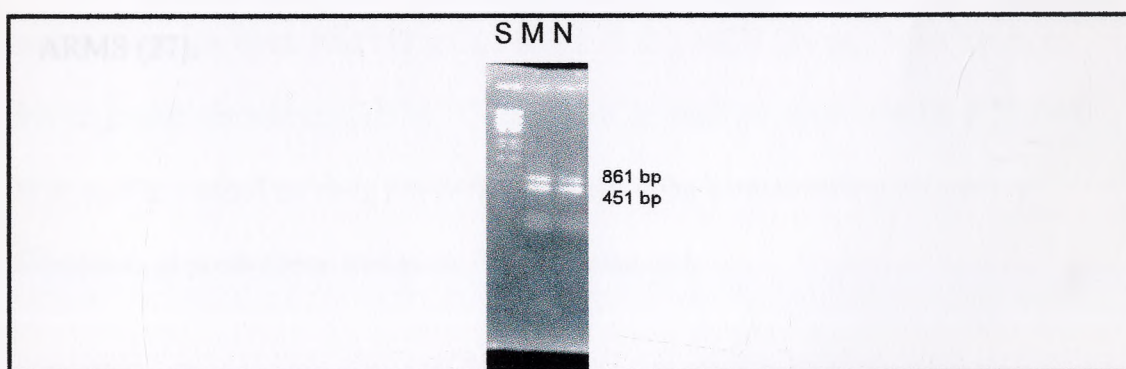
Nosioci ovih mutacija (6, u 2 različite porodice) otkriveni su uglavnom u rutinskom skriningu nivoa Hb kod dece, pri čemu terapija gvožđem nije imala efekta. Ipak, jedan nosilac je u specifičnim radnim uslovima ispoljio neuobičajene tegobe, koje su podsećale na talasemiju intermediju. Hematološki parametri uočeni kod ovog tipa mutacije (β^+) su neobično "talasemični" (Hb, MCV i MCH izrazito sniženi, Hb A₂ povišen). I vrednosti HbF su povišene (1,6% - 2,5%).



Atipični heterozigoti za β -talasemiju

Genotip $+/\beta^0 44$

Neobična mutacija za Mediteransko područje, $\beta^0 44$ (-1 bp, -C), u skriningu naše populacije je detektovana metodom alel-specifičnog PCR (ARMS) (Slika 25).



Slika 25. Detekcija mutacije $\beta^0 44$ metodom ARMS. S- standard (λ DNK/BstE II); M – PCR produkt ispitanika sa hromozoma koji ima mutaciju u kodonu 44 β -globinskog gena; – PCR produkt sa zdravog (normalnog) hromozoma. Sa strane su označene veličine PCR produkata: 861 bp – unutrašnja kontrola PCR reakcije, 451 bp – dijagnostički PCR produkt.

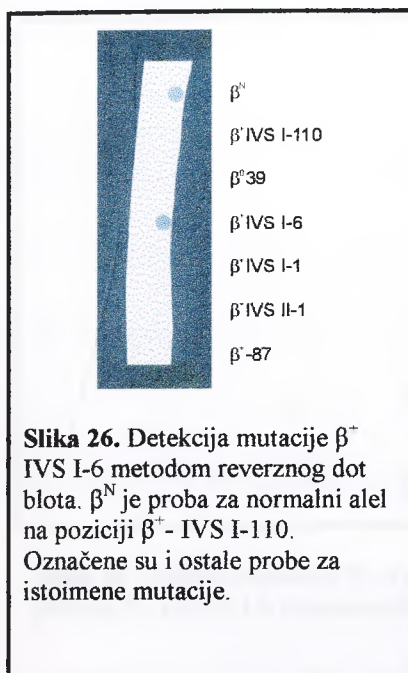
Genotip	Pol	Broj	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)	Hb A ₂ (%)
$+/\beta^0 44$	M	2	86 ± 1,00	60,6± 0,40	17,1± 0,10	3,5± 0,10
	Ž	2	86 ± 2,00	59,7± 0,70	16,8± 0,15	3,4± 0,05

U obe porodice kod kojih je otkrivena ova mutacija, heterozigotni nosioci su imali simptome blažeg oblika talasemije intermedije. Pojedinci su povremeno primali transfuzije. Svi relevantni hematološki parametri su drastično sniženi. Nivo Hb A₂ je na granici normale (borderline, eng) , što je za ovakav genotip potpuno neočekivano. Interesantno je da su nosioci ovih mutacija imali relativno visok nivo Hb F (3,8 – 4,6 %).

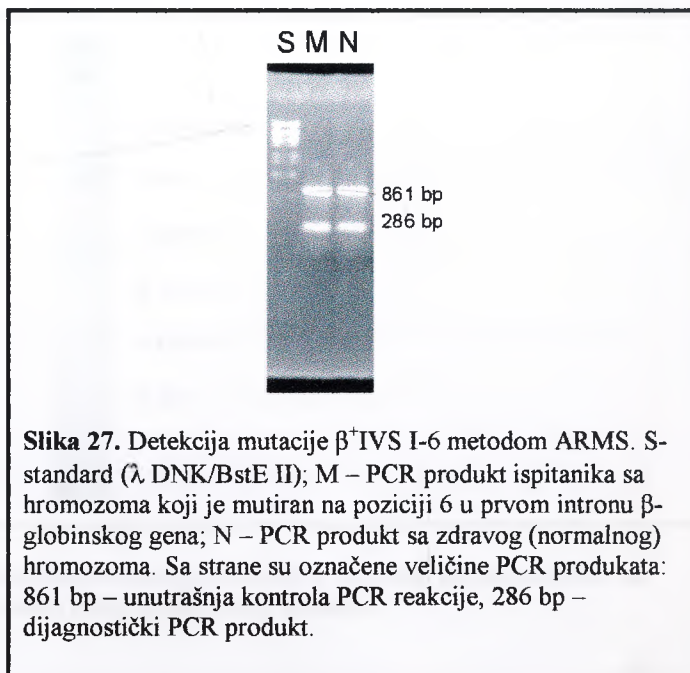
Genotip +/ β⁺ IVS I -6

Jugoslovenska porodica u kojoj je otkrivena ova mutacija imala je člana sa talasemijom major. Članovi porodice koji su nosioci mutacije β⁺ IVS I -6 (T→C), su klinički asimptomski. Ipak, na hematološkom nivou, detektovano je sniženje nivoa Hb (100 g/L), MCV (69 fL) i MCH (21 pg). I nivo Hb A₂ bio povišen (4,0%). Za ovaj tip mutacije, koji po pravilu daje izuzetno blagi fenotip, svi hematološki parametri mnogo odstupaju od normalnih vrednosti. Vrednosti HbF su normalne.

Mutacije su detektovane metodama reverznog dot blota (slika 26) i metodom ARMS (27).



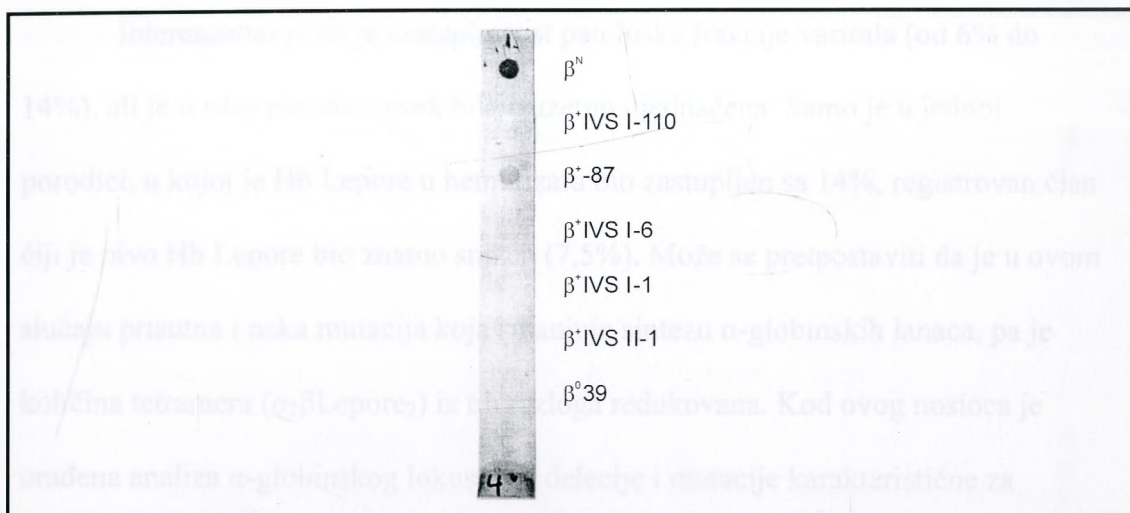
Slika 26. Detekcija mutacije β^+ IVS I-6 metodom reverznog dot blota. β^N je proba za normalni alel na poziciji β^+ - IVS I-110. Označene su i ostale probe za istoimene mutacije.



Slika 27. Detekcija mutacije β^+ IVS I-6 metodom ARMS. S - standard (λ DNK/BstE II); M - PCR produkt ispitanika sa hromozoma koji je mutiran na poziciji 6 u prvom intronu β -globinskog gena; N - PCR produkt sa zdravog (normalnog) hromozoma. Sa strane su označene veličine PCR produkata: 861 bp - unutrašnja kontrola PCR reakcije, 286 bp - dijagnostički PCR produkt.

Genotip +/ β^+ -87

Promotorska mutacija β^+ -87 (C→G) detektovana je u jednoj jugoslovenskoj porodici. Svi članovi porodice koji su nosioci mutacije su potpuno klinički bez obeležja. Hematološki parametri su veoma visoki, posebno ako se ima u vidu da su nosioci mutacije deca: Hb (115 g/L), MCV (70 fL), MCH (24 pg). Nivo Hb A₂ je bio na granici normalnog (3,5 %). Ovi subjekti su imali povišeni nivo Hb F (2,5%), te je analiza i započeta zbog povišene vrednosti ovog hematološkog parametra. Dijagnoza je postavljena metodom RDB-a (slika 28).



Slika 28. Detekcija mutacije $\beta^+ -87$ metodom reverznog dot blota. β^N je proba za normalni alel na poziciji $\beta^+ - IVS I-110$. Označene su i ostale probe za istoimene mutacije.

Talasemijska hemoglobinska varijanta – Hb Lepore

Heterozigotni nosioci fuzione ($\delta\beta$) hemoglobinske varijante Hb Lepore u jugoslovenskoj populaciji imaju karakteristike slične tipičnim heterozigotima za β -talasemiju.

Genotip	Pol	Broj	Hb (g/L)	MCV (fL)	MCH (pg)
+/ Hb Lepore	M	7	120 ± 10,02	67,5± 3,55	21,5± 1,57
	Ž	7	108 ± 6,33	67,0± 1,55	21,9± 1,25

Nivo Hb A₂ je kod svih nosilaca (14, iz 6 različitih porodica), bio ili u granicama normalnog ili snižen (čak do 0,55%). Nivo Hb F je kod svih bio blago povišen (1,6% – 2,4%). Iako većina nosilaca nije imala razvijene simptome hemolitičke anemije, pojedini su upućeni kao pacijenti koji pate od tahikardije i dispneje nepoznate etiologije.

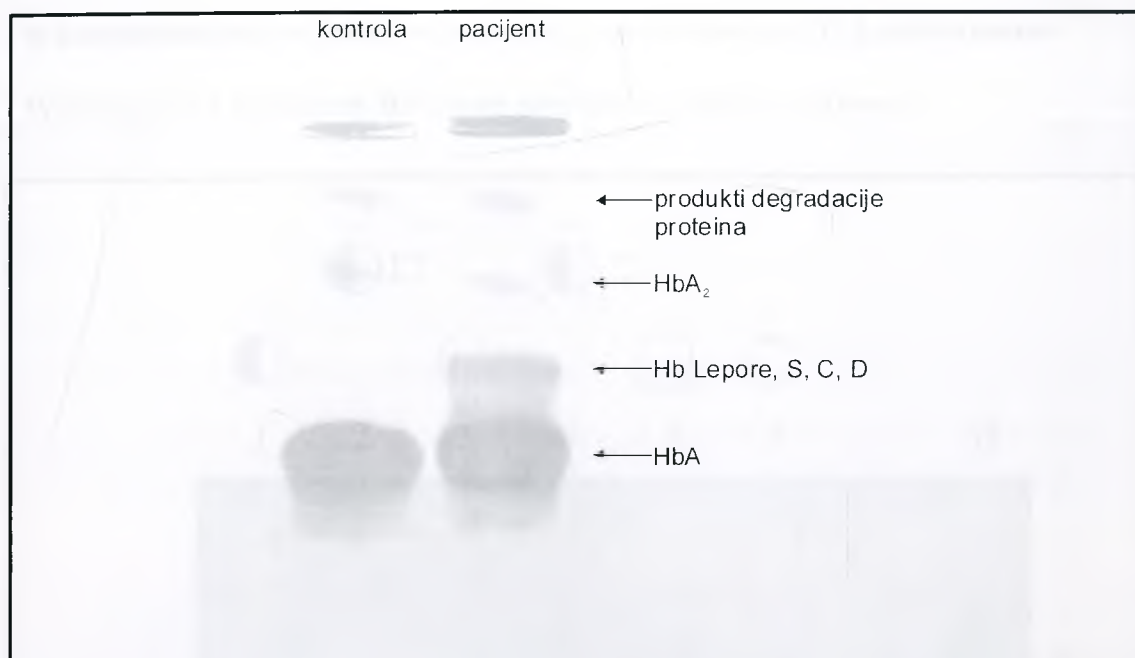
Naš zaključak je da je Hb Lepore u jugoslovenskoj populaciji " β^+ - talasemični" alel i da su njegove manifestacije na svim nivoima slične onima koje produkuje, na primer, alel $\beta^+ IVS I-110$ u heterozigotnom stanju.

Interesantno je da je zastupljenost patološke frakcije varirala (od 6% do 14%), ali je u istoj porodici uvek bila izuzetno ujednačena. Samo je u jednoj porodici, u kojoj je Hb Lepore u hemolizatu bio zastupljen sa 14%, registrovan član čiji je nivo Hb Lepore bio znatno snižen (7,5%). Može se pretpostaviti da je u ovom slučaju prisutna i neka mutacija koja smanjuje sintezu α -globinskih lanaca, pa je količina tetramera ($\alpha_2\beta\text{Lepore}_2$) iz tih razloga redukovana. Kod ovog nosioca je urađena analiza α -globinskog lokusa na delecije i mutacije karakteristične za Mediteransko područje ($\alpha^{3,7}$, $\alpha^{4,2}$, α^{NcoI} , α^{HphI} , α^{Med} , $(\alpha)^{20,5}$). Nosilac je bio negativan za sve ove mutacije (rezultati nisu prikazani), iako dobijeni rezultati ne isključuju našu hipotezu.

Dvostruki heterozigoti za Hb Lepore i bilo koju drugu talasemijsku mutaciju, u našoj populaciji, davali su sliku talasemije major.

Svi identifikovani hromozomi bili su tipa Hb Lepore- Boston –Washington.

Eksperimentalni put karakterizacije ove mutacije sastoji se iz više koraka : elektroforeze Hb na gelu od acetatne celuloze, gap PCR analize i analize sekvence u regionu $\delta\beta$ rekombinacije.



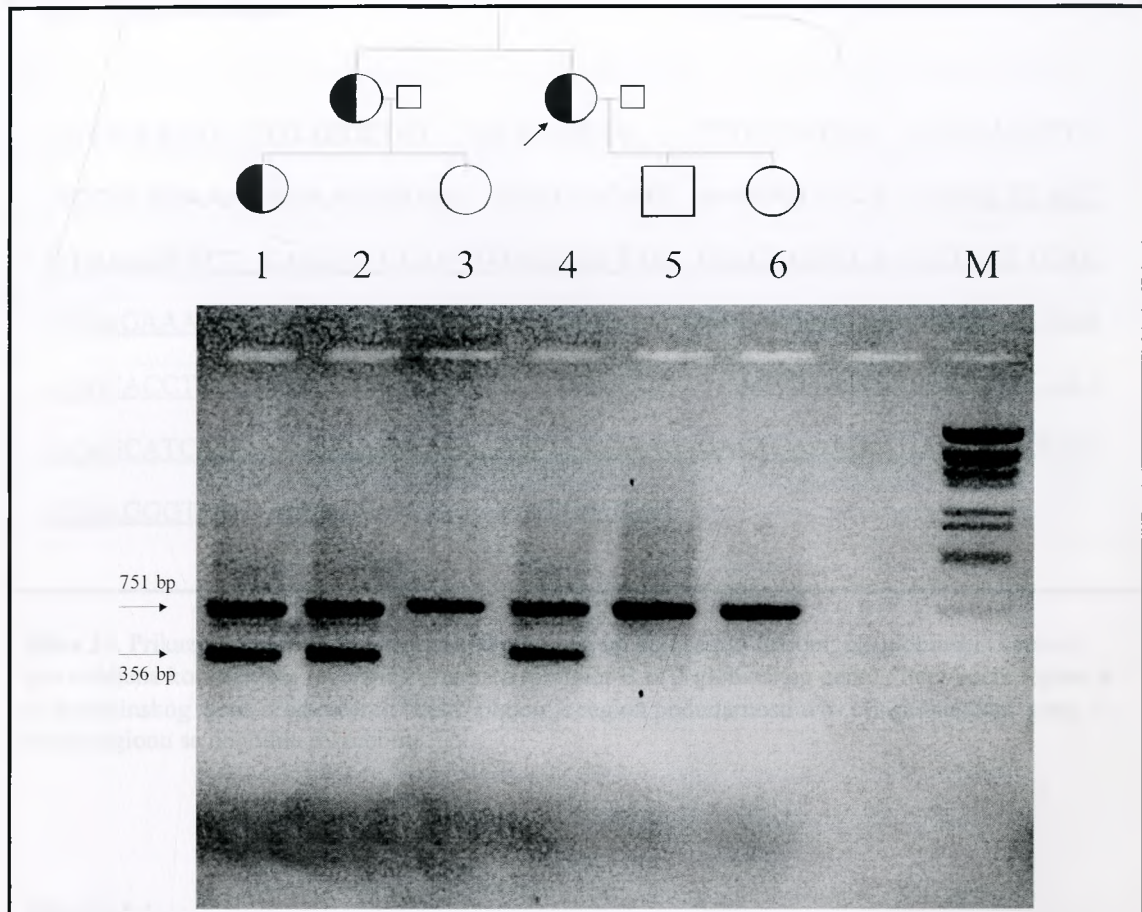
Slika 29. Elektroforeza na gelu od acetatne celuloze. Prikazani su hemoglobini iz hemolizata kontrolne, zdrave osobe, kao i hemoglobini analizirane pacijentkinje (proposita). Pored hemoglobinskih frakcija koje čine normalni hemoglobinski patern (HbA i HbA₂), kod pacijentkinje je prisutna i dodatna hemoglobinska frakcija, koja po elektroforetskoj pokretljivosti odgovara (između ostalih) i hemoglobinskoj varijanti Lepore.

Elektroforeza hemoglobina na gelu od acetatne celuloze kod zdravih adultnih osoba identifikuje dve najzastupljenije frakcije: Hb A ($\alpha_2 \beta_2$) i Hb A₂ ($\alpha_2 \delta_2$).

Identifikacija hemoglobinskih varijanti se ostvaruje upoređivanjem elektroforetske pokretljivosti različitih frakcija u odnosu na HbA. Ako se elektroforeza izvodi u standardnim uslovima, na poziciju 8 mm od HbA, migriraju četiri različite hemoglobinske varijante (HbS, HbD, HbC i Hb Lepore) (slika 29). Kako su HbS i Hb C karakteristični za tropsku Afriku i crnu populaciju, HbD za južnu Aziju, a Hb Lepore za mediteransko područje, provera na DNK nivou se prvo radi za Hb Lepore.

DNK potencijalnih heterozigotnih nosilaca se analizira gapPCR-om za hemoglobinsku varijantu Hb Lepore-Boston-Washington, ali korišćenjem datog seta prajmera moguće je detektovati i Hb Lepore-Baltimore (slika 30). Prisustvo Hb Lepore-Hollandia je isključeno jer kod ove varijante delecija zahvata sekvencu koja

je komplementarna sa jednim od prajmera, a za razlikovanje Hb Lepore-Boston-Washington od Hb Lepore-Baltimore neophodna je analiza sekvence.



Slika 30. PCR analiza propositusa (obeležen strelicom) i članova njegove porodice. Krugom su obeležene žene, kvadratom muškarci. Heterozigotni nosioci su obeleženi simbolima zatamnjениh polovina. U koloni M je DNK marker (DNK lambda faga digerirana enzimom BstE II- fragmenti su dužina od 702bp do 8454bp). Do markera je kontrola PCR reakcije. Duži PCR produkt (751 bp) detektuje samo normalni β -globinski gen. Kraći PCR produkt (351bp) detektuje samo fuzionisani $\delta\beta$ -globinski (Lepore) gen. Prisustvo oba fragmenta označava heterozigotnog nosioca Hb Lepore-Boston Washington (Pavlović S et al. 2001.)

Analizom sekvence oba lanca pokazano je da je kod svih nosilaca prisutna forma Hb Lepore-Boston-Washington (slika 31). Tačno mesto na kojem prestaje δ -globinski gen a počinje β -globinski gen nije moguće utvrditi jer se u oba gena nalazi 58 zajedničkih baznih parova u regionu koji učestvuje u cross-over-u (u oba gena ovaj fragment zauzima kraj drugog egzona i početak drugog introna).

