

Overzichten

Moleculaire diagnostiek van hemoglobinopathieën en thalassemieën

W.W. van SOLINGE, H.A. van WIJK en R.J. KRAAIJENHAGEN

Diagnostiek met behulp van moleculair biologische technieken trekt momenteel sterk de aandacht. Steeds meer klinisch-chemische laboratoria zetten een DNA-laboratorium op en beginnen deze nieuwe technieken te gebruiken. De moleculaire diagnostiek van hemoglobinopathieën en thalassemieën blijkt een van de belangrijkste aandachtsgebieden te zijn. Dit artikel beschrijft relevante moleculair biologische technieken. De globine genclusters en expressie hiervan worden besproken evenals de fenotypische en genotypische analyse van de hemoglobinopathieën, α -thalassemieën, β -thalassemieën en gecombineerde afwijkingen. Tot slot wordt besproken of en wanneer moleculaire diagnostiek van deze afwijkingen noodzakelijk is.

Trefwoorden: moleculaire diagnostiek; hemoglobinopathie; thalassemie; DNA; genotype; fenotype

Moleculair biologische technieken hebben de laatste jaren een doorbraak teweeg gebracht op tal van onderzoeksgebieden. Met name de Polymerase Chain Reaction (PCR), een techniek om specifieke stukken DNA exponentieel te vermeerderen en zo beschikbaar te maken voor nader onderzoek, heeft een grote vooruitgang mogelijk gemaakt. Het toepasbaar zijn op tal van onderzoeksterreinen, de grote gevoeligheid en de relatieve eenvoud van de techniek hebben gezorgd voor succes in de onderzoekswereld. Deze successen hebben ertoe geleid dat nu ook in klinische laboratoria de PCR, al dan niet aangevuld met andere moleculair biologische technieken, zijn toepassingen vindt. Tot op heden zijn met name de diagnostiek van erfelijke afwijkingen, neoplastische processen en infecties de belangrijkste aandachtsgebieden. In de toekomst zullen tal van nieuwe toepassingen en met name genexpressie analyses, helpen ons inzicht in de samenhang tussen genotypen en fenotypen te vergroten. Figuur 1 illustreert hoe gecompliceerd het zoeken naar een oorzaak van een specifiek fenotype kan zijn. De expressie van een gen wordt op tal van niveaus gereguleerd. Voor elke stap in deze figuur bestaan aparte regulatie mechanismen (1,2). Op elk van deze niveaus kan dientengevolge een de-regulatie plaatsvinden. Nu een steeds groter aantal genen be-

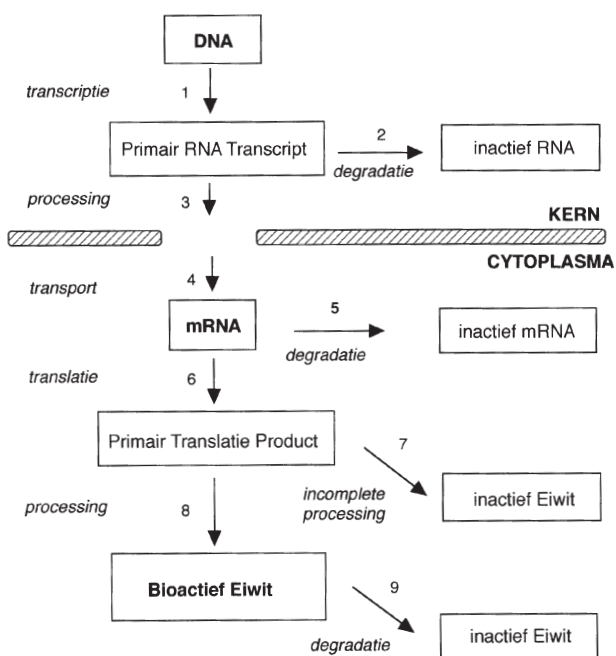
kend wordt en moleculair biologische technieken toegankelijker zijn geworden, is op tal van klinische laboratoria de mogelijkheid en/of de interesse ontstaan om specifieke genen te bestuderen.

Hemoglobinopathieën en thalassemieën zijn een van de meest voorkomende genetische afwijkingen in de wereldbevolking. Migratie uit hoge incidentie gebieden naar Nederland resulteert erin dat deze afwijkingen als oorzaak van een microcytaire anemie in Nederland geen zeldzaamheid meer zijn. Dit artikel wil een beknopt overzicht geven van de huidige kennis van de α - en β -globine genclusters, de moleculaire diagnostiek en ingaan op de vraag of en wanneer moleculair biologisch onderzoek naar deze genetische afwijkingen zinvol is.

Voor verklaring van moleculair biologische terminologie (voor zover niet in de tekst genoemd), wordt verwezen naar de literatuur (3).

Globine genclusters en expressie

Hemoglobine is opgebouwd uit vier eiwitketens (globinen) en vier haem-moleculen. De genen welke coderen voor de verschillende globineketens zijn gelocaliseerd in genclusters. Deze verzameling van verschillende genen wordt zodanig gereguleerd, dat tijdens de ontwikkeling van een individu op vaste momenten specifieke genen tot expressie komen (4).



Figuur 1. Gen-expressie en de niveaus waarop de expressie kan worden gereguleerd.

Klinisch Laboratorium, Ziekenhuis Eemland, Amersfoort

Correspondentie: Dr W.W. van Solinge, Klinisch Laboratorium, Ziekenhuis Eemland, Utrechtseweg 160, 3818 ES Amersfoort. Ingekomen: 12.01.96

Het α -globine gencluster is gelocaliseerd op de korte arm van chromosoom 16. De cluster bestaat uit een ζ -gen, een θ -gen en twee α -genen. Dit betekent, dat ieder normaal individu vier α -genen bezit, op elk chromosoom twee. Daarnaast zijn er een pseudo- ζ -gen en twee pseudo- α -genen. Deze genen vertonen een zeer grote homologie met de functionele genen, maar missen cruciale controle elementen waardoor ze niet tot expressie kunnen komen. In het embryonale stadium komen van deze cluster het ζ -gen en de α -genen tot expressie, vanaf het foetale stadium zijn dit alleen de twee α -genen (5).

