

## ارتباط برخی پلی مورفیسم‌های جایگاه BCL11A و HBS1L-MYB با افزایش سطح هموگلوبین جنینی در بیماران بتا تالاسمی ماژور

فیض‌اله هاشمی گرجی<sup>۱</sup>، محمد حمید<sup>۲</sup>، آیدا عرب<sup>۳</sup>، اعظم امیریان<sup>۴</sup>، سیروس زینلی<sup>۵</sup>، مرتضی کریمی پور<sup>۶</sup>

### چکیده

#### سابقه و هدف

سطح بالای هموگلوبین جنینی (HbF) تأثیر عمده‌ای بر تالاسمی بتا دارد به طوری که افزایش تولید HbF، شدت بیماری را کاهش می‌دهد. سه لوکوس HBS1L-MYB در کروموزوم 6q23، BCL11A در کروموزوم 2p16 و ژن گاماگلوبین با افزایش سطح HbF در بیماران مبتلا به تالاسمی در ارتباط می‌باشند. در مطالعه کنونی، ارتباط برخی پلی مورفیسم‌های افزایش‌دهنده سطح HbF در بیماران مبتلا به تالاسمی و افراد سالم ارزیابی شد.

#### مواد و روش‌ها

مطالعه انجام شده از نوع مورد - شاهدهی بود. در این مطالعه سه پلی مورفیسم شایع rs11886868، rs4895441 و rs28384513 با استفاده از روش PCR - RFLP در میان ۵۰ بیمار مبتلا به تالاسمی بتا با HbF افزایش یافته و ۴۷ فرد سالم با HbF نرمال تعیین ژنوتیپ شدند. هضم آنزیمی به ترتیب با RsaI، MboII و BstXI انجام شد و پس از تعیین ژنوتیپ نمونه‌ها، فرکانس آللی HbF SNPs در دو گروه با آزمون کای‌دو توسط نرم‌افزار SPSS۱۶ به همراه SNP analyzer 2 صورت گرفت.

#### یافته‌ها

فرکانس برای آلل موتانت در rs4895441، rs11886868 و rs28384513 به ترتیب ۰/۲۴۵، ۰/۵۲۱ و ۰/۳۰۹ در گروه سالم و ۰/۳۰۰، ۰/۵۲۰ و ۰/۲۸ در گروه بیمار بود. ارتباط معنی‌داری بین سه پلی مورفیسم مورد بررسی در افراد سالم و افزایش میزان HbF در بیماران مبتلا مشاهده نشد.

#### نتیجه‌گیری

درحالی که در مطالعه‌های قبلی این پلی مورفیسم‌ها در BCL11A و HBS1L - MYB loci با افزایش سطح HbF در ارتباط بودند، در این مطالعه ممکن است پلی مورفیسم‌های دیگری برای افزایش HbF در جمعیت ما نقش داشته باشند.

**کلمات کلیدی:** بتا تالاسمی، هموگلوبین جنینی، پروتئین انسانی BCL11A، پلی مورفیسم (ژنتیک)

تاریخ دریافت: ۱۹/۶/۲

تاریخ پذیرش: ۱۹/۱۲/۲۳

- ۱- کارشناس ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران
- ۲- PhD ژنتیک مولکولی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران
- ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران
- ۴- کارشناس ارشد میکروبیولوژی - مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - ایران
- ۵- PhD ژنتیک انسانی - دانشیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران و مرکز تحقیقات ژنتیک انسانی کوثر - تهران - ایران
- ۶- مؤلف مسؤول: MD، PhD زیست فن‌آوری پزشکی - استادیار مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی انستیتو پاستور ایران - تهران - خیابان پاستور - پلاک ۶۹ - کدپستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱

**مقدمه**

هموگلوبینوپاتی‌ها، رایج‌ترین دسته از ناهنجاری‌های وراثتی می‌باشند که اثر شدیدی بر مرگ و میر جهانی دارند (۱). تعدادی از مطالعه‌ها نشان دادند که افزایش بیان هموگلوبین جنینی، یک تاثیر بهبود بخش در شدت بالینی کم خونی داسی شکل و بتا تالاسمی دارد (۲، ۳). در دوران نوزادی، هموگلوبین F (HbF) به هموگلوبین A (HbA) تغییر می‌یابد ولی گاهی این تعویض زنجیره به طور کامل روی نداده و باعث می‌شود که در افراد بالغ نیز درصد کمی هموگلوبین F مشاهده شود که تنها از سلول‌های F (F cell) منشا می‌گیرند (۴-۶). افزایش هموگلوبین F، عدم تعادل زنجیره‌های گلوبین را در بتا تالاسمی کاهش و علائم بیماری را بهبود می‌بخشد. همه افراد بالغ به تولید مقدار کمی (کمتر از ۰.۳-۰.۲٪ از کل هموگلوبین) از هموگلوبین F ادامه می‌دهند (۶). مقدار سلول‌های F و HbF در میان افراد بیمار و بالغین سالم به طور قابل توجهی متفاوت است (۷-۱۰، ۴). اگرچه اکثریت بالغین HbF کمتر از ۰.۸٪ کل هموگلوبین را دارند، ۱۰ تا ۱۵ درصد افراد، مقدار افزایش یافته‌ای تا ۵٪ را نشان می‌دهند (۱۱). افرادی که بیشتر از ۵٪ افزایش سلول‌های F را دارند، تحت عنوان Hereditary Persistent Fetal Hemoglobin (HPFH) مورد بررسی قرار می‌گیرند. HPFH یک صفت چند عاملی شناخته شده با افزایش معتدل مقدار هموگلوبین جنینی در بزرگسالان است (۱۲). وقتی که HPFH با بتا تالاسمی و کم خونی داسی شکل به ارث برسد، می‌تواند بازده تولید هموگلوبین جنینی را به سطحی که سودمند است افزایش دهد (۳، ۲). با این که عوامل محیطی مانند سن و جنس در این تفاوت نقش دارند، اما بررسی خانواده‌ها بیانگر وجود نقش مهم ژنتیک و توارث در این گونه تفاوت‌ها بوده است (۷). عوامل cis-acting و موتاسیون‌های نادری در لوکوس ژن بتاگلوبین، برخی از تغییرات را توضیح می‌دهند (۱۳، ۵). اما بیشتر از ۵۰٪ واریته‌ها، مرتبط به این لوکوس نیست. برای سال‌های زیادی تصور می‌شد که HPFH با rs7482144 در لوکوس بتاگلوبین همبستگی دارد (۱۴). جانشینی باز C به T در جایگاه ۱۵۸-ژن گاماگلوبین موسوم به *Xmnl*، به عنوان

