



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI CAGLIARI
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA
Dipartimento di Scienze Biomediche e Biotecnologie

Dottorato di Ricerca (XX ciclo)
"Terapia Pediatrica e Farmacologia dello Sviluppo"
Coordinatore Scientifico: Prof. Renzo Galanello
(MED 03)

STUDIO DEL GENE AHSP NELLE
 β -TALASSEMIE

Tutor:
Prof. Renzo Galanello

Tesi di dottorato di:
Dott.ssa Stefania Satta

ANNO ACCADEMICO 2006-2007

Indice

<i>Indice</i>	1
<i>Introduzione</i>	2
1.1. <i>La β-talassemia</i>	3
1.2. <i>Gene AHSP</i>	8
<i>Scopo della tesi</i>	15
<i>Materiali e Metodi</i>	17
<i>Risultati</i>	24
<i>Conclusioni</i>	30
<i>Bibliografia</i>	34

Introduzione

1.1. Talassemie

Le talassemie costituiscono un gruppo eterogeneo di disordini ereditari, a carattere autosomico recessivo, dovuti alla difettosa o assente sintesi di una delle catene costitutive della molecola emoglobinica.

Le emoglobine umane normali sono costituite da due tipi di catene polipeptidiche (globine) assemblate in tetrameri.^{1,2,3} Ogni catena possiede un gruppo eme (ferroprotoporfirina IX) il cui atomo di ferro in forma ridotta (Fe^{++}) può legare reversibilmente l'ossigeno. In rapporto al periodo di sviluppo (switch fetto-adulto) i globuli rossi contengono diversi tipi di emoglobina (Hb): l'Hb A ($\alpha_2\beta_2$, adulta che costituisce circa il 97 % dell'Hb del soggetto dopo la nascita); l'Hb A2 ($\alpha_2\delta_2$, presente solo dopo la nascita e che costituisce circa il 2% dell'Hb); e l'Hb F ($\alpha_2\gamma_2$, fetale), propria della vita intrauterina e che normalmente dopo la nascita costituisce circa l'1% dell' Hb. Ogni catena globinica è prodotta sotto il controllo di uno specifico gene globinico. L'individuo normale possiede una sola coppia di geni per le catene β e le catene δ , mentre possiede due coppie di geni per le catene α e due per le catene γ . Le due coppie di geni γ , il gene δ e il gene β sono localizzati nel cromosoma 11 (cluster β)⁴. Le due coppie di geni α sono localizzate nel cromosoma 16 (cluster α)⁵. A seconda del gene coinvolto si distinguono vari tipi di

talassemie (α , β , δ , etc.), ma solo le β e α -talassemie hanno rilevanza clinica.

Le talassemie sono i disordini monogenici più comuni nell'uomo; sono prevalenti nelle popolazioni del Mediterraneo, Africa, Medio Oriente, Asia Centrale, India ed Estremo Oriente, dove raggiungono frequenze molto elevate e rappresentano un rilevante problema sanitario. La frequenza media dei portatori di β -talassemia in queste regioni raggiunge il 4.9%, per un totale di circa 300 milioni di individui.

Le β -talassemie sono estremamente eterogenee dal punto di vista molecolare. Vengono attualmente riconosciute oltre 200 differenti mutazioni responsabili di β -talassemia^{6,7}. Un numero limitato di mutazioni è dovuto ad una estesa delezione del gene β . La gran parte dei difetti sono invece legati a singole sostituzioni nucleotidiche o a delezione/addizione di uno o pochi nucleotidi. Si distinguono mutazioni che agiscono negativamente sulla trascrizione del gene (mutazioni del promoter), mutazioni che alterano il processo di maturazione del RNA messaggero (splicing), mutazioni che interferiscono sul processo di poliadenilazione del RNA messaggero, mutazioni del codone iniziale, mutazioni che trasformano un codone codificante in un codone terminale (non-senso), mutazioni frameshift che per delezione in genere di uno o due nucleotidi alterano il codice di lettura a valle, mutazioni del codone terminale che risultano nella produzione di una molecola

allungata e mutazioni che portano alla sintesi di un'emoglobina iperinstabile.

Da un punto di vista clinico le β -talassemie possono essere classificate in: portatore asintomatico dovuto allo stato eterozigote per una mutazione β -talassemica; talassemia major, omozigosi o composto genetico per due mutazioni; talassemia intermedia, costituita da una serie estremamente eterogenea di quadri di diversa gravità a patologia molecolare complessa.

Nella popolazione sarda, dove la frequenza dei portatori è del 10.5%, la β -talassemia è quasi esclusivamente del tipo β^0 . L'analisi molecolare ha evidenziato che il difetto predominante (95% dei difetti β -talassemici) è la mutazione nonsense al codon 39 del gene β globinico.

A livello clinico la grande maggioranza degli omozigoti manifesta la forma grave di anemia trasfusione-dipendente (talassemia major), mentre circa il 10% hanno una condizione più lieve di anemia non trasfusione-dipendente chiamata talassemia intermedia.

I quadri clinici attenuati, rappresentati da composti genetici o omozigoti per la β -talassemia, sono dovuti ad una serie di meccanismi molecolari solo in parte conosciuti. Questi vari meccanismi convergono nel determinare una minore riduzione dello sbilanciamento biosintetico rispetto a quello che si ritrova abitualmente nella β -talassemia omozigote^{8,9}. Tra questi meccanismi i più comuni sono:

a) la presenza di omozigosi per mutazioni cosiddette “lievi” o “silenti”, cioè mutazioni beta talassemiche con una capacità residua di sintesi beta-globinica relativamente elevata.

b) la coereditarietà di due geni alfa deleti, che attraverso la ridotta produzione di catene α -globiniche provoca una riduzione dello sbilanciamento biosintetico $\alpha/\beta+\gamma$.

c) la presenza di determinanti genetici capaci di aumentare la sintesi di catene γ nella vita adulta così da ridurre lo sbilanciamento biosintetico. Questi determinanti possono essere associati o non al cluster β -globinico. Tra quelli associati vi sono mutazioni note: la -196 C→T e la -117 G→A nel promoter del gene $A\gamma$ e la -158 C→T nel promoter del gene $G\gamma$ globinico ^{10,11}. Quest’ultima è attiva solo in condizioni di stress eritropoietico. Alcuni laboratori, sulla base di dati sperimentali ed estesi studi familiari, hanno ipotizzato l'esistenza di loci che controllano la produzione di F-cellule localizzati al di fuori del cluster β globinico. Dover e collaboratori, in pazienti con anemia falciforme di origine africana, hanno riportato evidenze che suggeriscono che la produzione di F-cellule è controllata da un locus assegnato al cromosoma X (Xp 22.2-22.3)¹². Più recentemente Craig e collaboratori¹³ e successivamente Garner ^{14,15}, in una vasta famiglia con HPFH (persistenza ereditaria di emoglobina fetale) di origine orientale, hanno ipotizzato la presenza di un altro locus, che è stato assegnato al cromosoma 6 (6q 22.3-23.1).

