

**MOLEKULARNO – GENETSKA ANALIZA GENA ZA HEMOHROMATOZU U  
BOSANSKO – HERCEGOVAČKOJ POPULACIJI**

UDK 577.21:616.003.829(497.6)

Amela Hercegovac<sup>1</sup>, Nataša Teran<sup>2</sup>, Rifet Terzić<sup>1</sup>, Borut Peterlin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Prirodno – matematički fakultet, Univerzitet u Tuzli, <sup>2</sup> Centar za medicinsku genetiku,  
Odjel za ginekologiju i akušerstvo, Univerzitetno medicinski centar, Ljubljana

**ABSTRAKT**

Hereditarna hemohromatoza (HH) je autosomalno recesivna bolest koju karakteriše nakupljanje željeza usljed njegove povećane apsorpcije. Najučestaliji tip HH posljedica je mutacija HFE gena. HFE gen lociran je na hromosomu 6 u blizini HLA - A lokusa. Dvije najučestalije mutacije HFE gena su: C282Y koja predstavlja zamjenu 845. nukleotida, adenin zamjenjuje guanin i H63D mutacija koja predstavlja zamjenu 187. nukleotida, guanin zamjenjuje citozin. Istraživanje je obuhvatilo 200 zdravih osoba (100 muškaraca i 100 žena) iz Bosne i Hercegovine. DNA je izolirana iz leukocita, periferne krvi, standardnom metodom. Analiza mutacija HFE gena urađena je primjenom PCR – RFLP metoda. C282Y mutacija je utvrđena kod 9 osoba i to su sve bili heterozigotni nosioci mutacije. H63D mutacija utvrđena je kod 40 ispitanika, od kojih je 6 bilo homozigotnih nosilaca mutacije. U bosansko-hercegovačkoj populaciji utvrđena frekvencija C282Y alela iznosi 2.25%; frekvencija H63D alela je 11.5%.

**Ključne riječi:** hereditarna hemohromatoza, HFE, C282Y, H63D

**UVOD**

Hereditarna hemohromatoza (HH) je autosomalno recesivna bolest metabolizma željeza. Bolest karakteriše nakupljanje željeza usljed njegove povećane apsorpcije. Progresivno nakupljanje željeza uzrokuje oštećenje organa i vodi razvoju ciroze, šećerne bolesti, oštećenju srčanog mišića i hiperpigmentaciji kože. Simptomi bolesti javljaju se obično između 40 i 60 godina starosti kod muškaraca, a kod žena nakon menopauze. Ukoliko se bolest dijagnosticira i liječi u precirotičkom stadiju, životni vijek bolesnika je normalan. Liječenje bolesnika je moguće, podrazumijeva flebotomiju (uzimanje krvi iz vene) s ciljem uklanjanja viška željeza. (Barton, 1998; Adams, 2004). Najučestaliji tip HH posljedica je mutacija HFE gena. Metodom pozicijskog kloniranja, 1996. godine Feder i saradnici su uspjeli izolovati gen za hemohromatozu (HFE gen). Lociran je na kratkom kraku hromosoma 6 (6p21.3), u blizini lokusa HLA - A. Opisano je više mutacija tog gena, ali s bolešću su najviše povezane dvije mutacije: C282Y i H63D (Feder et al., 1996; Beutler, 1996; Brandhagan, 2000). C282Y mutacija predstavlja zamjenu 845. nukleotida, adenin zamjenjuje guanin što uzrokuje zamjenu 282. aminokiseline proteina HFE - umjesto cisteina u protein se ugradi tirozin. H63D mutacija predstavlja zamjenu 187. nukleotida, guanin zamjenjuje citozin što uzrokuje zamjenu u proteinu na 63. aminokiselinskom mjestu umjesto histidina ugradi se aspartatna kiselina. Genetsko epidemiološke studije hereditarne hemohromatoze pokazale su visoku prevalencu C282Y mutacije kod osoba sjeverozapadno evropskog porijekla, gdje je njena učestalost 1/300 (Merryweather – Clarke et al., 1997). U populacijama južne Evrope utvrđena je niža prevalenca ove mutacije. Frekvencija mutacije H63D u evropskim

populacijama ima općenitije vrijednosti i kreće se između 10 – 20% (Merryweather – Clarke et al.,1997). Distribucija mutacije C282Y u skladu je sa učestalošću hemohromatoze u evropskim populacijama, dok se frekvencije mutacije H63D u takvu distribuciju ne uklapaju (Merryweather – Clarke at al., 2000). S obzirom da u raspoloživoj literaturi nismo našli podatke o frekvenciji navedenih mutacija u Bosni i Hercegovini cilj našeg istraživanja je bio utvrditi apsolutnu frekvenciju C282Y i H63D genotipova u ispitivanom uzorku i na osnovu dobijenih rezultata izračunati frekvenciju odgovarajućih recesivnih alela u bosanskohercegovačkoj populaciji u ukupom uzorku.