Het β -globine gencluster is gelocaliseerd op de korte arm van chromosoom 11. De cluster bestaat uit een ϵ -gen, twee γ -genen (G_γ en A_γ), een pseudo- β -gen, een δ -gen en een β -gen. In het embryonale stadium komen voornamelijk het ϵ -gen en de γ -genen tot expressie. In het foetale stadium komen de γ -genen tot uitdrukking ($G_\gamma > A_\gamma$) en op een laag niveau het β -gen. Na geboorte neemt de expressie van het β -gen sterk toe en wordt ook het δ -gen afgelezen. De expressie van de γ -genen neemt af tot een zeer laag niveau (6). Ieder normaal individu heeft dus twee β -genen, op elk chromosoom een. De structuur van de individuele genen, wordt hier niet verder behandeld (zie 5,6).

De biosynthese van de globinen vindt plaats zoals aangegeven in figuur 1. Voor een gedetailleerde beschrijving van de vele factoren en processen betrokken bij transcriptie van de genen wordt verwezen naar betreffende referentie (2). Van belang is, dat zeer specifieke nucleotiden volgorden ("promoters" en "enhancers") herkend moeten worden door, onder andere, transcriptiefactoren. Elk afzonderlijk gen binnen de twee clusters heeft eigen "herkennings-sequenties", maar de cluster zelf heeft ook specifieke controle-elementen, vele tienduizenden nucleotiden van het betreffende gen verwijderd (" β -Locus Control Region" (LCR) voor het β -gen en " α -Hypersensitive Site" (HS-40) voor de α -genen). Voor deze, maar ook hierna genoemde specifieke sequenties van nucleotiden geldt, dat de juiste volgorde essentieel is voor een goed verloop van de expressie cascade. Een enkele mutatie kan ernstige gevolgen hebben.

Na transcriptie van het DNA wordt de mRNA-precursor, het RNA waarin de getranscribeerde intronen nog aanwezig zijn, omgezet tot mRNA. Bij dit proces, wat "splicing" genoemd wordt, worden de intron-sequenties verwijderd en de exonen aan elkaar gezet. Dit proces is aan tal van regulatie-mechanismen onderworpen (7). Ook hier is het van belang dat specifieke nucleotiden volgorden aanwezig moeten zijn om een foutloos verloop van dit proces te garanderen. In de kern van de cel wordt het mRNA gepolyadenyleerd aan de 3'-zijde en voorzien van een "cap" aan de 5'-zijde. Deze modificaties beschermen het RNA tegen inwerking van exonucleasen. Wederom zijn hiervoor specifieke nucleotiden sequenties noodzakelijk (8,9). Dit mRNA verlaat de kern en komt in het cytoplasma, waar het geïntegreerd wordt in een zeer groot eiwitcomplex (polysomen). Translatie van mRNA kan nu plaats vinden. Zowel de binding aan het mRNA van de verschillende eiwitten die tezamen de polysomen vormen, als het begin en eind van het

translatie proces, vergen wederom zeer specifieke nucleotiden sequenties in het RNA ("leader" en "trailer" (10)).

Door de specifieke expressie van verschillende genen van de clusters gedurende de ontwikkeling van het individu, ontstaan verschillende tetrameren van globine-ketens. De belangrijkste zijn in de foetus HbF (α_2/γ_2) en in het volwassen individu HbA (α_2/β_2) en in geringe mate HbA₂ (α_2/δ_2).

Het juist inbouwen in het eiwit van de goede aminozuren is van belang voor een optimaal functioneren van het eiwit. Veranderingen van aminozuren kunnen leiden tot veranderingen in bindingen met haem en andere globine-ketens, verslechterde zuurstof binding, etcetera (4).

Relevante moleculair biologische technieken

Voor analyse van het genetisch materiaal is allereerst het isoleren van DNA noodzakelijk. Het is in principe mogelijk direct op het uitgangsmateriaal (bijvoorbeeld bloed) een analyse (PCR) te verrichten (11). Deze benadering is snel, maar werkt meestal alleen goed bij makkelijk te amplificeren genen (bijvoorbeeld het β -globine gen) en geeft geen of slecht interpreteerbare resultaten bij gecompliceerde DNA sequenties (bijvoorbeeld de α -globine genen). Tal van DNA extractie procedures zijn beschreven met elk verschillende voor- en nadelen. Voor details zie elders (12,13).

Southern analyse is een techniek waarbij DNA (na behandeling met restrictie-enzymen (RE) of PCR geamplificeerd materiaal) na agarose elektroforese overgebracht wordt op een membraan. Deze kan met een gemerkte probe (radioactief of luminiscentie) gehybridiseerd worden. Bindt de probe aan een DNA-fragment dan komt de sequentie in de probe in principe overeen met het gedetecteerde fragment, afhankelijk van de keuze van de hybridisatie en wascondities (12). Deze techniek wordt gebruikt bij analyses ter identificatie van α -thalassemieën. Combinaties van met name de restrictie-enzymen BamHI, BglII en EcoRI met specifieke α - en ζ -probes zijn standaard. Aanvullende analyses met andere restrictie-enzymen en probes geven additionele informatie (14). De PCR is de laatste jaren veel gebruikt bij het diagnosticeren van afwijkingen in de α - en β -genclusters. Van alle genen binnen de cluster zijn de nucleotidenvolgorden bekend, zodat het ontwerpen van primers mogelijk is. De aanwezigheid van pseudogenen vereist, dat de sequentie van de primers genspecifiek is, om kruisreacties met deze genen die een hoge mate van homologie vertonen, te voorkomen (15-17). Er moet eenmalig een sequentie analyse uitgevoerd worden op het geamplificeerde materiaal, als gouden standaard, om het juist zijn van de PCR reactie te bevestigen. De analyse van geamplificeerde DNA-fragmenten kan op een aantal wijzen geschieden. Het meest eenvoudig is agarose elektroforese en ethidium bromide kleuring, waarbij de grootte van de fragmenten aan de hand van een standaard geschat kan worden. Bij aanwezigheid van deleties of inserties zullen fragmenten ontstaan met een afwijkende grootte in vergelijking met de normale controle. Ook het aan-

wezig zijn van de mutatie in heterozygote of homozygote vorm is detecteerbaar. Wordt er gezocht naar puntmutaties die bekend zijn en welke een herkennings-sequentie voor een restrictie enzym veranderen, dan kunnen de fragmenten gesplitst worden met het betreffende restrictie enzym. Als de PCR een specifieke band oplevert kan de restrictie enzym behandeling direct op een aliquot van het PCR product gericht worden. Zijn er meerdere banden, en kan de PCR niet verder geoptimaliseerd worden, dan zal vaak het PCR-product uit de gel geïsoleerd moeten worden alvorens verdere analyse plaatsvindt (12). PCR-producten kunnen ook geanalyseerd worden met tal van andere technieken, zoals hybridisatie met Allel Specifieke Oligonucleotiden (ASO;(18-20)), Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE; (21)) en SSCP (Single Stranded Conformation Polymorfism; (22)). Deze technieken hebben elk specifieke voor- en nadelen, waarop hier verder niet wordt ingegaan.

