

بررسی نقش مارکرهای پلی مورفیک *BCL11A* و *HBS1L-MYB* در افزایش هموگلوبین جنینی افراد ناقل و مبتلا به تالاسمی بتا در جنوب ایران - خوزستان

محمد حمید^۱، نیلوفر برخورداری بافقی^۲، غلامرضا شریعتی^{۳*}،
حمید کله داری^۴، علی حسین صابری^۵، علیرضا صداقت^۶

چکیده

زمینه و هدف: افزایش بیان هموگلوبین جنینی در برخی بیماران تالاسمی بتا و داسی شکل منجر به بهبود علائم بیماری می‌گردد. شناخت عواملی که موجب افزایش مجدد هموگلوبین جنینی می‌شوند بسیار مهم است. توجه مولکولی افزایش هموگلوبین جنینی را می‌توان به ژن‌هایی نسبت داد که نقش تنظیمی در بیان ژن‌های خوشه ی ژنی بتاگلوبین دارند. هدف از این تحقیق بررسی ارتباط پلی مورفیسم شایع مرتبط با افزایش هموگلوبین جنینی ژن *BCL11A* و ناحیه ی بین ژنی *HBS1L-MYB* در بیماران و ناقلین بتا تالاسمی خوزستان می باشد.

روش بررسی: در این مطالعه ۵۰ بیمار تالاسمی با هموگلوبین جنینی بالا و ۵۰ مورد به عنوان کنترل نرمال از جمعیت خوزستان انتخاب شد. با بهره‌گیری از روش‌های PCR، هضم آنزیمی و تعیین توالی فراوانی پلی مورفیسم‌های rs28384513، rs766432، rs11886868 و rs4895441 بررسی شد.

یافته‌ها: فراوانی پلی مورفیسم‌های rs766432 (A/C) و rs11886868 (C/T) آلل C و rs28384513 (A/C) آلل A در افراد با هموگلوبین جنینی افزایش یافته بالا بوده، ارتباط معنی‌دار قوی با افزایش هموگلوبینی جنینی داشتند. در حالی که در رابطه با پلی مورفیسم rs4895441 (A/G) تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید.

نتیجه‌گیری: در این مطالعه می‌توان گفت که پلی مورفیسم‌های rs766432 (A/C) آلل C و rs11886868 (C/T) آلل C و rs28384513 (A/C) آلل A در ارتباط با افزایش هموگلوبین جنینی بوده، در پیش‌بینی وضعیت بالینی جنین به صورت تالاسمی ماژور یا ایترمدیا می‌توانند نقش داشته باشند. اگرچه برای تایید این موضوع بررسی این مارکرها در جمعیت بزرگتر ضروری است.

واژه‌های کلیدی: تالاسمی بتا، هموگلوبین جنینی، پلی مورفیسم.

۱-استادیار بخش پزشکی مولکولی

۲-کارشناس ارشد بخش پزشکی مولکولی.

۳-استادیار گروه ژنتیک.

۴-استاد گروه ژنتیک.

۵-دانشیار گروه ژنتیک.

۶-استادیار گروه غدد.

۱-انستیتو پاستور ایران، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، بخش پزشکی مولکولی، تهران، ایران.
۲-آزمایشگاه ژنتیک پزشکی و تشخیص پیش از تولد نرگس، اهواز، ایران.

۳-گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

*نویسنده مسؤول:

غلامرضا شریعتی؛ آزمایشگاه ژنتیک پزشکی و تشخیص پیش از تولد نرگس، اهواز، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۶۱۳۳۳۶۹۰۴۳

Email: Shariatig@yahoo.com

مقدمه

تالاسمی بتا، کم خونی هتروژن اتوزوم مغلوب بوده که به وسیله ی کاهش یا عدم سنتز زنجیره های گلوبین، بواسطه بیش از ۲۰۰ جهش رخ می دهد (۱). در طی رشد جنینی زنجیره گاما گلوبین جایگزین اپسیلون شده و اصلی ترین نوع هموگلوبین دوران جنینی و بدو تولد یا همان هموگلوبین جنینی تولید می گردد. هموگلوبین جنینی ($HbF: \alpha 2\gamma 2$) از دو زنجیره گلوبین آلفا و گاما ($\gamma 2\alpha 2$) تشکیل شده است و در اوایل دوره رویانی یعنی در حدود هفته ششم که خون سازی در کبد و طحال انجام می گردد قابل مشاهده است و سنتز آن به طور سریع افزایش می یابد. به طوری که در هفته هشتم حاملگی، حداقل ۹۰ درصد هموگلوبین از این نوع می باشد و در طی دوران جنینی و نوزادی به شکل غالب باقی می ماند. تغییر هموگلوبین جنینی به هموگلوبین بزرگسالی ($HbA: \alpha 2\beta 2$)، در هفته های اول زندگی اتفاق می افتد بطوری که مقدار هموگلوبین جنینی تا ماه ششم پس از تولد شروع به افت سریع کرده به حدود ۳ درصد کل هموگلوبین می رسد و پس از یک سالگی میزان آن به کمتر از ۲ درصد کاهش می یابد (۲).