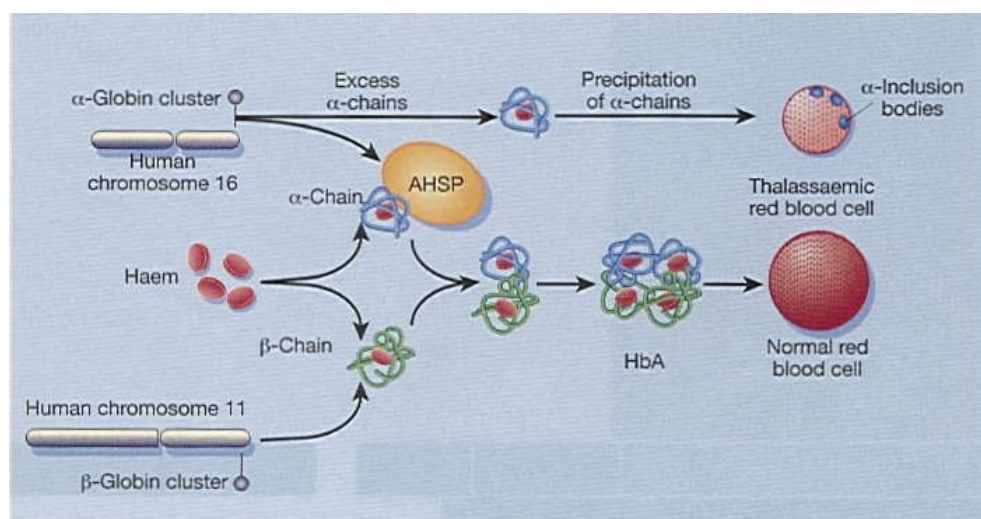
d) il doppio eterozigote per β -talassemia e la presenza di un gene α triplicato, anzichè duplicato come di norma. Il gene α triplicato provoca un eccesso di α globina e quindi si comporta di fatto come un allele β talassemico ¹⁶.

L'analisi dei difetti molecolari del gene β -globinico ha consentito di chiarire la fisiopatologia della talassemia. Qualunque sia il difetto molecolare, il risultato è una riduzione di entità variabile o assenza di sintesi di catene β globiniche.³ In conseguenza si ha una minore quantità di emoglobina per cellula e quindi globuli rossi microcitici ed ipocromici, ma soprattutto si ha uno sbilanciamento della sintesi globinica con eccesso relativo di catene α globiniche, le quali precipitano formando corpi inclusi nei precursori eritroidi. Queste inclusioni danneggiano la membrana per cui si ha la distruzione degli eritroblasti immaturi nel midollo osseo (eritropoiesi inefficace). I pochi eritrociti che sopravvivono e raggiungono il circolo periferico contengono corpi inclusi, per cui vengono rimossi nella milza, fegato e cellule reticoloendoteliali del midollo osseo e questo rappresenta la componente emolitica nella β talassemia. Tutti questi meccanismi contribuiscono all'anemia caratteristica della malattia, anche se il ruolo preminente spetta all'eritropoiesi inefficace.

1.2. Gene AHSP

Si è a lungo dibattuto su quali siano i meccanismi che consentono ai globuli rossi di produrre i loro prodotti globinici in perfetto bilanciamento stechiometrico (α -globine, β -globine e eme in rapporto 2:2:4). Infatti la sintesi di HbA è coordinata in modo da ridurre al minimo l'accumulo di subunità libere che tenderebbero a formare precipitati citotossici. L'esistenza di "chaperones" molecolari che regolano la stabilità delle subunità globiniche è stata più volte proposta, ma tali molecole non erano mai state identificate^{17,20}.

Recentemente Kihm AJ e coll.¹⁸ hanno descritto una proteina eritroide specifica, EDRF (Erythroid Differentiation Related Protein Factor), in grado di stabilizzare le catene alfa emoglobiniche libere e perciò "ribattezzata" AHSP (Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein). E' stato dimostrato che l'AHSP, altamente espressa nei precursori eritroidi, agisce stabilizzando le catene α -globiniche libere evitando gli effetti dannosi della loro precipitazione¹⁹.



L'AHSP agisce almeno su due forme dell' α -globina: l'apo- α -globina, priva di EME, estremamente instabile nella cellula e l'olo- α -globina (α Hb) (provvista di EME).

Da diversi studi si è visto che in condizioni normali l'AHSP ha una duplice funzione:

- a) detossifica il lieve eccesso di α -globine presente nei precursori eritroidi (α -globine prodotte in lieve eccesso senza effetti dannosi nella cellula)²¹
- b) agisce come chaperone molecolare facilitando il ripiegamento delle α -globine neosintetizzate per promuovere la normale sintesi dell'HbA.

Il complesso α Hb-AHSP altera la struttura tridimensionale dell' α Hb convertendo l' α -Hb ossigenata (FeII) nella forma più stabile e non reattiva α -Hb deossigenata (FeIII).^{22,23}

In assenza di AHSP le α -Hb libere formerebbero spontaneamente emicromi i quali precipitando generano le specie reattive dell'ossigeno (ROS)^{24,25} che causano danno alla membrana determinando la distruzione prematura dei precursori eritroidi nel midollo osseo (eritropoiesi inefficace).

L'AHSP lega α -Hb in almeno due α eliche chiamate G ed H distanti dalla tasca di legame con l'EME. Presumibilmente l'AHSP riconosce un sito di legame simile anche nell' α -apo-globina.

