

Hemoglobinopathiën veroorzaakt door mutaties in de α -globinegenen

J. PRINS¹, B.B. van der MEIJDEN¹, W.W. van SOLINGE², E.A.W. BLOKLAND¹ en R.J. KRAAIJENHAGEN¹

Introductie

Hemoglobinopathiën vormen een heterogene groep erfelijke aandoeningen veroorzaakt door mutaties die leiden tot een gereduceerde of afwezige synthese van één van de globinegenen (thalassemiën) of tot de synthese van globineketens met een structurele verandering (Hb-varianten) (1). De α -globinegenen bestaan uit een $\alpha 1$ - en een $\alpha 2$ -globinegen gelegen op chromosoom 16 en omvatten elk 3 exonen. Hb-varianten worden veroorzaakt door mutaties in de coderende delen van de α - of β -globinegenen. Terwijl β -thalassemiën met name veroorzaakt worden door puntmutaties in de expressie regulerende regionen van het β -globinegen, worden α -thalassemiën met name veroorzaakt door deletie van één of beide α -globinegenen (2, 3). Een klein deel van de α -thalassemiën wordt evenwel veroorzaakt door puntmutaties in de α -globinegenen welke aanleiding geven tot stoornissen in de transcriptie en/of translatie van deze genen en daarmee leiden tot een verlaagde synthese van de α -globineketens.

Binnen ons laboratorium is het gebruikelijk om, indien bij capillaire elektroforese van hemoglobine een Hb-variant of een verhoogd percentage HbA2 wordt gezien, in eerste instantie een sequentie analyse van het β -globinegen uit te voeren. Indien er een verdenking bestaat op de aanwezigheid van een α -thalasemie (persisterende anemie met al dan niet een verlaagd MCV, positieve familieanamnese, niet verhoogd percentage HbA2, geen aanwijzingen voor ijzergebrek) wordt een screening op de meest voorkomende α -globinegen deleties (namelijk de $-\alpha^{3,7}$, $-\alpha^{4,2}$, $-(\alpha)^{20,5}$, $--_{SEA}$ en $--_{MED}$ -deleties) uitgevoerd op het UMCU (4). Indien met deze procedure geen verklaring wordt gevonden voor de klinische en/of laboratoriumbevindingen, dan wordt sequentie analyse van de $\alpha 1$ - en $\alpha 2$ -globinegenen overwogen.

In deze studie zijn de resultaten beschreven van de sequentie analyse van de α -globinegenen uitgevoerd bij 14 patiënten geselecteerd op basis van bovengenoemde procedure.

Materialen en methoden

Genomisch DNA wordt geïsoleerd vanuit EDTA-volbloed met behulp van Puregene (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA).

Meander Medisch Centrum, Klinisch Chemisch Laboratorium, Amersfoort¹, Universitair Medisch Centrum Utrecht, Centraal Diagnostisch Laboratorium, Utrecht²

Indien bij capillaire elektroforese (P/ACE system 5000 met ANALIS kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) een Hb-variant of een percentage HbA2 > 3,0 % wordt gezien, is in eerste instantie sequentie analyse van het β -globinegen uitgevoerd. Hiervoor worden de promotorregio (nt-307 tot nt +50 ten opzichte van de 'cap site'), de 5'-regio (nt-103 tot nt+144 in IVS-2) en/of de 3'-regio (nt+603 in IVS-2 tot nt+62 in de 3' UTR) van het β -globinegen geamplificeerd.

Indien hiermee geen verklaring wordt gevonden voor de aanwezige Hb-variant of indien screening op de vijf meest voorkomende α -globinegendeleties geen verklaring geeft voor de bevindingen, dan worden de coderende delen van de $\alpha 1$ - en $\alpha 2$ -globinegenen elk met behulp van één primer paar geamplificeerd.

- 5'-primer voor het $\alpha 1$ - én $\alpha 2$ -globinegen: TGGAGGGTGGAGACGTCCTG (vanaf nt-239 ten opzichte van het ATG-startcodon)
- 3'-primer specifiek voor het $\alpha 1$ -globinegen: TGGCACGTTTCTGAGGGGAA (tot nt+153 ten opzichte van het TAA-stopcodon) leidend tot een 1087bp-PCR-product
- 3'-primer specifiek voor het $\alpha 2$ -globinegen: GCACATTCCGGGACAGAG (tot nt+150 ten opzichte van het TAA-stopcodon) leidend tot een 1076bp-PCR-product.

Sequentieanalyse van de PCR-producten wordt uitgevoerd met behulp van een ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Resultaten

De coderende sequenties van de $\alpha 1$ - en $\alpha 2$ -globinegenen zijn gelijk, verschillen tussen de twee α -globinegenen worden uitsluitend gezien in de IVS-2 (in het $\alpha 1$ -globinegen nt55 g en vanaf nt118 ctggccc; in het $\alpha 2$ -globinegen nt55 t en vanaf nt118 een 7-bp-deletie + g) en in de 3'-UTR regio (vanaf nt15 vele verschillen tussen de $\alpha 1$ - en $\alpha 2$ - globinegenen).