فاکتور cis-acting شناخته می‌شود. بیشترین سهم تفاوت‌ها در هموگلوبین جنینی به علت عوامل trans-acting هستند (۱۵). در سال ۲۰۰۸، سانکاران و همکاران دو لوکوس trans-acting Quantitative Trait برای واریانس سلول‌های F در کروموزوم 6q و Xp را در خانواده‌هایی با کم خونی داسی شکل نقشه‌برداری کردند (۱۶).

پیش‌تر نیز کلوز و همکاران با جستجوی منطقه ۱/۵ میلیون بازی، واریته‌های مختلف را در کروموزوم 6q مشخص کردند. مطالعه‌های همبستگی ژنتیکی نیز چندین SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) در این ناحیه را که با تنوع در میزان هموگلوبین جنینی در بزرگسالان ارتباط دارد، معرفی کردند. این SNP ها در BCL11A و HBS1L-MYB قرار دارند. این سه لوکوس، BCL11A (۱۵٪)، HBS1L-MYB (۱۹٪) به همراه (۱۰٪) *Xmnl*، تقریباً ۵۰٪ تغییرات سلول‌های F را نشان می‌دهند (۱۷). الگوی وراثت‌پذیری واریانته‌های رایج در این سه QTL (Quantitative Trait Loci) تقریباً ۴۴٪ از تنوع کل HbF و سلول F را در افراد نرمال جمعیت تشکیل می‌دهند (۱۸). به غیر از این، چندین QTL دیگر نیز شناسایی شده‌اند اما فرکانس آن‌ها در جمعیت‌ها و سهم‌شان در تنوع سلول‌های F مشخص نشده است (۱۴). یودا و همکاران نشان دادند که توالی ما بین این ژن‌ها و محصولات آن‌ها در تکثیر، بقا و تمایز سلول‌های اجدادی خون‌ساز و میزان سلول‌های خونی محیطی در مطالعه‌های حیوانی تاثیر دارند (۲۰، ۱۹). در این ارتباط، مطالعه‌های بسیاری در مورد پلی مورفیسم‌های مرتبط با ژن‌های BCL11A و HBS1L-MYB که در تنظیم میزان سلول‌های F نقش دارند در جمعیت‌های مختلف انجام شده است. یودا، تین، لثره و همکارانشان در بررسی‌های خود در بیماران بتا تالاسمی و کم خونی داسی شکل، پلی مورفیسم‌های rs4895441 و rs11886868 را در ارتباط نزدیکی با افزایش هموگلوبین F و سایر صفات مؤثر در شاخص‌های خونی مشاهده و نتیجه‌گیری کردند که این پلی مورفیسم‌ها در کاهش شدت اثرات بالینی در این بیماران نقش مؤثر دارند (۲۱-۱۸). هدف از این مطالعه،

توزیع سنی بین ۲ تا ۳۰ سال و میانگین ۱۰ سال که از نظر شاخص‌های خون‌شناسی، هموگلوبین F کمتر از ۲٪ هموگلوبین کل را داشتند به عنوان افراد سالم انتخاب شدند. DNA ژنومی نمونه‌های خون از سلول‌های لوکوسیتی با استفاده از روش استاندارد Salting out استخراج و پس از تعیین غلظت و قبل از انجام مراحل بعدی، در دمای °C ۲۰- نگهداری شد (۲۲).