C File: N14r#02
CC Analysed by: Tanja
CC Method: extended
CC Date: 7.03.2001.
CC Clone 14 reverse

```
CATTCTAAAC TGTACCCTGT TACTTATCCC CTTCCTATGA CATGAACTTA  
ACCATAGAAA AGAAGGGGAA AGAAAACATC AAGGGTCCCA TAGACTCACC  
CTGAAGTTCT CAGGATCCAC GTGCAGCTTG TCACAGTGCA GCTCACTCAG  
CTGAGAAAAA GTGCCCTTGA GGTTGTCCAG GTGAGCCAGG CCATCACTAA  
AGGCACCTAG CACCTTCTTG CCATGAGCCT TCACCTTAGG GTTGCCCATA  
ACAGCATCAG GAGAGGACAG ATCCCCAAAG GACTCAAAGA ACCTCTGGGT  
CCAAGGGTAG ACCACCAGTA ATCTGAGGGT
```

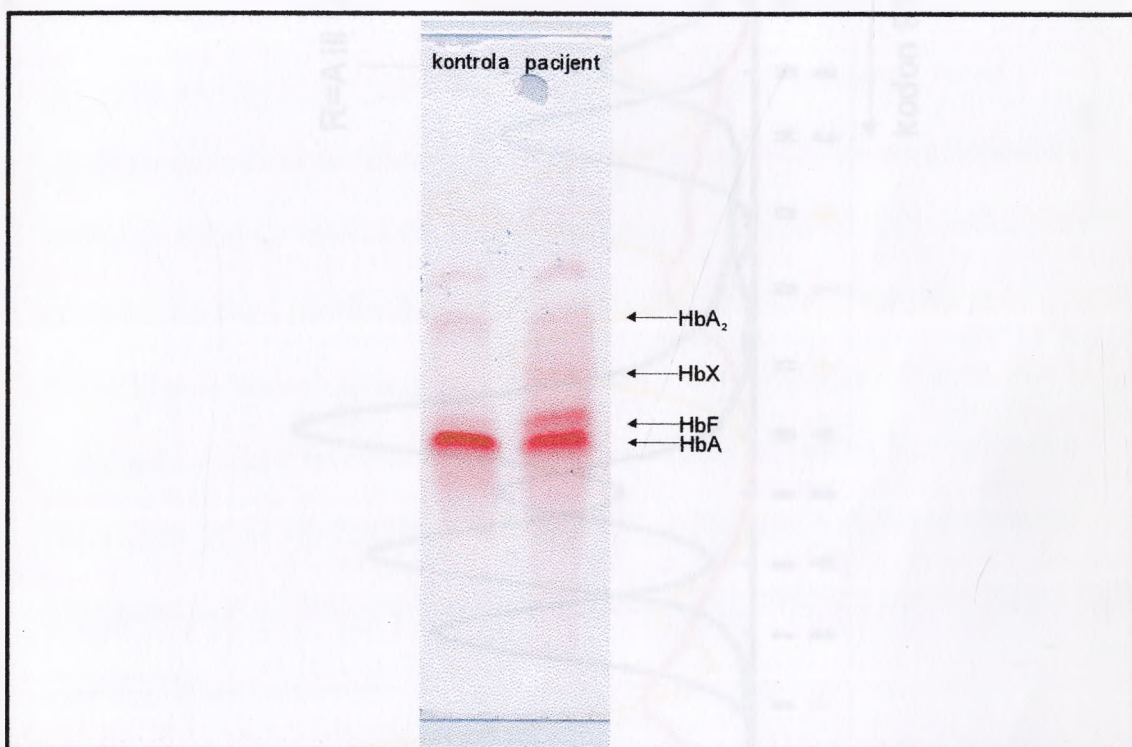
Slika 31. Prikaz sekvence PCR fragmenta dugog 356 bp koji sadrži fuzioni $\delta\beta$ -globinski (Lepore) gen dobijena korišćenjem reverznog prajmera (prajmer B iz β -globinskog gena). Podvučeni region je iz δ -globinskog gena. Podvučeni i "bold" region je region podudarnosti u δ - i β -globinskom genu. U ovom regionu se dogodila rekombinacija.

Hb Sabine

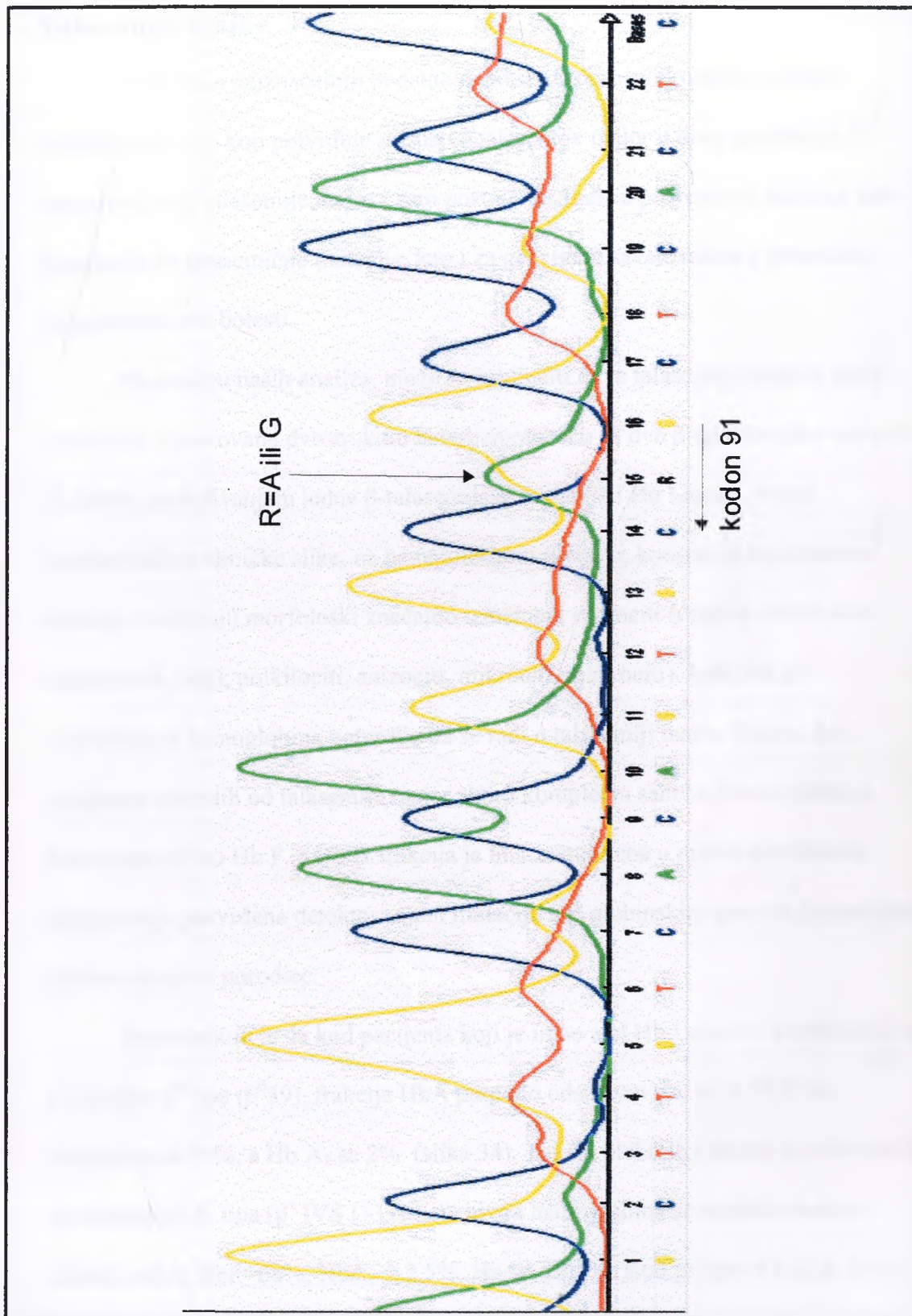
Hb Sabine ($\alpha 2\beta 91\text{Leu}\rightarrow\text{Pro}$) je nestabilna hemoglobinska varijanta β -polipeptidnog lanca, detektovana kod dečaka jugoslovenskog porekla starog 3 godine, kod koga su uočeni znaci blage hemolitičke anemije. Hematološki parametri su sledeći: Er: $3,95 \times 10^{12}/\text{L}$; Hb: 99 g/L; MCV: 80 fL; MCH: 25 pg; HB F: 16,5%. U testu nestabilnosti Hb, testu toplotne denaturacije, u drugom satu se uočavalo zamućenje s talogom, a u trećem talog sa flokulama, što je bila indikacija da je u hemolizatu prisutna nestabilna Hb varijanta.

Elektroforetska analiza na gelu od celuloznog acetata je otkrila HbA, HbA₂, HbF i varijantu čija je elektroforetska pokretljivost bila između HbA i HbA₂ (slika

32). Analiza sekvence DNK 634 bp dugog fragmenta β -globinskog gena, umnoženog u PCR-u prajmerima karakterističnim za drugi egzon (prajmeri iz ARMS analiza: N za mutaciju IVS II-1 x C, vidi: Materijal i metode), i sekvenciranog u oba smera prajmerima R37 i N za mutaciju IVS II-1 (vidi: Materijal i metode), pokazala je da je došlo da zamene jedne jedine baze (T \rightarrow C) u kodonu 91 (CTG \rightarrow CCG), čime je Leu zamenjen u Pro (Slika 33). Za oca je utvrđeno da je nosilac iste patološke varijante.



Slika 32. Elektroforeza na gelu od acetatne celuloze. Prikazani su hemoglobini iz hemolizata kontrolne osobe, kao i hemoglobini analiziranog pacijenta (propositus). Pored hemoglobinskih frakcija koje čine normalni hemoglobinski patern (HbA i HbA₂), kod pacijenta je prisutna i dodatna hemoglobinska frakcija, Hb X. Vrlo je izražena i frakcija HbF.



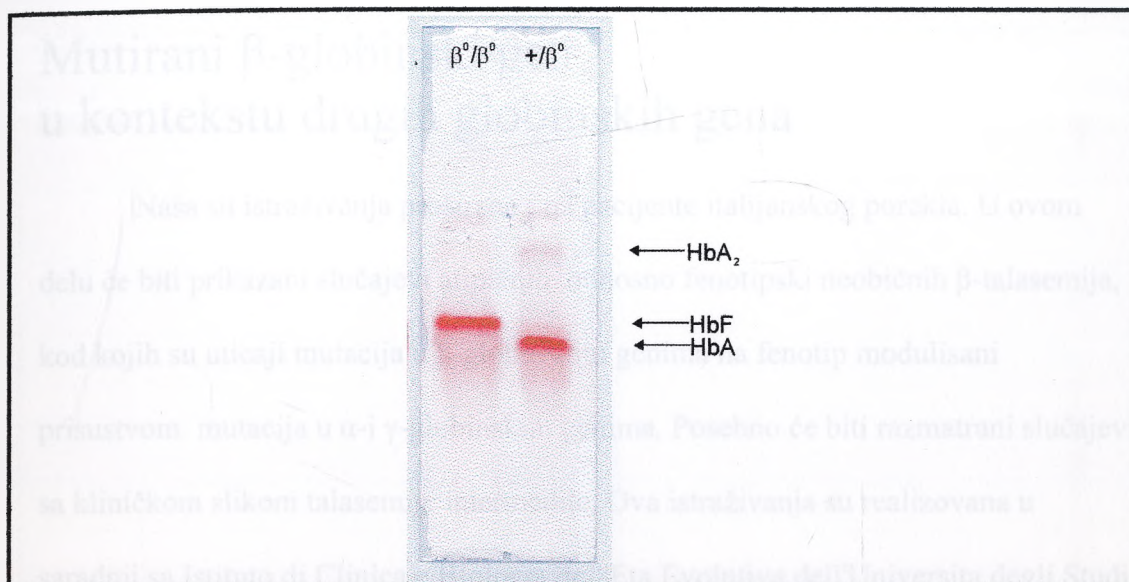
Slika 33. Grafički zapis dela sekvence PCR fragmenta dugog 634 bp koji sadrži baznu substitucije u kodonu 91 (CTG→CCG, odnosno GAC→GGC) – Hb Sabine. Korišćen je reverzni prajmer (N za mutaciju IVS II-1). Prikazan je kodon 91 (GRC, gde R označava A ili G nukleotid). Ovo ilustruje heterozigotnost pacijenta u kodonu 91, i to heterozigotnost za Hb Sabine.

Talasemija major

Verovatno najznačajniji podatak o talasemijskim sindromima u jednoj populaciji je onaj koji potvrđuje prisustvo talasemije major u datoj populaciji. U Jugoslaviji ima talasemije major i zato postoje razlozi za preventivni skrining naše populacije na talasemične mutacije, kao i za genetičko savetovalište i prenatalnu dijagnostiku ove bolesti.

Na osnovu naših analiza, može se zaključiti da je talasemija major u našoj populaciji uzrokovana dvostrukom heterozigotnošću za dve β -talasemijske mutacije, ili, češće, nasleđivanjem jedne β -talasemijske mutacije i Hb Lepore. Pored karakteristične kliničke slike, na hematološkom nivou se konstatuje hipohromna anemija i uočavaju morfološki značajno izmenjeni eritrociti (ćelije u obliku mete (target cells, eng), poikilociti, anizociti, mikroцити, makrociti). Ipak, tek je elektroforeza hemoglobina potvrdila da se radi o talasemiji major. Naime, kod pacijenata obolelih od talasemije major skoro kompletan sadržaj hemoglobina u hemolizatu je bio Hb F, a Hb A frakcija je bila zastupljena u malim količinama. Dijagnoza je potvrđena detektovanjem mutacija u β -globinskim genima propozitusa i članova njegove porodice.

Interesantno je da kod pacijenta koji je imao alel Hb Lepore u kombinaciji sa mutacijom β^0 tipa ($\beta^0 39$), frakcija HbA potpuno odsustvovala, te je Hb F bio zastupljen sa 98%, a Hb A₂ sa 2%. (slika 34). Taj isti alel (Hb Lepore) u kombinaciji sa mutacijom β^+ tipa (β^+ IVS I -110), na nivou hemoglobina se reperkutovao na sledeći način: HbF=68%, HbA₂ = 2,5%, HbA= 29,5%. Kod pacijenta koji je imao udružene dve mutacije β^+ tipa (β^+ IVS I-110 i β IVS I-6), zastupljenost hemoglobina je bila gotovo identična prethodnom slučaju.



Slika 34. Elektroforeza na gelu od acetatne celuloze. Prikazani su hemoglobini iz hemolizata osobe koji je heterozigotni nosilac β^0 -talasemijske mutacije ($+/\beta^0$), kao i hemoglobini pacijenta obolelog od talasemije major (β^0/β^0). Od hemoglobinskih frakcija koje čine hemoglobinski patern kod β -talasemije minor tipa (HbA, HbF i HbA₂), kod pacijenta je prisutna isključivo frakcija HbF.

Zanimljivo je da je klinička slika svih opisanih pacijenata bila veoma teška.

Način njihovog lečenja nije bio isti, pa se, u ovom slučaju, ne može diskutovati uticaj genotipa na fenotip.

Hb Lepore se u našoj populaciji ponaša kao "težak" alel β^+ tipa, jer u kombinaciji sa β -talasemičnim alelom bilo kog tipa (β^0 ili β^+) daje sliku talasemije major. Mutacija β^+ IVS I-6 je u našoj populaciji neobično "teška". Udružena sa drugom mutacijom β^+ tipa, ona daje kliničku sliku talasemije major. Ovo treba imati na umu pri davanju genetičkog saveta porodicama u kojima su otkriveni nosioci ovih mutacija.

Mutirani β -globinski gen u kontekstu drugih globinskih gena

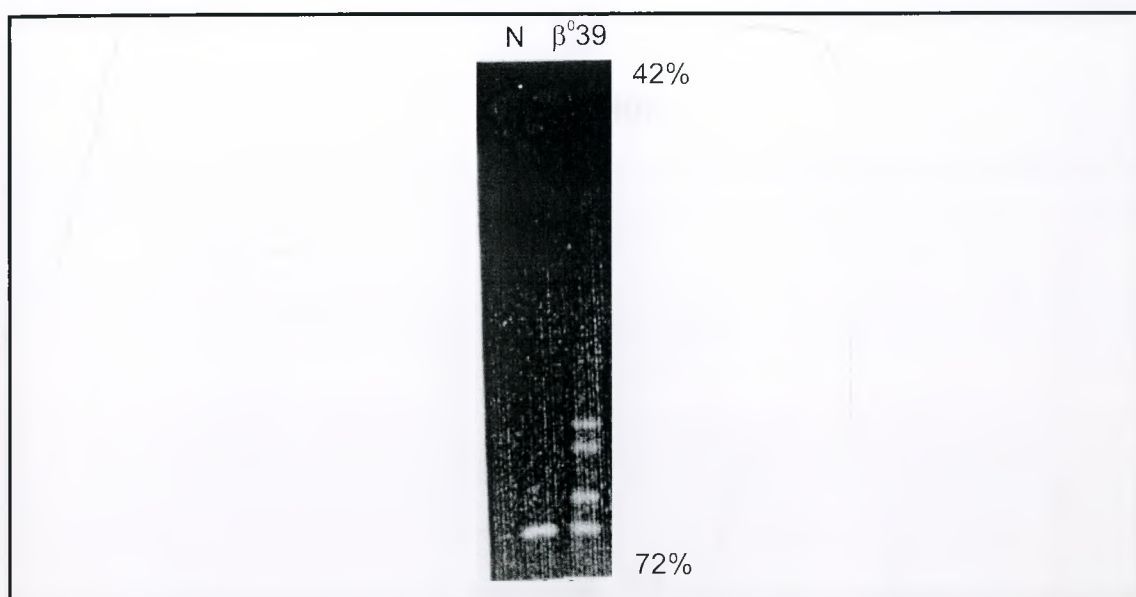
Naša su istraživanja proširena i na pacijente italijanskog porekla. U ovom delu će biti prikazani slučajevi atipičnih, odnosno fenotipski neobičnih β -talasemija, kod kojih su uticaji mutacija u β -globinskim genima na fenotip modulirani prisustvom mutacija u α -i γ -globinskim genima. Posebno će biti razmatrani slučajevi sa kliničkom slikom talasemije intermedije. Ova istraživanja su realizovana u saradnji sa Istituto di Clinica e Biologia dell'Eta Evolutiva dell'Universita degli Studi, u Kaljariju, na Sardiniji.

Atipični heterozigotni nosilac mutacije za β -talasemiju

Prikaz slučaja: Pacijentkinja stara 20 godina, anemična, gravidna, javila se u genetičko savetovalište zbog eventualne prenatalne dijagnoze. Hematološki parametri su bili sledeći: RBC: $3,57 \times 10^{12}$; Hb: 90,5 g/L; MCV: 79 fL; MCH: 26 pg; RDW: 29,5%. Kvantifikacija hemoglobinskih frakcija, izvršena HPLC-om, dala je sledeće rezultate: HbA 78,50%, HbA₂ 4,80%, HbF 16,70%. *In vitro* sinteza globinskih polipeptida upućuje na β -talasemiju ($\alpha/\beta=2,04$).

Genotip: DGGE analiza β -globinskog gena (slika 35), otkrila je prisustvo mutacije u heterozigotnom stanju, koja je sekvenciranjem tog fragmenta identifikovana kao mutacija β^0 39. Neobjašnjivo visok nivo parametara MCV i MCH za ovu mutaciju, kao i ekstremno velika zastupljenost HbF, zahtevala je dodatne analize i to u genu za γ -globine. I zaista, DGGE analiza γ -globinskog gena pokazala je postojanje mutacije u γ -globinskom promotoru na poziciji -158 (C→T) (slika 36). Kako ova mutacija stvara i novo restrikciono mesto za XmnI enzim,

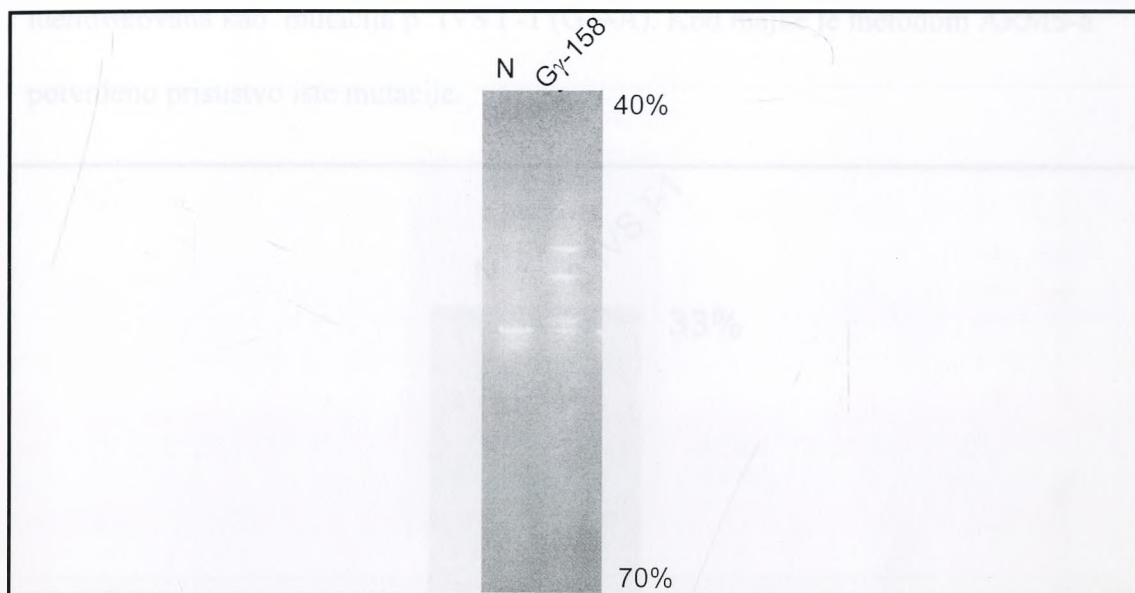
dijagnoza je potvrđena restrikcijom analizom DGGE fragmenta enzimom XmnI (rezultat nije prikazan).



Slika 35. DGGE analiza za mutaciju $\beta^0 39$. Prikazana je analiza heterodupleksa fragmenta IIIb iz β -globinskog gena. Procenat denaturanta je naznačen sa strane gela (42% – 72%). N – subjekat koji ne sadrži mutaciju u IIIb fragmentu (normalni alel). $\beta^0 39$ – subjekat koji sadrži mutaciju u fragmentu IIIb (mutacija je $\beta^0 39$).

Neobično blagi relevantni hematološki parametri za β -talasemijske mutacije, ukazivali su na prisustvo drugih, modulirajućih genetičkih faktora. Izrazito visok nivo HbF je bio poreklom od promotorske mutacije u γ -globinskim genima. Izražena anemija bila je rezultat graviditeta, inače bi ova mutacija na hematološkom nivou bila potpuno asimptomatska (silent). Nivo Hb A₂ je "opominjao" da treba pretražiti β -globinski gen. Takođe je bilo neophodno utvrditi proporciju α/β globinskih polipeptida. Ovaj dodatni eksperiment je govorio u prilog dijagnoze koja je i potvrđena na molekularnom nivou (heterozigot za $\beta^0 39$). Ovaj primer skreće pažnju na mogućnost "ublažavanja" fenotipa kod heterozigota za β -talasemijske mutacije usled efekata pojačane ekspresije γ -globina, odnosno usled istovremeno nasleđenog i HPFH alela. Nivo HbA₂ i koeficijent sinteze polipeptida α/β se moraju

konsultovati, kako se ne bi dao pogrešan genetički savet o odsustvu mutacija u β -globinskom genu.

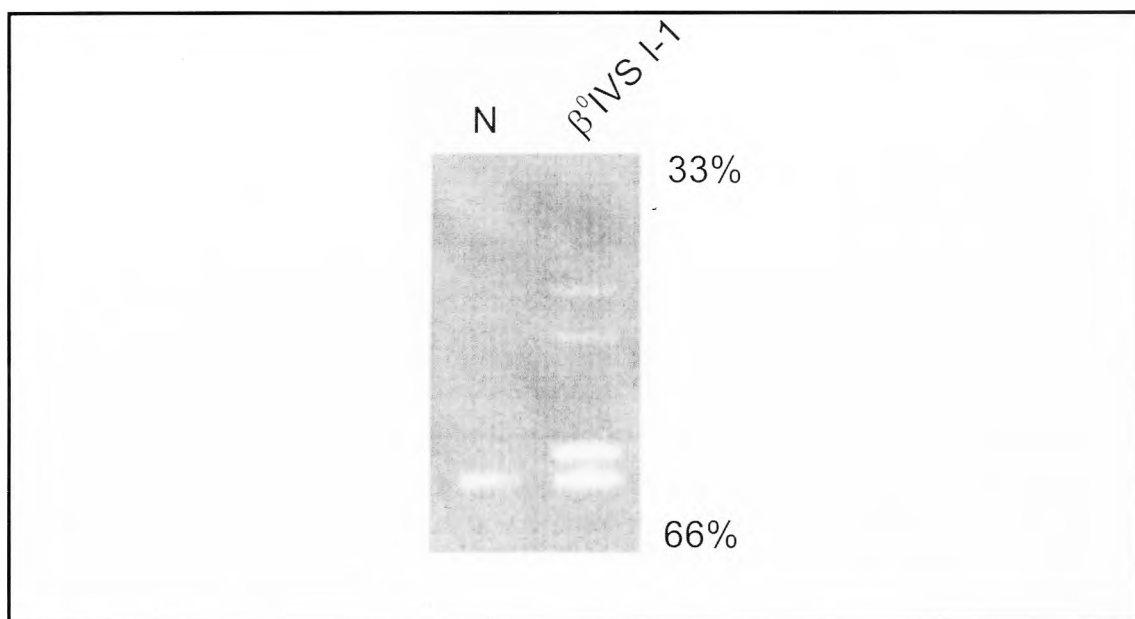


Slika 36. DGGE analiza kratkog fragmenta γ -globinskog gena. Procenat denaturanta je naznačen sa strane gela (40% – 70%). N – subjekat koji ne sadži mutaciju u kratkom fragmentu γ -globinskog gena (normalni alel). γ -158 – subjekat koji je heterozigot za mutaciju γ -158.