Tot nu toe zijn voor 14 patiënten sequentieanalyses van de α -globinegenen uitgevoerd. In drie gevallen omdat middels elektroforese een Hb-variant werd gezien welke niet bevestigd kon worden met behulp van sequentieanalyse van het β -globinegen. In alle andere gevallen bestond er een verdenking op de aanwezigheid van een α -thalasemie, waarbij screening op de vijf meest voorkomende α -globinegendeleties (waarmee 85 % van de α -thalassemiën vastgesteld kunnen worden) geen verklaring gaf voor de klinische en/of laboratorium bevindingen. De resultaten van de sequentieanalyse van de $\alpha 1$ - en $\alpha 2$ - globinegenen staan weergegeven in tabel 1.

Tabel 1. Resultaten van de sequentieanalyse van de α -globinegenen uitgevoerd bij 14 patiënten

Patiënt	Mutatie	Hemoglobino- pathie
B (28-09-2000)	$\alpha 2$: IVS-1 nt 116 a→g	α^+ -thalassemie
B (12-02-1947)		
D (23-03-1982)	$\alpha 1$: codon 64 GAC→CAC	HbQ-India
E (01-07-1970)	$\alpha 2$: codon 68 AAC→AAA	HbG-Philadelphia
KM (01-01-1962)	$\alpha 2$: codon 78 AAC→AAA	Hb-Stanleyville
9 patiënten	Geen gevonden	

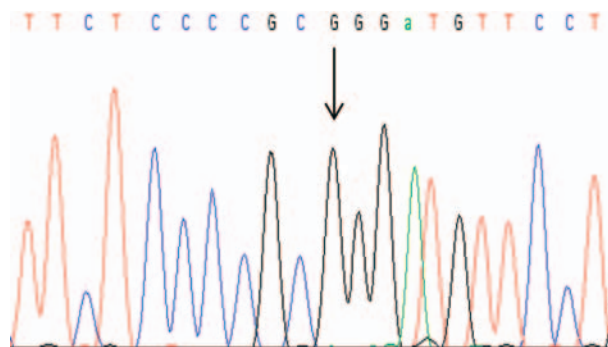
Tot nu toe zijn geen polymorfismen geïdentificeerd in de delen van de $\alpha 1$ - en $\alpha 2$ -globinegenen waarop sequentieanalyse werd uitgevoerd, zodat bij de patiënten waarbij geen of een homozygote mutatie werd aangetroffen geen uitsluitsel gegeven kan worden of beide $\alpha 1$ - dan wel $\alpha 2$ -globinegenen ook daadwerkelijk aanwezig zijn.

Casusbespreking: Patiënte B (12-02-1947)

Bij deze patiënte van Nederlandse origine met een persisterende milde microcytaire anemie (Hb 7,7 mmol/l, MCV 78 fl) waarbij een ijzeregebrek werd uitgesloten (Fe 13 μ mol/l; ferritine 81 μ g/l; transferrine 2,4 g/l) liet hemoglobine-capillaire-elektroforese een normaal patroon zien. Ook screening op de vijf meest voorkomende α -globinegenedeleties leverde niets op. Sequentieanalyse van de α -globinegenen liet evenwel een homozygote nt116 a→g-mutatie in IVS-1 van het $\alpha 2$ -globinegen zien (zie figuur 1). Deze mutatie in de 'acceptor splice site'-consensussequentie verstoort de correcte 'splicing' van het pre-mRNA en leidt daarmee tot de retentie van het eerste intron in het mRNA. De genoemde mutatie is eerder getypeerd als zijnde een α^+ -thalassemie (5).

Conclusie

Ook puntmutaties in de α -globinegenen kunnen aanleiding geven tot het ontstaan van Hb-varianten of α -



Figuur 1. Homo- (of hemi-)zygote mutatie in nt116 (a→g) welke aanleiding geeft tot het verdwijnen van een 3' 'splice site' in IVS-1 van het $\alpha 2$ -globinegen.

thalassemiën. Sequentieanalyse van deze genen kan in voorkomende gevallen een verklaring geven voor de klinische en/of laboratoriumbevindingen. Uit de bevindingen beschreven in deze studie blijkt wel dat maar bij een klein deel van de patiënten met een verdenking op een α -thalassemie ook daadwerkelijk een puntmutatie in één van de α -globinegenen wordt gevonden (hier 2 van de 11 patiënten).

References

1. Weatherall DJ, Provan AB. Red cells I: inherited anaemias. *Lancet* 2000; 355: 1169-1175.
2. Higgs DR, Hill AVS, Nicholls R, Goodbourn SEY, Ayyub H, Teal H, Clegg JB, Weatherall DJ. Molecular rearrangements of the human α -globin gene cluster. *Annals New York Acad Science* 1985; 445: 45-56.
3. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α -globin cluster. *Blood* 1989; 73: 1081-1104.
4. Neerbos BR van, Tilanus MGJ, Solinge WW van, Oirschot BA van, Schmidt YMG, Bouwens AGM, Kraaijenhagen RJ, Rijksen G. α -Thalassemie, een vergelijkend onderzoek op DNA niveau. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1996; 21: 193-196.
5. Harteveld CL, Heisters JGAM, Giordano PC, Delft P van, Haak HL, Wijermans PW, Losekoot M, Bernini LF. An IVS1-116 (A→G) acceptor splice site mutation in the $\alpha 2$ globin gene causing α^+ thalassemia in two Dutch families. *Br J Haemat* 1996; 95: 461-465.