

CA

CAMILA ORESCO DOS SANTOS

Este exemplar corresponde à versão final da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento do (a) aluno (a) **CAMILA ORESCO DOS SANTOS**.

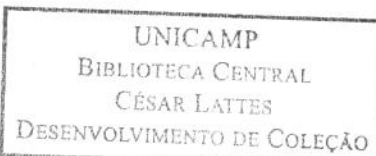
Campinas, 27 de outubro de 2006.


Prof (a). Dr (a). Fernando Ferreira Costa
Orientador (a)

**Fatores genéticos moduladores da gravidade clínica
nas β -talassemias: o exemplo da proteína AHSP
(Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein)**

CAMPINAS

2006



CAMILA ORESCO DOS SANTOS

**Fatores genéticos moduladores da gravidade clínica
nas β -talassemias: o exemplo da proteína AHSP
(Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein)**

*Tese de Doutorado apresentada à Pós-graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de Doutor em
Fisiopatologia Médica, área de concentração em Biologia
Estrutural, Celular e do Desenvolvimento.*

ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO FERREIRA COSTA

CAMPINAS

2006

UNIDADE BC
Nº CHAMADA F/UNICAMP
Sa 59f
V EX
TOMBO BC/ 71225
PROC. 16.145.07
C D x
PREÇO 11,00
DATA 23/01/07
BIB-ID 374189

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Sa59f Santos, Camila Oresco dos
Fatores genéticos moduladores da gravidade clínica nas β -
talassemias : o exemplo da proteína AHSP (Alpha Hemoglobin
Stabilizing Protein) / Camila Oresco dos Santos . Campinas, SP :
[s.n.], 2006.

Orientador : Fernando Ferreira Costa
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Talassemia. 2. Hemoglobina. 3. Expressão gênica. 4.
Polimorfismo. 5. Proteína. 6. Estabilidade de RNA. I. Costa,
Fernando Ferreira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.



Banca examinadora de Tese de Doutorado

Orientador (a): Prof (a). Dr (a). Fernando Ferreira Costa

Membros:

1. Prof. (a) Dra. Maria Stella Figueiredo

2. Prof. (a) Dra. Sandra Fátima Menossi Gualandro

3. Prof. (a) Dra. Sara Teresinha Ollala Saad

4. Prof (a) Dra. Maria de Fátima Sonati

5. Prof Dr. Fernando Ferreira Costa

Curso de Pós-graduação em Fisiopatologia Médica, área de concentração Biologia Estrutural, Celular e do Desenvolvimento da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27.10.2006

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

DEDICATÓRIA

À minha família, base indispensável da minha vida, por terem me ensinado a ser forte e perseverante. Dói não ter vocês por perto todos os dias. Meu amor e minha gratidão por vocês são indiscreíveis, eternos e infinitos.

À Larissa, a luz da minha vida.

To Chris, my love will be yours forever.

Aos meus amigos verdadeiros, pelo apoio.

E à Deus.....porque eu tudo posso Naquele que me fortalece!

Ao Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa que sempre confiou e suportou meu trabalho mesmo quando distante, obrigada pela oportunidade e pelos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Mitchell J. Weiss, que me recebeu em seu laboratório com muito respeito e paciência, obrigado pelo incentivo, liberdade e ensinamentos.

À Carolina Lanaro, Camila Almeida e Barbára, pela amizade verdadeira que o tempo não apagará;

A Sheley.....sem comentários!!!!

Ao Marcos Andre, Flávia Pinho e Anderson Cunha pela colaboração.....

A Dulcinéia...que verdadeiramente deu o sangue!

Aos integrantes do Hemocentro da Unicamp...dói pensar em deixá-los!

Aos integrantes do Children's Hospital of Philadelphia.....o desafio só começou!

A FAPESP e CAPES pelo auxílio financeiro

*"Há, verdadeiramente, duas coisas diferentes:
saber e crer que se sabe. A ciência consiste
em saber; em crer que se sabe está a
ignorância"*

(Hipócrates)

	PÁG.
RESUMO.....	xxx
ABSTRACT.....	xxxiv
INTRODUÇÃO.....	38
1 - Justificativa Geral.....	40
2 - A linhagem eritróide e hemoglobinas.....	41
3 - As β -talassemias.....	43
4 - AHSP.....	47
OBJETIVOS.....	57
MATERIAIS E MÉTODOS.....	61
1 - Casuística	63
2 - Análise de DNA genômico.....	63
3 - Superexpressão de proteínas e purificação.....	64
4 - Análise da afinidade da proteína AHSP N75I com α -Hb.....	65
5 - Produção de espécies reativas de oxigênio pela proteína N75I.....	66
6 - Análise de Corpos de Heinz.....	66
7 - Análise de ligação RNA-proteína pela técnica de Gel Shift.....	67
8 - Construção de plasmídeos AHSP-IRE-WT e AHSP-IRE-MT.....	68
9 - Análise de ligação de proteínas pela técnica de RNA IP.....	68
10 - Quantificação da estabilidade de mRNA.....	70
11 - Indução de camundongos ao excesso de Ferro.....	71
12 - Tratamento de células da linhagem G1E-ER4 com ferro(III).....	71

13 - Análise de ligação de proteínas pela técnica de ChIP.....	72
14 - Extração de RNA nuclear.....	72
15 - Northern-blot.....	73
16 - PCR em tempo real.....	73
RESULTADOS.....	75
1 - Análise do polimorfismo N75I no gene AHSP.....	77
2 - Presença de estrutura secundária na posição 3'-UTR do gene AHSP pode estar relacionada à estabilidade do mRNA dependente da concentração de ferro.....	85
3 - Regulação da transcrição do gene AHSP pelos fatores de transcrição Bach1/Nrf2 em resposta à presença/produção de Heme.....	104
DISCUSSÃO.....	109
CONCLUSÕES.....	120
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	124
APÊNDICES.....	134
1 - AHSP and β -thalassemia: A possible genetic modifier.....	136
2 - The Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein Mutation N75I Impairs Protein Function and is Associated with Increased Severity of β Thalassemia.....	141
3 - Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein mRNA Stability is Regulated by an Iron Response Element.....	164

Epo	-	Eritropoetina
GATA-1	-	Fator de transcrição GATA-1
EKLF	-	Fator de transcrição Erythroid Kruppel-Like Factor
NF-E2	-	Fator de transcrição Nuclear Factor Erythroid 2
Fe⁺²	-	Ferro
pO₂	-	Pressão de oxigênio
CO₂	-	Gás carbônico
O₂	-	Oxigênio
HbA₂	-	Hemoglobina adulta tipo 2
HbF	-	Hemoglobina fetal
TSE	-	Encefalopatias espongiformes transmissíveis
SNC	-	Sistema nervoso central
EDRF	-	Erythroid differentiation related factor
AHSP	-	Alpha-haemoglobin stabilizing protein
Oct1	-	Fator de transcrição Oct1
SNPs	-	polimorfismo
SNPdb	-	banco de dados de polimorfismos
N75I	-	Troca de Asparagina número 75 por Isoleucina na proteína AHSP
α-globina-Fe(II)	-	alfa globina na forma reduzida
α-globina-Fe(III)	-	alfa globina na forma oxidada
IRE	-	Elemento responsivo a ferro

c-Jun	-	Fator de transcrição c-Jun
Jun-B	-	Fator de transcrição Jun-B
Jun-D	-	Fator de transcrição Jun-D
c-Fos	-	Fator de transcrição c-Fos
Fra1	-	Fator de transcrição Fra1
Nrf1	-	Fator de transcrição Nrf1
Nrf2	-	Fator de transcrição Nrf2
YABP	-	Fator de transcrição YABP
ARE_BP1	-	Fator de transcrição ARE_BP1
Bach1	-	Fator de transcrição Bach1
MARE	-	Sítio de reconhecimento de fatores de transcrição
Maf	-	Proteínas que heterodimerizam com outros fatores de transcrição
ChIP	-	Imunoprecipitação de cromatina
MEL	-	Células eritroleucêmicas de camundongo
K562	-	Células eritroleucêmicas de humano
NG	-	Amostras de DNA de indivíduos da Papua Nova Guinea
M	-	Amostras de DNA de indivíduos Mediterraneos
AI	-	Amostras de DNA de indivíduos da Oceania
PO	-	Amostras de DNA de indivíduos de Port Orly
AC	-	Amostras de DNA de indivíduos Afro-caribenhos
BR^{CTRL}	-	Amostras de DNA de indivíduos brasileiros
BR^{TAL}	-	Amostras de DNA de pacientes brasileiros com β -talassemia

GST	-	Proteína Glutathiona S-transferase
H₂O₂	-	Peróxido de hidrogênio
IMDM	-	Iscove's Modified Dulbecc'os Medium
COS-7	-	Linhagem celular de Macaco
$\Delta\Delta\text{CT}$	-	ΔCT da amostra a ser quantificada menos ΔCT da amostra referência
MCV	-	Volume corpuscular médio
MCH	-	Hemoglobina corpuscular média
Ret	-	Reticulócitos
IRP	-	Proteínas reconhecedoras de IRE
DFO	-	Desferal
Act-D	-	Actinomicina - D
TfR	-	Receptor de transferrina
SA	-	Reagente Succinil acetone (bloqueador da síntese de heme)
$-\Delta\Delta\text{CT}$	-	Fórmula aritmética para quantificação em PCR em tempo real
TM	-	Temperatura de <i>melting</i>
BFU-E	-	Unidade formadora de <i>burst</i> eritróide
CFU-E	-	Unidade formadora de colônia eritróide
RNA	-	Ácido ribonucléico
cDNA	-	DNA complementar
mRNA	-	RNA mensageiro
EDTA	-	Ácido etilenodiaminotetracético
NH₄Cl	-	Cloreto de amônio

NH₄HCO₃	-	Bicarbonato de amônio
KCl	-	Cloreto de potássio
CHCL₃	-	Clorofórmio
DEPC	-	Dietilpirocarbonato
Mg⁺⁺	-	Magnésio
RBC	-	Hemácia
NaOH	-	Hidróxido de sódio

LISTA DE TABELAS

	<i>PAG.</i>
Tabela 1- Lista geral de polimorfismos descritos no gene AHSP	51
Tabela 2- Dados hematológicos de pacientes talassêmicos positivos para o polimorfismo N75I no gene AHSP	78
Tabela 3- Análise dos haplótipos do gene AHSP em diferentes etnias	79

	PÁG.
Figura 1- Esquema sobre a fisiopatologia de β -talassemias	44
Figura 2- Descrição gráfica do gene AHSP	46
Figura 3- Mecanismo de ligação da proteína AHSP	49
Figura 4- Análise de corpos de inclusão em células normais e positivas para o polimorfismo N75I no gene AHSP	81
Figura 5- Estudos utilizando proteína recombinante AHSP_N75I	83
Figura 6- <i>Stem-loop</i> na porção 3'-UTR do RNA mensageiro do gene AHSP sugere presença de elemento responsivo a ferro	86
Figura 7- Ligação específica de proteína presente em extrato protéico de células da linhagem K562 ao elemento responsivo a ferro presente em AHSP	87
Figura 8- Tratamento de células da linhagem celular K562 com heme como fonte de ferro reduz a ligação entre IRPs e IRE	89
Figura 9- Proteínas IRP1 e IRP2 reconhecem o IRE localizado na extremidade 3'-UTR do RNA mensageiro do gene AHSP	91
Figura 10- Efeito da presença de ferro na estabilidade do RNA mensageiro do gene AHSP	92
Figura 11- Estabilidade diferencial entre os RNAs mensageiros AHSP-IRE ^{WT} e AHSP-IRE ^{MT}	94
Figura 12 – Análise da deposição de ferro em cortes histológicos de camundongos com excesso de ferro	95

Figura 13 - Níveis de expressão gênica em precursores eritróides de camundongos controles e com excesso de ferro	97
Figura 14 – Análise morfológica da diferenciação celular linhagem celular G1E-ER4 tratadas, ou não, com citrato de ferro(III)	99
Figura 15 – Análise da expressão do gene AHSP em células G1E-ER4 tratadas e não tratadas com Citrato de Ferro	100
Figura 16- Análise da expressão do gene AHSP em extrato citoplasmático de células G1E-ER4 tratadas e não tratadas com citrato de ferro	101
Figura 17 – Análise da expressão do gene AHSP em extrato nuclear de células induzidas à diferenciação eritróide	102
Figura 18 - Ligação da proteína Maf no final do segundo éxon do gene AHSP sugere presença de elemento MARE	105
Figura 19 - Análise da ligação dos fatores de transcrição Bach1 e Nrf2 no elemento MARE do gene AHSP	107



RESUMO

AHSP é uma proteína eritróide específica que apresenta afinidade de ligação com α -globinas, estabilizando essas moléculas e dessa forma, evitando a precipitação nos precursores eritróides e bloqueando danos celulares causados pela oxidação de cadeias globínicas. Camundongos portadores de β -talassemia com deleção do gene AHSP apresentaram maior precipitação de cadeias α -globinas nas hemácias e níveis acentuados de anemia. Estudos *in vitro* utilizando proteína recombinante demonstraram menor geração de espécies reativas de oxigênio quando α -globinas encontram-se estabilizadas pela AHSP.

Com o objetivo de analisar a importância da proteína AHSP como modulador de gravidade clínica nas síndromes β -talassêmicas o gene AHSP foi analisado em amostras de DNA de pacientes com β -talassemia, atendidos pelo Hemocentro da Unicamp, e em amostras controles durante minha tese de mestrado. Durante estes estudos, três características do gene AHSP foram detectadas. Estas características do gene AHSP foram investigadas durante o desenvolvimento deste presente trabalho.

Primeiro, um polimorfismo localizado na posição 12888 no gene AHSP, que leva a substituição de uma Asparagina na posição 75 por uma Isoleucina (N75I), foi identificado em uma paciente heterozigota para β -talassemia (β^{39}/β^A) com anemia grave e em processos transfusionais frequentes. Outras duas famílias apresentaram o polimorfismo N75I. Entretanto, nestes casos a presença do polimorfismo no gene AHSP não se correlaciona claramente com a gravidade clínica. O sequenciamento de amostras de indivíduos controles de várias partes do mundo sugerirão uma baixa frequência deste polimorfismo na população analisada.

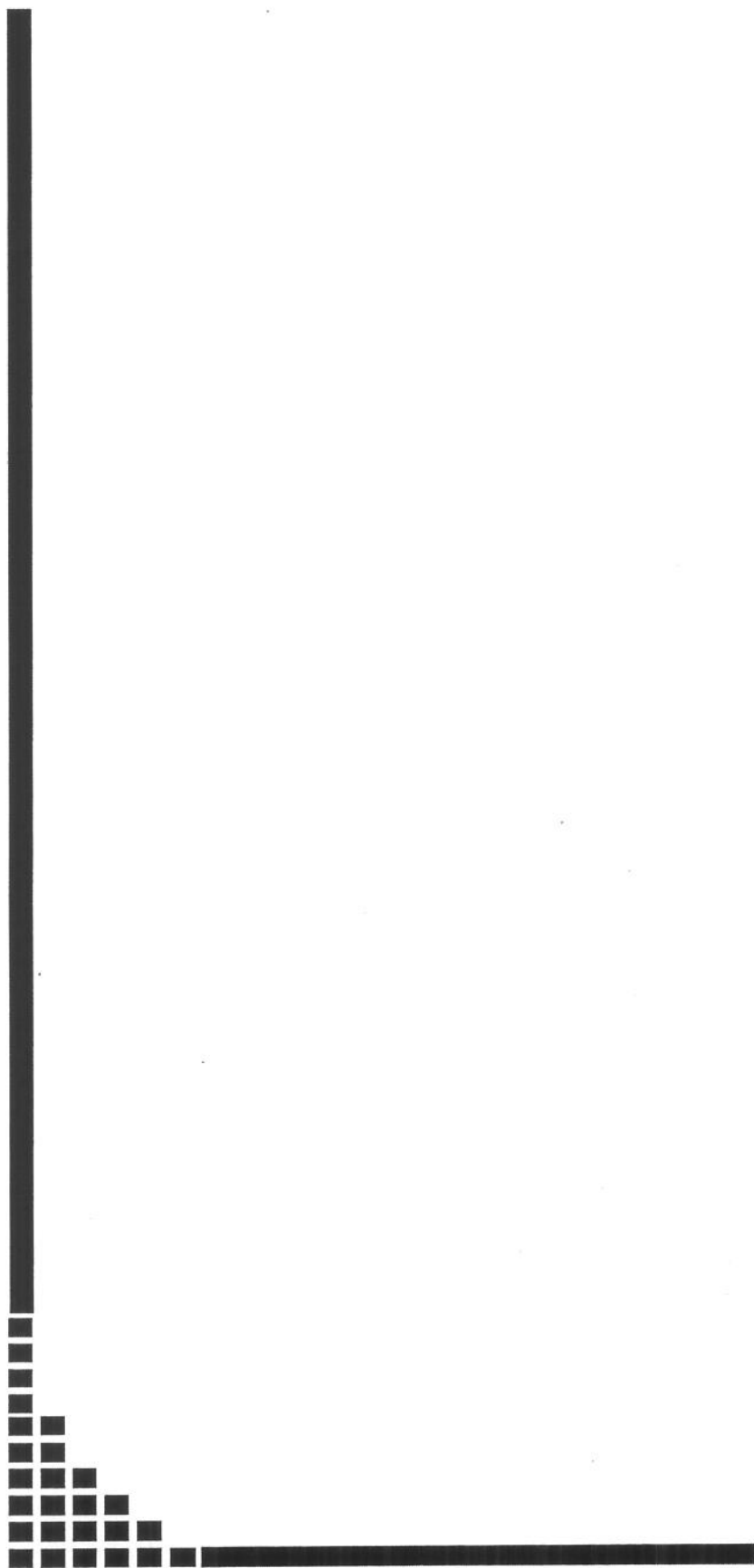
Estudos de indivíduos saudáveis positivos para o polimorfismo N75I demonstraram precipitação e oxidação de cadeias globínicas nas hemácias. Análises funcionais com proteína recombinante sugerem que a proteína AHSP N75I apresenta características de ligação com α -globinas normais, mas é menos eficiente em evitar geração de espécies reativas de oxigênio por estas cadeias globínicas. Estes efeitos, quando em conjunto com β -talassemia poderiam resultar em anemia mais grave, demonstrando a proteína AHSP N75I como um modificador genético nas síndromes talassêmicas.

Segundo, através de análises computacionais, nós identificamos uma estrutura secundária na região 3'-UTR do RNA mensageiro do gene AHSP, semelhante a um elemento responsivo a ferro (IRE), presente em todas as espécies que apresentam o gene AHSP. Várias evidências demonstraram que, mesmo não apresentando as características principais para a caracterização de um IRE, esta estrutura secundária do gene AHSP é reconhecido pelas proteínas reconhecedoras de IREs (IRPs) regulando a estabilidade da molécula de RNA mensageiro em resposta aos níveis de ferro: 1) Recuperação do RNA mensageiro do gene AHSP através da imunoprecipitação das proteínas IRP1 e IRP2; 2) Níveis elevados de ferro desestabilizam o RNA mensageiro do gene AHSP; mutações neste IRE levam à desestabilização constitutiva do RNA mensageiro; 3) Níveis elevados de ferro desestabilizam o RNA mensageiro do gene AHSP em camundongos que apresentam excesso de ferro.

Estes dados contribuem para o melhor entendimento de como IRE atípicos podem ainda ser funcionais e sugerem um mecanismo que poderia regular a estabilidade de cadeias globínicas de acordo com os níveis de ferro. Além disso, sugerem que o excesso de ferro, que ocorre em pacientes com β -talassemia, podem ser determinante na gravidade da doença por, provavelmente, aumentar os níveis de α -globinas livres e precipitando nos precursores eritróides.

E, em terceiro, através de busca de sítios de ligação de fatores de transcrição no gene AHSP, nós encontramos um elemento MARE localizado no final do segundo éxon. Estudos de imunoprecipitação de cromatina demonstraram ligação dos fatores de transcrição Nrf2, Bach1 e Maf ao elemento MARE do gene AHSP e regiões controle.

Concluindo, estes resultados demonstraram pela primeira vez um polimorfismo no gene AHSP que produz uma proteína não completamente funcional que pode estar relacionada com gravidade à β -talassemia e, além disso, descrevem dois mecanismos inéditos da regulação da expressão do gene AHSP que podem ser importantes na regulação deste gene em outras doenças hematológicas e durante a eritropoiese.



ABSTRACT

Alpha-hemoglobin stabilizing protein (AHSP) is an erythroid-specific molecular chaperone that binds the α -chains of hemoglobin, preventing their precipitation and deleterious effects. Loss of AHSP exacerbates α -globin precipitation and anemia in a murine model for β -thalassemia. In vitro, recombinant AHSP inhibits the production of reactive oxygen species (ROS) by α -globin. To further define the role of AHSP as a modifier of β -thalassemia, we analyzed AHSP sequence for mutations in a large population of β -thalassemic and control subjects. From this genomic screening three interesting features of the AHSP gene were found.

First, a single nucleotide change that converts asparagine 75 to leucine (N75I) was identified in a patient who was heterozygous for β -thalassemia (β^{39}/β^A). She presented with an unusually severe anemia that required regular blood transfusion. Another two families were positive detected for the SNP N75I, but the presence of other known genetic modifiers for thalassemia in these families made hard to correlate clinical severity with AHSP. Of the unrelated control subjects tested just one (0.35%) contained the SNP N75I. Analysis of red blood cells from this subject revealed normal hemoglobin indices but a small number of Heinz bodies, suggesting a non-fully functional AHSP.

Analysis of the biochemical properties of the recombinant mutant protein showed that the binding affinity of AHSP N75I for α -hemoglobin is normal. Importantly, compared to wild type AHSP, the N75I mutant protein exhibited significantly reduced capacity to inhibit ROS production by α -hemoglobin. Hence, AHSP N75I may be less effective at conferring protection from oxidative-mediated damage by free α -hemoglobin in erythrocytes. These effects, when coupled with β -thalassemia, could result in more severe anemia, implicating AHSP N75I as a potential genetic modifier.

Second, by computational algorithms, we identified IRE-like stem-loop structures in AHSP mRNA of multiple species, yet the primary sequences deviate significantly from canonical IRE consensus sequences determined by studies of classical IREs, such as Transferring receptor and Ferritin.

Several lines of evidence now show that the AHSP IRE binds IRPs to regulate mRNA stability in an iron-dependent fashion: 1) AHSP mRNA co-immunoprecipitates with IRPs. 2) AHSP mRNA is destabilized by iron in both erythroid and heterologous cells; disruption of the IRE renders the mRNA constitutively unstable. To study how iron regulates AHSP expression *in vivo*, we treated mice with iron dextran for 10 days and then examined AHSP mRNA in Ter119⁺ erythroid progenitors by RT-PCR. We found that short-term iron overload reduced AHSP mRNA levels. Our findings indicate that AHSP mRNA stability is regulated by iron via an atypical 3'-UTR IRE.

These findings extend the potential repertoire for functional IREs that do not conform as the previously defined canonical consensus sequences. In addition, they provide a potential mechanism by which erythroid cells can regulate globin stability according to iron status. As such, iron overload, which occurs in patients with β thalassemia, might aggravate the disease by further elevating the levels of toxic free α globin.

And third, by computation analysis of transcriptional sites, we found a potential MARE element located at the end of the second exon. Experiments of chromatin immunoprecipitation assay determined the binding of the transcript factor Nrf2, Bach1 and Maf to the MARE element of AHSP gene, as well to the positive controls.

Overall, these results demonstrated for the first time a polymorphism on AHSP gene that produce a non fully functional protein that might be correlated with severity in β -thalassemia and two new mechanisms that control the AHSP gene expression with potential implications in another hematological diseases besides thalassemias and closely connecting AHSP with erythropoiesis.



INTRODUÇÃO

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CESAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

1. Justificativa

Os defeitos na síntese das cadeias globínicas são responsáveis pelas hemoglobinopatias hereditárias de maior impacto clínico. Essas doenças afetam milhares de pacientes no mundo e representam um importante problema de saúde pública em algumas regiões onde as frequências de genes talassêmicos alcançam altos índices. As formas clínicas mais comuns das hemoglobinopatias de cadeias β são a anemia falciforme e as β -talassemias (1).

Atualmente, o único tratamento curativo das hemoglobinopatias das cadeias β -globinas é o transplante de células troncos hematopoiéticas. No entanto, esse procedimento é restrito a um pequeno número de pacientes, seja pela limitação de doadores HLA compatíveis ou pela morbidade/mortalidade associada ao procedimento, principalmente entre pacientes adultos com complicações hepáticas e/ou cardíacas (2).

O reconhecimento dos efeitos benéficos da persistência de expressão da hemoglobina fetal como modulador da hemoglobina adulta motivou a pesquisa de drogas que pudessem aumentar a hemoglobina fetal tais como hidroxiuréia ou eritropoetina. Estudos clínicos demonstraram a eficiência da hidroxiuréia em prevenir ou melhorar as complicações clínicas da doença falciforme (3). No entanto, o uso dessas drogas resultaram em efeito mínimo em um pequeno número de pacientes com β -talassemia.

Dessa forma, a identificação de fatores endógenos ou exógenos moduladores das sínteses das globinas é fundamental para reconhecer novos alvos terapêuticos para as hemoglobinopatias. O presente estudo é baseado na investigação do papel da proteína *chaperone* de cadeias α -globinas, a proteína AHSP (Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein) na fisiopatologia e na modulação fenotípica das β -talassemias.

2. A linhagem eritróide e hemoglobinas

A diferenciação eritróide, que apresenta como produto final a hemácia, ocorre em estágios bem definidos, que podem ser acompanhados de acordo com as características morfológicas e de coloração das células com, por exemplo, a coloração de Wright-Giemsa.

O primeiro precursor da linhagem eritróide identificável é denominado pró-eritroblasto, composto de núcleo grande e ovalado com nucléolo indistinguível e citoplasma claro. A maturação do pró-eritroblasto em eritroblasto basofílico é acompanhada de redução no tamanho celular e mudanças na estrutura cromatínica nuclear. O próximo estágio celular, eritroblasto policromatófilo, apresenta aproximadamente o mesmo tamanho celular e condensação nuclear. O último precursor nucleado é denominado eritroblasto ortocromático, apresentando menor tamanho celular e citoplasma eosinofílico, que permite a identificação do acúmulo de hemoglobina (1).

A extrusão do núcleo pela célula resulta no estágio celular denominado reticulócito, célula um pouco maior que a hemácia que apresenta uma fina e granular rede de RNA ribossomal, identificada através de coloração com azul de cresil ou azul de metileno. Estas células estão presentes, normalmente, em pequenas quantidades no sangue periférico (1).

A regulação da proliferação e maturação dos progenitores eritróides depende da interação com fatores de crescimento, sendo a eritropoetina (Epo) essencial para a maturação terminal das células eritróides (4,5), e da ativação da expressão de genes tecido específicos por fatores de transcrição como GATA-1, EKFL e NF-E2 (6,7,8). A regulação da diferenciação eritróide através de fatores de transcrição garante, principalmente, a indução da expressão dos genes codificadores das cadeias globínicas.

Os genes das globinas encontram-se arrançados em dois grupamentos gênicos: o grupamento dos genes α -globina, localizado no cromossomo 16, e o grupamento dos genes β -globina, localizado no cromossomo 11. O grupamento α -globina consiste de quatro genes ($5' - \zeta - \alpha^1 - \alpha^2 - \theta - 3'$) e o grupamento β -globina apresenta-se como um complexo de cinco genes ($5' - \epsilon - \gamma^G - \gamma^A - \psi\beta - \delta - \beta - 3'$).

O arranjo dos genes nos clusters obedece à ordem de expressão cronológica destes durante os diferentes estágios de desenvolvimento. Duas mudanças na expressão dos genes das globinas são observadas durante o desenvolvimento: hemoglobina embrionária por hemoglobina fetal, a qual ocorre nas primeiras semanas de gestação e caracteriza-se pela substituição de cadeias ζ -globina e ϵ -globina por cadeias α -globina e γ -globina; e hemoglobina fetal por hemoglobina adulta, que ocorre após o nascimento e substitui cadeias γ -globina por β -globina no final do sexto mês de vida (9).

O termo hemoglobina foi descrito pela primeira vez em 1674 como sendo um pigmento em eritrócitos que apresenta a propriedade de se ligar à molécula de oxigênio. A molécula de hemoglobina é constituída de 4 subunidades, cada uma contendo um grupo heme, um derivado porfirínico contendo radical Fe^{+2} ligado a uma cadeia globínica (10). Nos pulmões onde a pressão de oxigênio (pO_2) é alta, cada molécula de hemoglobina se combina com 4 moléculas de O_2 , sendo uma molécula O_2 para cada grupo heme, formando a oxi-hemoglobina. Esta combinação é reversível e o O_2 transportado é transferido para os tecidos onde a pO_2 é baixa. A combinação da hemoglobina com CO_2 , normalmente produzido nos tecidos, também é reversível e constitui a carboxi-hemoglobina. Este evento de ligação com O_2 e/ou com CO_2 ocorre em células específicas denominadas hemácias, eritrócitos ou glóbulos vermelhos (11).

Alterações hereditárias na molécula de hemoglobina podem causar doenças denominadas hemoglobinopatias classificadas como hemoglobinopatias em decorrência de alterações estruturais, como no exemplo clássico da hemoglobina S, e hemoglobinopatias promovidas pela redução ou bloqueio na síntese das cadeias globínicas, denominadas talassemias.

3. As β -talassemias

As síndromes talassêmicas compreendem um grupo heterogêneo de doenças hereditárias na qual existe uma redução no ritmo de síntese de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina. Esta anormalidade de natureza complexa ocasiona, em última análise, a supressão total ou parcial da produção de cadeias α nas α -talassemias e de cadeias β nas β -talassemias (12).

Nas síndromes talassêmicas, em função da hemoglobinizacão deficiente ocorre à presença de anemia microcítica e hipocrômica, sendo esta uma das características dessas síndromes. Além disso, a síntese de cadeias não afetada permanece inalterada provocando acúmulo e a formação de agregados instáveis. São essas lesões as responsáveis pela destruição prematura dos eritroblastos na medula óssea, caracterizando eritropoese ineficaz comum a essas síndromes, e também pela reduzida sobrevivência dos eritrócitos na circulação, determinante do quadro hemolítico (13).

No caso das β -talassemias, a síntese normal de cadeias α -globina, combinada com a redução ou bloqueio na síntese das cadeias β -globina, resulta no acúmulo de cadeias α -globinas nos precursores eritróides. Estas cadeias globínicas, por serem extremamente instáveis, precipitam-se nas células formando corpos de inclusão intra eritrocitário, responsáveis pela destruição intramedular de precursores eritróides e eritropoese ineficaz. Os produtos da degradação das cadeias α em excesso, que são globina, heme, hemina (forma oxidada da molécula de heme) e ferro livre, provavelmente são responsáveis por grande parte dos danos à membrana de eritrócitos (13, 14). Uma forma resumida da fisiopatologia das β -talassemias encontra-se exemplificada na figura 1

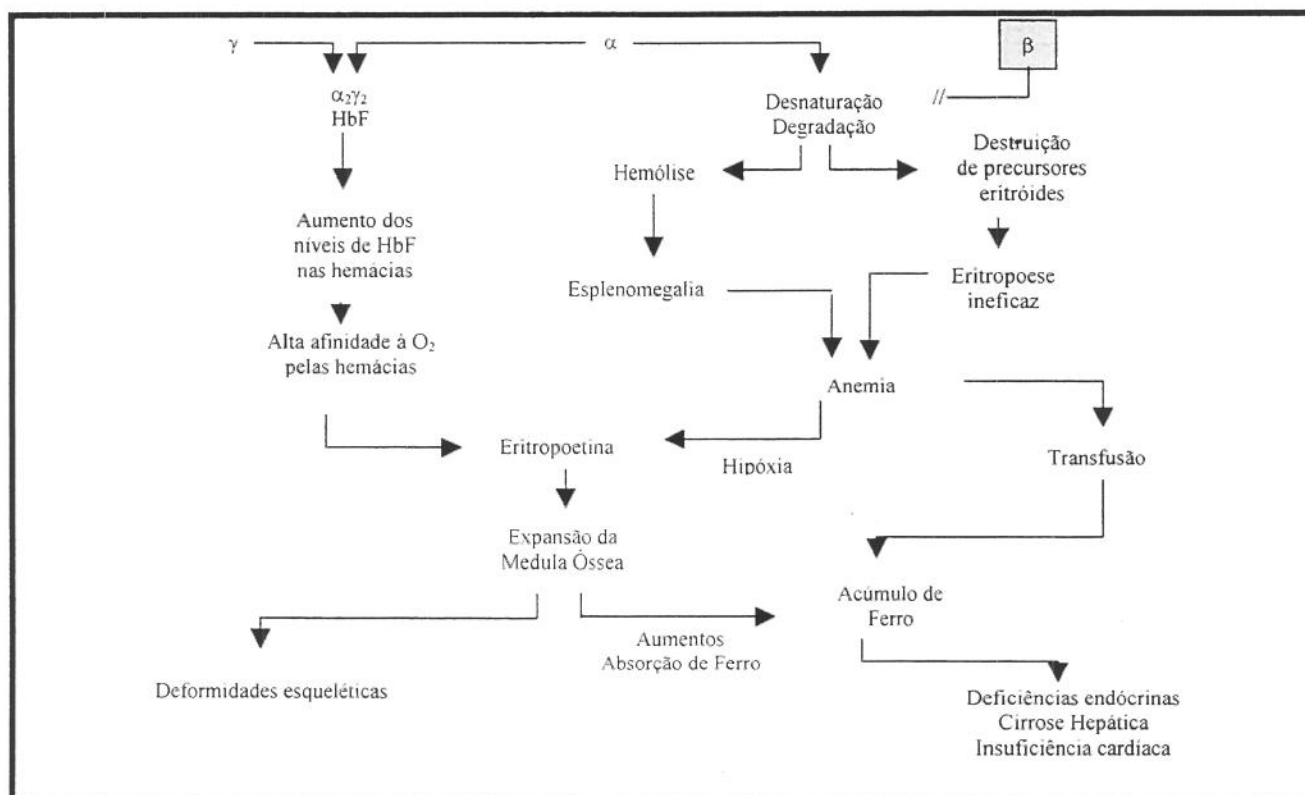


Figura 1- Esquema sobre a fisiopatologia das β -talassemias –As cadeias α -globinas livres, que apresentam alta instabilidade, precipitam-se nas células danificando a parede de precursores eritróides (eritropoese ineficaz) e diminuindo da vida média da hemácia (hemólise). Figura traduzida da versão original (14) .

As mutações que causam β -talassemias podem resultar na deficiência total (β^0 -talassemias) ou parcial da síntese de cadeias β -globina (β^+ -talassemias). Enquanto algumas mutações levam à tênue redução na síntese de β -globina e são denominadas β^{++} -talassemias, em outras o déficit é mínimo e os heterozigotos para essa anormalidade são conhecidos como “silenciosos” (15, 16, 17). As alterações laboratoriais são caracterizadas pela presença de hemácias microcíticas e hipocrômicas e elevados níveis da hemoglobina tipo HbA₂. Em alguns casos elevados níveis de hemoglobina fetal (HbF) também são detectados (18).

O estado homozigótico da maioria das variantes genéticas de β -talassemia produz o quadro clínico da talassemia maior ou anemia de Cooley. Esses pacientes apresentam acentuada anemia a partir do quarto mês de vida e necessitam de transfusões sanguíneas regulares para sobreviverem. Esse processo terapêutico conduz ao acúmulo de ferro no organismo e às suas conseqüências sobre glândulas endócrinas, fígado e coração. As complicações cardíacas secundárias à hemocromatose na segunda década da vida representam a causa mais comum de morte nessa doença (13). Os heterozigotos para β -talassemia apresentam, com raras exceções, apenas discreta anemia com ausência de manifestações clínicas relevantes, quadro, em geral, conhecido como talassemia menor. Entre estes dois extremos, existem quadros clínicos de gravidade intermediária, com anemia moderada mas sem necessidade de transfusões regulares (18, 19).

Devido à grande heterogenidade clínica das β -talassemias e aos anos de estudo, hoje acredita-se na presença de fatores genéticos que podem contribuir para a melhora ou piora da evolução clínica destes pacientes. Além dos considerados moduladores do fenótipo de pacientes com β -talassemia mais comuns, como aumentados níveis de produção de hemoglobina fetal (20, 21) e co-herança com α -talassemia (22), alguns outros tem sido descritos ultimamente:

- HRI: A proteína Heme-regulated eIF2 α kinase [heme-regulated inhibitor (HRI)] regula a síntese cadeias α -globinas, entre outras proteínas, em resposta aos níveis de heme celular. Na presença de heme na células a proteína HRI fosforila o fator iniciador da tradução eIF α . Entretanto, em condições de ausência ou deficiência de síntese de heme a proteína HRI fosforila o fator eIF2 α , diminuindo a síntese de cadeias α -globina e mantendo a razão heme/cadeias globínicas equilibrada. Estudos de deleção do gene HRI em camundongos com fenótipo β -talassêmico demonstraram aumento da síntese de cadeias α -globinas e níveis elevados de dano celular, o que leva à morte intra-uterina destes camundongos (23);

- Hepcidina: A proteína Hepcidina é considerada proteína chave no metabolismo do ferro em mamíferos. Esta proteína inibe a absorção de ferro pelo duodeno e a liberação de ferro por macrófagos. Estudos em pacientes com β -talassemia maior e em camundongos com o

mesmo fenótipo demonstraram níveis diminuídos de expressão gênica do gene Hpcidina,. Nestes casos, os baixos níveis de expressão deste gene poderiam estar relacionados com o aumento de absorção de ferro no organismo de pacientes portadores desta hemoglobinopatia (24, 25);

- AHSP: A proteína AHSP é uma proteína estabilizadora de cadeias α -globina. Estudos em camundongos com fenótipo β -talassêmicos apresentando deleção do gene AHSP demonstraram eritrócitos com vida-média reduzida, aumento da presença de corpos de inclusão nas hemácias, elevados níveis de espécies reativas de oxigênio e aumento do número de morte intra-uterina. A ausência da proteína AHSP poderia estar expondo os precursores eritróides e as hemácias a elevados níveis de precipitação e oxidação por cadeias α -globina, o que levaria a um fenótipo mais severo (26, 27).

4. AHSP

AHSP é uma proteína eritróide específica que apresenta afinidade de ligação com α -globinas estabilizando essas moléculas e, dessa forma, evitando a precipitação nos precursores eritróides e bloqueando danos celulares causados pela oxidação de produtos globínicos. A primeira descrição do gene AHSP ocorreu durante estudos pela busca de marcadores moleculares para Encefalopatias Espongiformes Transmissíveis (28). Em função da localização e da abundância deste transcrito na medula óssea e sangue periférico os autores o denominaram EDRF (Erythroid differentiation-related factor). Em 2002, o gene EDRF foi renomeado AHSP (alpha hemoglobin stabilizing protein) por Kihm e colaboradores (26). Através da comparação de genes diferencialmente expressos em linhagens celulares com e sem a expressão do fator de transcrição GATA-1, o transcrito descrito por Miele e colaboradores foi identificado como altamente expresso na presença do fator GATA-1.

O gene AHSP que se localiza no cromossomo 16, abrange aproximadamente 1.8kb de DNA com estrutura genômica composta por três éxons e dois íntrons. O RNA mensageiro é constituído de aproximadamente 600pb, codificando uma proteína com 102 aminoácidos. Em relação à regulação da expressão do gene AHSP, Gallagher e colaboradores (29) analisando a sequência genômica de AHSP encontraram múltiplos sítios para o fator de transcrição GATA-1 (30, 31) e sítios CACCC, de reconhecimento do fator EKLF (Erythroid Kruppel factor) (figura 2).

Estudos em camundongos com o gene EKLF deletado demonstraram níveis de expressão do gene AHSP nove vezes menor do que a demonstrada em camundongos normais. Outros pesquisadores, também analisando os efeitos da ausência do gene EKLF em observaram várias anormalidades celulares, sugerindo corpos de inclusão (31, 32, 33). Apesar de ter sido demonstrado que EKLF regula negativamente os níveis de AHSP, não foi possível concluir que a presença dos corpos de inclusão nestes camundongos estaria ocorrendo exclusivamente pela ausência de AHSP, uma vez que mais de 50 genes mostraram se regulados pelo gene EKLF.