Heterozigotni nosilac mutacije za β -talasemiju sa kliničkim manifestacijama

Prikaz slučaja: Devojčica stara 4 godine, izrazito anemična, primila transfuziju. Konstatovani blagi ikterus i splenomegalija. Na razmazu periferne krvi, uočeni mikrociti, anizociti, kao mnoštvo inkluzionih tela u ćelijama crvene loze.. Hematološki parametri su bili sledeći: RBC: $3,85 \times 10^{12}$; Hb: 70,9 g/L; MCV:63,9 fL; MCH: 20,5 pg; RDW: 23,7%. Kvantifikacija hemoglobinskih frakcija, izvršena HPLC-om, dala je sledeće rezultate: HbA 90%, HbA₂ 4,80%, HbF 5,20%. Otac je klinički i hematološki normalan. Pretpostavljeno je, na osnovu hematoloških parametara, da je majka nosilac β -talasemične mutacije.

Genotip: DGGE analiza β -globinskog gena (slika 37), otkrila je prisustvo mutacije u heteozigotnom stanju, koja je sekvenciranjem tog fragmenta identifikovana kao mutacija β^0 IVS I -1 (G \rightarrow A). Kod majke je metodom ARMS-a potvrđeno prisustvo iste mutacije.

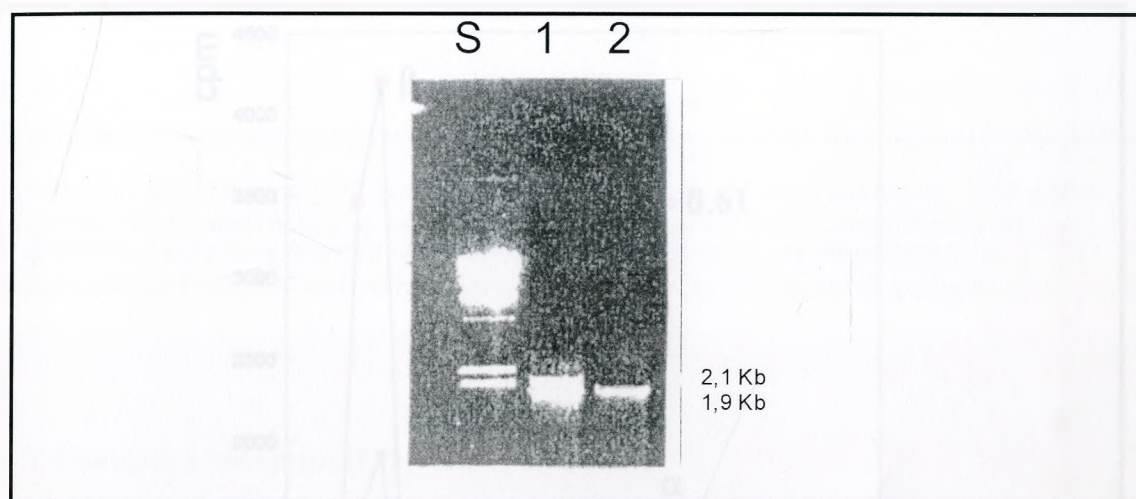


Slika 37. DGGE analiza za mutaciju β^0 IVS I-1. Prikazana je analiza heterodupleksa fragmenta II iz β -globinskog gena. Procenat denaturanta je naznačen sa strane gela (33% – 66%). N – subjekat koji ne sadrži mutaciju u II fragmentu (normalni alel). β^0 IVS I-1 – subjekat koji sadrži mutaciju u fragmentu II (mutacija je β^0 IVS I-1).

Zbog neuobičajeno teških kliničkih manifestacija, nastavljena je analiza DNK ovog pacijenta. Potpuno normalni hematološki parametri oca, upućivali su na moguću patologiju u α -globinskim genima. Gap PCR za najčešću mediteransku deleciju u α -globinskim genima, otkrio je da na jednom hromozomu postoji triplikovan α -gen ($\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$). I kod oca je potvrđen genotip $\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha^{\text{anti}3,7}$ (Slika 38).

Klinička slika talasemije intermedije uzrokovana je udruženim efektima mutacija u β - i α -globinskim genima. Nefunkcionalnost jednog β -globinskog gena (radi se o mutaciji β^0 tipa) i prisustvo α -globinskih gena u višku, rezultiraju smanjenjem sinteze β -globinskih polipeptida i ekstremno velikom akumulacijom α -

globina. Posledica ovog izrazitog α/β disbalansa je pojava ogromnog broja inkluzionih tela u perifernim ćelijama crvene loze, naglašena hemoliza i fenotip talasemije intermedije.



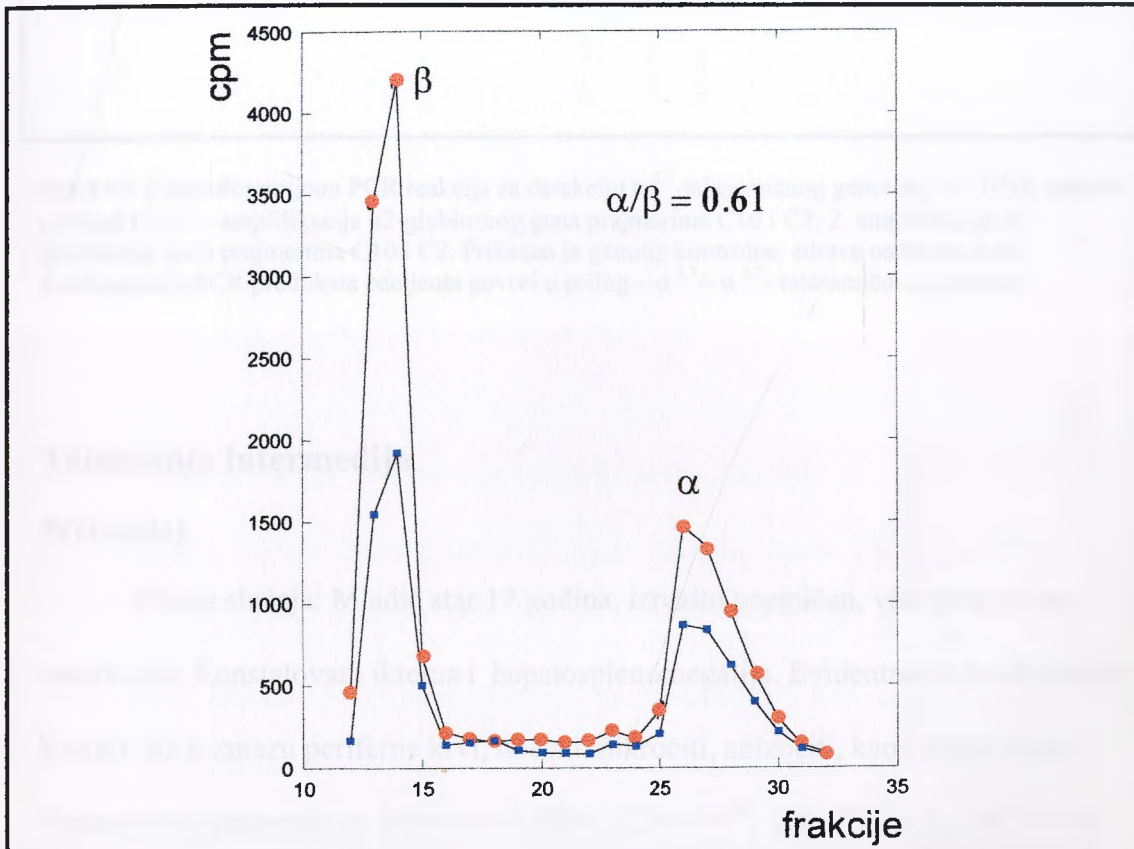
Slika 38. Elektroforetogram PCR reakcija za detekciju $\alpha^{3,7}$ -talasemičnog genotipa; S – DNK marker (λ /Hind III); 1 – amplifikacija $\alpha 2$ -globinskog gena prajmerima C10 i C3; 2. amplifikacija $\alpha 1$ -globinskog gena prajmerima C10 i C2. Prajmeri C10 i C3 prepoznaju hibridni gen nastao u rekombinaciji "RW" tipa ($\alpha\alpha^{anti^{3,7}}$).

Fenotip "ili α -talasemija ili β -talasemija"

Prikaz slučaja: Pacijentkinja, anemična, gravidna, javila se u genetičko savetovalište zbog eventualne prenatalne dijagnoze. Hematološki parametri su bili sledeći: Hb: 106 g /L; MCV:70,6 fL; MCH: 24,5 pg. Kvantifikacija hemoglobinskih frakcija, izvršena HPLC-om, dala je sledeće rezultate: HbA 97,7%, HbA₂ 2,30%, HbF 0,00%.

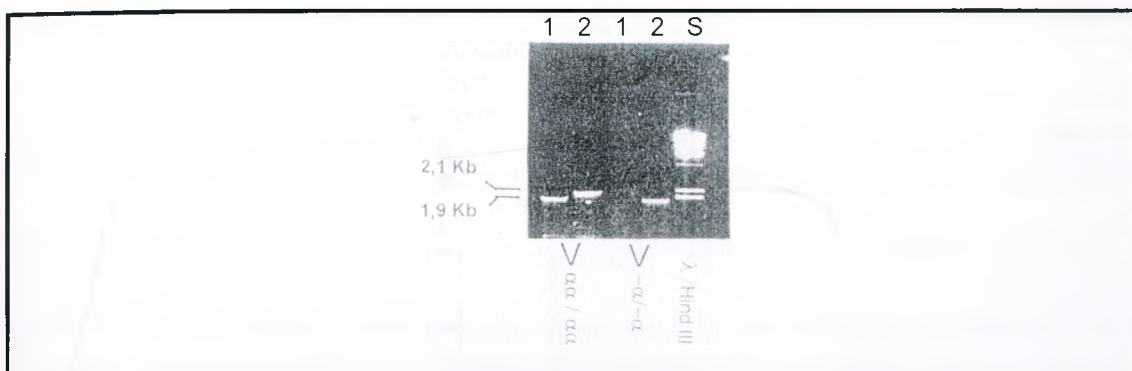
Sniženi MCV i MCH su karakteristike heterozigota za β -talasemijsku mutaciju. Nizak nivo HbA₂, opet, ide u prilog α -talasemijama. Kod α -talasemija, mikrocitoza i hipohromija su ovako izražene samo ako su bar dva α -globinska gena inaktivisana. Zbog toga se, u ovom slučaju, odlučujemo za *in vitro* sintezu globinskih polipeptida. Koeficijent sinteze α/β je bio 0,61 (slika 39). Ovaj podatak

ide u prilog α -talasemijskim mutacijama. Usledila je PCR analiza α -globinskih gena, koja je pokazala sledeći genotip kod pacijentkinje ($-\alpha^{3,7}/-\alpha^{3,7}$), to jest homozigotnost za α -talasemiju-2 (Slika 40). Otuda i fenotip talasemije minor tipa.



Slika 39. Određivanje biosintetskog indeksa (α/β) u eseju *in vitro* sinteze globinskih polipeptida. Prikazani su superponirani rezultati merenja absorbancije na 280 nm (plavi signali) i radioaktivne emisije (cpm) poreklom od obeleženih Leu inkorporiranih u α - i β -globinske polipeptide (crveni signali).

Hematološki parametri kod talasemije minor tipa često mogu da budu dvosmisleni, i da ukazuju i na α - i na β -talasemiju. Metoda izbora u tim slučajevima je *in vitro* sinteza globinskih polipeptida, koja usmerava ka daljim genetičkim analizama.

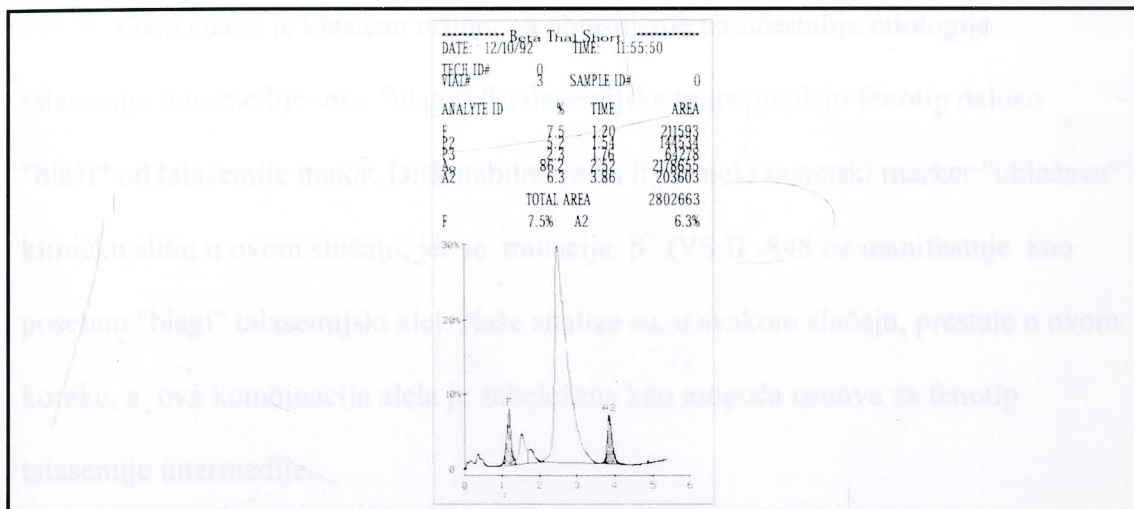


Slika 40. Elektroforetogram PCR reakcija za detekciju $\alpha^{3,7}$ -talasemičnog genotipa; S – DNK marker (λ /Hind III); 1 – amplifikacija $\alpha 2$ -globinskog gena prajmerima C10 i C3; 2. amplifikacija $\alpha 1$ -globinskog gena prajmerima C10 i C2. Prikazan je genotip kontrolne, zdrave osobe ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$). Konfiguracija PCR produkata pacijenta govori u prilog $\alpha^{3,7}/\alpha^{3,7}$ - talasemičnog genotipa.

Talasemija intermedija

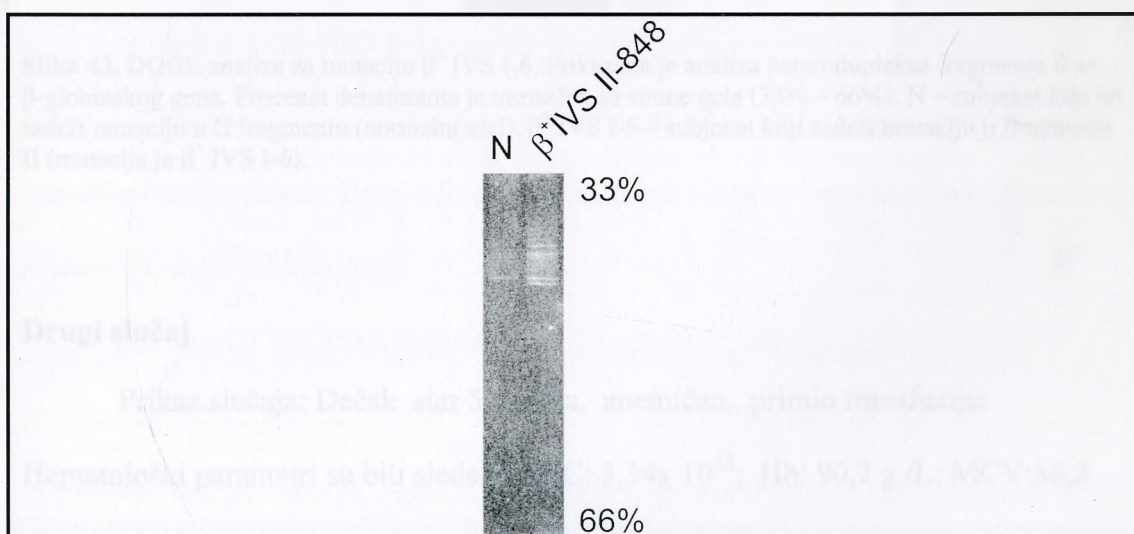
Prvi slučaj

Prikaz slučaja: Mladić star 17 godina, izrazito anemičan, više puta primao transfuziju. Konstatovani ikterus i hepatosplenomegalija. Evidentne su modifikacije kostiju. Na razmazu periferne krvi, uočeni mikrociti, anizociti, kao i target ćelije. Hematološki parametri su bili sledeći: RBC: $3,24 \times 10^{12}$; Hb: 70,6 g/L; MCV: 69,8 fL; MCH: 23,5 pg; RDW: 24,1%. Kvantifikacija hemoglobinskih frakcija, izvršena HPLC-om, dala je sledeće rezultate: HbA 86,20%, HbA2 6,30%, HbF 7,50% (41). Pretpostavljeno je, na osnovu hematoloških parametara, da su i majka i otac nosioci β -talasemijskih mutacija.



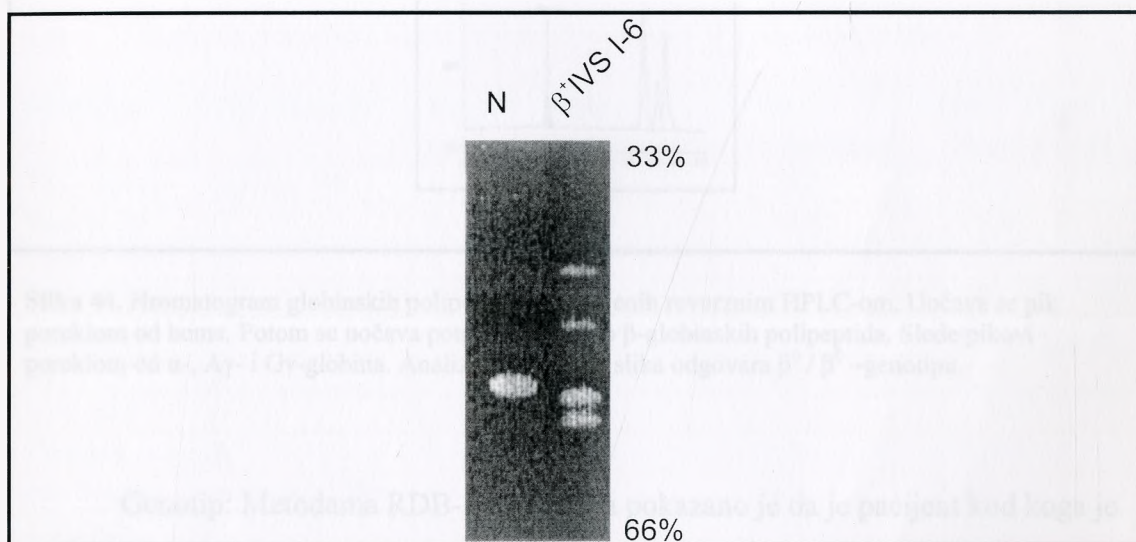
Slika 41. Hromatogram hemoglobina razdvojenih HPLC-om.

Genotip: DGGE analiza β -globinskog gena (slike 42 i 43), otkrila je prisustvo dve mutacije u heterozigotnom stanju, koje su, sekvenciranjem tih fragmenata, identifikovane kao mutacije β^+ IVS I -6 (T \rightarrow C) i β^+ IVS II -848 (C \rightarrow A). Kod majke je metodom ARMS-a potvrđeno prisustvo mutacije β^+ IVS I -6, dok je kod oca mutacija β^+ IVS II-848 potvrđena sekvenciranjem (rezultati nisu prikazani).



Slika 42. DGGE analiza za mutaciju β^+ IVS II-848. Prikazana je analiza heterodupleksa fragmenta IV iz β -globinskog gena. Procenat denaturanta je naznačen sa strane gela (33% – 66%). N – subjekat koji ne sadrži mutaciju u IV fragmentu (normalni alel). β^+ IVS II-848 – subjekat koji sadrži mutaciju u fragmentu IV (mutacija je β^+ IVS II-848).

Ovaj slučaj je klasičan primer za objašnjenje najučestalije etiologije talasemije intermedije: dve "blage" β -talasemijske mutacije daju fenotip daleko "blaži" od talasemije major. Diskutabilno je da li još neki genetski marker "ublažava" kliničku sliku u ovom slučaju, jer se mutacija β^+ IVS II -848 ne manifestuje kao posebno "blagi" talasemijski alel. Naše analize su, u svakom slučaju, prestale u ovom koraku, a ova kombinacija alela je zabeležena kao moguća osnova za fenotip talasemije intermedije.



Slika 43. DGGE analiza za mutaciju β^+ IVS I-6. Prikazana je analiza heterodupleksa fragmenta II iz β -globinskog gena. Procenat denaturanta je naznačen sa strane gela (33% – 66%). N – subjekat koji ne sadrži mutaciju u II fragmentu (normalni alel). β^+ IVS I-6 – subjekat koji sadrži mutaciju u fragmentu II (mutacija je β^+ IVS I-6).

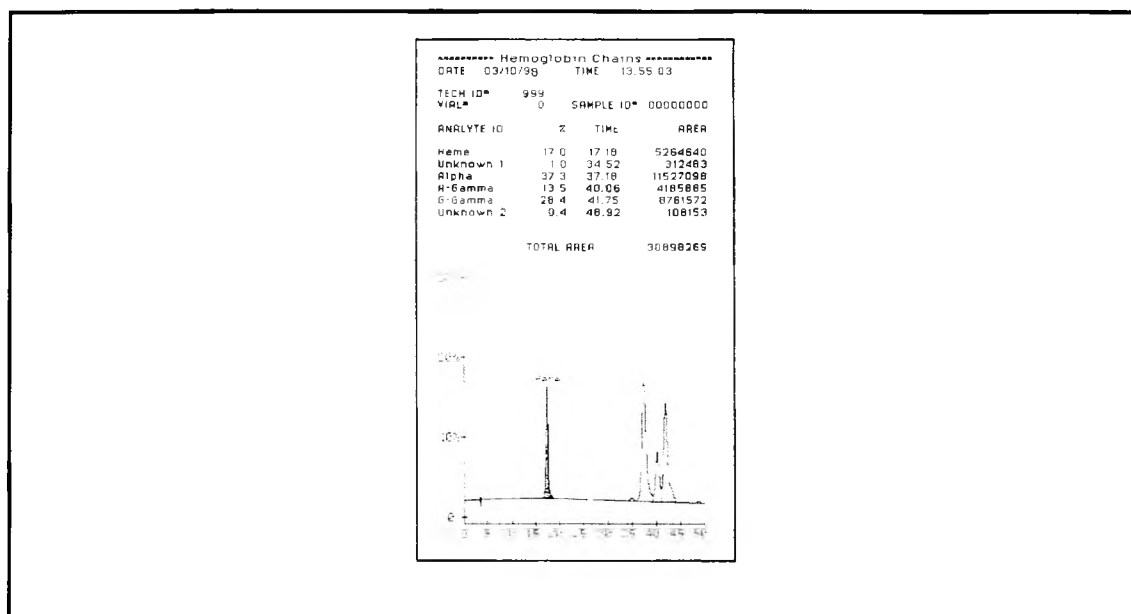
Drugi slučaj

Prikaz slučaja: Dečak star 5 godina, anemičan, primio transfuziju.

