

BASE MOLECULAR DE UMA β -TALASSÉMIA DE TRANSMISSÃO DOMINANTE

PAULA FAUSTINO, JOSÉ BARBOT, JOÃO GONÇALVES, MARIA JOÃO PERES, JOÃO LAVINHA

Centro de Genética Humana. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA). Lisboa.

Serviço de Hematologia. Hospital de Santo António. Porto.

Laboratório de Hematologia. INSA. Lisboa.

RESUMO

Neste estudo procurou-se esclarecer a base molecular de uma β -talassémia de transmissão dominante, segregando em heterozigotia, numa família do norte de Portugal com talassémia intermédia. Caracterizou-se: i) a estrutura do agrupamento génico da α -globina; ii) o haplotipo de restrição do agrupamento génico da β -globina; e iii) a natureza da mutação β -talassémica. O agrupamento génico da α -globina encontrava-se estruturalmente normal. Detectou-se, nos indivíduos afectados, uma transversão G \rightarrow T no codão 121 do gene da β -globina. Esta mutação segrega em associação com o haplotipo V (seg. Orkin). É uma mutação rara, mas ubíqua, tendo sido detectada em baixa frequência, associada a diversos haplotipos, em diferentes populações. Foi encontrada em Portugal em três gerações desta única família. Propõe-se um mecanismo explicativo da relação genótipo/fenótipo.

SUMMARY

Molecular Basis of a Dominantly Inherited β -Thalassemia

In this study, we sought to clarify the molecular basis of a dominant inherited β -thalassemia, found in heterozygosity in a northern Portuguese family with thalassemia intermedia. We characterized: i) the α -globin gene cluster structure; ii) the β -globin gene cluster haplotype; and iii) the β -thalassemia mutation. The α -globin gene cluster was structurally normal. The G \rightarrow T transversion at codon 121 of the β -globin gene was found in the affected individuals in association with Orkin's haplotype V. This is an uncommon, though ubiquitous, mutation. Which has also been found, in association with different haplotypes, in several distant populations. It has only been observed in this three-generation family, in the Portuguese population. We suggest a mechanism to explain the genotype/phenotype correlation.

A β -talassémia é uma doença genética, em geral com uma hereditariedade autossómica recessiva, caracterizada por uma síntese deficiente (β^+ -talassémia) ou nula (β^0 -talassémia) das cadeias de β -globina constituintes da hemoglobina (Hb), o que resulta num fenótipo clínico de anemia hemolítica mais ou menos grave. A dependência da terapêutica transfusional permite categorizar a β -talassémia em talassémia major (dependente de transfusão) e a talassémia intermédia (em geral não dependente de transfusão). O estado de heterozigotia ou traço

β -talassémico, apesar da grande heterogeneidade molecular que lhe subjaz¹, é, salvo raras excepções, clinicamente assintomático, com um perfil hematológico caracterizado por uma discreta anemia microcítica (VGM<80fl) e hipocrómica (HGM<27pg) conjuntamente com um aumento do nível da Hb A₂ (>3,5%). O nível de Hb fetal (Hb F) encontra-se, também, aumentado (1-5%) em cerca de 50% dos casos². Os portadores típicos do traço β -talassémico estão geneticamente protegidos contra a malária, o que explica a sua elevada

prevalência em regiões onde esta é ou foi endémica, nomeadamente nos países da bacia do Mediterrâneo². Foram descritas algumas formas de talassémia intermédia em indivíduos que herdaram uma única cópia de um gene β -globina mutado e um genótipo normal para o α -globina. Estes casos são clinicamente detectáveis, apresentando anemia moderada, aumento do nível de Hb A₂ e Hb F, icterícia, esplenomegália, desequilíbrio de síntese das cadeias globínicas e presença, em alguns casos, de corpos de inclusão nos precursores eritróides e nos eritrócitos do sangue periférico após esplenectomia³. O principal factor que determina este tipo de fenótipo parece ser o tamanho do péptido resultante da tradução do gene mutado da β -globina, a sua possibilidade de se ligar ao heme, de formar dímeros $\alpha\beta$ e tetramerizar ($\alpha_2\beta_2$) e, ainda, a estabilidade do tetrâmero nos precursores dos glóbulos vermelhos. A base molecular deste tipo de talassémia é heterogénia mas, na maioria dos casos, parece envolver mutações no terceiro exão do gene da β -globina que dão origem a variantes altamente instáveis da cadeia β -globina³. No entanto, já encontramos na população Portuguesa uma família onde a β -talassémia intermédia resulta de um deficiente processamento (*splicing*) do RNA provocado por uma mutação na sequência de consenso entre o exão 2 e o intrão 2 do gene da β -globina⁴.