افزایش مجدد بیان هموگلوبین جنینی معمولا در بیماران مبتلا به حذفهای بزرگ در ناحیه ژنی بتاگلوبین نظیر بیماریانی که همواره سطح بیان بالایی از هموگلوبین جنینی (Hereditary Persistence of Fetal Haemoglobin; HPHF) دارند و نیز بیماران مبتلا به تالاسمی دلتا-بتا دیده شده است. در برخی از بیماران که در ناحیه تنظیمی ژن گاماگلوبین آنها تغییرات تک نوکلئوتیدی اتفاق افتاده است نیز گزارش شده است (۳). فاکتورهایی چندگانه که با مقادیر هموگلوبین جنینی در جمعیت مرتبط اند شامل سن، جنسیت (۲ درصد) و فاکتورهای محیطی (۱ درصد) می شود؛ اما نقش فاکتورهای ژنتیکی در این ارتباط چشمگیر است (۹۱ درصد). چندشکلی *XmnI-G\gamma* در لوکوس بتا گلوبین، مسئول

۱۳ درصد از تنوع سلول جنینی در جمعیت است (۴). اگرچه بیش از ۳۵ درصد تنوع سلول جنینی توسط دو لوکوس *HBSIL-MYB* (۱۹ درصد) و *BCL11A* (۱۵ درصد) کنترل می شود، که با لوکوس بتا گلوبین بی ارتباط اند (۵).

سه لوکوس مرتبط با افزایش هموگلوبین جنینی شامل *XmnI-G\gamma polymorphism* در خوشه ی ژن بتا گلوبین، ناحیه ی بین ژنی *HBSIL-MYB* بر روی کروموزوم 6q23 و *BCL11A* به روی کروموزوم 2p16 مورد بررسی ویژه ای قرار گرفته اند (۵).

BCL11A یک فاکتور رونویسی درگیر در رشد هماتوپویتیک نرمال و بدخیم می باشد. محصول ژن *BCL11A* یک فاکتور رونویسی *Multi-zinc finger* است که با اتصال به *Hypersensitive site 3* مربوط به جایگاه *locus Control Region* در تنظیم بیان هموگلوبین جنینی نقش دارد. کاهش بیان *BCL11A* در سلول های اولیه ی اریترئوئید بالغ منجر به بیان قوی هموگلوبین جنینی می شود. ناحیه ی *HBSIL-MYB* یک ناحیه ی اینترژنیک است که برخی پلی مورفیسم های آن در ارتباط با افزایش هموگلوبین جنینی می باشند (۶ و ۷). *HBSIL* که عملکرد آن تاکنون به خوبی شناخته نشده است خصوصیات ساختمانی آن با خانواده ی فاکتور *eEF-1* و فاکتور آزاد سازی *eERF-3* شباهت دارد (۸). ژن *MYB* به شدت در طول تکامل حفظ شده است و محصول اصلی آن در انسان، پروتئینی هسته ای است که در اغلب بافت های خون ساز بیان می شود و میزان بیان آن در سلول های نابالغ خون ساز بسیار بالاست. این ژن کلید تنظیم خون سازی است و بیان بالای آن با مهار گاماگلوبین همراه است و در تکثیر و تمایز سلول ها نقش دارد، مقادیر پایین *MYB* منجر به تسریع در بلوغ سلول های اریترئوئیدی می شود (۹). با توجه به اینکه بحث مکانیسم های افزایش هموگلوبین

غیراز ژن هدف نیست، در سایت اینترنتی <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> پرایمر بلاست صورت گرفت. توالی آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر نواحی پلی مورفیسم در جدول ۱ آمده است. برای تکثیر ویژه ی قطعات اطراف پلی مورفیسم های مورد نظر، واکنش زنجیرهای پلیمرز (PCR) در حجم ۳۰ میکرولیتر شامل ۲۰۰ نانوگرم DNA، ۲/۵ میکرولیتر بافر 10X PCR، ۵/۰ میکرولیتر dNTP ۱۰ میلی مولار، ۱/۲ میکرولیتر MgCl₂ ۵۰ میلی مولار، ۱ میکرولیتر از آغازگرهای رفت و برگشت، ۳/۰ میکرولیتر آنزیم DNA پلیمرز Taq (سینازن) انجام گردید. برنامه ی زمانی - دمایی بهینه برای PCR به صورت زیر بدست آمد: مرحله ی ذوب آغازین شامل ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه، ۳۰ تکرار دمایی با دناتوراسیون در دمای ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، ۵۰ ثانیه در دمای ۶۲/۵ درجه برای اتصال آغازگرها، دمای تکثیر ۷۲ °C به مدت ۱ دقیقه و در نهایت ۴ دقیقه در دمای ۷۲ درجه جهت تکثیر نهایی انتخاب شد. سپس محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱٪ با ولتاژ ۸۲ ولت، الکتروفورز شدند و در نهایت باندهای تفکیک شده توسط دستگاه UV Gel Documentation مشاهده و مورد آنالیز قرار گرفتند.