Hematološki parametri su bili sledeći: RBC: $3,34 \times 10^{12}$; Hb: 90,2 g/L; MCV:86,2 fL; MCH: 27,6 pg; RDW: 24,3%. Kvantifikacija hemoglobinskih frakcija, izvršena HPLC-om, dala je sledeće rezultate: HbA 00,00%, HbA₂ 2,70%, HbF 97,50% .

Koeficijent sinteze globinskih lanaca α/β je bio 2,94. I reverzni HPLC je potvrdio

odsustvo β -globinskih polipeptida (slika 44). Pretpostavljeno je, na osnovu hematoloških parametara, da su i majka i otac nosioci β -talasemijskih mutacija.



Slika 44. Hromatogram globinskih polipeptida razdvojenih reverznim HPLC-om. Uočava se pik poreklom od hema. Potom se uočava potpuno odsustvo β -globinskih polipeptida. Slede pikovi poreklom od α -, $A\gamma$ - i $G\gamma$ -globina. Analiza sugerise da slika odgovara β^0 / β^0 -genotipu.

Genotip: Metodama RDB-a i ARMS-a pokazano je da je pacijent kod koga je dijagnostikovana talasemija intermedija, homozigot za mutaciju $\beta^0 39$, "tešku mutaciju", koja po pravilu daje sliku talasemije major. Više metoda je potvrdilo odsustvo HbA, odnosno sinteze β -globinskog gena. I kod oba roditelja je potvrđeno prisustvo iste, $\beta^0 39$ mutacije.

Faktor koji "ublažava" kliničku sliku kod ovog pacijenta, otkriven je u γ -globinskom genu. Naime, ustanovljeno je da je pacijent homozigot za -158 mutaciju iz γ -globinskog promotora, koja u uslovima eritopoetskog stresa, deluje kao HPFH faktor, i time proizvodi registrovani fenotip talasemije intermedije.

Mutirana oba β -globinska alela, udružena sa HPFH sindromom je, takođe, vrlo čest mehanizam koji rezultira fenotipom talasemije intermedije.

Molekularna karakterizacija talasemijskih sindroma u SR Jugoslaviji

Od 1999. godine, u našoj laboratoriji, se karakterišu talasemijski sindromi na molekularnom nivou. Početni skrining je izvršen na anemičnim pacijentima, kod kojih je isključena sideropenijska anemija (terapija preparatima gvožđa nije rezultovala poboljšanjem simptoma) kao i na članovima njihovih porodica. Otkriveno je 60 hromozoma koji nose talasemijske ili talasemijama slične mutacije, i to u 23 različite porodice. Karakterizacija mutacija je prikazana u tabeli 5:

Mutacija	Tip mutacije	Broj porodica	Broj hromozoma	% porodica	% hromozoma
Hb Lepore	fuzioni Hb	6	18	26,2	30,0
kodon 39	β^0	5	12	21,8	20,0
IVS I-110	β^+	4	11	17,4	18,4
IVS II-745	β^+	2	6	8,7	10,0
kodon 44	β^0	2	4	8,7	6,7
-87	β^+	1	3	4,3	5,0
IVS II-1	β^0	1	2	4,3	3,3
IVS I-6	β^+	1	2	4,3	3,3
Hb Sabine	nestabilni Hb	1	2	4,3	3,3
Ukupno		23	60	100,0	100,0

Tabela 5. Prikaz talasemijskih mutacija detektovanih u jugoslovenskoj populaciji i njihove relativne učestalosti.

Identifikovano je ukupno 9 različitih mutacija koje uzrokuju talasemijske sindrome, od toga 7 β -talasemijskih mutacija i 2 hemoglobinske varijante, od kojih se Hb Lepore punopravno tretira kao β -talasemijski alel (udružen sa drugim mutacijama u β -globinskim genima, daje kliničku sliku talasemije major ili talasemije intermedije, homozigotno stanje rezultira fenotipom talasemije major). Hb Sabine je retka, nestabilna Hb varijanta, zabeležena u literaturi samo u heterozigotnom stanju, sa kliničkom slikom relativno teške hemolitičke anemije i

prisustvom Heinzovih tela u ćelijama crvene loze. Može se smatrati β -talasemijskom hemoglobinskom varijantom.

Među detektovanim mutacijama, tri je distribuirano na oko 70% okarakterisanih hromozoma (Hb Lepore, $\beta^0 39$ i β^+ IVS I-110). Posebno je zanimljiv Hb Lepore, čija je učestalost u našim istraživanjima bila oko 30%. Tri slučaja talasemije major (koliko je analizirano u ovom periodu) skoro isključivo su u svojoj osnovi imali kombinaciju ove tri mutacije.

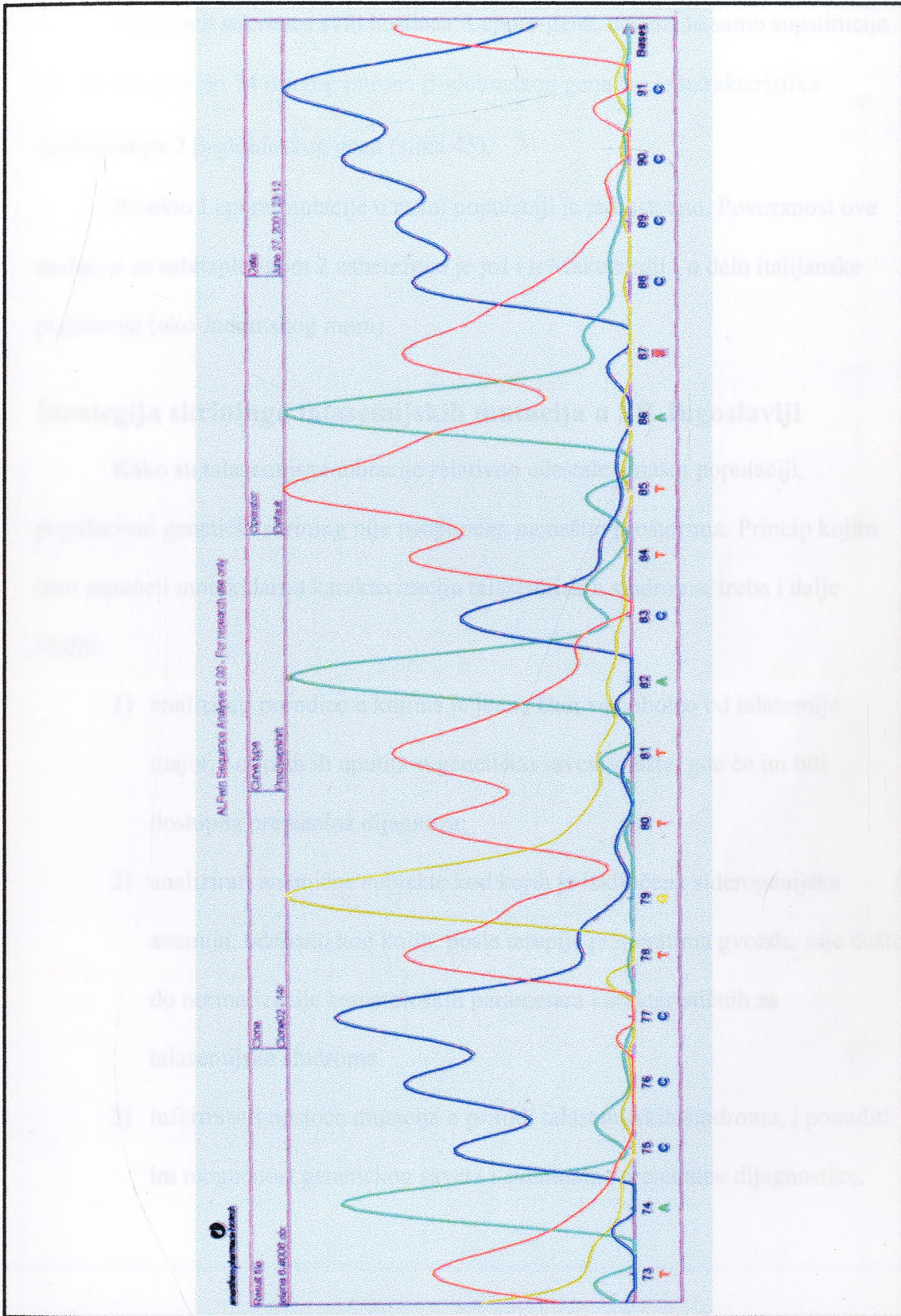
Sve mutacije su "mediteranskog" tipa, sem mutacije $\beta^0 44$, koja je prvobitno okarakterisana kod kurdskih Jevreja, a kasnije i u albanskoj populaciji. HbSabine je dosad opisan u četiri porodice evropskog porekla.

Od svih subjekata koje je u ovom vremenskom periodu obuhvatilo naše istraživanje, samo troje (5%) nije okarakterisano na molekularnom nivou. U sva tri slučaja se radi o hemoglobinskim varijantama (nestabilni Hb, Hb neuobičajene elektroforetske pokretljivosti, i, potencijalni Hb sa povećanim afinitetom za kiseonik). U toku su analize sekvenci ovih pacijenata.

U ovom, vremenski ograničenom, istraživanju, α -talasemijski sindromi nisu dijagnostikovani.

Poreklo Hb Lepore u jugoslovenskoj populaciji

Hb Lepore-Boston –Washington ($\delta 87$ - $\beta 116$) je jedini tip Hb Lepore identifikovan u našoj populaciji. Neobično velika učestalost Hb Lepore- BW na ovim prostorima, podstakla nas je da analiziramo hromozomalni kontekst u kome se nalazi ova mutacija. Povezanost mutacije za određeni subhaplotip β -globinskog gena (framework, eng.), može pružiti informaciju o poreklu ove mutacije i njenoj distribuciji.



Slika 45. Grafički zapis dela sekvence PCR fragmenta dugog 356 bp koji sadži fuzioni $\delta\beta$ -globinski (Lepore) gen dobijenog korišćenjem reverznog prajmera (prajmer B iz β -globinskog gena). Prikazan je subhaplotip 2 (nukleotid u zapisu na poziciji 86 – IVS II-74 C→A).

Analizom sekvence svih nosilaca Lepore-gena, uočena je samo supstitucija (G→T) na poziciji 74 drugog introna β-globinskog gena što je karakteristika subhaplotipa 2 β-globinskog gena (slika 45).

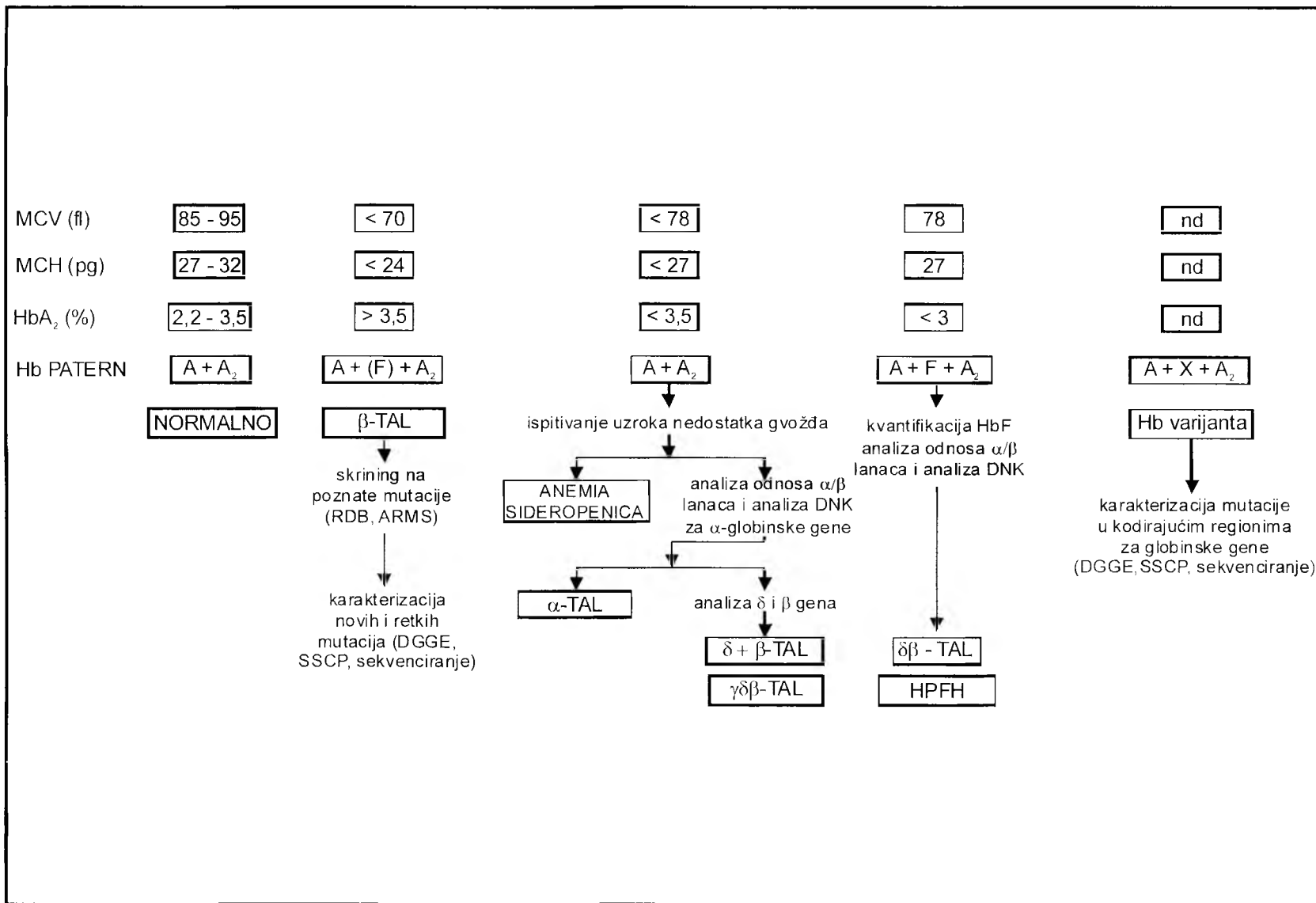
Poreklo Lepore-mutacije u našoj populaciji je jedinstveno. Povezanost ove mutacije sa subhaplotipom 2 zabeleženo je još i u Makedoniji i u delu italijanske populacije (oko Jadranskog mora).

Strategija skrininga talasemijskih mutacija u SR Jugoslaviji

Kako su talasemijske mutacije relativno učestale u našoj populaciji, populacioni genetički skrining nije neophodan na našim prostorima. Princip kojim smo započeli molekularnu karakterizaciju talasemijskih sindroma, treba i dalje slediti:

- 1) analizirati porodice u kojima je jedan član već oboleo od talasemije major, i odmah ih uputiti u genetičko savetovalište, gde će im biti dostupna prenatalna dijagnoza;
- 2) analizirati anemične subjekte kod kojih je isključena sideropenijska anemija, odnosno kod kojih, posle terapije preparatima gvožđa, nije došlo do normalizacije hematoloških parametara karakterističnih za talasemijske sindrome
- 3) informisati nosioce mutacija o prirodi talasemijskih sindroma, i ponuditi im mogućnost genetičkog saveta i eventualne prenatalne dijagnostike.

Slika 46. Shematski prikaz strategije hematološkog, biohemijskog i molekularnog skrininga populacije suspektna na talasemijske sindrome u SR Jugoslaviji.



Nedavna istraživanja UNICEF-a su pokazala da je anemija prisutna u značajnoj meri u našoj populaciji. Kako se u nas kod dece u prvoj godini i u predškolskom uzrastu radi totalni skrining na anemiju, a kako pojedinci koji ne odgovore na uobičajenu terapiju, po pravilu, bivaju upućeni u velike kliničko-bolničke centre, jasno je da je osposobljenost ovih ustanova za osnovni skrining na talasemijske sindrome od suštinskog značaja za postizanje kontrole nad ovom grupom poremećaja. Osposobljenost podrazumeva: izvođenje vrlo jednostavne elektroforeze Hb na celuloznom acetatu i određivanje zastupljenosti relevantnih hematoloških frakcija u hemolizatu (elucija iz gela frakcije Hb A₂ i spektrofotometrijsko određivanje njenih vrednosti, test alkalne denaturacije (za Hb F) i test toplotne denaturacije (za nestabilne hemoglobine).

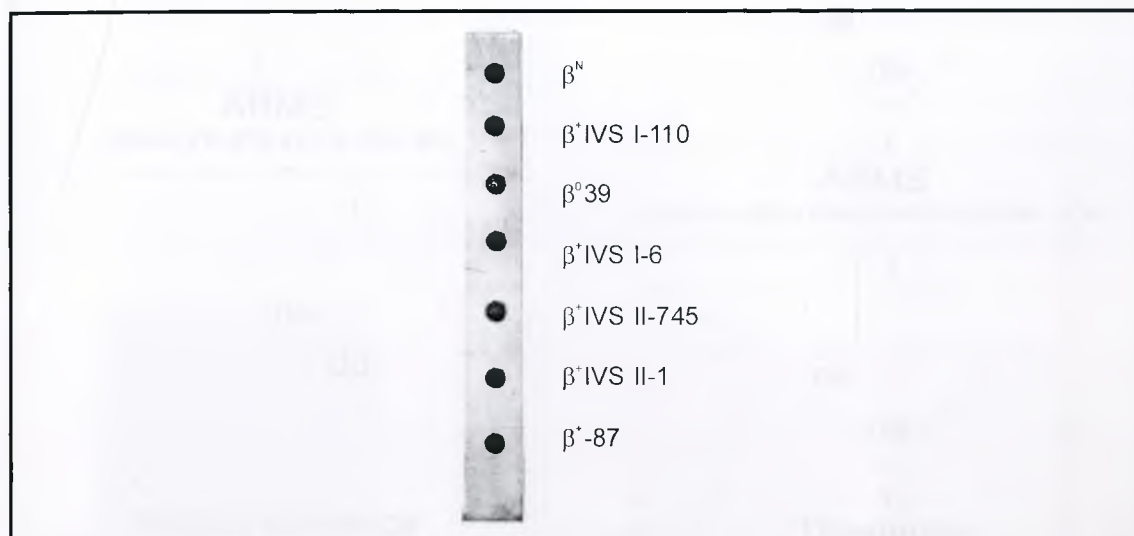
Genetička analiza se radi na pojedincima koji su odabrani iz prethodnih koraka skrininga.

Analiza korelacija genotipa i fenotipa omogućila je izvođenje određenih zaključaka o vrednostima hematološki parametara koji upućuju na specifične genetičke analize, čime se dijagnostika ubrzava i postaje rentabilnija.

Na slici 46 je predstavljena strategija hematološkog i genetičkog skrininga na talasemijske sindrome, koji mi predlažemo za našu populaciju. Prvi korak je analiza relevantnih hematoloških parametara i obavezna elektroforeza hemoglobina, kao i kvantifikacija frakcija HbA₂ i HbF. Analize pojedinih mutacija u našoj populaciji su pokazale kako, kod nekih, vrednosti hematoloških parametara mogu biti atipične (mutacija β^+ -87). I ove mutacije su obuhvaćene našim algoritmom.

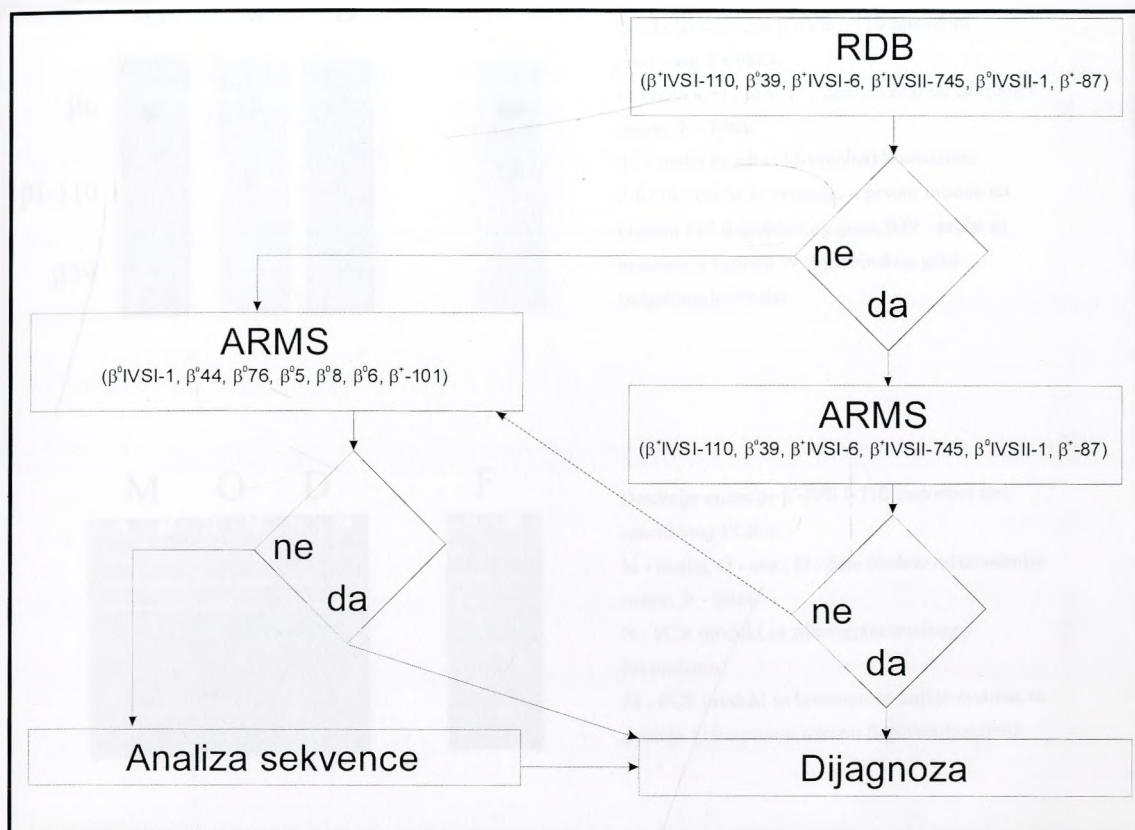
Deo koji se odnosi na α -talasemijske sindrome, HPFH sindrome i $\delta\beta$ -talasemije, izveden je na osnovu diferencijalne dijagnostike u odnosu na β -talasemijske sindrome u nas, kao i na osnovu saznanja o takvim vrstama istraživanja

u drugim populacijama. Algoritam strategije hematološkog i genetičkog skrininga na talasemijske sindrome je podložan promenama i zadobiće definitivn oblik, tek posle višegodišnjih istraživanja naše populacije.



Slika 47. Prikaz membrane za RDB analizu, "jugoslovenskog čipa" za β-talasemije. Probe su nanošene u sledećim koncentracijama: NH₂-β⁺ IVS-I-110-N 20pmol; NH₂-β⁺ IVS-I-110-M 3-5pmol; NH₂-β⁰ 39-M 3-5pmol; NH₂-β⁺ IVS-I-6-M 5pmol; NH₂-β⁺ IVS II-745-M 10pmol; NH₂-β⁰ IVS-II-1-M 40pmol i NH₂-β⁺ (-87)-M 5pmol.