É importante esclarecer a natureza da lesão molecular que determina cada caso de talassémia intermédia, já que o estabelecimento de uma relação genótipo/fenótipo poderá contribuir para o aconselhamento genético e para a definição da melhor estratégia terapêutica.

Neste estudo pretendeu-se determinar a base molecular de uma talassémia de transmissão dominante, segregando em heterozigotia numa família do norte de Portugal com talassémia intermédia e propõe-se um mecanismo para explicar a relação fisiopatológica entre genótipo e fenótipo.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi efectuado em três gerações de uma família onde se observava segregação de uma talassémia intermédia. A *proposita*, indivíduo do sexo feminino de 30 anos de idade, apresentava desde a infância, valores médios de Hb de 9,1 g/dl, (variações entre 8,4 e 10,0), microcitose, hipocromia e presença de eritroblastos no sangue periférico. Os índices hematimétricos (HGM e VGM) foram calculados num contador automático de células. A separação electroforética das hemoglobinas foi efectuada em acetato de celulose a pH 8,4. Apresentava elevação dos níveis de Hb A₂ (6,4%), quan-

tificada por cromatografia em DEAE-celulose, e de Hb F (4,9%), quantificada pelo método de desnaturação alcalina⁵. Observou-se esplenomegália (3 cm abaixo da linha média costal) e hiperbilirrubinémia com icterícia. Na gravidez declarou-se uma anemia grave que obrigou a transfusão. O metabolismo do ferro era normal, não se observou deficiência de glucose-6-fosfato desidrogenase, de piruvato quinase, nem presença de haptoglobinas e hemoglobinas instáveis. A mãe e o filho da *proposita* apresentavam um fenótipo semelhante. A média dos valores hematológicos dos três membros afectados da família (Fig. 1) era a seguinte: Hb = 9,5 g/dl, MCV = 63 fl; MCH = 20 pg; Hb A₂ = 4,5 %, Hb F = 3,5 %.

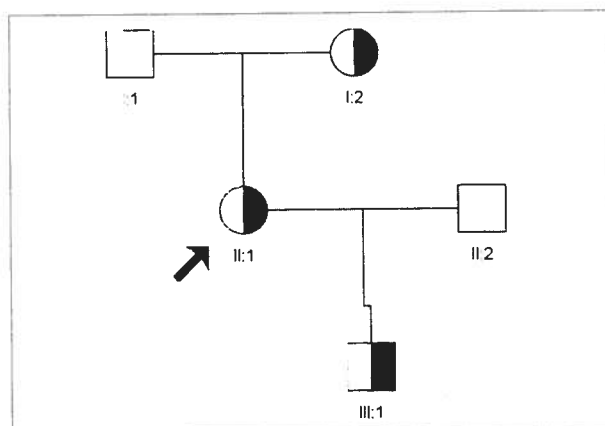


Fig.1 - Árvore genealógica da família em estudo. A *proposita* está indicada com uma seta