برای هضم آنزیمی محصولات PCR حاوی پلی مورفیسم rs4895441 از آنزیم محدودگر RsaI (Thermo، 500 u، 10u/μl) استفاده شد. انکوباسیون محصولات PCR به مدت شش ساعت در دمای ۳۷ °C صورت گرفت. بعد از این مدت، محصولات برش آنزیمی، در ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار محصول برش نیافته ی PCR و نشانگر، الکتروفورز شدند.

برای هضم آنزیمی محصولات PCR حاوی چندشکلی rs28384513 از آنزیم محدودگر BstxI (Thermo، ۵۰۰ u، ۱۰ u/μl) استفاده شد. انکوباسیون محصولات PCR در دمای ۵۵ °C در طول یک شبانه روز صورت گرفت. بعد از این مدت، محصولات برش آنزیمی، در ژل آگارز ۲/۵ درصد در کنار محصول برش نیافته ی

جنینی در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی چندین سال است که مورد توجه محققین قرار گرفته است بدین منظور در این مطالعه مارکر های پلی مورفیک BCL11A و HBSIL- MYB مورد بررسی قرار گرفته تا نقش آنها در افزایش هموگلوبین جنینی در جمعیت جنوب ایران-خوزستان تعیین گردد. بررسی این مارکرها برای اولین بار در بیماران تالاسمی جمعیت خوزستان انجام شده است.

روش بررسی

در مطالعه ی حاضر، که به صورت مورد - شاهدهی انجام گرفته است. پس از اخذ رضایت نامه از افراد نرمال و بیماران تالاسمی مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک نرگس در این مطالعه ۵۰ بیمار شامل ۱۵ بیمار تالاسمی ماژور و ۳۵ تالاسمی مینور همراه با هموگلوبین جنینی بالا (بین ۳/۲ الی ۹۸/۵ درصد) و ۵۰ فرد سالم به عنوان افراد کنترل انتخاب شدند و نسبت زن و مرد تقریباً برابر بود. نمونه گیری بر اساس داده های خونشناسی و الکتروفورز هموگلوبین از بین بیماران تالاسمی مینور یا ماژور انجام شد.

نمونه خون در حدود ۲ میلی لیتر در لوله های حاوی ضدانعقاد EDTA جمع آوری گردید و استخراج DNA به روش Salting Out انجام گرفت. از دستگاه نانودراپ برای خواندن غلظت DNA بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر (μg/ml) استفاده گردید. همچنین درجه ی خلوص با استفاده از تقسیم جذب نوری DNA در طول موج ۲۶۰ نانومتر بر جذب نوری پروتئین در طول موج ۲۸۰ نانومتر اندازه گیری و محاسبه شد.

برای تکثیر نواحی پلی مورفیسم های شایع rs28384513، rs4895441، rs766432 و rs11886868 آغازگرهای رفت و برگشت با استفاده از نرم افزار Gene Runner version 4.0.9.2 طراحی شد. در مرحله ی بعد برای اطمینان از اینکه پرایمرهای طراحی شده قادر به شناسایی دیگر توالی های DNA به

پلی مورفیسیم rs28384513 (A/C)

محصولات PCR حاصل از تکثیر ناحیه‌ی چندشکلی rs28384513 که اندازه ۴۳۵ جفت بازی دارند با آنزیم محدودگر *BstXI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفتند. این آنزیم توالی CCANNNNN/NTGG را شناسایی و برش می‌دهد. در صورتی که در جایگاه چندشکلی، نوکلئوتید A وجود داشته باشد، جایگاه برش آنزیم مربوطه وجود دارد، بنابراین آنزیم آن را برش داده و دو قطعه با طول‌های ۳۱۶ و ۱۱۹ جفت بازی ایجاد می‌کند. اما در صورتی که در جایگاه چندشکلی، نوکلئوتید C وجود داشته باشد در محصول PCR، جایگاه برش آنزیم مربوطه وجود ندارد و محصول بدون برش به طول ۴۳۵ جفت باز باقی می‌ماند. نتایج ذکر شده در شکل ۱ آمده است.