برای طراحی آغازگرها، توالی نواحی مجاور SNP هدف با مراجعه به بانک اطلاعاتی dbSNP واقع در پایگاه اینترنتی <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbsnp> استخراج و آغازگرهای مناسب با برنامه Gene Runner طراحی شد (جدول ۱). برای تکثیر ویژه قطعات اطراف پلی مورفیسیم‌های مورد نظر، واکنش زنجیره‌ای پلی مرز (PCR) با استفاده از ۵۰۰ نانوگرم DNA ژنومی، ۷ پیکومول از آغازگرهای اختصاصی (تگ کوپنهاگن) برای هر پلی مورفیسیم با استفاده از یک واحد آنزیم Super SmarTaq DNA Polymerase (شرکت نانوبیوفارما LTD)، ۲/۵ میلی مولار  $MgCl_2$ ، ۲۰۰ میکرومولار dNTP و ۱۹ میکرولیتر آب دوبار تقطیر انجام شد. PCR هر یک از پلی مورفیسیم‌های مورد مطالعه با دستگاه اپندورف (مدل Mastercycler gradient، آلمان) انجام شد. برنامه زمانی - دمایی بهینه واکنش زنجیره پلیمرز به ترتیب شامل مراحل زیر بود: مرحله ذوب آغازین شامل °C ۹۵ به مدت ۵ دقیقه، پس از آن ۳۵ تکرار دمایی با دنا تراسیون در دمای °C ۹۴ به مدت ۱ دقیقه، دمای اتصال °C ۶۰ برای rs4895441 و rs11886868 به مدت ۱ دقیقه و دمای اتصال °C ۶۲/۵ برای rs28384513 به مدت ۵۰ ثانیه و به دنبال آن همانندسازی اولیه در دمای °C ۷۲ به مدت ۱ دقیقه و سپس طویل سازی نهایی در دمای °C ۷۲ به مدت ۴ دقیقه انجام شد. پس از آنالیز محصولات PCR بر روی ژل آگارز، هضم آنزیمی محصولات PCR توسط آنزیم‌های محدودگر ویژه شامل *RsaI*، *MboII* و *BstXI* (شرکت نانوبیوفارما LTD) به ترتیب برای rs4895441، rs11886868 و rs28384513 در هر دو گروه بیمار و نرمال انجام شد. انکوباسیون محصولات PCR بیمار شده به مدت شش ساعت توسط *RsaI* و *MboII* در

بررسی ارتباط سه پلی مورفیسیم مرتبط با افزایش هموگلوبین جنینی در بین جمعیت مورد مطالعه از ایران بود و پرسش مطرح شده این بود که آیا ارتباط معنی داری بین این پلی مورفیسیم ها در جمعیت افراد سالم با هموگلوبین جنینی کاهش یافته و افزایش HbF در بیماران تالاسمی ماژور، وجود دارد؟

## مواد و روش‌ها

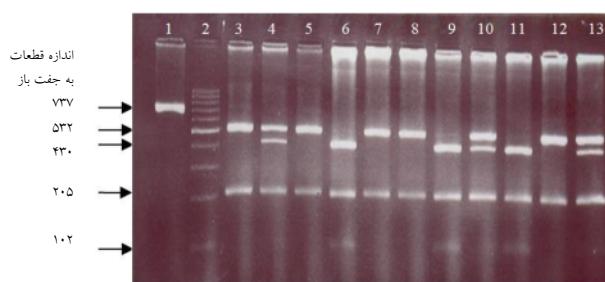
مطالعه از نوع مورد - شاهدی بود. ۹۷ نمونه خونی از افراد مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک تشخیص پیش از تولد (PND) انستیتو پاستور ایران آزمایش شدند. این افراد به دو گروه تقسیم شدند: گروه اول افرادی بودند که از نظر اندکس‌های خون‌شناسی و میزان هموگلوبین جنینی، طبیعی به شمار می رفتند (کمتر از ۲٪ HbF از کل هموگلوبین در خون) و دسته دیگر بیماران بتا تالاسمی ماژور بودند که از نظر شاخص‌های خون‌شناسی دارای افزایش هموگلوبین جنینی بیشتر از ۸٪ از کل هموگلوبین خون (بالتر از ۵٪ معیار) بودند. در این بررسی، بیماران بتا تالاسمی ماژور با هموگلوبین F بالاتر از ۸٪ وارد مطالعه شدند و بیماران تالاسمی با هموگلوبین F پایین تر از ۸٪ از مطالعه حذف شدند. معمولاً افراد دارای هموگلوبین F بالاتر از ۵٪ به عنوان افراد با هموگلوبین F بالا در نظر گرفته می شوند. در این مطالعه برای این که مطمئن شویم نمونه‌ها قطعاً هموگلوبین F بالایی دارند، معیار ورود به مطالعه ۸٪ به بالا در نظر گرفته شد. در افراد سالم نیز نمونه‌هایی با هموگلوبین F زیر ۲٪ به عنوان گروه کنترل وارد مطالعه شدند. پس از اخذ رضایت‌نامه از افراد سالم و بیماران تالاسمی مراجعه کننده به آزمایشگاه ژنتیک تشخیص پیش از تولد (PND) انستیتو پاستور ایران، مقدار ۵ تا ۱۰ میلی لیتر نمونه خون در لوله‌های حاوی EDTA تهیه شد. از بین موارد مراجعه کننده، ۵۰ فرد مبتلا به تالاسمی شامل ۳۱ زن و ۱۹ مرد با توزیع سنی بین ۱ تا ۵۳ سال و میانگین سنی ۱۲ سال همراه با افزایش HbF بین ۱۰/۳ تا ۷۵ درصد و میانگین ۵۱/۵ درصد (بیشتر از ۸٪) از هموگلوبین کل خون به عنوان مبتلایان به تالاسمی ماژور در نظر گرفته شدند. ۴۷ فرد شامل ۲۷ زن و ۲۰ مرد با