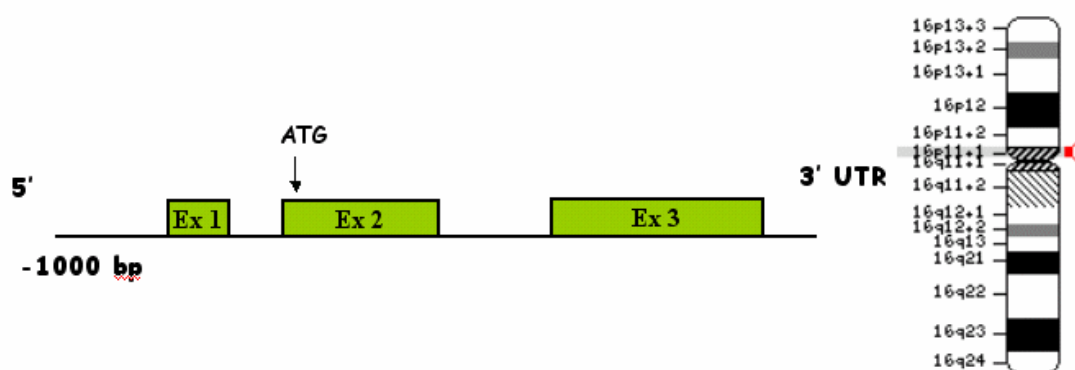
Studi in vitro hanno dimostrato che l'AHSP non lega le β -apo globine, le β Hb o il tetramero HbA²⁶. In questo modo, poichè α Hb ha una maggiore affinità per β Hb, in presenza di sufficienti concentrazioni di β Hb il "rilascio" di α Hb dall'AHSP è facilitato al fine di consentire la formazione dei dimeri di Hb $\alpha\beta$ e quindi dei tetrameri dell'emoglobina adulta. AHSP non interferisce dunque con la sintesi di HbA²⁷.

Gallagher e coll studiando un certo numero di sequenze genomiche che potessero essere coinvolte nella trascrizione del gene AHSP, hanno dimostrato in vivo che AHSP è un gene che dipende dal fattore eritroide EKLF (Erythroid Kruppel-like factor), molto importante nel rimodellamento cromatinico del locus AHSP²⁸.

Nel tentativo di fornire ulteriori informazioni sul meccanismo molecolare di controllo dell'espressione di AHSP nell'eritrocita e per contribuire quindi a futuri studi genetici sulla talassemia, Gallagher e coll hanno identificato e caratterizzato nel promoter del gene AHSP anche sequenze di consenso per il legame dei fattori di trascrizione eritroide GATA-1 e OCT-1²⁸. I risultati ottenuti in vitro dimostrano che nel promoter del gene AHSP sono molto importanti i siti di legame per queste proteine, al fine di ottenere alti livelli di espressione di AHSP nelle

cellule eritroidi. Questo promoter, da -170 a +269, comprende la regione 5' fiancheggiante il gene AHSP e l'introne 1. Anche gli studi sul topo transgenico hanno dimostrato che questa regione del promoter è necessaria per l'espressione del gene nelle cellule eritroidi e che la sua espressione dipende da GATA-1.

Il gene AHSP, localizzato nel braccio corto del cromosoma 6 (6p11.1) è composto da tre esoni di cui il primo non codificante, si estende per circa 900 bp e codifica una proteina di 102 aa, altamente conservata in diverse specie animali.



Studi su modelli murini AHSP^{-/-} hanno evidenziato reticolocitosi ed una morfologia dei globuli rossi simile a quella dei topi transgenici con talassemia (Fig.1).

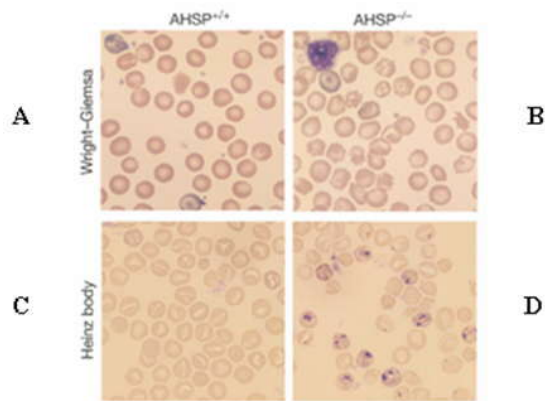


Fig. 1: Striscio di sangue di un topo normale AHSP^{+/+} (A,C) e di un topo AHSP knockout (B,C) in cui si evidenziano eritrociti con anomala morfologia spiculata, reticolociti elevati e corpi di Heinz.

Inoltre Yi Kong e coll. dimostrano un peggioramento nella precipitazione delle α -globine nel topo adulto AHSP^{-/-} e con talassemia intermedia (Fig.2)³⁴.

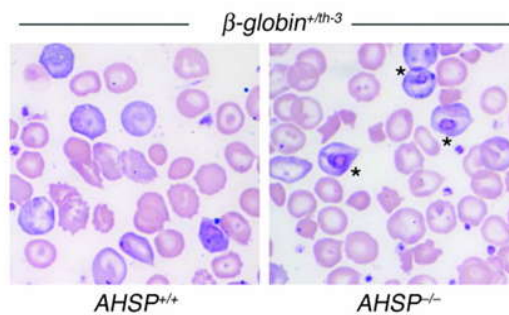


Fig. 2: Striscio di sangue di un topo talassemico (β -globin^{+/th-3}) con genotipo AHSP^{+/+} e AHSP^{-/-}. Le inclusioni eosinofile (evidenziate con asterischi) sono aumentate negli eritrociti AHSP^{-/-}

Questi studi suggeriscono dunque l'ipotesi del possibile ruolo di AHSP nel modificare il fenotipo talassemico .