Outro fator de transcrição recentemente descrito como regulador do gene AHSP é o Oct-1 (34). Oct-1 é uma proteína de domínio POU, membro de uma família de fatores conhecidos como reguladores de numerosos genes tecidos específicos, podendo agir como repressor e ativador da transcrição.

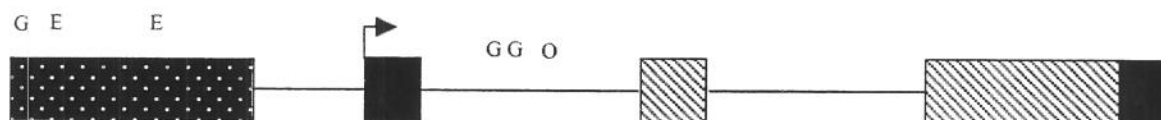


Figura 2 – Descrição gráfica do gene AHSP – Os 1.8kb de DNA do gene AHSP são estruturalmente divididos em região promotora (blocos pontilhados), 3 éxons (blocos) e 2 íntrons (linhas). Estão representados os sítios de ligação dos fatores de transcrição GATA-1 (G, num total de 9 sítios), EKLF (E, num total de 2 sítios) e Oct-1 (O). Seta indica local do início da transcrição. Blocos em preto representam a região não codificante do RNA mensageiro. Blocos listrados representam a região codificante da proteína AHSP.

Ensaio funcionais demonstraram que, além da AHSP ligar-se a cadeias α -globina e prevenir sua precipitação nos precursores eritróides, também bloqueia sua oxidação (35). O modelo de ligação e outras características biofísicas da proteína AHSP foram melhor esclarecidos por Feng e colaboradores (36), que demonstraram a habilidade da AHSP se ligar com as várias formas de α -globina, mesmo quando a molécula de heme não está presente (apo- α -globina), que o sítio de ligação entre AHSP e α -globina é o mesmo utilizado pela ligação α -globina e β -globina e que a ligação entre AHSP e cadeias α -globina ocorre através de 3 pontes de hidrogênio, o que constitui uma ligação fraca, facilitando a substituição de AHSP por β -globina.

Além de comprovar as vias de estabilização de α -globina por AHSP, estes autores foram capazes de analisar o motivo pelo qual a AHSP é eficiente na proteção contra a geração de espécies reativas de oxigênio pela molécula de α -globina (37).

A ligação entre a AHSP e cadeias α -globina promove um rearranjo de aproximadamente 80% da estrutura da α -globina, gerando modificações da ligação do grupo heme com esta molécula. Normalmente o grupo heme-Fe(II) encontra-se coordenado pela histidina 58 da molécula de α -globina, região onde o grupo heme se liga a molécula de α -globina (37). Com a formação do complexo AHSP- α -globina-Fe(II), o grupo heme-Fe(II) passa a ser coordenado adicionalmente pelo histidina 87, que se liga à molécula de Fe(II) induzindo sua oxidação em Fe(III) – forma menos reativa da molécula.

Dessa forma, a proteína AHSP previne diretamente a precipitação de cadeias α -globina nos precursores eritróides e indiretamente previne o grupo heme-Fe(II) de gerar espécies reativas de oxigênio (37) (figura 3).

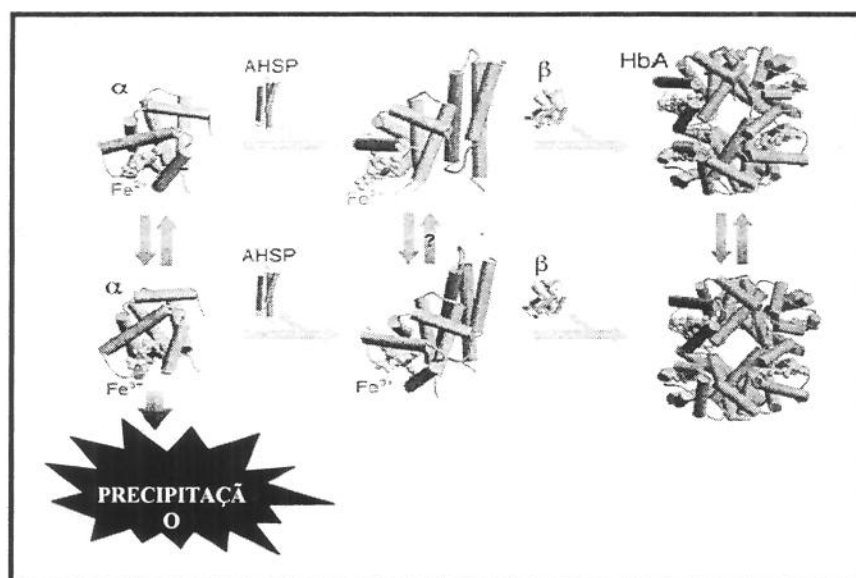


Figura 3 – Mecanismo de ligação da proteína AHSP – A AHSP pode ligar-se tanto à α -globina-Fe(II) (reduzida) quanto à α -globina-Fe(III) (oxidada). Quando AHSP forma complexo com α -globina reduzida, o grupo heme esta coordenado pela histidina 58 da molécula de α -globina. Com a formação do complexo, a α -globina-Fe(II) é rapidamente oxidada. Dessa forma, a AHSP protege o eritrócito de danos causados pela geração de espécies reativas de oxigênio, uma vez que a molécula α -globina-Fe(III) é cataliticamente inerte. Por outro lado, a ligação específica de cadeias α -globinas com AHSP previne a

precipitação de cadeias α -globina, dando mais tempo para a α -globina oxidada voltar ao estado normal e ligar-se com cadeias do tipo β -globina para a formação de hemoglobina (36).

De acordo com as funções preditas para a AHSP, poderia ser especulado que essa proteína deva apresentar uma importante função como modeladora de gravidade em β -talassemia, diminuindo a proporção de eritropoese ineficaz promovida pela precipitação de cadeias α -globinas nos precursores eritróides (27, 35). Ensaios de co-expressão de AHSP e α -globinas demonstraram que na ausência de AHSP, as α -globinas precipitam-se nas células formando agregados semelhantes aos corpos de inclusão observados em precursores eritróides com β -talassemia.

Camundongos portadores de β -talassemia com deleção do gene AHSP também foram analisados (27). Nestes camundongos foram observados índices elevados de morte intra-uterina, níveis acentuados de anemia e apoptose celular e graus aumentados quanto à geração de espécies reativas de oxigênio nas hemácias. Estes foram os primeiros indícios de que mutações AHSP, que pudessem alterar ou abolir os níveis desta proteína nas células da linhagem eritróide, poderiam possivelmente contribuir com pior evolução clínica em pacientes com β -talassemia.

Na tentativa de determinar possíveis mutações no gene AHSP, Vip e colaboradores (38) analisaram a seqüência de nucleotídeo do gene AHSP em 120 pacientes com HbE/ β -talassemia provenientes da Tailândia. A principal expectativa do grupo era a de encontrar mutações no gene AHSP que diminuíssem a expressão do gene e que essas alterações estivessem relacionadas com talassemia grave. Nenhuma mutação foi encontrada. Entretanto esse foi o primeiro grupo a sugerir um conjunto de polimorfismos (SNPs) que pudessem formar um haplótipo para o gene AHSP. Análises de relação entre haplótipos no gene AHSP com gravidade clínica nas β -talassemia não foram capazes de demonstrar nenhuma correlação significativa.

Atualmente, vários sítios polimórficos no gene AHSP encontram-se depositados no banco de dados de SNPs (tabela 1). Muitos destes encontram-se em regiões que provavelmente não alteram a expressão do gene AHSP.

Tabela 1 –Polimorfismos descritos no gene AHSP

#	Localização cromossomo 16	SNP ID	Nucleotídeo	Região	Alteração
1	22850300	rs9929657	<u>T</u> - A	Promotor	-
2	22850301	rs9937367	<u>C</u> - T	Promotor	-
3	22850653	rs7203199	<u>C</u> - G	Promotor	-
4	22850734	rs7203199	<u>G</u> - A	Promotor	-
5	22850883	rs13338939	<u>C</u> - T	Promotor	-
6	22851040	rs13339026	<u>C</u> - G	Promotor	-
7	22851538	rs9921592	<u>G</u> - A	Promotor	-
8	22851545	rs9921597	<u>G</u> - T	Promotor	-
9	22851705	rs28509322	<u>A</u> - G	Promotor	-
10	22851797	rs4889672	<u>C</u> - T	Promotor	-
11	22851818	rs8046452	<u>C</u> - T	Promotor	-
12	22852061	rs4499252	<u>A</u> - G	Promotor	-
13	22852138-55	rs5816533	<u>T18</u> - T15	Promotor	-
14	22852261	rs4319784	<u>G</u> - A	Promotor	-
15	22852465	rs8050390	<u>G</u> - A	Intron 1	-
16	22852509	rs4296276	<u>G</u> - A	Intron 1	Sítio de ligação do fator Oct-1
17	22852916	rs10920	<u>T</u> - A	Exon 3	Lis / Met (aa45)
18	22853013	rs17677	<u>G</u> - T	Exon 3	Leu / Leu
19	22853109	rs10843	<u>T</u> - C	Exon 3	3'-UTR

Localização do cromossomo 16 do gene AHSP está de acordo com banco de dados (GeneBank GI: 51472974);

SNPs ID descritos de acordo com nomenclatura do dado de bases de polimorfismos no NCBI;

Sublinhados estão os nucleotídeos apresentados na sequência gênica depositada no Genebank.

Uma sugestão do possível papel de AHSP como um modulador de gravidade em talassemia foi proposto através de ensaios analisando RNA mensageiro. Gallanello e colaboradores (39) estudaram um grupo de pacientes heterozigotos para β -talassemia mas portadores de fenótipo intermediário (geralmente detectado em pacientes homozigotos), pela técnica de PCR em tempo real. A expressão do gene AHSP nestes pacientes apresentou uma diminuição significativa quando comparados com indivíduos normais.

Em outra vertente, Lai e colaboradores (40) sugeriram que a expressão do gene AHSP estaria relacionada à quantidade de bases nitrogenadas Timina na região promotora, variação já proposta por Vip e colaboradores (38). A comparação da expressão do gene AHSP com 15 Ts e 18 Ts em pacientes com β -talassemia e em estudos *in vitro* sugerem que, na presença de 15 Ts a expressão do gene AHSP é menor quando na presença de 18 Ts.

Foi então que, pelo fato de a proteína AHSP ser uma *chaperone* de α -globina com potencial importância na eritropoese normal e em ocasiões de excesso de α -globina nos eritrócitos, decidimos estudar os níveis de expressão do gene AHSP durante a diferenciação eritróide em cultura de células (41) e a presença de polimorfismos ou mutações, bem como os níveis de expressão gênica, em pacientes brasileiros com β -talassemia e em indivíduos controles. Estes estudos foram realizados durante a dissertação de mestrado da autora Camila Oresco dos Santos, defendida em 2004.

Observou-se que, durante a eritropoese normal, a expressão do gene AHSP é coordenada com a expressão do gene α -globina, sugerindo um feedback positivo da expressão de ambos RNAs durante a maturação eritróide. Assim, quanto maior a produção de hemoglobina, maior será a expressão de AHSP, provavelmente para estabilizar todas as moléculas de α -globina evitando sua precipitação e, dessa forma, colaborando na ligação com β -globina (41).

Os estudos realizados em pacientes com talassemia sugeriram que a expressão do gene AHSP poderia estar relacionada com a severidade clínica nos pacientes analisados (42). Comparando os níveis de expressão do gene AHSP entre pacientes com talassemia

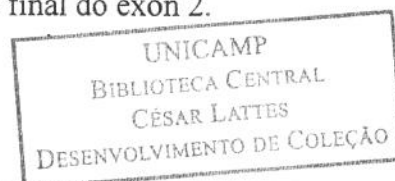
intermediária e pacientes com talassemia maior, foi observado nível aumentado, de aproximadamente 2.5 vezes da expressão do gene AHSP no grupo de pacientes com talassemia intermediária. Os níveis de α -globina em ambos os grupos não demonstraram diferenças estatísticas, sugerindo que a AHSP poderia ser um dos fatores modificadores do fenótipo.

Nenhuma mutação foi detectada no gene AHSP durante os estudos da sequência de DNA nos pacientes talassêmicos. Os polimorfismos previamente descritos (38, 40) foram detectados e, assim como quando descritos, não demonstraram relação com a evolução clínica dos pacientes talassêmicos. Entretanto um polimorfismo que promove a alteração de um aminoácido na cadeia polipeptídica da proteína AHSP foi detectado somente no grupo de pacientes talassêmicos.

O polimorfismo na posição 12888 do gene AHSP, que foi detectado em 4 pacientes com β -talassemia, promove a substituição de uma asparagina (N) por uma isoleucina (I) na posição 75 da cadeia de aminoácidos da proteína AHSP. Santivieri e colaboradores, grupo que previamente descreverão o polimorfismo (43), sugeriram que essa substituição na cadeia polipeptídica da proteína AHSP não alteraria a afinidade por α -globinas.

Neste trabalho, apresentamos uma vasta análise da composição de nucleotídeos do gene AHSP em amostras de DNA originárias de diversos locais do mundo e, análises das propriedades bioquímicas da proteína AHSP N75I. Nossos resultados sugerem a primeira alteração na proteína AHSP detectada através do sequenciamento de DNA de indivíduos talassêmicos e controles, que gera uma proteína não totalmente funcionante sugerindo, mais uma vez, uma função moduladora para o gene AHSP nas síndromes talassêmicas.

Outras duas características foram detectadas a partir das análises de DNA do gene AHSP: a presença de uma estrutura secundária na porção 3'-UTR da molécula de RNA mensageiro e a presença de uma sequência de 10 nucleotídeos no final do exon 2.



A análise computacional da estrutura secundária na porção 3'-UTR do RNA mensageiro do gene AHSP sugeriu a existência de um possível elemento responsivo a ferro (IRE). IREs são estruturas secundárias compostas de aproximadamente 28 nucleotídeos que estão presentes em molécula de RNA mensageiro, tanto na posição 5'-UTR como na posição 3'-UTR, e que regulam a expressão gênica de forma pós transcricional (44). Os IREs estão presentes em um grande número de RNAs mensageiros, integrando o metabolismo de ferro e oxigênio pela regulação do ciclo do ácido tri-carboxílico (m-aconitase RNA), estoque de ferro (ferritina e ferroportina RNAs), síntese de heme (eritróide aminolevulínico sintetase RNA), absorção de ferro (receptor de transferrina e transportador de metais divalentes – DMT1 RNAs) e regulação de ciclo celular (CDC14A e CDC42 kinase RNAs) (45, 46, 47, 48, 49 e 50).

A regulação pós transcricional de genes que apresentam IREs ocorre de acordo com os níveis de ferro celular, através da ligação de proteínas reconhecedoras de elementos responsivo a ferro denominadas IRPs. Em condições em que existem diminuídos níveis de ferro, as proteínas IRPs encontram-se ligadas aos IREs. Em condições em que existem aumentados níveis de ferro, as proteínas IRPs apresentam-se na forma oxidada e não se ligam aos IREs. Duas proteínas com habilidade de ligação a IREs são conhecidas: IRP1 e IRP2 (52). Camundongos apresentando deleção dos genes IRP1 e IRP2 desenvolveram neurodegeneração associada com a não regulação da absorção de ferro em áreas específicas do cérebro, anemia microcítica e porfiria (52, 53, 54).

Os genes melhor caracterizados como regulados por IREs são os receptores de transferrina e ferritina. A ligação das proteínas IRPs aos múltiplos IREs da porção 3'-UTR do RNA mensageiro do gene receptor de transferrina resulta na estabilização do RNA. A ligação das proteínas IRPs ao único IRE na porção 5'-UTR do RNA mensageiro do gene ferritina (cadeias leve e pesada) impede a ligação dos ribossomos à molécula de RNA inibindo a síntese protéica (55).

A possibilidade da AHSP ser uma proteína eritrocitária controlada pela presença do ferro poderia ter implicações importantes em talassemia, anemias por ausência de ferro e

até mesmo na explicação da enorme variação da expressão do gene AHSP em indivíduos normais (56). Nossos resultados demonstraram a regulação da estabilidade do RNA mensageiro do gene AHSP de acordo com os níveis de ferro intracelular pela via IRE/IRP.

Quanto à sequência de nucleotídeos encontradas no final do éxon 2 do gene AHSP, análises de comparação de sequências sugeriram que esta sequência seria um sítio de reconhecimento de fatores de transcrição do tipo MARE (Maf recognition element) (57). Proteínas do tipo Maf (MafG, MafK e MafF) pertencem à família dos fatores de transcrição do tipo zíper de leucina, responsáveis pela repressão e/ou ativação da transcrição de vários genes a partir da heterodimerização com outros fatores de transcrição, tais como c-Jun, Jun-B, Jun-D, c-Fos, Fra1, Nrf1, Nrf2, YABP, ARE-BP1 e Bach1 (58, 59). Dentre os genes que apresentam regulação via elementos MARE temos β -globina, α -globina, NAD(P)H: Quinona oxireductase (NQO1) e Hemeoxigenase-1 (HO-1) (59, 60, 61, 62).

No caso das globinas, a ativação da transcrição destes genes acontece em resposta às concentrações de heme na célula. Na presença de heme, o fator de transcrição NF-E2 encontra-se ligado à região promotora destes genes, ao passo que nos primeiros estágios celulares, onde a presença de heme não é tão grande, estes genes encontram-se repressos pela ligação do fator de transcrição Bach-1 ao elemento MARE (61, 62).

O fator de transcrição NF-E2 foi identificado primeiramente como um fator restrito às linhagens eritróide e megacariocítica por se ligar à região promotora do gene eritróide específico porfobilinogeno deaminase (PBGD), codificante de uma das enzimas participantes da síntese de heme. NF-E2 é um complexo heterodímero formado pela interação das proteínas p45 e p18, onde p45 é uma proteína integrante da subfamília bZip, presente nas linhagens eritróides, megacariocítica e mastócitos, e a p18 é integrante da família das proteínas Maf (MafK, MafF e MafG) (57).

Em eucariotos, 4 outros genes estão relacionados com o fator de transcrição NF-E2: Nrf1, Nrf2, Bach1 e Bach2. Todos estes genes são conhecidos por terem a propriedade de formar heterodímeros com proteínas do tipo Maf, para ativação ou repressão da transcrição.

Enquanto os fatores de transcrição Nrf1 e Nrf2 estão relacionados com a ativação de genes relacionados à prevenção de stress oxidativo, Bach1 e Bach2 funcionam como repressores de transcrição (58, 62, 63). Em resposta à presença de heme nas células tanto NF-E2 como Nrf2 encontram-se heterodimerizadas com as proteínas Maf ativando a transcrição de genes, enquanto que Bach1 é transportado para o citoplasma celular, não exercendo mais repressão da transcrição.

A presença de um elemento MARE no gene AHSP poderia estar confirmando dados publicados anteriormente que demonstraram correlação da expressão dos genes α -globina e AHSP durante a diferenciação eritróide, e sugerindo, mais uma vez, a grande importância da proteína AHSP durante a maturação eritróide. Nossos resultados preliminares sugerem reconhecimento do elemento MARE por fatores de transcrição que poderiam estar regulando a expressão do gene AHSP em resposta aos níveis de heme.

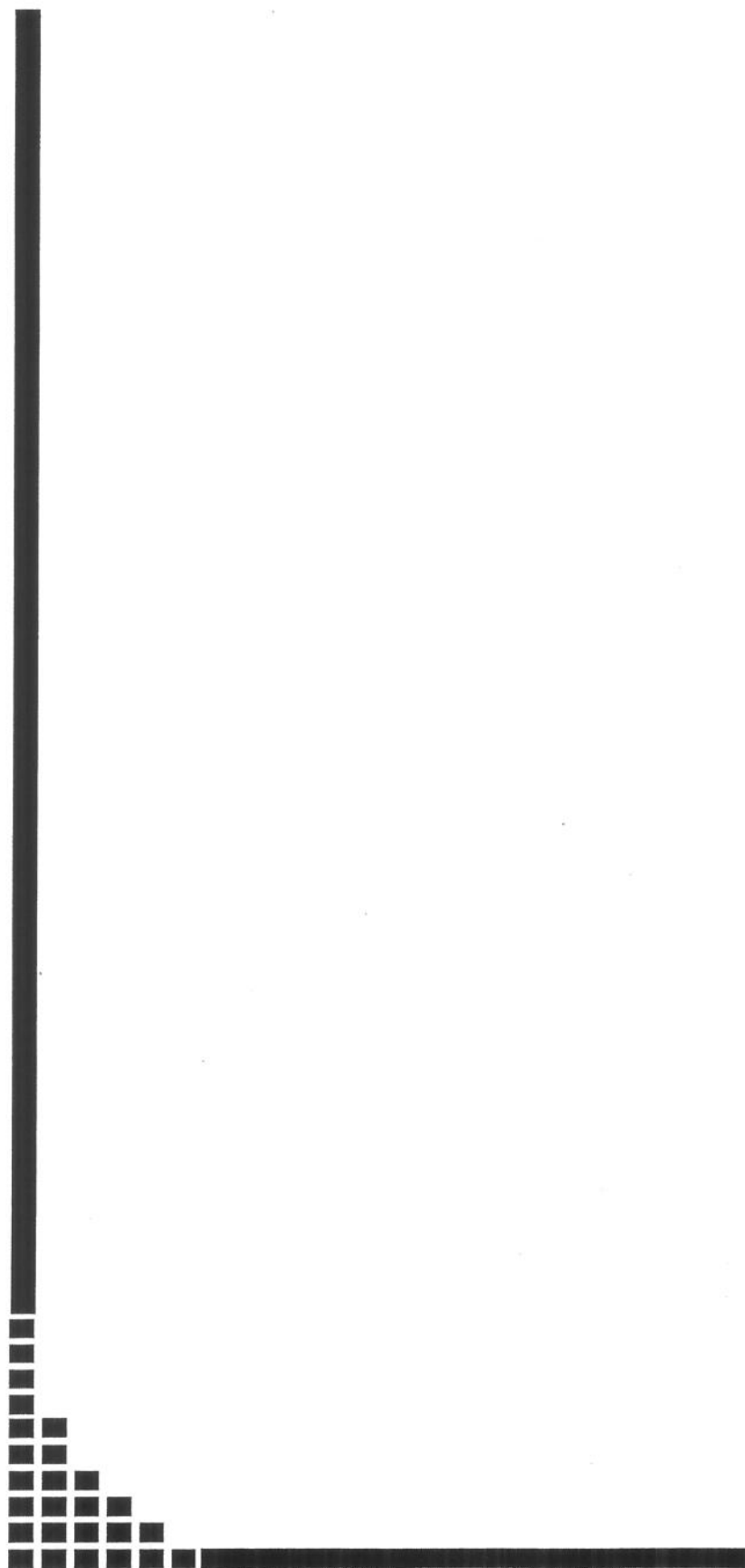
Em suma, os dados obtidos durante o desenvolvimento desta tese contribuem para o entendimento da regulação da expressão do gene AHSP nos níveis transcricional e pós transcricional e para a melhor compreensão da importância desta proteína na diferenciação eritróide e sua possível implicação em doenças.



OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

- Analisar a presença do polimorfismo N75I do gene AHSP em amostras de DNA de indivíduos das populações brasileira, européia, asiática e caribenha;
- Analisar o impacto do polimorfismo N75I na função da proteína AHSP através de estudos das propriedades bioquímicas da proteína recombinante AHSP N75I;
- Caracterizar funcionalmente a estrutura secundária presente na extremidade 3'-UTR da molécula de RNA mensageiro do gene AHSP;
- Caracterizar a ligação de fatores de transcrição ao elemento MARE localizado no segundo exon do gene AHSP.



***MATERIAIS E
MÉTODOS***

1 – Amostras de DNA

298 amostras de DNAs de indivíduos anônimos foram estudadas: 50 amostras de indivíduos provenientes de Papa Nova Guiné (NG); 48 amostras de indivíduos de origem Européia (M), 50 amostras de indivíduos de origem Asiática (AI), 46 amostras de indivíduos provenientes de Port Orly (PO), 48 amostras de indivíduos de origem Afro-caribenha (AC), 126 amostras de indivíduos de origem Brasileira (BR).

As amostras de DNA das populações de Papa Nova Guiné, Européia, Asiática, Port Orly e Afro-Caribenha foram cedidas pela Dra. Swee Lay Thein do King's College Hospital, em Londres, e pelo Dr. Douglas R. Higgs da University of Oxford, no Reino Unido. As amostras de origem brasileira foram coletadas no Hemocentro da Universidade Estadual de Campinas.

Os dados de seqüenciamento das amostras de pacientes com β -talassemia foram obtidas durante o desenvolvimento de tese de mestrado. Nesse estudo, 88 pacientes com β -talassemia atendidos pelo Hemocentro da Unicamp foram analisados. O diagnóstico da talassemia foi realizado através da quantificação de hemoglobina do tipo A_2 e seqüenciamento do gene β -globina. Dados clínicos e histórico familiar foram obtidos através dos prontuários dos pacientes.

2 - Análise de DNA genômico

Os polimorfismos do gene AHSP foram numerados e coordenados de acordo com a seqüência depositada no *GeneBank* (número de acesso AC 106 730.2). Dois conjuntos de *primer* foram utilizados para a amplificação de fragmento de 1.26Kb da região estrutural do gene AHSP a partir de DNA genômico. A análise da seqüência repetitiva de Ts na região promotora do gene AHSP foi realizada de acordo com a literatura (40). Os produtos de PCR gerados foram seqüenciados em seqüenciador automático MegaBace (Amershan Pharmacia). As seqüências dos conjuntos de *primers* foram as seguintes :

AHSP_F2: 5'-GCCTCTCCCTTCTTCTCCTC-3';
AHSP_R2: 5'-CGTGTCTCTGCTTGTTTCCA-3';
AHSP_F3: 5'-TCCATTTCAAAGGACTGGCC-3';
AHSP_R3: 5'-TGGTCACTCAAGGCTGCTAA-3'.

Os haplótipos foram estimados utilizando os softwares Haploview v.3.32 e Multalin.

3. Superexpressão de proteínas e purificação

Um fragmento de cDNA de aproximadamente 306pb referente à parte codificante dos genes AHSP WT e AHSP N75I foi clonado em vetor de superexpressão pGEX-2T (Amershan Biosciences). Os *primers* utilizados para a amplificação do fragmento foram: F: 5'-GGGGACAGAGAGATTACGC -3' e R: 5'- AGCACTGGTCTTTATTGAGGTGT -3'. Da superexpressão destes plasmídios em bactérias da linhagem *E. Coli* BL21 foi possível a obtenção das proteínas AHSP WT e AHSP N75I fusionadas à Glutathione S-transferase (GST).

A superexpressão foi realizada através do tratamento das bactérias em fase exponencial de crescimento com 0.5M de IPTG (Sigma) durante 2 horas em agitador automático à 30°C. Após a lise celular, utilizando-se 50mg/ml de lisozima (Sigma) e sonicação durante 30 segundos, as proteínas de fusão foram capturadas em *beads* contendo Glutathione (Amershan Biosciences) por 16 horas a 4°C em constante rotação.

Após a incubação, as *beads* conjugadas, com as proteínas, foram precipitada através de centrifugação a 3000 RPM por 5 minutos e lavada com tampão BC500 (20mM Tris-HCl pH 8, 500mM KCl, 20% glicerol, 1% Igepol, 0.5mM EDTA, 1mM DTT e 0.5X solução inibidora de proteases) cinco vezes, sendo incubadas por 2 minutos em cada lavagem. Após lavagem, as *beads* foram ressuspensas em PBS gelado, e tratadas com Trombina (Sigma) para liberação das proteínas. Para melhor pureza, as proteínas ainda

foram submetidas à purificação em FPLC (Amershan Biosciences) utilizando para isso coluna Mono Q HR 5/5 (Amershan Biosciences).

As proteínas foram concentradas em concentrador Centricon-30 (Milipore) e a quantificação foi realizada por meio de Bradford (BioRad). No total 5 diferentes preparações de proteínas foram utilizadas. A preparação da α -globina foi realizada como descrito previamente (37).

4 – Análise da afinidade da proteína AHSP N75I com cadeias α -globinas

As proteínas recombinante AHSP WT e AHSP N75I foram superexpressas como descrito anteriormente, mas não foram tratadas com Trombina. Para eluição das proteínas, as *beads* foram ressuspensas com 1ml de solução de glutatona reduzida pH 8 (100mM NaCl, 50mM Tris 8.8, 20mM Glutatona) à temperatura ambiente por 10 minutos em constante agitação. O sobrenadante contendo as proteínas foi coletado e aplicado em coluna desalinizante PD-10 (Amershan Biosciences) sendo as proteínas eluídas pela adição de 3.5ml do tampão BC100 (20mM Tris-HCl pH 8, 100mM KCl, 20% glicerol, 0.5mM EDTA, 1mM DTT e 0.5X *mix* inibidor de proteases).

Um passo adicional de purificação utilizando FPLC foi realizado como descrito previamente. O volume coletado foi concentrado em colunas de concentração (Centricon - Milipore) e a quantificação protéica foi realizada por meio de Bradford (BioRad). As proteínas recombinante com GST *tag* foram imobilizadas em Sensor Chip CM5 (Biacore), uma lâmina de vidro que apresenta uma fina camada de ouro revestida com dextran carbometilado. Este revestimento formou um ambiente hidrofílico que serviu de substrato para a ligação de biomoléculas.

A camada de ouro no chip criou condições físicas requeridas para ressonância em Surface Plasmon (SPR). Essencialmente, SPRs detectam mudanças de massa na camada aquosa próxima da superfície do chip através de captação de mudanças no índice de refração. Dessa forma, quando as moléculas em solução se ligam às moléculas imobilizadas no chip ocorre um aumento da massa molecular e, quando as moléculas se dissociam,

ocorre volta aos estágios iniciais. Através desse princípio é que se formam as bases dos sensogramas – um contínuo monitoramento em tempo real da dissociação das moléculas que interagiram. Os sensogramas promovem informação quantitativa e em tempo real da ligação específica, concentração de moléculas ativas na amostra, cinética e afinidade (protocolo do fabricante). A imobilização das proteínas foi realizada de acordo com instrução do fabricante. Um mutante com habilidade de ligação à α -globina diminuída foi usado como controle negativo (AHSP D43R) (36, 37).

5 – Produção de espécies reativas de oxigênio pela proteína AHSP

AHSP WT e AHSP N75I (80 μ M) foram incubadas com α -globina-Fe(III) (40 μ M) em tampão de ligação (50mM Hepes, 250mM NaCl, 1mM EDTA) por 30 minutos em gelo, para formação do complexo AHSP- α -globina. Para a quantificação da produção de EROs foi utilizado o reagente TMPD (N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine), um químico facilmente oxidado e que serve de agente redutor para heme peroxidase. TMPD perde um elétron a partir da oxidação por H₂O₂, sendo o produto da oxidação de tom azul.

Dessa forma a velocidade de oxidação pode ser acompanhada através de constantes leituras à absorvância de 610nm (protocolo Sigma). Sendo assim, ao complexo AHSP- α -globina foram adicionados 400 μ M de TMPD e 400 μ M de H₂O₂ e a contínua oxidação do TMPD foi acompanhada em leitor de Elisa à absorvância de 610nm (29, 36, 37).

6 - Análise de Corpos de Heinz

A coloração dos corpúsculos de inclusão (Corpos de Heinz) foi realizada como proposto em literatura (26, 27). 5 μ l de sangue total foram homogeneizados com 5 μ l do corante Violeta de Metila e incubados a 37°C por 1 hora. 3 μ l da mistura foram utilizados na preparação esfregaço celular. As lâminas foram analisadas utilizando microscópio de contraste de fase Eclipse E-600 (Nixon). As imagens foram capturadas utilizando o software Image Pro-Express (Media Cybernetic, LP).

A análise de precipitação de α -globinas pela técnica de imunofluorescência foi realizada com a fixação de 10 μ l de sangue periférico em formaldeído e incubação com anticorpos primários, tanto anti α -globina (diluição 1:100) ou anti β -actina (diluição 1:100) *overnight* a 4°C. As amostras foram lavadas em PBS e incubadas com o anticorpo secundário (diluição 1:100 anti IgG de coelho, Santa Cruz Biotechnology) por duas horas a temperatura ambiente.

7 - Análise de ligação RNA-proteína pela técnica de EMSA

Células do tipo K562 (linhagem eritroleucêmica humana) foram cultivadas em meio de cultura IMDM enriquecido com 10% de soro bovino fetal. Durante as últimas 16 horas de culturas, as células foram tratadas com 100 μ M de desferrioxamina (Novartis) ou com 50 μ M de Hemina (Sigma) ou mantidas sem tratamento. As células foram lavadas duas vezes com tampão PBS gelado.

Para geração de extrato citoplasmático, as células foram submetidas à lise utilizando-se tampão de lise gelado (10mM EDTA (pH 7.4), 100mM Tris-HCl, 10mM Na₂P₂O₇, 100mM NaF₂, 10mM Na₃VO₄, 2mM PMSF, 1% Triton X-100 e 0.1mg/ml Aprotinina) por 30 minutos em gelo. Após centrifugação a 13000 RPM o sobrenadante foi coletado. A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se Comassie blue (Bio Rad). O IRE presente na molécula de RNA mensageiro da cadeia pesada da ferritina foi utilizado como controle positivo (49).

Para geração das sondas de RNA mensageiro, oligonucleotídeos de aproximadamente 50pb, contendo sequência de reconhecimento da enzima T7 polimerase (sobrescrito) (49), foram anelados em solução composta de 50 μ M de NaCl e 1mM de EDTA pH 7, incubando-se a reação por 5 minutos a 95°C em banho seco, seguido de incubação à temperatura ambiente por 2 horas. As sondas utilizadas foram:

AHSP_Humano WT: 5' CAATAAAGACCAGTGCTGGTTTTGTTGTATAGTGAGTCGTATTA 3'
 AHSP_Humano MT: 5'CAATGAGTACCAGTGCTGGTTTTGTTGTATAGTGAGTCGTATTA 3'
 AHSP_Camundongo: 5' – TGTGCTGTACTTTGACATGCCAATATATAGTGAGTCGTATTA – 3'
 Ferritina: 5'– GGATCCTGCTTCAACAGTGCTTGGACGGATCCTATAGTGAGTCGTATTA – 3'

Sondas radioativas utilizando [α -³²] UTP, bem como sondas sem marcação foram sintetizadas utilizando-se T7 RNA polimerase (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante. *Electrophoretic mobility-shift assay* (EMSA) foi realizado utilizando-se 20µg de extratos citoplasmáticos e 0.5µg de sonda. As reações foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 6%. Após seco, o gel foi exposto em filme fotográfico por período 5 horas.

8 – Construção dos plasmídeos AHSP-IRE-WT e AHSP-IRE-MT

Fragmentos de cDNA de aproximadamente 600pb, referentes aos RNA mensageiros (3 éxons) dos genes AHSP WT e AHSP N75I, foram clonados em vetor de tipo pEF1α neo (Invitrogen) e em vetor tipo pTet-Splice (Invitrogen) respectivamente.

Os plasmídeos foram transfectados em bactéria da linhagem DH5α, e a confirmação das seqüências de nucleotídeos foi realizada por seqüenciamento automático. Os *primers* utilizados para a amplificação do fragmento de DNA foram:

AHSP_IRE_F 5'-ACAGAGAGATTACGCACC-3'
 AHSP_IRE_WT_R 5'-CAACAA AACCAGCAGTGGTCTTTATTGAGG -3'
 AHSP_IRE_MT_R 5'-CAACAAAACCAGCAGTGGTACTCATTGAGG-3'

9 - Análise de ligação de proteínas pela técnica de RNA IP

Células de linhagem de carcinoma mamário (HeLa) resistentes ao antibiótico tetraciclina (65) foram transfectadas (5×10^5 células/ml) com 6µg do plasmídeo pTet-Splice (Invitrogen) contendo as seqüências para AHSP-IRE-WT e AHSP-IRE-MT, em placas de cultura de 60mm. As transfecções foram realizadas utilizando-se o reagente FUGene (Roche) de acordo com instruções do fabricante.

Após 4 horas de transfecção as células foram incubadas por 24 horas em meio DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino e antibiótico, na ausência de tetraciclina, com a finalidade de proporcionar a expressão do gene AHSP, na presença de Desferal (100 μ M) e/ou Citrato de Ferro(III) (1mM).

Após 24 horas, as células foram removidas da placa e lavadas 2 vezes com PBS gelado. O pellet celular foi tratado com 3 volumes do tampão de lise (15mM Tris-HCl pH 7.4, 15mM MgCl₂, 150mM NaCl e 0.65% Igepal) por 10 minutos, em gelo, para geração de extrato protéico. O drebid celular foi removido por centrifugação à 13000RPM por 5 minutos. 100 μ l de proteína A *beads* (previamente lavadas 3 vezes em PBS) foram incubadas com 250mg de anticorpos anti-IRP1 e anti-IRP2 por 1 hora à 4°C com constante agitação e posteriormente lavadas duas vezes com PBS gelado, para remoção de anticorpos não-incorporados às *beads*.

2.1mg de extrato protéico diluído em tampão de ligação (20mM Hepes pH 7.9, 150mM NaCl, 0.05% Triton-X e RNaseOut 0.15U/ μ l) foram adicionados às *beads* pré-conjugadas com os anticorpos e incubadas novamente por 1 hora a 4°C, em constante agitação. Após incubação, as *beads* foram lavadas duas vezes com tampão de ligação e duas vezes com tampão de lavagem (20mM Hepes pH 7.9, 150mM NaCl, 1% Triton-X e RNaseOut 0.15U/ μ l). A eluição do RNA foi realizada a partir da incubação das *beads* com tampão de eluição (100mM Tris-HCl pH 7.4, 12.5mM EDTA, 150mM NaCl e 1% SDS) a 100°C, por 3 minutos (65).

O RNA foi purificado utilizando-se Trizol (Invitrogen) de acordo com instruções do fabricante, e precipitado utilizando-se 20 μ g de glicogênio. Dos 20 μ l de H₂O com DEPC utilizados para ressuspender o pellet de RNA, 5 μ l foram utilizados para síntese de cDNA utilizando-se o kit SuperScript II (Invitrogen). A quantificação do RNA precipitado pelos anticorpos foi feita através de PCR em tempo real.

10 - Quantificação da estabilidade do RNA mensageiro

Células do tipo K562 foram cultivadas em meio de cultura IMDM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal. A indução da produção de hemoglobina nestas células ocorreu do tratamento das células com Hidroxiuréia (Sigma) por 48 horas. Como indicado, Desferrioxamina (100 μ M - Novarts) ou Citrato de Ferro(III) (1mM – Sigma) foram adicionados às células por 16 horas antes da adição do inibidor de transcrição. Actinomicina-D (Sigma – 5 μ M/ml) foi adicionada ao meio de cultura para inibição da transcrição.

As células foram então lavadas duas vezes em tampão PBS gelado e a extração de RNA total foi realizada utilizando-se Trizol (Invitrogen). cDNA foi sintetizado utilizando-se SuperScriptII (Invitrogen). Os níveis da molécula de RNA mensageiro do gene AHSP foram quantificados em três diferentes experimentos utilizando-se PCR em tempo real. GAPDH foi utilizado como controle interno, uma vez que este transcrito é estável na presença/ausência de ferro (16). Os níveis de RNA dos genes *c-myc*, receptor de transferrina, considerados RNAs instáveis (49, 66) e do gene das globinas, considerado RNA estável (66) foram quantificados como controles intra-experimento.

A estabilidade do RNA das construções AHSP IRE-WT e AHSP IRE-MT foi analisada transfectando células COS-7 (linhagem celular de rim de macaco). Células COS-7 foram cultivadas em meio de cultura tipo DMEM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal. Os plasmídeos contendo AHSP IRE-WT e AHSP IRE-MT foram produzidos clonando a região codificadora do gene AHSP em plasmídeo pEF1- α^{NEO} . 3 μ g de plasmídeo foram utilizados para transfecção. As transfecções foram realizadas utilizando-se o reagente FUGene (Roche) de acordo com instruções do fabricante. O tratamento das células, extração de RNA e a PCR em tempo real foram realizados como descrito anteriormente.