### MATERIJAL I METODE

Istraživanje je obuhvatilo 200 zdravih ispitanika iz Bosne i Hercegovine. DNK je izolovana standardnom metodom iz leukocita periferne krvi. Analiza mutacija HFE gena urađena je primjenom PCR i RFLP metoda. Za identifikaciju mutacije C282Y u PCR reakciji primjenili smo prajmere C282Y – F i C282Y – R. PCR produkt tretirali smo restrikcijskom endonukleazom RsaI koja je izolovana iz bakterije *Rhodobacter sphaerides*. Za identifikaciju H63D mutacije PCR reakciju izveli smo upotrebom prajmera: H63D/F i H63D/R. PCR produkt tretirali smo restrikcijskom endonukleazom MboI koja je izolovana iz bakterije *Moraxella bovis*. Produkte restrikcije analizirali smo elektroforezom na 3 % agaroznom gelu.

### REZULTATI

U ispitivanom uzorku utvrđeno je prisustvo sva tri moguća genotipa za mutaciju H63D: HH (homozigot normalan), HD (heterozigot) i DD (homozigot mutiran). Za mutaciju C282Y utvrđeni su genotipovi: CC (homozigot normalan) i CY (heterozigot). Nije utvrđen genotip YY (mutirani homozigot).

**Tabela 1.** Utvrđene apsolutne i relativne frekvencije genotipova H63D mutacije u ispitivanom uzorku

Genotip	Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
HH	160	80
HD	34	17
DD	6	3
Σ	200	100

Relativna frekvencija recesivnog alela H63D izračunata na osnovu utvrđenih apsolutnih frekvencija genotipova u bosanskohercegovačkoj populaciji iznosi 11.5 %.

Učestalost recesivnih homozigota DD iznosi 1: 100, dok je učestalost heterozigota HD u bosanskohercegovačkoj populaciji prema utvrđenoj alelogenskoj frekvenciji 1 : 5. Relativna frekvencija recesivnog alela C282Y izračunata na osnovu utvrđenih frekvencija genotipova u bosanskohercegovačkoj populaciji iznosi 2.25 %. Učestalost

recesivnih homozigota YY iznosi 1:1975; dok je učestalost heterozigota CY u bosanskohercegovačkoj populaciji prema utvrđenoj alelogenskoj frekvenciji 1 : 23.

**Tabela 2.** Utvrđene apsolutne i relativne frekvencije genotipova C282Y mutacije u ispitivanom uzorku

Genotip	Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
CC	191	95,5
CY	9	4,5
YY	0	-
Σ	200	100

**Tabela 3.** Apsolutne i relativne frekvencije genotipova u odnosu na mutacije C282Y i H63D u ukupnom uzorku.

Genotip	Apsolutna frekvencija	Relativna frekvencija (%)
CCHH	152	76
CYHH	8	4
CCHD	33	16,5
CYHD	1	0,5
CCDD	6	3
Σ	200	100

### DISKUSIJA

U našem ispitivanom uzorku, mutacija C282Y bila je otkrivena kod ukupno devet osoba. Sve osobe sa mutiranim alelom bile su heterozigotni nosioci. Odnosno od ukupno analiziranih 400 hromosoma, na 9 hromosoma utvrđeno je prisustvo C282Y mutacije HFE gena. Utvrdili smo da relativna frekvencija alela C282Y u bosanskohercegovačkoj populaciji iznosi 2.25%.

Kada se zna da su preko 80% pacijenata sa hereditarnom hemohromatozom homozigotni nosioci C282Y alela (Press, 1999; Merryweather – Clarke et al., 2000), onda nas naši rezultati navode na zaključak da hemohromatoza sigurno nije rijetko stanje u Bosni i Hercegovini, međutim pacijenti sa hereditarnom hemohromatozom uglavnom prolaze neprepoznati i tako dolazi do razvoja drugih bolesti. Heterozigotni nosioci C282Y alela su daleko brojnija grupa: otprilike svaka 23. osoba u Bosni i Hercegovini. Iako je kod ovih osoba rizik za povećanu apsorpciju željeza znatno manji, moralo bi im se savjetovati da ako im je supružnik takođe heterozigotni nosilac C282Y alela, vjerovatnoća da će im dijete biti mutirani homozigot je 25% (Snustad et al., 1997).

Mutaciju H63D u bosanskohercegovačkoj populaciji otkrili smo kod ukupno 40 osoba od kojih je bilo šest homozigotnih nosilaca mutacije dok su ostalih 34 bili heterozigoti. U ispitivanom uzorku samo jedna osoba je bila miješani heterozigot za C282Y i H63D mutaciju. Utvrđena frekvencija mutacije H63D u bosanskohercegovačkoj populaciji iznosi 11.5%.

Molekularno – genetsko testiranje hemohromatoze omogućava identificiranje pacijenata koji još ne pokazuju simptome bolesti, što daje priliku za preventivno djelovanje.

Analizom mutacija HFE gena savremenim molekularno – genetskim metodama istakli smo značaj primjene pomenutih metoda u dijagnosticiranju nasljednih oboljenja. Rezultati ove populaciono – genetičke studije ukazuju na značajnu prevalenciju C282Y i H63D mutacija u bosanskohercegovačkoj populaciji te time ukazuju i na potrebu dodatnog istraživanja hemohromatoze u Bosni i Hercegovini uključujući biohemijske metode nalaza željeza i DNK testiranje.