Što se genetičke analize tiče, mi smo uveli prostu, efikasnu i rentabilnu metodologiju za identifikaciju β-talasemijskih mutacija u našoj populaciji. Napravili smo dijagnostičku membranu za reverzni dot blot, na koju su nanete probe za mutacije detektovane u našoj populaciji. Ova membrana predstavlja "jugoslovenski čip" za β-talasemijske mutacije (Slika 47). Detektovanu mutaciju proveravamo metodom ARMS-a. U slučaju negativnog rezultata na mutacije zastupljene na "jugoslovenskoj" membrani, pacijent se proverava metodom ARMS-a na preostale β-talasemijske mutacije karakteristične za mediteransko područje. Ukoliko ni ovaj skrining ne otkrije mutaciju, sekvencira se β-globinski gen i njegovo okruženje (slika 48).



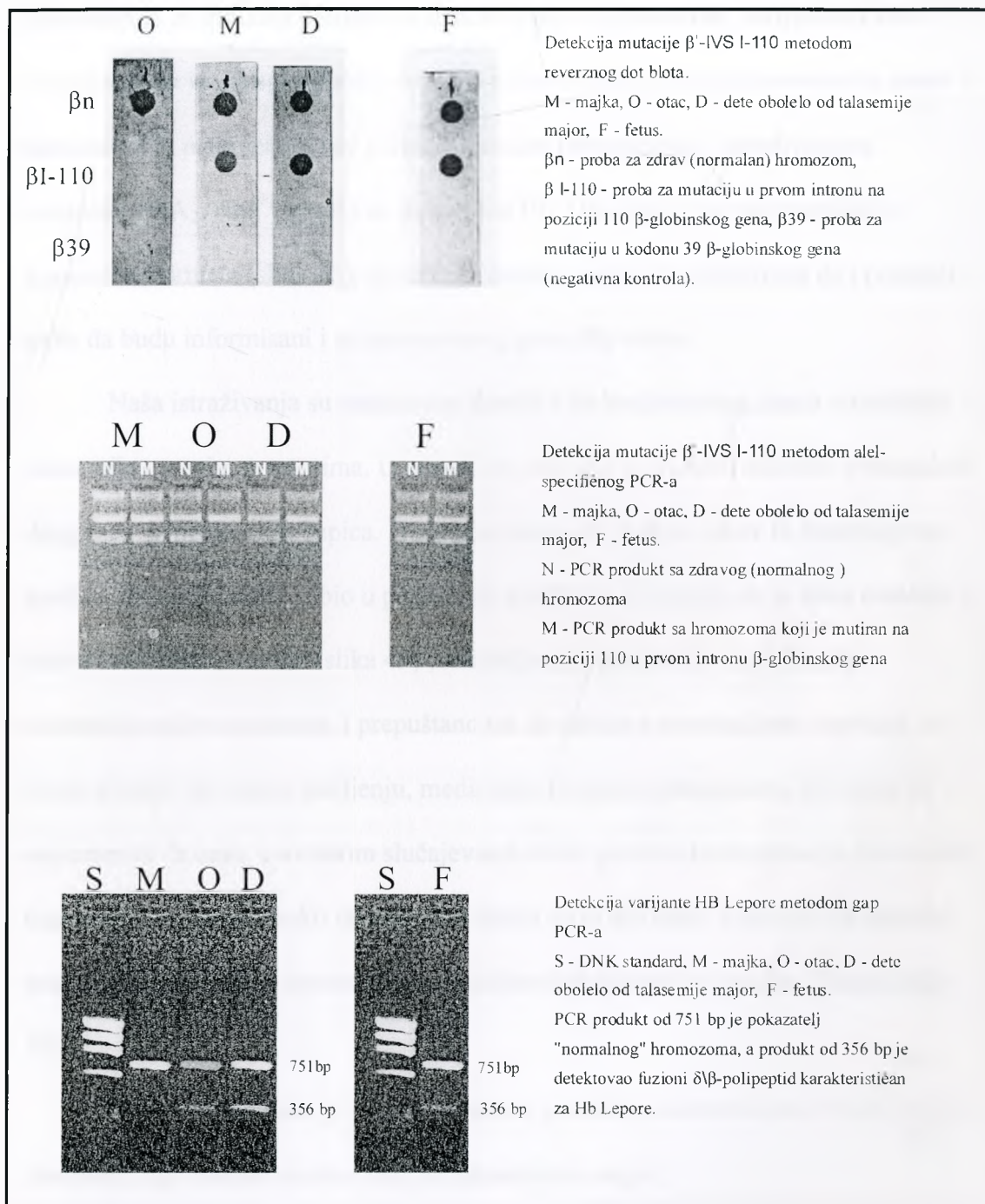
Slika 48. Algoritamski prikaz efikasne i rentabilne molekularne dijagnostike β -talasemija u SR Jugoslaviji.

Hb Lepore- BW, najčešći talasemijski sindrom u našoj populaciji, dijagnostikuje se jednom PCR reakcijom.

Kod ostalih hemoglobinskih varijanti, mutacija se otkriva analizom sekvence egzona.

Genetičko savetovalište i prenatalna dijagnoza

Posle identifikacije, nosioci talasemijskih mutacija su, u genetičkom savetovalištu, bili informisani o prirodi bolesti i implikacijama njihovog genetičkog statusa na najbliže rođake i potomstvo. U velikom broju slučajeva, posle intervjua sa novootkrivenim nosiocima, članovi porodica bi se javljali kako bi saznali svoj status i dobili više informacija o prirodi talasemijskih sindroma.



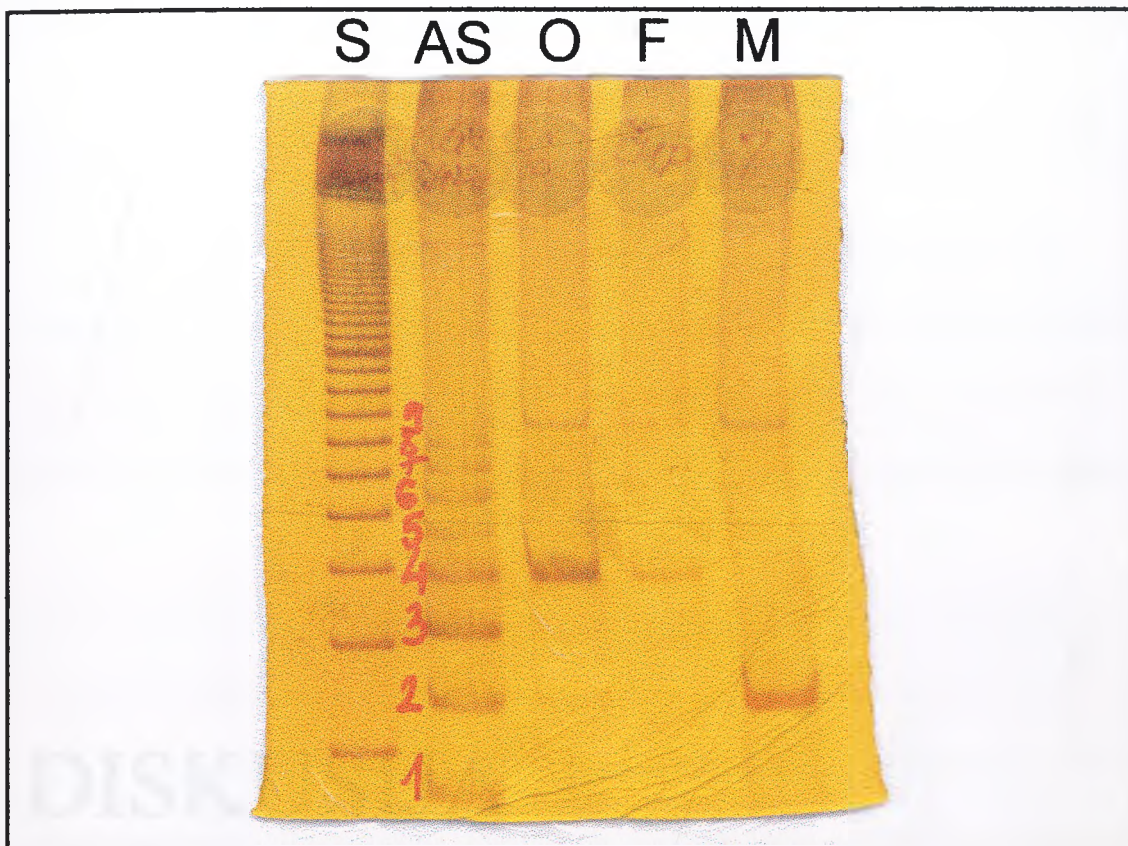
Slika 49. Prenatalna dijagnoza u jednoj jugoslovenskoj porodici. Fetus je dvostruki heterozigot za talasemijsku mutaciju poreklom od majke (β IVSI-110) i hemoglobinsku varijantu poreklom od oca (Hb Lepore). Kako u porodici postoji dete sa istom genetskom kombinacijom i kliničkom slikom talasemije major, analizirani fetus bi po rođenju ispoljio kliničku sliku talasemije major.

U nekoliko slučajeva, budući roditelji, od kojih je jedan nosilac β -talasemijske mutacije, su se javljali u genetičko savetovalište radi provere partnera i

razmatranja eventualne potrebe za prenatalnom dijagnostikom. Isključivali smo mogućnost da je i drugi roditelj nosilac β -talasemijske mutacije proverom ne samo hematoloških parametara, već i elektroforezom hemoglobina, određivanjem vrednosti HbA₂, HbF i testom na nestabilne Hb. Ukoliko bi svi parametri bili u granicama normale (slika 46), savet bi se odnosio samo na upozorenje da i potomci treba da budu informisani i da provere svoj genetički status.

Naša istraživanja su neminovno dovela i do kvalitativnog skoka u tretiranju talasemija na ovim prostorima. U proteklom periodu je urađeno nekoliko prenatalnih dijagnoza iz horionskih čupica. U slučaju nalaza da je fetus zdrav ili heterozigotni nosilac, genetički savet je bio u potpunosti pozitivan. U slučaju da je fetus nasledio i očevu i majčinu mutaciju (slika 49), roditeljima je predočeno da je fenotip talasemije major neizbežan, i prepuštano im da odluče o eventualnom abortusu, u ovom slučaju, po našem mišljenju, medicinski potpuno opravdanom. Potrebno je napomenuti da smo, u ovakvim slučajevima, radili proveru kontaminacije horionskih čupica tkivom majke, kako rezultat kod deteta ne bi bio lažno pozitivan na majčinu mutaciju. To je rađeno upoređivanjem polimorfnihih lokusa kod majke i fetusa (slika 50).

U periodu od kada je počelo sa radom genetičko savetovalište za talasemijske sindrome, nije rođeno nijedno dete sa talasemijom major.



Slika 50. Elektroforetogram PCR analize polimorfnog lokusa D17S5 u DNK iz horionskim čupicama (F), kao i kod oca (O) i majke(M). S – lestvica DNK od po 100 bp. AS – alelski standard (1 – 9). Analiza je pokazala da fetus sadrži alele 4 i 9, otac – alele 4 i 9, a majka – alele 2 i 9. Time je dokazano odsustvo kontaminacije fetusnog majčinim tkivom.

DISKUSIJA

Heterozigotna β -talasemija: korelacija između hematološkog fenotipa i tipa β -talasemijske mutacije

Heterozigotna β -talasemija se na hematološkom nivou manifestuje mikrocitozom, hipohromijom, visokim nivoom adultne minorne hemoglobinske frakcije, Hb A₂, i disbalansom u sintezi globinskih lanaca ($\alpha/\beta > 1$). Izraženost ovih hematoloških manifestacija značajno varira ukoliko su konasleđene α - ili δ -talasemija, ili, ako je prisutna i deficijencija gvožđa. Neke studije su pokazale da su ove varijacije u funkciji i tipa β -talasemijske mutacije (Rosatelli MC et al. 1992.).

Naša istraživanja su pokazala značajne varijacije hematoloških parametara kod heterozigotnih nosilaca β -talasemija. Iako su istraživanja bila ograničenog karaktera, ipak se za neke mutacije može zaključiti da se manifestuju kao tipične. U ovu grupu su svrstane mutacije β^0 tipa (β^{039} i β^0 IVS II-1) i "teže" mutacije β^+ tipa

(β^+ IVSI-110 i β^+ IVS II-745). "Teže" β^+ -talasemijse mutacije su one koje u homozigotnom stanju ili udružene sa β -talasemijskom mutacijom drugog tipa, daju fenotip β -talasemije major.

Za β^0 39 mutaciju u našoj zemlji bi se moglo reći da ima relativno blagi hematološki fenotip, u poređenju sa drugim populacijama, naročito italijanskom gde je to, ujedno, i najučestalija mutacija. Međutim, u bugarskoj populaciji, ova mutacija takođe ima nešto blaže hematološke parametre (Petkov GH et al. 1990.). Da li se radi o različitom genetičkom kontekstu u kome se nalazi ova mutacija u Italiji i u istočnom delu Balkana, to jest, da li mutacija ima dvojako poreklo, nije utvrđeno. Haplotipska populaciona istraživanja bi dala odgovor na ovo pitanje.

Druga mutacija β^0 tipa (β^0 IVS II-1) se manifestovala na hematološkom nivou vrlo drastično, što nije neobično, uzevši u obzir molekularnu etiologiju i patofiziologiju sindroma izazvanih ovom mutacijom. Treba istaći da ova mutacija pokazuje izrazito visoke vrednosti hematoloških parametara u pojedinim populacijama, MCV dostiže neočekivane vrednosti (i do 75fL) (Indrak K et al. 1992.).

Mutacija β^+ IVS I-110 je najčešća mutacija mediteranskog područja. Hematološki parametri heterozigotnih nosilaca ove mutacije su u potpunom saglasju sa onima detektovanim u drugim evropskim populacijama .

Mutacija β^+ IVSII-745 je kod nas "teža" β^+ mutacija. Ona je i u heterozigotnom stanju kod pojedinih pacijenata proizvela fenotip blaže β -talasemije intermedije. Hematološki parametri govore tome u prilog.

Nivo Hb A₂ kod svih nosilaca tipičnih β -talasemijskih mutacija je bio povišen. Razlike u nivou HbA₂ između mutacija β^0 i β^+ tipa, potencirane u literaturi (Steinberg MH & Adams JG. 1991.), u našim istraživanjima nisu nedvosmisleno

pokazane. Ipak, u slučaju mutacije β^+ IVS I-110 je detektovano nešto skromnije povećanje ove hemoglobinske frakcije.

Dva različita mehanizma leže u osnovi povećanja HbA₂ kod heterozigotnih β -talasemija. Prvi deluje na posttranslacionom nivou i zasniva se na favorizovanju sparivanja α - i δ -globinskih lanaca, usled deficijencije β -lanaca. Kako je kod mutacija β^+ tipa, β -globinski lanac prisutan, dolazi do limitiranog formiranja HbA₂ (Codrington JF et al. 1990.). Ovaj mehanizam je odgovoran za nešto niži stepen povećanja HbA₂ frakcije kod heterozigota za mutaciju β^+ IVS I-110 .

Drugi mehanizam koji objašnjava povećanje HbA₂ odnosi se na transkripcioni nivo i na kompeticiju koja postoji između različitih promotora β -globinskog lokusa za LCR (Codrington JF et al. 1990.). Naime, delecije i tačkaste promotorske mutacije β -globinskog gena, koje ukidaju mesta za vezivanje transkripcionih faktora i favorizuju interakciju δ -globinskog promotora sa LCR-om, mogu uzrokovati ekstremno visok nivo HbA₂ , kakav nije zabeležen kod nosilaca drugih β -talasemijskih mutacija. Tako je kod mutacije β^+ – 88 zabeleženo povećanje HbA₂ frakcije čak do 7% (Codrington JF et al. 1990.). Slično je pokazano i za mutaciju β^+ – 29.

Istraživanja atipičnih mutacija u našoj populaciji su od posebnog značaja za otkrivanje nosilaca β -talasemijskih mutacija. Znanje o neuobičajenim hematološkim karakteristikama ovih subjekata značajno smanjuje mogućnost da budu "propušteni" u skriningu ili, što je još opasnije, u genetičkom savetovalištu.

Mutacija β^{044} je otkrivena kod kurdskih Jevreja (Kinniburgh AJ et al. 1982.), a kasnije i u albanskoj populaciji (lična komunikacija, C. Rosatelli). Izražena anemija i niske vrednosti hematoloških parametara (MCV i MCH) u obe porodice objašnjavale su manifestovanu "težu" kliničku sliku od one koja se očekuje kod

tipičnih β -talasemija minor tipa (heterozigotne β -talasemije). Međutim, nivo Hb A₂ je bio neobično nizak, "border-line". Krajnje atipično, zanemarljivo malo povećanje frakcije Hb A₂ kod β^0 -talasemija, može ukazivati na prisustvo δ -talasemije. Kako se ovde radi o dve različite porodice, veća je verovatnoća da se mutacija nalazi na hromozomu u takvom "okruženju", koje narušava transkripciju i δ -globinskog gena. U prilog ovome idu i podaci o visokim vrednostima Hb F, čiji je promotor, prema našoj pretpostavci, u datom slučaju posebno favorizovan u interakciji sa LCR-om.

Mutacija β^+ IVS I-6 je opisana u literaturi kao "blaga" talasemijska mutacija (Cao A et al. 1990a.). Pokazano je da ona u homozigotnom stanju i u kombinaciji sa drugim β -talasemijskim mutacijama rezultira blagom formom β -talasemije, talasemijom intermedija. U našem slučaju, ova mutacija je u kombinaciji sa mutacijom β^+ tipa, eksprimirala fenotip talasemije major. Svi hematološki parametri su bili izrazito "talasemični". I nivo Hb A₂ frakcije, koji je, po pravilu, kod ovog tipa mutacije "borderline", u našem slučaju je bio visok. Hematološki i biohemijski parametri su prejudicirali "tešku" kliničku sliku. Ovaj podatak treba uvek imati u vidu pri davanju genetičkog saveta. Detektovana mutacija se uvek nalazi u određenom genetskom miljeu, koji nama ostaje nepoznat. Hematološki i biohemijski parametri se uvek moraju konsultovati pri predviđanju fenotipa.

Mutacija β^+ -87 je tipični predstavnik blagih β -talasemijskih mutacija. Hematološki i biohemijski pokazatelji bili su u saglasnosti sa odsustvom bilo kakvih kliničkih simptoma. U nekim populacijama ova mutacija, iako "blaga", ima povišen nivo Hb A₂ (Rosatelli C et al. 1992.). Kod nas je zabeležen "borderline" nivo. Interesantno je da mutaciju β^+ -88 u istom regulatornom regionu, proksimalnom CACCC bloku, karakteriše ekstremno visok nivo Hb A₂. Možemo pretpostaviti da pozicija -87 nije od posebnog značaja za vezivanje transkripcionih faktora (Sp1,

EKLF) za ovaj regulatorni region, dok pozicija -88 jeste. Tako, u slučaju mutacije β^+ -87, β -globinski promotor relativno normalno funkcioniše, "angažuje" transkripcione faktore i interaguje sa LCR-om, dok je δ -globinski gen utišan. Kod mutacije β^+ -88 se sve događa upravo suprotno.

Genotip subjekata sa nivoima Hb A₂ od 3% -3,5% (borderline) zabeležen je kod blagih β -talasemijskih mutacija, kao što su β^+ -101 (C→T), β^+ +1 *cap* mesto (A→C), i pomenuta β^+ IVS I-6 (Galanello R et al. 1994.). Nivo Hb A₂ kod β -talasemija takođe može biti snižen do graničnog nivoa usled deficijencije gvožđa, kao i istovremenog prisustva δ -talasemije (Paglietti E et al. 1985.).

Iako su naša istraživanja sprovedena na populaciji kod koje je isključena deficijencija gvožđa (prethodni tretman preparatima gvožđa), kod svih subjekata je zabeležen izrazito nizak nivo Hb. Istraživanja talasemija u drugim populacijama nisu ni izbliza pokazivali tako dramatične vrednosti Hb (Rosatelli C et al. 1992.; Petkov GH et al. 1990.; Indrak K et al. 1992.; Dimovski A et al. 1990.). Naša istraživanja nisu obuhvatila analizu δ -globinskog gena. δ -talasemije su veoma retke, i malo je verovatno da su nasleđene zajedno sa β -talasemijom.

Hematološki parametri, a naročito nivo Hb A₂ kod nosilaca β -talasemijske mutacije u istoj porodici bili su izrazito korelisani. Ova pojava je već opisana u literaturi (Berman BW et al. 1980.).

Znanja stečena izučavanjem korelacija između fenotipova i različitih tipova β -talasemijskih mutacija poslužila su za kreiranje strategije skrininga naše populacije na β -talasemije, a samim tim su neophodna za tačan i pouzdan genetički savet.

Hb Lepore – najčešći talasemijski sindrom na našim prostorima

Populaciono istraživanje na teritoriji R Srbije sprovedeno davne 1980. godine, pokazalo je da je učestalost hemoglobinopatija u nas 1,9% (Beksedić D et al. 1980.). Od toga, skoro 45% je predstavljao Hb Lepore. I naša istraživanja su pokazala da je to najzastupljenija "talasemijska" mutacija na ovim prostorima (30%). U literaturi nije zabeležena ovako visoka stopa učestalosti ove Hb varijante ni u jednoj populaciji.

Većina slučajeva talasemije major u nas su uzrokovani kombinacijom jedne talasemijske mutacije (bilo β^0 ili β^+ tipa) i Hb Lepore. Zabeležen je i slučaj homozigota za Hb Lepore koji je takođe imao kliničku sliku talasemije major. Zbog toga je skrining naše populacije na ovu hemoglobinopatiju od velikog značaja.

Prisustvo velikih varijacija u vrednostima Hb Lepore (6-14%), može biti objašnjena, kao što je i u ranijim prikazima ove bolesti sugerisano, varijacijom u broju α -globinskih gena (Oner C et al. 1998.). Naše nastojanje da to potvrdimo, i to na najindikativnijem primeru, u istoj porodici, u kojoj je količina Hb Lepore varirala drastično, nije uspelo. Treba naglasiti da su naša istraživanja α -globinskog lokusa u ovoj porodici bila ograničenog karaktera, i da kompletna analiza sekvence nije urađena. Zbog toga koegzistencija Hb Lepore i α -talasemije trait, u ovom slučaju nije isključena. Naše razmišljanje ide u pravcu suprotnom ovom objašnjenju. Naime, varijacije u zastupljenosti frakcije Hb Lepore među porodicama, su toliko velike, i toliko česte, da to uveliko prevazilazi učestalost α -talasemijskih mutacija u datim populacijama.

Nama izgleda verovatnije da u osnovi ovog fenomena leži drugi mehanizam. Ribeiro et al. su ispitivali sintezu Hb Lepore, na nivou iRNK i nivou proteina (Ribeiro ML et al. 1997.). Pokazali su da se $\delta\beta$ hibrid transkribuje na nešto višem

nivou nego sam δ -globinski gen, a da je translacija izuzetno efikasna, ali varijabilna (10%-15%). Razlozi za ovako izrazito efikasnu (i varijabilnu) translaciju još nisu rasvetljeni.

Svi Hb Lepore detektovani u našoj populaciji su bili tipa HbLepore- Boston-Washington. Heterogenost hromozomskog okruženja (background, eng.) kod Hb Lepore BW hromozoma se ispituje od momenta kada je za mutirani (hibridni) gen utvrđeno da je vezan za različite haplotipove kod pacijenata iz različitih populacija (Lanclos KD et al. 1987.). Nedavno je pokazano da u Italiji Lepore-gen ima dvostruko poreklo (Fioretti G et al. 1992.). Naime, u pokrajinama Campania i Abruzzo Lepore-geni s bili vezani za različite subhaplotipove u okviru β -globinskog gena (framework, eng.), prvi za subhaplotip 1, a drugi za subhaplotip 2.