پلی مورفیسیم rs4895441 (A/G)

طول قطعه ی تکثیر شده مربوط به پلی مورفیسیم rs4895441، ۷۳۷ جفت باز است که با آنزیم محدودگر *RsaI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت. این آنزیم توالی GT/AC را شناسایی و برش می‌دهد. در صورتی که در جایگاه چندشکلی، نوکلئوتید A وجود داشته باشد در محصول PCR، یک جایگاه برش آنزیم مربوطه وجود دارد، بنابراین آنزیم آن را برش داده و دو قطعه با طول‌های متفاوت ۵۳۲ و ۲۰۵ جفت بازی ایجاد می‌کند. اما در صورتی که در جایگاه پلی مورفیسیم، نوکلئوتید G وجود داشته باشد در محصول PCR، ۲ جایگاه برش آنزیم وجود دارد بنابراین آنزیم آن را برش داده و سه قطعه با طول‌های متفاوت ۴۳۰، ۲۰۵ و ۱۰۲ جفت بازی ایجاد می‌کند.

در صورتی که هر دو نسخه (پدری و مادری) مورد هضم آنزیمی قرار گیرند (ژنوتیپ هموزیگوت AA)، دو قطعه به طول‌های ۵۳۲ و ۲۰۵ جفت باز وجود خواهد داشت. اما اگر تغییر G وجود داشته باشد به دلیل وجود دو جایگاه برش سه قطعه به طول‌های ۴۳۰، ۲۰۵ و ۱۰۲ جفت بازی خواهیم داشت (ژنوتیپ هموزیگوت GG).

PCR و نشانگر الکتروفورز شدند. برای بررسی دو پلی مورفیسیم دیگر rs766432، rs11886868 ابتدا محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱ درصد و با ولتاژ ۸۰-۸۵ الکتروفورز شد. پس از اتمام الکتروفورز و اطمینان از عدم وجود باند غیر اختصاصی، نمونه در حجم ۲۰ μ l جهت انجام تعیین توالی به صورت تجاری (Bioneer co., Korea) آماده شد که با استفاده از روش ختم زنجیره صورت گرفت. آغازگرهایی که با آن تعیین توالی صورت گرفت همان آغازگرهایی بودند که در تکثیر قطعات به کار رفته بودند.

به منظور تفسیر نمودارهای تعیین توالی از برنامه Chromas استفاده شد و جهت بررسی اختلاف فراوانی توزیع آللی موجود در گروه‌های مجزای مورد مطالعه، تست کای دو (χ^2) بکار رفت نتایج بدست آمده با سطح معنی‌داری $\alpha=0.05$ مقایسه شد. بدین صورت که اگر $p < 0.05$ باشد، فرضیه معنی‌دار تلقی می‌گردد. سپس معنی‌دار بودن فراوانی آلل‌های مورد مطالعه براساس آزمون کای دو در دو گروه شاهد و نمونه بررسی گردید. در ادامه جهت بررسی اثر هر پلی مورفیسیم بر افزایش هموگلوبین جنینی Odds Ratio با درصد اطمینان ۹۵٪ (CI: %95) محاسبه شد که شانس وقوع خطر را نشان می‌دهد. برای آنالیز آماری نتایج از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ استفاده گردید.

یافته ها

از مجموع افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک نرگس در سال‌های ۹۰، ۹۱ و ۹۲، در حدود ۵ هزار فرد دارای موتاسیون در ژن بتا گلوبین بودند که از این تعداد حدود ۵۰ نفر که دارای هموگلوبین جنینی بالا (در رنج ۳،۲ الی ۹۸ درصد) و ۵۰ فرد سالم با هموگلوبین جنینی نرمال انتخاب شد که نسبت زن و مرد تقریباً برابر داشتند. پلی-مورفیسیم‌های شایع rs28384513، rs4895441، rs766432 و rs11886868 با استفاده از دو روش هضم آنزیمی و تعیین توالی بررسی شدند.

هتروزیگوت و هموزیگوت در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

فراوانی آللی

از میان پلی مورفیسیم مورد مطالعه در افراد با هموگلوبین جنینی بالا و جمعیت نرمال، فراوانی پلی مورفیسیم‌های rs766432 (A/C) آلل C و 6868 (C/T) rs1188 و آلل C و rs28384513 (A/C) آلل A در افراد با هموگلوبین جنینی افزایش یافته بالا بوده، تفاوت معنی داری را بین دو گروه نشان داد که به منزله ارتباط معنی داری با افزایش هموگلوبینی جنینی است. در حالیکه در رابطه با پلی مورفیسیم rs4895441 (A/G) تفاوت معنی داری بین دو گروه مشاهده نگردید جدول ۲.