11 – Indução de camundongos ao excesso de Ferro

Camundongos da linhagem C57/Bl6, com aproximadamente 6 a 8 semanas, foram tratados com 100µl de solução salina (grupo controle) ou com 10mg de Ferro Dextran por dia, via injeção intra-peritoneal (INFeD). Após 10 dias de tratamento os animais foram sacrificados, e fêmur, baço e fígado foram removidos.

Os fêmures foram lavados com 1X PBS para remoção das células da medula óssea. Baço e fígado foram fixados em paraformaldeído e submetidos a cortes histológicos e coloração de Azul da Prússia para confirmação do acúmulo de ferro. Os eritrócitos presentes na medula óssea foram marcados utilizando-se *beads* conjugadas com marcador específico para esta linhagem (MACS) e então selecionados através de separador automático (autoMACS). As células foram então lavadas duas vezes em tampão PBS gelado e a extração de RNA total foi realizada utilizando-se Trizol (Invitrogen). cDNA foi sintetizado utilizando-se SuperScriptII (Invitrogen). Os níveis de RNA foram determinados a partir de PCR em tempo real.

12 – Tratamento de células da linhagem G1E-ER4 com ferro(III)

Células da linhagem G1E-ER4 (7, 67) foram previamente tratadas por 24 horas na presença, ou ausência de Citrato de Ferro(III) (1mM). Após este período, as células foram induzidas à diferenciação através da adição do hormônio estradiol, que proporcionou a expressão do gene GATA-1 e promoveu a diferenciação das células em linhagem eritróide.

Nos tempos determinados, as células foram coletadas e lavadas duas vezes com 1X PBS. $\frac{1}{10}$ das células foram utilizadas para confecção de lâminas para análise morfológica, que foram coradas com corante Wright-Giemsa.

O restante foi submetido à extração de RNA total, utilizando-se o reagente Trizol, de acordo com as instruções dos fabricantes. cDNA foi sintetizado utilizando-se SuperScriptII (Invitrogen). Os níveis de RNA foram determinados através da técnica de Northern blot.

13 - Análise de ligação de proteínas pela técnica de Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

Células do tipo K562 foram cultivadas em meio de cultura IMDM (Invitrogen) suplementado com 10% de soro bovino fetal. A indução da produção de hemoglobina nestas células decorreu do tratamento das células da linhagem K562 com Hidroxiuréia (Sigma) por 48 horas. Como indicado, Succinil acetone (100mM) ou Hemina (50μ) foram adicionados às células nos tempos determinados e, após o tratamento, as células foram lavadas duas vezes em tampão PBS gelado.

A técnica de ChIP foi realizada como descrito na literatura (68). Células, após remoção dos resíduos do meio de cultura, foram submetidas ao *crosslink* do complexo DNA/proteína a partir da adição de Formaldeído por 10 minutos. A interrupção do *crosslink* ocorreu pela adição de glicina a células e incubação por 5 minutos. Após lise celular e nuclear, o DNA foi sonicado e incubado com os específicos anticorpos incorporados em *beads*, por 16 horas.

As *beads* contendo a composição DNA/proteína/anticorpo foram lavadas e, após a eluição do DNA destas, foi realizada purificação por fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Após a purificação do DNA, os fragmentos de DNA precipitados a partir da ligação dos fatores de transcrição Bach1 e Nrf2 foram analisados por PCR em tempo real, utilizando-se conjuntos de *primers* cobrindo uma região de aproximadamente 4kb, constante do gene AHSP mais aproximadamente 2kb antes da região de início da transcrição e 2kb depois da região de início de transcrição.

14 – Extração de RNA nuclear

Células (1×10^7 células) foram lavadas duas vezes com 1X PBS gelado e incubadas com 3 volumes do tampão de lise nuclear (10mM Tris-HCl pH 7.4, 10mM NaCl, 3mM MgCl₂, 0.5%NP-40) por 5 minutos em gelo. Após incubação as células foram centrifugadas por 2000RPM por 1 minuto e o sobrenadante (extrato citoplasmático) foi removido (69).

O pellet nuclear foi lavado duas vezes com 1X PBS gelado e ressuspendido em Trizol. 5 a 10µg de RNA nuclear foi submetido a eletroforese em gel desnaturante para quantificação da expressão gênica pela técnica de Northern.

15 - Northern-blot

5 a 15µg de RNA foram aplicados em gel de agarose suplementado com formaldeído. A eletroforese ocorreu utilizando-se tampão 1X MOPS a 70 volts por aproximadamente 4 horas, e transferência do RNA para membrana de nylon ocorreu por 16 horas utilizando-se tampão 20X SSC.

Após transferência, a membrana foi lavada duas vezes a temperatura ambiente com tampão 5X SSC, e uma vez com tampão 5X SSC, 1%SDS, 65°C, para remoção do excesso de formaldeído e brometo de etídeo. A pré-hibridização ocorreu em tampão 5X SSC, 1%SDS suplementado com 100ng de DNA de espermatozoides de salmão, à 65°C por 6 a 8 horas.

A hibridização ocorreu utilizando-se o mesmo tampão, adicionado de sonda radioativa específica para o gene AHSP, por aproximadamente 16 horas. A marcação da sonda foi realizada utilizando-se o reagente High primer (Roche) e [α^{32}]P-dCTP. Duas lavagens a 65°C com tampão 2X SSC foram realizadas e, então a membrana foi exposta em filme fotográfico por 3 a 5 horas.

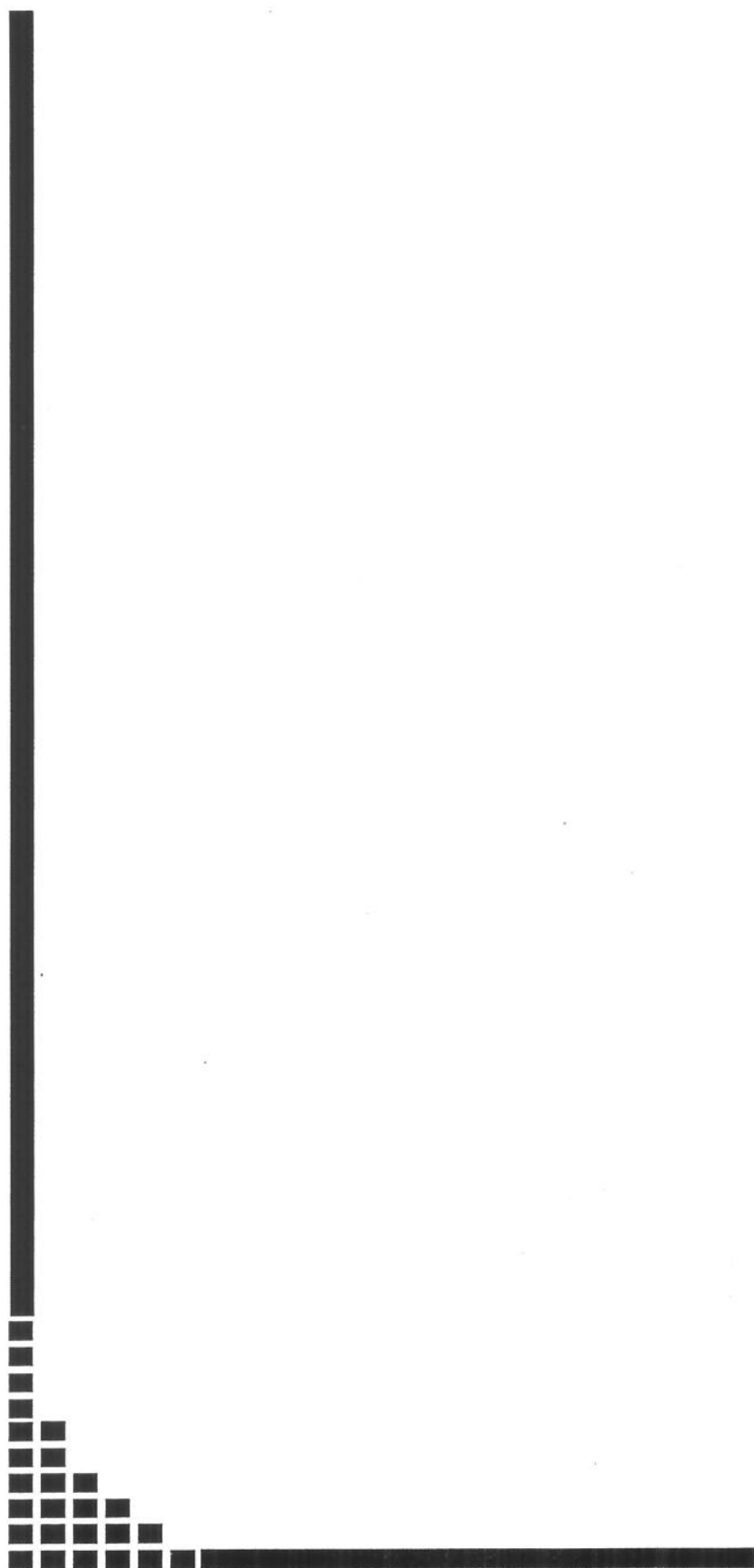
16 - PCR em tempo real

Tanto as análises de real-time para quantificação da expressão gênica como as análises de real-time para a técnica de ChIP foram realizadas em placas de 384 *wells* (Applied Biosystems) em equipamento SDS-7900HT (Applied Biosystems).

Todas as reações foram realizadas utilizando-se SYBR Green PCR Máster Mix (Applied Biosystems). Em todas as reações foram utilizadas curvas padrão e derivação da

fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. Segue abaixo a relação dos *primers* utilizados nas metodologias acima citadas: (h) *primers* utilizados em experimentos com células de humanos; (m) *primers* utilizados em experimentos com células de murinos;

hAHSP_RT	F - 5'-CAATAAGGATCTCATTTCCG-3'	R - 5'-GAGGATCATTGAAGACCTGCTGA-3'
hGAPDH_RT	F - 5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'	R - 5'-CCAGGCGCCCAATACG-3'
hc-myc_RT	F - 5'- ACCAGATCCCGGAGTTGGA-3'	R - 5'-CGAGTCCGAGGAAGGAGAGA-3'
h α -globin_RT	F - 5'- GTTAAGGGCCACGGCAAGAA-3'	R - 5'- GGCTTAGGAGGTTGAAGTTG-3'
hFerritin_RT	F - 5'- AACATGCTGAGAACTGATG-3'	R - 5'- GCACACTCCATTGCATTGAGC-3'
cosGAPDH_RT	F - 5'-TGTGGTAAAGTGGATATTGTTG-3'	R - 5'- TGGGTGGAATCATACTGGAACA-3'
hTfR_RT	F - 5'- AGATTTTCGGGAATGCTGAGAAA-3'	R - 5'-AGGGAGAGAGGAAGTGATAC-3'
mAHSP_RT	F - 5'-GCCATGACAGAATTCCAGCCA-3'	R - 5'-TTTGGACTTCAGAAAGGTCTGTAT-3'
mGAPDH_RT	F - 5'-AGGTTGTCTCCTGCGACTTCA-3'	R - 5'-CCAGGAAATGAGCTTGACAAAG-3'
m β -globina_RT	F - 5'- AACGATGGCCTGAATCACTTG -3'	R - 5' -AGCCTGAAGTTCTCAGGATCCA-3'
m α -globina_RT	F - 5'- CCACCCTGCCGATTTTAC -3'	R - 5'- CTCACAGAGGCAAGGAAGTTGTC -3'
mTfR_RT	F - 5'-TGGAGTATCACTTCCTGTGCG -3'	R - 5'- TGAGAGAGTGTGAGAGCCAGAGC -3'
ChIP_hAHSP#1	F - 5'-GGAGTGCAGTGGCGTGATC-3'	R - 5'-GGCTGAGGCAGGAGAATCG-3'
ChIP_hAHSP#2	F - 5'-TGCATCCATACAATGCAATGTG-3'	R - 5'-TTTTGGTCAGCATGATGTTCTTG-3'
ChIP_hAHSP#3	F - 5'-TGGGAGAATCATTGCGATCA-3'	R - 5'-GGGCATGTTCTGCTTTTTG-3'
ChIP_hAHSP#4	F - 5'-GGCACTATTCTAGTATTCCCG-3'	R - 5'-CAGAGACGAGAGGATCATTG-3'
ChIP_hAHSP#5	F - 5'-AAGTCTCCAGTCTTGTTATCCT-3'	R - 5'-AGAGTCCGAAGATCCTAGAATGTAGTTT-3'
ChIP_hAHSP#6	F - 5'-ACGCTCCGGTGCCTTATG-3'	R - 5'-TGTAACAACCTATTTGCACAGCATTG-3'



RESULTADOS

1 – Análise do polimorfismo N75I no gene AHSP

Foi com base na hipótese de que variação nos níveis de expressão gênica e/ou alteração da conformação protéica da proteína AHSP poderiam estar relacionados com variabilidade clínica em β -talassemia, que primeiramente decidimos examinar a sequência de nucleotídeos do gene AHSP. Em nosso trabalho prévio, 88 amostras de DNA de pacientes brasileiros com β -talassemia foram analisadas e a detecção do polimorfismo N75, na posição 12888 da sequência de DNA do gene AHSP, só foi possível em três diferentes casos de pacientes com talassemia:

Caso 1: Paciente adulto heterozigoto para β -talassemia (β^{39}/β^A) e heterozigoto para o polimorfismo N75I no gene AHSP, com um quadro de anemia grave e freqüentes eventos transfusionais. A mãe do paciente apresentou β -talassemia em heterozigose e sequência gênica normal para o gene AHSP, com leve anemia; o pai do paciente apresentou sequência gênica normal para o gene β -globina e presença em heterozigose do polimorfismo N75I no gene AHSP.

Caso 2: Paciente heterozigoto para β -talassemia (β^{39}/β^A) e heterozigoto para o polimorfismo N75I no gene AHSP, com anemia acentuada. Co-herança de três genes α -globinas foi detectado. Dois irmãos e um filho apresentaram as mesmas características. A filha não apresentou mutações no gene β -globina e não apresentou mutações no gene AHSP.

Caso 3: Dois irmãos (um irmão e uma irmã) homozigotos para β -talassemia ($\beta^{-89}/\beta^{IVS1-6}$) e heterozigotos para o polimorfismo N75I no gene AHSP com fenótipo de talassemia intermediária.

Tabela 2 – Dados hematológicos de pacientes com β -talassemia e com o SNP N75I no gene AHSP

Indivíduos	β -globina	AHSP	Hb (g/dL)	MCV (fL)	MCH (pg)	Ret (%)	HbA2 (%)	HbF (%)	α -globina
Caso 1									
Paciente	β^{39}/β^A	N75I/N75N	6.8	67	19	10.4	4	5.2	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Mãe	β^{39}/β^A	N75N/N75N	10.8	63	19.7	*	5.7	0.7	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Pai	β^A/β^A	N75I/N75N	14.5	89.6	29.7	*	2.0	0.2	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Caso 2									
Paciente	β^{39}/β^A	N75I/N75N	9.4	59	20.7	1.86	4.8	2.6	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Irmão	β^{39}/β^A	N75I/N75N	11	65.1	20.4	2.29	4.7	3.3	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Irmã	β^{39}/β^A	N75I/N75N	10.9	61.1	19.2	3.18	5.0	3.9	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Filho	β^{39}/β^A	N75I/N75N	13.8	61.1	20.2	1.56	4.9	1.2	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Filha	β^A/β^A	N75N/N75N	14.4	88.4	29.9	1.52	2.9	0.9	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Caso 3									
Paciente	$\beta^{-88}/\beta^{1VS1-6}$	N75I/N75N	7.2	77	22.8	4.2	6.7	4.3	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Paciente	$\beta^{-88}/\beta^{1VS1-6}$	N75I/N75N	7.3	73	21.3	13.7	3.2	3.2	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$

“ β^A ” significa alelo normal para o gene β -globina; “ $\alpha\alpha\alpha$ ” significa um gene α -globina triplicado; “*” significa níveis dentro dos padrões normais de reticulócito; “N” significa alelo normal para o gene AHSP.

A paciente indicada como caso 1 apresenta anemia acentuada divergente do proposto pelo genótipo do gene β -globina, que indica somente 1 alelo para β -talassemia. As análises do gene α -globina não demonstraram triplicação deste gene. Os níveis de hemoglobina considerados habituais em casos de traço talassêmico variam entre 10.5g/dL a 11.5g/dL, similares aos níveis de hemoglobina apresentados pela mãe, considerada traço talassêmico. Os dados apresentados nesta família indicam fortemente que o polimorfismo N75I no gene AHSP pode estar relacionado com a gravidade clínica da paciente. Nos casos 2 e 3 esta sugestão não é claramente indicada. No entanto, deve ser observado que os dois pacientes do caso 3 apresentam níveis de hemoglobina inferiores aos sugeridos pela literatura.

No decorrer do presente trabalho, uma nova análise do gene AHSP foi realizada utilizando amostras de DNA de indivíduos anônimos provenientes de países com alta incidência de β -talassemia. A análise dos sítios polimórficos no gene AHSP demonstrou vários SNPs descritos na literatura (38, 40). É importante observar que o polimorfismo N75I no gene AHSP foi observado somente em um indivíduo de origem brasileira.

Desta análise foi possível a elaboração de 19 haplótipos a partir da associação dos 7 polimorfismos mais freqüentes: 11943 (A-G), 12020 (T¹⁸ – T¹⁵), 12347 (G-A), 12391 (G-A), 12985 (G-T), 12888 (A-T) e 12991 (T-C). A posição dos nucleotídeos refere-se à sequência do gene AHSP depositada no *Genebank* sob número de acesso AC 106 730.2.

Tabela 3 – Análise dos haplótipos do gene AHSP em diferentes etnias

		Frequência dos Haplótipos (%)						
Haplótipos	Sequências	AC (n=96)	AI (n=100)	B ^{CTRL} (n=252)	B ^{THAL} (n=176)	M (n=92)	NG (n=100)	P (n=92)
H1	A18GGGAT	39.4	23.5	56.4	51.0	44.6	21.0	13.3
H2	G15GGGAT	7.4		2.7				1.1
H3	A18GGGTT			0.9	1.3			
H4	A18AGGAT	3.2		21.8	30.5	37.5	6.0	7.8
H5	G15AGGAT	4.3						1.1
H6	A18GGGAC	2.1			1.3			
H7	G15GGGAC					1.8		
H8	A18AGGAC				1.3	1.8	1.0	1.1
H9	G15GAGAT	1.1		3.6			3.0	
H10	A18GAGAT			0.9		1.8	5.0	1.1
H11	A18AAGAT			1.8	0.7			
H12	A18GGTAT	3.2						
H13	G15GGTAT	14.9	25.0	4.5	1.3			
H14	G15GATAT	9.6	2.9	6.4	3.3		47.0	62.2
H15	A18GATAT	3.2		0.9		8.9		
H16	A18AGTAT	1.1		0.9	2.6	1.8		
H17	A18AATAT				1.3	1.8		
H18	G15AATAT	6.4	48.5		4.6		15.0	12.2
H19	G15AGTAT	4.3			0.7		2.0	

NG, Nova Papa Guine; M, Mediterrânea; AI, Asiática; PO, Port Olry (Ilha de Vanatu, Oceania); AC, Afro-caribenhos; Br^{ctl}, brasileiros controles; Br^{tal}, pacientes com β -talassemia.

O primeiro nucleotídeo e posições referem-se aos dados fornecidos pelo Genebank número de acesso AC 106730.2.

N significa a quantidade de alelos seqüenciados em cada população

Os haplótipos H7, H8 e H19 foram detectados exclusivamente em amostras de DNA provenientes do Mediterrâneo, Brasil e Ásia, respectivamente, e o haplótipo H4 foi o único presente em todas as populações analisadas. Dois haplótipos foram presentes somente em amostras de pacientes com β -talassemia: H17 e H18.

De forma interessante, o haplótipo H3 que representa o alelo com o polimorfismo N75I, foi detectado exclusivamente na população de controles e pacientes provenientes do Brasil, sugerindo um haplótipo ancestral em comum nesta população. Esta sugestão fica mais evidente quando a ancestralidade dos pacientes com talassemia e do indivíduo controle foram analisadas. Em todas as situações, os indivíduos apresentaram ancestrais provenientes de Portugal e Itália.

Uma vez que o polimorfismo N75I foi encontrado em pacientes com β -talassemia com evolução clínica mais grave do que o esperado, resolvemos estudar, através de ensaios com proteína recombinante, se a alteração de uma asparagina (N) por uma isoleucina (I) na cadeia polipeptídica da proteína AHSP poderia alterar a função estabilizadora de cadeias α -globina.

Entretanto, antes de iniciar os estudos com a proteína recombinante, hemácias de indivíduos saudáveis e heterozigotos para o polimorfismo N75I no gene AHSP foram analisadas (n=2). Como já descrito por Kong e colaboradores (27), células de camundongos com ausência de uma ou de ambas as cópias do gene AHSP apresentam precipitação de cadeias globina, denominados corpos de inclusão. Dessa forma, se o polimorfismo N75I estiver alterando a estrutura da proteína AHSP ou a afinidade à α -globinas, precipitados de cadeias globínicas na membrana de hemácias deverão ser observados. Como controles foram corados eritrócitos de cinco indivíduos normais para o gene AHSP e para o gene β -globina (figura 4).

Somente os eritrócitos provenientes do indivíduo com o polimorfismo N75I demonstraram corpos de inclusões num padrão heterocelular, sugerindo precipitação de cadeias globínicas nas células.

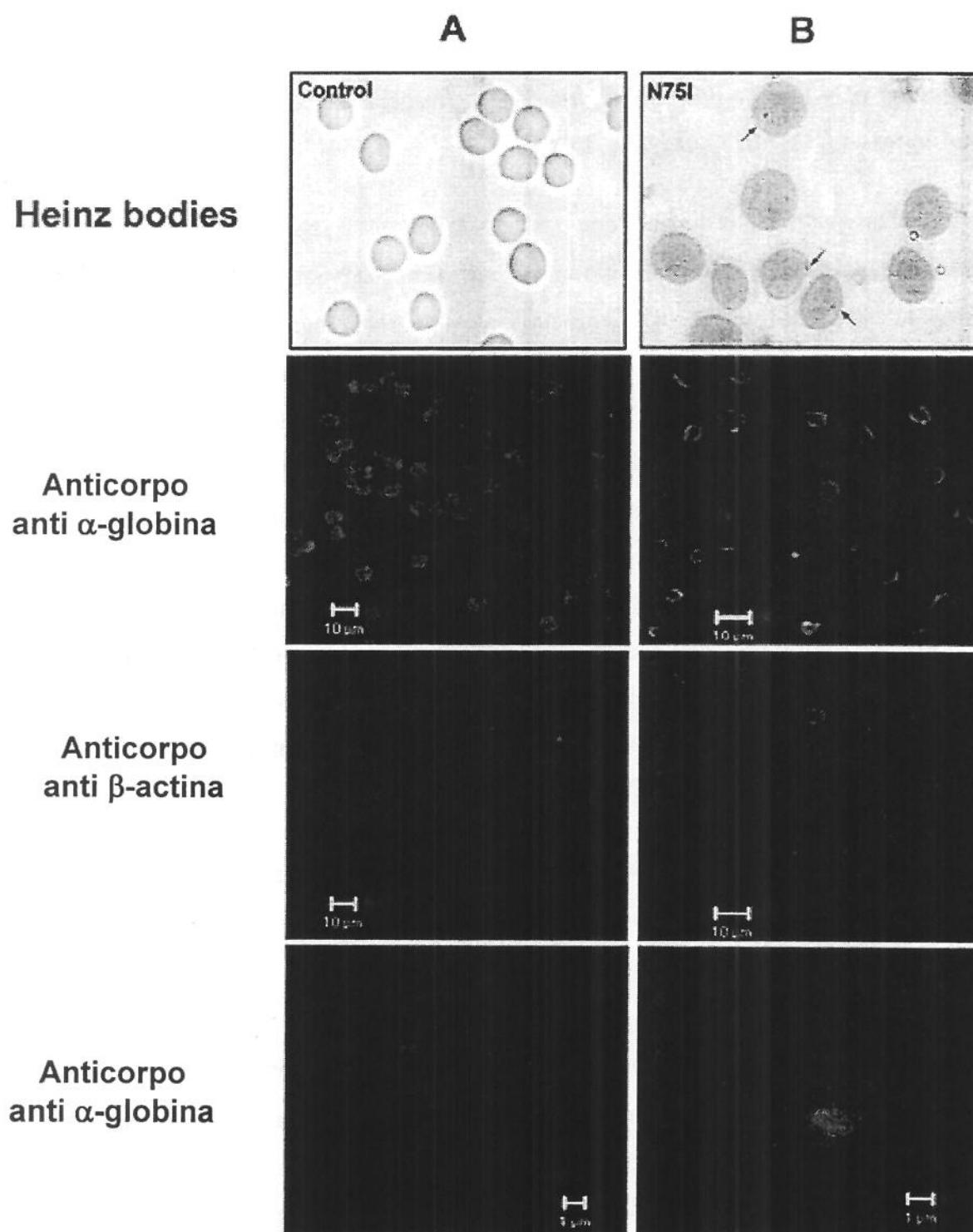
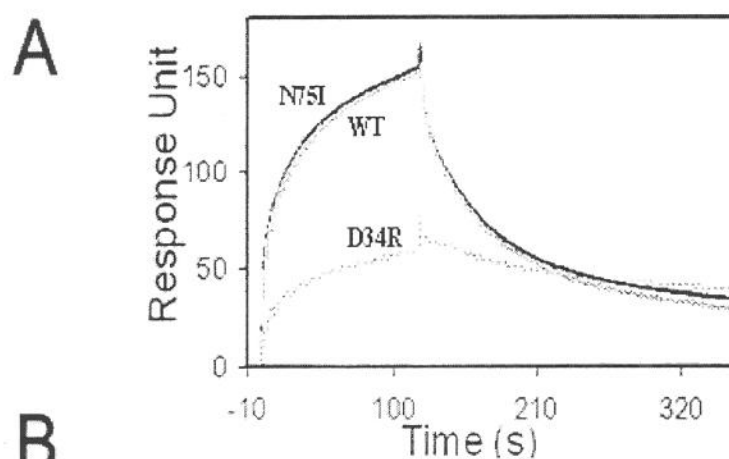


Figura 4 – Análise de corpos de inclusão em células normais e positivas para o polimorfismo N75I no gene AHSP – Painel Superior - lâminas de eritrócitos de indivíduo controle (A) e eritrócitos de indivíduo positivo para o polimorfismo no gene AHSP (B) corados com solução de Violeta de Metila. Outros painéis – lâminas de eritrócitos indivíduo controle (A) e eritrócitos de indivíduo positivo para o polimorfismo no gene AHSP (B) analisados pela técnica de imunofluorescência. Imagens capturadas pelo software Image Pro-Express 4.0 (Media Cybernetic, LP).

Mas, qual seria o impacto que o SNP N75I estaria causando na proteína AHSP que levaria à precipitação de cadeias globínicas nas hemácias? Sabe-se que a proteína AHSP apresenta duas funções vitais nos eritrócitos: além da AHSP ligar-se a cadeias α -globinas e prevenir a precipitação desta em precursores eritróides, AHSP também é capaz de bloquear a oxidação da α -globina (26, 27, 36, 37). Na tentativa de analisar quais destas funções poderiam estar sendo modificadas pelo polimorfismo N75I experimentos com proteínas recombinantes foram realizados. Para tanto, sangue dos indivíduos positivos para o polimorfismo N75I foi coletado para extração de RNA e síntese de cDNA. Um fragmento de aproximadamente 500pb foi amplificado do cDNA e clonado em vetor TOPO (Invitrogen). Após o seqüenciamento, os clones positivos para AHSP-N75I foram digeridos para extração do fragmento de interesse que foi, então, clonado em vetor de expressão pGex (Invitrogen). A transformação de bactérias de linhagem BL21-DE3 permitiu a superexpressão da proteína AHSP-N75I.

A interação entre as proteínas AHSP e α -globina pode ser avaliada pela taxa de oxidação do grupo heme, por meio de mudanças espectrométricas ocorridas na presença de H_2O_2 . Neste estudo foram avaliadas as seguintes interações: AHSP-WT- α -globina-Fe(II), AHSP-N75I- α -globina-Fe(II) e AHSP-D34R- α -globina-Fe(II), que conhecidamente apresenta redução de ligação com α -globina. Os resultados obtidos demonstraram que AHSP-WT e AHSP-N75I apresentam a mesma capacidade de ligação com α -globina, uma vez que não foi observado o rápido declínio da absorbância (referida como unidade de resposta). Já a proteína AHSP-D34R-Fe(II), que apresentava perda da capacidade de ligação com α -globina, demonstrou um declínio considerável da absorbância (figura 5a).

Análise da ligação AHSP - α -globina



B

Análise da produção de Espécies Reativas de Oxigênio por α -Hb

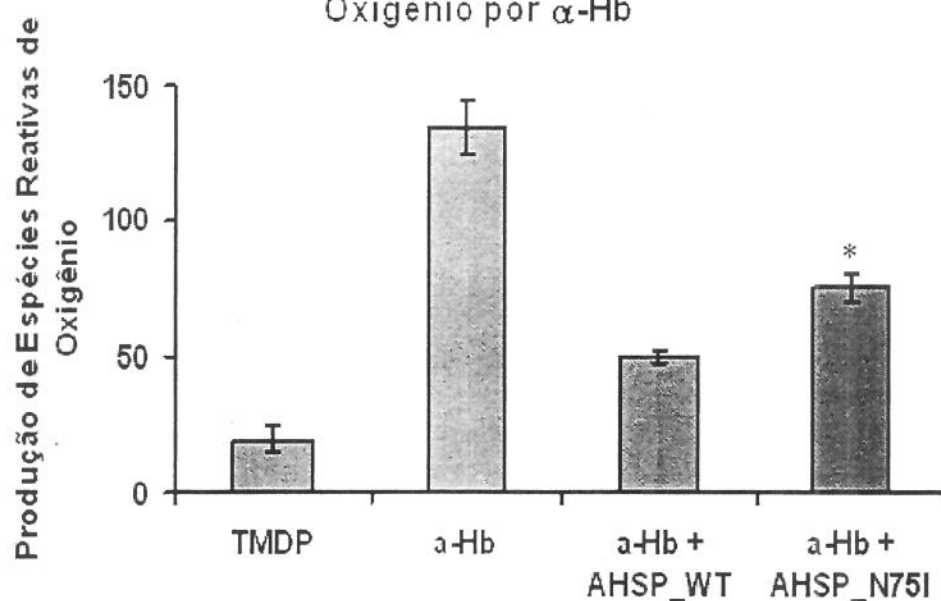


Figura 5 – Estudos utilizando proteína recombinante AHSP N75I – (A) estabilidade do grupo heme nos complexos AHSP-WT- α -globina-Fe(III), AHSP-N75I- α -globina-Fe(III) e AHSP-D34R- α -globina-Fe(III) após exposição a H_2O_2 . **(B)** Produção de oxidantes secundários durante incubação na presença de H_2O_2 e do corante TMDP. Valores coletados da leitura colorimétrica a 610nm em leitor de Elisa. α -Hb - α -globina. * $p < 0.05$.

Com relação à função protetora de AHSP contra a geração de espécies reativas de oxigênio, esta pôde ser estimada por meio da quantificação da oxidação do grupo heme. Os complexos AHSP-WT- α -globina-Fe(II), AHSP-N75I- α -globina-Fe(II) e α -globina livre foram incubados na presença de H₂O₂ e do corante TMPD. A alteração na cor do corante foi medida por leitor de Elisa, de 15 em 15 segundos, durante uma hora. Os resultados indicaram que o complexo AHSP-N75I- α -globina-Fe(II) apresentou menor capacidade de proteger as cadeias α -globina de gerar espécies reativas de oxigênio (figura 5b).

Em suma, os resultados obtidos com a proteína recombinante AHSP-N75I indicam uma perda parcial da função protetora contra geração de espécies reativas de oxigênio. Este fato poderia explicar o aparecimento dos corpos de inclusão visualizados em células positivas para o polimorfismo N75I.

2 – Presença de estrutura secundária na posição 3'-UTR do gene AHSP pode estar relacionada à estabilidade do RNA dependente da concentração de ferro

Durante a fase de análise da composição de nucleotídeos do gene AHSP, a sequência de 6 nucleotídeos na posição 3'-UTR do gene nos chamou atenção. A sequência de CAGTGC é conhecida por fazer parte do *stem-loop* encontrado em RNAs mensageiros de proteínas envolvidas na resposta aos níveis corpóreos do íon ferro. Este *stem loop* é denominado “Elemento Responsivo a Ferro” (IRE). IREs são estruturas secundárias formadas por aproximadamente 25-35 nucleotídeos com 6 nucleotídeos principais, responsáveis pela formação do *loop* da estrutura. Estes *stem-loops* são reconhecidos por proteínas denominadas IRPs na resposta a concentração de ferro (47). Dependendo de sua localização na molécula de RNA o IRE pode apresentar duas funções distintas (49):

a- IREs posicionados na porção 5'-UTR do RNA mensageiro regulam a síntese de proteínas na presença de níveis elevados de ferro, como por exemplo RNA mensageiro do gene da ferritina, molécula de estoque de ferro. Na presença de altas concentrações de ferro não há a ligação das proteínas IRP ao *stem-loop*, o que favorece a ligação dos ribossomos ao RNA mensageiro e a síntese da proteína;

b- IREs posicionados na porção 3'-UTR do RNA mensageiro estão relacionados à estabilidade da molécula, como por exemplo RNA mensageiro do gene do receptor de transferrina, que promove o influxo de ferro nas células. Na presença de altas concentrações de ferro não há a ligação das proteínas IRP ao *stem-loop*, deixando expostos sítios de RNases, que degradam o RNA mensageiro.

Para a avaliação da formação de estrutura secundária no RNA mensageiro do gene AHSP foi utilizado o software RNAProfile (70). Este software apresenta a vantagem de prever estruturas secundárias típicas e não típicas, de acordo com a semelhança aos IREs presentes nos RNAs dos genes receptor de transferrina e ferritina (figura 6a). Três pré-requisitos básicos são necessários para a caracterização de um IRE típico: 1) presença de um *loop* formado por 6 nucleotídeos, onde os nucleotídeos de número 1 e 5 devem obedecer ao pareamento segundo as leis de Watson e Crick (Cs pareiam com Gs, e As

pareiam com Ts); 2) presença de 5 nucleotídeos pareados formando o *stem* superior e, 3) um *C bulged* entre os *stems* superior e inferior (71).

Os resultados da análise da estrutura secundária presente no RNA do gene AHSP permitiram reconhecer que os IREs presentes na molécula de RNA do gene AHSP de humanos, macacos e cachorros enquadram-se na classe de IREs atípicos, uma vez que apresentam um *loop* composto de 4 nucleotídeos e um *bulged* A (figura 6b). Os IREs presentes na molécula de RNA do gene AHSP de camundongo e cachorro aproximam-se mais das formas conhecidas de IREs, apresentando *loop* de seis e cinco nucleotídeos, respectivamente, pareamento de acordo com as leis de Watson e Crick (figura 6b).

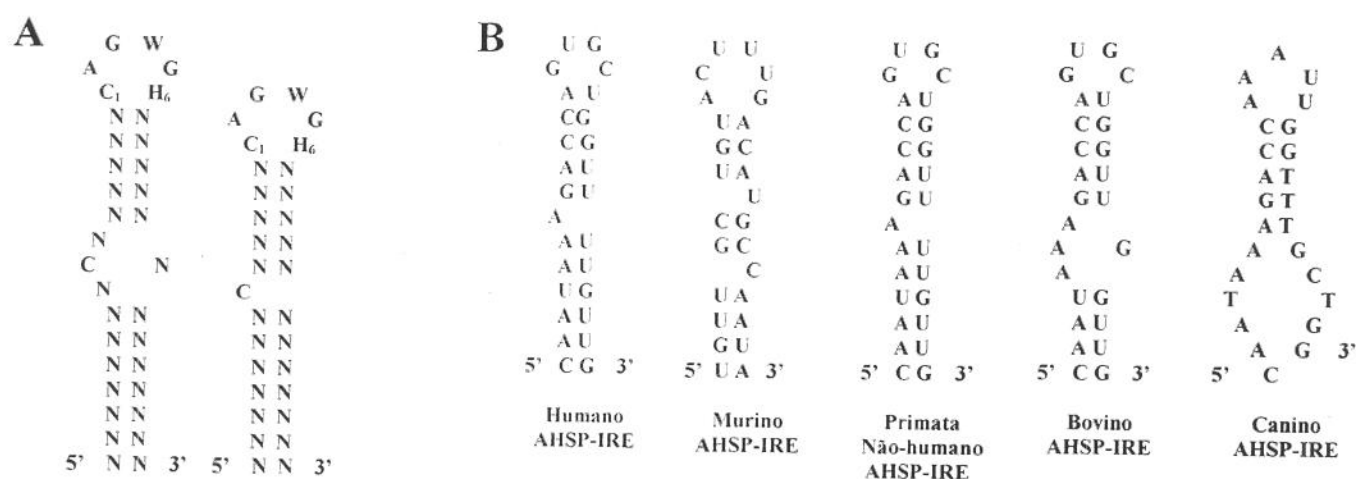


Figura 6 – Stem-loop na porção 3'-UTR do RNA mensageiro do gene AHSP sugere presença de elemento responsivo a ferro - (A) Representação da estrutura conservada para IREs. (B) Representação do possível *stem-loop* no gene AHSP de humanos, camundongos, macaco, boi e cachorro. A predição da estrutura secundária no RNA mensageiro do gene AHSP foi gerada utilizando-se o algoritmo descrito por Giulio et al (70).

Uma vez sugerida a presença de um elemento responsivo a ferro na molécula de RNA do gene AHSP, passamos a investigar a capacidade desse *stem-loop* ser reconhecido pelas proteínas reconhecedoras de IREs, denominadas IRPs, por meio da técnica de *EMSA* (figura 7).

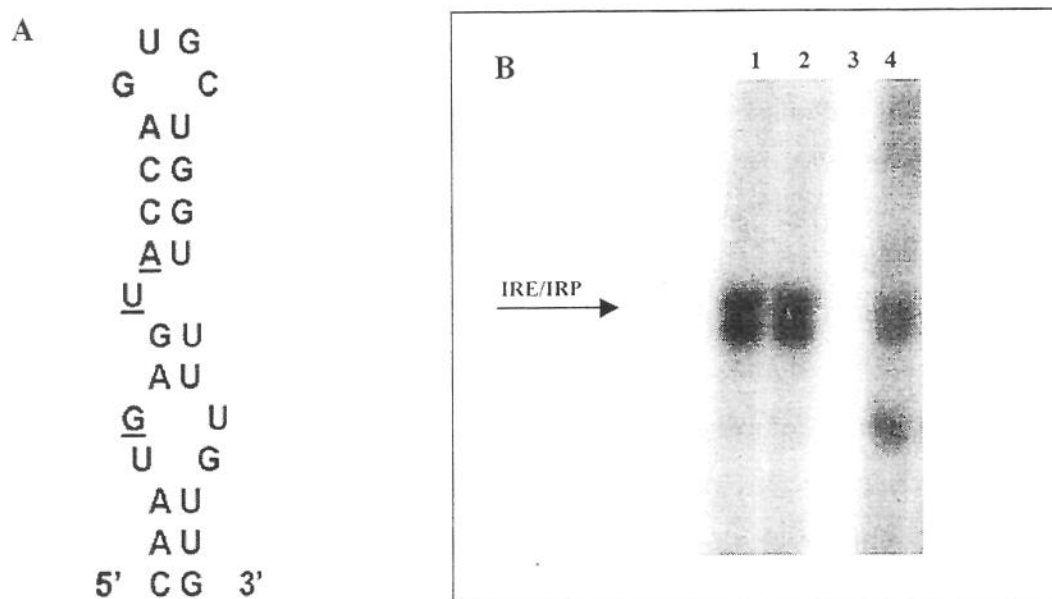


Figura 7 – Ligação específica de proteína presente em extrato protéico de células da linhagem K562 ao elemento responsivo a ferro presente em AHSP – Sondas de RNA sintetizadas *in vitro* (0.5µg), correspondentes à seqüência encontrada no RNA mensageiro do gene AHSP de humanos, um mutante com alteração de três nucleotídeos (A) e a seqüência de IRE do gene ferritina foram incubados com 20µg de extrato protéico total de células K562. As amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante. (B) coluna 1 – sonda para IRE de ferritina; coluna 2 – sonda para IRE^{WT} de AHSP; coluna 3 – branco; coluna 4 sonda para IRE^{MUT} de AHSP.