Ova heterogenost može biti objašnjena pomoću tri mehanizma: 1. nejednakom rekombinacijom između normalnog i Lepore hromozoma; 2. konverzijom gena, i 3. ponovljenim, nezavisnim rekombinacijama koje rezultiraju nezavisnim mutiranim (hibridnim) genima.

U prvoj hipotezi se predviđa nejednaka rekombinacija u segmentu između pozicije gde se formirao hibridni gen (breakpoint, eng.) i pozicije β IVS II-74 (subhaplotip 2). Kako ovaj segment sadrži samo 128 bp, a već obuhvata 58 bp u kojima se dogodila Lepore rekombinacija, verovatnoća da se desi još jedan "crossing over" je izuzetno mala. Protiv ove hipoteze je i argument da se ovaj gen prostire samo u određenim geografskim područjima.

Konverzija gena se takođe može odbaciti kao malo verovatna, jer su za to potrebna bar dva uzastopna događaja, pošto je rastojanje između polimorfnih markera 9 Kb.

Hipoteza o ponovljenim, nezavisno nastalim mutacijama (Antonarakis SE et al. 1982b.), po našem mišljenju, najbolje tumači pojavu da se mutacija može naći u kontekstu više subhaplotipova. Sledeći dokazi potkrepljuju hipotezu o multiplom poreklu Lepore alela. Prvo, malo je verovatno da je heterogenost hromozomskog okruženja nastala posle Hb Lepore-BW mutacije, jer je pokazano da su asocijacije haplotipova (po Orkinu) i subhaplotipova (framework, eng.) ustanovljene kod ovih pacijenata, iste kao i kod ostalih zdravih ili β -talasemičnih hromozoma (Orkin SH et al. 1982b.). Drugo, otkriven je i treći Lepore hromozom, kod koga je hromozomsko okruženje toliko kompleksno, da se može objasniti jedino *de novo* nastalom delecijom (Lanclos KD et al. 1987.). Treće, svaki od ovih Lepore hromozoma je koncentrisan u različitim geografskim područjima, što upućuje na zaključak o njihovom multicentričnom poreklu.

Hb Lepore –BW gen vezan za subhaplotip 2 je jedini tip otkriven u SR Jugoslaviji. Pokazano je da ovakva asocijacija genetičkih markera postoji još i u "jadranskom" delu Italije (Masciangelo F et al. 1989.). Kako su migracije iz istočnih mediteranskih zemalja preko Jadranskog mora do italijanske obale istorijski dokumentovane, može se pretpostaviti da je gen nastao na Balkanskom poluostrvu i odatle se proširio u Italiju.

Hb Sabine

Opisano je više od 100 nestabilnih Hb koji izazivaju hemolitičku anemiju (Beutler E. 1995.). Među njima 80% je izazvano mutacijama u β -globinskom genu, a 20% u α -globinskom genu. Hb Sabine (β 91(F7) Leu→Pro) je nestabilna β -globinska strukturna varijanta, koja izaziva umereno tešku hemolitičku anemiju, te ga zbog toga ubrajamo u sindrome slične talasemijama.

Histidin na poziciji 92 (F8) je jedina aminokiselina u β -globinskom lancu koja kovalentno interaguje sa hemom. Uvođenje prolina u α -heliks na poziciji β 91, narušava spiralnu strukturu i funkciju β 92 (His). Uz to, Leu ima značajnu funkciju u održavanju kontakta hem – β -globinski polipeptid. Supstitucija Leu→Pro utiče na narušavanje strukture džepa hema, i na slabljenje veza između hema i globina. Posledice su dvostruke: 1. tendencija gubljenja hema iz mutirane subjedinice, i 2. povećana susceptibilnost za oksidaciju hema, što favorizuje formiranje metHb. Ove promene su odgovorne za izrazitu nestabilnost Hb Sabine. Sledi stvaranje hemihroma koji precipitiraju u formi Heinzovih tela, a krajnji rezultat je hemoliza. Interesantno je da ista aminokiselinska zamena na poziciji β 88 (Hb Santa Ana), narušava isti helikalni segment, ali su konsekvence znatno blaže (Opfell RW et al. 1968.).

Četiri slučaja Hb Sabine su dosad opisana, svi u Evropi. U originalnom prikazu (Schneider RG et al. 1969.) je opisan pacijent englesko-nemačkog porekla sa relativno teškom hemolitičkom anemijom, koji je ispoljio značajno kliničko poboljšanje posle splenektomije. I pacijenti sa Sardinije (Gasperini D et al. 1992.) i iz Severne Irske (Hull D et al. 1998.) su slično reagovali na splenektomiju. Pacijent jugoslovenskog porekla (Bogoevski P. 1983.) je imao najblažu kliničku sliku, a splenektomija je njegovu anemiju smanjila na minimum (nivo Hb je dostizao vrednosti do 130 g/L).

Naš pacijent je potomak opisanog jugoslovenskog nosioca Hb Sabine, kod koga je mutacija nastala *de novo*. Vrlo blagi klinički simptomi kod našeg pacijenta se mogu objasniti ekstremno velikom zastupljenošću Hb F (16,5%). Naime, posttranslaciona situacija, u kojoj nestabilni β -globinski lanac teško formira $\alpha\beta$ dimere, rezultira i nagomilavanjem nesparenih α -polipeptida, što u krajnjoj instanci povećava hemolizu. Ako γ -globinski polipeptidi "preuzmu" višak α -lanaca, stanje će

se popraviti. I zaista, jedina razlika između pacijenata nejugoslovenskog porekla i članova jugoslovenske porodice, je povećan nivo Hb F kod naših pacijenata. Ova varijacija u nivou Hb F bi mogla biti povezana sa razlikom vezanom za hromozomske haplotipove sa kojima je povezana "Sabine" mutacija. Analiza γ -globinskog promotora kod našeg pacijenta je korak koji nam predstoji.

Mutirani β -globinski gen u kontekstu drugih globinskih gena

β -talasemije su veoma heterogena grupa naslednih oboljenja. Genetička heterogenost je uzrok varijabilnosti hematoloških i kliničkih manifestacija. Ova heterogenost nije samo posledica različitih tipova mutacija u samom β -globinskom genu, već je rezultat i uticaja brojnih genetičkih modifikujućih faktora.

Genetičke determinante koje dovode do povećane ekspresije γ -globinskih lanaca kod adultnih jedinki su najčešći modifikujući faktori kod β -talasemija. Prisustvo γ -globinskih lanaca redukuje disbalans između α - i β -lanaca, što rezultuje blažim fenotipom od očekivanog (talasemija minor se manifestuje kao asimptomatska (silent, eng.) talasemija, a talasemija major, kao talasemija intermedija) (Galanello R et al. 1989.; Gilman GJ & Huisman THJ. 1985.)

Vrlo česta, HPFH-slična determinanta je A \rightarrow T supstitucija u promotoru $G\gamma$ -lanca, i to na poziciji -158. Za razliku od drugih HPFH mutacija, ova je potpuno asimptomatska kod zdravih individua (Wainscoat JS. 1987.). Mutacija -158 u $G\gamma$ promotoru funkcioniše kao HPFH determinanta samo u uslovima eritropoetskog stresa (Cao A et al. 1990a.). U našim istraživanjima ovaj genetički faktor je ublažavao kliničku sliku i talasemije minor i talasemije major.

Posebno je zanimljiv slučaj pacijenta koji je homozigot za β^0 –talasemiju, koji nema frakciju Hb A a nije zavisao od transfuzija. Prisustvo HPFH mutacije -158 G γ "obezbedilo" je ovom pacijentu fenotip β -talasemije intermedije.

β -talasemija intermedija je zanimljiva grupa sindroma koja se manifestuje na najrazličitije načine. Osnovne kliničke manifestacije su: anemija, ikterus, hepatosplenomegalija i blago izražene modifikacije kostiju. Pacijenti nisu na regularnom transfuzionom režimu. Transfuzije su povremeno neophodne, naročito u fiziološko stresnim situacijama, kao što su trudnoća, infekcije itd.

U osnovi ovih sindroma su defekti oba β -globinska gena. Hematološka slika je identična onoj kod talasemije major, samo je anemija slabije izražena. I elektroforetski patern odgovara onom kod talasemije major tipa. Jedina razlika se primećuje u odnosu α - i β - globinskih lanaca. Disbalans je kod talasemije intermedije znatno manje izražen nego kod talasemije major. Koji su molekularni mehanizmi sposobni da utiču na smanjenje nivoa α -globina, koji su u slučaju inaktivacije oba β -globinska gena u ogromnom višku, i da tako ublaže kliničku sliku talasemije major?

Registrovano je više mehanizama koji stoje u molekularnoj osnovi talasemije intermedije:

- 1) Blagi β -talasemični aleli. Homozigoti i dvostruki heterozigoti za pojedine mutacije u β -globinskom genu daju kliničku sliku talasemije intermedije. To su: β^+ -29, β^+ -87, β^+ -88, β^+ -101, β^+ +1, β^+ IVS I-6, β^+ 26 (β 26-HbE), β^+ 27 (β 27-Hb Knossos), β^+ 24, β^+ polyA signal (Rosatelli MC et al. 1989).
- 2) Koegzistencija α -talasemije. Brojne studije u različitim populacijama su pokazale da prisustvo α -talasemije može ublažiti kliničke i hematološke manifestacije β -talasemije bilo u heterozigotnom ili homozigotnom stanju

(Melis MA et al. 1983.; Kanavakis E et al. 1982.). Homozigoti za β^0 – mutacije ili dvostruki heterozigoti za β^0 – i β^+ -mutacije, imaju fenotip talasemije intermedije ako su im deletirana 2 α -globinska gena ($--/\alpha\alpha$ ili $-\alpha/-\alpha$) ili postoji tačkasta mutacija u $\alpha 2$ -genu. Dve mutacije β^+ -tipa udružene sa α -globinskim lokusom u kome je deletiran samo 1 gen ($-\alpha/\alpha$), takođe daju sliku talasemije intermedije.

- 3) Povećanje produkcije γ -globinskog lanca. Homozigoti za $\delta\beta$ talasemiju kao i složeni heterozigoti ($\delta\beta$ - i β -talasemija) imaju fenotip talasemije intermedije (Stamatoyannopoulos G & Nienhuis AW. 1987.). HPFH poreklom od delecionih i nedelecionih mutacija udružen sa mutiranim β -globinskim genima takođe daje srednje tešku kliničku sliku talasemije. U ovaj tip genetičkih modifikatora se ubraja i mutacija -158 Gy.
- 4) Ostali slučajevi. Heterozigotna β -talasemija udružena sa tripliciranim α -globinskim genom, bilo u homozigotnom ili heterozigotnom stanju ($\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$ ili $\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$), daje sliku talasemije intermedije (Kanavakis E et al. 1983.). Hipernestabilne hemoglobinske varijante, mogu eksprimirati klinički relevantan fenotip, čak i kad su prisutne u jednoj kopiji.

U našim istraživanjima detektovano je nekoliko interesantnih genotipova koji su rezultovali fenotipom talasemije intermedije. Mehanizmi "ublažavanja" kliničke slike bili su veoma različiti, ali u skladu sa znanjima koja imamo o genetičkoj osnovi β -talasemije intermedije.

Posebno je zanimljiv slučaj dvostrukog heterozigota za mutacije β^+ IVS I-6 (T→C) i β^+ IVS II-848 (C→A), koji je imao kliničku sliku talasemije intermedije, mada mutacija u drugom intronu, po uticaju koji ima na regulaciju ekspresije β -globinskog gena, ne spada u blage talasemijske mutacije.

β -talasemijske mutacije u SR Jugoslaviji su mediteranskog tipa

Mutacije koje uzrokuju β -talasemije u našoj populaciji (osim već apostrofirane mutacije β^0 44), su mediteranskog tipa. U tabeli 6 je predstavljena rasprostranjenost različitih β -talasemijskih mutacija u Makedoniji (Dimovski A et al. 1990.), Bugarskoj (Petkov GH et al. 1990.), Grčkoj (Kattamis C et al. 1990.), Italiji (Pirastu M et al. 1988.), Kipru (Baysal E et al. 1992.), Turskoj (Oner R et al. 1990.), Republikama Češkoj i Slovačkoj (Indrak K et al. 1992.) i Nemačkoj (Laig M et al. 1990.). Najučestalije mutacije u našoj zemlji (β^0 39 i β^+ IVSI-110) su najzastupljenije i u drugim, nama susednim populacijama. Interesantno je da je u makedonskoj populaciji, mutacija β^0 39 vrlo retka.

Makedonija	IVSI-110 (45 %)	IVSI-6 (29 %)	IVSI-1 (10 %)	polyA (4 %)	kodon 39 (4 %)
Bugarska	IVSI-110 (24 %)	kodon 39 (22 %)	IVSI-6 (10 %)	IVSII-745 (10 %)	kodon 8 (5 %)
Grčka	IVSI-110 (43 %)	kodon 39 (17 %)	IVSI-1 (13 %)	IVSI-6 (7 %)	IVSII-745 (7 %)
Italija	kodon 39 (44 %)	IVSI-110 (22 %)	IVSI-1 (10 %)	IVSI-6 (8 %)	IVSII-745 (5 %)
Kipar	IVSI-110 (77 %)	IVSI-6 (7 %)	IVSI-1 (7 %)	IVSII-745 (6 %)	kodon 39 (2 %)
Turska	IVSI-110 (39 %)	IVSI-6 (18 %)	IVSII-1 (12 %)	kodon 8 (7 %)	kodon 39 (4 %)
Češka i Slovačka	IVSI-1 (45 %)	IVSII-1 (14 %)	kodon 121 (12 %)	IVSI-110 (5 %)	IVSII-745 (4 %)
Nemačka	kodon 39 (50 %)	IVSI-110 (8 %)	IVSII-1 (5 %)	IVSI-1 (3 %)	
SR Jugoslavija	kodon 39 (29 %)	IVSI-110 (26 %)	IVSII-745 (14 %)	kodon 44 (9 %)	-87 (7 %)

Tabela 6. Distribucija β -talasemijskih mutacija u Mediteranu i drugim delovima Evrope (uključujući i podatke o jugoslovenskoj populaciji koji su rezultat naših istraživanja)

Neophodno je istaći da je molekularna osnova talasemija istraživana na našim prostorima u poslednjih 25 godina (Efremov GD. 1992.). Ipak, Efremov et al. naglašavaju da je ogromna većina analiziranih pacijenata poreklom iz Makedonije (više od 80%), pa se naša istraživanja mogu smatrati početkom sistematskog molekularnog skrininga na prostorima R Srbije i R Crne Gore.

Strategija skrininga talasemijskih mutacija u SR Jugoslaviji

Preventivni genetički programi, bazirani na masovnom skriningu populacije u kombinaciji sa genetičkim savetom i prenatalnom dijagnozom, su predloženi kao metoda kojom se može staviti pod kontrolu jedno autozomno recesivno oboljenje u čitavoj populaciji (Kaback MM et al. 1974.). Preduslovi za izbor ovakve strategije su: bolest je vrlo učestala u datoj populaciji, teška i potencijalno fatalna; postoje jednostavne metode za identifikaciju nosilaca genetičkih determinanti bolesti; i prenatalna dijagnoza je moguća. Ovakvi programi su aktivni u Italiji, Grčkoj, na Kipru i drugim oblastima gde je učestalost talasemija velika (na primer, grad London) (Cao A et al 1990b.; Loukopoulos D et al. 1990.). Oni su se pokazali kao veoma efikasni. Rađanje dece obolele od talasemije major smanjeno je za 90% tokom petnaest godina primene ove strategije na Sardiniji i na Kipru (WHO 1985.; Cao A et al. 1991.).

U našoj zemlji talasemije ne predstavljaju veliki zdravstveni problem. Njihova učestalost u našoj populaciji nije izrazito velika. Zbog toga smo mišljenja da je strategija ograničenog skrininga dovoljna za kontrolu talasemijskih sindroma na ovim prostorima. Osposobljavanje kliničko-bolničkih centara, u kojima se stiču nosioci talasemijskih mutacija, za primenu osnovnih metoda skrininga (elektroforeza Hb, određivanje nivoa HbA₂ i HbF, otkrivanje nestabilnih Hb) leži u

osnovi našeg predloga borbe sa ovom bolešću. Stalna edukacija nosilaca, aktivna uloga genetičkog savetovališta i primena prenatalne dijagnostike su od suštinskog značaja za funkcionisanje ovog preventivnog programa.

Naš rad je stvorio preduslove za sistematski pristup detekciji talasemijskih sindroma u nas. Predložene su efikasne metode analiza kako hematološkog, tako i biohemijskog i genetičkog statusa pacijenta. Dijagnostika talasemijskih sindroma je bazirana na minimalnom broju potrebnih analiza.

Dalja istraživanja i kumulacija znanja o prirodi talasemijskih sindroma u nas, kao i potpunija slika o njihovoj molekularnoj osnovi, staviće na probu naše zaključke i predloge i promeniti ih, a sve u cilju kontrole i prevencije ove bolesti.

ZAKLJUČCI

Istraživanja korelacije fenotipa i genotipa kod širokog spektra talasemijskih sindroma dovela su do sledećih zaključaka:

- 1) Hematološke i kliničke manifestacije mutacija u β -globinskim genima varijaju u zavisnosti od nivoa regulacije ekspresije β -globinskog gena koji je narušen datom mutacijom, kao i od genetskog konteksta u kome se nalazi mutacija, kako *in cis*, tako i *in trans*
- 2) Heterozigotni nosioci tačkastih mutacija u β -globinskom genu imaju skoro isključivo kliničku sliku β -talasemije minor tipa (β -talasemija trait)
- 3) Heterozigotni nosioci β -talasemičnog gena β^{044} (-C) u jugoslovenskoj populaciji imaju kliničku sliku blage β -talasemije intermedije i neuobičajeno nizak nivo minorne adultne hemoglobinske frakcije (Hb A₂)

- 4) Heterozigotni nosioci mutacije $\beta^+ \text{IVS I-6 (T} \rightarrow \text{C)}$, u kombinaciji sa genotipom $+/\beta^+$, mogu imati potomka sa kliničkom slikom β -talasemije major
- 5) Heterozigotni nosioci mutacije $\beta^+ \text{-87 (C} \rightarrow \text{G)}$ mogu biti hematološki i klinički asimptomski
- 6) Hb Lepore je β^+ -talasemični alel
- 7) Genetička determinanta $\text{G}\gamma \text{-158}$ ima ulogu genetičkog modifikujućeg faktora ("maskira" kliničku sliku β -talasemije minor i "ublažava" kliničku sliku β -talasemije major)
- 8) Dvostruki heterozigot za mutacije $\beta^+ \text{IVS I-6 (T} \rightarrow \text{C)}$ i $\beta^+ \text{IVS II-848 (C} \rightarrow \text{A)}$ daje sliku talasemije intermedije
- 9) Heterozigotni nosilac mutacije $\beta^0 \text{IVS I-1 (G} \rightarrow \text{A)}$ uz istovremeno nasleđen "višak" α -globinskih gena ($\alpha\alpha/\alpha\alpha^{3,7}$) ispoljava kliničku talasemije intermedije

Istraživanja talasemijskih sindroma u jugoslovenskoj populaciji su pokazala:

- 1) Otkrivene su 23 porodice (60 hromozoma) u kojima su detektovane talasemijske ili talasemijama slične mutacije
- 2) Tri mutacije obuhvataju 70% analiziranih hromozoma: Hb Lepore, $\beta^0 \text{-39 (C} \rightarrow \text{T)}$ i $\beta^+ \text{IVS I-110 (G} \rightarrow \text{A)}$
- 3) Hb Lepore je najčešći uzročnik β -talasemije u SR Jugoslaviji (30%)
- 4) Svi Lepore hromozomi su tipa Boton Washington i vezani za isti polimorizam (subhaplotip 2). Populaciono genetičke studije sugerišu pretpostavku da je ova mutacija nastala na jugoslovenskim prostorima, nezavisno od mutacija istog tipa prisutnih na drugim geografskim lokacijama.

- 5) Otkrivena je retka hemoglobinska varijanta Hb Sabine, sa neuobičajeno blagom kliničkom slikom i izrazito povišenim nivoom HbF.
- 6) Na osnovu istraživanja predložena je strategija hematološkog, biohemijskog i genetičkog skrininga jugoslovenske populacije na talasemijske sindrome, i ustanovljeni osnovni principi funkcionisanja genetičkog savetovališta za ove sindrome
- 7) Urađene su prve prenatalne dijagnoze talasemijskih sindroma u nas

Posle zaključka - nekad

Svaki period i istoriji imao je svoj etički ideal. Kod starih Grka to je bila *kalokagatija* (ideal o lepom čoveku, fizički i moralno lepom). U doba Renesanse ljudi su stremili idealu koji se može obuhvatiti terminom - *homo universale*. To je bilo vreme genijalnih ljudi koji su u sebi objedinjavali i velike naučnike i sjajne umetnike. Racionalizam je promovisao novi ideal – *homo faber* (kovač). Samosvest i razum su podignuti na pijedestal sa koga se može upravljati čovekovom srećom. Naše doba obeleženo je otkrivanjem velikih tajni prirode. Makrokosmos i mikrokosmosom nisu više za čoveka nepoznanice, a sam čovek je najintragantniji objekat velikog broja naučnih disciplina. Humana genetika je među njima jedna od najinteresantnijih jer je pitanje nasleđa veoma značajno za potpunu demistifikaciju biološkog aspekta čoveka. Pored fundamentalnog značaja, humana genetika, preko svojih disciplina, ima ulogu u životu čoveka i kao primenjena nauka. Klinička genetika, na primer, brine o zdravlju čoveka. Njen značaj nije samo u tome što pomaže ljudima da uspešnije savlađuju nasledne bolesti, već i u tome što određenim porodicama omogućuje da imaju zdravo potomstvo uprkos riziku kome ih je priroda izložila. Prenatalna dijagnostika se, tako, direktno umešala u 'stvari' prirode. U nekom ranijem trenutku to nije bilo moguće, ne samo zbog materijalnih pretpostavki, već i zbog etičkih opredeljenja ljudi. Danas žive ljudi koji ne priznaju zabranjene zone. Sve što se radi za dobrobit čoveka je dozvoljeno. A još je *Cicieron* mudro zaključio da 'ljudi ničim bliže ne pristupaju bogovima nego spašavanjem ljudi' (*Homines ad deos nulla re propius accedunt quam salutem hominibus dando*). Tako stižemo do etičkog ideala našeg vremena. Čovek je danas dovoljno hrabar da bi želeo ne samo da spozna sve što ga okružuje, pa i samoga sebe, već da ti svekolikim kretanjima i ovlada. To je pravo pripadalo samo bogovima. Uzdám se u to da smo jednako mudri koliko i hrabri i da ćemo u tome uspeti.

Sonja Pavlović

Diplomski rad

Beograd, 1992. godine

Posle zaključka – sad

Ovako su izgledali snovi mladog naučnika na samim počecima karijere. Tada nisam znala koliko su oskudna naša znanja o molekularnoj osnovi različitih bolesti, koliko ograničene naše mogućnosti da pomognemo u lečenju ljudi. Tada nisam ni predpostavljala šta znači baviti se molekularnom genetikom u Srbiji.