در صورتی که یک نسخه برش بخورد و نسخه‌ی دیگر بدون برش و دست نخورده باقی بماند (ژنوتیپ هتروزیگوت AG) چهار قطعه با اندازه‌های ۵۳۲، ۴۳۰، ۲۰۵، ۱۰۲ جفت باز بر روی ژل مشاهده می‌شود. نتایج مذکور در شکل ۲ آمده است. قابل ذکر است که قطعه ۱۰۲ جفت بازی به دلیل اندازه کوچک در ژل آگارز قابل مشاهده نبود.

پلی مورفیسیم‌های rs766432 (A/C) و (C/T) rs11886868

در رابطه با دو پلی مورفیسیم فوق محصول PCR، تعیین توالی گردیده نتایج بدست آمده در شرایط

جدول ۱: توالی آغازگرهای رفت و برگشت برای تکثیر پلی مورفیسیم‌ها ژن‌های *BCL11A* و *HBSIL-MYB*

ژن	پلی مورفیسیم	آغازگر رفت	آغازگر برگشت	طول محصول (جفت باز)
<i>HBSIL-MYB</i>	rs28384513	5'-GAATGCCCACTGTGTGCTTAATG-3'	5'-ATACTGATAAGGCGCCAACTG-3'	۴۳۵
<i>HBSIL-MYB</i>	rs4895441	5'-TTGGCCAGAGCACACTTGAATG-3'	5'-GGATGGGTGATCATGTGTTTGC-3'	۷۳۷
<i>BCL11A</i>	rs766432, rs11886868	5'-GCATTCTCATTTCCCTGAAATGT-3'	5'-ATCTACACAGTGTCCATTGTAGCACT-3'	۶۰۹

جدول ۲: فراوانی آللی پلی مورفیسیم‌های مورد مطالعه در نمونه‌های با افزایش هموگلوبین جنینی و گروه شاهد

نمونه‌ها	فرکانس آللی rs766432 (A/C)		فرکانس آللی rs28384513 (A/C)		فرکانس آللی rs11886868 (C/T)		فرکانس آللی rs4895441 (A/G)	
	سطح معنی دار	سطح معنی دار	سطح معنی دار	سطح معنی دار	سطح معنی دار	سطح معنی دار	سطح معنی دار	سطح معنی دار
هموگلوبین جنینی بالا (میانگین ۲۷/۶ و انحراف معیار ۳۲/۱)	۵۸(٪۵۸)	۴۲(٪۴۲)	۷۷(٪۷۷)	۲۳(٪۲۳)	۴۰(٪۴۰)	۶۰(٪۶۰)	۷۸(٪۷۸)	۲۲(٪۲۲)
کنترل	۹۰(٪۹۰)	۱۰(٪۱۰)	۶۰(٪۶۰)	۴۰(٪۴۰)	۶۳(٪۶۳)	۳۷(٪۳۷)	۸۵(٪۸۵)	۱۵(٪۱۵)

بحث

مطالعه‌ای که ارتباط پلی مورفیس‌های rs28384513، rs766432 و rs11886868 با افزایش هموگلوبین جنینی را بررسی کرده می‌توان به مطالعه‌ای که در جمعیت‌های تانزانایی و انگلیسی مبتلا به سیکل سل اشاره کرد که پلی مورفیس rs11886868 در هر دو جمعیت ارتباط معنی داری قوی را نشان می‌داد در حالی که پلی مورفیس rs28384513 در جمعیت انگلیسی برعکس جمعیت تانزانایی معنی دار نبود (۱۰). تحقیقی که در سال ۲۰۰۷ توسط Thein و همکاران به روی ناحیه‌ی بین ژنی HBS1L-MYB در لندن انجام شد، به وجود رابطه‌ی مستقیم میان میزان افزایش هموگلوبین جنینی و rs4895441 اشاره دارد. همچنین وی در تحقیق دیگری که در سال ۲۰۰۹ منتشر کرد، وجود این رابطه را نیز در پلی مورفیس rs11886868 تأیید نمود (۹ و ۱۱).

در سال ۲۰۰۸، Sedgewick و همکارانش، ارتباط میان پلی مورفیس‌های ژن BCL11A به ویژه rs766432 با تعداد سلول‌های جنینی در نمونه‌های مربوط به گروه جمعیتی شمال تایلند و همچنین ارتباط آن با میزان هموگلوبین جنینی در جمعیت‌های آمریکایی آفریقایی مشخص کردند (۱۲).