Utilizando sonda de RNA com aproximadamente 35 nucleotídeos, representando a sequência do IRE do gene AHSP de humano e extrato protéico total de células K562 – linhagem eritroleucêmica humana - foi possível a visualização de um padrão de migração similar ao visualizado com a sonda de controle positivo (ferritina IRE) (figura 7b). A construção de uma sonda mutante, modificando 3 nucleotídeos do IRE do gene AHSP de humanos (figura 7a) demonstrou menor afinidade de ligação com proteínas.

Dessa forma, podemos concluir que o atípico elemento responsivo ao ferro presente no gene AHSP de humanos é provavelmente reconhecido pelas mesmas proteínas que se ligam ao IRE presente na molécula de ferritina.

Uma vez que o reconhecimento de um IRE por proteínas do tipo IRPs depende da concentração de ferro na célula, resolvemos avaliar o padrão de ligação de IRPs ao possível IRE presente na molécula de RNA do gene AHSP de humanos, de acordo com a concentração de ferro. Células da linhagem K562 foram tratadas por 16 horas na presença de desferal (quelante de ferro) e ou hemina (como fonte de ferro). O resultado observado sugere que a estrutura secundária atípica presente no RNA mensageiro do gene AHSP é reconhecida por proteínas IRPs de acordo com os níveis de ferro: na presença de extrato protéico de células tratadas com hemina, perde-se totalmente a ligação proteína-*loop*, enquanto, em situações sem tratamento ou tratadas com desferal ainda existe a ligação (figura 8).

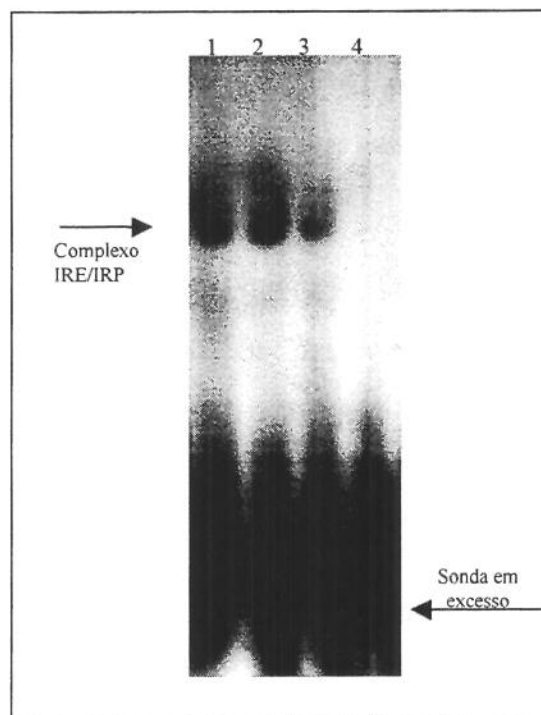


Figura 8 – Tratamento de células da linhagem celular K562 com heme como fonte de ferro reduz a ligação entre IRPs e IRE - Sondas de RNA sintetizadas *in vitro* (0.5µg), correspondentes à sequência encontrada no RNA mensageiro do gene AHSP de humanos foram incubadas com 20µg de extrato protéico total de células K562 sem tratamento (coluna 1), células K562 tratadas com 100µM de Desferal, como quelante de ferro (coluna 2), células K562 tratadas com 50µM de Hemina, como fonte de ferro (coluna 3). Coluna 4 – competidor não radioativo 100 vezes mais concentrado. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6% não-desnaturante.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO

Para análise da formação do complexo AHSP_IRE/IRPs *in vivo*, IRPs foram imunoprecipitadas a partir de extratos citoplasmáticos da linhagem celular Hela previamente transfectadas transitoriamente com plasmídeos contendo a sequência completa do cDNA do gene AHSP de humanos. Dessa forma, tanto IRPs como os RNAs reconhecidos por essas proteínas poderiam ser estudados. Após extração e purificação, a quantidade de RNA mensageiro dos genes AHSP, ferritina (controle positivo) e GAPDH (controle negativo) foi analisada através da técnica de PCR em tempo real.

Através da imunoprecipitação das IRPs foi possível a detecção de grande quantidade de RNA mensageiro dos genes AHSP e ferritina e pequenas quantidades de RNA mensageiro do gene GAPDH, confirmando a especificidade do experimento e a formação do complexo IRE-IRP no RNA mensageiro do gene AHSP. Entretanto, a formação do complexo RNA-Proteínas pelas proteínas IRP falhou na precipitação do RNA do gene AHSP contendo mutações no possível IRE (figura 9a).

O tratamento das mesmas células com DFO e/ou ferro (III), seguido da imunoprecipitação das IRPs, confirmou os dados obtidos pelos experimentos EMSA, demonstrando que a habilidade de reconhecimento de IREs pelas proteínas IRPs é dependente dos níveis de ferro na célula (figura 9b).

Levando em consideração que a presença de IREs na porção 3'-UTR da molécula de RNA está relacionada com a estabilidade da molécula de acordo com a concentração de ferro, foi sugerida a hipótese de que a estabilidade do gene AHSP poderia ser regulada através do sistema IRE/IRP. Dessa forma foram realizados experimentos bloqueando a transcrição em células K562 e analisando a estabilidade do RNA mensageiro do gene AHSP na presença de quelante de ferro e de fonte de ferro (figura 10).

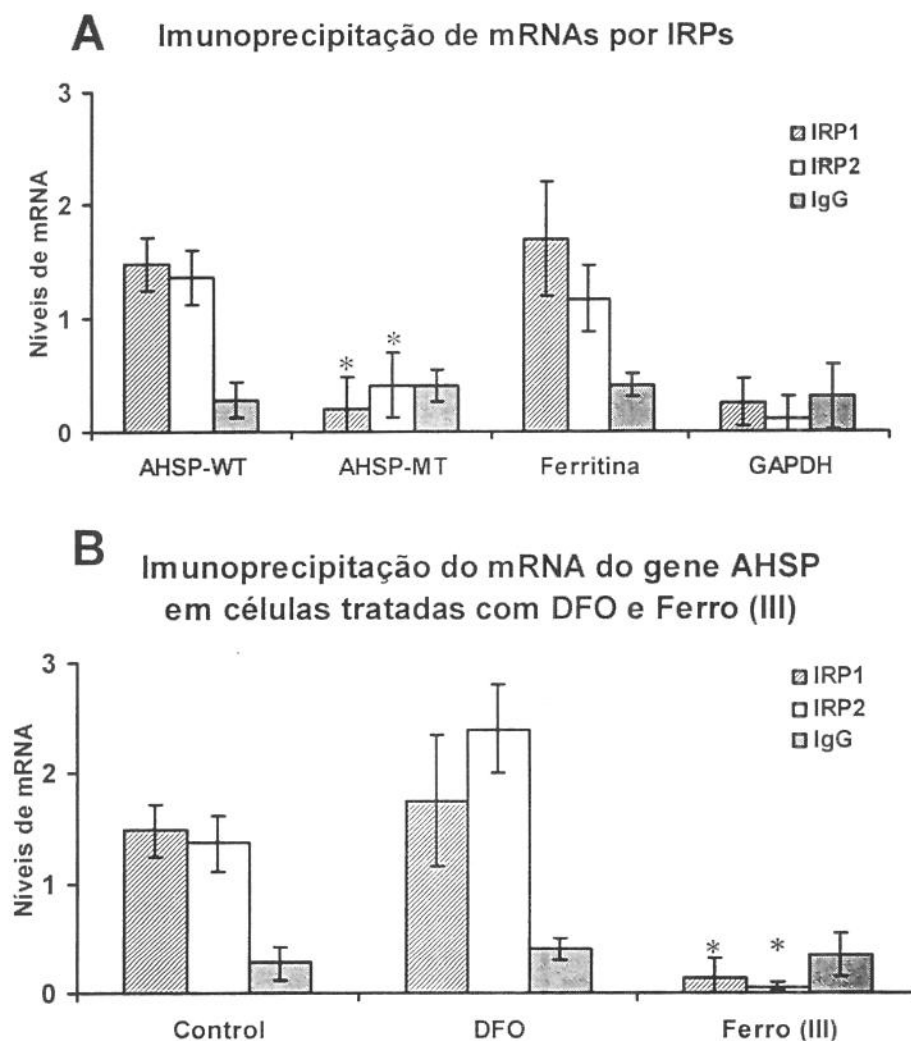


Figura 9 – Proteínas IRP1 e IRP2 reconhecem o IRE localizado na extremidade 3'-UTR do RNA mensageiro do gene AHSP – Células da linhagem Hela foram transfectadas com plasmídeo pTet-AHSP, e a transcrição foi induzida por 24 horas. Extratos citoplasmáticos das células transfectadas foram incubados com anticorpos específicos para as proteínas IRP1 e IRP2 e IgG (isotipo controle). O RNA imunoprecipitado foi isolado e os níveis de RNA dos genes AHSP, Ferritina e GAPDH foram analisados por PCR em tempo real. RNA direto do extrato citoplasmático foi utilizado para construção de curva padrão. (A) Quantificação dos níveis de RNA dos genes AHSP_IRE^{WT}, AHSP_IRE^{MT}, Ferritina e GAPDH imunoprecipitados com as proteínas IRP1 e IRP2; (B) Afinidade de ligação das proteínas IRP1 e IRP2 de acordo com níveis de ferro na célula. * $p < 0.05$.

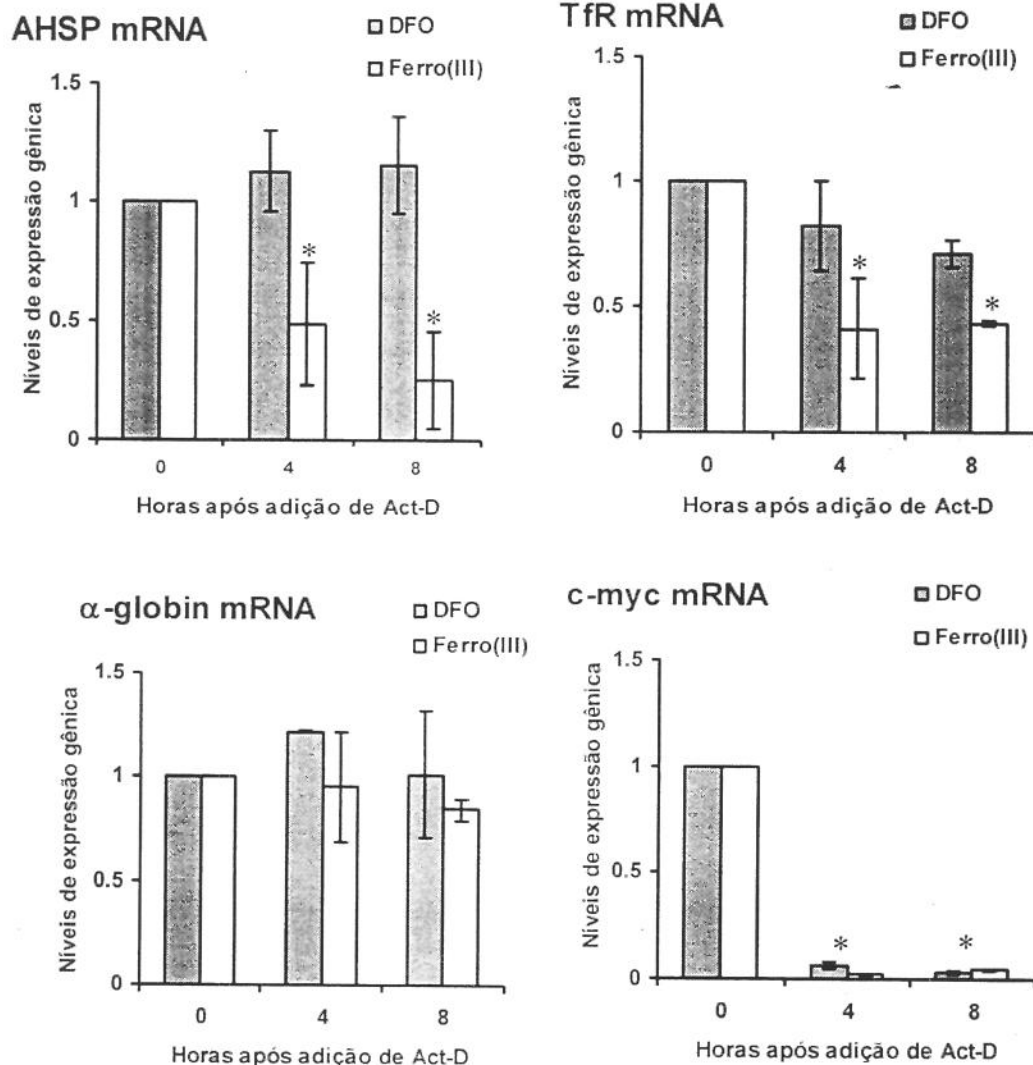


Figura 10 –Efeito da presença de ferro na estabilidade do RNA mensageiro do gene AHSP – Os níveis da expressão gênica foram quantificados em células K562 tratadas por 24 horas com Desferal e/ou Ferro(III) e, em seguida, tratadas com 5 μ M de Actinomicina-D por 4 e 8 horas. A quantificação da expressão gênica foi realizada por meio de PCR em tempo real. * $p < 0.05$.

Após 4 horas de tratamento com Actinomicina-D, um bloqueador de transcrição, células tratadas com Ferro(III) apresentaram 50% de redução de transcritos para o gene AHSP. Transcritos conhecidos foram utilizados como controle: receptor de transferrina, por apresentar menor estabilidade do RNA na presença de ferro; α -globina, que apresenta estabilidade não-dependente das concentrações de ferro, e *c-myc*, por apresentar instabilidade não-dependente das concentrações de ferro. Os resultados obtidos sugerem que, na presença de ferro, transcritos para o gene AHSP apresentam maior instabilidade.

Ensaio de transfecção de células com plasmídeos contendo cDNA do gene AHSP de humanos com a estrutura IRE normal (WT) ou com a mutação descrita previamente (MT) foram realizados. Como sugerido pelos ensaios de *EMSA*, o gene AHSP-MT apresenta maior instabilidade mesmo na ausência de ferro, quando comparado como perfil de estabilidade apresentado nos experimentos realizado com AHSP-WT (figura 11).

Todos os dados indicam que um dos mecanismos de regulação pós transcricional, que regula a expressão do gene AHSP, consiste da presença de um elemento responsivo a ferro na extremidade 3'-UTR da molécula de RNA. A presença desse *stem-loop* confere instabilidade ao RNA mensageiro do gene AHSP quando elevados níveis de ferro estão presentes na célula.

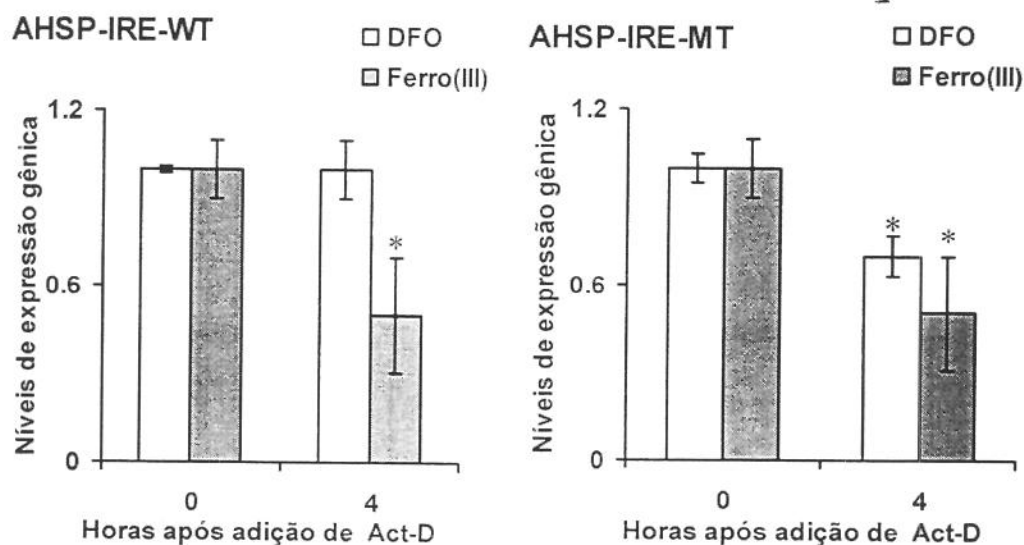


Figura 11 – Estabilidade diferencial entre os RNAs mensageiros AHSP-IRE^{WT} e AHSP-IRE^{MUT} – Células do tipo COS foram transfectadas com plasmídeo contendo o cDNA para o gene AHSP com a sequência normal do IRE (WT) e com a sequência com três nucleotídeos alterados (MT). Os níveis da expressão do gene AHSP foram quantificados em células tratadas por 24 horas com Desferal e/ou Ferro(III) e, em seguida, tratadas com 5 μ M de actinomicina-D por 4 horas. A quantificação da expressão gênica foi realizada por meio de PCR em tempo real. * $p < 0.05$.

Na tentativa de melhor esclarecer o impacto da regulação pós transcricional por IREs *in vivo*, camundongos da linhagem C57Bl6, com 6 a 8 semanas de vida foram tratados com Ferro Dextran (10mg/dia/camundongo) por via intra peritonial durante 10 dias. A confirmação do excesso de ferro no organismo foi realizada através da coloração de cortes histológicos do baço e fígado com corante Azul da Prússia (figura 12).

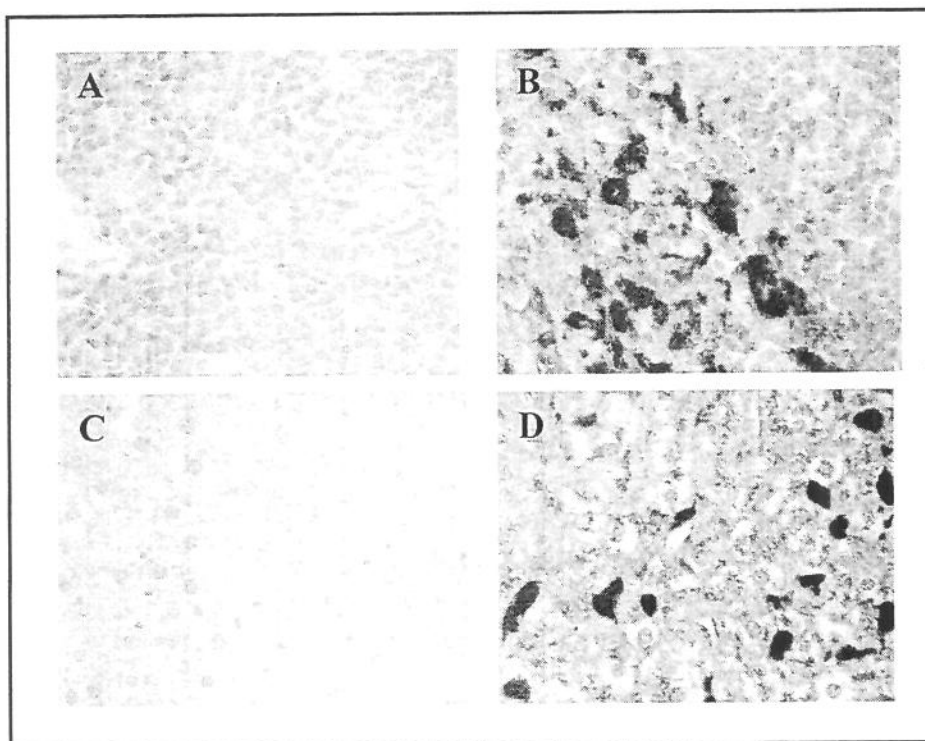


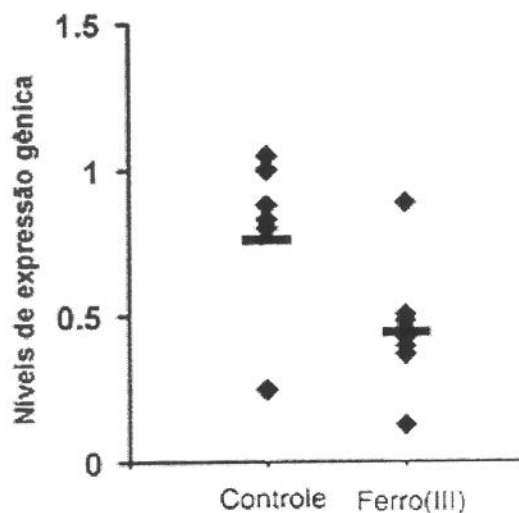
Figura 12 – Análise da deposição de ferro em cortes histológicos de camundongos com excesso de ferro – Cortes histológicos de baço e fígado de camundongos, tratados ou não com ferro dextran por 10 dias, foram corados pela metodologia de Azul da Prússia, específica para analisar depósito de ferro em órgãos. Na presença de depósito de ferro são observados pontos em azul, denominados “pérolas azuis”. Após coloração slides foram analisados em microscópio Axioskop2 (Zeiss) num aumento de 40x. As representações acima correspondem a: A – baço de animal controle; B – baço de animal tratado com ferro; C – fígado de animal controle; D – fígado de animal tratado com ferro.

Pela técnica de coloração de azul da Prússia, pontos em azul correspondem ao depósito de ferro nos tecidos. De acordo com a figura 12, baço de camundongos sem tratamento (A) apresentaram níveis basais de estoque de ferro, o que era previsível uma vez que o baço em camundongos é o segundo local de eritropoese, e depósitos de ferro são necessários para síntese de heme e, posteriormente, hemoglobina.

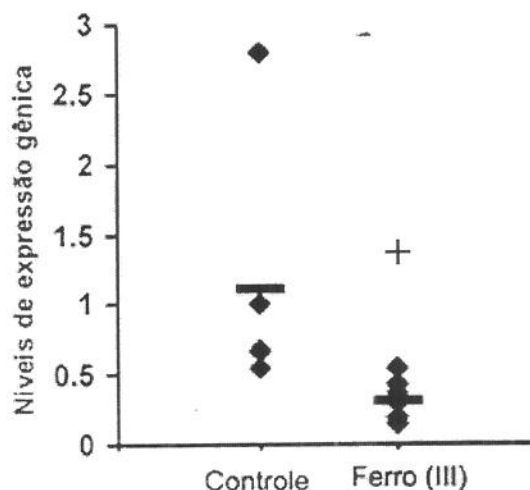
Por outro lado, baço de camundongos tratados com ferro dextran apresentou pontos em azul em maior concentração, sugerindo o sucesso do tratamento, gerando camundongos com hemocromatose. Essa conclusão é baseada na análise de fígado de animais sem (C) ou com tratamento (D), uma vez que depósito de ferro no fígado só ocorre em situações de acúmulo excessivo de ferro no organismo.

Após a confirmação do acúmulo de ferro no organismo dos camundongos tratados com Ferro Dextran, foi realizada a análise da expressão dos genes AHSP, receptor de transferrina, α -globina e β -globina em células provenientes da medula óssea, recuperadas dos fêmures dos camundongos. Os precursores eritróides foram isolados utilizando pérolas conjugadas com anticorpo específico contra o antígeno eritróide Ter119 (uma proteína associada com glicoforina A), e a expressão gênica analisada por PCR em tempo real (figura 13).

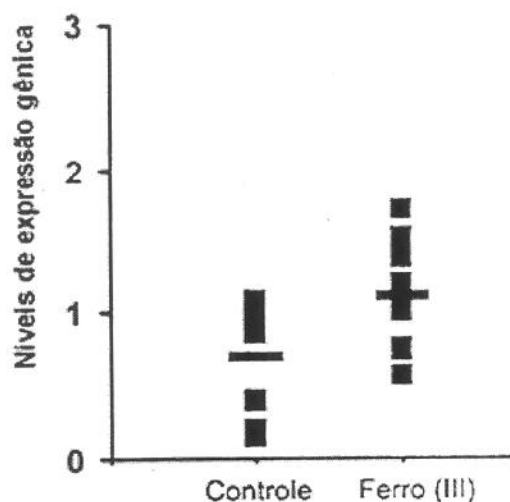
AHSP mRNA



TfR mRNA



α -globin mRNA



β -globin mRNA

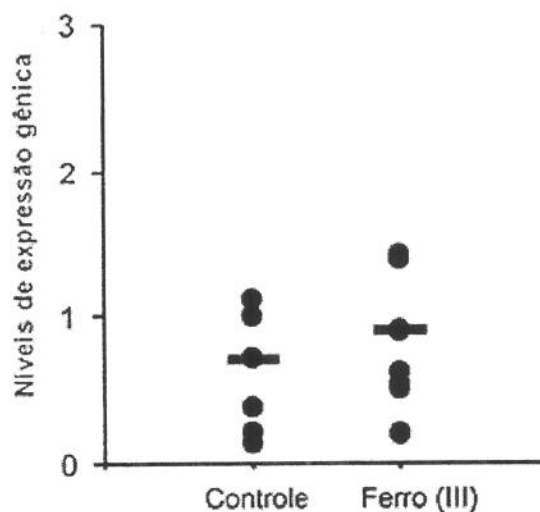


Figura 13 – Níveis de expressão gênica em precursores eritróides de camundongos controle e com excesso de ferro - Células positivas para o antígeno Ter-119 foram obtidas de medula óssea de camundongos tratados (ferro) e não tratados (controle) com Ferro Dextran. No total, 7 camundongos controle e 8 camundongos tratados com ferro foram analisados. RNA total foi extraído e os níveis de expressão gênica foram quantificados por PCR em tempo real. * $p = 0.055$. $^+ p = 0.059$.

A expressão dos genes AHSP e receptor de transferrina mostrou-se diminuída em células de camundongos tratados com ferro quando comparada aos níveis de expressão em camundongos controles, mas não são estatisticamente significativa. A expressão dos genes das globinas também não demonstrou diferenças estatísticas entre animais tratados e não tratados.

Os nossos dados, até o momento, sugerem que elementos responsivos a ferro presentes em moléculas de RNA regulam a estabilidade de transcritos de acordo com a concentração de ferro em estudos utilizando células de linhagens celulares, porém *in vivo* este efeito não é perfeitamente similar.

Esta mesma conclusão foi sugerida em recentemente publicação (72). Durante estudo, células da linhagem eritróide, tratadas e não tratadas com ferro(III), provenientes da cultura de célula fetal de fígado de camundongos, foram comparadas quanto ao perfil de expressão de genes controlados pelo sistema IRE/IRP, como ferritina, receptor de transferrina e ácido aminolevúlico sintetase (Ala), em diferentes estágios de maturação.

Como conclusão, os autores sugerem o funcionamento do sistema IRE/IRP somente em estágios celulares imaturos, onde as atividades de transcrição e tradução são menores e a necessidade de ferro e/ou heme por estas células para a produção de hemoglobina, não é grande. Enquanto isso, durante os estágios de grande produção de hemoglobina e síntese de heme, situações onde níveis aumentados de ferro são necessários, a regulação dos genes ferritina e receptor de transferrina parecem não mais seguir os parâmetros do sistema IRE/IRP.

Na tentativa de entender se essas conclusões são aplicadas da mesma forma para a regulação do gene AHSP, uma vez que o experimento com células eritróides de camundongos poderia não ter demonstrado diferenças estatísticas em função da análise da expressão gênica em células com diferentes estágios de maturação, resolvemos analisar a expressão gênica em diferentes estágios de diferenciação eritróide utilizando-se células da linhagem G1E-ER4 (67).

A indução da maturação das células eritróides na linhagem celular G1E-ER4 ocorre através do tratamento das células com o hormônio estradiol. Esta linhagem celular foi construída a partir de células tronco de embriões de camundongos deletados para o gene GATA-1. Normalmente esta linhagem celular imortalizada se prolifera na forma de eritroblastos imaturos. A inserção de vetor de expressão regulando a expressão do gene GATA-1 através do receptor de estradiol induz estas células à diferenciação eritróide normal (67).

Previamente à indução da diferenciação as células foram submetidas, ou não, ao tratamento com Citrato de Ferro(III) por 24 horas. A diferenciação eritróide também ocorreu na presença ou ausência de ferro. Para a constatação da maturação celular, foram realizadas análises morfológicas das células coletadas nos tempos 0, 3, 24 e 48 horas após tratamento com estradiol (figura 14).

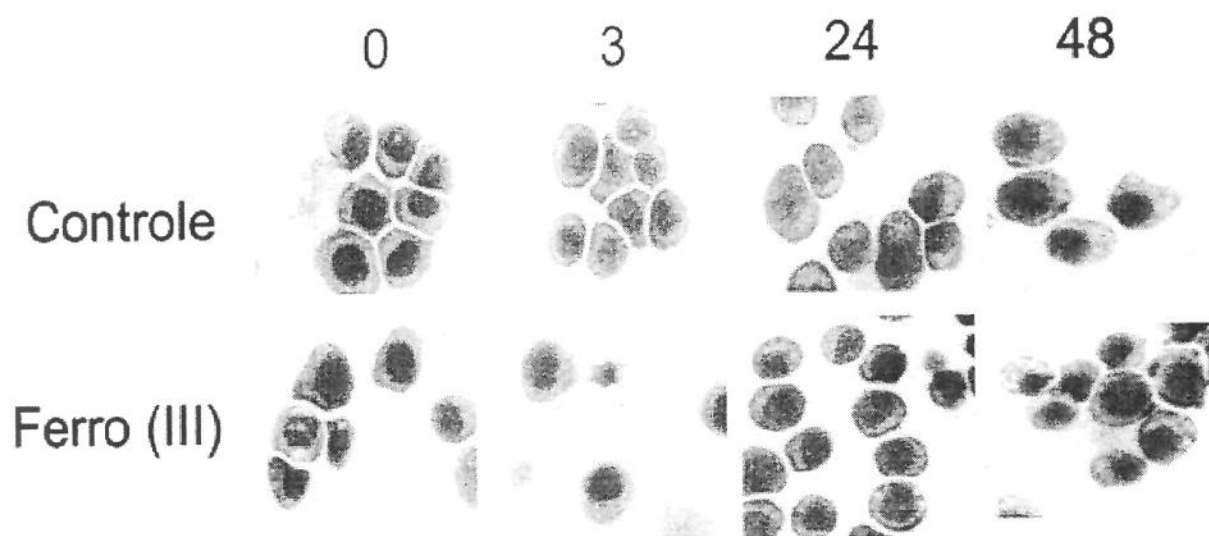


Figura 14 – Análise morfológica da diferenciação da linhagem celular G1E-ER4 tratadas, ou não, com Citrato de Ferro(III) – Células foram coletadas nos tempos 0, 3, 24 e 48 horas após a indução da diferenciação eritróide pelo tratamento com estradiol. Lâminas celulares foram confeccionadas pela fixação das células através de citospin e coloração de Wright-Giemsa. As lâminas foram analisadas em microscópio Zeiss Axioskop 2 (Zeiss) e as imagens foram registradas pelo software Axio vision 4.3 (Zeiss) em aumento de 40x.

Nenhuma diferença quanto à morfologia celular ou à diferenciação eritróide foi identificada entre células tratadas e não tratadas com citrato de ferro(III). A expressão do gene AHSP foi analisada em células coletadas com 0, 3, 10, 24, 30 e 48 horas após a indução, pela técnica de Northern blot (figura 15)

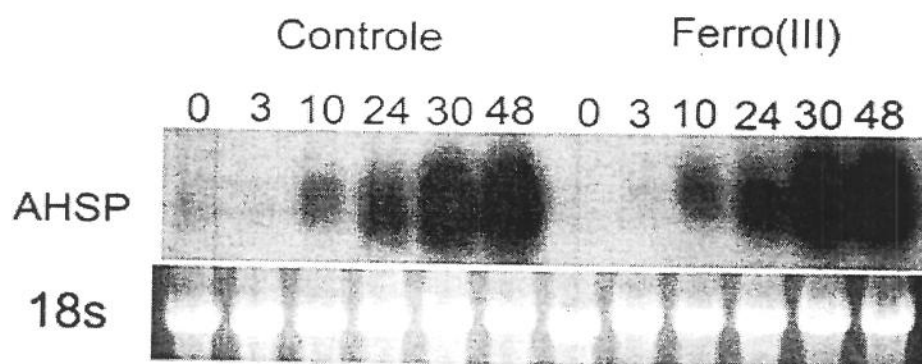


Figura 15 – Análise da expressão do gene AHSP em células G1E-ER4 tratadas e não tratadas com Citrato de Ferro – 15µg de RNA total de cada amostra foram submetidos à eletroforese em gel agarose formaldeído e transferidos overnight para membrana de nylon. A hibridização ocorreu como descrito em materiais e métodos. Dados representativos de 3 experimentos diferentes.

Através da análise da expressão do gene AHSP foi possível a observação de dados similares aos apresentados na literatura para os genes do receptor de transferrina e ferritina, sugerindo que durante a diferenciação eritróide o sistema IRE/IRP não estaria mais regulando a estabilidade de RNAs mensageiros com estrutura secundária na extremidade 3'-UTR (72). Em contra partida, diferenças muito tênues puderam ser observadas na expressão em células com 48 horas, sugerindo diminuição dos níveis de RNA do gene AHSP nas células que receberam tratamento com ferro.

Uma vez que, analisando a expressão em extrato celular total a interpretação dos dados estaria englobando níveis de transcrição e a estabilidade do RNA, realizamos experimentos determinando a expressão do gene AHSP na porção citoplasmática (figura 16) e na porção nuclear (figura 17).

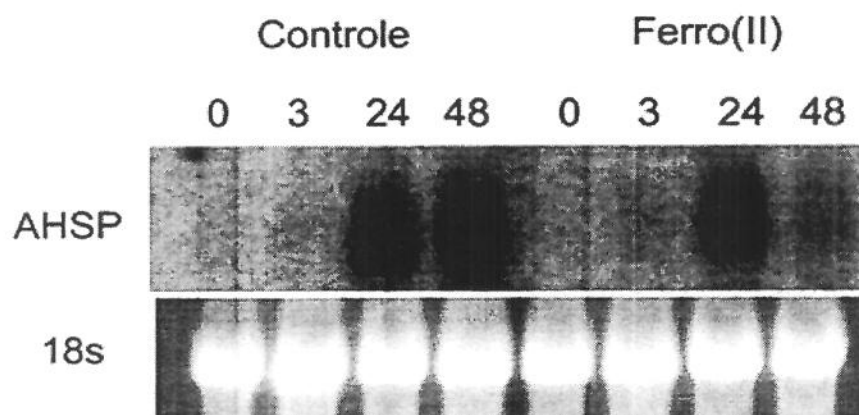


Figura 16 – Análise da expressão do gene AHSP em extrato citoplasmático de células induzidas à diferenciação eritróide – A extração de RNA citoplasmático de células tratadas ou não com Citrato de Ferro (III) foi realizada como descrito em materiais e métodos. 15µg de RNA citoplasmático de cada amostra foram submetidos a eletroforese em gel agarose formaldeído e transferidos overnight para membrana de nylon. A hibridização ocorreu como descrito em materiais e métodos. Dados representativos de 3 experimentos diferentes.

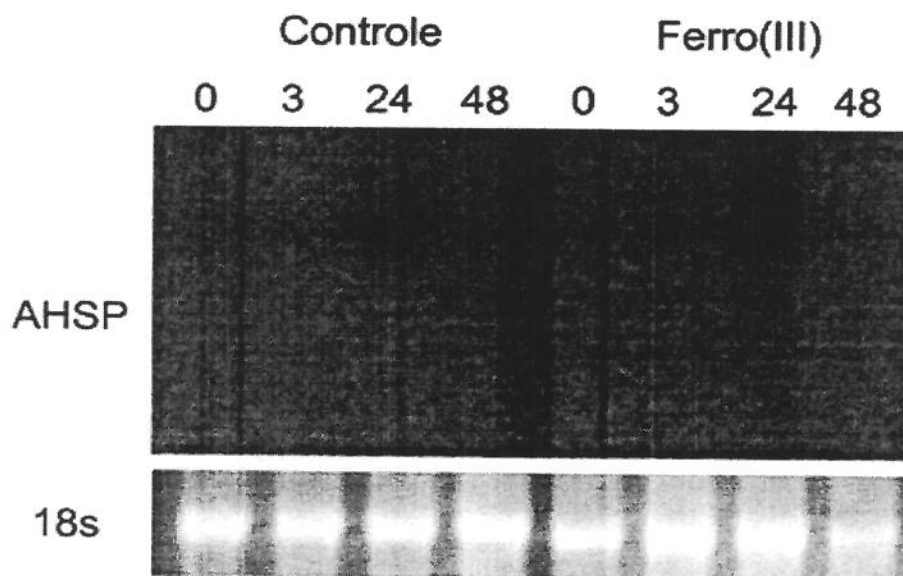


Figura 17 – Análise da expressão do gene AHSP em extrato nuclear de células induzidas à diferenciação eritróide – A extração de RNA nuclear de células tratadas ou não com Citrato de Ferro (III) foi realizada como descrito em materiais e métodos. 10µg de RNA total de cada amostra foram submetidos a eletroforese em gel agarose formaldeído e transferidos overnight para membrana de nylon. A hibridização ocorreu como descrito em materiais e métodos. Dados representativos de 3 experimentos diferentes.

A quantificação dos níveis de RNA presente no citoplasma celular indicou que após 48 horas de indução da diferenciação eritróide, na presença de níveis aumentados de ferro, ocorre a diminuição da expressão do gene AHSP quando comparada a células sem tratamento com ferro (figura 16).

A explicação do porquê estas células demonstraram menor expressão do gene AHSP somente com 48 horas de diferenciação, e não com 24 horas, é apresentada através da análise de RNA nuclear (figura 17). Aparentemente, o tratamento de células com Citrato de Ferro não só desestabiliza o RNA do gene AHSP mas, também induzem a transcrição do gene. Esta indução da transcrição pode ser identificada principalmente pela presença de

vários tamanhos de RNA, provavelmente representando RNAs com diferenças de processamento, demonstrado pela presença de um rastro difuso visualizado no poço onde o RNA de células induzidas por 24 horas foi aplicado.

Esses dados, mais uma vez, estão de acordo com a hipótese da regulação da expressão do gene AHSP pelo sistema IRE/IRP e ajudam na interpretação dos dados obtidos de células da medula óssea de camundongos. Uma vez que diferentes tipos celulares apresentam diferentes níveis de transcrição, e os níveis dos genes AHSP e receptor de transferrina não demonstraram diferenças significativas quanto aos níveis de expressão gênica entre os grupos tratados ou não com ferro, sugerimos que esses dados podem refletir a análise de células eritróides com diferentes níveis de transcrição.

3 – Regulação da transcrição do gene AHSP pelos fatores de transcrição Bach1/Nrf2 em resposta à presença/produção de Heme

Durante muito tempo acreditou-se que a única via bioquímica de atuação da molécula de heme seria sua incorporação à molécula de hemoglobina para o transporte de oxigênio. Hoje em dia sabe-se que além dessa função, a presença de heme pode estar relacionada com a regulação da expressão gênica de vários genes relacionados com a biossíntese de heme, como heme oxigenase-1, e de genes relacionados com a eritropoese como: receptor de transferrina, ferritina e α e β - globinas (57).

No caso das cadeias globínicas, elementos regulatórios como LCR e fatores de transcrição estão relacionados à regulação da expressão gênica. Nos genes que codificam as cadeias α e β - globina a existência de uma sequência de nucleotídeos denominada MARE (Maf recognition elements) sugere a regulação da expressão pelo sistema Bach-1 em resposta a heme (62, 66). Os possíveis fatores de transcrição que reconhecem os elementos MARE são Bach-1 e Bach-2, que exercem função repressora na ausência de heme, e NEF2, Nrf-1 e Nrf-2, que exercem função ativadora na presença de heme (60).

Como já proposto, a expressão do gene AHSP é coordenada com a expressão do gene α - globina durante a diferenciação eritróide simulada em cultura de duas fases. Tanto AHSP como α - globina apresentam algumas características quanto aos fatores de transcrição: ambos apresentam regulação pelos fatores GATA-1 e EKLf. Durante a busca de outros fatores de transcrição em comum entre AHSP e α - globina, uma sequência similar ao elemento MARE foi identificada no gene AHSP.