I diversi studi effettuati nell'uomo per supportare questa ipotesi, hanno dato risultati diversi:

1. Viprakasit e collaboratori hanno studiato il gene AHSP in 120 pazienti HbE- β talassemici con fenotipo variabile. Hanno individuato diversi polimorfismi che hanno permesso di costruire degli aplotipi (indicati come I e II) i quali riflettono la diversa origine etnica delle popolazioni del Sud-Est asiatico, ma nessuna mutazione o aplotipo particolare era associato alla gravità della malattia²⁹.
2. Cappellini e coll studiando il gene AHSP in 70 individui bianchi con varie forme di talassemia non trovano mutazioni o associazione di specifici aplotipi con la gravità della malattia.³⁰
3. Nel nostro laboratorio in uno studio di due famiglie, non imparentate, con soggetti eterozigoti per la mutazione β^{o39} ma fenotipo di talassemia intermedia grave è stata trovata una riduzione significativa dell'espressione di AHSP (nei reticolociti e in colture cellulari), anche se negli stessi individui non sono state trovate mutazioni nel gene AHSP e nelle regioni fiancheggianti³¹.
4. Mei Lai e coll, hanno studiato i due omopolimeri (T18 e T15) in posizione -160pb upstream all'esone 1 del gene AHSP in un gruppo di 9 pazienti con talassemia intermedia, composti eterozigoti per beta-talassemia e gene alfa triplicato. La frequenza dell'omopolimero corto T15 è risultata essere più alta di quella attesa (in base alla frequenza allelica nella popolazione normale) e in associazione a una bassa espressione di AHSP³².
5. Dos Santos e coll., hanno dimostrato su colture eritroidi di indivui normali un'espressione coordinata della sintesi di AHSP e delle catene α -globiniche nella differenziazione eritroide³³.

In linea teorica la sovraespressione dell'AHSP (gain of function) potrebbe avere rilevanza clinica nella β talassemia in quanto, la stabilizzazione delle catene α globiniche libere ridurrebbe lo sbilanciamento globinico trasformando una Tal. Major in Tal. Intermedia. Viceversa una ridotta espressione dell'AHSP (loss of function) potrebbe invece spiegare il fenotipo grave di alcuni soggetti eterozigoti per β talassemia (convertire dunque un portatore beta in Talassemia Intermedia).

Scopo della tesi

Sebbene la β -talassemia sia considerata una classica malattia monogenica, la grande variabilità clinica in pazienti che ereditano identiche mutazioni del gene β -globinico, suggerisce l'esistenza di altri determinanti genetici, localizzati anche fuori dal cluster β -globinico, che ne possano influenzare il quadro clinico. L'AHSP sembra rappresentare, per le sue caratteristiche, un buon candidato come gene modificatore del fenotipo nella β -talassemia.

A tale scopo ho voluto studiare:

- la sequenza del gene AHSP per ricercare eventuali mutazioni che potessero alterare la funzione del gene e quindi modificare il quadro clinico della β -talassemia;
- gli aplotipi del gene AHSP per determinare la presenza di alleli comuni nei diversi gruppi di pazienti con β talassemia o eventuali differenze di aplotipi tra popolazioni diverse;
- la sequenza T repeat (T18 e T15), in posizione -160pb upstream all'esone 1 del gene AHSP, risultata responsabile della diversa espressione del gene.

Materiali
e
Metodi

Lo studio del gene AHSP (comprese 600bp in 5' ed in 3' al gene) è stato eseguito in 19 pazienti con talassemia intermedia non trasfusi con le seguenti caratteristiche genetiche:

- omozigoti per la mutazione non senso al codon 39
CAG → TAG,
- aplotipo II/II,
- genotipo α -globinico $\alpha\alpha/\alpha\alpha$, $-\alpha/\alpha\alpha$;
- negatività per il polimorfismo XmnI (-158 C→T) nel promoter del gene γ -globinico e assenza di altre mutazioni note, implicate nell'aumento dell' HbF, nei promoter dei geni $G\alpha$ e $A\gamma$.

Da un'indagine sulla distribuzione e sulla provenienza geografica di questi pazienti, al fine di individuare un'eventuale origine comune, è risultato che una buona parte delle famiglie raccolte proviene da una stessa zona delle Sardegna, precisamente dalla costa sud-occidentale.

Per confronto sono stati esaminati 14 pazienti con talassemia major trasfusione dipendenti, aventi identiche caratteristiche genetiche (Tab.1),

	<i>Talassemia Intermedia</i>	<i>Talassemia Major</i>
<i>Pazienti</i>	<i>19</i>	<i>14</i>
<i>Genotipo β</i>	<i>$\beta^{\circ}39/\beta^{\circ}39$</i>	<i>$\beta^{\circ}39/\beta^{\circ}39$</i>
<i>Genotipo α</i>	<i>$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ <i>-$\alpha/\alpha\alpha$</i></i>	<i>$\alpha\alpha/\alpha\alpha$ <i>-$\alpha/\alpha\alpha$</i></i>
<i>Aplotipo β-cluster</i>	<i><i>I /II</i> <i>II /II</i></i>	<i><i>I /II</i> <i>II /II</i></i>
<i>XmnI (-158 Gγ C→T)</i>	<i>-/-</i>	<i>-/-</i>

Come detto precedentemente in posizione -160pb upstream all'esone 1 del gene AHSP, sono stati descritti due omopolimeri (T18 e T15) che possono influenzare l'espressione del gene AHSP e di conseguenza il fenotipo clinico ed ematologico. Abbiamo pertanto studiato la frequenza degli omopolimeri T15 e T18 in un gruppo di 20 soggetti normali e in pazienti con differenti sindromi talassemiche e precisamente 14 pazienti omozigoti per la mutazione non senso beta 39 con talassemia major, 19 con talassemia intermedia con lo stesso genotipo, 13 composti eterozigoti per β -talassemia e triplo gene alfa globinico e 5 portatori di β -talassemia ma con fenotipo di talassemia intermedia. Questi ultimi mostravano un'anemia microcitica da moderata a severa con livelli di emoglobina che variano da 7.2 a 9.0 g/dl, epatosplenomegalia, lievi alterazioni ossee faciali "thalassemia-like", iperbilirubinemia, marcate anomalie morfologiche dei globuli rossi (anisocitosi, poichilocitosi), reticolocitosi e presenza di eritroblasti nel sangue periferico.

Gli individui esaminati sono stati sottoposti a prelievo di sangue periferico da cui è stato estratto il DNA genomico utilizzando la procedura di estrazione salina.

L'analisi molecolare del gene AHSP (~1.5 Kb) è stata condotta con sequenziamento diretto del DNA genomico amplificato (PCR) su Sequenziatore Automatico Capillare ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, CA).