در سال ۲۰۱۰، Nguyen و همکارانش در فرانسه با بررسی ۵۷ بیمار تالاسمی ایترمدیا با ژنوتیپ‌های بسیار متفاوت مشخص کردند که rs11886868، rs4671393 بر خلاف نتایج تحقیقات قبلی هیچ‌گونه ارتباط میان آنها و میزان هموگلوبین جنینی وجود ندارد (۱۳).

در سال ۲۰۱۱ در تحقیقی که در جمعیت ایرانی صورت گرفت در بررسی ۵۰ بیمار مبتلا به تالاسمی بتا با هموگلوبین جنینی بالا و ۴۷ فرد سالم با هموگلوبین جنینی نرمال، ارتباط معنی داری بین پلی مورفیس‌های rs11886868، rs4895441 و rs28384513 با افزایش میزان هموگلوبین جنینی مشاهده نشد (۱۴). این مطالعه مجدداً توسط گروه دیگری در سال ۲۰۱۳ بر روی

الفا و مکانیسم‌های افزایش هموگلوبین جنینی در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی چندین سال است که مورد توجه محققین قرار گرفته تا بدین روش بتوانند آن‌ها را به تالاسمی ایترمدیا تبدیل کرده و درمان نمایند. به این صورت که افزایش جبرانی زنجیره‌های گاما در همراهی با ژن معیوب بتا موجب افزایش بیشتر هموگلوبین جنینی و در نتیجه تعادل بهتر زنجیره‌ها و کاهش تجمع زنجیره‌های آلفا می‌شود. توجیه مولکولی افزایش هموگلوبین جنینی را می‌توان به ژن‌هایی نسبت داد که نقش تنظیمی در بیان ژن‌های خوشه‌ی بتاگلوبین دارند.

بنابراین بررسی دو مارکر BCL11A و HBS1L-MYB تعیین نقش این مارکرها در افزایش هموگلوبین جنینی به شناخت مکانیسم افزایش هموگلوبین جنینی کمک می‌کند همچنین این مارکرها در پیش بینی وضعیت بالینی جنین در تشخیص‌های پیش از تولد به صورت تالاسمی ماژور یا ایترمدیا ارزشمند می‌باشند.

مطالعه‌ی حاضر بر روی ۵۰ بیمار تالاسمی ماژور و تالاسمی مینور همراه با هموگلوبین جنینی بالا و ۵۰ فرد سالم به عنوان افراد کنترل انجام گرفت. در این تحقیق ۴ پلی مورفیس رایج در دو ناحیه‌ی مرتبط با افزایش هموگلوبین جنینی در ژن BCL11A و ناحیه‌ی بین ژنی HBS1L-MYB مورد بررسی قرار گرفتند.

پلی مورفیس‌های rs766432 (A/C) آلل C و rs28384513 و rs11886868 (C/T) آلل C در افراد با هموگلوبین افزایش یافته در مقایسه با افراد نرمال بالا بوده، ارتباط معنی داری نشان دادند. در حالیکه در پلی مورفیس rs4895441 (A/G) تفاوت معنی داری بین دو گروه مشاهده نگردید. لذا این مارکر اخیر در افزایش هموگلوبین جنینی موثر نمی‌باشد. در مقایسه نتایج بدست آمده در این مطالعه با نتایج بدست آمده در جمعیت‌های دیگر می‌توان بطور خلاصه به موارد زیر اشاره کرد.

داسی شکل استفاده کرد. همچنین در تشخیص‌های قبل از تولد برای پیش‌بینی وضعیت بالینی جنین حائز اهمیت می‌باشد. لذا با توجه نتایج بدست آمده در این مطالعه که بر روی جمعیت خالص تری صورت گرفت می‌توان گفت که پلی مورفیسم‌های rs766432 (A/C) آلل C و rs28384513 (C/T) آلل C و rs1188 6868 (C/T) آلل A در ارتباط با افزایش هموگلوبین جنینی بوده، می‌توانند در پیش‌بینی وضعیت بالینی جنین به صورت تالاسمی ماژور یا اینترمدیا نقش داشته باشند. اگرچه برای تایید این موضوع بررسی این مارکرها در جمعیت بزرگتر ضروری است.

قدردانی

از کلیه افراد شرکت کننده در این تحقیق، پرسنل آزمایشگاه ژنتیک نرگس و همکاران بخش پزشکی مولکولی انستیتوپاستور ایران تشکر و تقدیر بعمل می‌آید. همچنین این تحقیق با گرنت شماره ۶۸۷ انستیتوپاستور ایران حمایت مالی شده است.

پلی مورفیسم‌های rs11886868 و rs766432 در جمعیت ایرانی انجام شد که نتایج بدست آمده عدم ارتباط را نشان می‌داد (۱۵).