Para a validação da presença desse elemento, experimentos de ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) foram realizados, primeiramente, utilizando anticorpos contra as proteínas tipo MAF, pois tanto Bach1 quanto NF-E2 ou Nrf2 heterodimerizam com Maf para ligação no DNA. Seis pares de *primers* foram sintetizados cobrindo toda a região do gene AHSP e mais 2kb antes da região de início da transcrição e 2kb depois da região de início de transcrição (figura 18).

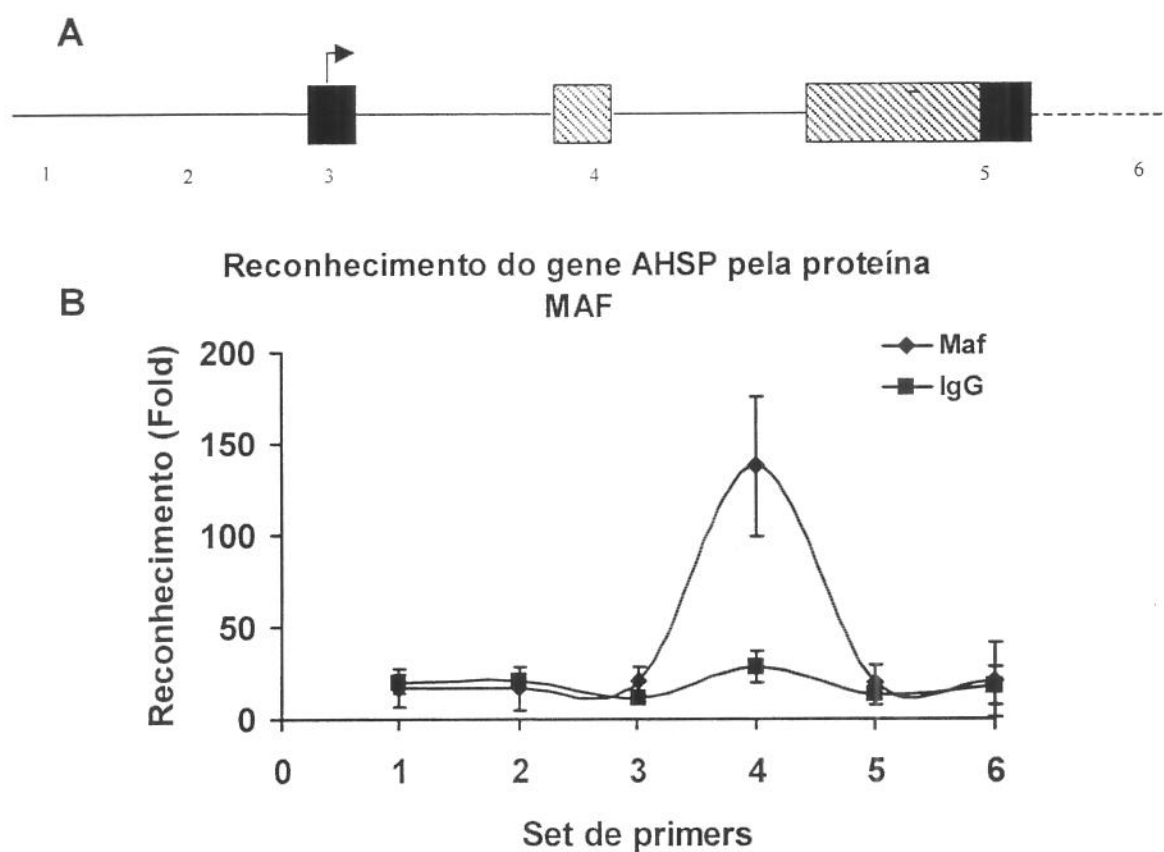


Figura 18 – Ligação da proteína Maf no final do segundo éxon do gene AHSP sugere presença de elemento MARE – (A) Seis pares de *primers* foram sintetizados cobrindo toda a região do gene AHSP e as regiões 2kb antes da região de início da transcrição e 2kb depois da região de início de transcrição; **(B)** Análise da estrutura cromatínica do gene AHSP pela técnica de ChIP demonstrou possível ligação de proteína da família das proteínas tipo MAF no final do segundo éxon do gene. A região amplificada pelo conjunto de *primers* de número 4 encontra-se 281pb antes do possível elemento MARE.

A observação da ligação da proteína MAF foi observada somente utilizando o conjunto de *primers* de número 4, que amplifica um fragmento próximo ao possível elemento MARE do gene AHSP.

Uma vez demonstrada a presença de interação proteína-DNA no possível elemento MARE localizado no final do segundo éxon do gene AHSP, foi realizada a análise dos possíveis fatores de transcrição que poderiam heterodimerizar com as proteínas MAF.

Anticorpos específicos contra os fatores de transcrição Bach-1, NF-E2 e Nrf2, proteínas conhecidas por se ligarem a proteínas MAF e estarem presentes na regulação da expressão de vários genes eritróides específicos, foram utilizados na técnica de ChIP em células K562 tratadas com hemina e *succinyl acetone*, um bloqueador na síntese de heme (figura 19).

Os resultados obtidos demonstraram a ligação dos fatores Nrf2 e Bach1, mas não do fator NF-E2, ao sítio MARE. A ligação destes fatores ocorre de acordo com a concentração de heme nestas células, uma vez que, com o bloqueio da síntese de heme, ocorre maior ligação do fator de transcrição Bach-1. Como controles positivos para os fatores de transcrição, a região HS2 do gene β -globina foi analisada para a ligação dos fatores de transcrição Bach-1 e NF-E2, e a região promotora do gene NQO1 foi analisada para a ligação dos fatores de transcrição Bach1- e Nrf2 .

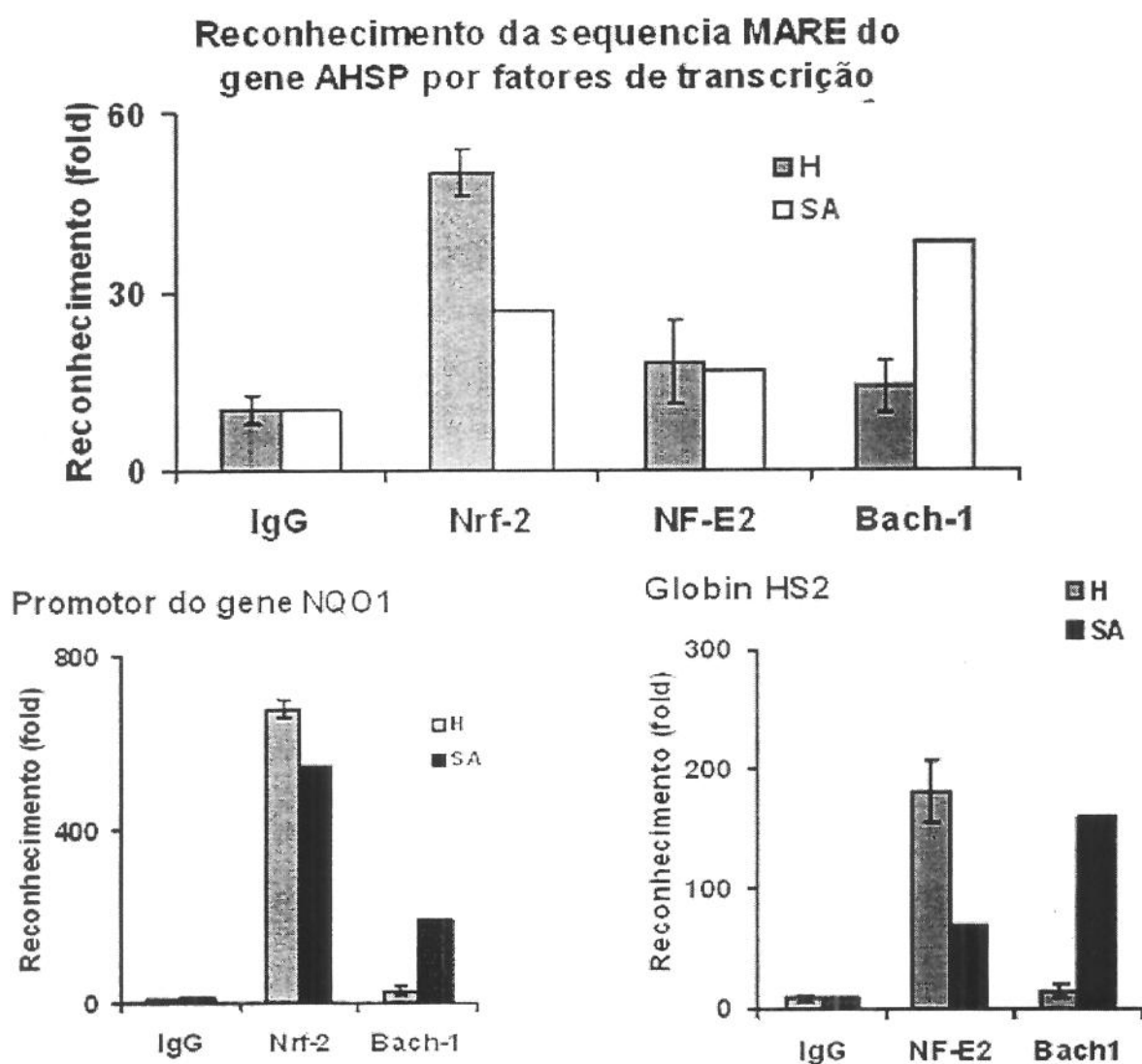


Figura 19 – Análise da ligação dos fatores de transcrição Bach-1 e Nrf-2 no elemento MARE do gene AHSP – Análise da estrutura cromatínica do gene AHSP pela técnica de ChIP demonstrou ligação dos fatores de transcrição Bach-1 e Nrf-2 ao DNA. A análise de Bach1/Nrf2 dependente da presença de heme; maior afinidade do fator de transcrição Bach-1 é observada quando as células são privadas de heme; maior afinidade do fator de transcrição Nrf2 é observada na presença de heme. HS2 do gene β -globina e a região promotora do gene NQO1 foram amplificadas como sendo controles positivos para os fatores de transcrição analisados.

Ainda que preliminares, estes dados sugerem que a expressão do gene AHSP, além de ser controlada por fatores eritróides específicos como GATA-1 e EKLF, poderia também ser regulada em resposta aos níveis de heme celular, através dos fatores de transcrição Bach1 e Nrf2. Uma forte evidência vem de experimentos, apresentados na sessão anterior, que demonstram indução da transcrição do gene AHSP em células tratadas com Ferro (III) (figura 18).



DISCUSSÃO

As hemoglobinopatias representam as doenças genéticas que mais contribuíram com o avanço nas pesquisas na área da biologia molecular, estrutura protéica, regulação gênica e compreensão das bases moleculares de doenças hereditárias como moduladores de fenótipos clínicos(1).

A molécula de hemoglobina A, a proteína transportadora de oxigênio em hemácias de mamíferos em fase adulta, é composta da tetramerização de duas subunidades protéicas, α - e β - globinas, as quais encontram-se ligadas a um grupo heme. Este é representado por complexo de estrutura planar, sintetizado através de oito passos enzimáticos onde, no último passo, ocorre a incorporação de uma molécula de ferro que irá ligar-se diretamente com a molécula de oxigênio. Mutações que afetam a síntese e a estrutura da hemoglobina são reconhecidas por causar uma grande variedade de doenças humanas (1).

Mas, apesar do profundo conhecimento sobre a biologia das hemoglobinas, algumas questões ainda não foram respondidas. Uma destas seria como a síntese das globinas é coordenada e equilibrada em ordem de minimizar os efeitos prejudiciais que as cadeias globínicas, quando não heterodimerizadas, que poderiam ser tóxicas aos precursores eritróides e comprometer sua diferenciação em hemácia. Alguns mecanismos relevantes que poderiam ajudar a responder essa questão foram recentemente descritos.

Como exemplo, podemos citar a proteína *heme regulated kinase* (HRI) parte de um mecanismo sensor que coordena a síntese de cadeias globínicas de acordo com a viabilidade de heme na célula (73, 74), e Bach1, um fator de transcrição que exerce função repressora, como inibidor da transcrição dos genes das globinas em situações de reduzidas concentrações de heme (61, 66). Entretanto, muitos dos mecanismos que regulam a produção da molécula de hemoglobina ainda permanecem não esclarecidos.

A melhor compreensão de como a expressão e síntese de cadeias globínicas são coordenadas seria de grande importância principalmente para a melhor compreensão da fisiopatologia de algumas hemoglobinopatias, como as β -talassemias. Nesta doença, mutações que ocorrem no gene da β -globina reduzem ou interrompem a síntese de cadeias β -globina resultando no acúmulo das cadeias α -globina livres, as quais são extremamente

instáveis e tendem a danificar os precursores eritróides e hemácias pela liberação de ferro e geração de espécies reativas de oxigênio (12, 19).

Algumas pesquisas sugeriram durante muito tempo que as células eritróides poderiam possuir um mecanismo acoplador de cadeias α -globina, como uma *chaperone*, responsável por regular o excesso de α -globinas. Essa sugestão veio de estudos mostrando que precursores eritróides normais produzem mais α -globinas que β -globinas sem que ocorra nenhum dano celular (75) e da conclusão de que indivíduos com traço β -talassêmico sintetizam cadeias α -globina com aproximadamente 50% de excesso relativo à síntese de cadeias β -globina, na maioria das vezes sem apresentar anemia acentuada ou anemia hemolítica significativa. A identificação e caracterização da proteína AHSP veio confirmar estas expectativas, possibilitando a ampliação das investigações do processo de controle da produção das cadeias α -globina.

A AHSP é uma proteína pequena de aproximadamente 12kDa, especificamente expressa na linhagem eritróide, que apresenta habilidade de se ligar com diferentes formas de cadeias α -globina (apo- α -globina, α -globina-Fe[II] e α -globina-Fe[III]) e limitar a capacidade pró oxidativa deste tipo de globina. Desde sua descrição como estabilizadora de cadeias α -globinas em 2002 (26), a AHSP tem sido extensivamente estudada, na tentativa de melhor compreender suas funções (26, 35, 36) no mecanismo de ligação e estabilização das cadeias α -globina (36, 37), na regulação gênica (28, 30, 31, 34, 41) e também as possíveis implicações como possível fator modulador de gravidade nas síndromes talassêmicas (27, 38, 39, 40, 42). Este último tópico pela sua importância é o que conduz a inúmeros estudos em diferentes populações.

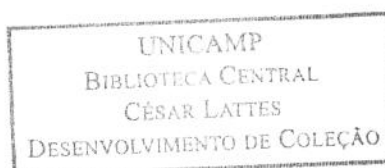
É de conhecimento que diferentes fatores genéticos podem contribuir para melhor ou pior evolução clínica de pacientes com β -talassemia. Além dos moduladores do fenótipo de pacientes com β -talassemia mais comuns, como níveis de produção de hemoglobina fetal (20, 21) e co-herança com α -talassemia (22), alguns outros têm sido recentemente descritos como alteração da expressão e síntese das proteínas HRI (23), Hepsidina (24, 25) e AHSP (26, 27).

Neste trabalho, apresentamos a primeira evidência de um polimorfismo no gene AHSP (N75I) que poderia relacionar esta proteína com casos de talassemia menor que evoluem com anemia acentuada. Vale ressaltar que o polimorfismo N75I já havia sido publicado anteriormente como uma variação neutra na proteína AHSP por não estar localizado na região de ligação com a proteína α -globina (43).

Entretanto, um novo mecanismo de ação para a proteína AHSP proposto em 2005 (37) demonstrou que, quando ligada à AHSP, a proteína α -globina apresenta um rearranjo estrutural de 80% em sua conformação protéica. Com a alteração estrutural da proteína α -globina ocorre alteração no emparelhamento de elétrons do átomo de Ferro(II) presente no grupamento heme, acarretando oxidação do átomo de Ferro(II) em Ferro(III), forma com menor poder reativo do átomo de ferro. Dessa forma a proteína AHSP não só preveniria a precipitação de cadeias α -globinas como também, pela oxidação do átomo de Ferro(II), evitaria a geração de espécies reativas de oxigênio pela molécula de heme, via reação de Fenton.

Experimentos utilizando proteínas recombinante AHSP_WT e AHSP_N75I demonstraram que a presença do polimorfismo N75I não altera a ligação entre AHSP e α -globina mas, é menos eficaz na prevenção da geração de espécies reativas de oxigênio (EROS). A presença de corpos de Heinz em hemácias de indivíduos com o polimorfismo N75I no gene AHSP reforça a hipótese de oxidação de cadeias globínicas. Uma vez que a formação do complexo α -globina-AHSP_N75I ocorre de forma normal, acreditamos que também ocorra normalmente a alteração estrutural da proteína α -globina e a oxidação do átomo de ferro no grupamento heme (37).

Uma hipótese para a maior geração de EROS e produção de corpúsculo de inclusão nas hemácias pela proteína AHSP_N75I seria a de que o átomo de ferro, mesmo oxidado, não estaria sendo ocultado completamente pelo complexo α -globina-AHSP_N75I, e a exposição mínima poderia estar promovendo a geração de EROS.



Apesar de estudos mais aprofundados, como análise da estrutura da proteína AHSP e ressonância magnética do átomo de ferro e, principalmente, a identificação de novos casos com este polimorfismo serem requeridos para confirmar nossa hipótese, acreditamos na importância dos nossos achados, por serem pioneiros na identificação de uma forma da proteína AHSP não totalmente funcional que poderia estar relacionada com anemia mais grave em alguns casos de heterozigose ou homozigose para β -talassemia, como demonstrado em nossos resultados.

Além dos estudos conferindo à AHSP um provável papel de fator modulador nas β -talassemias, estudo sobre as formas de regulação da expressão deste gene foram analisados, na tentativa de contribuir para esclarecer a função desta proteína na diferenciação eritróide normal.

A regulação da expressão de um gene é imediatamente relacionada às moléculas de DNA que serão transcritas em RNA mensageiro e estes traduzida em proteínas. Entretanto, esta regulação requer alguns passos intermediários, o que torna complexa a compreensão de como a expressão de um determinado gene é controlada.

A expressão gênica pode ocorrer pelo controle de quantas moléculas de RNA mensageiro serão produzidas a partir da sequência de DNA (controle da transcrição), pela rapidez no processamento das moléculas de RNA mensageiro por meio de inclusão da cauda poli A e ou *splicing* (controle do processamento de RNAs), ou pela seleção de quais dos RNAs que foram processados serão transportados para o citoplasma (controle do transporte do RNA). Uma vez no citoplasma, estes RNA mensageiros podem ser reconhecidos por ribossomos e então traduzidos em proteína (controle da tradução).

Algumas moléculas de RNA ainda apresentam fatores de controle pós transcricional, que regulam a estabilidade da molécula. Estes fatores reconhecem estruturas secundárias na molécula de RNA e, a partir de sua ligação com estas estruturas, regulam a estabilidade da molécula. Em comum entre quase todos os RNAs mensageiros presentes em eucariotos podemos citar o complexo protéico CBP80 e CBP20 que se ligam à estrutura

m⁷Gppp cap na extremidade 5' da molécula de RNA e a proteína PABP que se liga na cauda poli-A na extremidade 3' da molécula de RNA.

Dois fatores importantes para a linhagem eritróide são as proteínas α CP e as proteínas IRPs. As proteínas do tipo α CP são conhecidas por ligarem-se a motivos ricos em citosinas na porção 3'-UTR do RNA mensageiro do gene α -globina (65) regulando a estabilização da molécula de RNA e a tradução desta em proteína. IRPs (iron regulatory proteins) são proteínas que reconhecem estruturas secundárias na molécula de RNA mensageiro, localizadas tanto na região 5'-UTR quanto na região 3'-UTR, e regulam a expressão de genes envolvidos no metabolismo de ferro celular, como o gene do receptor de transferrina e o gene da ferritina (75).

Uma nova proposta para a regulação da expressão do gene AHSP, via regulação da estabilidade do RNA pelo mesmo sistema que regula a estabilidade do RNA do gene receptor de transferrina, é sugerida pelos dados deste estudo. Entretanto, ao invés de apresentar cinco IREs na extremidade 3'-UTR, como o RNA do gene do Receptor de transferrina, a AHSP apresenta um único IRE, também localizado na extremidade 3'-UTR do RNA mensageiro. Um fato interessante é que a estrutura secundária presente no RNA mensageiro do gene AHSP é conservada entre humanos, macacos e bovinos, apresentando praticamente o mesmo arranjo estrutural, e também é conservada em caninos, porém com a diferença de apresentar um *loop* interno.

Entretanto, além do IRE do gene AHSP de camundongos encontrar-se numa região completamente diferente das outras espécies, apresenta uma composição de nucleotídeos e estrutural diferente das dos outros IREs do gene AHSP. A única espécie em que o elemento responsivo a ferro não foi detectado foi em marsupiais. Esta, entre outras já descritas (30), é mais uma evidência de que o gene AHSP é relativamente novo na escala evolutiva, que está presente num *locus* de alta recombinação e, por isso, ainda apresenta muita diversidade entre espécies.

Outro fato interessante sobre o IRE presente no RNA mensageiro do gene AHSP pode ser apontando quanto à formação da uma estrutura secundária atípica, abrindo novas perspectivas na participação de elementos responsivos a ferro atípicos na regulação da expressão gênica. Esta nova concepção quanto à IRE poderia ser importante principalmente em estudos de rastreamento genômicos utilizando análises bioinformáticas que vêm sendo realizadas na tentativa de encontrar novos genes que apresentam IRE (46, 47).

Entretanto, um comentário em comum entre estes estudos é que poucos genes são encontrados, principalmente por estas ferramentas de bioinformática utilizarem como molde os IRE presentes nos genes ferritina e receptor de transferrina. Estes genes apresentam os IRE considerados ideais, por demonstrarem um *loop* formado por 6 nucleotídeos, um *C bulged*, e um *stem* superior composto por 5 nucleotídeos (71). Estudos induzindo a alteração desses requisitos nos elementos responsivos a ferro demonstraram impreterivelmente a presença da sequência de nucleotídeos CAGWGH (onde W pode ser A ou U, e H pode ser C, A ou U) no *loop* e, necessariamente, o pareamento pelas leis de Watson-Crick entre os nucleotídeos número 1 e número 5 do *loop* para o eficiente reconhecimento da estrutura secundária pelas proteínas IRP. (77, 78) Até a presente data, poucos exemplos de ligação de IRPs a atípicos IREs foram demonstradas (79) mas nenhuma evidência sobre a funcionalidade destes elementos responsivos a ferro não-conservados foi observada.

Os dados apresentados na segunda parte da seção resultados deste trabalho, não só indicam fortemente que ambos os IREs presentes no RNA mensageiro do gene AHSP de humanos e camundongos ligam-se a IRPs de maneira semelhante que o IRE presente no gene da ferritina, mas demonstram também que a presença desse complexo parece regular a estabilidade do RNA do gene AHSP de acordo com as concentrações de ferro, *in vitro* e *in vivo*. Dessa forma, a AHSP provavelmente é o primeiro exemplo de um gene que apresenta um IRE atípico na extremidade 3'-UTR do RNA que além de ser reconhecido por IRPs apresenta funcionalidade na regulação da estabilidade do RNA.

Uma sugestão do porquê o gene AHSP seria regulado por IREs incluiria esta proteína como um possível fator modulador de gravidade, não só da β -talassemia mas

também de anemias por deficiência de ferro. A AHSP seria importante para estabilizar apo- α -globina, proteína sem a presença de heme, e evitar a precipitação desta nos eritrócitos. No caso das talassemias, o maior excesso de ferro, comum devido aos eventos transfusionais, poderia estar interferindo com o papel de estabilizadora de cadeias α -globinas da AHSP.

Outra implicação da regulação da estabilidade do RNA mensageiro do gene AHSP pelo sistema IRE/IRP seria na diferenciação eritróide normal. A regulação dos níveis de RNA do gene AHSP de acordo com a concentração de ferro seria importante na limitação da síntese protéica, evitando assim competição da proteína AHSP com cadeias β -globina pela ligação com α -globina. Essa sugestão é reforçada por estudos anteriores, que demonstraram uma relação estequiométrica entre os níveis de proteína AHSP e α -globina. É possível sugerir que a alteração desse equilíbrio poderia prejudicar hemoglobinizacão (35).

No entanto, é importante ressaltar que, ao mesmo tempo que a presença de níveis aumentados de ferro altera a estabilidade do RNA do gene AHSP também promove indução da expressão gênica, como sugerido pela análise de RNA nuclear. Uma explicação para a indução da transcrição gênica do gene AHSP na presença de ferro poderia estar relacionada com o terceiro e último tópico apresentado nesta tese de doutorado, que sugere a regulação da expressão do gene AHSP através da produção de heme nos eritrócitos. Neste caso, a presença de ferro, além de essencial para a vida como catalisador dos sistemas de oxidação-redução e bioenergéticos, seria um fator essencial para formação de moléculas de heme.

Durante a diferenciação eritróide o aumento da síntese de heme nos eritrócitos induz o aumento da produção de cadeias globínicas, receptores de transferrina e proteínas do tipo ferritina. A indução da expressão destes genes tem como finalidade a produção, em larga escala, de hemoglobina. Não é claro ainda o mecanismo pelo qual heme induz a produção de receptores de transferrina e ferritina, mas existe a sugestão que esta aconteça da mesma forma que os genes da globina (61, 62) por meio dos elementos MARE (Maf recognition elements).

O reconhecimento destes elementos MARE por fatores de transcrição envolve a repressão ou indução de genes relacionados com stress oxidativo e resposta a heme. O fator de transcrição Bach-1 é um dos fatores que se liga ao elemento MARE e promove repressão da expressão gênica na ausência de heme. Na presença de heme, Bach1 é transportado para o citoplasma e fatores de transcrição como NF-E2 e Nrf2 passam a reconhecer o elemento MARE, induzindo a expressão gênica (60).

Uma sequência de nucleotídeos muito semelhante à do elemento MARE (5'-NNNTGCTGACTCAG- 3') foi encontrada no final do segundo exon do gene AHSP (5'-CTGCTGAATCAGCA- 3'). Estudos do reconhecimento desta sequência a partir de técnicas baseadas na análise de DNA quanto estrutura cromatínica, sugerem que os fatores de transcrição Bach1 e Nrf2 ligam-se à molécula de DNA do gene AHSP.

Entretanto, uma vez que a presença de elevados níveis de ferro e heme, como fonte de ferro, desestabiliza o RNA mensageiro do gene AHSP, fica difícil a análise da expressão deste gene pela simples análise do RNA total. Como sugerido pela técnica de Northern blot, existe sim uma indução da expressão gênica na presença de ferro, mas ainda acreditamos que técnicas mais claras e sensíveis são necessárias para elucidar todo o processo.

Apesar de preliminar, a sugestão de que a expressão do gene AHSP estaria sendo regulada pelos níveis de heme da mesma forma que o gene α -globina, confirma resultados anteriormente publicados pelo nosso grupo de pesquisa (41). Apesar de não ter sido possível a completa remoção do fator de transcrição Nrf2 em condições de bloqueio da síntese de heme, podemos concluir que o fator de transcrição Bach1 seria um dos responsáveis por coordenar a expressão dos gene AHSP e α -globina durante a diferenciação eritróide.

Quanto ao fator de transcrição Nrf2, duas hipóteses podem ser levantadas: indução da transcrição durante a diferenciação eritróide em resposta aos níveis de heme, em conjunto com os fatores de transcrição GATA-1 e EKLF, genes estes conhecidos até o presente momento como os principais fatores que regulam a expressão do gene AHSP; e,

em segundo, indução da transcrição do gene AHSP na prevenção da geração de espécies reativas de oxigênio pela molécula heme-ferro encontrada nas cadeias α -globina.

Tomando em conjunto, os dados apresentados neste trabalho reforçam a idéia de que a AHSP pode ser um potencial fator modulador de gravidade nas síndromes β -talassêmicas, que a ocorrência de mutações em sítios não requeridos para a ligação com cadeias α -globina podem parcialmente alterar a função da proteína AHSP e fornecem dados sugestivos de que a produção da proteína AHSP é complexa e regulada por heme.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
CÉSAR LATTES
DESENVOLVIMENTO DE COLEÇÃO



CONCLUSÕES

As conclusões que chegamos com este trabalho foram que:

- O polimorfismo N75I é a primeira alteração descrita em humanos na proteína AHSP que poderia estar afetando a função desta proteína;
- A regulação da expressão do gene AHSP pela via IRE/IRP poderia indicar uma função modeladora de gravidade em outras doenças hematológicas além β -talassemia;
- A regulação da expressão do gene AHSP pela via MARE sugere mais uma vez a importância deste gene durante a diferenciação eritróide



1. JANDL, J.H. **Blood – Textbook of Hematology**. 2nd. Edition. 1996; 135-139.
2. HONGENG, S., PAKAKASAMA, S., CHUANSUMRIT, A., SIRACHAINAN, N., KITPOKA, P., UDOMSUBPAYAKUL, A., UNGKANONT, A., JOOTAR, S. **Biol. Blood Marrow Transplant**. 2006; 12(6): 683-687.
3. LIMA CS, ARRUDA VR, COSTA FF, SAAD ST. Minimal doses of hydroxyurea for sickle cell disease. **Braz J Med Biol Res**. 1997; 30(8): 933-940.
4. PFEILSCHIFTER, J. HUWILER, A. **Erythropoietin is more than just a promoter of erythropoiesis**. J. Am. Soc. Nephrol. 2004; 15: 2240-2241.
5. LINDERN, M., SCHMIDT, U., BEUG, H. **Control of erythropoiesis by Erythropoietin and stem cell factor**. Cell Cycle. 2004; 3(7): 876-879.
6. HUO, X., ZHANG, J. **Important roles of reversible acetylation in the function of hematopoietic transcript factors**. J. Cell. Mol. Med. 2005; 9(1): 103-112.
7. WELCH, J.J, WATTS, J.A., VAKOC, C.R., YAO, Y., WANG,H., HARDISON, R.C., BLOBEL, G.A., CHODOSH, L.A., WEISS, M.J. **Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1**. Blood. 2004; 104(10): 3136-3147.
8. INGLE, E., TILBROOK, P.A., KLINKEN, S.P. **New insights into the regulation of erythroid cells**. IUBMB Life. 2004; 56(4): 117-184.
9. UMEDA K., HEIKE, T., NAKATA-HIZUME M., NIWA, A., ARAI, M., SHINODA, G., MA, F., SUEMORI, H., LUO, H.Y., CHUI, D.H., TORII, R., SHIBUYA, M., NAKATSUJI, N., NAKAHATA, T. **Sequential analysis of {alpha}- and {beta}-globin gene expression during erythropoietic differentiation from primate embryonic stem cells**. Stem Cells. 2006; Epub ahead of print.
10. STEINBERG, M.H., FORGET B.G., HIGGS, D.R., NAGEL, R.L. *Disordes of Hemoglobin. Genetic, Pathophysiology, and Clinical Manegement*, Cambrigde University Press, 2001, pp 231-356.
11. HOFFMAN, R., BENZ, E.J., SHATTIL, A.J., FURIE B., COHEN, H.J. *Hematology- Basic Principles and Practice*. Churchill Livingstone Inc, 1991, pp. 252-300.
12. THEIN, S.L. **Genetic insights into the clinical diversity of β -thalassaemia**. British Journal of Haematology. 2004; 124: 264-274.
13. RUND, D., RACHAMILEWITZ, E. **Medical Progress - β -thalassemia**. The New England Journal of Medicine. 2005; 353:1135–1146.

14. WEATHEDRALL D.J., CLEGG J.B. **The thalassemia syndrome.** 4nd Ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 2001
15. WEATHERALL, D.J. **Thalassaemia: the long road from bedside to genome.** Nature Genetics. 2004; 5: 1-7.
16. AMER, J., GOLDFARB, A., FIBACH, E. **Flow cytometric measurement of reactive oxygen species production by normal and thalassaemic red blood cells.** European Journal of Haematology. 2003; 70: 84-90.
17. RACHMILEWITZ, E.A., WEIZER-STERN, O., ADAMSKY, K., AMARIGLIO, N., RECHAVI, G., BREDÁ, L., RIVELLA, S., CABANTCHIK. **Role of iron in inducing oxidative stress in thalassemia.** Annals New York Academy of Sciences. 2005; 1054: 118-123.
18. GALANELLO, R., CAO, A. **Relationship between genotype and phenotype: Thalassemia Intermedia.** Annals New York Academy of Sciences. 1998; 850: 325-333.
19. PREMAWARDHENA, A., FISHER, C.A., OLIVIERI, N.F., SILVA, S., SLOANE-STANLEY, J., WOOD, W.G., WEATHERALL, D.J. **A novel molecular basis for β -thalassemia intermedia poses new questions about its pathophysiology.** Blood. 2005; 106(9): 3251-3255.
20. DE PAULA, E.V., LIMA, C.S., ARRUDA, V.R., ALBERTO, F.L., SAAD, S.T., COSTA, F.F. **Long term hydroxyurea therapy in β -thalassaemia patients.** European Journal of Hematology. 2003; 70(3): 151-155.
21. TAHER, A., ISMA'EEL, H., CAPPELLINI, M.D. **Thalassemia intermedia: Revisited.** Blood Cells and Diseases. 2006; 37: 12-20.
22. COHEN, A.R., GALANELLO, R., PENNELL, D.J., CUNNINGHAM, M.J., VICHINSKY, E. **Thalassemia.** Hematology. American Society of Hematology Educational Program. 2004: 14-34.
23. HAN, A., FLEMING, M.D., CHEN, J.J. **Heme-regulated eIF2 α kinase modifies the phenotypic severity of murine models of erythropoietic protoporphyria and β -thalassemia.** The Journal of Clinical Investigation. 2005; 115(6): 1562-1570.
24. KATTAMIS, A., PAPASSOTITIOU, I., PALAIOLOGOU, D., APOSTOLAKOU, F., GALANI, A., LADIS, V., SAKELLAROPOULOS, N., PAPANIKOLAU, G. **The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major.** Haematologica. 2006; 91(6): 809-812.
25. WEIZER-STERN, O., ADAMSKY, K., AMARIGLIO, N., RACHMILEWITZ, E., BREDÁ, L., RIVELLA, S., RECHAVI, G. **mRNA expression of iron**

regulatory genes in β -thalassemia intermedia and β -thalassemia major mouse models. American Journal of Hematology. 2006; 81: 479-483.

26. KIHM, A.J., KONG, Y., HONG, W., RUSSEL J.E., ROUDA, S., ADACHI, K., SIMON, M.C., BLOBEL, G.A., WEISS, M.J. **An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-haemoglobin.** Nature. 2002; 417(6890): 758-63.
27. KONG, Y., ZHOU, S., KIHM, A.J., KATEIN, A.M., YU, X., GELL D.A., MACKAY, J.P., ADACHI, K., FOSTER-BROWN, L., LOUDEN, C.S., GOW, A.J., WEISS, M.J. **Loss of α -hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates β -thalassemia.** The Journal of Clinical Investigation. 2004; 114(10): 1457-66
28. MIELE G., MANSON J., CLINTON M. **A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies.** Nature Medicine, 2001: (7) 3: 361-4.
29. GALLAGHER PG, PILON AM, ARCASOY MO, BODINE DM. **Multiple defects in erythroid gene expression in Erythroid Kruppel-Like Factor (EKLF) target genes in EKLF-deficient mice** (abstract). American Society of Hematology - 2004.
30. DORE, L.C., VAKOC, C.R., BLOBEL, G.A., HARDISON, R.C., BODINE, D.M., GALLAGHER, P.G., WEISS, M.J. **Genomic Organization, Chromatin Structure, and Transcriptional regulation of the murine alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) gene.** (Abstract). American Society of Hematology – 2005
31. PILON, A.M., ZHOU, D., WEISS, M.J., TOWNES, T.M., BODINE, D.M., GALLAGHER, P.G. **The Human Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein (AHSP) Gene Locus in EKLF-Deficient Erythroid Cells**_(Abstract). American Society of Hematology – 2005.
32. PERKINS, A.C., COGHILL, E., MAGUIRE, T., HARTMANN, B., MCDOWALL, A., WEISS, M., GRIMMOND, S., KEYS, J., HODGE, D. **A Global Role for EKLF in Definitive and Primitive Erythropoiesis** (Abstract). American Society of Hematology – 2005.
33. HODGE D, COGHILL E, KEYS J, MAGUIRE T, HARTMANN B, MCDOWALL A, WEISS M, GRIMMOND S, PERKINS A. **A global role for EKLF in definitive and primitive erythropoiesis.** Blood. 2005 Dec 27.
34. 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.