Met het beschikbaar komen van geautomatiseerde DNA sequencing apparatuur is het technisch mogelijk geworden om van geamplificeerde producten snel en direct de nucleotiden volgorde te bepalen. Deze techniek zal steeds meer opgang vinden, mede doordat op deze manier de mutaties direct geïdentificeerd kunnen worden (20).

Analyses van het RNA met Northern-blotting en reverse transcriptie-PCR, vinden steeds meer toepassingen (24,25). Voordelen zijn dat het mRNA een verkorte versie is van het DNA (geen intron sequenties), en dat dus de analyse van grote genen makkelijker is. Nadelen zijn de hoge instabiliteit, dat mutaties in intronen worden gemist en dat wanneer de mutatie transcriptie van het gen verhindert, er geen mRNA aanwezig zal zijn. Het bepalen van de verhoudingen tussen de diverse RNAs van de genen binnen de clusters, is goed toepasbaar en informatief. Echter, vooral de instabiliteit en problemen met kwantitatieve RT-PCR, maken deze techniek bewerkelijk.

Zeer recent is de ontwikkeling van PCR-technieken waarbij zeer lange DNA fragmenten geamplificeerd kunnen worden (XL-PCR). Tal van toepassingen voor de analyse van de beide genclusters zijn mogelijk maar tot op heden is hier, voorzover wij weten, nog geen literatuur over verschenen.

Hemoglobinopathieën

Hemoglobinopathieën vormen een groep van erfelijke anemieën veroorzaakt door een structurele afwijking van een of meerdere globine ketens. De hoeveelheid gesynthetiseerd globine is normaal (uitgezonderd HbE, zie later) maar door substitutie van aminozuren ontstaat een eiwit met een afwijkende structuur en functie. Deze substituties vinden hun oorzaak in mutaties in het betreffende gen, waarbij de code voor een specifiek aminozuur wordt veranderd. Meer dan 650 Hb-varianten zijn beschreven. De meerderheid hiervan (90%) wordt veroorzaakt door puntmutaties in de α -, β - en γ -globine (G_γ en A_γ) genen. Andere varianten betreffen twee aminozuur substituties in een globine keten, hybride ketens, ketens met een deletie of insertie en ketens met een ver-

lengde C-terminus of N-terminus (4). De mutatie kan zich op één chromosoom bevinden (heterozygoot), of op beide chromosomen (homozygoot). Een groot aantal van de hierboven vermelde varianten zijn zeer zeldzaam. Relatief vaker voorkomende varianten zijn Hemoglobine-S (HbS), Hemoglobine-E (HbE), Hemoglobine-C (HbC) en de Hemoglobines-D (HbD).

Phenotype analyse

Door de structurele veranderingen in het hemoglobine molecuul treedt in de meeste gevallen een verandering in de elektroforetische mobiliteit op. Bij verdenking op een Hb-pathie op basis van hematologische parameters en ijzer-status, kunnen elektroforetische technieken veelal goed uitsluitsel geven of er een afwijkend hemoglobine molecuul aanwezig is. Isoelektrische focussing, HPLC en cellulose-acetaat elektroforese bij pH 8,6 en/of 6,2 zijn veel gebruikte technieken. Echter, niet altijd laten de varianten zich goed van elkaar of van normale hemoglobinen scheiden. Op cellulose-acetaat elektroforese bij pH 8.6 migreren bijvoorbeeld HbD en HbS op dezelfde positie, evenals HbE, HbA₂ ($\alpha_2\delta_2$) en HbC. Met aanvullende scheidings technieken zijn deze problemen veelal te ondervangen.

Genotype analyse

Moleculaire diagnose van Hb-pathieën (met name HbC, HbE, HbS en HbD) is relatief eenvoudig. Deze puntmutaties liggen op het β -globine gen (uitzondering HbD, zie verder) en zijn allen direct verantwoordelijk voor het fenotype. De structuur en de nucleotiden volgorde van het β -globine gen zijn bekend (16,17), en primers kunnen zo gekozen worden dat de gezochte mutatie binnen het geamplificeerde fragment valt. Onze ervaring is, dat het amplificeren van delen van het β -globine gen zonder problemen verloopt. Het ontstane PCR-product wordt met agarose elektroforese en ethidiumbromide kleuring op grootte gecontroleerd. Eenmalig wordt een sequentie analyse uitgevoerd als gouden standaard om het juist zijn van de PCR-reactie te bevestigen. Meestal wordt bij deze amplificaties een enkel specifiek PCR-product verkregen, welk met restrictie enzym analyse verder kan worden geanalyseerd. Aangezien HbC, HbE en HbA₂ op cellulose acetaat, en HbE en HbA₂ met IEF en de algemeen gebruikelijke HPLC-systemen op een identieke positie elueren, kunnen restrictie enzym analyses hier een aanvulling en positieve identificatie leveren. Ter identificatie van HbC, waarbij glutamine-zuur gesubstitueerd is door een lysine (mutatie in codon 6: GAG→AAG), wordt door ons, na PCR amplificatie van exon 1, intron 1 en een deel van exon 2 van het β -globine gen, het restrictie enzym BseRI gebruikt, waarvan de herkennings-sequentie door deze mutatie verdwijnt. Bij HbE is er een substitutie van lysine voor glutamine-zuur door een mutatie in codon 26 (GAG→AAG). Hierdoor verdwijnt de herkenningssequentie van het restrictie enzym HphI. De primers gebruikt voor amplificatie van het β -globine gen zijn identiek aan de primers gebruikt voor de identificatie van HbC. De G→A mutatie bij HbE veroorzaakt niet alleen een aminozuur substitutie,

maar vormt ook een nieuwe "splice" sequentie in het RNA. Hierdoor wordt een deel van het RNA incorrect geknipt, waardoor er een aberrant mRNA wordt gevormd. Dit veroorzaakt een verminderde β -globine synthese en is dus de reden van het β -thalassemische fenotype (zie later) van HbE hetero- en homozygote individuen.

In hetzelfde amplificatieproduct kan de mutatie welke HbS veroorzaakt geïdentificeerd worden. Hemoglobine S wordt veroorzaakt door een mutatie in hetzelfde codon als HbC, codon $\beta 6$. Bij HbS is er een vervanging van glutamine-zuur door valine, veroorzaakt door een A \rightarrow T mutatie. Voor positieve identificatie gebruiken wij het restrictie enzym Bsu36I, waarvan de knipplaats verdwijnt.