جدول ۱: فهرست توالی و ترتیب نوکلئوتیدی آغازگرهای طراحی شده، دمای اتصال، طول محصول تکثیر شده و آنزیم های مورد استفاده برای تعیین ژنوتیپ هر یک از سه پلی مورفیسم rs4895441، rs11886868 و rs28384513 (آلل سالم = Wt)

SNPs	توالی آغازگرها	دمای اتصال	طول محصول تکثیر شده	آنزیم محدودگر	طول قطعات پس از هضم آنزیمی
rs4895441 RefSNP Alleles: A/G Wt: A	rs4895F: TTGGCCAGAGCACACTTGAATG rs4895R: GGATGGGTGATCATGTGTTTGC	۶۰/۳ °C	۷۳۷ bp	<i>RsaI</i>	A ۵۳۲ + ۲۰۵ G ۴۳۰ + ۲۰۵ + ۱۰۲
rs11886868 RefSNP Alleles: C/T Wt: T	rs1188F: TTTGGTGTCTACCCTGAAAGAC rs1188R: ACTCAACAGTAGCAGAATGAAA GAG	۶۰ °C	۵۴۰ bp	<i>MboII</i>	C ۴۷۸ + ۷۰ T ۵۴۰
rs28384513 RefSNP Alleles: A/C Wt: A	rs2838F: GAATGCCCACTGTGTGCTTAATC rs2838R: ATACTGATAAGGCGCCAACCTG	۶۲/۵ °C	۴۳۵ bp	<i>BstXI</i>	A ۳۱۶ + ۱۱۹ C ۴۳۵

در قطعه ۵۳۲ جفت بازی rs4895441 داشتند، این قطعه را به دو قطعه ۴۳۰ و ۱۰۲ جفت بازی تقسیم کرد که در مجموع با قطعه ۲۰۵ جفت بازی سه قطعه به دست آمد. در الگوی الکتروفورزی محصول هضم شده قطعه دارای تغییر A، ۲ بانده و در الگوی الکتروفورزی محصول هضم شده قطعه با تغییر A به G، ۳ بانده قابل مشاهده خواهد بود (شکل ۱).

دمای ۳۷ °C و با آنزیم *BstXI* در دمای ۵۵ °C به طور شبانه صورت گرفت. محصولات برش آنزیمی، در ژل آگارز ۳٪ در کنار محصول برش نیافته PCR و مارکر DNA، الکتروفورز شدند. پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، باندهای مورد نظر توسط دستگاه دستگاه UV Gel Doc (Transilluminator) مشاهده شد. سپس فراوانی آلی و ژنوتیپی نمونه ها برای هر یک از SNP های مورد بررسی با آزمون کای دو توسط نرم افزار بر پایه وب SNP Analyzer2 موجود در پایگاه <http://snp.istech.info/istech> و نرم افزار آماری SPSS ۱۶ مورد ارزیابی قرار گرفت.



شکل ۱: تکثیر قطعه ۷۳۷ نوکلئوتیدی مربوط به rs4895441 و الگوی برش آن توسط آنزیم *RsaI*. الگوی الکتروفورزی محصولات هضم شده قطعه ۷۳۷ نوکلئوتیدی مربوط به rs4895441. چاهک ۱ محصول PCR برش داده نشده. چاهک ۲ مارکر ۱۰۰ جفت بازی، چاهک های ۳ تا ۱۲ محصولات هضم شده قطعه ۷۳۷ نوکلئوتیدی. در چاهک های ۳، ۵، ۷، ۸ و ۱۲ دو قطعه به طول ۵۳۲ و ۲۰۵ جفت بازی برای تغییر A و در ستون ۶، ۹ و ۱۱ سه قطعه ۴۳۰، ۲۰۵، ۱۰۲ جفت بازی برای تغییر G مشاهده می شود. در ستون های ۴، ۱۰ و ۱۳، قطعات ۵۳۲، ۴۳۰، ۲۰۵ و ۱۰۲ جفت بازی مربوط به دو الگوی هم زمان A و G قابل رؤیت است.

#### یافته ها

در مطالعه حاضر، پلی مورفیسم های rs4895441، rs11886868 و rs28384513 در ۹۷ فرد بیمار تالاسمی و سالم برای نقش داشتن در افزایش هموگلوبین F با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفتند. در مورد مربوط به rs4895441، پس از این که مشخص شد در تمام نمونه ها توالی ۷۳۷ زوج نوکلئوتیدی به خوبی تکثیر یافته است، محصول PCR آن ها توسط آنزیم *RsaI* برش داده شد.

رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نشان داد که برای تغییر A در این جایگاه (rs4895441)، دو قطعه به طول ۵۳۲ و ۲۰۵ جفت بازی مشاهده می شود. آنزیم *RsaI* با ایجاد یک جایگاه برش دیگر در نمونه هایی که تغییر A به G را

جدول ۲: توزیع فرکانس آلل موتانت پلی مورفیسم‌های مورد بررسی و فراوانی آللی دو گروه تالاسمی ماژور و افراد سالم

SNPs	آلل	Ancestral Allele	فرکانس آلل موتانت		p-value	فرکانس آللی
			سالم	بیمار		
rs4895441	A/G	A	۰/۲۴۵	۰/۳	۰/۸۹۸	۰/۸۹۸
rs11886868	C/T	T	۰/۴۷۹	۰/۴۸	۰/۹۹۸	۰/۹۹۸
rs28384513	A/C	A	۰/۳۰۹	۰/۲۸۰	۰/۹۴۹	۰/۹۴۹