در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۳ بر روی جمعیت عرب در کشور عربستان انجام شده بود پلی مورفیسم‌های rs766432، rs886868 و rs4895441 مورد بررسی قرار گرفته و نتایج بدست آمده با مطالعه ما مشابه بود (۱۶).

روشن است که نتایج بدست آمده در این مطالعه، در راستای تحقیقات صورت گرفته در جمعیت‌های مختلف دنیا می‌باشد و تنها در سه مورد (۱۳-۱۵) متفاوت است. که دلایل تفاوت نتایج بدست آمده در این تحقیق با دو مطالعه انجام شده قبلی بر روی جمعیت ایرانی، می‌توان به مواردی اشاره کرد: از جمله افراد انتخاب شده در مطالعات قبلی بصورت هتروژن بودند در حالی که در مطالعه حاضر در حدود ۸۰ درصد افراد مورد بررسی عرب و بقیه از قومیت لر بودند و به این دلیل نتایج این مطالعه با مطالعه ای که در عربستان صورت گرفته مشابه بود. دلیل دیگر این تفاوت فراوانی بالای ازدواج‌های خویشاوندی در خوزستان است. لذا جمعیت مورد بررسی در این تحقیق خالص‌تر از مطالعات قبلی است. همچنین در دو مطالعه قبلی حذف‌های بتاگلوبین در نمونه‌های HPFH با عامل موتاسیون حذفی بتاگلوبین، مورد بررسی قرار نگرفته که چه بسا برخی از نمونه‌های مورد بررسی آنها، افزایش هموگلوبین جنینی در آنها به دلیل موتاسیون حذفی بتاگلوبین بوده است. ولی در این مطالعه مواردی که دارای موتاسیون حذفی ژن بتاگلوبین بودند از جمعیت مورد مطالعه حذف شده بودند.

نتیجه گیری

شناخت عواملی که موجب فعالیت مجدد هموگلوبین جنینی می‌شوند بسیار مهم است، زیرا می‌توانی از آن به عنوان یک استراتژی درمانی برای تالاسمی و کم‌خونی

منابع

- 1-Fabrice Danjou, Franco Anni, Renzo Galanello. Beta-thalassemia: from genotype to phenotype *Haematologica* 2011;96(11):1573-5.
- 2-Thein, S. L. and Menzel, S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *British Journal of Haematology* 2009;145(4): 455-67.
- 3-Hamid M, Mahjoubi F, Akbari MT, Arab A, Zeinali S, Karimipoor M. Molecular analysis of gamma-globin promoters, HS-111 and 3'HS1, in beta-thalassemia intermedia patients associated with high levels of Hb F. *Hemoglobin* 2009;33(6):428-38.
- 4-Thein S L. 'Beta-thalassaemia prototype of a single gene disorder with multiple phenotypes. *International Journal of Hematology* 2002;76: 96-104.
- 5-Menzel S, Garner C, Gut I, Matsuda F, Yamaguchi M, Heath S, et al. A QTL influencing F cell production maps to a gene encoding a zincfinger protein on chromosome 2p15. *Nature Genetics* 2007; 39(10):1197-9.
- 6-Farrell JJ, Sherva RM, Chen ZY, Luo HY, Chu BF, Ha SY, et al. A 3-bp deletion in the hbs11-myb intergenic region on chromosome 6q23 is associated with hbf expression. *Blood* 2011;117:4935-4945.
- 7-Wahlberg K, Jiang J, Rooks H, Jawaid K, Matsuda F, Yamaguchi M, et al. The hbs11-myb intergenic interval associated with elevated hbf levels shows characteristics of a distal regulatory region in erythroid cells. *Blood* 2009;114:1254-1262.
- 8-Wallrapp C, Verrier SB, Zhouravleva G, Philippe H, Philippe M, Gress TM, et al. The product of the mammalian orthologue of the *Saccharomyces cerevisiae* HBS1 gene is phylogenetically related to eukaryotic release factor 3 (eRF3) but does not carry eRF3-like activity. *FEBS Letters* 1998; 440: 387-392.
- 9-Westin EH, Gallo RC, Arya SK, Eva A, Souza LM, Baluda MA, et al. Differential expression of the amv gene in human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1982;79 (7): 2194-8.
- 10-Makani J, Menzel S, Nkya S, Cox SE, Drasar E, Soka D, et al. Genetics of fetal hemoglobin in Tanzanian and British patients with sickle cell anemia. *Blood* 2011;117(4):1390-2.
- 11-Thein SL, Menzel S, Peng X, Best S, Jiang J, Close J, et al. Intergenic variants of HBS1L-MYB are responsible for a major quantitative trait locus on chromosome 6q23 influencing fetal hemoglobin levels in adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104 (27), 11346-51.
- 12-Sedgewick AE, Timofeev N, Sebastiani P, So JC, Ma ES, Chan LC, et al. BCL11A is a major HbF quantitative trait locus in three different populations with betahemoglobinopathies. *Blood Cells Molecules and Disease* 2008;41(3):255-8.
- 13-Thi Khanh Tien Nguyen, Philippe Joly, Claire Bardel, Mustapha Moulisma, Nathalie Bonello-Palot, Alain Francina. The XmnI (G)gamma polymorphism influences hemoglobin F synthesis contrary to BCL11A and HBS1L-MYB SNPs in a cohort of 57 beta-thalassemia intermedia patients. *Blood Cells Molecules and Diseases* 2010 45(2):124-7.
- 14-Hashemi Gorji F, Hamid M, Arab A., Amirian A, Zeinali S, Karimipoor M. Relationship between DNA polymorphisms at the BCL11A and HBS1L-MYB loci in 9-Thalassemia patients with increased fetal hemoglobin levels. *Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ* 2011;8(3):149-157.
- 15-Neishabury M, Zamani F, Keyhani E, Azarkeivan A, Abedini SS, Eslami MS, et al. The influence of the BCL11A polymorphism on the phenotype of patients with beta thalassemia could be affected by the beta globin locus control region and/or the Xmn1-HBG2 genotypic background. *Blood Cells Molecules and Diseases* 2013;51(2):80-4.
- 16-Ngo D, Bae H, Steinberg MH, Sebastiani P, Solovieff N, Baldwin CT, et al. Fetal hemoglobin in sickle cell anemia: genetic studies of the Arab-Indian haplotype. *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2013;51(1):22-6.