Op eenzelfde positie als HbS kan HbD elektrofoeren. Hemoglobine D is een verzamelnaam voor een tiental verschillende varianten, allen met een identieke mobiliteit. De meest voorkomende is echter "HbD-Punjab" (= "HbD-Los Angeles", = "HbD-Chicago"), een substitutie van glutamine voor glutamine zuur, door een G \rightarrow C mutatie in codon $\beta 121$. Deze mutatie verandert een herkennings-sequentie van het restrictie enzym EcoRI (26). HbD-Baltimore (= "HbD-St Louis", = "HbD-Washington") is een α -keten variant ($\alpha 68$: Asn \rightarrow Lys).

Voor alle mutaties geanalyseerd met de hierboven beschreven restrictie enzym methode zijn de homo- en heterozygote vormen eenvoudig en positief te identificeren.

α -Thalassemieën

In tegenstelling tot de hemoglobinopathieën, is bij thalassemieën de expressie van de genen gestoord. Hierdoor treedt er een tekort aan mRNA, of een aberrant mRNA op, resulterend in het afwezig of verminderd aanwezig zijn van globine ketens. De *vorming* van de globine-ketens is dus gestoord (27).

Normale individuen hebben vier α -genen, twee op elk chromosoom 16 ($\alpha\alpha/\alpha\alpha$), terwijl dragers van α -thalassemie drie ($-\alpha/\alpha\alpha$) of twee ($--/\alpha\alpha$) α -genen hebben. Door interactie van deze genotypen kunnen ontstaan $-\alpha/-\alpha$, $--/-\alpha$ (HbH), of $--/--$ (Hb Bart's of hydrops foetalis). Echter, een groot aantal verschillende moleculaire defecten liggen aan dit simpele model ten grondslag. Deze mutanten zijn geclassificeerd als α^+ - en α^0 -thalassemie om chromosomen aan te geven met een verminderde (α^+) of afwezige (α^0) output van het aangedane complex (5).

Een α -thalassemisch fenotype wordt meestal veroorzaakt door deleties waar een of meerdere α -genen bij betrokken zijn. Soms zijn de deleties zo groot dat ook andere genen van het α -globine gencluster gemuteerd worden. Echter, het is ook mogelijk dat de vier α -genen geheel intact zijn, maar niet tot expressie komen, door deleties van het α -globine regulatie element (HS-40). α -Thalassemie als gevolg van specifieke punt-mutaties in kritische sequenties, waarbij de expressie van de α -genen is aangedaan ("non-deletion type"), zijn beschreven maar in tegenstelling tot de situatie bij de β -thalassemieën (zie later), zeldzaam. Varianten resulterend in afwijkende mRNA-processing, mRNA-translatie en post-translationele

instabiliteit zijn beschreven. Mutaties die dergelijke effecten veroorzaken, bevinden zich vaak in de eerder beschreven specifieke nucleotiden-volgorden cruciaal voor een juiste afhandeling van het tot expressie komen van het gen (5). Naast deze genetische varianten die tot een thalassemisch fenotype leiden, zijn ook varianten in de α -globine cluster beschreven die niet tot een dergelijk fenotype aanleiding geven.

Tussen de vele beschreven verschillende genetische modificaties zijn honderden interacties mogelijk. Fenotypisch echter, resulteren deze interacties in vier categorieën: "silent carrier" (drie functionele genen), α -thalassemie "trait" (twee functionele genen), HbH ziekte (een functioneel α -gen) en Hb Bart's hydrops foetalis syndrome (geen functionele α -genen; niet levensvatbaar). Omdat elke α -thalassemie variant mogelijk in verschillende mate een reductie in α -keten synthese veroorzaakt, bestaan de α -thalassemie traits uit een spectrum van fenotypen, met een klinische en hematologische range van normale individuen tot patiënten met HbH ziekte. Het is van belang zich dit fenomeen te realiseren als men de diagnose α -thalassemie op DNA-niveau wil stellen. Het is dus moeilijk, zo niet onmogelijk, om op basis van het fenotype een inschatting te maken naar welk genetisch defect in de α -gencluster gezocht moet gaan worden.

Fenotype analyse

Bij verdenking op een α -thalassemie op basis van hematologische parameters en ijzerstatus, kunnen elektroforetische technieken hierover geen uitsluitsel geven. Uitzonderingen hierop zijn HbH (tetrameer van β -ketens) en Hb Bart's (tetrameer van γ -ketens). De α -genen zijn zowel in het foetale- als in het volwassen stadium van belang. Een tekort aan α -globinen kan niet gecompenseerd worden door combinatie van twee β -globine ketens met een ander genproduct uit de α -cluster. Men kan de synthese van α - en β -eiwitketens van het hemoglobine molecuul in reticulocyten bepalen. De verhouding tussen de synthese-snelheden van de ketens is mogelijk een maat voor het aan- of afwezig zijn van een thalassemie. Dit is een bewerkelijke bepaling, welke overigens niet in alle gevallen uitsluitsel geeft, met name als meerdere afwijkingen tegelijkertijd in een patiënt aanwezig zijn. Ook heterozygote α^+ -thalassemie zal een normale α/β -ketensynthese verhouding geven (28).

Genotype analyse

Moleculaire diagnose van α -thalassemieën is niet eenvoudig. Zoals hierboven vermeld is het moeilijk zonet onmogelijk om op basis van het fenotype een uitspraak te doen welke α -thalassemie variant aanwezig zou kunnen zijn, waardoor gericht zoeken moeilijk is.

Een veel gebruikte techniek is de Southern analyse van genomisch DNA, zoals eerder hier reeds beschreven is. De combinatie van verschillende restrictie-enzymen en probes kan veel informatie over het gencluster geven. DNA moet zorgvuldig geïsoleerd worden om breuken in het DNA te voorkomen. Een nadeel is dat grote hoeveelheden DNA nodig zijn om

betrouwbare analyses te kunnen doen. De optimale keuze van de probes is van essentieel belang om kruisreacties met pseudogenen te voorkomen. Verder moet men kunnen beschikken over hybridisatie apparatuur en een radioisotopenlaboratorium, al zijn tegenwoordig gevoelige, niet-radioactieve detectie-methoden beschikbaar.

Voor de analyse van α -thalassemie met behulp van PCR zijn in de literatuur veel verschillende methoden beschreven (29-32). Er zijn een aantal problemen met PCR analyse van het α -globine gencluster.