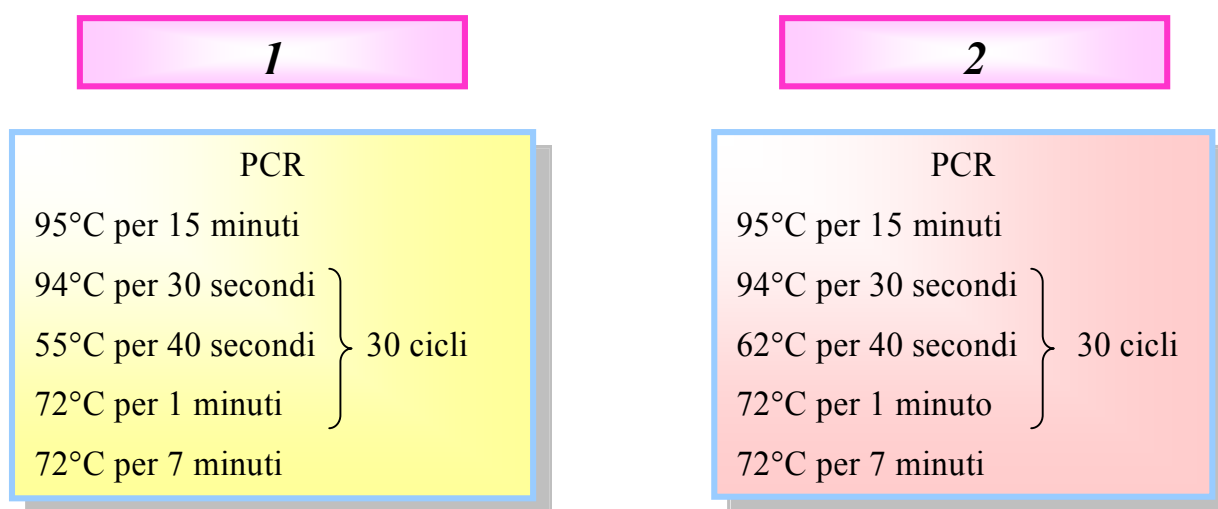
Il gene AHSP è stato amplificato con l'uso di appropriati primers (*Tab.1*) che consentono di amplificare esclusivamente il gene in esame.

<i>Tab.1</i> PRIMERS			
	<u>PCR</u>	<u>FORWARD</u>	<u>REVERSE</u>
<i>rs 4499252</i>	<u>1</u>	<u>TCTTATGGAGCACAGCGTG</u>	<u>ACAGAGAGATTCACGCACCCT</u>
<i>rs 5816533</i>	<u>1</u>	<u>TCTTATGGAGCACAGCGTG</u>	<u>ACAGAGAGATTCACGCACCCT</u>
<i>rs 5850390</i>	<u>1</u>	<u>GGCCTTGTTATCTTTCTACCTT</u>	<u>TCAGCAGGTGAGTCCAAGCTT</u>
<i>rs 4296276</i>	<u>1</u>	<u>GGCCTTGTTATCTTTCTACCTT</u>	<u>TCAGCAGGTGAGTCCAAGCTT</u>
<i>rs 17677</i>	<u>2</u>	<u>CAACTATTACAGGCAGCAGGT</u>	<u>CTGAGAAACTCTGACCTTCATG</u>

La miscela di amplificazione ha un volume totale di 25 µl ed è formata da: una coppia di primer (forward e reverse), 25 pmol, che fiancheggiano la regione che funge da stampo che si desidera studiare, 200 µM di quattro desossiribonucleosidi trifosfato (dNTPs); 1 U di DNA polimerasi (AmpliTAQ GOLD), 50 mM di KCl, 10 mM di TRIS HCl pH 8.3 e 1,5 mM di MgCl₂ cui si aggiungono 100 ng di DNA genomico.

I prodotti ottenuti vengono controllati su gel orizzontale di agaroso al 1.2% con una semplice corsa elettroforetica e seguente visualizzazione su transilluminatore a raggi UV.

In questo studio le condizioni seguite per la PCR sono:



I prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando ExoSAP-IT. La purificazione si rende necessaria perché nel prodotto di PCR permangono dNTPs e primer non utilizzati che possono interferire con le fasi successive dell'analisi.

Le reazioni di cycle sequencing sono state eseguite in un volume finale di 20 μ l. Il volume include: 2 μ l di miscela di reazione contenente polimerasi, buffer, dNTPs e ddNTPs (Big dye mix); 3-10 ng di template la cui quantità è stata valutata in base alla grandezza del prodotto di PCR; 3,2 pmol di primer; H₂O deionizzata.

I ddNTPs marcati non incorporati devono essere rimossi completamente dai campioni in quanto interferiscono con il riordinamento delle basi. La purificazione della reazione di sequenziamento può essere eseguita tramite precipitazione con etanolo e sodio acetato oppure mediante l'uso di PERFORMA DTR Gel Filtration Cartridges.

Un'aliquota del purificato viene successivamente esaminata sull'analizzatore genetico ABI Prism 3100.

Per lo studio del T repeat ho usato un primer legato a fluorocromo che permette l'analisi su un sequenziatore automatico ABI PRISM 377 (19).

Le reazioni di PCR sono state fatte seguendo il protocollo per l'ABI PRISM Linkage Mapping Set, in Thermal Cycler Gen Amp PCR Sistem 9700, in un volume di 15 μ l, contenente 50 μ g del campione di DNA, 0.33 μ M della miscela di ciascun primer, 250.0 μ M di ciascun dNTP, 0.04 U/ μ l di Amplitaq Gold (Perkin Elmer), 1 x Gene Amp PCR buffer II con 2.5 mM di MgCl₂ (Perkin Elmer).

Il DNA è stato inizialmente denaturato a 95°C per 15 min. e poi è stato sottoposto a 30 cicli di 94°C per 30 secondi, 55°C per 40 secondi e, 72°C per 40 secondi, con un'estensione finale a 72°C per 30 min. Un'aliquota di 2 μ l del prodotto di PCR è stata miscelata ad uno standard interno GS 400HD (Perkin Elmer) con 1 μ l di di Formamide e 0.5 μ l di Gel Loading Dye (Blu dextrano-Perkin Elmer) e separati su un sequenziatore automatico ABI PRISM 3100.