The Impact of *BCL11A* and *HBS1L-MYB* Polymorphic Markers in Affected and Carriers of Beta Thalassemia with High Level of Fetal Hemoglobin in South of Iran, Khuzestan

Mohammad Hamid¹, Nilofar Barkhordari Bafghi², Gholamreza Shariati^{3*},
Hamid Galehdari⁴, Ali Hossein Saberi⁵, Ali Reza Sedaghat⁶

1-Assistant Professor of Molecular Medicine.

2-Master of Science in Molecular Medicine.

3-Assistant Professor of Medical Genetic.

4-Professor of Genetic.

5-Associate Professor of Genetic.

6-Associate Professor of Endocrinology.

1,2-Department of Molecular Medicine, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran.

3,6-Laboratory of Genetic Medicine and Prenatal Diagnosis, Narges, Ahvaz, Iran.

4,5-Department of Medical Genetic, Faculty of Medicine, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.

*Corresponding author:

Gholamreza Shariati; Laboratory of Genetic Medicine and Prenatal Diagnosis, Narges, Ahvaz, Iran.
Tel: +98 6133369043
Email: Shariati@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: The increase of HbF in some beta-thalassemia and sickle cell patients ameliorates the disease severity. Therefore, understanding the reasons behind the increasing of fetal hemoglobin is needful. The molecular explanation of fetal hemoglobin increment might be correlated with the genes which play a regulatory role in expression of beta-globin cluster genes. In this study, the likelihood of polymorphisms of *BCL11A* and *HBS1L-MYB* regions to cause HbF elevation was studied.

Subjects and Methods: In this investigation, 50 thalassemia patients with high level of fetal hemoglobin and 50 healthy individuals as control group were selected from Khuzestan. The allele frequency of rs28384513, rs766432, rs11886868 and rs4895441 polymorphisms were assessed by using PCR-RFLP and PCR-sequencing methods.

Results: The frequency of C allele in rs766432 (A/C), C allele in rs11886868 (C/T) and A allele in rs28384513 (A/C) were significantly high among the patients with increased level of HbF. Whereas, the frequency of rs4895441 (A/G) polymorphism had no significant differences compared with the patients with high level of HbF and control group.

Conclusion: Based on this study, rs766432 (A/C), rs11886868 (C/T) and rs28384513 (A/C) polymorphisms are correlated with HbF increased and they can be used to predict the clinical features of fetus in case of bearing the major or intermediate forms of thalassemia. However, to confirm these results these markers need to be studied by applying a larger number of samples.

Keywords: Beta-thalassemia, Fetal hemoglobin, Polymorphism.

►Please cite this paper as:

Hamid M, Barkhordari Bafghi N, GhR Shariati, Galehdari H, Saberi AH, Sedaghat AR. The Impact of *BCL11A* and *HBS1L-MYB* Polymorphic Markers in Affected and Carriers of Beta Thalassemia with High Level of Fetal Hemoglobin in South of Iran, Khuzestan. *Jundishapur Sci Med J* 2017; 16(6):611-619.

Received: July 11, 2017

Revised: Nov 22, 2017

Accepted: Nov 11, 2017