Ten eerste, de amplificatie van de α -genen is moeilijk. De structuur van de genen vraagt tijdsinvestering in het optimaliseren van de PCR-condities.

Ten tweede, dient men nooit een diagnose te stellen met behulp van een negatieve PCR-reactie. Bedoeld wordt hiermee, dat het afwezig zijn van een signaal, ook al zijn de positieve controles in orde, niet uitgelegd mag worden als het niet binden van primers door het aanwezig zijn van een veronderstelde deletie. Het vinden van een geschikte primerset voor positieve controles in geval van een deletie kan lastig zijn.

Ten derde, de keuze van ideale primer combinaties wordt gecompliceerd door de aanwezigheid van vier α -genen en de pseudogenen. Primers vinden makkelijk homologe sequenties die oninterpreteerbare patronen na de PCR opleveren.

Ten vierde levert de aanwezigheid van twee α -genen per chromosoom met sommige primersets problemen op. Zo kan dan bijvoorbeeld alleen een $-\alpha/-\alpha$ genotype gediagnostiseerd worden en is het onderscheid tussen $-\alpha/\alpha\alpha$ en $--/\alpha\alpha$ niet te maken, omdat de aan-

wezige twee genen op het andere chromosoom amplificatie banden zullen geven. Het kunnen diagnostiseren van het verschil tussen deze twee genotypen is zeer belangrijk, met name voor het geven van genetische adviezen. Bij $-\alpha/\alpha\alpha$ is er geen kans op hydrops foetalis en bij $--/\alpha\alpha$ genotype wel. Het valt buiten dit artikel om de verschillende PCR-methoden met elkaar te vergelijken en af te zetten tegen de Southern analyse-techniek, verwezen wordt daarvoor naar de literatuur (33). Echter, met geen enkele techniek tot dusver beschreven kunnen alle mogelijke deleties in een keer worden aangetoond. In ieder geval zijn tot nu toe meerdere primersets noodzakelijk, in verschillende PCR-reacties, om tot een redelijke conclusie te kunnen komen. Aan optimalisering van de diagnose van α -thalassemie met behulp van de PCR wordt door een aantal laboratoria gewerkt. Momenteel gebruiken wij in samenwerking met het Academisch Ziekenhuis Utrecht tien primersets, maar streven naar een lager aantal. Op deze wijze kunnen de meest voorkomende α -thalassemieën gedetecteerd worden (SEA; MED; 20.5; 3.7; 4.2 (29-33)). Puntmutaties worden met deze methoden gemist. Mocht geen deletie gevonden worden, en is de verdenking op een α -thalassemie sterk, dan zal tot sequencing moeten worden overgegaan. Dit is echter zeer arbeidsintensief. Bovendien moet men zich ervan bewust zijn, dat de afwijking ook buiten het gencluster gelokaliseerd kan zijn.

β -Thalassemieën

β -Thalassemie staat voor een groep van erfelijke afwijkingen aan het hemoglobine molecuul, waarbij sprake is van een verminderde synthese van de β -globine ketens. Hierdoor ontstaat een afwijkende verhouding in de α /non- α -globine synthese, hetgeen de belangrijkste factor is voor de ernst van de optredende thalassemie (34). Normale individuen hebben twee β -genen, een op elk chromosoom 11. De reductie in β -globine synthese kan variëren van minimaal (β^+ -thalassemie) tot compleet (β^0 -thalassemie). Het aantal mutaties dat deze reductie in synthese veroorzaakt is enorm. Meer dan 160 verschillende mutaties verspreid over het β -globine gen zijn beschreven. De meerderheid van de mutaties heeft invloed op de expressie van het gen (vorming van RNA). Mutaties die dergelijke effecten veroorzaken, bevinden zich vaak in de eerder beschreven specifieke nucleotidenvolgorde cruciaal voor een juiste afhandeling van het tot expressie komen van het gen (5). Ook complete deleties zijn beschreven (zie tabel 1). Deleties die ten grondslag liggen aan β -thalassemie zijn echter zeldzaam, in tegenstelling tot de situatie bij de α -thalassemieën (zie hierboven). Ook zijn mutaties in andere genen van het β -globine gencluster beschreven (6). Tussen deze vele verschillende genetische modificaties zijn evenzovele interacties mogelijk. De β -thalassemieën zijn onder te verdelen in twee categorieën: β -thalassemie "trait" (één functioneel gen) en ziekte (geen functionele β -genen). Omdat elke β -thalassemie variant in verschillende mate een reductie in β -ketensynthese veroorzaakt, bestaan de β -thalassemie traits en ziekten uit een spectrum van fenotypen af-

Tabel 1. Moleculaire basis van het β -thalassemie fenotype

I.	Niet functioneel mRNA
	a. Nonsense mutanten
	b. Frameshift mutanten
	c. Initiator codon mutanten
II.	RNA processing mutanten
	a. Splice-junction veranderingen
	b. Consensus veranderingen
	c. Interne IVS* veranderingen
	d. Coding region substituties welke processing beïnvloeden
III.	Transcriptie mutanten
IV.	RNA splitsings en polyadenylatie mutanten
V.	Cap site mutanten
VI.	Thalassemische hemoglobinen
VII.	Mutanten geassocieerd met dominante β -thalassemie
	a. Nonsense mutanten
	b. Frameshift mutanten
	c. Coding region substituties
	d. Deleties van intacte codons
	e. Inserties van intacte codons
VIII.	Deletie mutanten welke β^0 -thalassemie veroorzaken
IX.	Zeer grote deleties in het β -globin gencluster ($\epsilon^{\alpha}\gamma^{\alpha}\delta\beta$) 0 -thalassemieën
X.	β -Thalassemie niet verbonden met het β -globine gen

*: intervening sequence (=intron)

hankelijk van vele factoren waaronder de aard van de betrokken mutatie en genetische modifiers elders in het genoom. Klinisch en hematologisch variëren deze fenotypen van normale individuen tot patiënten met een transfusie afhankelijke β -thalassemie. Bovendien kunnen gelijkende fenotypen veroorzaakt worden door mutaties in andere genen van de cluster (bijvoorbeeld δ -thalassemie; zie hieronder). Ook in Nederland komt een breed spectrum aan mutaties voor (20). Het is van belang zich deze fenomenen te realiseren als men de diagnose β -thalassemie op DNA-niveau wil stellen.