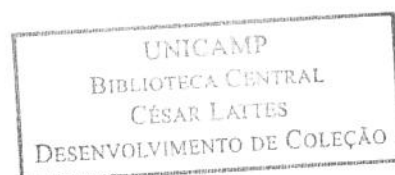
35. GELL, D., KONG Y., EATON, S.A., WEISS, M.J., MACKAY, J.P. **Biophysical characterization of the alpha-globin binding protein AHSP.** J. Biol. Chem. 2002; 277(43): 40602-09.
36. FENG, L. GELL, D.A., ZHOU S. GU, L. KONG, Y., LI, J., HU M., YAN, N., LEE, C., RICH, A.M., ARMSTRONG, R.S., LAY, P.A., GOW, A.J., WEISS, M.J., MACKAY, J.P., SHI, Y. **Molecular Mechanism of AHSP-Mediated Stabilizing of α -hemoglobin.** Cell 2004; 119:629-640.
37. 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.
38. 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.
39. GALANELLO R, PERSEU L, GIAGU N, SOLE G. **AHSP expression in β -thalassemia carriers with thalassemia intermedia phenotypes.** (Abstract). American Society of Hematology – 2003.
40. LAI, M.I., JIANG, J., SILVER, N., BEST, S., MENZEL, S., GARNER, C., WEISS, M.J., THEIN, S.L. **α -Haemoglobin stabilizing protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of β -thalassemia.** British Journal of Haematology. 2006; 133: 675-682.
41. DOS SANTOS, C.O., DUARTE, A.S.S., SAAD, S.T.O., COSTA, F.F. **Expression of α -hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis.** Experimental Hematology. 2004; 32: 157-162.
42. DOS SANTOS, C.O, DUARTE, A.S.S., SAAD, S.T.O., COSTA, F.F. **Expression of Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein Gene (AHSP) during Erythropoiesis and in Beta-Thalassemia** (Abstract). American Society of Hematology – 2003.
43. SANTIVERI CM, PEREZ-CANADILHAS JM, VADIVELU MK, ALLENMD, RUTHERFORD TJ, WATKINS NA, BYCROFT M. **NMR structure of the α -hemoglobin chaperone AHSP: Insights into conformational heterogeneity and binding.** J Biol Chem 2004; 279(33):34963–34970.
44. TANG, C.K., CHIN, J., HARFORD, J.B., KLAUSNER, R.D., ROUAULT, T.A. **Iron regulates the activity of the iron-responsive element binding protein without changing its rate of synthesis or degradation.** J. Biol. Chem. 1992; 267(34): 24466-24470.
45. ERLITZIKI, R., LONG, J. C., THEIL, E.C. **Multiple, conserved iron-responsive elements in the 3'- untranslated region of transferrin receptor mRNA**

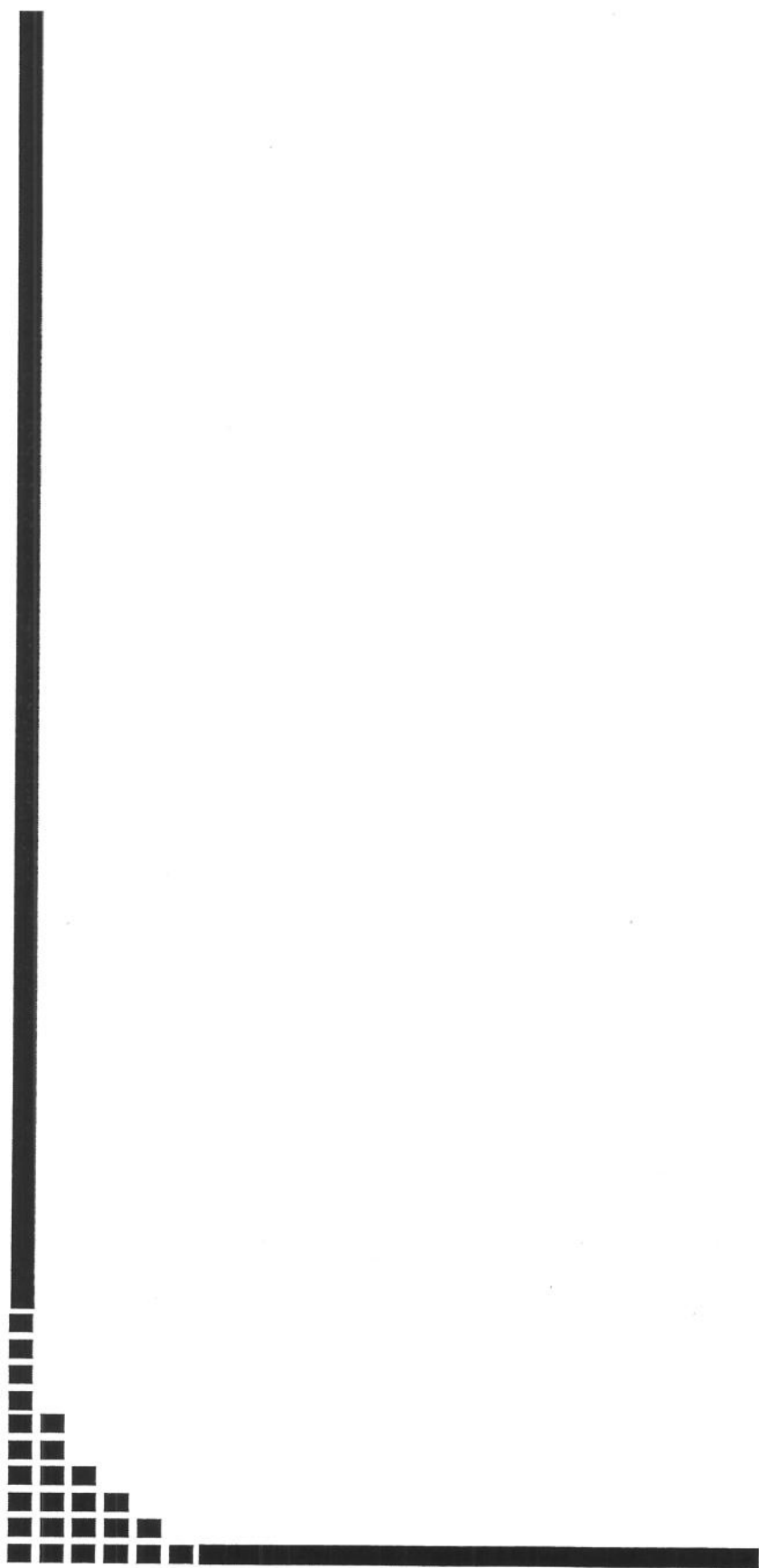
- enhance binding of iron regulatory protein 2. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(45): 42579-42587.
46. SANCHEZ, M., GALY, B., DANDEKAR, T., BENGERT, P., VAINSHTEIN, Y., STOLTE, J., MUCKENTHALER, M.U., HENTZE, M.W. **Iron regulation and cell cycle: identification of an iron-responsive element in the 3'-untranslated region of human cell division cycle 14A mRNA by a refined microarray-based screening strategy.** *J. Biol. Chem.* 2006; 281(32): 22865-22874.
 47. CMEJLA, R., PETRAK, J., CMEJLOVA, J. **A novel iron responsive element in the 3'-UTR of human MRCK α .** *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2006; 341: 158-166.
 48. GUNSHIN, H., ALLERSON, C.R., POLYCARPOU-SCHWARTZ, M., ROFTS, A., ROGERS, J.T., KISHI, F., HENTZE, M.W., ROUAULT, T.A., ANDREWS, N. C., HEDIGER, M., A. **Iron-dependent regulation of the divalent metal ion transporter.** *FEBS.* 2001; 509: 309-316.
 49. MÜLLNER, E. W., KÜHN, L. C. **A stem-loop in the 3'-Untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in the cytoplasm.** *Cell.* 1988; 53: 815-825.
 50. CAUGHMAN, S.W., HENTZE, M. W., ROUAULT, T. A., HARFORD, J. B., KLAUSNER, R. D. **The iron-responsive element is the single element responsible for iron-dependent translational regulation of ferritin biosynthesis.** *J. Biol. Chem.* 1988; 263(35): 19048-19052.
 51. GUO, B., PHILLIPS, J. D., YU, Y., LEIBOLD, E. A. **Iron regulates the intracellular degradation of iron regulatory protein 2 by the proteasome.** *J. Biol. Chem.* 1995; 270(37): 21645-21651.
 52. ROUAULT, T.A. **Post-transcriptional regulation of human iron metabolism by iron regulatory proteins.** *Blood Cells, Molecules and Diseases.* 2002; 29(3): 309-314.
 53. GALY, B., FERRING, D., MINANA, B., BELL, O., JANSER, H. G., MUCKENTHALER, M., SCHÜMMANN, K., HENTZE, M. W. **Altered body iron distribution and microcytosis in mice deficient in iron regulatory protein 2 (IRP2).** *Blood.* 2005; 106(7): 2580-2589.
 54. COOPERMAN, S. S., MEYRON-HOLTZ, E. G., OLIVIERRE-WILSON, H., GHOSH, M. C., MCCONNELL, J. P., ROUAULT, T.A. **Microcytic anemia, erythropoietic protoporphyria, and neurodegeneration in mice with targeted deletion of iron-regulatory protein 2.** *Blood.* 2005; 106(3): 1084-1091.

55. WANG, J., PANTOPOULOS, K. **Conditional derepression of ferritin synthesis in cells expressing a constitutive IRP1 mutant.** *Molecular and Cellular Biology*. 2002; 22(13): 4638-4651.
56. GLOCK, B., WINTER, M., RENNHOFFER, S. O., BRUNHÖLZL, E., TRÖSCHER, D., REISACHER, R. B. K., MAYR, W. R. **Transcript levels of erythroid differentiation-related factor a candidate surrogate marker for transmissible spongiform encephalopathy diseases in blood, shows a broad range of variation in healthy individuals.** *Transfusion*. 2003; 43: 1706-1710.
57. IGARASHI, K., SUN, J. **The heme-Bach1 pathway in the regulation of oxidative stress response and erythroid differentiation.** *Antioxidants & Redox signaling*. 2006; 8(1&2): 107-118.
58. DHAKSHINAMOORTHY, S., JAISWAL, A.K. **Small Maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H: Quinone oxireductase 1 gene.** *J. Biol. Chem.* 2000; 275(51): 40134-40141.
59. TOKI, T., KATSUOKA, F., KANEZAKI, R., XU, G., KUROTAKE, H., SUN, J., KAMIO, T., WATANABE, S., TANDAI, S., TERUI, K., YAGIHASHI, S., KOMATSU, N., IGARASHI, K., YAMAMOTO, M., ITO, E. **Transgenic expression of Bach1 transcription factor results in megakaryocytic impairment.** *Blood*. 2005; 105(8): 3100-3108.
60. SUN, J., BRAND, M., ZENKE, Y., TASHIRO, S., GROUDINE, M., IGARASHI, K. **Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network.** *PNAS*. 2004; 101(6): 1461-1466.
61. TAHARA, T., SUN, J., IGARASHI, K., TAKETANI, S. **Heme-dependent up-regulation of the α -globin gene expression by transcriptional repressor Bach1 in erythroid cells.** *Bio. Bioph. Res. Comm.* 2004; 342: 77-85.
62. TAHARA, T., SUN, J., NAKANISHI, K., YAMAMOTO, M., MORI, H., SAITO, T., FUJITA, H., IGARASHI, K., TAKETANI, S. **Heme positively regulates the expression of β -globin at locus control region via transcriptional factor Bach1 in erythroid cells.** *J. Bio. Chem.* 2004; 279(7): 5480-5487.
63. DHAKSHINAMOORTHY, A., JAIN, A. K., BLOOM, D. A., JAISWAL, A. K. **Bach1 competes with Nrf2 leading to negative regulation of the antioxidant response element (ARE)-mediated NAD(P)H:Quinone oxireductase 1 gene expression and induction in response to antioxidants.** *J. Biol. Chem.* 2005; 280(17): 16891-16900.

64. LEE, J., CHAN, K., KAN, Y. W., JOHNSON, J.A. **Targeted disruption of Nrf2 causes regenerative immune-mediated hemolytic anemia.** PNAS. 2004; 101(26): 9751-9756.
65. KONG, J., JI, X., LIEBHABER, S.A. **The KH-Domain protein α CP has a direct role in mRNA stabilization independent of its cognate binding site.** Molecular and Cellular Biology. 2003; 23(4): 1125-1134.
66. RODGERS, N., D. WANG, Z., KILEDJIAN, M. **Regulated α -globin mRNA decay is a cytoplasmic event proceeding through 3'- to 5'- exosome-dependent decapping.** RNA. 2002; 8: 1526-1537.
67. WEISS, M. J., YU, C., ORKIN, S.H. **Erythroid-Cell-Specific properties of transcription factor GATA-1 revealed by phenotypic rescue of a gene-targeted cell line.** Molecular and Cellular Biology. 1997; 17(3): 1642-1651.
68. VAKOC, C.R., MANDAT, S.A., OLENCHOCK, B.A., BLOBEL, G.A. **Histone H3 lysine 9 methylation and HP1gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin.** Mol Cell. 2005 Aug 5;19(3):381-91, 2005.
69. FENG, Y., WARIN, R., LI, T., OLIVIER, E., BESSE, A., LOBELL, A., FU, H., LIN, C.M., ALADJEM, M. I., BOUHASSIRA, E. E. **The human β -globin locus control region can silence as well as activate gene expression.** Molecular and Cellular Biology. 2005; 25(10): 3864-3874.
70. PAVESI, G., MAURI, G., STEFANI, M., PESOLE, G. **RNAProfile: na algorithm for finding conserved secondary structure motifs in unaligned RNA sequences.** Nucleic Acids Research. 2004; 32(10): 3258-3269.
71. HENDERSON, B. R., MENOTTI, E., BONNARD, C., KÜHN, L. C. **Optimal sequence and structure of iron-responsive elements.** J. Biol. Chem. 1994; 269(26): 17481-17489.
72. SCHRANZHOFFER, M., SCHIFRER, M., CABRERA, J.A., KOOP, S., CHIBA, P., BEUG, H., MÜLLNER, E.W. **Remodeling the regulation of iron metabolism during erythroid differentiation to ensure efficient heme biosynthesis.** Blood. 2006; 107(10): 4159-4167.
73. HAN, A., YU, C., LU, C., FUJIWARA, Y., BROWNE, C., CHIN, G., FLEMING, M., LEBOULCH, P., ORKIN, S.H., CHEN, J.J. **Heme-regulated eIF2 α (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency.** The EMBO Journal. 2001; 20(23): 6909-6918.
74. SARKAR, A., KULKARNI, A., CHATTOPADHYAY, S., MOGARE, D., SHARMA, K.K., SINGH, K., PAL, J.K. **Lead-induced upregulation of the heme-regulated eukaryotic initiation factor 2 α kinase is compromised by**

- hemin in human K562 cells.** *Biochimica et Biophysica Acta*. 2005; 1732: 15-22.
75. SHAEFFER, J.R. **Evidence for soluble alpha-chains as intermediates in hemoglobin synthesis in the rabbit reticulocytes.** *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1967; 28: 647-652.
76. ROUAULT, T. A., HENTZE, M. W., HAILE, D. J., HARFORD, J. B., KLAUSNER, R. **The iron-responsive element binding protein: A method for the affinity purification of a regulatory RNA-binding protein.** *Proc. Natl. Acad. Sci USA*. 1989; 86: 5768-5772.
77. HENDERNSON, B. R., MENOTTI, E., KÜHN, L. **Iron regulatory proteins 1 and 2 bind distinct sets of RNA target sequences.** *J. Biol. Chem.* 1996; 271(9): 4900-4908.
78. MEEHAN, H.A., CONNELL, G.J. **The hairpin loop but not the bulged C of the iron responsive element is essential for high affinity binding to iron regulatory protein 1.** *J. Biol. Chem.* 2001; 276(18): 14791-14796.
79. HUANG, T., MELEFORS, O., LIND, M.I., SÖDERHÄLL, K. **An atypical iron responsive element (IRE) within crayfish ferritin mRNA and an iron regulatory protein 1 (IRP1)-like protein from crayfish hepatopancreas.** *Insecta Biochemistry and Molecular Biology*. 1999; 29: 1-9.





APÊNDICES

AHSP and β -thalassemia: A possible genetic modifier

CAMILA ORESKO DOS SANTOS¹ & FERNANDO FERREIRA COSTA¹

¹State University of Campinas, Center of Hemotherapy and Hematology, Campinas, São Paulo, Brazil

(Received 23 November 2004; accepted 10 December 2004)

Abstract

The identification of defective genes underlying inherited diseases has made it clear that patients with the same genotype can have variable clinical expression. Suggestions proposing that the protein AHSP, a α -globin specific chaperone could influence disease severity in patients with β -thalassemia, an inherited disorder characterized by a quantitative deficiency of β -globin genes. This article presents a review of the AHSP gene structure, function and expression. A discussion of the AHSP gene knowledgments is presented with an overview of the possible genetic modifier function of AHSP on β -thalassemia pathophysiology.

Keywords: AHSP, β -thalassemia, α -globins

Introduction

Alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) is a specific molecular chaperone that binds to the α -chains of hemoglobin, providing a potential compensatory mechanism in erythroid precursors to neutralize the deleterious effects of α -globin precipitation [1,2]. Consistent with a role for AHSP in regulating coordinated globin expression, gene-targeting studies in mice have shown that ablation of AHSP functions leads to erythrocyte abnormalities that are also observed in β -thalassemia [2].

These results may have medical implications. It is known that the balance of the α and β -globin chains is important not just to molecular physiology but also in blood disease. Indeed, in β -thalassemia syndromes the main defect is, by definition, an alteration in the rate of synthesis of β -chains with an excess of α -chains, which is a major determinant of disease severity [3,4].

If the excess in α -chains is correlated with severity disease in thalassemia syndromes, AHSP may provide a potential target for studies searching for new disease severity modulators in β -thalassemia.

The β -thalassemias

β -Thalassemia can be broadly defined as a syndrome of inherited haemoglobin disorders, characterized by a quantitative deficiency in functional β globin chains [4,5]. Although β -thalassemia is considered to be a classical monogenic disease, it is clear that there is considerable clinical variability between patients who inherit identical β globin gene mutations, suggesting that there may be a variety of genetic determinants influencing different clinical phenotypes [4].

The basic defect in β -thalassemia is a reduction or absence in the output of β chains. These affect β -globin synthesis and promote the excess of α -globin chains. Unbound α -chains precipitate in the red-cell precursors in the marrow and in their progeny in the peripheral blood, leading to ineffective erythropoiesis and a shortened red cell survival. The resulting anemia causes an intense proliferative drive in the ineffective bone marrow, which results in skeletal deformities and growth and metabolic abnormalities [6].

Var

α -thalassemia or the co-inheritance of Hereditary Persistence of Fetal Hemoglobin (HPFH) [4]. Identification is another factor that could prove to be compensatory mechanisms is important for the understanding of the clinical features of this disease.

AHSP

Miele et al. [7] were the first to describe AHSP, whilst attempting to identify molecular markers of transmissible spongiform encephalopathies disease (TSE) in non central nervous system tissues in spleens of scrapie-infected and uninfected mice by differential display (DDRT-PCR). One transcript clearly expressed at decreased levels in spleens of scrapie-infected mice was identified. Nucleotide sequencing analysis of this cDNA revealed 100% homology to a nucleotide database. This new gene was named erythroid differentiation related factor (*EDRF*) since it was isolated from murine erythroblasts and human bone marrow.

Kihm et al. in 2002 [1], whilst searching transcripts induced by the transcription factor *GATA-1*, performed a subtractive hybridization after genetic rescue of *GATA-1* null erythroid cell line (G1E-ER2 cell line). The search demonstrated several known *GATA-1* targets and identified numerous other genes of unknown function. In the latter group, *EDRF* messenger RNA and protein were strongly and rapidly induced by *GATA-1*.

The identification of the possible function of this protein was performed in a yeast two-hybrid assay screening a murine erythroleukemia cell complementary library. The analysis demonstrated that *EDRF* selectively bound free α globins as a chaperone. On the basis of its cellular function, *EDRF* was renamed as *AHSP*. Luzzatto and Notaro [3] proposed a hypothetical scheme for the role of *AHSP* function.

The *AHSP* gene is located on chromosome 16 with a genomic structure containing three exons and two introns. The transcript sequence represents approximately 0.5 Kb in length, coding for a protein of 102 amino acids.

Gene transcription

Gallagher et al. [8] studied a number of genomic sequences that could be involved with *AHSP* gene transcription. Inspection of the 5' flanking DNA revealed no TATA or CCAAT sequences; multiple consensus binding sequences for *GATA-1* and a single CACCC-binding protein site were found. *In vivo* studies demonstrated that the *AHSP* gene is dependent on Erythroid Kruppel-like factor (*EKLF*).

To examine the role of *EKLF* in *AHSP* expression, a subtractive hybridization microarray and a RNase protection analysis were performed to compare *AHSP* mRNA levels in fetal liver cells from wild type and homozygous for the knockout gene mice (*EKLF*^{-/-}). *EKLF*^{-/-} fetal liver had 9-fold less *AHSP* mRNA

than wild type fetal liver cells. Based on the observation that *EKLF* associates with an erythroid chromatin remodeling complex, the authors hypothesized *EKLF* was involved in chromatin remodeling at the *AHSP* locus. DNase I hypersensitive sites (HS) were assayed in chromatin from wild type and *EKLF*^{-/-} fetal liver nuclei and a strong DNase I HS was found. To determine histone acetylation in chromatin from wild type and *EKLF*^{-/-} fetal liver was performed chromatin immune precipitation analysis and two regions in wild type chromatin were hyperacetylated while the same regions were hypoacetylated in chromatin from *EKLF*^{-/-} fetal liver cells. The results suggested that *EKLF* is required for remodeling chromatin of the *AHSP* locus [9,10].

Molecular chaperones

In response to many stresses, including heat, oxidizing conditions, and exposure to toxic compounds, all cells produce a common set of heat shock proteins (*Hsps*). Experiments in *E. coli*, yeast, fruit flies and mice have shown that increased expression of these proteins can protect the organism against stress-induced damage [11]. A very similar response occurs in all organisms; increased expression of *Hsps* is mediated at multiple levels, such as mRNA synthesis, mRNA stability, and translation efficiency. Elevated synthesis of *Hsps* persists only through the initial period of stress and even if the organism continues to be exposed to high temperature after the initial shock, *Hsp* expression drops, and *Hsp* levels return to normal. The heat shock response is distinct from adaptive responses that an organism may undergo when its environment changes gradually [11]. Most, but not all, *Hsps* are molecular chaperones, namely proteins that bind and stabilize other proteins at intermediate stages of folding, assembly, and translocation across membranes and degradation.

The *AHSP* characteristics closely resemble those of other members of the small *Hsp* family in its size and ATP independence. Furthermore, *AHSP* is similar to *Rb12p*, a yeast protein that binds β tubulin, a component of microtubules [2]. Free β tubulin disrupts microtubule assembly and function. *Rb12p* limits the toxicity of free β tubulin from forming a heterodimer complex. However, β tubulin interacts more strongly with α tubulin than *Rb12p*, favoring microtubule formation when tubulin subunits are balanced. β tubulin bound to *Rb12p* can be released; either for assembly into microtubules or for storage in higher order phenomenon also aggregates [2].

The same occurs with α globin and *AHSP*; Gell et al. [2] demonstrated that *AHSP* bound α globin can be released for assembly into hemoglobin A tetramers. Based on the studies performed with the *Rb12p* protein, *AHSP* may have two possible functions: *AHSP* might enhance the catabolism of excess free α

globins through interactions with protein degradation machinery and, it is also possible that AHSP plays other roles in erythrocyte maturation, by acting as a monitor of free α globin levels, feeding back to globin gene regulation, as is known to occur with other chaperone proteins.

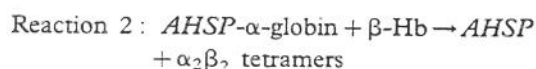
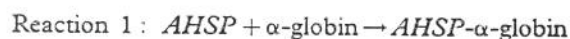
AHSP protein

AHSP in its native state is conformationally heterogeneous in solution, an elongated antiparallel three α -helix bundle complex, and the probable dynamic source of its behavior is a *cis/trans* isomerization of residue Pro30. The α -helix is unusually long (helix 1 and helix 2 comprise residues Lys5 to Asn23 and Glu34 to Arg53, respectively) particularly the *c*-terminal residue (Glu61 to Ser91). Helix 3 is kinked due to the presence of Pro80 in its middle. The third α -helix is arranged with a very rare right-handed twist [12].

The main backbone differences between the *cis* and the *trans* forms are observed in the loop 1 region, where Pro30 is located, with the *cis* conformation being more open than the *trans*. The side chain of residue Leu31 points to opposite directions in both forms. While in the *cis* conformation, Leu31 interacts with Phe88 but not with Phe27, the situation is reverse in the *trans* conformation, with Leu31 interacting with Phe27 but not with Phe88. The *cis* and the *trans* form also present slight differences in the side chain orientation of the aromatic residues, forming the hydrophobic core. The orientation of the *c*-terminus of the helix 3 is different in the structures of both forms of AHSP. [12].

The specific binding site of AHSP to α -globin is in the $\alpha_1\beta_1$ interfaces and no detectable $\alpha\beta$ -complexes and AHSP exist [2]. The conformation complexity of AHSP disappears upon formation with α -globin and some evidence suggests that the *trans* position must be involved in α -globin recognition. The backbone conformation of loop 1 of AHSP undergoes a rearrangement upon α -globin binding. This indicates that once AHSP binds to α -globin, residue Pro30 adopts primarily just one conformation [12].

The heme groups of α -globin are not required for AHSP interactions and at least six amino acids from *N*-terminal and 17 from the *C*-terminal are dispensable for α -globin binding activity [2]. Baudin-Creuzat et al. [13], studying CO recombination kinetics proposed a better understanding for the stabilizing role of AHSP on α -globin. The results demonstrate that AHSP binds rather tightly to hemoglobin α -chains and it is easily replaced by β -chains. (reactions 1 and 2).



In the formation of the complex between the AHSP and α -chains, two models involving the different interface are possible;

1. AHSP could be coupled to the α -chain via the $\alpha_1\beta_2$ type contact, an orientation favoring the association of α -chains with β -chains into $\alpha_1\beta_1$ type dimers. Once the residues which participate in the $\alpha_1\beta_1$ contacts are exposed towards the exterior of the molecule the complex formed by AHSP and the α -chain, the B, G, H helices and the GH corner from α -chains, involved in the $\alpha_1\beta_1$ packing contact, are postulated to be exposed towards the exterior and not participate in the binding with AHSP. In this model, there is the possibility of a ternary complex, with AHSP released only upon Hb ($\alpha\beta$)₂ tetramer formation;
2. An alternative model is the $\alpha_1\beta_1$ type contact for AHSP binding. In this case, the AHSP must dissociate before the β -chain can bind.

To investigate how formation of this complex affects α -globin-mediated redox chemistry, Zhou et al. [14] examined the ability of AHSP to inhibit peroxide-mediated oxidation of the redox-sensitive dye tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD). AHSP binding to oxy- α -hemoglobin induced a spectral shift in the UV/visible range, suggesting that stabilization might be associated with structural alterations in the heme moiety. These alterations suggest that heme-bound iron is converted to a ferric (Fe^{+3}) form and therefore, can no longer catalyze redox chemistry.

These findings illustrate a potential mechanism whereby AHSP renders α -globin chemically inert by inhibiting the reactivity of heme-bound iron. The authors propose that within the AHSP- α -hemoglobin dimer, the oxidized heme is held within a bi-histidyl form, thus blocking its ability to act as a redox catalyst [14].

Only two amino acid changes have been described to date; a variant sequences on AHSP (N75I) that exposes a solvent residue that would not be expected to alter the function of AHSP and another variant, M45K, which is also thought to be a neutral alteration [12].

Role in erythropoiesis

Gell et al. [2] suggested that AHSP might act as a monitor of free α -globin levels, providing feedback for globin gene regulation. Dos Santos et al. [15] demonstrated, using a two-phase liquid culture of human erythroid cells, that AHSP acts as a monitor of free α -globin levels. Blood from control volunteers was cultured in the presence of erythropoietin to stimulate differentiation. The different stages of erythropoiesis were confirmed by morphologic and flow cytometric analysis. Quantification of α -globin and AHSP mRNA

demonstrated a coordinate expression of *AHSP* and α -globin during erythroid maturation with the highest expression of both at stages where hemoglobin synthesis was intense, and a reduction in expression levels when the cells lose their nuclear function and hemoglobin synthesis is reduced.

These findings are in agreement with those of Gell et al. [2] who hypothesized that *AHSP* may have an important role in normal erythropoiesis by stabilizing α -globins to prevent their precipitation and possible helping in hemoglobin tetramer binding.

Evidence for *AHSP* as a genetic modifier

A report by Kihm et al. [1] suggested that *AHSP* might be a possible genetic modifier in β -thalassemia events. It is known that free α -globins are highly unstable in cells, forming inclusion bodies that are detected by staining with crystal violet (Heinz bodies). These inclusion bodies decrease the erythrocyte lifespan by damaging and destabilizing the cell membrane. *In vitro* studies have demonstrated that *AHSP* blocks oxidant-induced α -globin precipitation.

Cell culture experiments were performed in COS cells and coexpressed *AHSP* and α -chain immunoprecipitated together from cell extracts. Indirect immunofluorescence localization data showed that the α -chain, when expressed alone, precipitates in a punctuate pattern, in a similar manner to that of inclusion body formation in β -thalassemic erythroid precursors that contain excess free α -chains.

Some results indicate that when *AHSP* is absent, α -globin becomes unstable and generates reactive oxygen species (ROS) that damage α -globin itself, HbA, and other cellular constituents. *AHSP* could inhibit ROS production from α -globin by reducing its inherent ability to participate in redox reactions and/or by inhibiting its denaturation and subsequent heme release.

In mice, the *AHSP* gene was deleted to investigate the requirement for *AHSP* *in vivo*; mice homozygous for the knockout gene (*AHSP*^{-/-}), demonstrated an elevated reticulocyte count, indicating a shortened erythrocyte half-life. The erythrocytes exhibited an abnormal speculated morphology, which has been observed in erythroid cells of β -thalassemic mice. Moreover, *AHSP*^{-/-} erythrocytes contained denatured haemoglobin inclusions.

Data analyzing the hematological parameters from *AHSP*-null mice and from *AHSP*-null mice with β -thalassemia suggest that *AHSP* participates in normal erythropoiesis by limiting oxidative damage caused by free α -globin and that altered *AHSP* levels could modify the phenotypes of thalassemia in humans [16,17,18]. Erythrocyte β -globin precipitations were present in some mice with β -thalassemia intermedia alone, although the relative levels of α -globin precipitates were always greater. Concomitant *AHSP* deficiency exacerbated both α -globin

precipitation and, to a lesser extent, β -globin precipitation in thalassemic mice [18].

These data strongly suggest that the loss of *AHSP* leads to defective hemoglobin metabolism *in vivo* and that *AHSP* could be a relevant factor in β -thalassemia.

AHSP and β -thalassemia

In order to investigate the possible role of *AHSP* in human β -thalassemic patients, Viprakasit et al. [19] characterized the *AHSP* gene in 120 Thai patients with clinically mild, moderate, and severe forms of Hb E- β -thalassemia to determine whether there were common alleles of *AHSP* in this population that could modify the clinical presentation of β -thalassemia. These authors were unable to find any mutation in the *AHSP* gene of the patients studied. Several single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found and these SNPs formed distinct haplotypes although no statistically significant association was found between a particular haplotype and disease severity. The hypothesis that *AHSP* may act as a genetic modifier in β -thalassemia so far was not proved with studies concerning genotype-phenotype correlations in β -thalassemia patients. There was no alteration in *AHSP* gene that was associated with clinical severity [20,21,22,23].

An indication of the possible role of *AHSP* as a genetic modifier, however, has been shown by studies analyzing the messenger RNA. Galanello et al. [24] studied a group of patients that were heterozygotes for β -thalassemia, with an unusually severe phenotype of thalassemia intermedia, by real-time PCR. The *AHSP* gene in these thalassemia intermedia patients was found to have a significantly lower average expression as compared to beta carriers and normal subjects. Similar results were obtained in erythroid culture cells.

The hypothesis that lower *AHSP* gene expression could be responsible for this severe phenotype was suggested once again by Dos Santos et al. [25] when comparing the *AHSP* and α -globin gene expression in patients with thalassemia major, thalassemia intermedia with different genotypes, and controls by real-time PCR. The α -globin gene expression was not significantly different in any of these groups, whilst *AHSP* gene expression was higher in thalassemia intermedia than in thalassemia major.

Perspectives

The importance of *AHSP* in the red blood cell is becoming increasingly clear with *AHSP* preventing the deleterious effects of α -globin precipitation. The role of *AHSP* as a genetic modifier of β -thalassemia, however, is not clear. The main difficulty in proving this role is the large heterogeneity of the molecular bases that affect the analysis of the genotype/pheno-

type relationship in β -thalassemia. Studies have shown that there are three categories of population specific genetic modifiers that form background genes, some of which have been co-selected with the thalassemias. To include AHSP in these backgrounds in the future it will be important to further examine its gene inheritance and expression in the different populations of patients.

References

- [1] Kihm AJ, Kong Y, Hong W, Russel JE, Rouda S, Adachi K, Simon MC, Blobel GA, Weiss MJ. An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha-hemoglobin. *Nature* 2002;417(6890):758–763.
- [2] Gell D, Kong Y, Eaton SA, Weiss MJ, Mackay JP. Biophysical characterization of the alpha-globin binding protein AHSP. *J Biol Chem* 2002;277(43):40602–40609.
- [3] Luzzatto L, Notaro R. Haemoglobin's chaperone. *Nature* 2002;417:703–705.
- [4] Weatherall DJ, Clegg JB. The thalassemia syndromes., 4th ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 2001.
- [5] Thein SL. Genetic insights into the clinical diversity of β -thalassaemia. *Br J Haematol* 2004;124:264–274.
- [6] Weatherall DJ. Thalassemia: The long road from bedside to genome. *Nat Genet* 2004;5:1–7.
- [7] Miele G, Manson J, Clinton M. A novel erythroid-specific marker of transmissible spongiform encephalopathies. *Nat Med* 2001;3(7):361–364.
- [8] Gallagher PG, Wong EY, Pilon AM, Weiss MJ, Bodine DM. The human alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) gene is regulated by GATA-1 and EKLF (abstract). *Blood* 2003;102:945.
- [9] Gallagher PG, Pilon AM, Arcasoy MO, Bodine DM. Multiple defects in erythroid gene expression in Erythroid Kruppel-Like Factor (EKLF) target genes in EKLF-deficient mice (abstract). *Blood*. In press.
- [10] Pilon AM, Wong C, Garret-Beal LJ, Weiss M, Gallagher PG, Bodine DM. Chromatin remodeling of the mouse AHSP gene requires EKLF (abstract). *Blood*. In press.
- [11] Alberts B, Jonson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 4th ed. New York: Taylor & Francis Group; 2002.
- [12] Santiveri CM, Pérez-Cañadillas JM, Vadivelu MK, Allen MD, Rutherford TJ, Watkins NA, Bycroft M. NMR structure of the α -hemoglobin chaperone AHSP: Insights into conformational heterogeneity and binding. *J Biol Chem* 2004;279(33):34963–34970.
- [13] Baudin-Creuzat V, Vasseur-Godbillon C, Pato C, Préhu C, Wajcman H, Marden MC. Transfer of human α to β -hemoglobin via its chaperon protein: Evidence for a new state. *J Biol Chem* 2004;279(35):36530–36533.
- [14] Zhou S, Gell D, Kong Y, Li J, Mackay JP, Weiss M, Gow AJ. Mechanisms of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) actions (abstract). *Blood*. In press.
- [15] Dos Santos CO, Duarte AS, Saad ST, Costa FF. Expression of alpha-hemoglobin stabilizing protein gene during human erythropoiesis. *Exp Hematol* 2004;32(2):157–162.
- [16] Kong Y, Katein AM, Loudon CS, Weiss MJ. Loss of alpha hemoglobin stabilizing protein exacerbates thalassemia phenotypes in mice. (abstract). *Blood* 2003a;102:149.
- [17] Kong Y, Kihm AJ, Katein AM, Loudon CS, Brugnara C, Weiss MJ. Loss of alpha hemoglobin stabilizing protein causes compensated hemolytic anemia with globin precipitation and oxidative stress. (abstract). *Blood* 2003b;102:714.
- [18] 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 α -hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates β -thalassemia. *J Clin Invest* 2004;114(10):1457–1466.
- [19] Viprakasit V, Tanphaichitr VS, Chinchang W, Sangkha P, Wiess MJ, Higss DR. Valuation of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) as a genetic modifier in patients with β -thalassemia. *Blood* 2004;103(9):3296–3299.
- [20] Bittles A, Erber W, editors. Genotype–phenotype relationship in thalassemia: Predicting clinical severity by molecular testing. Genetics and population health conferences Western Australia, Australia: World Health Organization; 2004. p 92, 2004 Aug 8–10.
- [21] Bittles A, Erber W, editors. Thalassemia genotype–phenotype correlations. Genetics and population health conferences Western Australia, Australia: World Health Organization; 2004. p 92, 2004 Aug 8–10.
- [22] Cappellini MD, Refaldi C, Bignamini D, Zanaboni L, Fiorelli G. Molecular analysis of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) in caucasian patients with different Beta-Thalassemia phenotypes (abstract). *Blood*. In press.
- [23] Fucharoen S, Winichagoon P, Sripitchai O, Munkongdee T, Kumkhaek C, Vichitumaros K, Whiacre J, Abel K, Braun A. Genetic analysis of candidate modifier polymorphisms in β -thalassemia/Hb E patients (abstract). *Blood*. In press.
- [24] Galanello R, Perseu L, Giagu N, Sole G. AHSP expression in Beta-thalassemia carriers with thalassemia intermedia phenotypes (abstract). *Blood* 2003;102:1881.
- [25] Dos Santos CO, Duarte ASS, Saad STO, Costa FF. Expression of alpha hemoglobin stabilizing protein gene (AHSP) during erythropoiesis and in beta-thalassemia (abstract). *Blood* 2003;102:3837.

The Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein Mutation N75I Impairs Protein Function and is Associated with Increased Severity of β Thalassemia

Camila O. dos Santos^{1,2}, Suiping Zhou², Flavia R. Pinho¹, Dulcineia M. Albuquerque¹, Anderson F. da Cunha¹, Rodrigo Secolin³, Xiaomei Wang², Swee Lay Thein⁴, Doug R. Higgs⁵, Iscia Lopes-Cendes³, Sara T. O. Saad¹, Mitchell J. Weiss^{2,6}, Fernando F. Costa^{1,6}

1. State University of Campinas, Center of Hemotherapy and Hematology, Sao Paulo, Brazil
2. The Children's Hospital of Philadelphia, Division of Hematology, and the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA
3. State University of Campinas, Department of Medical Genetics, São Paulo, Brazil
4. Dept of Haematological Medicine, King's College School of Medicine, King's College Hospital, Denmark Hill, London SE5 9RS, United Kingdom
5. The MRC Molecular Haematology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, John Radcliffe Hospital, University of Oxford, United Kingdom
7. Co-corresponding authors:

Fernando F. Costa, University of Campinas, Center of Hematology and Hemotherapy, Campinas, SP, ferreira@unicamp.br, Phone: (19) 3788 8611

Mitchell J. Weiss, Children's Hospital of Philadelphia, Division of Hematology, 3615 Civic Center Blvd., Philadelphia, PA 19104, weissmi@email.chop.edu, Phone:(215) 590-0565

Author contributions: Author contributions: COS, SZ, FRP, DMA, AFC, XW, performed experiments. SLT, DRH collected patient material and analyzed clinical data, STOC, FFC, RS, ILC analyzed data. COS and MW analyzed data and wrote the manuscript.

Supported by: The National Institutes of Health (grant R01 DK61692 [M.J.W.]), The Cooley's Anemia Foundation (S.Z), The General Clinical Research Center of The Children's Hospital of Philadelphia, Grant number 5-MO1-RR-000240, FAPESP (grant 02/13801-7) and CAPES (grant BEX0638/05-6).

Abstract

Alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) binds α hemoglobin, limits its ability to produce reactive oxygen species and stabilizes its structure. This raises the possibility that naturally occurring variations in AHSP protein could influence β thalassemia phenotypes by modulating the effects of α globin excess. We analyzed *AHSP* gene coding regions in 348 anonymous individuals from 6 different geographic regions and 109 well characterized patients with various forms of β thalassemia. We detected numerous single nucleotide polymorphisms, including *AHSP* N75I, which substitutes isoleucine for asparagine at amino acid position 75 in the AHSP protein. Several thalassemia patients who were heterozygous for *AHSP* N75I exhibited clinical phenotypes that are more severe than expected for the thalassemic β globin gene mutations. Moreover, erythrocytes from non-thalassemic *AHSP* N75I heterozygotes contained low level hemoglobin precipitates, similar to what we observed previously in *Ahsp* haploinsufficient mice. Finally, compared to recombinant wild type AHSP protein, AHSP N75I was less effective at inhibiting the production of reactive oxygen species by α hemoglobin. Together, our data identify *AHSP* N75I as a candidate modifier of β thalassemia.

Introduction

Beta thalassemia is a common inherited hemoglobinopathy caused by β globin gene mutations that impair the production of β globin polypeptide. This limits the synthesis of hemoglobin (Hb) A ($\alpha_2\beta_2$), the major blood oxygen carrier in adults¹. In addition, β globin deficiency causes accumulation of free α Hb, an unstable protein and potent oxidant. Excessive free α Hb causes premature death of erythroid precursors (ineffective erythropoiesis) and shortened lifespan of circulating erythrocytes². The clinical spectrum of β thalassemia varies greatly, even among individuals with the same β globin gene mutations. Numerous genetic and environmental determinants contribute to this variability³. Coexisting globin mutations that modulate α to β globin chain ratios are important modifiers. For example β thalassemia is alleviated by ongoing expression of γ globin, a fetally expressed β -like chain that binds α Hb. Similarly, concomitant α thalassemia improves β thalassemia by reducing free α Hb, while inheritance of extra α globin loci is deleterious. These clinical findings highlight free α Hb as a major determinant of β thalassemia pathophysiology and explain some of the observed phenotypic heterogeneity. However, not all observed clinical variability in β thalassemia can be explained and it is believed that additional unknown genetic modifiers exist.

Alpha hemoglobin-stabilizing protein (AHSP) is an abundant erythroid protein that specifically binds α globin polypeptide and multiple forms of free α Hb, but not β Hb or HbA^{4,5}. AHSP limits the oxidative effects of α Hb and prevents its precipitation in solution and in cells. Loss of AHSP in mice causes hemoglobin precipitation with reduced

erythrocyte lifespan and ineffective erythropoiesis. Furthermore, β thalassemia in mice is exacerbated by concomitant loss of AHSP⁶. These observations indicate that AHSP stabilizes α Hb during normal erythropoiesis and suggest that altered AHSP expression or function could modulate β thalassemia in humans.

We and others have examined AHSP loci in selected β thalassemia pedigrees and populations⁷⁻¹². Some of these studies indicate that variations in expression could modulate β thalassemia, although no structural *AHSP* mutations or statistically significant associations between specific alleles and disease severity were discovered. However, these prior studies examined *AHSP* genes in a relatively limited number of thalassemic populations. It is important to examine *AHSP* sequences more broadly because the genetics of thalassemia and its modifiers vary greatly between populations from different geographic regions of the world. In the current study, we analyzed *AHSP* gene coding regions in a large, diverse cohort of normal subjects and β thalassemia patients. We found that AHSP missense mutations are relatively rare in all populations studied. However, a previously described single nucleotide polymorphism (SNP) variant, *AHSP* N75I, was associated with impaired protein function and unexpectedly severe phenotypes in some β thalassemia patients. These findings indicate that stabilization of α Hb by AHSP may play an important role in the pathophysiology of human β thalassemia and identify *AHSP* N75I as a candidate modifier mutation.