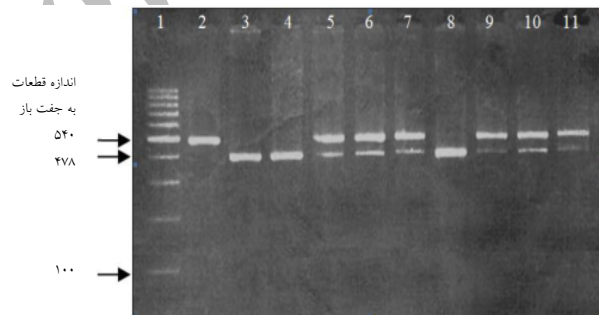
جدول ۳: توزیع فرکانس ژنوتیپ پلی مورفیسم‌های مورد بررسی در دو گروه بیمار و سالم

ژنوتیپ	rs4895441				rs11886868		rs28384513		
	A/A (%)	A/G (%)	G/G (%)	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	A/A (%)	A/C (%)	C/C (%)
بیمار	(۵۲)۲۶	(۳۶)۱۸	(۱۲)۶	(۲۴)۱۲	(۵۸)۲۹	(۱۸)۹	(۵۶)۲۸	(۳۲)۱۶	(۱۲)۶
سالم	(۵۹/۵)۲۸	(۳۲)۱۵	(۸/۵)۴	(۲۷/۶)۱۳	(۴۸/۹)۲۳	(۲۳/۴)۱۱	(۵۱)۲۴	(۳۶)۱۷	(۱۲/۷)۶
کای - دو		۰/۰۲۹			۰/۰۳۴		۰/۰۱		
p-value		۰/۹۸۵			۰/۹۸۳		۰/۹۹۵		

rs28384513 در اثر آنزیم *BstXI* نشان داد که در تغییر C قطعه ۴۳۵ جفت بازی بدون ایجاد برش باقی می ماند ولی با تغییر A، این توالی نوکلئوتیدی به دو قطعه ۳۱۶ و ۱۱۹ زوج بازی برش داده می شود. این دو قطعه در ژل آگارز به خوبی از هم تفکیک شده و به صورت دو باند مجزا دیده شد. پس از هضم آنزیمی، فرکانس آللی و ژنوتیپی هر پلی مورفیسم جداگانه محاسبه شد. فرکانس آللی برای آلل موتانت در rs4895441، rs11886868 و rs28384513 به ترتیب ۰/۲۴۵، ۰/۵۲۱، و ۰/۳۰۹ در گروه سالم و ۰/۳۰۰، ۰/۵۲۰، و ۰/۲۸۰ در گروه بیمار بود (جدول ۲ و ۳). نتایج نشان دادند که پلی مورفیسم‌ها در بیماران تالاسمی ماژور همراه با افزایش هموگلوبین F در مقایسه با افراد سالم، p-value بیشتر از ۰/۰۵ را داشتند.

#### بحث

کم خونی داسی شکل و بتا تالاسمی هر دو تنوع قابل توجهی را در شدت بیماری نشان می دهند و یکی از فاکتورهای بهبود بخش در این مورد، توانایی ذاتی تولید هموگلوبین جنینی است. در سالیان اخیر مشخص شد که متغیرهای خونی توسط ساختار ژنتیکی بیماران تحت تاثیر قرار می گیرند (۲۳، ۲۴). تاکنون چندین فاکتور در افزایش سطح سلول‌های F و هموگلوبین جنینی هم چون سن،



شکل ۲: نتایج برش توالی ۵۴۰ نوکلئوتیدی مربوط به rs11886868 (۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ۲: محصول PCR، ۳ تا ۱۱: محصولات برش آنزیمی). در اثر هضم آنزیمی توسط *MboII*، توالی ۵۴۰ نوکلئوتیدی دارای تغییر T به C به دو قطعه ۴۷۸ و ۷۰ نوکلئوتیدی برش داده می شود. (قطعه ۷۰ نوکلئوتیدی به دلیل کوچک بودن، در ژل آگارز به خوبی دیده نمی شود). چاهک شماره ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی. چاهک شماره ۲: محصول PCR. چاهک‌های ۱۱-۳ نمونه‌های بیماران.

محصول PCR قطعه ۵۴۰ جفت بازی حاصل از تکثیر rs11886868 که دو تغییر C و T را دارند، نشان داد که در اثر هضم آنزیمی با *MboII* تغییر T به C، دو قطعه ۴۷۸ و ۷۰ بازی ایجاد می شود، ضمن این که قطعه ۷۰ زوج بازی به دلیل کوچکتر بودن در ژل آگارز به خوبی مشاهده نمی شود (شکل ۲). هضم آنزیمی قطعه ۴۳۵ جفت بازی

می‌گذارد (۲۵).