Als een specifieke mutatie resulteert in een specifiek fenotype, zoals bijvoorbeeld bij een aantal van de hemoglobinopathiën, kan het diagnosticeren van de mutaties relatief makkelijk geschieden. Men weet waarnaar te zoeken, wanneer een specifiek fenotype zich voordoet. Bij de β -thalassemieën is dit niet het geval. Het volgende wil dit duidelijk maken. Een tekort aan β -globine kan gedeeltelijk gecompenseerd worden door vorming van tetrameren van de twee α -globinen met eiwitten van γ - (HbF (α_2/γ_2)) en/of δ -genen (HbA₂ (α_2/δ_2)) uit de β -globine cluster (4,6). Dit komt ondermeer doordat het overschot van α -ketens bij gebrek aan β -ketens tetrameren vormt met de aanwezige γ -ketens. Uit recent onderzoek blijkt dat specifieke mutaties in de β -promoter, welke proximale en distale transcriptie-regulatie-elementen muteren, naast uiteraard een verminderde expressie van het β -gen, een verhoogde expressie van de δ - en γ -genen in *cis* veroorzaken. Dit komt waarschijnlijk door een betere interactie van de LCR met de transcriptie elementen van de δ - en γ -genen (35). Komt naast de mutatie in het β -gen ook in bijvoorbeeld het δ -gen een mutatie voor welke tot een verlaagde expressie leidt, dan zal dezelfde mutatie in het β -gen tot een totaal ander fenotype leiden. Namelijk, de HbA₂ concentratie zal hierbij veel lager zijn dan in het eerste geval (35). Een bepaald fenotype ontstaat dus door regulatie van genen door controle-elementen gelokaliseerd elders in de cluster (of zelfs genoom (35)). Zelfs is een homozygote vorm van β -thalassemie beschreven, zonder dat er sprake was van een anemie. Een relatief hoge concentratie HbF, homogeen gedistribueerd over de rode cellen en een milde reductie in β -keten productie leken het afwezig zijn van anemie in deze patient te verklaren. Dezelfde mutatie is echter ook beschreven in transfusie afhankelijke patienten (36). Concluderend, een specifieke mutatie (genotype) kan tot meerdere fenotypen aanleiding geven. Evenzo kan eenzelfde fenotype veroorzaakt worden door verschillende genotypen.

In het algemeen zijn individuen heterozygoot voor de verschillende vormen van β -thalassemieën klinisch asymptomatisch. Uitzonderingen zijn de dominante β -thalassemieën (mutaties voornamelijk in exon 3 van het β -gen), welke klinisch manifest zijn in de heterozygote vorm.

Ondanks de heterogeniteit van de mutaties is de mate van verhoging van het HbA₂ vrij homogeen (6,35). Uitzonderingen hierop zijn:

Ten eerste, een groep van β -thalassemieën met in de heterozygote vorm, zeer hoge HbA₂ concentraties (>

6,5%), door mutaties in de transcriptie-regulatie elementen.

Ten tweede, een groep van heterozygote β -thalassemieën met een normaal HbA₂, waarvan sommige individuen wel hematologische abnormaliteiten hebben en anderen niet. Waarschijnlijk is een mede-overerven van δ -thalassemie verantwoordelijk voor de meerderheid van de β -thalassemieën met een normaal HbA₂ (35).

Ten derde, "silent- β -thalassemia" geeft geen enkel duidelijk hematologisch fenotype, anders dan een verstoorde α/β -keten synthese.

Ten vierde, zijn er β -thalassemieën, waarbij geen enkel defect in de β -genen kan worden aangetoond, ondanks uitgebreide analyse. Men vermoedt dat de mutaties die dit fenotype veroorzaken te vinden zijn in de LCR, ongeveer 60.000 baseparen "upstream" (6,35).

Een aantal β -thalassemieën heeft naast de HbA₂ verhoging, ook een persisterend verhoogd HbF. De HbF concentraties bij homozygote β -thalassemieën zijn zeer variabel en hangen wederom af van de aard van de mutatie en de andere genetische factoren elders in de cluster (36). Verder komen bij een $\delta\beta$ -thalassemie hoge HbF concentraties voor (5-20%), met hypochrome, microcytaire erythrocyten. Zijn de concentraties HbF nog hoger (tot 30%) met normale rode cel indices, dan is er sprake van HPFH (Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin), weer veroorzaakt door een verscheidenheid aan puntmutaties en deleties (36). Een verhoogd HbF komt ook voor bij sikkelcelanemie (homozygoot HbS), waar het een functie verlust in het voorkomen van het sikkelen van de cellen (37).

Samenvattend is het dus zeer moeilijk, zo niet onmogelijk, om op basis van het fenotype een inschatting te maken naar welk genetisch defect in de β -gencluster gezocht moet gaan worden.

Fenotype analyse

Bij verdenking op β -thalassemie op basis van hematologische parameters en ijzerstatus, kan een elektroforetische techniek worden toegepast. Karakteristiek en specifiek is een verhoging van het HbA₂ (van 3,2% to 6%; kwantitatieve bepaling verdient de voorkeur). Echter, eerder is beschreven dat dit niet altijd het geval zal zijn. Problematisch zijn bij herhaling gemeten percentages HbA₂ rond de 3,5%. Men kan synthese van α - en β -globine ketens in reticulocyten bepalen, waarbij de verhouding tussen synthese snelheden van de ketens mogelijk een maat is voor het aan- of afwezig zijn van een thalassemie. Deze bewerkelijke bepaling zal niet altijd uitsluitel kunnen geven, met name als meerdere afwijkingen bij een patient aanwezig zijn.

Genotype analyse

Uit het bovenstaande blijkt dat de diagnose β -thalassemie op moleculair niveau niet op eenvoudige wijze te stellen is. De enorme verscheidenheid aan puntmutaties, ook binnen de verschillende etnische groepen maakt dat restrictie-enzym-analyse, na amplificatie van het DNA met de PCR, niet zinvol is. Voor een

moleculaire diagnose van β -thalassemie is DNA sequentie analyse de gouden standaard, mits dit noodzakelijk lijkt te zijn (zie verder). Met behulp van de nieuwe generatie genetische analysers is dit snel en nauwkeurig te realiseren. Er moet echter altijd rekening mee worden gehouden dat de mutaties ook gelocaliseerd kunnen zijn in andere genen in de cluster.

Gecombineerde erfelijke hemoglobine aandoeningen

Tot dusverre is uitsluitend gesproken over hemoglobinopathieën en thalassemieën, voorkomende in hetero- of homozygote vorm. Echter tal van combinaties van deze afwijkingen blijken in de praktijk voor te komen, hetgeen de diagnose kan compliceren.