Methods

DNA analysis. A total of 436 DNA samples from various ethnic groups were studied. *AHSP* gene nucleotide positions are numbered according the nomenclature used in Genbank accession number AC106 730.2. Two set of polymerase chain reaction (PCR) primers were used to amplify a 1.26-kb fragment of the structural portion *AHSP* from genomic DNA: AHSP_F2: 5'- GCCTCTCCCTTCTTCTCCTC-3'; AHSP_R2: 5'- CGTGTCTCTGCTTGTTTCCA-3'; AHSP_F3: 5'-TCCATTTC AAAGGACTGGCC-3'; and AHSP_R3: 5'-TGGTCACTCAAGGCTGCTAA-3'. PCR products were sequenced using fluorescent-labeled dideoxyterminators. The molecular basis for β thalassemia on the Brazilian population was determined by sequencing the β globin gene. Analysis of the T₁₅-T₁₈ region at the 5' end of the *AHSP* gene was performed as described¹⁰.

Phylogenetic analysis. Haplotypes were estimated using an accelerated EM algorithm in Haploview v3.32[©] software and aligned with Multalin[©] software (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>)^{13,14}. Phylogenetic analyses were performed by distance matrix and Phylogenetic tree were built from Neighbor n-joining method in Clustal W online software (<http://align.genome.jp/>)¹⁵. Moreover, association tests, as well as odds ratio (OR) calculus with 95% interval confidence (IC), were analyzed from 88 Brazilian with thalassemia (cases) and 126 Brazilian controls using Fisher's exact test in R environment. Association between mutation and disease were accepted with p values < 0.01¹⁶.

Protein expression and purification. N75I AHSP cDNA was cloned from carrier individuals using previously described methods. The full-length coding regions of wild-type (wt) and N75I human *AHSP* cDNA (GeneBankTM accession number AF147435) were subcloned into the bacterial protein expression vector pGEX-2T (Amersham Biosciences). Recombinant wt and N75I AHSP proteins were produced as described^{4,5}. Alpha Hb was purified as described¹⁷.

Analysis of AHSP- α Hb binding affinities by surface plasmon resonance. Wt and mutant versions of AHSP fused to GST were immobilized onto Sensor Chip CM5 (Biacore AB) using The GST Capture Kit according to the manufacturer's instructions. The analyte, carbon monoxy (CO) α Hb, was injected with flow rate 40 μ l/min for 2 min. The experiments were conducted at room temperature using a Biacore 3000 instrument according to the manufacturer's instructions. Data were analyzed using BIAevaluation software (version 3.0).

AHSP-mediated conversion of oxygenated (oxy) α Hb to the ferric bis-histidyl form. Oxy α Hb (5 μ M) was incubated on ice for 30 minutes with 10 μ M of AHSP-WT or AHSP-N75I to allow oxy- α -Hb-AHSP complexes to form. The complexes were then shifted to room temperature and the rate of Fe(III) α Hb formation was determined by monitoring the characteristic changes in visible light absorbance¹⁸.

Production of reactive oxygen species (ROS) by α Hb. Oxy α Hb (10 μ M) was incubated with 1.5 molar excess recombinant wt or N75I AHSP proteins at 4°C for 30 minutes.

Generation of ROS from hydrogen peroxide by α Hb or α Hb AHSP complexes was performed using the ROS sensitive dye tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) as described⁶.

Heinz body analysis. Heinz body staining was performed as described previously¹⁹. Five μ l of fresh whole blood was mixed with 5 μ l of methyl violet stain solution and incubated at 37°C for 1 hour. Three μ l were used to smear cell slides and cells were analyzed using a phase contrast Eclipse E-600 microscopic (Nixon). Images were captured by Image Pro-Express 4.0 software (Media Cybernetic, LP).

Immunofluorescence. Peripheral blood (10 μ l) was formaldehyde-fixed and incubated with primary antibodies, either rabbit polyclonal anti- α -globin antibody (1:100 dilution) or TRITC-conjugated anti-actin antibody (1:100 dilution) overnight at 4°C. The samples were rinsed in PBS and exposed to secondary antibody, (1:1000, anti-rabbit IgG FITC, 400 μ g/mL, Santa Cruz Biotechnology) for 2 hours at room temperature. Samples were mounted and imaged using a Zeiss LMS 510 fluorescence microscope using a C-APOCHROMAT 63x1.2W water lens. The acquisition software was Confocal microscopy Software Release 3.2.

Results

The initial goal of this study was to ascertain the frequencies of *AHSP* mutations in thalassemic populations. We sequenced the *AHSP* gene in a cohort of 88 well-characterized β thalassemia patients followed at the University of Campinas Center of Hematology in Brazil and 126 control individuals from the same region (ethnic background mainly Portuguese, Italian and African), 21 β thalassemia patients from The Children's Hospital of Philadelphia (mainly Italian descent) and anonymous subjects from the following regions where thalassemia is common: 50 individuals from Papua New Guinea; 28 from Mediterranean countries; 50 from Punjab and northern regions of the Indian continent; 46 from Port Olry (Vanatu, Melanesia) and 48 from Afro-Caribbean regions.

In previous studies, we used polymorphic markers to define different *AHSP* gene haplotypes in selected populations^{10,12}. Here we extend this analysis by comparing *AHSP* gene sequences from more diverse populations throughout the world. By analyzing SNP associations, 19 different *AHSP* gene haplotypes were determined among the DNA samples analyzed (Table 1). The *AHSP* SNPs positions used for the haplotypes were: 11943 (A-G), 12020 (T¹⁸ – T¹⁵), 12347 (G-A), 12391 (G-A), 12985 (G-T), 12888 (A-T) and 12991 (T-C). The nucleotide position number refers to Genbank accession number AC 106 730.2. Phylogenetic analysis predicted two major haplotype clades: Haplotypes H9 to H19 in clade I are represented mainly in samples from Port Olry, Papua New Guinea and Indian continents; haplotypes H1 to H8 (clade II) predominate in samples from Brazilian, North America, Mediterranean and Afro-Caribbean regions (Figure 1).

We identified both new and previously described SNPs, including two rare variants that cause amino acid substitutions in AHSP protein: SNP N75I (AHSP gene position 12888, A-T) replaces isoleucine for asparagine at amino acid position 75 and-SNP P100T (12962, C-A), substitutes threonine for proline at amino acid position 100. Neither of these SNPs are described in public databases, although N75I is noted in the literature²⁰. We did not find dbSNP rs10920 (12798, T-A, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=snp>), which encodes a lysine to arginine substitution at amino acid position 45 of AHSP protein²⁰, indicating that this variant is rare.

The AHSP N75I variant was reported previously but its functional significance and allele frequencies in various populations are not known²⁰. In previous studies, this mutant allele was not found in thalassemic individuals from Thailand, Sri Lanka or Mediterranean areas^{7,9-12}. These reports and the current one indicate that AHSP N75I is relatively rare. However, we found this variant to coexist with β globin mutations in three Brazilian pedigrees (Table 2).

In pedigree 1, the index patient, of Italian and Portuguese ancestry, was doubly heterozygous for β^0 thalassemia (genotype β^{39}/β^A , with normal α globin genotype) and AHSP N75I. The patient had chronic severe anemia requiring regular blood transfusions and died of sepsis in 2004. The patient's mother has the same β globin genotype with normal AHSP alleles. She exhibits only mild anemia with microcytosis, a more typical phenotype for the β^{39}/β^A genotype. The father has normal erythrocyte indices, normal β

globin alleles and is heterozygous for AHSP N75I. Therefore, in this family, heterozygosity for AHSP N75I is associated with a more severe β thalassemia phenotype.

In pedigree 2, the index patient has β^0 thalassemia trait (genotype β^{39}/β^A) and is heterozygous for both triplicate α -globin (genotype $\alpha\alpha/\alpha\alpha\alpha$) and AHSP N75I. This individual has mild anemia, bone disease and splenic enlargement. Two sibs have the same genotypes and similar Hb levels, but no splenomegaly. Exacerbation of thalassemia in this pedigree could be due to heterozygosity of triplicate α globin genes^{21,22}, AHSP N75I or both. However, the son of the patient has the same genotype combination, but is clinically normal, indicating that other inherited or acquired phenotype modifiers must also exist in this pedigree. The patients in this family also were from Italian and Portuguese ancestry.

Pedigree 3 consists of two sibs of Italian descent who are compound heterozygotes for β^+ thalassemic mutations (genotype $\beta^{-89}/\beta^{IVS1-6}$) and are also heterozygous for AHSP N75I. These individuals have thalassemia intermedia with intermittent transfusion requirement, splenomegaly and bone disease. Of note, the hemoglobin levels for 6 individuals with the $\beta^{-89}/\beta^{IVS1-6}$ genotype are reported as 8.6 ± 1.1 g/dL²³. The hemoglobin levels of the two individuals in pedigree 3 are at the low end of this range. It is possible that coinheritance of AHSP N75I contributes to the relatively low hemoglobin levels in these affected individuals.

Two non-coding polymorphisms may be associated with variations in AHSP gene expression. First, 12020 (T¹⁸ – T¹⁵) is a variable length T stretch located approximately

110 nucleotides upstream of the major start of transcription^{10,12}. Reticulocytes from individuals with the T¹⁵ polymorphism contain reduced *AHSP* mRNA compared to individuals who are homozygous for the T¹⁸ variant¹⁰. Second, SNP-12391 (G/A) resides within an Oct-1 transcription factor binding site required for optimal *AHSP* promoter activity in linked reporter assays²⁴. An A residue at this position could potentially disrupt Oct-1 binding and inhibit transcription. All individuals in pedigrees 1, 2 and 3 are homozygous for the *AHSP* T¹⁸ variant and for G at position 12391 within the Oct-1 site, genotypes that are not predicted to adversely affect *AHSP* expression. Another *AHSP* SNP in the 5' upstream region at position 11679 that was associated with reduced mRNA expression in a Japanese cohort was not examined in the current study²⁵.

It is possible that coinheritance of *AHSP* N75I exacerbates β thalassemia in pedigrees #1 and #3. In this case, the *AHSP* mutation should impair protein function. Previously, we noted that *Ahsp*^{+/-} mice are hematologically normal, but their erythrocytes contain low-level Hb precipitates (Heinz bodies), indicating that *AHSP* haploinsufficiency causes mild destabilization of α Hb⁶. Similarly, we found erythrocyte Heinz bodies in two *AHSP* N75I heterozygotes with normal β globin alleles and normal erythroid indices (Figure 2, top panels and not shown). Immunofluorescence studies showed that the Heinz bodies contained precipitated α globin in two related individuals (Figure 1, middle panels). In contrast, we observed no Heinz bodies in 6 control individuals with normal *AHSP* alleles. Hence, heterozygosity for *AHSP* N75I in the context of normal β globin alleles is associated with α globin instability in erythrocytes.

Human AHSP is a 102 amino acid protein consisting of three parallel α helices. The distal portion of helix 1, the proximal portion of helix 2 and their intervening loop form the α Hb binding interface of AHSP^{18,20}. Position 75 contains a solvent-exposed residue within a conserved region of helix 3 that does not participate directly in α Hb binding²⁰. Asparagine is present at this position in human, pig and cow AHSP proteins while another polar amino acid, serine (S), is present in rat and mouse. Substitution of I at this position introduces a hydrophobic amino acid that, unlike N or S, is incapable of hydrogen bonding.

To investigate how the N75I substitution affects AHSP function, we studied biochemical interactions between recombinant mutant protein and purified α Hb. Previously, we showed that wt AHSP binds oxygenated ferrous (FeII) α Hb with an association constant of 100 nM^{-1} to form an AHSP-oxy (FeII) α Hb complex (Figure 3A)⁴. Upon further incubation, the complex becomes deoxygenated and oxidized through loss of an O_2^- ion to form (FeIII) α Hb. Simultaneously, AHSP-bound α Hb undergoes a conformational change in which the heme iron becomes liganded at opposite sides of the planar porphyrin ring by histidine residues 58 and 87 of the α globin polypeptide^{18,26,27}. This bis-histidyl structure limits the accessibility α Hb-associated iron, inhibiting its ability to participate in chemical reactions that produce ROS.

AHSP N75I and wt AHSP were indistinguishable in their binding to α Hb as measured by surface plasmon resonance, suggesting that the mutation does not affect the affinity of AHSP for α Hb (Figure 3B), consistent with predictions based on structural studies^{18,20}. In addition, N75I AHSP and wt AHSP induce oxidation of bound oxy FeII α Hb to the FeIII

form at similar rates (Figure 2C). Introduction of N75I AHSP or wt AHSP cDNA expression constructs into murine erythroleukemia cells generated similar levels of protein, as assessed by Western blotting (not shown). Together, these findings demonstrate that AHSP N75I is stable, folds normally and is expressed at normal levels in erythroid cells.

Next, we compared production of ROS from hydrogen peroxide by wt or N75I AHSP-(FeIII) α Hb complexes (Figure 3D). Wt AHSP suppressed ROS production from α Hb by 64%. In contrast N75I AHSP suppressed ROS production by only 44%. These differences were reproduced in three experiments using independent protein preparations. Therefore, compared to wt AHSP, the N75I mutant protein is about 30% less effective at suppressing ROS production by α Hb. It is possible that in vivo, increased ROS production by α Hb bound to AHSP N75I causes low-level Hb precipitation with Heinz bodies in individuals with normal β globin alleles (Figure 2) and exacerbates thalassemia phenotypes in some patients (Table 2).

Discussion

The biochemical properties of AHSP, in particular its ability to stabilize free α Hb, suggest that alterations in AHSP expression or function could modulate β thalassemia phenotypes. Here we describe an *AHSP* gene mutation (*AHSP* N75I) that appears to impair protein function and is associated with unexpectedly severe thalassemic phenotypes in some individuals. The mechanism by which AHSP N75I fails to fully stabilize α Hb is unknown. AHSP N75I induces the formation of the stable bis-histidyl form of α Hb at a rate comparable to that of wt AHSP (Figure 3 and not shown). However, it is possible that

within the α Hb-AHSP complex, one or both iron-histidine bonds are weakened by the AHSP N75I mutation. This would increase the chemical reactivity of iron, enhancing the production of ROS that promote Hb precipitation. In any case, our data suggest that subtle alteration of AHSP function via heterozygosity for the N75I mutant could exacerbate the deleterious effects of free α Hb in some patients. However, it is now important to verify this hypothesis by examining additional thalassemic pedigrees, particularly those of African or Mediterranean descent, as our *AHSP* haplotype analysis (Table 2) predicts that the N75I mutation arose in one of these regions.

Our data and prior studies indicate that structural mutations in the *AHSP* gene are rare in most populations. Hence, such mutations are unlikely to be common modifiers of β thalassemia. More likely, AHSP null or missense mutations exist in a relatively rare subset of pedigrees in which thalassemia severity is discordant with β globin genotypes. Examination of such families is important to better define the role of AHSP in normal Hb synthesis and β thalassemia. Moreover, several recent studies indicate that erythroid *AHSP* expression varies widely among normal individuals and that reduced *AHSP* expression correlates with more severe thalassemia in some populations and pedigrees^{9,10,28} and with drug or infection-induced hemolytic anemia in non-thalassemic individuals²⁵. Therefore, it is possible that genetically determined variations in *AHSP* gene expression influence β thalassemia phenotypes relatively frequently.

Acknowledgements

We thank Vivian Cheung for reviewing this manuscript.

Table 1. Population distributions of AHSP gene haplotypes.

		Haplotype Frequencies (%) [†]							
Haplotype	Sequences*	AC (n=96)	AI (n=100)	B ^{CTRL} (n=252)	B ^{THAL} (n=176)	M (n=92)	N ^{THAL} (n=42)	NG (n=100)	P (n=92)
H1	A18GGGAT	39.4	23.5	56.4	51.0	44.6	45.8	21.0	13.3
H2	G15GGGAT	7.4		2.7					1.1
H3	A18GGGTT			0.9	1.3				
H4	A18AGGAT	3.2		21.8	30.5	37.5	41.7	6.0	7.8
H5	G15AGGAT	4.3					4.2		1.1
H6	A18GGGAC	2.1			1.3				
H7	G15GGGAC					1.8			
H8	A18AGGAC				1.3	1.8		1.0	1.1
H9	G15GAGAT	1.1		3.6				3.0	
H10	A18GAGAT			0.9		1.8		5.0	1.1
H11	A18AAGAT			1.8	0.7				
H12	A18GGTAT	3.2							
H13	G15GGTAT	14.9	25.0	4.5	1.3				
H14	G15GATAT	9.6	2.9	6.4	3.3		4.2	47.0	62.2
H15	A18GATAT	3.2		0.9		8.9			
H16	A18AGTAT	1.1		0.9	2.6	1.8			
H17	A18AATAT				1.3	1.8			
H18	G15AATAT	6.4	48.5		4.6		4.2	15.0	12.2
H19	G15AGTAT	4.3			0.7			2.0	

* The sequences for AHSP SNP haplotypes are: 11943 (A-G), 12020 (T¹⁸ – T¹⁵), 12347 (G-A), 12391 (G-A), 12985 (G-T), 12888 (A-T) and 12991 (T-C). Nucleotide position numbers refer to Genbank accession number AC 106 730.2.

† AC, Afro-Caribbean; AI, Indian continent; Br^{ctrl}, control subjects from Brazil; Br^{thal}, β thalassemic subjects from Brazil; M, Mediterranean; N^{thal}, β thalassemic subjects from North America; NG, Papua New Guinea and PO, Port Olry (Vanatu, Melanesia). n, number of alleles sequenced.

Table 2. Hematological data from β thalassemia pedigrees with AHSP N75I SNP

Sample	β globin genotype*	AHSP Genotype	AHSP Haplotype	Hb (g/dL)	MCV (fL)	MCH (pg)	Ret (%) [†]	HbA ₂ (%)	HbF (%)	α globin genotype
Pedigree 1										
Patient	β^{39}/β^A	N75I/wt	H1/H3	6.8	67	19	10.4	4	5.2	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Mother	β^{39}/β^A	wt / wt	H1/H1	10.8	63	19.7	nd	5.7	0.7	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Father	β^A/β^A	N75I/ wt	H1/H3	14.5	89.6	29.7	nd	2.0	0.2	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Pedigree 2										
Patient	β^{39}/β^A	N75I/ wt	H1/H3	9.4	59	20.7	1.86	4.8	2.6	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Brother	β^{39}/β^A	N75I/ wt	H1/H3	11	65.1	20.4	2.29	4.7	3.3	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Sister	β^{39}/β^A	N75I/ wt	H1/H3	10.9	61.1	19.2	3.18	5.0	3.9	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Son	β^{39}/β^A	N75I/ wt	H1/H3	13.8	61.1	20.2	1.56	4.9	1.2	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Daughter	β^A/β^A	wt / wt	H1/H1	14.4	88.4	29.9	1.52	2.9	0.9	$\alpha\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Pedigree 3										
Patient	$\beta^{-89}/\beta^{IVS1-6}$	N75I/ wt	H4/H3	7.2	77	22.8	4.2	6.7	4.3	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$
Patient	$\beta^{-89}/\beta^{IVS1-6}$	N75I/ wt	H4/H3	7.3	73	21.3	13.7	3.2	3.2	$\alpha\alpha/\alpha\alpha$

* β^A denotes normal genotype. B39 is a β^0 mutation that fully ablates β globin synthesis. β^{89} and β^{IVS1-6} are β^+ mutations that partially inhibit β globin synthesis²⁹.

[†] nd, not done.

Abbreviations: Hb, hemoglobin; MCV, mean corpuscular volume; MCH, mean cell hemoglobin, Ret, reticulocyte count, HbF, fetal hemoglobin level.

References

1. Cunningham MJ, Weiss MJ, Neufeld EJ. Thalassemia. In: Young NS, Gerson SL, High KA, eds. *Clinical Hematology*. Philadelphia, PA, USA: Mosby Elsevier; 2006:281-292.
2. Schrier SL. Pathophysiology of thalassemia. *Curr Opin Hematol*. 2002;9:123-126.
3. Weatherall DJ. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassaemias. *Nat Rev Genet*. 2001;2:245-255.
4. 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;277:40602-40609.
5. Kihm AJ, Kong Y, Hong W, et al. An abundant erythroid protein that stabilizes free alpha hemoglobin. *Nature*. 2002;417:758-763.
6. Kong Y, Zhou S, Kihm AJ, et al. Loss of alpha-hemoglobin-stabilizing protein impairs erythropoiesis and exacerbates beta-thalassemia. *J Clin Invest*. 2004;114:1457-1466.
7. Cappellini MD, Refaldi C, Bignamini D, Zanaboni L, Fiorelli G. Molecular analysis of alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) in Caucasian patients with different beta-thalassemia phenotypes. *Blood*. 2004;104a:29b.
8. dos Santos CO, Duarte AS, Saad ST, Costa FF. Expression of alpha hemoglobin stabilizing protein gene (AHSP) during erythropoiesis and beta thalassemia. *Blood*. 2003;102:3837a.
9. Galanello R, Perseu L, Giagu N, Sole G. AHSP expression in beta-thalassemia carriers with thalassemia intermedia phenotype. *Blood*. 2003;102:abstract-1881.
10. Lai MI, Jiang J, Silver N, et al. AHSP is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of beta thalassemia. *British Journal of Hematology*. 2006;In press.
11. Premawardhena A, Fisher CA, Olivieri NF, et al. Haemoglobin E beta thalassaemia in Sri Lanka. *Lancet*. 2005;366:1467-1470.
12. 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.
13. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics*. 2005;21:263-265.
14. Corpet F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res*. 1988;16:10881-10890.
15. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*. 1994;22:4673-4680.
16. Clarkson D, Fan Y, Joe H. A remark on algorithm:FEXACT: An algorithm for performing Fisher's exact test in $r \times c$ contingency tables. *ACM Transactions in Mathematical Software*. 1993;19:484-488.
17. Bucci E. Preparation of Isolated Chains of Human Hemoglobin. In: Antonini E, Luigi R-B, Chiancone E, eds. *Methods in Enzymology*. Vol. 76. New York: Academic Press; 1981:97-105.

18. Feng L, Gell DA, Zhou S, et al. Molecular mechanism of AHSP-mediated stabilization of alpha-hemoglobin. *Cell*. 2004;119:629-640.
19. Stamatoyannopoulos G, Woodson R, Papayannopoulou T, Heywood D, Kurachi S. Inclusion-body beta-thalassemia trait. A form of beta thalassemia producing clinical manifestations in simple heterozygotes. *N Engl J Med*. 1974;290:939-943.
20. Santiveri CM, Perez-Canadillas JM, Vadivelu MK, et al. NMR structure of the alpha-hemoglobin stabilizing protein: insights into conformational heterogeneity and binding. *J Biol Chem*. 2004;279:34963-34970.
21. Camaschella C, Bertero MT, Serra A, et al. A benign form of thalassaemia intermedia may be determined by the interaction of triplicated alpha locus and heterozygous beta-thalassaemia. *Br J Haematol*. 1987;66:103-107.
22. Kulozik AE, Thein SL, Wainscoat JS, et al. Thalassaemia intermedia: interaction of the triple alpha-globin gene arrangement and heterozygous beta-thalassaemia. *Br J Haematol*. 1987;66:109-112.
23. De Angioletti M, Lacerra G, Pagano L, et al. Beta-thalassaemia-87 C-->G: relationship of the Hb F modulation and polymorphisms in compound heterozygous patients. *Br J Haematol*. 2004;126:743-749.
24. 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;280:39016-39023.
25. Kanno H, Kamatani N, Hamada T, et al. Alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP) is a susceptibility gene to drug/infection-induced hemolytic anemia. *Blood*. 2005;106:479a.
26. Feng L, Zhou S, Gu L, et al. Structure of oxidized alpha-haemoglobin bound to AHSP reveals a protective mechanism for haem. *Nature*. 2005;435:697-701.
27. Zhou S, Olson JS, Fabian M, Weiss MJ, Gow AJ. Biochemical fates of alpha hemoglobin bound to alpha hemoglobin stabilizing protein (AHSP). *J Biol Chem*. 2006.
28. Glock B, Winter M, Rennhofer SO, et al. Transcript level of erythroid differentiation-related factor, a candidate surrogate marker for transmissible spongiform encephalopathy diseases in blood, shows a broad range of variation in healthy individuals. *Transfusion*. 2003;43:1706-1710.
29. Forget BG. Molecular Mechanisms of β Thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, eds. *Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology and Clinical Management*. New York: Cambridge University Press; 2001:252-276.

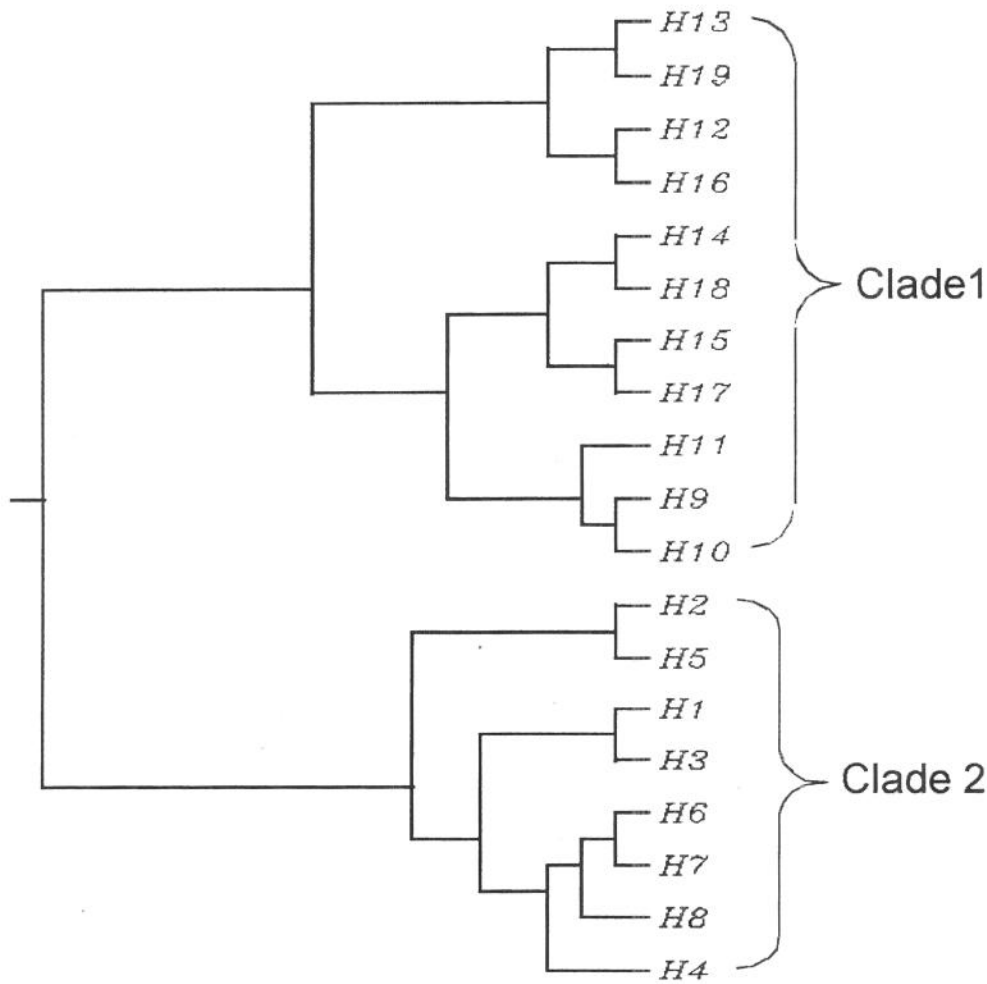
Figure Legends

Figure 1. Phylogenetic analysis of AHSP gene haplotypes. DNA sequences associated with each haplotype are described in Table 1.

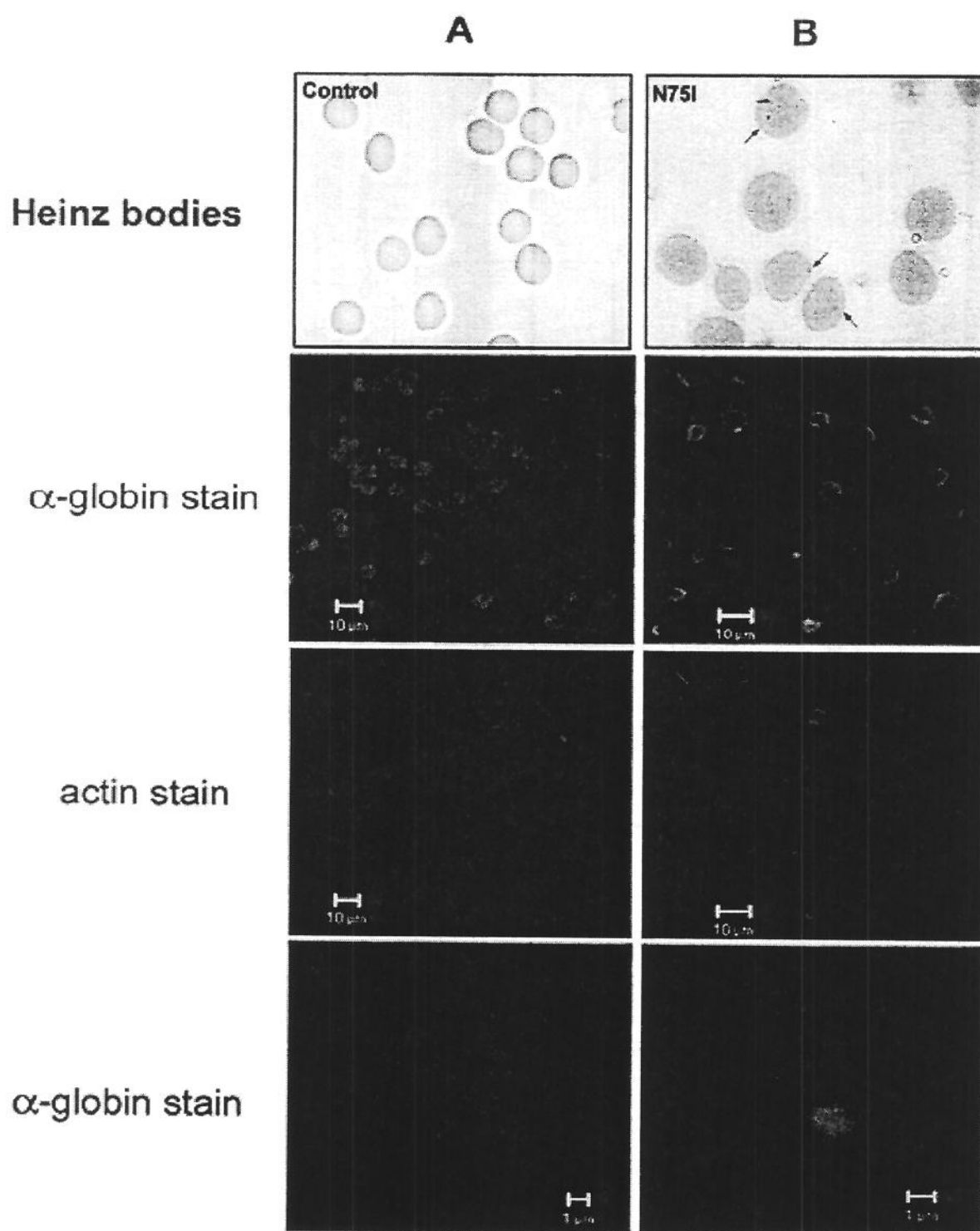
Figure 2. Hemoglobin precipitates (Heinz bodies) in AHSP N75I heterozygous erythrocytes. Right panels show erythrocytes from a normal control individual. Left panels show erythrocytes from an AHSP N75I heterozygote with normal β globin alleles. Heinz bodies indicative of precipitated hemoglobin, marked by arrows in the upper right panel, were detected by staining with methyl violet. The lower two panels show immunofluorescence staining with antibodies against α globin and β actin as control. Note that some N75I AHSP erythrocytes contain punctate foci of α globin staining (white arrows and inset). Micrographs in the top row were photographed with a Eclipse E-600 microscope using a $\times$ phase contrast objective and Image Pro-Express 4.0 software (Media Cybernetic, LP). The immunofluorescence studies (bottom two rows) were photographed using the same microscope and a 63X objective.

Figure 3. Biochemical interactions of recombinant AHSP N75I protein with purified α Hb. **A.** AHSP- α Hb interactions. AHSP binds oxygenated ferrous (FeII) α Hb to form an initial complex. Subsequently, O_2^- is lost to generate ferric (FeIII) α Hb-AHSP. This complex exhibits a bis-histidyl structure, which stabilizes bound α Hb and limits reactive oxygen species production by the heme iron. **B.** Surface plasmon resonance analysis of binding interactions between recombinant AHSP and purified (FeII) α Hb. Dashed line, wt

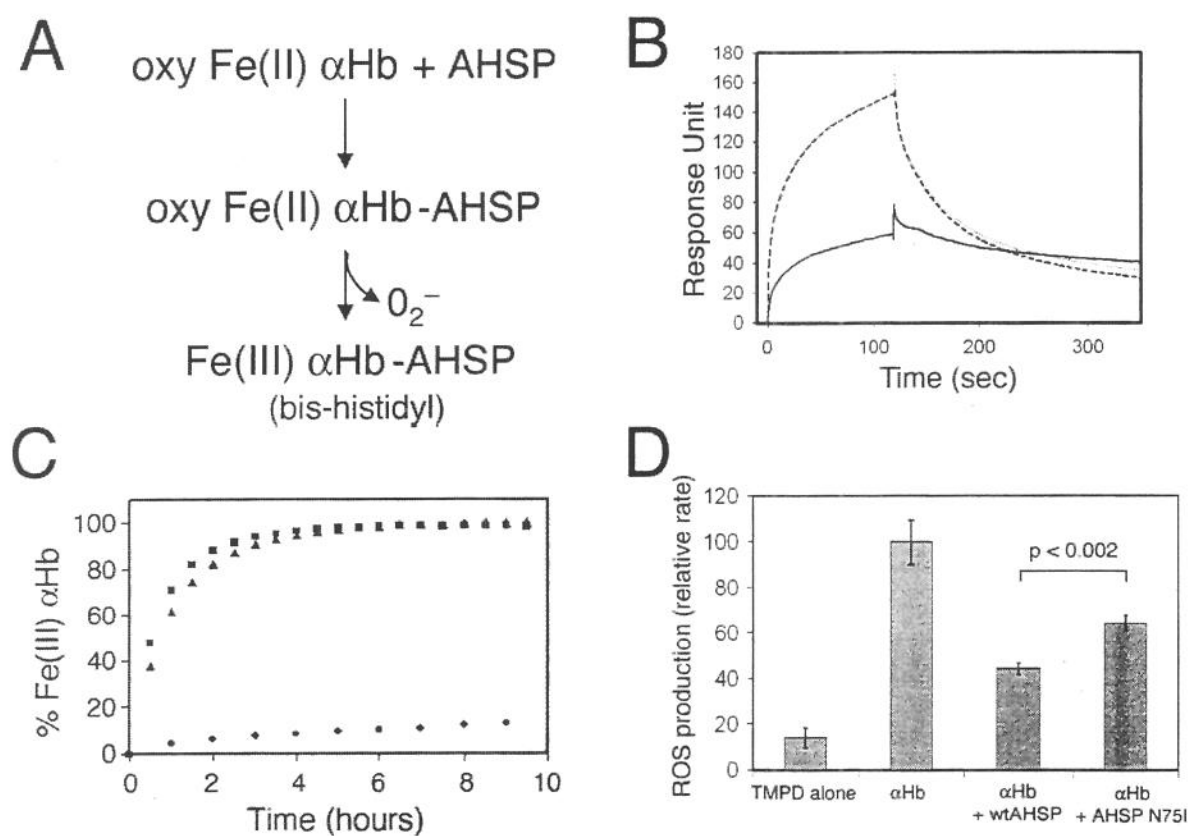
AHSP; solid line, AHSP D43R, a reduced binding mutant¹⁸; dotted line AHSP N75I. It is difficult to distinguish dotted from dashed lines because they are largely superimposed. **C.** AHSP-mediated oxidation of α Hb. Wt AHSP (squares) or AHSP N75I (triangles) were incubated at 1:1 molar ratio at 37° C. The oxidation of α Hb to the (FeIII) form was measured spectrophotometrically. The diamonds indicate spontaneous oxidation of α Hb with no AHSP added. **D.** Production of ROS by α Hb or α Hb-AHSP complexes. Recombinant AHSP proteins (20 μ M) were pre-incubated with equimolar oxy (FeII) α Hb for 30 minutes at 4°C, then mixed with hydrogen peroxide and TMPD, a ROS indicator dye. The initial rate of TMPD oxidation (y axis) was determined by light absorbance at 610 nm.



dos Santos et al. Figure 1



dos Santos et al. Figure 1



dos Santos et al. Figure 3

Regulation of Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein (AHSP) mRNA Stability by a 3-UTR Iron Response Element

Camila O dos Santos^{1,2*}, Louis C Dore^{2*}, Tracy Rouault, PhD^{3*}, Manik C Gosh, PhD^{3*}, Sara T Ollala, MD, PhD^{1*}, Fernando F Costa, MD, PhD^{1,4*} and Mitchell J Weiss, MD, PhD^{2,4}.

1. Center of Hematology and Hemotherapy, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil, 13083-970;
2. The Children's Hospital of Philadelphia, Philadelphia, PA, United States, 19104-4399 and
3. Cell Biology and Metabolism Branch, National Institutes of Health, Bethesda, MD, United States, 20892.
4. Co-corresponding authors:

Fernando F. Costa, University of Campinas, Center of Hematology and Hemotherapy, Campinas, SP, ferreira@unicamp.br, Phone: (19) 3788 8611

Mitchell J. Weiss, Children's Hospital of Philadelphia, Division of Hematology, 3615 Civic Center Blvd., Philadelphia, PA 19104, weissmi@email.chop.edu, Phone:(215) 590-0565

Supported by: The National Institutes of Health (grant R01 DK61692 [M.J.W.]), The Cooley's Anemia Foundation (S.Z), The General Clinical Research Center of The Children's Hospital of Philadelphia, Grant number 5-MO1-RR-000240, FAPESP and CAPES (COS).

ABSTRACT

AHSP is an erythroid protein that binds the alpha globin subunit of hemoglobin (Hb) to maintain its structure and limit its oxidative activity. Biochemical and genetic studies demonstrate that AHSP is essential for normal Hb homeostasis and may act via at least two mechanisms: First, as a molecular chaperone to promote the folding and stability of alpha globin prior to its incorporation into HbA ($\alpha_2\beta_2$). Second, to bind and detoxify excess alpha globin that accumulates in normal erythroid precursors, and to a larger extent, in beta thalassemic ones. The existence of a potential iron responsive element (IRE) in the 3'-UTR of the AHSP mRNA raises the interesting possibility that iron homeostasis impacts on alpha globin stability via AHSP. IREs form stem-loop structures that bind cytosolic iron-sensing proteins (IRPs). Several lines of evidence showed that the AHSP IRE binds IRPs to regulate mRNA stability in an iron-dependent fashion. Our findings indicate that AHSP mRNA stability is regulated by iron via an atypical 3'-UTR IRE. These findings extend the potential repertoire for functional IREs that do not conform to previously defined canonical consensus sequences. In addition, they provide a potential mechanism by which erythroid cells can regulate globin stability according to iron status. For example, induction of AHSP during iron deficiency might stabilize apo- alpha globin that could accumulate from lack of heme. Conversely, iron overload could destabilize alpha globin by reducing AHSP levels. As such, iron overload, which occurs in patients with beta thalassemia, might aggravate the disease by further elevating the levels of toxic free alpha globin.

INTRODUCTION

The adult major hemoglobin molecule is a tetramer formed by four polypeptide chains: two α -globins and two β -globins. Each of these chains is attached to a prosthetic group, the heme, formed by protoporphyrin IX complexed with an iron molecule. During hemoglobin synthesis, the coordinated production of α -globin and β -globin are essential to limit the accumulation of free subunits and iron excess, avoiding oxidative damages to the cell.