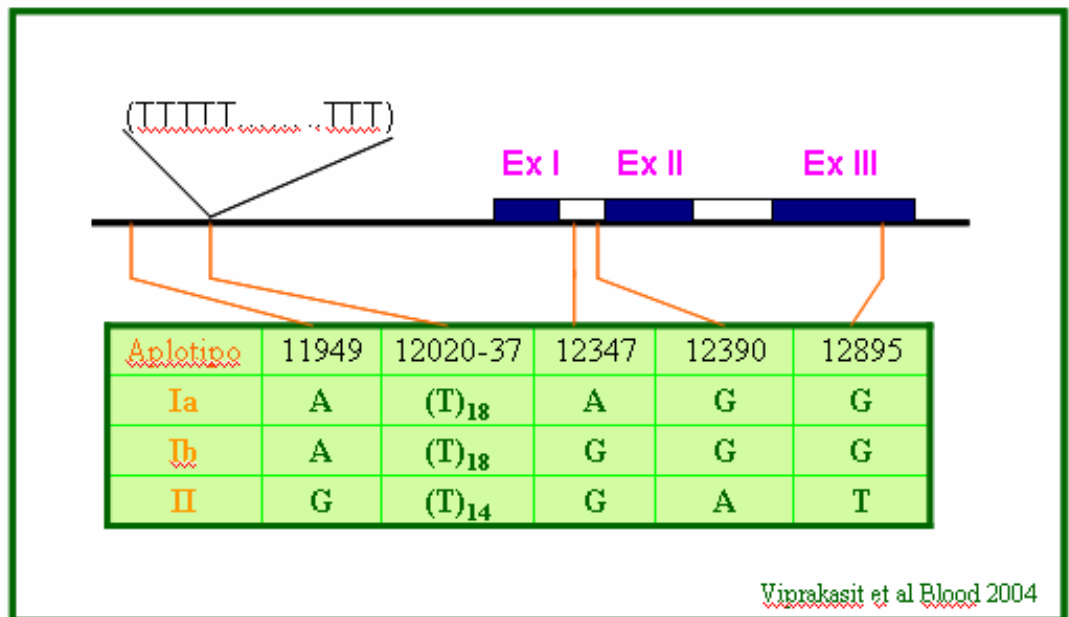
Le immagini dei gel sono state analizzate con l'uso del software GeneScan Analysis 3.1 (Perkin Elmer).

Le grandezze elettroforetiche dei marcatori sono state determinate con l'uso del software Genotyper 2.0 (Perkin Elmer). Per paragonare le grandezze alleliche tra i diversi gel e quindi poter determinare le grandezze elettroforetiche appropriate degli alleli sono stati inclusi sempre dei campioni di riferimento CEPH 1347-02, con un genotipo noto.

Risultati

Sequenze del gene e aplotipi

In tutti i pazienti sono state ricercate mutazioni del gene AHSP.



La sequenza del gene AHSP (~800bp) non ha evidenziato alcuna mutazione. Inoltre lo studio dei siti polimorfici, identificati precedentemente in pazienti composti genetici HbE/ β -talassemia del Sud Est asiatico, ha confermato anche nei nostri pazienti la presenza dei medesimi aplotipi I e II (Fig.3). Solo in un paziente con talassemia major è stato identificato un nuovo aplotipo da noi definito come III (Tab.2).

Tab.2 Aplotipi del gene AHSP in pazienti sardi con talassemia intermedia e talassemia major

Fenotipo	I/I	I/II	II/II	I/III	I allele freq.	II allele freq.	III allele freq.
TALASSEMIA INTERMEDIA n=19	12	6	1	-	30 (78.9)	8 (21.1)	-
TALASSEMIA MAJOR n=14	9	3	1	1	22 (78.6)	5 (17.8)	1 (3.6)

Per valutare la possibile relazione tra un particolare aplotipo e la gravità della β -talassemia, abbiamo confrontato la frequenza allelica di ciascun singolo aplotipo nei due gruppi di pazienti (talassemie major e intermedie) ma non è stata trovata alcuna differenza statisticamente significativa (Tab.2). Il confronto delle frequenze alleliche tra i pazienti sardi e i pazienti del sud-est asiatico e tra i soggetti normali delle due popolazioni (Sardegna, Thailandia), non ha rilevato differenze significative (Tab.3-Tab.4).

Tab.3 Frequenza allelica nelle talassemie intermedie e major sarde e del S/E asiatico

Fenotipo	I allele freq	II allele freq	III allele freq
INTERMEDIA SARDEGNA (n=20)	78.9	21.1	-
INTERMEDIA S/E ASIA (n=33)	62.2	37.8	-

Fenotipo	I allele freq	II allele freq	III allele freq
MAJOR SARDEGNA (n=14)	78.6	17.8	3.6
MAJOR S/E ASIA (n=65)	63	37	-

Tab.4 Aplotipi del gene AHSP in soggetti normali sardi e thailandesi

	I/I	I/II	II/II	Freq. Allele I	Freq. Allele II
Sardegna n°=20	13 (65%)	7 (35%)	-	33 (82.5%)	7 (17.5%)
Sud Est Asia n°=211	133 (63.1%)	71 (33.6%)	7 (3.3%)	337 (80.0%)	85 (20.0%)
Surin n°=30	11 (36.7%)	12 (40%)	7 (23.3%)	34 (57%)	26 (43%)

Omopolimero

La frequenza degli omopolimeri T15 e T18 e la distribuzione dei genotipi da noi trovata è riportata in Tab.5

Tab.5

Genotipo	Normali	Tal.intermedie	Tal. Major	Portatori gravi	Triplo alfa/ beta eterozigoti
T18/T18	65%	63%	72%	-	93%
T18/T15	35%	32%	21%	100%	7%
T15/T15	-	5%	7%	-	-

Non ci sono differenze nella frequenza dei genotipi tra i soggetti normali ed i pazienti con talassemia major ed intermedia. Nei portatori di beta talassemia con fenotipo di talassemia intermedia l'unico genotipo riscontrato è T18/T15. La presenza dell' omopolimero T15, in tutti i portatori di beta talassemia con fenotipo severo è in accordo con la

ridotta espressione del gene AHSP da noi precedentemente descritta nei reticolociti e nelle colture eritroidi. (Galanello et al, abs 1881. ASH 2003).