Het effect van de combinatie van twee verschillende mutaties ("compound heterozygotes") in de globine genen betekent niet altijd een ernstiger aandoening. Een combinatie van een α - en een β -thalassemie kan hematologisch en klinisch tot een milder beeld leiden dan een van deze thalassemieën alleen. De disbalans tussen de hoeveelheden gesynthetiseerde α - en β -ketens is bij de gecombineerde afwijking minder en dus zijn de rode cellen stabiel en hebben een normale levensduur. Dit in tegenstelling tot een combinatie van HbE en een β -thalassemie. Omdat HbE een thalassemissch fenotype kent (zie eerder) ontstaat hier een ernstiger disbalans in de verhouding tussen de ketens en dus een ernstiger hematologisch en klinisch beeld. Ook hier bestaat weer een groot scala aan diverse fenotypen.

Fenotype analyse

In principe is de analyse identiek aan de wijze zoals hierboven beschreven. Men dient alert te zijn op ogenschijnlijk onjuiste uitslagen of uitslagen anders dan welke voor de vermoede afwijking bekend zijn. Bijvoorbeeld bij een patient met een ijzer-resistente microcytaire anemie wordt een percentage van 54% HbE/HbA₂, HbA 46% en HbF <1% gevonden. Dit percentage HbE/HbA₂ is te hoog voor een heterozygote vorm van HbE. Er is ook geen sprake van een homozygote vorm van HbE, gezien het aanwezig zijn van HbA. Een dergelijk percentage HbA₂ is niet mogelijk. De combinatie van een β -thalassemie met HbE dient in een dergelijk geval onderzocht te worden. Evenzo presenteert een combinatie van α -thalassemie met HbE zich met ongewoon lage percentages HbE. Familie onderzoek is hier noodzaak om fenotypisch een diagnose te stellen.

Genotype analyse

Voor het aantonen van gecombineerde erfelijke afwijkingen is DNA onderzoek de gouden standaard. De technieken zijn als eerder beschreven.

Discussie

Hemoglobinopathieën en thalassemieën zijn in Nederland steeds frequenter voorkomende aandoeningen. Het stellen van de juiste diagnose is zeer belangrijk voor het voorkomen van onnodig medisch onderzoek en onjuiste behandeling (bijvoorbeeld langdurige ijzer-suppletie leidend mogelijk tot secundaire ijzerstapeling), alsmede voor het kunnen aanbieden van gene-

tisch advies. Voor het vaststellen van het aanwezig zijn van een mutatie in een van de globine genen is, per definitie, moleculair biologisch onderzoek noodzakelijk. De vraag is of dit altijd zinvol is.

Voor het aantonen van afwijkingen leidend tot α -thalassemie is moleculair onderzoek noodzakelijk. Daarentegen geven hematologische en biochemische parameters in de meerderheid van de gevallen wel uitsluitel of een individu mogelijk hetero- of homozygoot is voor mutaties in de β -genen. Veelal is er bij β -thalassemie sprake van een verhoging van het HbA₂ (en HbF), hetgeen met elektroforese en/of HPLC is te detecteren. Vindt men een verhoogd HbA₂, dan is de diagnose β -thalassemie zeer waarschijnlijk. Bij de neonaat is de expressie van het β -gen nog niet goed op gang en zullen aandoeningen in deze genen zich niet openbaren voor de 3^e tot 6^e levensmaand. In een dergelijke situatie is moleculaire diagnostiek zinvol, wanneer men niet wil of kan wachten met het stellen van de diagnose. Ook hier geldt, net zo als in de volwassen individuen bij wie een " β -aandoening" wordt vermoed, dat men veelal niet weet waarnaar te zoeken. De moleculaire diagnostiek van de β -thalassemieën is gecompliceerd door de grote hoeveelheid verschillende mutaties die veelal gelijkende fenotype produceren. Hierdoor is gericht zoeken naar een mutatie moeilijk en tijdrovend. De moleculaire diagnostiek van de meest frequent voorkomende hemoglobinopathieën is relatief eenvoudig uit te voeren, aangezien het bekende mutaties betreft die restrictie-enzymherkenningssequenties muteren. Veelal echter is met bekende elektroforetische technieken ook tot een conclusie te komen.

Indien een gecombineerde afwijking wordt vermoed, is moleculaire analyse zeer zinvol. Met behulp van deze technieken kan eenduidig vast komen te staan welke afwijkingen en in wat voor vorm aanwezig zijn. Dit is van evident belang voor een goede erfelijkheids-advisering. Dit is ook het geval als van een echtpaar een individu duidelijk drager is en de andere een "grensgeval" lijkt te zijn (1-3% van de dragers, bijvoorbeeld MCV 80 fl en HbA₂ van 3,3%). In een dergelijk geval zal besloten worden tot het onderzoeken van de ouders van het "verdachte" lid van het echtpaar. Worden ook daarbij grenswaarden gevonden of is ouder-onderzoek niet mogelijk, dan is sequentie-analyse van het β -gen de aangewezen aanpak (6). Wil men prenatale diagnostiek verrichten, dan zullen de mutaties op moleculair niveau bij de ouders bekend moeten zijn. Moleculair biologisch onderzoek is in deze gevallen onmisbaar. In het algemeen geldt voor alle situaties, dat een familie-onderzoek noodzakelijk is om de diagnose te kunnen bevestigen.

Tot slot, is moleculair biologisch onderzoek bij deze afwijkingen zinvol? Vaak niet, maar zoals in de beschreven gevallen is dergelijk onderzoek onmisbaar. In ieder geval zal het opsporen van de mutaties en het beschrijven van het bijbehorende fenotype een beter inzicht geven in de relaties tussen het genotype en het fenotype. Dit zal mogelijk van belang kunnen zijn bij het voorspellen van de ernst van de aandoeningen en het beïnvloeden van beslissingen aangaande preventie en therapie van deze ziekten.