Ipak, ako prepoznamo svoje mesto u svekolikom poretku stvari, uprkos svemu, snovi mogu da postanu stvarnost. Posle krivudavog puta na kome je centar mog istraživačkog sveta postao jedan anemični pacov, ponovo sam se približila svom naučnom snu. Moj naučni rad je danas neraskidivo povezan sa kliničkom genetikom. Istina, još uvek sam samo dijagnostičar. Primenjujem principe negativne eugenetike. Dajem "nepopularne" genetičke savete.

Ali, snovi se nastavljaju. Uprkos tome što, sada sam toga još svesnija, malo znam, i što živim na ovom, za nauku, tako neprijateljskom meridijanu, verujem da ću jednoga dana porasti do terapeuta. Bila sam svedok koraka od sedam milja kojima je nauka napredovala u poslednjih deset godina. Sigurna sam da se taj put nastavlja i ka mom novom snu – genskoj terapiji.

Na kraju, moram da primetim da se moje aspiracije više uopšte ne odnose na božansku funkciju naučnika u životu ljudi. Za mene su postali jedino važni: osmeh zdravog deteta, stisak ruke ohrabrenih roditelja, pogled nade utešenog čoveka. Tako se ostvaruje moj san. Zbog toga sam sanjala i sanjam i dalje.

Sonja Pavlović

Doktorska teza

Beograd, 2001. godine

LITERATURA

Adams JG & Coleman MB. Structural hemoglobin variants that produce the phenotype of thalassemia. *Semin Hematol* 27: 229. 1990.

Albitar M, Peschle C, Lieberhaber SA. Theta, zeta and epsilon globin messenger RNAs are expressed in adults. *Blood* 74: 629, 1989.

Allen DW, Shroeder WA, et al. Observation on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobins. *A Am Chem Soc* 80: 1628. 1958.

Alperin JB, Dow PA, et al. Hemoglobin A levels in health and various hematologic disorders. *Am J Clin Pathol* 67: 219. 1977.

Ansabel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K.: Current protocol in molecular biology. Publishing Assoc. and Interscience, 1990.

Antonarakis SE, Boehm CD, Giardina PJV, Kazazian HH Jr. Nonrandom association of polymorphic restriction sites in the β -globin gene clusters. Proc Natl Acad Sci USA 79: 137. 1982a.

Antonarakis SE, Kazazian HH Jr, Orkin SH. DNA polymorphism and molecular pathology of the human globin gene clusters. Hum Genet 69: 1. 1985.

Antonarakis SE, Orkin SH et al. Beta thalassemia in American blacks: Novel mutations in the TATA box and an acceptor splice site. Proc Natl Acad Sci USA 81: 1154. 1984.

Antonarakis SE, Orkin SH, Kazazian HH, Goff SB, Boehm CD, Waber PG, et al. Evidence for the multiple origin of the β -E globin gene in Southeast Asia. Proc Natl Acad Sci USA 79: 6608. 1982b.

Antoniou M, deBoer E, Habets G, Grosveld F. The human β -globin gene contains multiple regulatory regions: identification of one promoter and two downstream enhancers. EMBO.J. 7: 377-384, 1988.

Antoniou M, Grosveld F. β -globin dominant control region interacts differently with distal and proximal promoter elements. Genes & Dev. 4: 1007-1013, 1990.

Atweh GF, Wong C, Reed R, et al. A new mutation in IVS-I of the human β -globin gene causing β -thalassemia due to abnormal splicing. Blood 70: 147. 1987.

Baglioni C. The fusion of two peptide chains in hemoglobin Lepore and its interpretation as a genetic deletion. Proc Natl Acad Sci USA 48: 1880-1886. 1962.

Baserga SJ and Benz EJ Jr. β -globin nonsense mutation: deficient accumulation of mRNA occurs despite normal cytoplasmatic stability. Proc Natl Acad Sci USA 89: 2935. 1992.

Baysal E, Indrak K, Bozkurt G, et al. The β -thalassaemia mutations in the population of Cyprus. Br J Haematol 81: 607. 1992.

Beksedić D, Čuharska T, Stojimirović E, Dinić B. Rasprostranjenost hemoglobinopatija u SR Srbiji. U Hemoglobin i hemoglobinopatije, Zavod za transfuziju krvi SR Srbije, Beograd. 1980.

Benesch RE, Ranney HM, et al. The chemistry of the Bohr effect: Some properties of hemoglobin H. J Biol Chem 236: 2926. 1961.

Benesh R and Benesh RE: The effect of organic phosphate from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin. Biochem Biophys Res Commun 26:162. 1967.

Benz EJ Jr, Forget BG, et al. Variability in the amount of beta-globin mRNA in beta thalassemia. Cell 14: 299. 1978.

Benz EJ Jr. The hemoglobinopathies. In: Kelly WN, DeVita VT (eds): Textbook of Internal Medicine. JB Lippincott, Philadelphia: 1423, 1988.

Berman BW, Ritchey AK, Jeckel JF, et al. Hematology of beta-thalassemia trait: age-related developmental aspects and intra-familial correlations. J Pediatr 97: 901. 1980.

Beutler E. In Williams Hematology, 5th edition. Ed. E. Beutler et al. McGraw-Hill, Inc. New York, 1995.

Bogoevski P, Efremov GD, Kezic J, et al. Hb Sabine in Yugoslavian boy. Hemoglobin 7: 195. 1983.

Bohr C, Hasselbach K, et al. Über einen in biologischer beziehung wichtigen Einfluss, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung. *Scan Arc Physio* 16: 402, 1904.

Boissel JP, Kasper TJ, Shah SC et al. Amino-terminal processing of proteins: hemoglobin South Florida, a variant with retention of initiator methionine and N-acetylation. *Proc natl Acad Sci USA* 82: 8448. 1985.

Bookchin RM and Gallop PM. Structure of hemoglobin A1c: nature of the N-terminal β -chain blocking group. *Biochem Biophys Res Commun* 32: 86. 1968.

Bowden DK, Hill AV, Higgs DR, Oppenheimer SJ, Weatherall DJ, Clegg JB. Different hematologic phenotypes are associated with the leftward and rightward α -thalassemia deletions. *J Clin Invest* 79: 39. 1987.

Bowden DK, Vickers MA, Higgs DR. A PCR based strategy to detect the common severe determinants of α -thalassaemia. *Br J Haemat* 81: 104. 1992.

Boyer SH, Belding TK, et al. Fetal hemoglobin restriction to few erythrocytes (F cells) in normal human adults. *Science* 188: 361. 1974.

Braverman AS & Bank A. Changing rates of globin chain synthesis during erythroid cell maturation in thalassemia. *J Mol Biol* 42: 57. 1969.

Brinster RL, Allen JM, et al. Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 836. 1988.

Bunn FH. Human hemoglobins: normal and abnormal. in Nathan and Oski's *Hematology of Infancy and Childhood*, 5th edition. ed. DG Nathan and SH orkin, WB Saunders Company, Philadelphia, str, 730. 1988.

Bunn HF i Forget BG: *Hemoglobin: Molecular, genetic and clinical aspects*. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1986.

Bunn HF and Briel RW. The interaction of 2,3-DPG with various human hemoglobins. *J Clin Invest* 49: 1088. 1970.

Bunn HF, Haney DN, et al. Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A1c. *Biochem Biophys Res Commun* 67:103. 1975.

Bunn HF. Subunit assembly of hemoglobin: an important determinant of hematologic phenotype. *Blood* 69:1. 1987.

Busslinger M, Moschonas N, Flavel RA. β^+ -thalassemia: aberrant splicing results from a single point mutation in intron. *Cell* 27: 289. 1981.

Cacciari et al.: *Principi e pratica di pediatria*. Monduzzi Editore, str.152, 1990.

Cai SP & KanYW. Identification of the multiple beta-thalassemia mutations by denaturing gradient gel electrophoresis. *J Clin Invest* 85: 550. 1990.

Cao A, Gasperini D, Podda A, Galanello R. Molecular pathology of thalassemia intermedia. *Euro J Int Med* 1: 227. 1990a.

Cao A, Rosatelli MC, Galanello R. Population-based genetic screening. *Curr Opinion Gen &Dev* 1: 48. 1991.

Cao A, Rosatelli MC, Leoni GB, et al. Antenatal diagnosis of β -thalassemia in Sardinia. *Ann NY Acad Sci* 612:215. 1990b.

Cao SX, Gitman PD, Dave HPG et al. Identification of a transcriptional silencer in the 5'-flanking region of the human epsilon-globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 5306. 1989.

Cao, A., Galanello, R.: *Le Emoglobinopatie*. In: *Trattato italiano di medicina di laboratorio*. A. Burlina (ed.) Piccin, 1994.

Carver, M.F.H., Huisman, T.H.J.: IHIC Variant List. *Hemoglobin* 21: 505, 1997.

Chang DD and Sharp PA. Messenger RNA transport and HIV rev regulation. *Science* 249: 614. 1990.

Chanutin A and Curnish RR. Effect of organic and inorganic phosphates on the oxygen equilibrium of human erythrocytes. *Arc Biochem Biophys* 121: 96. 1967.

Charnay P, Mellon P, Maniatis T. Linker scanning mutagenesis of the 5'-flanking region of the mouse β -major-globin gene: sequence requirements for transcription in erythroid and nonerythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1498-1511, 1985.

Cheng TC, Orkin SH, Antonarakis SE et al. β -thalassemia in Chinese: use of in vitro RNA analysis and oligonucleotide hybridization in systematic characterization of molecular defects. *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 2821. 1984.

Clegg JB, Weatherall DJ, Milner PG. Haemoglobin Constant Spring – a chain termination mutant. *Nature* 234: 337. 1971.

Clegg, J.B.: Hemoglobin Synthesis. In: Weatherall, D.J. (ed) *The Thalassemias. Methods in Hematology Vol 6.*: 54. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983.

Codrington JF, Li HW, Kutlar F, Gu LH, Ramachandran M, Huisman THJ. Observations on the levels of Hb A2 in patients with different β -thalassemia mutations and a δ -chain variant. *Blood* 76: 1246. 1990.

Coleman MB, Steinberg MH, Adams JG. Hemoglobin Terre Haute, a posthumous correction to the original structure of hemoglobin Indianapolis. *J Biol Chem* 266: 5798. 1991.

Collins FS and Weissman SM. The molecular genetics of human hemoglobin. *Prog. Nucl. Acid. Research and Molecul. Biology* 31: 315-462. Academic Press, Inc. New York, 1984.

Cooley TB, Lee P. A series of cases of splenomegaly in children with anemia and peculiar bone changes. *Trans Am Pediatr Soc* 37:29, 1925.

Cooley TB, Witwer ER, Lee P. Anemia in children with splenomegaly and peculiar changes in bones. report of cases. *Am J Dis Child* 34: 347. 1927.

Craig JE, Kelly SJ, Barnetson R, Thein SL. Molecular characterization of a novel 10.3 kb deletion causing β -thalassemia with unusually high Hb A2. *Br J Haematol* 82: 735. 1992.

Craing JE et al. *Blood* 83:1673. 1994.

Cunningham TM. Hemoglobin E in Indochinese refugees. *West J Med* 137: 186. 1982.

deBruin SH and Janssen LHM. Comparison of the oxygen and proton binding behavior of human hemoglobin A and A2. *Biochim Biophys Acta* 295: 490. 1973.

Deisseroth A, Nienhuis AW, et al. Chromosomal localization of the human beta-globin gene on chromosome 16 in somatic cell hybrids. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 1459. 1978.

Deisseroth A, Nienhuis AW, et al. Localization of the human alpha-globin structural gene to chromosome 16 in somatic cell hybrids by molecular hybridization assay. *Cell* 12: 205. 1977.

Deka R, Decroo S, Mei YL, Ferrell RE. Variable number of tandem repeat (VNTR) polymorphism at locus D17S5 (YNZ22) in four ethnically defined human populations. *Hum Genet* 90: 86. 1992.

Diaz-Chico JC, Huang HJ, et al. Two new large deletions resulting in $\gamma\delta\beta$ -thalassemia. *Acta Haematol.* 80: 79. 1988.

Dillon N and Grosveld F. Transcriptional regulation of multigene loci: multilevel control. *Trends in Genetics* 9: 134-137, 1993.

Dimovski A, Efremov DG, Jankovic L, Juricic D, Zisovski N, Stojanovski N, Nikolov N, Petkov GT, Reese AL, Stoming TA, Efremov GD, Huisman THJ. Beta-thalassaemia in Yugoslavia. Hemoglobin 14: 15-24, 1990.

Dode C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{\text{anti}3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. Br J Haematol 82: 105. 1993.

Dover GJ, Smith KD, et al. Fetal hemoglobin production is controlled by a gene on the X-chromosome in normal adults and sickle cell patients. Blood 76:59a. 1990.

Dozy AM, Kan YW, Embury SH, et al: α -globin gene organization in blacks precludes the severe form of α -thalassaemia. Nature 280:605-607, 1979.

Driscoll MC, Dobkin CS, et al. Gamma delta beta thalassaemia due to a de novo mutation deleting the 5' beta-globin gene activation- region hypersensitive sites. Proc Natl Acad Sci USA 86: 7470. 1989.

Efremov DG, Efremov GD, Zisovski N, Stojanovski N, Kutlar F, Diaz-Chico JC, Kutlar A, Yang KG, Stoming TA, Huisman THJ. Variation in clinical severity among patients with Hb Lepore-Boston-beta-thalassaemia is related to the type of beta-thalassaemia. Br J Haematol 68:351. 1988.

Efremov GD, Duma H, Ruvdite R, et al. Hb Beograd or $\alpha 2\beta a$ 121 Glu \rightarrow Val. Biochim Bioph Acta 138: 81. 1973.

Efremov GD, Juricic D, Stojanovski N. Hemoglobinopathies in Yugoslavia. Hemoglobin 6: 643. 1982.

Efremov GD. Hemoglobinopathies in Yugoslavia – un update. Hemoglobin 16:531. 1992.

Embury SH, Miller JA, Dozy AM, et al: Two different molecular organizations account for the single α -globin gene of the α -thalassemia-2 genotype. *J Clin Invest* 66:1319, 1980.

Evans T, Felsenfeld G. *trans*- Activation of a globin promoter in nonerythroid cells. *Mol. Cell. Biol.* 11: 843-853, 1991.

Faustino P, Osorio Almeida L, Barbot J et al. Novel promoter and splice junction defects add to the genetic, clinical or geographical heterogeneity of β -thalassemia in Portuguese population. *Hum Genetic* 89: 573. 1992.

Fearon ER, Kazazian HJ, et al. The entire beta-globin gene cluster is deleted in a form of gamma-delta-beta thalassemia. *Blood* 61: 1269. 1983.

Feingold EA & Forget BG. The breakpoint of a large deletion causing HPFH occurs within an erythroid DNA domain remote from the beta-globin gene cluster. *Blood* 7: 2178. 1989.

Fermi G, Perutz MF et al. The crystal structure of human deoxyhemoglobin at 1.7 AA resolution. *J Mol Biol* 175:159. 1984.

Fessas P and Yataganas X. Intra-erythroblastic instability of hemoglobin beta (HbH). *Blood* 31: 323. 1968.

Fioretti G, De Angioletti M, Masciangelo F, Lacerra G, Scarallo A, deBonis C, Pagano L, Guarino E, De Rosa L, Salvati F. Origin heterogeneity of Hb-Lepore Boston gene in Italy. *Am J Hum Genet.* 50:781. 1992.

Fisher KD & Nowock J. The T to C substitution at -198 of the $A\gamma$ -globin gene associated with the British form of HPFH generates overlapping recognition sites for two DNA binding proteins. *Nucleic Acids Res* 18: 5685. 1990.

Flint J, Hill AV, et al. Alpha globin genotypes in two North European populations. *Br J Haematol* 63: 796. 1986.

Forget BG and Pearson HA. Hemoglobin Synthesis and the Thalassemias. in Blood: Principles and Practice of Hematology. Lippincott Company, Philadelphia. 1995.

Forget BG. The Thalassemia Syndromes. in Hematology basic principles and practise. Ed. Ronald Hoffman et al. Churchill Livingstone, Philadelphia. 2000.

Forrester WS, Takegawa S, Papayannopoulou T, Stamatayannopoulos G, Groudine M. Evidence for a locus activating region: the formation of developmentally stable hypersensitive sites in globin expressing hybrids. Nucleic Acids Res. 15: 10159-10177, 1987.

Frazer GR, Kitsos C, et al. Thalassemias, abnormal hemoglobins, and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the Arta area of Greece: diagnostic and genetic aspects of complete village studies. Ann NY Acad Sci 119:415. 1964.

Friedman MJ and Traeger W. The biochemistry of resistance to malaria. Sci Am 244: 154. 1981.

Friedman S, Schwartz E, et al. Variation in globin chain synthesis in hereditary persistence of fetal hemoglobin. Br J Haematol 32: 357. 1976.

Fritsch, E.F., Lawn R.M., Maniatis T.: Molecular cloning and characterization of the human β - like globin gene cluster. Cell 19: 959, 1980.

Galanello R, Barella S, Ideo A, et al. Genotype of subjects wit borderline hemoglobin A2 levels: Implication for β -thalassemia carrier screening. Am J Hemat 46: 79. 1994.

Galanello R, Dessi E, Melis MA et al. Molecular analysis of β -thalassemia intermedia in Sardinia. Blood 74: 823. 1989.

Galanello, R., Aru, B.: HbH disease in Sardinia: molecular, hematological and clinical aspects. Acta Haematologica 88: 1, 1992.

Galanello, R., Melis, M.A.: β - thalassemia trait in Sardinia. Hemoglobin 3: 33, 1979.

Garby L, Robert M, et al. Proton and carbamino-linked oxygen affinity of normal human blood. Acta Physiol Scan 84: 48 2. 1972.

Gasperini D, Galanello R, Melis MA, et al. Hb Sabine occurrence in a Sardinian individual with hemolytic anemia and inclusion bodies. Haematologica 77: 381. 1992.

Gelinas R, Bender M, et al. C to T at position -196 of the A gamma gene promoter. Blood 67: 1777. 1986.

Ghanem N, Girodon E, Vidaud M, Martin J, Fanen P, Plassa F, Goosens M. A comprehensive scanning method for rapid detection of β -globin gene mutations and polymorphisms. Human Mutation 1:229. 1992.

Gibbons RJ and Higgs DR. The α -thalassemia /mental retardation syndromes. Medicin Baltimore 75:45. 1996.

Gibbons RJ, Vickets DJ, Villard L, Higgs DR. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation associated with α -thalassemia (ATR-X sindrom). Cell 80: 837. 1995.

Gilman JG & Huisman THJ. DNA sequence variatio associated with elevated fetal γ -gamma globin production. Blood 66: 783. 1985.

Gonzales Redondo JM, Kattamis C, Huisman THJ. Characterization of three types of β^0 thalassemia resulting from a partial deletin of the β -globin gene. Hemoglobin 13: 377. 1989.

Gonzales Redondo JM, Stoming TA, et al. A C \rightarrow T substitution at nt-101 in a conserved DNA sequence of the promoter region of the beta-globin gene is associated with "silent" beta-thalassemia. Blood 73: 1705. 1989.

Goosens M, Dumez Y, Kaplan L, Lupker M, Charbet C, henrion R, Rosa J. Prenatal diagnosis of sickle cell anemia in the first trimester of pregnancy. *N Eng J Med* 309: 831. 1983.

Goosens M, Lee KY, Liebhaber SA, Kan YW. Globin structural mutant α 125 Leu→Pro is a novel cause of α -thalassemia. *Nature* 296: 864. 1982.

Gottardi, E, Losekoot M, Fodde R, Saglio G, Camashella C, Bernini LF. Rapid identification by denaturing gradient gel electrophoresis of mutations in the γ -globin gene promoters in non-deletion type HPFH. *Br J Haematol* 80: 533. 1992.

Grosveld F, van Assendelft GB, Greaves D, Kollias G. Position-independent high-level expression of the human β -globin gene in transgenic mice. *Cell* 51: 975. 1987.

Harteveld CL. The molecular genetics of α -thalassemia. PhD thesis. University of Leiden. Netherlands. 1998.

Hatton C, Wilkie AOM, Drysdale HC, et al. α -thalassemia caused by a large (62 kb) deletion upstream of the human α globin gene cluster. *Blood* 76: 221. 1990.

Helder J and Deisseroth A. S1 nuclease analysis of α -globin gene expression in preleukemic patients with acquired hemoglobin H disease after transfer to MEL cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 2387. 1987,

Heller P and Yakulis V. The distribution of hemoglobin A2. *Ann NY Acad Sci* 165:54. 1968.

Henthorn PS, Smithies O, et a. Molecular analysis of deletions in the human beta-globin gene cluster: deletion junctions and locations of breakpoints. *Genomics* 6: 226. 1990.

Hess JF, Schmid CW, Shen CK. A gradient of sequence divergence in the human adult α -globin duplication units. *Science* 226: 67. 1984.

- Higgs DR, Goodbourn SEY, Lamb J, et al: α -thalassemia caused by a polyadenilation signal mutation. *Nature* 306:398. 1983.
- Higgs DR, Pressley L, Aldridge B, Clegg JB, Weatherall DJ, Cao A, et al. Genetic and molecular diversity in nondeletion HbH disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 5833. 1981.
- Higgs DR, Wood WG, Jarman AP et al. A major positive regulatory region located far upstream of the human α -globin gene locus. *Genes & Dev*4:1588, 1990.
- Higgs DR. α -Thalassaemia. *Bailliere 's Clinical Haematology*: 6 . 1993.
- Higgs, D.R., Vickers, M.A. Wilkie A.O.M.: A review of the molecular genetics of the human α - globin gene cluster. *Blood* 73: 1081, 1989.
- Hsu SL, Marks J, Shaw JP et al. Structure and expression of the human theta globin gene. *Nature* 331:44, 1988.
- Huang SZ, Wong C, et al. The same TATA box beta thalassaemia mutation in Chinese and US Blacks: another example of independent origins of mutation. *Hum Genet* 74: 152. 1986.
- Huehns ER and Farooqui AM. Oxygen dissociation properties of human embryonic red cells. *Nature* 254: 335. 1975.
- Huisman THJ and Schroeder WA: New aspects of the structure, function and synthesis of hemoglobins. Boca Raton, FL, CRC Press, 1971.
- Huisman THJ. Separation of hemoglobins and hemoglobin chains by HPLC. *J of Chromat* 418: 277. 1987.
- Hull D, Winter PC, McHale CM, et al. Familial hemolytic anemia due to Hb Sabine identified by PCR. *Hemoglobin* 22: 263. 1998.
- Hunt DM, Higgs DR, Winichagoon P, et al. Haemoglobin Constant Spring has an unstable α -chain messenger RNA. *Br J Haematol.* 51: 405. 1982.

Indrak K Gu YC; Novotny J, Huisman THJ. A new α -thalassemia-2 deletion resulting in microcytosis and hypochromia and in vitro chain imbalance in the heterozygote. *Am J Hematol* 43: 144. 1993.

Indrak K, Brabec V, Indrakova , et al. Molecular characterization of β -thalassemia in Czechoslovakia. *Hum Genet* 88: 399. 1992.

Jones RT and Schroeder WA. Chemical characterization and subunit hybridization of human hemoglobin H and associated compounds. *Biochemistry* 2:1357. 1963.

Kaback MM, Zeiger RS, Reynolds LW. Approaches to the control and prevention of Tay-Sachs disease. in *Progress in medical genetics*. Ed. Steinberg Ag. Grune & Stratton. New York. 1974.