Discussione
e
Conclusioni

La marcata variabilità clinica, che si può presentare in pazienti con identiche mutazioni nel gene β globinico, può essere data dalla coereditarietà di HPFH e di mutazioni dei geni α globinici che alterano il rapporto globinico positivamente o negativamente. Esistono comunque diversi casi di β talassemia la cui variabilità fenotipica non può essere spiegata solo da modificatori conosciuti. L'AHSP a causa delle proprie caratteristiche biologiche e biochimiche, è stato potenzialmente indicato come possibile gene modificatore della β talassemia. L'interazione dell' α Hb con l'AHSP potrebbe avere rilevanza clinica nella β talassemia; una sovraespressione dell'AHSP potrebbe infatti spiegare perchè a livello clinico molti individui omozigoti per la beta talassemia hanno una condizione più lieve di anemia non trasfusione dipendente (talassemia intermedia) rispetto alla grande maggioranza degli omozigoti che manifesta la forma grave di anemia trasfusione-dipendente (talassemia major); viceversa la contemporanea presenza di mutazioni che compromettono la funzione dell'AHSP potrebbe spiegare il fenotipo severo riscontrato in alcuni eterozigoti β -talassemici.

Nei pazienti da noi studiati con talassemia intermedia, talassemia major e eterozigoti per il gene β ma con fenotipo grave, non sono state trovate mutazioni del gene AHSP. Tali dati sono in accordo con precedenti studi effettuati da Viprakasit, il quale esaminando pazienti Tailandesi con HbE- β talassemia e con differenti quadri clinici (forme lievi, moderate e severe), non ha trovato alcuna associazione tra il gene AHSP e la gravità del fenotipo.

Anche lo studio degli aplotipi nei nostri due gruppi di pazienti (talassemie major e intermedie) ha confermato la presenza dei medesimi aplotipi I e II trovati in pazienti β -talassemici del sud est asiatico.

Lo studio dell'omopolimero T15 nei pazienti composti eterozigoti per beta talassemia e triplo gene alfa globinico, ha dato una frequenza più

bassa rispetto a quella della popolazione normale. Tali dati non sono in accordo con i risultati ottenuti da Mei Lai e collaboratori in un gruppo di pazienti composti eterozigoti per beta talassemia e triplo gene alfa globinico con fenotipo di talassemia intermedia. La frequenza dell'allele T15 infatti, oltre ad essere risultata più alta di quella attesa (rispetto all'allele T18), è anche significativamente associata a bassi livelli di espressione dell'AHSP.

Lo studio dell'omopolimero nei pazienti con talassemia intermedia e talassemia major non ha evidenziato differenze sia nella frequenza allelica che in quella genotipica; l'unica significatività è nei portatori gravi in cui è stato riscontrato il solo genotipo T15/T18. La presenza dell'omopolimero T15 in tutti i portatori di β talassemia con fenotipo grave è in accordo con la ridotta espressione del gene AHSP da noi precedentemente descritta nei reticolociti e nelle colture cellulari degli stessi individui.

Nonostante non siano state evidenziate sino ad oggi mutazioni nel gene, nel promoter o nella regione 3' fiancheggiante il gene AHSP, è possibile tuttavia che l'espressione del gene possa venire alterata da mutazioni in elementi in cis non ancora esaminati o da modificazioni di proteine regolatorie che agiscono in trans, o ancora da cause epigenetiche che potrebbero spiegarne la variabilità di espressione. E' indispensabile quindi definire i meccanismi di regolazione del gene: un primo importante passo sarebbe l'identificazione dei domini del gene AHSP necessari alla sua corretta espressione in vivo.

E' inoltre importante studiare la sequenza del gene in un più ampio numero di individui talassemici appartenenti ad altre popolazioni. Lo studio del gene AHSP dovrebbe essere fatto inoltre in tutti quei casi di anemia emolitica con corpi di Heinz da causa sconosciuta e negli individui portatori di β -talassemia con fenotipo grave.

Le conoscenze sull'AHSP potranno essere utili anche nel campo della terapia genica. A questo scopo sarebbe interessante valutare la sovraespressione del gene AHSP in modelli sperimentali β -talassemici nei quali la proteina dovrebbe stabilizzare le catene α -globine in eccesso. Per far ciò, poiché la proteina AHSP è piccola e principalmente α -elica, si potrebbe definire un suo minimo dominio attivo ed utilizzarlo per generare un peptide sintetico, stabile e permeabile nella cellula, che sia in grado di mimare le funzioni dell'AHSP²¹.

Bibliografia

1. Dickerson, R.E., and Geis, I. 1983. Hemoglobin: structure, function, evolution, and pathology. Benjamin Cummings. Menlo Park, California, USA. 176 pp.
2. Fermi, G., and Perutz, M.F. 1981. Atlas of molecular structures in biology. Volume 2, Haemoglobin and myoglobin. Oxford University Press. Oxford, United Kingdom. Clarendon Press. New York, New York, USA. 104 pp.
3. Forget, B.G., and Pearson, H.A. 1995. Hemoglobin synthesis and the thalassemias. In Blood: principles and practices of hematology. R.I. Handin, S.E. Lux, and T.P. Stossel, editors. J.B. Lippincott. Philadelphia, Pennsylvania, USA. 1525–1990.
4. Fritsch E.F., Lawn R.M., Maniatis T. Molecular cloning and characterization of the human b-like globin gene cluster. Cell 19, 959, 1980.
5. Higgs DR, Vickers MA, Wilkie AO, Pretorius IM, Jarman AP, Weatherall DJ. A review of the molecular genetics of the human alpha-globin gene cluster. Blood. 1989 Apr;73(5):1081-104.
6. Huisman T.H.J., Carver M.F.H., Baysal E. Asyllabus of thalassemia mutation. Sicule Cell Anemia Foundation, 1997.
7. Rosatelli MC, Tuveri T, Scalas MT, Leoni GB, Sardu R, Faa V, Meloni A, Pishedda MA, Demurtas M, Monni G, et al. Molecular screening and fetal diagnosis of beta-thalassemia in the