در بررسی حاضر سه SNP rs4895441، rs11886868 و rs28384513 که در مطالعه‌های گروه‌های قبلی معنی‌دار بودند انتخاب و در بین بیماران بتا تالاسمی ماژور و افراد سالم مورد ارزیابی قرار گرفتند. اگر چه به طور طبیعی اکثریت بالغین سطح HbF کمتر از ۰/۶٪ و ۱۰ تا ۱۵ درصد افراد، افزایش خفیفی به میزان ۰/۸٪ تا ۰/۵٪ را دارند، با این وجود در این مطالعه F بالای ۸٪ به جای ۵٪ در نظر گرفته شد تا از سطح بالای هموگلوبین F در نمونه‌های بیمار اطمینان کامل داشته باشیم (۱۱). تحلیل فرکانس آللی و فرکانس ژنوتیپی در سه SNP توسط نرم‌افزار بر پایه وب 2SNP Analyzer موجود در پایگاه <http://snp.istech.info/istech> و آزمون کای دو توسط نرم‌افزار SPSS ۱۶ انجام شد. فرکانس‌های آللی به دست آمده از دو گروه تفاوت چندانی با هم نداشتند و از این نظر تقریباً مشابه بودند. با انجام آزمون کای دو مشخص شد که p-value فرکانس آللی در پلی مورفیسم rs11886868، rs4895441 و rs28384513 بین گروه بیمار و سالم نیز یکسان است (جدول ۲). p value ژنوتیپی نیز به طور جداگانه برای هر یک از ژنوتیپ‌های دو جمعیت محاسبه شد و در این مرحله نیز p-value در rs11886868 بیشتر از ۰/۰۵ بود. به طور کلی کمترین p-value آللی و ژنوتیپی در مورد هر سه پلی مورفیسم به ترتیب برای گروه بیمار و سالم تعیین شد ولی این مقادیر از لحاظ آماری با  $p < ۰/۰۵$  معنی‌دار نبودند. بنابراین ارتباط معنی‌داری بین فرکانس‌های آللی پلی مورفیسم‌ها و فراوانی ژنوتیپی در دو گروه بیمار و افراد سالم مشاهده نشد و دو گروه نشان دادند که از نظر قانون هاردی - واینبرگ در تعادل قرار دارند (جدول ۲ و ۳). دلایل چنین مشاهداتی می‌تواند به علت نوع انتخاب در مارکرهای جمعیتی و تفاوت‌های نژادی باشد. مارکرهای مورد بررسی می‌توانند تنها نشانه یک مارکر پلی مورفیک در این مطالعه بوده و تنها عامل اصلی و مستقیم افزایش هموگلوبین F و کاهش شدت کلینیکی در بیماران تالاسمی ماژور و کم خونی داسی شکل در جمعیت ما نباشند. چنین نتیجه‌ای می‌تواند به دلیل تفاوت در زمینه ژنتیک جمعیت ایران باشد. مورد دیگری

جنس، واریانت‌های ژنتیکی پیوسته و ناپیوسته به لوکوس بتا گلوبین در کروموزوم 11p شناسایی شدند (۲۶، ۲۵، ۱۹-۱۷). پلی مورفیسم *XmnI* در خوشه ژن بتا گلوبین (قسمت پروموتور ژن گاما گلوبین) در تقریباً ۱۹ درصد موارد در مطالعه‌های قبلی توجیه کننده افزایش میزان هموگلوبین F می‌باشد و سایر عوامل افزایش دهنده هموگلوبین F در خارج از این جایگاه قرار دارند (۱۲). تعداد زیادی از مطالعه‌های همبستگی ژنتیکی، چندین SNP را که با تنوع در بیان هموگلوبین جنینی در خارج از لوکوس بتا گلوبین مرتبط بود، شناسایی کردند که برای کاهش بروز شدت کلینیکی بیماری تالاسمی و کم خونی داسی شکل معنی‌دار شناخته شدند. پلی مورفیسم‌های متعددی در این نواحی برای همبستگی با افزایش بیان هموگلوبین جنینی نقش دارند که از این موارد می‌توان به rs4895441 در منطقه بین ژنی HBS1L-MYB، rs11886868 در ناحیه اینترونی BCL11A و rs28384513 در بالا دست ژن HBS1L اشاره کرد، با این وجود کارکردی بودن این SNP تاکنون مشخص نشده است. یودا و همکاران نشان دادند که rs11886868 در افراد Sardinian مبتلا به تالاسمی و کم خونی داسی شکل با افزایش هموگلوبین F ( $p < 10^{-35}$ ) در ارتباط است (۱۸). هم چنین در بررسی‌های تین و همکاران و همین طور لثره و همکاران، پلی مورفیسم‌های rs4895441 و rs11886868 ارتباط معنی‌داری با کاهش بروز شدت کلینیکی بیماری تالاسمی از طریق افزایش هموگلوبین F بودند و به علاوه SNP های دیگری در مطالعه‌های GWAS (Genome Wide Association Study) مرتبط با سایر صفات خونی نیز مورد بررسی قرار گرفتند (۲۸، ۲۷، ۱۹، ۱۸). تاکنون SNP واحدی برای افزایش بیان ژن گاما گلوبین تایید نشده است اما نشان داده شد که ناحیه بین ژنی HBS1L-MYB در کروموزوم 6q23.3، مقدار گلبول قرمز، پلاکت، مونوسیت و میزان سلول‌های F را در انسان تحت تاثیر قرار می‌دهد (۳۰، ۲۹). علاوه بر این، BCL11A نیز نقش کلیدی در تغییر هموگلوبین جنینی به هموگلوبین بالغ در روند خونسازی دارد و بیانش در سلول‌های رده اریترئوئید بالغ بر روی تولید مقدار هموگلوبین جنینی تاثیر

بیمار با تالاسمی ماژور همراه با هموگلوبین F افزایش یافته در شرایطی هستند که پاسخ بهتری به داروهای افزایش دهنده هموگلوبین دارند. بدین ترتیب این افراد نیاز کمتری به استفاده از داروهای القاکننده هموگلوبین جنینی دارند.