Pretendeu-se determinar a base molecular na origem deste fenótipo de talassémia intermédia. O DNA genómico total foi extraído⁶ de uma amostra de sangue periférico da *proposita* e dos familiares representados na Fig. 1. A análise familiar dos polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs), no agrupamento génico da β -globina foi efectuada por *Southern blotting*⁷. Pesquisou-se, no DNA da *proposita*, as 4 mutações β -talassémicas mais frequentes na população portuguesa⁴: codão 39 C \rightarrow T, IVS-I-1 G \rightarrow A, IVS-I-110 G \rightarrow A e IVS-I-6 T \rightarrow C por *dot-blot*⁸, após amplificação enzimática *in vitro* do fragmento de DNA (PCR)⁹ contendo o gene da β -globina. Foram pesquisadas, também, mais três mutações β -talassémicas frequentes nas populações mediterrânicas: codão 6(-A), IVS-II-745 C \rightarrow G e IVS-II-1 G \rightarrow A, por análise de restrição após amplificação enzimática do DNA. Perante os resultados negativos obtidos na pesquisa das mutações β -talassémicas mais comuns nas populações mediterrânicas, efectuou-se a sequencição directa, pelo método de Sanger, dos genes da β -globina no DNA amplificado em cadeia dupla¹⁰.

O agrupamento génico da α -globina foi cartografado

por *Southern blotting*, usando as enzimas de restrição *Bgl*II e *Bam*HI e as sondas genómicas específicas para os genes ζ e α -globina. Tanto as sondas genómicas como as sondas de oligonucleótidos sintéticos foram marcadas radioactivamente com ^{32}P ^{11,12}.

RESULTADOS

Pretendeu-se com este estudo determinar a base molecular na origem deste fenótipo de talassémia intermédia. A análise dos polimorfismos de tamanho de fragmentos de restrição (RFLPs) no agrupamento génico da β -globina, determinados nos diferentes membros da família (Fig. 1) revelou haver uma transmissão da lesão molecular associada ao haplotipo V segundo Orkin¹³. Não foi detectada na *proposita* nenhuma das mutações β -talassémicas mais frequentes nas populações mediterrânicas. A sequenciação directa do fragmento de DNA da *proposita* correspondente aos genes da β -globina permitiu detectar uma mutação pontual G \rightarrow T no codão 121 (3º exão) de um dos genes da β -globina, transformando um codão codificante para ácido glutâmico num codão de terminação (GAA \rightarrow TAA) (Fig. 2). Esta mutação anula

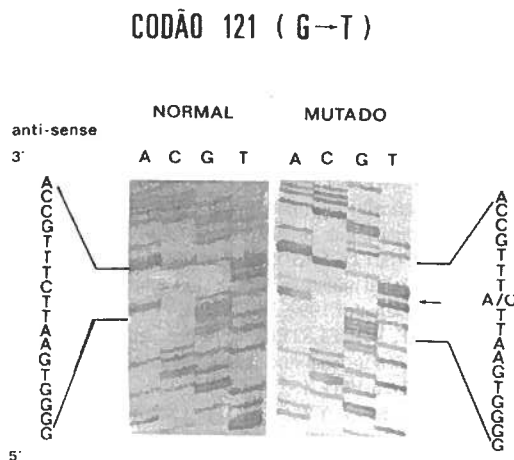


Fig. 2 - Autorradiografia de parte da sequenciação directa (cadeia anti-sense) do DNA amplificado em cadeia dupla, dos genes da β -globina da *proposita*, que permitiu a identificação da mutação β -talassémica G \rightarrow T no cordão 121. A seta indica a posição da mutação.

um sítio de restrição da endonuclease *Eco*RI o que permitiu confirmar a existência da mutação no DNA da mãe e filho da *proposita*, por digestão com a referida endonuclease de restrição, após amplificação enzimática *in vitro* de um fragmento de DNA contendo o terceiro exão do gene da β -globina (Fig 3a). A separação electroforética, em gel de agarose, dos fragmentos de DNA anteriormente obtidos permitiu observar, nos elementos afectados da família, a presença de um fragmento diagnóstico de 486 pb para além dos normais 271 e 215 pb (Fig. 3b).