- Italian population.
Hum Genet. 1992 Aug;89(6):585-9.
8. Wainscoat JS, Thein SL, Weatherall DJ. Thalassaemia intermedia. Blood Rev. 1987 Dec;1(4):273-9. Review.
 9. Galanello R, Cao A. Relationship between genotype and phenotype. Thalassaemia intermedia. Ann N Y Acad Sci. 1998 Jun 30;850:325-33. Review.
 10. Pirastu M, Kan YW, Galanello R, Cao A. Multiple mutations produce delta beta 0 thalassaemia in Sardinia. Science. 1984 Mar 2;223(4639):929-30.
 11. Gilman JG, Huisman TH. DNA sequence variation associated with elevated fetal G gamma globin production. Blood. 1985 Oct;66(4):783-7.
 12. Dover G.J., Smith K.D., Chang Y.C., Purvis S., Mays A., Meyers D.A., Sheils C., Serjeant G. Fetal hemoglobin levels in sickle cell disease and normal individuals are partially controlled by an X-linked gene located at Xp22.2. Blood 80, 816-824, 1992.
 13. Craig JE., Rochette J., Fischer CA., e coll. (1996). Dissecting the loci controlling fetal haemoglobin production on chromosomes 11p and 6q by the regressive approach. *Nat Genet.* 12(1),58-64.
 14. Garner CP, Tatu T, Best S, Creary L, Thein SL. Evidence of genetic interaction between the beta-globin complex and

- chromosome 8q in the expression of fetal haemoglobin. Am J Hum Genet. 2002 Mar;70(3):793-9. Epub 2002 Jan 30
15. Game L., Close J., Stephens P., Mitchell J., Best S., Rochette J., Louis-dit-Sully C., Riley J., See C.G., Sanseau P., Kearney L., Bethel G., Humphray S., Dunham I., Mungall A., Thein S.L. An integrated map of human 6q22.3-q24 including a 3-Mb high resolution BAC/PAC contig encompassing a QTL for fetal hemoglobin. *Genomics* 64, 264-276, 2000.
16. Galanello R, Ruggeri R, Paglietti E, Addis M, Melis MA, Cao A. A family with segregating triplicated alpha globin loci and beta thalassemia. *Blood.* 1983 Nov;62(5):1035-40.
17. Baudin-Creuzza V, Vasseur-Godbillon C, Pato C, Prehu C, Wajcman H, Marden MC. Transfer of human alpha- to beta-hemoglobin via its chaperone protein: evidence for a new state. *J Biol Chem.* 2004 Aug 27;279(35):36530-3. Epub 2004 Jun 26.
18. Kihm AJ, Kong Y, Hong W, Russell JE, Rouda S, Adachi K, Simon MC, Blobel GA, Weiss MJ. An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin. *Nature.* 2002 Jun 13;417(6890):758-63.
19. Luzzatto L, Notaro R. Haemoglobin's chaperone. *Nature.* 2002 Jun 13;417(6890):703-5. No abstract available

20. Yu X, Kong Y, Dore LC, Abdulmalik O, Katein AM, Zhou S, Choi JK, Gell D, Mackay JP, Gow AJ, Weiss MJ. An erythroid chaperone that facilitates folding of alpha-globin subunits for hemoglobin synthesis. *J Clin Invest.* 2007 Jul;117(7):1856-65
21. Weiss MJ, Zhou S, Feng L, Gell DA, Mackay JP, Shi Y, Gow AJ. Role of alpha-hemoglobin-stabilizing protein in normal erythropoiesis and beta-thalassemia. *Ann N Y Acad Sci.* 2005;1054:103-17. Review.
22. Gell D, Kong Y, Eaton SA, Weiss MJ, Mackay JP. Biophysical characterization of the alpha-globin binding protein alpha-hemoglobin stabilizing protein. *J Biol Chem.* 2002 Oct 25;277(43):40602-9. Epub 2002 Aug 20.
23. Hamdane D, Vasseur-Godbillon C, Baudin-Creuzat V, Hoa GH, Marden MC. Reversible hexacoordination of alpha-hemoglobin-stabilizing protein (AHSP)/alpha-hemoglobin Versus pressure. Evidence for protection of the alpha-chains by their chaperone. *J Biol Chem.* 2007 Mar 2;282(9):6398-404. Epub 2006 Dec 28.
24. Rouyer-Fessard P., et al. 1989. A study of membrane protein defects and alpha hemoglobin chains of red blood cells in human beta thalassemia. *J. Biol. Chem.* **264**:19092–19098.
25. Schrier S.L., Rachmilewitz E., Mohandas N. 1989. Cellular and membrane properties of alpha and beta thalassemic

- erythrocytes are different: implication for differences in clinical manifestations. *Blood*. **74**:2194–2202.
26. Feng L, Zhou S, Gu L, Gell DA, Mackay JP, Weiss MJ, Gow AJ, Shi Y. Structure of oxidized alpha-haemoglobin bound to AHSP reveals a protective mechanism for haem. *Nature*. 2005 Jun 2;435(7042):697-701.
27. Bank A. AHSP: a novel hemoglobin helper. *J Clin Invest*. 2007 Jul;117(7):1746-9.
28. Gallagher PG, Liem RI, Wong E, Weiss MJ, Bodine DM. GATA-1 and Oct-1 are required for expression of the human alpha-hemoglobin-stabilizing protein gene. *J Biol Chem*. 2005 Nov 25;280(47):39016-23. Epub 2005 Sep 25.
29. Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Chinchang W, Sangkla P, Weiss MJ, Higgs DR. Evaluation of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) as a genetic modifier in patients with beta thalassemia. *Blood*. 2004 May 1;103(9):3296-9. Epub 2004 Jan 8.
30. Cappellini M.D., Refaldi C., Bignamini D., Zanaboni L., Fiorelli G. 2004. Molecular analysis of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) in Caucasian patients with different beta-thalassemia phenotypes [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. **104**:3770.
31. Galanello R., Perseu L., Giagu N., Sole G. 2003. AHSP expression in beta-thalassemia carriers with thalassemia

- intermedia phenotype [abstract]. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. **102**:1881a.
32. Lai M.I., et al. 2006. Alpha-haemoglobin stabilising protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of beta thalassemia. *Br. J. Haematol.* **133**:675–682.
33. dos Santos CO, Duarte AS, Saad ST, Costa FF. Expression of alpha-hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis. *Exp Hematol.* 2004 Feb;32(2):157-62.
34. Kong Y, Zhou S, Kihm AJ, Katein AM, Yu X, Gell DA, Mackay JP, Adachi K, Foster-Brown L, Loudon CS, Gow AJ, Weiss MJ. Loss of alpha-hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates beta-thalassemia. *J Clin Invest.* 2004 Nov;114(10):1457-66.