### نتیجه گیری

این مطالعه برای اولین بار در ایران در ارتباط با بررسی پلی مورفیسم های افزایش دهنده هموگلوبین F در بیماران بتا تالاسمی ماژور صورت گرفت و در آن افراد بیمار بتا تالاسمی ماژور با هموگلوبین افزایش یافته و افراد سالم دارای هموگلوبین جنینی پایین با یکدیگر مقایسه شدند. این نتایج می تواند به دلیل مقایسه بین فرکانس های آلی و ژنوتیپی افراد بیمار بتا تالاسمی ماژور و افراد سالم، تفاوت در زمینه ژنتیکی جمعیت، دخالت سایر پلی مورفیسم ها در افزایش هموگلوبین F و یا میان کنش چندین پلی مورفیسم با یکدیگر تحت تاثیر قرار گرفته باشد. شناخت عواملی که موجب فعالیت مجدد HbF می شوند مهم بوده و از آن می توان به عنوان یک استراتژی درمانی برای تالاسمی و کم خونی داسی شکل استفاده کرد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از کلیه شرکت کنندگان در این پژوهش و همکاران گروه پزشکی مولکولی انستیتو پاستور ایران تقدیر و تشکر می نمایند.

### References :

- 1- Weatherall DJ, Clegg JB. Thalassemia--a global public health problem. *Nat Med* 1996; 2(8): 847-9.
- 2- Platt OS, Brambilla DJ, Rosse WF, Milner PF, Castro O, Steinberg MH, *et al.* Mortality in sickle cell disease. Life expectancy and risk factors for early death. *N Engl J Med* 1994; 330(23): 1639-44.
- 3- Ho PJ, Hall GW, Luo LY, Weatherall DJ, Thein SL. Beta-thalassaemia intermedia: is it possible consistently to predict phenotype from genotype?. *Br J Haematol* 1998; 100(1): 70-8.
- 4- Miyoshi K, Kaneto Y, Kawai H, Ohchi H, Niki S, Hasegawa K, *et al.* X-linked dominant control of F-cells in normal adult life: characterization of the Swiss type as hereditary persistence of fetal hemoglobin regulated dominantly by gene(s) on X chromosome. *Blood* 1988; 72(6): 1854-60.
- 5- Stamatyannopoulos G. The molecular basis of hemoglobin disease. *Annu Rev Genet* 1972; 6: 47-70.
- 6- Boyer SH, Belding TK, Margolet L, Noyes AN. Fetal hemoglobin restriction to a few erythrocytes (F cells) in normal human adults. *Science* 1975; 188(4186): 361-3.
- 7- Zago MA, Wood WG, Clegg JB, Weatherall DJ, O'Sullivan M, Gunson H. Genetic control of F cells in human adults. *Blood* 1979; 53(5): 977-86.
- 8- Rutland PC, Pembrey ME, Davies T. The estimation of fetal haemoglobin in healthy adults by radioimmunoassay. *Br J Haematol* 1983; 53(4): 673-82.
- 9- Economou EP, Antonarakis SE, Kazazian HH Jr, Serjeant GR, Dover GJ. Variation in hemoglobin F production among normal and sickle cell adults is not related to nucleotide substitutions in the gamma promoter regions. *Blood* 1991; 77(1): 174-7.
- 10- Sampietro M, Thein SL, Contreras M, Pazmany L.