Dobijeni rezultati ukazuju na značajnu prevalenciju C282Y i H63D mutacija u bosanskohercegovačkoj populaciji te impliciraju da je potrebno na novo istražiti epidemiologiju hemohromatoze u Bosni i Hercegovini.

#### LITERATURA

1. Adams P.C. Hemochromatosis. *Clin Liver Dis.* (2004) 8 (4): 735 – 53.
2. Barton J.C., McDonnell S.M., Adams P.C., Brissot P., Powell L.W., Edwards C.Q., Cook J.C., Kodley K.V., and Hemochromatosis Management Working Group Management of hemochromatosis. *Ann Intern Med.* (1998) 129 (11): 932 - 939.
3. Barton J.C., Felitti V.J., Lee P., Beutler E. Characteristics of HFE C282Y homozygotes younger than age 30 years. *Acta Haematol.*, (2004) 112 (4): 219 – 21.
4. Beutler E., Gelbart T., West C., Lee P., Adams M., Blackstone R., Pockros P., Kosty M., Venditi C.P., Phatak P.D., Seese N.K., Chorney K.A., ten Elshof A.E., Gerhard G.S., Chorney M. Mutation analysis in hereditary hemochromatosis. *Blood Cells Mol Dis.* (1996) 22: 187 – 194
5. Brandhagen D.J., Fairbanks V.F., Baldus W.P., Smith C.I., Kruckeberg K.E., Schaid D.J., Thilbodeau S.N. Prevalence and clinical significance of HFE gene mutations in patients with iron overload. *AM J Gastroenterol.* (2000)95 (10): 2910 – 2914.
6. Feder J.N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D.A., Basava A., Dormishian F., Domingo R.J., Ellis M.C., Fullan A., Hinton L.M., Jones N.L., Kimmel B.E., Kronmal G.S., Lauer P., Lee V.K., LoebD.B., Mapa F.A., McClelland E., Meyer N.C., Mintier G.A., Moeller N., Moore T., Morikang E., Prass C.E., Quintana L., Starnes S.M., Schatzman R.C., Brunke K.J., Drayna D.T., Ritsch N.J., Bacon B.R., Wolff R.K. A novel MHC class I – like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat Genet* (1996) 13: 399 – 409.
7. Merryweather – Clarke A.T., Pointon J.P., Shearman J.D., Robson K.J.H. Global prevalence of putative haemochromatosis mutations. *J Med Genet.* (1997) 34: 275 – 278
8. Merryweather – Clarke A.T., Pointon J.J., Jouanolle A.M., Rochette J., Robson K.J.H. Geography of the HFE C282Y and H63D mutations. *Genet.Test.* (2000) 4: 183 – 198.
9. Press R. D. " Hemochromatosis: A " Simple" Genetic Trait ." Hospital practice (1999, accessed February 2002).  
< <http://www.hosprract.com/genetics/9908mmc.htm>>
10. Snustad P.D., Simmons J.M., Jenkins B.J.: Principles of genetics. (1997)John Wiley & Sons, Inc., Canada.

**MOLECULAR – GENETIC ANALYSES OF THE HEMOCHROMATOSIS  
GENE IN BOSNIAN AND HERZEGOVINIAN POPULATION**Amela Hercegovac<sup>1</sup>, Nataša Teran<sup>2</sup>, Rifet Terzić<sup>1</sup>, Borut Peterlin<sup>2</sup><sup>1</sup>Faculty of science, University of Tuzla, <sup>2</sup>Division of Medical Genetics, Department of  
Obstetrics and Gynecology, University Medical Centre, Ljubljana**SUMMARY**

Hereditary hemochromatosis (HH) is an autosomal recessive disorder which is characterized by systemic iron overload due to enhanced iron absorption in the small bowel. The most prevalent form of HH results from mutations in the HFE gene. The HFE gene is located on chromosome 6 in close proximity to the HLA - A locus. Two most frequent missense mutations were identified in the HFE gene, namely a G to A transition at nucleotide 845 which leads to a substitution of cysteine for tyrosine at the amino acid position 282 (C282Y) and a C to G change at nucleotide 187 that result in a substitution of histidine for aspartate at the amino acid position 63 (H63D). The study population included two hundred (100 males and 100 females) unrelated healthy individuals from Bosnia and Herzegovina. Genomic DNA was extracted from peripheral blood leukocytes using the standard procedure. HFE mutation analysis was performed using PCR-RFLP methods. C282Y mutation was detected in 9 individuals and all of them were heterozygous. H63D mutation was found in 40 individuals, 6 of them were homozygous. One compound heterozygous H63D/C282Y was identified. The observed C282Y allele frequency in the Bosnian and Herzegovinian population was 2.25%; the frequency of the H63D allele was 11.5%.

Key words: hereditary hemochromatosis, HFE, C282Y, H63D