Kanavakis E, Metaxotou-Mavromati A, Kattamis C, Wainscoat JC, Wood WG. The triplicated α -gene locus and β -thalassemia. *Br J Haematol* 54: 201. 1983.

Kanavakis E, Tzotzos S, et al. Molecular basis and prevalence of α -thalassemia in Greece. *Birth defects* 23:377. 1988.

Kanavakis E, Wainscoat JS, Wood WG, et al. The interaction of α -thalassemia with heterozygous β -thalassemia. *Br J Haemat* 52: 465. 1982.

Karlson P. *Biokemija za studente medicine i kemije*. Školska knjiga, Zagreb. 1978.

Kattamis C, Hu H, Cheng G, et al. Molecular characterization of β -thalassaemia in 174 Greek patients with thalassaemia major. *Br J Haematol* 74: 342. 1990.

Kazazian HH Jr i Boehm CD: Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood* 72:1107, 1988.

Kazazian HH Jr, Dowling CE et al. The spectrum of beta-thalassemia genes in China and Southeast Asia. *Blood* 68: 964. 1986.

Kazazian HH Jr, Phillips JA, Boehm CD, Vik TA, Mahoney MJ, Ritchey AK. Prenatal diagnosis of β -thalassemias by amniocentesis: Linkage analysis using multiple polymorphic restriction endonuclease sites. *Blood* 56: 926. 1980.

Kazazian HH Jr, Dowling CE, et al. Thalassemia mutations in exon 3 of beta globin gene often cause a dominant form of thalassemia and show no predilection for malaria-endemic regions of the world. *Am J Hum Genet* 45: A242. 1989.

Kazazian HH Jr. The thalassemia syndromes: molecular basis and prenatal diagnosis in 1990. *Semin. Hematol.* 27:209, 1990.

Kinniburgh AJ, Maquat LE, et al. mRNA -deficient beta zero thalassemia results from a single nucleotide deletion. *Nucleic Acids Res* 10: 5421. 1982.

Kobayashi Y, Fukumaki Y, Komatsu N, et al. A novel globin structural mutant, Showa-Yakushiji (β 110 Leu \rightarrow Pro) causing a β -thalassemia phenotype. *Blood* 70: 1688. 1987.

Kosche K, Dobkin C, Bank A. The role of intervening sequence (IVS) in human β -globin gene expression. *Blood* 64: 58a. 1984.

Kozak M. The scanning model for translation: an update. *J Cell Biol.* 108: 229. 1989.

Kulozik AE, Kar BC, Serjeant GR, et al. The molecular basis of α -thalassemia in India: its interactions with the sickle cell gene. *Blood* 71: 467. 1988.

Lacerra G, Fioretti G, De Angioletti M, et al. $(\alpha)\alpha^{5.3}$: a novel α -thalassemia deletion with the breakpoints in the $\alpha 2$ -globin gene and in close proximity to an Alu family repeat between $\psi\alpha 2$ - and $\psi\alpha 1$ -globin genes. *Blood* 78: 2740. 1991.

LaFlamme S, Acuto S, Markowitz, D, Vick, L, Landschultz W, Bank A.
Expression of chimeric human α - and β -globin genes during erythroid differentiation.
J. Biol. Chem. 262: 4819-4826, 1987.

Laig M, Pape M, Hundrieser J, Flatz G. Mediterranean types of β -
thalassemia in the German population. Hum Genet 85: 135. 1990.

Lanclos KD, Patterson J, Efremov GD, Wong SC, Villegas A, Ojwang PJ, et
al. Characterization of chromosomes with hybrid genes for Hb Lepore-Washington,
Hb Lepore-Baltimore, Hb P-Nilotic, and Hb Kenya. Hum Genet 77: 40. 1987.

Lawn, RM, Efstratadis A, O'Connell C, Maniatis T. The nucleotide sequence of
the human β -globin gene. Cell 21: 647. 1980.

Lehman H, Casey R, et al. Hemoglobin Tak: a beta chain elongation. Br J
Haematol 31: 119, 1975.

Lehninger AL. Biochemistry. Worth Publisher Inc. New York. 1978.

Lewis BA & Orkin SH. A functional initiator element in the human β -globin
promoter. J Biol Chem 270: 28139. 1995.

Liang ST, Wong VC, et al. Homozygous alpha thalassemia: clinical
presentation, diagnosis and management. A review of 46 cases. Br J Obstet Gynaecol
92: 680. 1985.

Liebhaber SA, Cash FE, Ballas SK. Human α -globin gene expression. The
dominant role of the $\alpha 2$ locus in mRNA and protein synthesis. Journal of Biological
Chemistry 261: 15327. 1986.

Liebhaber SA, Cash FE, Main DM. Compensatory increase in $\alpha 1$ -globin gene
expression in individual heterozygous for the α -thalassemia-2 deletion. J Clin Invest
76: 1057. 1985.

Liebhaber SA. α - thalassemia. Hemoglobin 13: 685, 1989.

Livingstone FB. Abnormal Hemoglobins in Human Population. Aldine, Chicago, 1967.

Livingstone FB. Frequency Of Hemoglobin Variants. Oxford University Press, Inc. New York. 1985.

Loukopoulos D, Hadji A Papadakis M, et al. Prenatal diagnosis of thalassemia and of the sickle cell syndromes in Greece. Ann NY Acad Sci 612: 226. 1990.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J. Molecular Cloning, Second Edition, Cold Spring Harbor Lab., New York, 1989.

Mantovani R, Malgaretti N, Nicolis S, et al. The effect of HPFH mutations in the human γ -globin promoter on binding of ubiquitous and erythroid –specific nuclear factors. Nucleic Acids Res 16: 7783. 1988.

Maquat LE and Kinniburgh AJ. A β^0 -thalassemic β -globin RNA that is labile in bone marrow cells is relatively stable in HeLa cells. Nucleic Acids Res 13: 2855. 1985.

Maquat LE, Kinniburgh AJ, Rachmilewitz EA, et al. Unstable β -globin mRNA in mRNA –deficient β^0 -thalassemia. Cell 27:543. 1981.

Marengo-Rowe AJ: Rapid electrophoresis and quantitation of haemoglobin on cellulose acetate. J of Clin Pathol 18: 790. 1965.

Marinucci M, Mavilio F, Massa A, Gabbianelli M, Fontanarosa PP, Samoggia P, Tentori L. Hemoglobin Lepore Trait: haematological and structural studies on the Italian population. Br J Haematol 42: 557. 1979.

Masciangeo F, Salvati F, Riario Sforza G. Hemoglobinopathies and thalassemia syndromes in the hinterland of Lanciano, Italy. International Congress on Thalassemia. Sardinia. Italy. 1989.

Matherall JE, Collins FS, et al. Beta zero thalassemia caused by a base substitution that creates an alternative splice acceptor site in an intron. *EMBO J* 5: 2551. 1986.

Mc Donald MJ, Schapiro R, et al. Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J Biol Chem* 253: 2327. 1978.

Melis MA, Pirastu M, Galanello R, et al. Phenotypic effect of heterozygous α - and β -thalassemia interaction. *Blood* 62: 226. 1983.

Michelson AM and Orkin SH. Boundaries of gene conversion within the duplicated human α -globin genes. Concerted evolution by segmental recombination. *Journal of Biological Chemistry* 258:15245. 1983.

Milner PF, Clegg JB, Weatherall DJ. Haemoglobin H disease due to a unique haemoglobin variant with an elongated α -chain. *Lancet* 1: 729. 1971.

Milner PF. Thalassemias, Hemoglobinopathies and Sickle Cell Disease, *Hematology* 2:181, 1983.

Moi P, Paglietti R, et al. Delineation of the molecular basis delta- and normal HbA2 beta-thalassemia. *Blood* 72: 530. 1988.

Mosca A, Carpinelli A, Majavacca R, Cantu-Rainoldi A, Garatti M, Paleari R, Ferrari M, Agape V, Maccioni L, Pisano S, Galanello R. An Evaluation of DIAMAT HPLC Analyser for simultaneous determination of Hb A2 and F. *J. of Autom. Chem* 11: 273. 1989.

Mount SM. A catalogue of splice junction sequences. *Nucleic Acids Res* 10:459. 1982.

Mullis KB, Faloona FA, Scharf FA, Saiki RK, Horn GT, Erlich HA. Specific amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263. 1986.

Myers RM, Tilly K, Maniatis T. Fine structure genetic analysis of a β -globin promoter. *Science* 232: 613-618, 1986.

Nagel RL, Roth EF Jr.: Malaria and red cell genetic defects. *Blood* 74: 1213, 1989.

National Committee for Clinical Laboratory Standards: Detection of abnormal hemoglobin using cellulose acetate electrophoresis. NCCLS 6: No 9, H8 - A Villanova Schneider R.G. Developments in laboratory diagnosis. In: Abramson (ed) Sickle cell disease: 230, 1986.

Newton CR, Graham A, Hiptinstall LE. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17: 2503. 1989.

Nicholls RD, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall, DJ. α -thalassemia due to recombination between the $\alpha 1$ -globin gene and an Alu I repeat. *Blood* 65: 1434. 1985.

Nuez B, Michalovich D, et al. Defective hematopoiesis in fetal liver resulting from inactivation of the EKLF gene. *Nature* 375: 316. 1995.

Ohi S, Dixit M, Tillery MK, Plonk SG. Construction and replication of an adeno-associated virus expression vector that contains human β -globin cDNA. *Gene* 89: 279. 1990.

Old JM, Varawalla NY, Weatherall DJ. Rapid detection and prenatal diagnosis of β -thalassemia: studies in Indian and Cypriot population in the UK. *Lancet* 33: 834. 1990.

Oner R, Altay G, Gurgey A, et al. β -thalassemia in Turkey. *Hemoglobin* 14: 1. 1990.

Opfell RW, Orkin PA, Lehmann H. *J Med Genet* 5: 292. 1968.

Oppenheimer SJ, Higgs DR, Weatherall DJ, et al. α -thalassemia in Papua New Guinea. *Lancet* 2:424. 1984.

Orkin SH & Kazazian HH Jr. The mutation and polymorphism of the human β -globin gene and its surrounding DNA. *Annu Rev Genet* 18: 131. 1984.

Orkin SH & Nathan DG: The thalassemias, in Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood 5th edition, WB Sanders Company, Philadelphia, 1998.

Orkin SH, Antonarakis SE, et al. Abnormal processing of beta Knossos RNA. *Blood* 64: 311. 1984a.

Orkin SH, Antonarakis, SE, et al. Base substitution at position -88 in a beta-thalasemic globin gene. Further evidence for the role of distal promoter element CACCC: *J Biol Chem* 259: 8679. 1984b.

Orkin SH, Cheng TC, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr. Thalassemia due to a mutation in the cleavage-polyadenylation signal of the human β -globin gene. *EMBO J* 4: 453. 1985.

Orkin SH, Goff SC, et al. Heterogeneity of the DNA deletion in gamma-delta-beta thalassemia. *J Clin Invest* 67: 878. 1981.

Orkin SH, Kazazian HH Jr, Antonarakis SE et al. Linkage of β -thalassemia mutations and β -globin gene polymorphisms in the human β -globin gene clusters. *Nature* 296: 627. 1982b.

Orkin SH, Kazazian HH Jr, et al. Abnormal RNA processing due to the exon mutation of the beta E globin gene. *Nature* 300: 768. 1982a.

Orkin SH, Old JM, Weatherall DJ, Nathan DG. Partial deletion of β -globin gene DNA in certain patients with β^0 thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:2400. 1979.

- Orkin SH, Stylianos E, Antonarakis, and Haig H. Kazazian, JR:
Polymorphisms and Molecular Pathology of the Human Beta-Globine Gene.
Progress in Hematology. 1984c.
- Orkin SH. Globin gene regulation and switching: Circa 1990. Cell 63: 665-672, 1990.
- Ottolenghi S, Mantovani R, Nicolis S, et al. DNA sequences regulating human globin gene transcription in nondeletional HPFH. Hemoglobin 13: 523. 1989.
- Padgett RA, Grabowski PJ, Konaroka MM et al. Splicing of messenger RNA precursors. Annu Rev Biochem 55:1119. 1986.
- Paglietti E, Galanello R, Addis M, Cao A. Genetic counseling and genetic heterogeneity in the thalasseмии. Clin Gen 28: 1. 1985.
- Pasvol G, Weatherall DJ, et al. Effects on foetal haemoglobin on susceptibility of red cells to Plasmodium falciparum. nature 270:171. 1977.
- Pavlović S, Kovač M, Čvorkov- Dražić M i Zarić J. Molekularna dijagnostika Hb Lepore. Bilten za transfuziologe. 2001.
- Pavlović S, Mitrović T, Nikčević G, Grujičić N, Lazić D, Glišin V, Popović Z. The rat β_b^{miny} -globin promoter: nuclear protein factors and erythroid-specific induction of transcription. Cellular and Molecular Life Sciences 56, 871. 1999.
- Pearson HA. Thalassaemia intermedia: genetic and biochemical considerations. Ann NY Acad Sci 119: 390. 1964.
- Pembrey ME, McWade P, Weatherall DJ. Reliable routine estimation of small amounts of foetal haemoglobin by alkali denaturation. J of Clin. Pathol. 25: 738, 1972.
- Perutz F, Fermi G, et al. Stereochemistry of cooperative mechanisms in hemoglobin. Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 52: 555, 1987.

Perutz MF: Stereochemistry of cooperative effects of haemoglobin. *Nature* 228: 726, 1970.

Petkov GH, Efremov GD, Efremov DG, Dimovski A, et al. β -thalassemia in Bulgaria. *Hemoglobin* 14: 25. 1990.

Pirastu M, Kan WY, et al. Hemolytic disease of the newborn caused by a new deletion of the entire β -globin cluster. *J Clin Invest* 72: 602. 1983.

Pirastu M, Saglio G, Camaschella C, Loi A, Serra A, Bertero T, Gabutti W, Cao A. Delineation of specific β -thalassemia mutations in high-risk areas of Italy: a prerequisite for prenatal diagnosis. *Blood* 71: 983. 1988.

Poncz M, Schwartz E, Ballantine M, Surrey S. Nucleotide sequence analysis of the δ - β -globin gene region in humans. *J. B. Chem.* 258: 11599-11609, 1983.

Popovich BW, Rosenblatt DS, Kendall Ag, et al. Molecular characterization of an atypical β -thalassemia caused by a large deletion in the 5' β -globin gene region. *AM J Hum Genet* 39: 797. 1986.

Proudfoot NJ, Shander MHM, Manley JL, Geftter ML, Maniatis T. Structure and in vitro transcription of human globin genes. *Science* 209:1329. 1980.

Proudfoot NJ. Transcriptional interference and termination between duplicated α -globin gene constructs suggests a novel mechanism for gene regulation. *Nature* 322: 562. 1986.

Radosavljević D, Crkvenjakov R. Genomic sequence of rat β -globin major gene. *Nucleic Acids Res.* 17: 4368, 1989.

Ribeiro ML, Cunha E, Goncalves P, Martin Nunez G, Fernandez Gaian MA, Tamagnini GP, Smetanina NS, Gu L-H, Huisman THJ. Hb Lepore Baltimore and Hb Washington Boston in central Portugal and the Spanish Alta Extremadura. *Hum Genet* 99: 669. 1997.

Ristaldi MS, Murru S, et al. The C→T substitution in the distal CACCC box of the beta-globin gene promoter is a common cause of silent beta-thalassemia in the Italian population. *Br J Haematol* 74: 480. 1990.

Roberts AV, Weatherall DJ, Clegg JB. The synthesis of human hemoglobin A2 during erythroid maturation. *Biochem Biophys Res Commun* 47:81. 1972.

Rosatelli MC, Leoni GB, Tuveri T, Scalas MT, Mosca A, Galanello R, Gasperini D, Cao a. Heterozygous β -thalassemia: Relationship between the hematological phenotype and the type of β -thalassemia mutation. *Am J Hematol* 39: 1. 1992.

Rosatelli MC, Falchi AM, et al. Prenatal diagnosis of beta-thalassaemia with the synthetic oligomer technique. *Lancet* 1: 241. 1985.

Rosatelli MC, Oggiano L, Leoni GB, et al. Thalassemia intermedia resulting from a mild β -thalassemia mutation. *Blood* 73: 601. 1989.

Sanger F, Micklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463. 1977.

Schneider RG, Veda S, Alperin JB, et al. Hb Sabine Beta 91(F7) Leu→Pro. *New Engl J Med* 280: 739. 1969.

Schrier SL, Rashmilewitz EA, Mohandas N. Cellular and membrane properties of α - and β -thalasemic erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations. *Blood* 74: 2194. 1989.

Schroeder WA, Cua JT, et al. Hemoglobin FI, an acetyl-containing hemoglobin. *Biochem Biophys Acta* 63: 532. 1962.

Schroeder WA, Huisman THJ, et al. Evidence of multiple structural genes for γ -chain of human fetal hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 60: 537, 1968.

- Schwartz E, Edvard J. Benz, Jr., and Bernard G. Forget: Thalassemia Syndromes Red Blood Cells, Part IV. 1996.
- Schwartz E. The silent carrier of beta-thalassemia. N Eng J Med 281: 1327. 1969.
- Shimitzu K, Harano T, et al. Abnormal arrangements in the α - and γ -globin gene clusters in a relatively large group of Japanese newborns. Am J Hum Genet 38:45. 1986.
- Shinar E and Rachmilewitz EA. Oxidative denaturation of red blood cells in thalassemia. Semin Hematol 27: 70. 1990.
- Smale St & Baltimore D. The "initiator" as a transcriptional control element. Cell 57: 103. 1989.
- Spritz RA, Jagadeeswaran P, Choudary PV et al: Base substitution in an intervening sequence of a β^+ -thalassemic human globin gene. Proc Natl Acad Sci USA 78:2455, 1981
- Stamatoyannopoulos G, Nienhius AW. Molecular Basis of blood Diseases, Saunders, Philadelphia, 1987.
- Stamatoyannopoulos, G. Human hemoglobin switching. Science 252: 383, 1991.
- Stamatoyannopoulos G, Nienhius AW : Haemoglobin Switching. In: The Molecular Basis of Blood Diseases. Stamatoyannopoulos, Nienhus, Leder, Majerns Editors. W.B. Saunders Company, Philadelphia: str. 107, 1994.
- Stamatoyannopoulos G, Nienhius, A.W.: Haemoglobin Switching. In: The Molecular Basis of Blood Diseases. Stamatoyannopoulos, Nienhus, Leder, Majerns Editors. W.B. Saunders Company: str. 66, 1987.

Steinberg MH & Adams JG. Hemoglobin A₂: origin, evolution and aftermath. *Blood* 78: 2165. 1991.

Steinberg MH: Hemoglobinopathies and thalassemias. Stein JH (ed): *Internal Medicine*. Mosby-Year Book, St Louis, MO. 1994.

Superti-Furga G, Barberis A, Shaffner G, et al. The -117 mutation in Greek HPFH affects the binding of three nuclear factors to the CCAAT region of the γ -globin gene. *EMBO J* 7: 3099. 1988.

Sykes K & Kaufman R. A naturally occurring gamma globin gene mutation enhances Sp1 binding activity. *Mol Cell Biol* 10: 95. 1989.

Talbot D, Philipsen S, Fraser P, Grosveld F. Detailed analysis of the hypersensitive site 3 region of the human β -globin dominant control region. *EMBO J*. 9: 2169-2178, 1990.

Thein SL, Hesketh C, et al. Molecular basis for dominantly inherited inclusion body beta thalassemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3924. 1990.

Todd D, Lai MCS, et al. The abnormal hemoglobins in homozygous alpha thalassemia. *Br J Haematol* 19: 27. 1970.

Trecartin RF, Liebhaber SA, Chang JC et al: β^0 -thalassemia in Sardinia is caused by a nonsense mutation. *J Clin Invest* 68:1012, 1981.

Treisman R, Orkin SH, Maniatis T. Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β -thalassemia genes. *Nature* 302: 591. 1983.

Treisman R, Proudfoot NJ, Shander M, Maniatis T. A single base change at a splice site in a β^0 -thalassemic gene causes abnormal RNA splicing. *Cell* 29: 903. 1982.

Trent RJ, Higgs DR, Clegg JB, Weatherall DJ. A new triplicated α -globin gene arrangement in man. *Br J Haematol* 49: 149. 1981.

Trivelli LA, Ranney HM, et al. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med* 284: 353. 1971.

Tsai SF, Martin DI, Zon LI, D'Andrea AD, Wong GG, Orkin SH. Cloning of cDNA for the major DNA-binding protein of the erythroid lineage through expression in mammalian cells. *Nature* 339: 446. 1989.

Tuan D, Murnane MJ, et al. Heterogeneity of the molecular basis of HPFH. *Nature* 285: 335. 1980.

Tuan D, Solomon D, Li Q, London IM. The " β -like globin" gene domain in human erythrocyte cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6384-6388, 1985.

Wahle E, Keller W. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* 61:419. 1992.

Wainscoat JS, Thein S, Weatherall DJ. Thalassaemia Intermedia. *Blood Rev* 1: 273. 1987.

Wall L, de Boer E, Grosveld F. The human β -globin gene 3' enhancer contains multiple binding sites for an erythroid-specific protein. *Genes & Dev.* 2: 1089 - 1100, 1988.

Wasi P. Hemoglobinopathies including thalassemia: Tropical Asia. *Clin Haematol* 10: 707. 1981.

Wayne, JS, Eng B, Patterson M, Chui DHK, Chang LS, Gogiones B, Poon AO, Olivieri NF. HbE/Hb Lepore Hollandia in a family from Bangladesh. *Am J Hematol* 47:262. 1994.

Weatherall D.J., Clegg J.B.: *The Thalassemia Syndromes*. 3rd Ed. Blackwell Scientific, Oxford, 1981.

Weatherall. DJ. Common genetic disorders of the red cell and the "malaria hypothesis". *Ann Trop Med Parasitol* 81: 539. 1987.

Westaway D, Williamson R: An intron nucleotide sequence variant in a cloned β^+ -thalassemia globin gene. *Nucleic Acids Res* 9:1777, 1981.

Whipple G.H., Bradford, W.L.: Mediterranean disease-thalassemia (erythroblastic anemia of Cooley): associated pigment abnormalities simulating hemochromatosis. *J. Pediatr.* 9: 279, 1932.

Wickens M. How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem Sci.* 15: 277. 1990.

Wong C, Dowling CE, Saiki RK, et al. Characterization of β -thalassemia mutation using direct genomic sequencing of amplified single copy DNA. *Nature* 330: 384. 1987.

World Health Organization. Update of the progress of hemoglobinopathies control. *Bull World Health Organ.* 1985.

Yang KG, Kutlar F, et al. Molecular characterization of beta-globin gene mutations in Malay patients with HbE- beta- thalassemia and thalassemia major. *Br J Haematol* 72: 73. 1989.

Zarovni N, Radojković D, Savić A. Informativnost visoko polimorfnih DNK markera u utvrđivanju očinstva. *Medicinska istraživanja* 33: 22. 1999.

Zhang Y, Coyne MY, Will SG, Levenson CH, Kawa E. Single-base mutational analysis of cancer and genetic diseases using membrane bound modified oligonucleotide. *Nucleic Acids Res* 19: 3920. 1991.

Zhao JB Zhao L, Fei YJ, et al. A novel α -thalassemia-2 (-2.7 kb) observed in a Chinese patient with HbH disease. *Am J Hematol* 38: 248. 1991.

Zimmer EA, Martin SL, Beverly SM, Kan YW, Wilson AC. Rapid duplication and loss of genes coding for the α -chains of hemoglobin. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2158. 1980.