Iron by itself is one of the responsible for regulates the rate of hemoglobin production. The iron uptake is modulated by at least three factors: the amount of transferrin-bound iron available, the number of functional transferrin receptors on the cell surface, and, in iron-overload states and the amount of nontransferrin-bound iron. Erythrocyte regulates the appropriate compartmentalization of the internalized iron by changes in ferritin synthesis and transferrin receptor synthesis through an iron responsive system (IRE/IRP). IREs are stem-loop structures present in the untranslated regions (either 3' or 5'UTR) of mRNA that are recognized by iron-sensing (IRPs). When binding to IRPs, IREs regulates either translational level, IREs in the 5'-UTR of transcript (ferritin), and mRNA stability, IREs in the 3'-UTR of transcript (TfR).

In addition, the coupled synthesis of α - and β -globins is regulated by both erythroid-specific system (GATA1, EKLF) elements and heme-dependent system (Bach1, NF-E2). Heme iron regulates globins protein synthesis by directly regulating the activity of the heme-regulates inhibitor kinase, HRI. HRI regulates the synthesis of both globins by inhibiting the general translation initiation factor eIF2. This inhibition occurs when the intracellular concentrations of heme is low. When the heme concentration is high, heme

bins to HRI, inhibiting the kinase activity. In addition to translation regulation, heme induces transcription of globin gene by displacing the transcript factor Bach1, a transcription repressor.

However, despite the complex system to coordinated globin synthesis, the presence of a potential α -globin chaperone has been demonstrated as an important factor for successful hemoglobin formation. Alpha Hemoglobin Stabilizing Protein (AHSP) is an abundant erythroid protein that specifically binds free α -globin, stabilizing its structure, and limits its ability to participate in chemical reactions that generate free oxygen species. AHSP prevents free α -globin from precipitating in vitro, whether spontaneously or after oxidation of heme.

Like a chaperone, AHSP keeps a bound α -globin under control only until the latter encounters β -globin subunits, to form hemoglobin. Gene knockout studies in mice demonstrated short-lived erythrocytes with Hb precipitates, which can exacerbate β -thalassemia indicating that altered AHSP expression or function could modify thalassemia. The identification and characterization of regulatory elements that control AHSP gene expression might have important implications for normal erythropoiesis and for human disease.

A comprehensive secondary structure on AHSP mRNA has been proposed here, based in the presence of one atypical IRE-like structural element. Additional support for this model of IRE/IRP complex structure comes from binding studies performed *in vitro* and *in vivo* that indicated the ability of the AHSP IRE to bind to IRP1 and IRP2. The levels of AHSP mRNA upon iron conditions positively correlated with the levels of transferrin receptor mRNA in human and murine cell lines, indicating that the AHSP mRNA

posttranscriptional regulation occurs at the level of mRNA stability in an iron-dependent fashion.

An iron-sensing system regulating the AHSP gene would elucidate new potential mechanisms for the α -globin binding protein. Under conditions of iron deficiency, the increased mRNA stability would ensure higher levels of protein, which would stabilize apo- α -globin. In normal situations, when iron is constantly present in the cell, certain levels of AHSP mRNA degradation would prevent increased protein synthesis, which could compete with β -globin for binding to α -globin.

However, the presence of an iron-responsive element regulating the mRNA stability of AHSP might not be helpful in correlate AHSP levels as a genetic modifier in β -thalassemia. The ineffective erythropoiesis and hemolytic anemia in patients with β -thalassemia promotes a severe case of iron overload in these patients, which would decrease the AHSP mRNA levels, independent of the clinical severity.

Taken all together, our results helps to better understand the AHSP importance in normal erythropoiesis and suggests new implications of the α -globin like-chaperone protein in red blood cells disorders.

MATERIALS AND METHODS

Databases, Bioinformatics – To search for putative IREs on AHSP mRNA, the RNAProfile program was used at <http://www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/> (12), which is an algorithm capable of characterizing regulatory motifs in mRNA, like IREs. The AHSP sequences used in this study were obtained from NCBI Genbank.

Electrophoretic mobility-shift assay – The human erythroleukemic cell line K562 was cultured in IMDM with 10% fetal calf serum. During the final 16 hours, the cells were treated with 100 μ M desferrioxamine (Novartis) or 50 μ M Hemin (Sigma). Cells were washed with ice-cold PBS buffer. The pellet was lysed with ice-cold buffer (30mM EDTA pH 7.4, 25mM Tris-HCl, 1% Triton X-100, 1U/ml RNaseOut and Protease Inhibitor Cocktail) for 30 minutes on ice and centrifuged. Supernatant was collected and immediately frozen in liquid nitrogen. Protein concentration was determined by a Bio-Rad protein assay (Bio-Rad). DNA templates for T7 RNA polymerase were generated by hybridization of 900 μ M of oligonucleotides in 50 μ M NaCl and 1mM EDTA (table 1). The reaction was incubated 5 minutes at 95°C followed by room-temperature incubation for 2 hours and then used for RNA preparation. Radioactive probe using [α -³²] CTP as well as a competitor RNA were synthesized in parallel by T7 RNA polymerase (Invitrogen) according to the manufacturer's manual. Electrophoretic mobility-shift assay (EMSA) was performed mixing 5 μ g of cellular extracts with xng of radiolabeled RNA probe. The reaction was loaded onto a 6% native polyacrylamide gel.

Measurement of AHSP mRNA stability assay – K562 cells were grown in IMDM supplemented with 10% fetal calf serum and Hydroxiurea for 48 hours. Where indicated, Desferrioxamine (DFO - 100 μ M) or Iron (III) ammonium citrate (FAC- 1mM) was added for 16 hours prior to the addition of an inhibitor of transcription. Actinomycin- D (Sigma - 5 μ M/ml) was added to the culture medium for 8 hours to inhibit transcription. Cells were then washed with cold PBS buffer and RNA extracted using Trizol (Invitrogen). cDNA was produced using oligo(dT(18)) and SuperScriptII reverse transcriptase (Invitrogen) following enclosed protocol. The levels of AHSP mRNA were measured three times by real time PCR. GAPDH was used as an internal standard because its mRNA is stable under various iron concentrations (10). c-myc (short half-live) and α -globin (stable mRNA) were used as intra-experiment controls (___). AHSP IRE_WT and IRE_MT mRNA stability were measured in transfected cells from the monkey kidney cell line (COS-7). COS-7 cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum, antibiotics and with or without Desferrioxamine (100 μ M) or Hemin (50 μ M), were transfected with plasmids containing the AHSP_IRE_WT and AHSP_IRE_MT sequence. The full-length AHSP-IRE-WT and AHSP-IRE-MT were amplified by PCR. The AHSP gene was cloned into *EcoRI* site of pEF1- α ^{NEO}. 3 μ g of plasmids were used for transfection using FUGene reagent (____), according to the manufacture's recommendation. Transcription was stopped by addition of transcription. Actinomycin- D (Sigma - 5 μ M/ml) was added to the culture medium for 4 hours. RNA extraction and real-time PCR were performed as described above.

RNA IP – The immunoprecipitation of AHSP mRNA by IRP1 or IRP2 was performed as described by Waggoner et al () with some modifications. Protein G-Sepharose (PAS) (Invitrogen) was washed three times in cold PBS buffer. One hundred microliters of 50% slurry of PAS and PBS was incubated with 10ug of anti-IRP1 or anti-IRP2 antibodies (Santa Cruz) in the presence of 40U of RNAOut (Invitrogen) in PBS in a volume of 1.0ml. The mixtures were incubated for 1h at 4°C, and the PAS was washed once with PBS. Cellular extracts were prepared from K562 treated with Desferal or Iron (III) or without treatment. Cells were harvest by centrifugation at 2000 RPM for 5 minutes at 4°C and washed twice with 1.0ml of cold PBS buffer. After sedimentation at 2000RPM for 5 minutes at 4°C, the pellets were resuspended in 3 volumes of extraction buffer (15mM Tris HCl [pH 7.4], 15mM MgCl₂, 150mM NaCl, and 0.65% Igepal). The lysate was incubated on ice for 10 minutes with shaking and centrifuged at 13000 RPM for 5 minutes at 4°C. The cytoplasmic lysate (2.1mg/IP) was diluted fourfold in binding buffer (BB) (20mM Hepes [pH 7.9], 150mM NaCl, 0.05% Triton X-100 and 0.15U/μl of RNAOut) and incubated with the PAS for 1 hour at 4°C. The PAS was washed twice in BB buffer, twice with wash buffer (WB) (20mM Hepes [pH 7.9], 150mM NaCl , 1% Triton X-100 and 0.15U/μl of RNAOut) and then transferred to a fresh tube. The PAS was pelleted and resuspended in elution buffer (100mM Tris-HCl [pH 7.4], 12.5mM EDTA, 150mM NaCl, and 1% SDS). The mixture was boiled for 3 minutes, Trizol extracted, ethanol precipitated with 20μg glycogen and resuspended in 20μl of DEPC-H₂O. cDNA was produced using 5μl of co-purified RNA as described previously. The levels of AHSP mRNA were measured three times by real time PCR. GAPDH was used as negative control. Ferritin mRNA was quantified as positive controls for the IPs.

TABLE 1 – Primer sequences

Gene	Primer set (Forward and Reverse) →
AHSP_IRE-WT ^a	5'-ACA GAG AGA TTC ACG CAC C-3'; 5'-CAA CAA AAC CAG CAG TGG TCT TTA TTG AGG -3'
AHSP_IRE-MT ^a	5'-ACA GAG AGA TTC ACG CAC C-3'; 5'-CAA CAA AAC CAG CAG TGG TAC TCA TTG AGG-3'
AHSP_RT ^{b,c}	5'-CAATAAGGATCTCATTTCCG-3'; 5'-GAGGATCATTGAAGACCTGCTGA-3'
GAPDH_RT ^{b,c}	5'-CCACATCGCTCAGACACCAT-3'; 5'-CCAGGCGCCCAATACG-3'
c-myc_RT ^b	5'- ACCAGATCCCGGAGTTGGA-3'; 5'-CGAGTCCGAGGAAGGAGAGA-3'
α-globin_RT ^b	5'- GTTAAGGGCCACGGCAAGAA-3'; 5'- GGCTTAGGAGGTTGAAGTTG-3'
Transferrin Rec_RT ^c	5'- AGATTTTCGGGAATGCTGAGAAA-3'; 5'- AGGGAGAGAGGAAGTGATAC-3'
Ferritin_RT ^c	5'- AACATGCTGAGAACTGATG-3'; 5'- GCACACTCCATTGCATTTCAGC-3'
AHSP_PR_WT ^d	5' CAATAAAGACCAGTGCTGGTTTTGTTGTATAGTGAGTCGTATTA 3'
AHSP_PR_MT ^d	5'CAATGAGTACCAGTGCTGGTTTTGTTGTATAGTGAGTCGTATTA 3'
Ferritin_PR ^d	5'GGGTTCCGTCCAAACACTGTTGAAGCAGGAAACCCTTATAGTGAGTCGTATTA 3'

^a set of primers used for plasmid constructs

^b set of primers used for real time PCR on mRNA stability assays

^c set of primers used for real-time PCR on IP assays

^d EMSA probes; underlined sequence - T7 RNA polymerase recognition site

RESULTS

Identification of a putative IRE in the 3'-UTR of the AHSP mRNA

During the course of a program to study the natural variation in the sequence of the AHSP gene, a consensus region of six nucleotides at the 3'-UTR region of the mRNA molecule was identified. The six-nucleotide motif had the same nucleotide composition as the motif present in the stem-loop head of iron responsive elements (IRE). The most common criteria for evaluation of IREs on mRNAs is based on the secondary structures of two canonical IRE hairpins: (a) in the upper stem only one G-U pairing allowed within the three middle base pairs; (b) a lower stem at least five base pairs long with less than three G-U (Gunshin) (figure 1A). However, experimental observation has discovered some exceptions to the rule (Sierzputowska-Gracz, Guo, Butt, Huang).

By using the RNAprofile program, a software program able to predict typical and atypical candidates for IRE regions (---), we were able to predict an atypical secondary structure for the human AHSP mRNA. Comparison of the human AHSP mRNA with the previously identified IRE sequences of TfR and Ferritin reveal the six conserved nucleotides, however the upper-loop composition presented just four nucleotides (figure 1B). Another unusual feature of the AHSP IRE is a bulged A, once TfR and Ferritin IREs presents a bulged C.

The mouse AHSP IRE did not presented the conserved six nucleotide motif although presented an upper-stem composed by six-nucleotides. The stem conformation showed similarities with IREs from CDC14A and DMT1, presenting a bulged U and a bulged C (figure 1B). The AHSP IRE was either conserved in another mammalian species as monkeys, dogs and cows (figure 1C).

For further studies, a human AHSP IRE three point mutation was generated (figure 1D)

***In vitro* and *In vivo* binding of IRPs to the AHSP IRE**

To demonstrate the specificity of the *in vitro* AHSP IRE/IRPs interactions, gel electrophoretic retardation assays were performed to study whether IRPs can interact *in vitro* with the AHSP IRE. Cell extract from erythroleukemia cell line K562 was incubated with the ³²P-CTP-labelled RNA oligonucleotides containing IREs derived from the AHSP IREs and from the 5' UTR human ferritin heavy-chain IRE.

The result demonstrated an IRE/IRP complex co-migrated with the ferritin IRE probe for the human, mouse, monkey, dog and cow AHSP IRE (figure 2A). Supershift experiments with specific anti-IRP1 or anti-IRP2 antibodies were performed to demonstrate the specificity of the observed IRP/IRE interactions. Either ferritin or human and mouse AHSP IRP/IRE were displaced by the addition of the specific antibodies (figure 2B).

To test these hypothesis *in vivo*, IRP-containing complexes were immunoprecipitated from cytosolic extracts of Hela cells transiently transfected with plasmids containing the AHSP full-length cDNA. RNAs isolated from the immunoprecipitates were assayed for AHSP mRNA, ferritin mRNA and for GAPDH mRNA, by real-time PCR. While IRPs complexes immunoprecipitated contained abundant amounts of AHSP mRNA and ferritin mRNA, just trace levels of the GAPDH mRNA were detected, suggesting, first, the specificity of the experiment and, second, recognition of the AHSP IRE by IRPs (figure 3A). However, the IRPs complexes immunoprecipitation failed to bring down the mutant (MT) AHSP mRNA (figure 3B).

The addition of an iron source, Iron(III) citrate ammonium, to the transiently transfected cells decreased the amount of mRNA pull-down by IRPs, suggesting decreased

affinity to the AHSP IRE in the presence of iron. The treatment of HeLa cells with DFO allowed the immunoprecipitation of AHSP mRNA, suggesting that the IRE present at the 3'-UTR of the AHSP mRNA might be directly bound by IRPs in a manner dependent on iron status (figure 3C).

The statistical significance observed on the pulled-down mRNA levels by IRP2 immunoprecipitation, upon DFO treatment ($p < 0.05$) agrees with the suggested iron-response mechanism for this IRP, when intracellular iron is scarce, IRP2 binds IREs with high affinity (Guo 1995). The levels of IRP1 were measured by western blot in cell extract treated with DFO and/or iron (III), but no differences on protein levels were observed (data not show).

Taken together, these data demonstrate that the predicted atypical IRE at 3'-UTR of the AHSP mRNA is recognized by IRPs, *in vitro* and *in vivo*, in a iron-sensing status, similar to the IRE/IRP complexes described in ferritin and transferrin receptor (ref.)

AHSP mRNA stability is controlled by iron levels

The best-characterized IRE-containing mRNA encodes the transferrin receptor (TfR), which plays a critical role in cellular iron uptake. Iron starvation induces IRPs binding to the multiple IREs in the 3'-UTR of the TfR mRNA, resulting in its stabilization. However, high levels of iron release the IRPs from the IREs, leading to mRNA degradation. To assess the function of the AHSP IRE, the half-life of the mRNA was measured in K562 cells and MEL cells (supplement data) cultured in the presence of DFO and/or iron (III). Actinomycin-D was added to the cell culture for up to 8 hours to stop transcription, and the kinetics of AHSP mRNA decay was studied. As internal controls, the α -globin mRNA was measured, as this mRNA it is very stable; *c-myc* mRNA has also

examined as this mRNA has a half-life of about 30 minutes (ref.). The analysis of the AHSP mRNA levels in cells treated with DFO suggested a very stable mRNA with a half-life >8 hours (figure 4A). However, in cells treated with iron (III), the AHSP mRNA was more rapidly degraded (half-life 4 hours). The same effect was observed when the transferrin receptor mRNA was analyzed (figure 4B). The levels of the stable control gene α -globin did not change in response to both treatments (figure 4C) and the levels of the instable control, gene *c-myc*, was rapidly degraded independent of the cell treatment (figure 4D).

The half-life of the mutant AHSP IRE, demonstrated by EMSA and RNA IP as presenting decreased affinity to IRPs was analyzed as well. COS-7 cells treated with DFO and/or hemin were transiently transfected with plasmids containing the AHSP full-length cDNA without (WT) or with (MT) mutations and the half-life were analyzed by addition of actinomycin-D. The results obtained by the analysis of the wild type AHSP IRE mRNA half-life were similar to those from K562 cells experiment, showing a stable mRNA in cells treated with DFO and an unstable mRNA in cells treated with iron (figure 5A). Although, the mutate AHSP IRE mRNA was more rapidly degraded either DFO or heme treatment (figure 5B).

These results demonstrate that AHSP has IRE at the 3'-UTR of the mRNA that functions to regulates the stability of the mRNA in response to iron levels, in a manner similar to transferrin receptor.

DISCUSSION

Although the absence of AHSP gene in mice demonstrated α -hemoglobin precipitation in red blood cells and shortened erythrocytes half-life, not much is known about how the AHSP gene expression would correlate with ineffective erythropoiesis or act as genetic modifier in β -thalassemia.

A variety of studies have been reported trying to understand the AHSP gene expression. So far, it is known that the AHSP gene expression is synchronized with α -globin gene expression during maturation of human red blood cells precursors (___), and reduced levels AHSP expression could be associated with more severe phenotype among individuals with identical β -thalassemia.

Several studies have been searching for regulatory motifs and mutations on AHSP. Viprakasit et al (2004), genotyped 120 Thai patients with varying severities of Hb E/ β -thalassemia for the common sequence variants in AHSP gene. Two distinct haplotypes for AHSP were proposed, however no mutations or specific associations were found between extended AHSP haplotypes and severity in these patients. In another study, the analysis of AHSP mRNA levels in peripheral blood reticulocytes reported an inter-individual variation of AHSP expression, that could be correlated with the length of a homopolymer dT region upstream the AHSP gene (Lai et al, 2006).

Here we described a novel regulatory motif on AHSP gene. In our study, nucleotide analysis and biocomputational approach were used in combination with biochemical methods to identify a novel iron responsive element (IRE) at 3'-UTR of AHSP mRNA, present in human, mouse, monkey, dog and cow (figure 1).

The mouse AHSP IRE loop sequence ACUUUG has never been studied during the investigation of optimal sequences and structure of IREs, although presents the first and fifth positions of the hairpin loop forming a Watson-Crick pair and presents a bulged C and a bulged U, already described in previous IREs. However, the human, monkey, dog and cow AHSP IREs does not fit in the classical features for IREs: a stem loop sequence composed by four nucleotides (GUGC) and, in human, monkey and dog, a bulged A.

Binding of IRPs to AHSP IREs was confirmed by EMSA. When lysates from the human erythroleukemia K562 cell line were used in the EMSA reactions, a similar intense band likely corresponding to IRP/IRE complexes can be observed (figure 2). Immunoselected IRP/IRE mRNPs were assayed by using specific antibodies against IRP1 and IRP2 proteins in HeLa cells transiently transfected with human AHSP plasmids. The immunoprecipitation of ferritin mRNA, as well human AHSP IRE-WT mRNA suggested a potential non-canonical IRE-like motif capable to be recognized by IRP1 and IRP2, in response to iron levels (figure 3).

Several studies have been attempted to identify novel IRE-containing IREs. Although database searches for the alternative ligands have not yielded any obvious candidates for transcripts that are regulated by IRPs. Studies demonstrating variations on the IRE main features, as screening of loop mutations, bulges nucleotides and stem length agree with the fact that the absolute conservation of the stem-loop motifs would affect the strength and or the specificity of the IRPs binding. In this study, we are suggesting that an atypical IRE still can be recognized by IRPs.

The mRNA levels studies demonstrated a function of the AHSP IRE nearly the same as the transferrin receptor (TfR). It has been shown that the stability of TfR mRNA is

regulated by iron levels through the presence of IRE at 3'-UTR of the mRNA. Under conditions of low iron, the AHSP IRE mediated the stability of the mRNA. Indeed the addition of iron (III) to the culture medium resulted in a degradation of TfR Mrna, as well the AHSP mRNA. Furthermore, by changing the IRE structure, the AHSP mRNA was instable even when DFO (iron chelator) was added to the culture medium, suggesting that AHSP mRNA stability is controlled by intracellular iron levels via the IRE in its 3'-UTR.

However, how is AHSP mRNA degradation regulated? It was demonstrated that the TfR mRNA degradation involved an endonucleolytic cleavage located directly behind the IRE C. Comparison of the AHSP IREs locus with the previously identified 3'-UTR IRE sequences of TfR1 and DMT1, reveals the presence of the potential endonucleolytic cleavage site upstream of the IRE loci in humans, mouse, monkey and dog, but not in cow. Although the flanking regions are not well conserved among DMT1, CDC14A, TfR and AHSP, this motif might be functionally important.

AHSP is an abundant erythroid specific protein that forms a stable complex with multiple forms of α -hemoglobin, reflecting multiple functions that predominate under different circumstances of normal or pathological Hb metabolism. The most believed implications of AHSP it appears to be as a mechanism to coordinate normal Hb synthesis as such a potential modifier gene to β -thalassemia. The regulation of the AHSP gene expression by an IRE system as a post-transcriptional regulation might suggest new physiological implications to this protein.

Studies from the biochemical properties of AHSP (Gell) suggested that AHSP and α -globin bind each other to form a complex with 1:1 subunit stoichiometry and differences in the ratio AHSP/ α -globin could have consequences for oxygen transport, by competing

with β -globin. Since erythropoiesis is accompanied by extreme demand of iron to ensure proper hemoglobinization, the control of AHSP mRNA stability by iron levels through IRE would prevent AHSP accumulation and further competition with β -globin.

But why should be AHSP mRNA more stable in iron deprivation status? It is of interest to note that AHSP, as mentioned before, complex with multiple forms of α -hemoglobin, including apo- α -globin polypeptide, which lacks heme. In some red blood cells disorders, as anemia by iron deficiency, apo- α -globin it is very instable and precipitate on erythrocytes. The increase of AHSP protein levels would prevent α -globin precipitation and prevent cell damage, which could lead to a severe anemia.

IRP2- deficient mice display mild microcytosis with altered iron distribution, suggesting a potential function of IRP2 in normal erythropoiesis. Would be interesting evaluate the AHSP levels in that system since the phenotype was similar to AHSP^{-/-} mice.

Taken all together, our results indicate that AHSP mRNA stability is regulated by iron levels via atypical IRE system present at 3'-UTR. The implication of this post-transcriptional regulation helps to better understand the AHSP importance in normal erythropoiesis and suggests new implications of the α -globin like-chaperone protein in red blood cells disorders.

LEGENDS

Figure 1. Identification of an IRE element at the 3' end of the *AHSP* gene. A. Structure of the *AHSP* gene with IRE stem loop in the 3' untranslated region. Exons are shown as rectangles with coding regions in grey and untranslated regions black. B. IRE sequences and secondary stem-loop structure from human (h) and mouse (m) *AHSP* mRNAs. B. Two canonical IRE structures, showing a C-bulge, a 5 nucleotide distal stem and a 6 nucleotide loop.

Figure 2 – Specific binding of a cytoplasm protein to the iron regulatory region on human *AHSP* mRNA – Labeled *in vitro* transcribed RNAs (0.5µg) corresponding to the IRE-like sequence portion of human *AHSP* mRNA and to the IRE-like sequence portion of human ferritin mRNA were incubated with cell extract (15µg of protein) from human erythroleukemia cell line (K562). (A) *AHSP*^{WT} probe complexes with possible IRE binding proteins, as Ferritin IRE probe, but not *AHSP*^{MT} probe; Lane 1 - Ferritin IRE probe; Lane 2 – *AHSP*-IRE^{WT} probe; and Lane 4 – *AHSP*-IRE^{MUT} probe. (B) Secondary structure of mutant probe for the IRE on *AHSP* mRNA. (C) Iron status release IRE-BP from binding to *AHSP*-IRE; Lane 1 - cell extract from non-treated cells; Lane 2 - cell extract from cells treated with 100µM of iron chelator (Desferrioxamine); Lane 3 - cell extract from cells treated with 50µM of iron source (Hemin) and Lane 4 - cell extract from non-treated cells plus 100-fold molar excess of unlabeled *AHSP* probe. Samples were electrophoresed in a nondenaturing 4% acrylamide gel.

Figure 3. Co-immunoprecipitation of *AHSP* mRNA with IRE-binding proteins IRP1 and IRP2. HeLa cells were transiently transfected with human *AHSP* cDNA under the control of a tetracycline-regulated promoter and the mRNA was induced for 24 hours. *AHSP*^{wt} refers to the wild-type mRNA; *AHSP*^{mut} mRNA contains three point mutations that disrupt the stem-loop structure to inhibit IRP binding. Cytoplasmic extracts from transfected cells were incubated with specific antibodies for IRP1, IRP2 or control IgG. Antibody complexes were purified using protein G beads and bound mRNAs were quantified by real-time RT PCR. The Y-axis shows relative mRNA levels normalized to input (non-immunoprecipitated) RNA from each sample. A. IRP1 and IRP2 bind *AHSP*^{wt} and endogenous Ferritin H mRNAs, but not *AHSP*^{mut} or GAPDH mRNAs. B. The effects of desferroximine (DFO) or ferric ammonium citrate (FAC) on IRP binding to *AHSP*^{wt} mRNA. Data represent values from 3 independent experiments. FAC treatment blocks IRP binding to *AHSP* mRNA. In addition binding of IRP-2 to *AHSP* mRNA is significantly enhanced by DFO treatment compared to untreated control cells ($p < 0.05$, T-test).

Figure 4. Iron destabilizes endogenous *AHSP* mRNA in K562 erythroleukemia cells. Cells were treated with FAC or DFO for 16 hours, then new mRNA synthesis was arrested by actinomycin-D (act-D), 5 μ M. Messenger RNA levels for *AHSP* (upper left panel) and controls were measured by real-time RT-PCR and normalized to GAPDH mRNA. Control mRNAs include: transferrin receptor (*TfR*), which is destabilized by iron, α globin, a stable, iron-independent mRNA, and *MYC*, a constitutively unstable mRNA. Data represent

values from 3 independent experiments. * $p < 0.05$ for FAC treated samples at $t = 0$ vs 4 and 8 hrs, T-test.

Figure 5. The AHSP IRE confers iron-regulated mRNA stability. COS cells were transiently transfected with expression plasmids encoding wild-type (wt) and IRE mutant (mut) AHSP cDNAs. Cells were treated for 16 hours with desferrioxamine (DFO) or hemin (hem) as a source of iron. AHSP mRNA was quantified by real-time PCR at 0 and 4 hours after addition of actinomycin D, 5 μ M. AHSP mRNA levels are normalized to

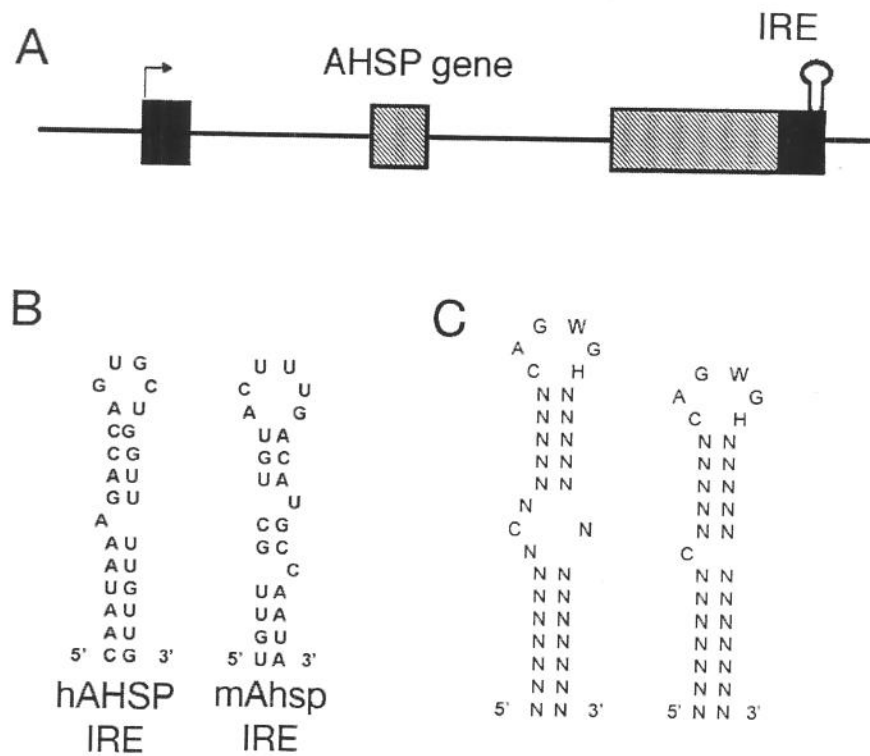


Figure 1 dos Santos et al.

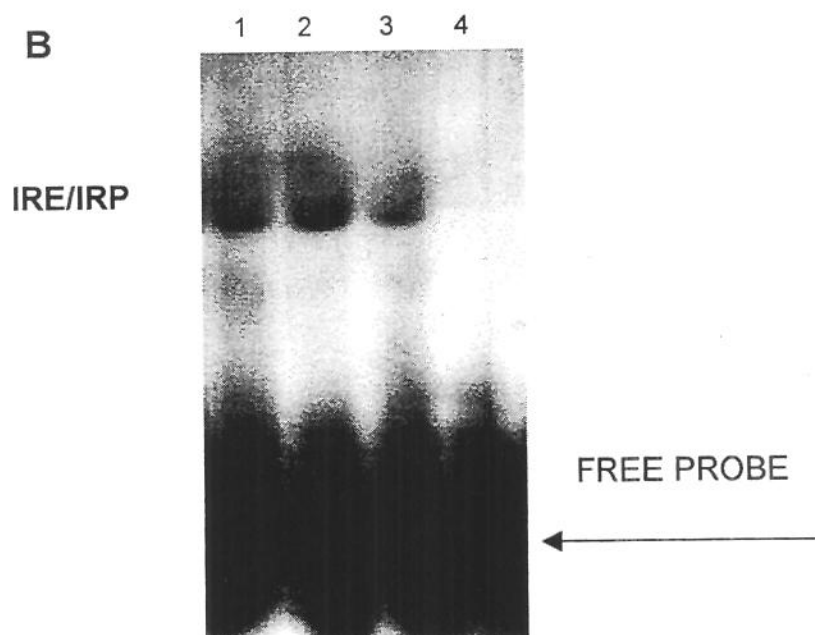
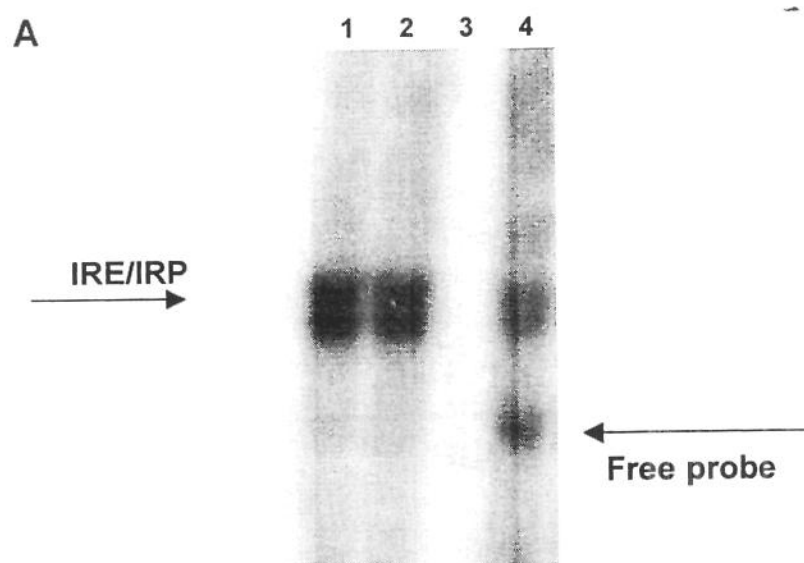


Figure 2 dos Santos et al

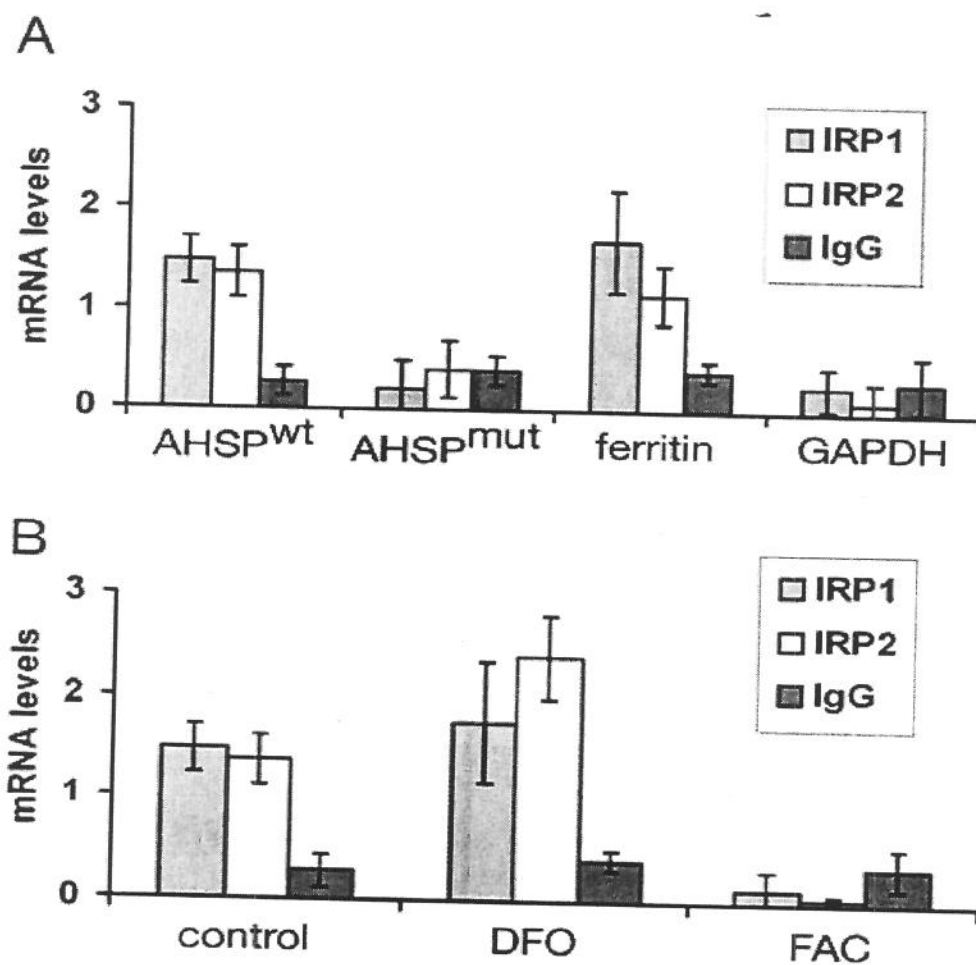


Figure 3 dos Santos et al.

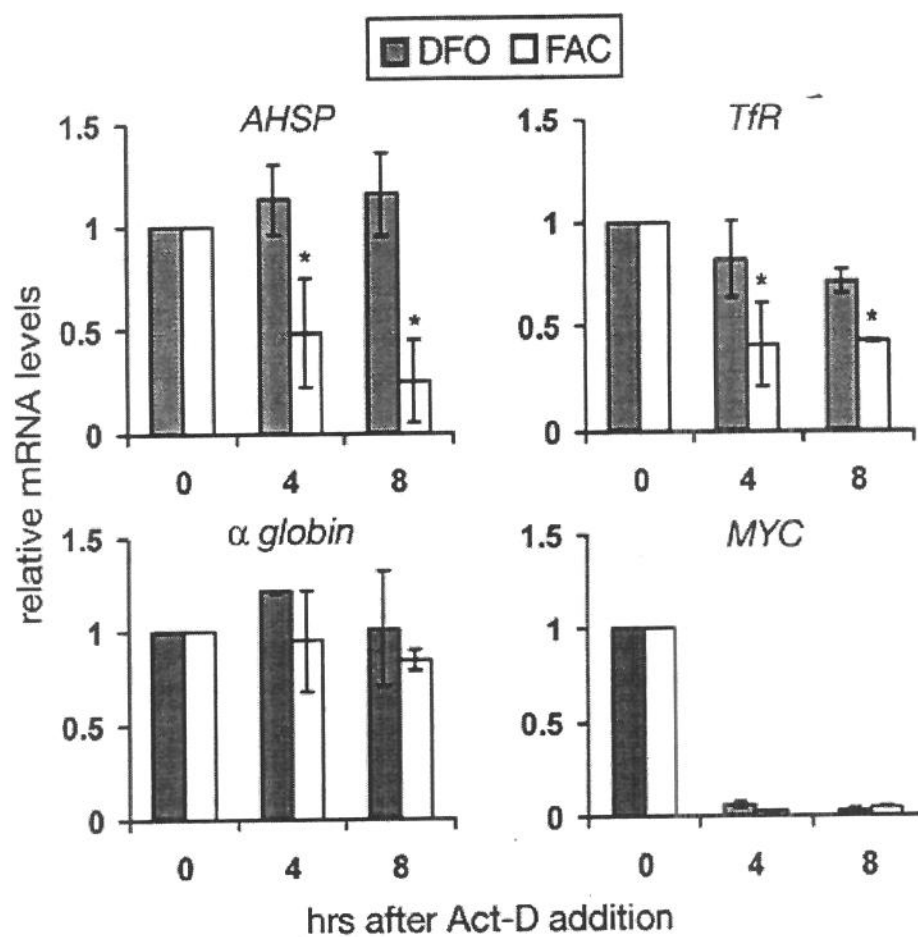


Figure 4 dos Santos et al.

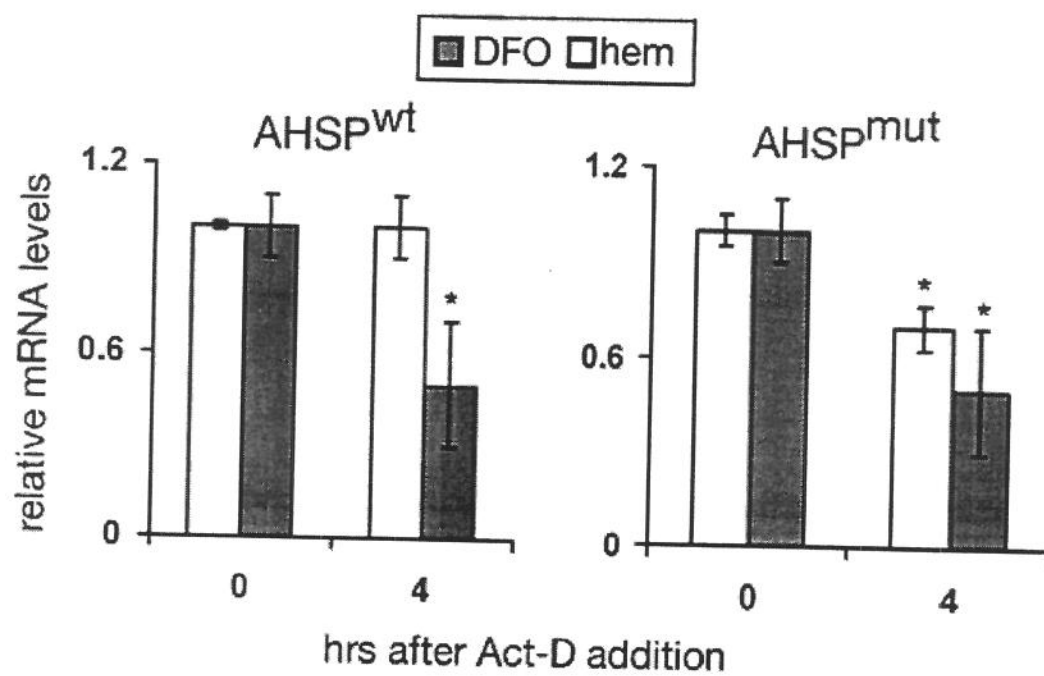


Figure 5 dos Santos et al.