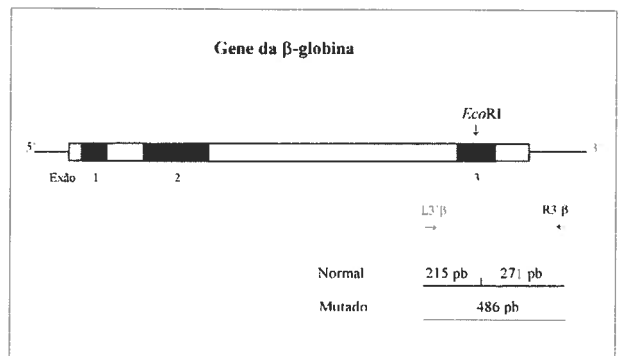


Fig. 3a - Esquema do gene da β -globina mostrando o fragmento do gene amplificado enzimaticamente *in vitro* usando os iniciadores L3' β e R3' β e, ainda, os fragmentos obtidos pela digestão deste fragmento com a endonuclease *Eco*RI na presença e na ausência da mutação.

O agrupamento génico da α -globina encontra-se estruturalmente normal em todos os membros da família representados na Fig. 1.

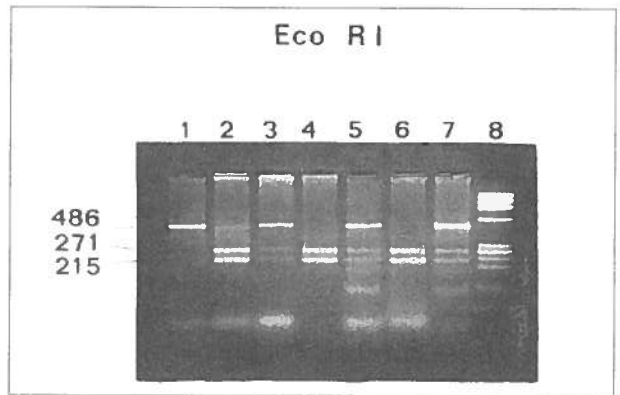


Fig. 3b - Separação electroforética, em gel de 4% de agarose corado com brometo de etídeo, dos produtos resultantes da digestão com a endonuclease de restrição *Eco*RI, de fragmentos de DNA amplificados enzimaticamente (486 pares de bases, pb) dos diferentes membros da família. Canais: 1 - fragmento não digerido, 2 - controlo normal, 3 - I: 1, 4 - I: 2, 5 - II: 1, 6 - II: 2, 7 - III: 1, 8 - marcador de peso molecular: plasmídeo pBR322 digerido com as endonucleases de restrição *Bgl*I e *Hin*fl.

DISCUSSÃO

A mutação CD121 G \rightarrow T no gene da β -globina, responsável por um fenótipo de β -talassémia do tipo dominante, é rara e ubiqüitária, tendo sido encontrada, até agora, num número reduzido de famílias, em associação com diferentes haplotipos, em diversas populações: polaca, suíça-francesa, japonesa e britânica¹. Em Portugal foi apenas detectada, segregando em heterozigotia, nesta família⁴. Ao contrário da β -talassémia típica, a qual é prevalente em regiões onde a malária é, ou foi, endémica, as β -talassémias do tipo dominante são raras, ocorrendo em diversas regiões geográficas incluindo o norte e o leste da Europa, o Japão e a Coreia. Em todas estas regiões a frequência génica para β -talassémia é muito baixa³. Postula-se que a baixa frequência das

mutações β -talassémicas dominantes em populações onde coexistiu com a malária é devida à falta de um factor de selecção positiva, ao contrário das formas recessivas que aí alcançaram elevadas frequências génicas.