Literatuur

1. Rehfeld JF, Van Solinge WW. The tumour biology of gastrin and cholecystokinin. *Adv Cancer Res* 1994; 63: 295-347.
2. Rosenthal N. Regulation of gene expression. *N Engl J Med* 1994; 331: 931-933.
3. Lovell MA, Mifflin TE. A glossary for molecular biology. *Clin Chem* 1989; 35: 1816-1818.
4. Huisman THJ. The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. In: *The Haemoglobinopathies*. Bailliere's Clinical Haematology 1993; 6: 1-30.
5. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AOM, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human α -globin gene cluster. *Blood* 1989; 73: 1081-1104.
6. Kazazian HH Jr. The thalassemia syndromes: Molecular basis and prenatal diagnosis. *Semin Hematol* 1990; 27: 209-228.
7. Green MR. Biochemical mechanisms of constitutive and regulated pre-mRNA splicing. *Annu Rev Cell Biol* 1991; 7: 559-579.
8. Padgett RA, Grobowski PJ, Konarska MM, Seiler S, Sharp PA. Splicing of mRNA precursors. *Annu Rev Biochem* 1986; 55: 1119-1140.
9. Wahle E, Keller W. The biochemistry of 3'-end cleavage and polyadenylation of messenger RNA precursors. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 419-440.
10. Jackson RJ, Standart N. Do the Poly(A) tail and 3' untranslated region control mRNA translation? *Cell* 1990; 62: 15-24.
11. Erlich HA. PCR technology; Principles and applications for DNA amplification. New York: Stockton Press, 1989
12. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
13. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
14. Lebo RV, Saiki RK, Swanson K, Montano MA, Erlich HA, Golbus MS. Prenatal diagnosis of α -thalassemia by polymerase chain reaction and dual restriction enzyme analysis. *Hum Genet* 1990; 85: 293-299.
15. Liebhaber SA, Goossens MJ, Kan YW. Cloning and complete nucleotide sequence of human 5'- α -globin gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7054-7058.
16. Lawn RM, Efstratiadis A, O'Connell CC, Maniatis T. The nucleotide sequence of the human β -globin gene. *Cell* 1980; 21: 647-651.
17. Efstratiadis A, Posakony JW, Maniatis T, Lawn RM, O'Connell C, Spritz RA, DeRiel JK, Forget BG, Weissmann SM, Slightom JL, Blechl AE, Smithies O, Baralle FE, Shoulders CC, Proudfoot NJ. The structure and evolution of the human β -globin gene family. *Cell* 1980; 21: 653-668.
18. Saiki RK, Chang C-A, Levenson CH, Warren TC, Boehm CD, Kazazian HH Jr, Erlich HA. Diagnosis of sickle cell anemia and β -thalassemia with enzymatically amplified DNA and nonradioactive allele-specific oligonucleotide probes. *N Engl J Med* 1988; 319: 537-541.
19. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQa DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986; 324: 163-167.
20. Losekoot M. In: *Hemoglobinopathies and today's genetics*. Leiden: Boerhaave cursus 1994.
21. Myers RM, Maniatis T, Lerman LS. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol* 1987; 155: 501-507.
22. Ozcelik H, Andrulis IL. Multiplex PCR-SSCP for simultaneous screening for mutations in several exons of p53. *Biotechniques* 1995; 18: 742-744.
23. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 329: 1982-1987.
24. Van Solinge WW, Nielsen FC, Friis-Hansen L, Falkmer UG, Rehfeld JF. Expression but incomplete maturation of progastrin in colorectal carcinomas. *Gastroenterology* 1993; 104: 1099-1107.
25. Huang SZ, Rodgers GP, Zeng FY, Zeng YT, Schechter AN. Diagnosis of thalassemia using cDNA amplification of circulating erythroid cell mRNA with the polymerase chain reaction. *Blood* 1991; 78: 2433-2437.
26. Zeng Y-t, Huang S-z, Ren Z-r, Li H-j. Identification of Hb D-Punjab gene: application of DNA amplification in the study of abnormal hemoglobins. *Am J Hum Genet* 1989; 44: 886-889.
27. Treisman R, Orkin SH, Maniatis T. Specific transcription and RNA splicing defects in five cloned β -thalassemia genes. *Nature* 1983; 302: 591-596.
28. Losekoot M, Beijer C, Giordano PC, Van Gemenen ADJ, Oei YB, Bernini LF. Gecombineerde α - en β -thalassemie bij een Chinese familie in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk* 1989; 133:1218-1223.
29. Bowie LJ, Reddy PL, Nagabhushan M, Sevigny P. Detection of α -thalassemias by multiplex polymerase chain reaction. *Clin Chem* 1994; 40: 2260-2266.
30. Dodé C, Krishnamoorthy R, Lamb J, Rochette J. Rapid analysis of $-\alpha^{3.7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{ami 3.7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. *Br J Haematol* 1992; 82: 105-111.
31. Bowden DK, Vickers MA, Higgs DR. A PCR-based strategy to detect the common severe determinants of a thalassaemia. *Br J Haematol* 1992; 81: 104-108.
32. Baysal E, Huisman THJ. Detection of common deletion α -thalassemia-2 determinants by PCR. *Am J Hematol* 1994; 46: 208-213.
33. Van Neerbos BR, Tilanus MGJ, Van Solinge WW, Van Oirschot BA, Schmidt YMG, Bouwens A, Kraaijenhagen RJ, Rijksen G. Alfa-Thalassaemie, een onderzoek op DNA-niveau. *Ned Tijdschr Klin Chem* 1996; 21: 193-196.
34. Kazazian HH Jr, Boehm CD. Molecular basis and prenatal diagnosis of β -thalassemia. *Blood* 1988; 72: 1107-1116.
35. Thein SL. β -Thalassaemia. In: *The Haemoglobinopathies*. Bailliere's Clinical Haematology 1993; 6: 151-175.
36. Craig JE, Barnetson RA, Prior J, Raven JL, Thein SL. Rapid detection of deletions causing $\delta\beta$ thalassemia and hereditary persistence of fetal hemoglobin by enzymatic amplification. *Blood* 1994; 83: 1673-1682.
37. Chang YC, Smith KD, Moore RD, Serjeant GR, Dover GJ. An analysis of fetal hemoglobin in sickle cell disease: The relative contributions of the X-linked factor, β -globin haplotypes, α -globin gene number, gender, and age. *Blood* 1995; 85: 1111-1117.

Summary

Molecular diagnostics of the hemoglobinopathies and thalassemias. Van Solinge WW, Wijk HA van and Kraaijenhagen RJ. Ned Tijdschr Klin Chem 1996; 21: 176-183.

Diagnosics using molecular biology techniques has gained significant interest over the last few years. More and more clinical chemistry laboratories are setting up DNA-facilities and start using these new techniques. The molecular diagnosis of hemoglobinopathies and thalassemias proves to be one of the main topics. This article describes relevant molecular biology techniques. In addition, the globin gene-clusters and their expression will be discussed as well as the phenotypic and genotypic analysis of the hemoglobinopathies, α -thalassemias, β -thalassemias and combined disorders. Finally, it will be discussed if and when molecular diagnostics of these disorders is necessary.

Keywords: molecular diagnostics; hemoglobinopathy; thalassemia; DNA; genotype; phenotype.