- Variation of HbF and F-cell number with the G-gamma Xmn I (C-T) polymorphism in normal individuals. *Blood* 1992; 79(3): 832-3.
- 11- Thein SL, Craig JE. Genetics of Hb F/F cell variance in adults and heterocellular hereditary persistence of fetal hemoglobin. *Hemoglobin* 1998; 22(5-6): 401-14.
  - 12- Garner C, Tatu T, Reittie JE, Littlewood T, Darley J, Cervino S, *et al.* Genetic influences on F cells and other hematologic variables: a twin heritability study. *Blood* 2000; 95(1): 342-6.
  - 13- Platt OS, Thorington BD, Brambilla DJ, Milner PF, Rosse WF, Vichinsky E, *et al.* Pain in sickle cell disease. Rates and risk factors. *N Engl J Med* 1991; 325(1): 11-6.
  - 14- Higgs DR, Wood WG. Genetic complexity in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(33): 11595-6.
  - 15- Garner C, Tatu T, Game L, Cardon LR, Spector TD, Farrall M, *et al.* A candidate gene study of F cell levels in sibling pairs using a joint linkage and association analysis. *GeneScreen* 2000; 1(1): 9-14.
  - 16- Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, *et al.* Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science* 2008; 322(5909):1839-42.
  - 17- 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 zinc-finger protein on chromosome 2p15. *Nat Genet* 2007; 39(10): 1197-9.
  - 18- Uda M, Galanello R, Sanna S, Lettre G, Sankaran VG, Chen W, *et al.* Genome-wide association study shows BCL11A associated with persistent fetal hemoglobin and amelioration of the phenotype of beta-thalassemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(5): 1620-5.
  - 19- Lettre G, Sankaran VG, Bezerra MA, Araujo AS, Uda M, Sanna S, *et al.* DNA polymorphisms at the BCL11A, HBS1L-MYB, and beta-globin loci associate with fetal hemoglobin levels and pain crises in sickle cell disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(33): 11869-74.
  - 20- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104 (27): 11346-51.
  - 21- Thein SL, Menzel S. Discovering the genetics underlying foetal haemoglobin production in adults. *Br J Haematol* 2009; 145(4): 455-67.
  - 22- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16(3): 1215.
  - 23- Buckley MF, James JW, Brown DE, Whyte GS, Dean MG, Chesterman CN, *et al.* A novel approach to the assessment of variations in the human platelet count. *Thromb Haemost* 2000; 83(3): 480-4.
  - 24- Evans DM, Frazer IH, Martin NG. Genetic and environmental causes of variation in basal levels of blood cells. *Twin Res* 1999; 2(4): 250-7.
  - 25- Liu H, Ippolito GC, Wall JK, Niu T, Probst L, Lee BS, *et al.* Functional studies of BCL11A: characterization of the conserved BCL11A-XL splice variant and its interaction with BCL6 in nuclear paraspeckles of germinal center B cells. *Mol Cancer* 2006; 5: 18.
  - 26- 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 beta-hemoglobinopathies. *Blood Cells Mol Dis* 2008; 41(3): 255-8.
  - 27- Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet* 2009; 18(R2): R216-23.
  - 28- Nuinon M, Makarasara W, Mushiroda T, Setianingsih I, Wahidiyat PA, Sripichai O, *et al.* A genome-wide association identified the common genetic variants influence disease severity in beta0-thalassemia/hemoglobin E. *Hum Genet* 2010; 127(3): 303-14.
  - 29- Jiang J, Best S, Menzel S, Silver N, Lai MI, Surdulescu GL, *et al.* cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. *Blood* 2006; 108(3): 1077-83.
  - 30- Menzel S, Jiang J, Silver N, Gallagher J, Cunningham J, Surdulescu G, *et al.* The HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23.3 influences erythrocyte, platelet, and monocyte counts in humans. *Blood* 2007; 110(10): 3624-6.
  - 31- Ganesh SK, Zakai NA, van Rooij FJ, Soranzo N, Smith AV, Nalls MA, *et al.* Multiple loci influence erythrocyte phenotypes in the CHARGE Consortium. *Nat Genet* 2009; 41(11): 1191-8.



*Original Article*

## Relationship between DNA polymorphisms at the BCL11A and HBS1L-MYB loci in $\beta$ -Thalassemia patients with increased fetal hemoglobin levels

Hashemi Gorji F.<sup>1</sup>, Hamid M.<sup>1</sup>, Arab A.<sup>1</sup>, Amirian A.<sup>1</sup>, Zeinali S.<sup>1,2</sup>, Karimipoor M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

<sup>2</sup>Kowsar Human Genetic Research Center, Tehran, Iran

### Abstract

#### **Background and Objectives**

High fetal hemoglobin (HbF) levels have a major impact on the hemoglobin disorders, i.e.  $\beta$ -Thalassemia. Increased HbF production ameliorates the disease severity. Three loci—HBS1L-MYB intergenic region on chromosome 6q23, BCL11A on chromosome 2p16, and the  $\gamma$ -globin gene on chromosome 11 account for up to 50% of the variations in HbF levels in patients with sickle cell anemia, thalassemia and healthy adults. In the present study, we evaluated the relationship between some polymorphisms on HBS1L-MYB BCL11A loci and increased HbF levels in thalassemia patients and normal subjects.

#### **Materials and Methods**

In this case-control study, three common polymorphisms among 50  $\beta$ -thalassemia patients with increased HbF and 47 healthy individuals with normal HbF by using PCR-RFLP were genotyped: rs4895441, rs11886868, and rs28384513. Enzymatic digestion was performed by RsaI, MboII, and BstXI, respectively. Correlations with high levels of HbF were performed with a Chi-square test by using SPSS 16 and SNP analyzer2.

#### **Results**

Mutant allelic frequencies were 0.245, 0.521 and 0.309 in healthy and 0.3, 0.52 and 0.28 in patient for rs4895441, rs11886868 and rs28384513, respectively. Significant relationship was not observed among three polymorphisms studied in healthy volunteers and  $\beta$ -Thalassemia major patients with increased HbF levels and P-value allelic and genotypic was higher than 0.05 at three SNPs.

#### **Conclusions**

In spite of previous reports, evaluation of polymorphisms at the BCL11A and HBS1L-MYB loci in this study did not show up a significant correlation with increased HbF. Other polymorphisms might have a role in increasing HbF in our population.

**Key words:** beta-Thalassemia, Fetal Hemoglobin, BCL11A protein: human, polymorphism: Genetic

*Sci J Iran Blood Transfus Organ 2011; 8(3):149-157*

Received: 24 Aug 2010

Accepted: 14 Mar 2011

Correspondence: Karimipoor M., PhD of Medical Biotechnology. Molecular Medicine Department, Biotechnology Research Center, Pasteur Institute of Iran. Pasteur St., No. 69.  
Postal code: 1316943551, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 66480780; Fax : (+9821) 66480780  
E-mail: mortezakarimi@yahoo.com