A grande maioria das mutações β -talassémicas que dão origem a um codão de terminação, ou a uma adição/delecção com desfaseamento da grelha de leitura e uma paragem da tradução a montante do codão 72 traduzem-se por uma β -talassémia clássica, de transmissão recessiva, onde a forma heterozigótica é praticamente assintomática, não sendo detectável a cadeia da β -globina anómala. Pelo contrário, se a alteração genética ocorreu a jusante daquele codão, por exemplo no terceiro exão, resulta na síntese de uma cadeia de β -globina truncada. No caso aqui apresentado, a cadeia truncada da β -globina resultante da tradução do gene portador da mutação de terminação G→T no codão 121 terá 120 resíduos de aminoácidos, ao invés dos normais 146. No entanto, a proteína resultante mantém a capacidade de ligar o heme visto conter os principais resíduos de aminoácidos envolvidos no contacto com este (His 63, Val 67, His 92, Asn 102, Phe 103)¹⁴. As cadeias truncadas contendo o heme possuem uma estrutura secundária que lhes confere uma certa resistência à degradação proteolítica. Faltam-lhes, no entanto, os últimos 26 resíduos de aminoácidos da cadeia da β -globina (hélice H). A perda da hélice H desprotege a face hidrófoba da hélice G e partes hidrófobas das hélices E e F, habitualmente protegidas do contacto com o meio aquoso. Ficam, assim, susceptíveis a agregação e/ou precipitação sem que possam formar o normal tetrâmero e sem que possam ser totalmente eliminadas pela proteólise intracelular por saturação da respectiva *maquinaria* bioquímica. Estas variantes, altamente instáveis, podem formar agregados e precipitar intracelularmente com o concomitante excesso de cadeias α -globina livres. Estas inclusões são responsáveis por uma certa destruição intramedular dos precursores eritróides e consequentemente pelo marcado grau de deseritropoiese observado em doentes portadores desta mutação. Estão, também, na origem de um processo hemolítico devido à destruição dos glóbulos vermelhos maduros circulantes que contêm estas

inclusões e no desencadear de um processo fisiopatológico característico da talassémia intermédia. A confirmação da ocorrência *in vivo* deste mecanismo de patogénese abrirá caminho à concepção de intervenções terapêuticas mais adequadas.

AGRADECIMENTOS

PF beneficiou de uma bolsa de doutoramento da JNICT. Este estudo foi parcialmente financiado pelo contrato de investigação JNICT - C/SAU/87128.

BIBLIOGRAFIA

1. BAYSAL E, CARVER MFH: The β - and δ -thalassaemia repository (eighth edition). Hemoglobin 1995, 19: 213-5.
2. WEATHERALL DJ, CLEGG JB: β -Thalassaemia, chapter 6. In: The Thalassaemia Syndromes, 3rd edn., Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1981, 148-319.
3. THEIN SL: β -Thalassaemia. In: Higgs DR, Weatherall DJ, eds. The Haemoglobinopathies. London: Baillière Tindall, 1993: 151-75.
4. FAUSTINO P, OSÓRIO-ALMEIDA ML, BARBOT J et al: Novel promoter and splice junction defects add to the genetic, clinical or geographic heterogeneity of β -thalassaemia in the Portuguese population. Hum Genet 1992, 89: 573-76.
5. BETKE K, MARTI HR, SCHLICHT I: Estimation of small percentages of foetal haemoglobin. Nature 1959, 184: 1877-8.
6. MILLER SA, DYKES DD, POLESKY HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 1988, 16: 1215.
7. SOUTHERN EM: Detection of specific fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975, 98: 503-17.
8. KAFATOS FC, WELDON J, EFSTRATIADIS A: Determination of nucleic acid sequence homologies and relative concentrations by a dot hybridization procedure. Nucleic Acids Res 1979, 7: 1541-52.
9. SAIKI RK, BUGAWOM TL, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA: Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α -DNA with allele-specific oligonucleotide probes. Nature 1986, 324: 163-66.
10. DODÉ C, ROCHETTE J, KRISHNAMOORTHY R: Locus assignment of human α globin mutations by selective amplification and direct sequencing. Br J Haematol 1990, 76: 275-81.
11. FEINBERG AP, VOGELSTEIN B: A new technique for radiolabelling DNA restriction endonucleases fragments to high specific activity. Anal Biochem 1983, 132: 6-13.
12. PIRASTU M, KAN YW, CAO A, CONNER BJ, TEPLITZ RL, WALLACE RB: Prenatal diagnosis of β thalassaemia. Detection of a single nucleotide mutation in DNA. N Engl J Med 1983, 309: 284-7.
13. ORKIN SH, KAZAZIAN HH JR, ANTONARAKIS SE et al: Linkage of β thalassaemia mutations and β globin gene polymorphisms in the human β globin gene cluster. Nature 1982, 296: 627-31.
14. HUISMAN THJ: The structure and function of normal and abnormal haemoglobins. In: Higgs DR, Weatherall DJ, eds. The Haemoglobinopathies, London: Baillière Tindall, 1993: 9-30.